HAL
open science

# Structuration écologique et évolutive des symbioses mycorhiziennes des orchidées tropicales

Florent Martos

## To cite this version:

Florent Martos. Structuration écologique et évolutive des symbioses mycorhiziennes des orchidées tropicales. Biologie végétale. Université de la Réunion, 2010. Français. NNT : 2010LARE0019 . tel-00732894

**HAL Id: tel-00732894**

**https://theses.hal.science/tel-00732894**

Submitted on 17 Sep 2012

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

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

Université de La Réunion – École doctorale Sciences Technologie Santé – Faculté des Sciences et des Technologies

# Structuration écologique et évolutive des symbioses mycorhiziennes des orchidées tropicales

## Thèse de doctorat

présentée et soutenue publiquement le 19 novembre 2010

pour l'obtention du grade de

**Docteur de l'Université de la Réunion**

**(spécialité Biologie des Populations et Écologie)**

par

Florent Martos

**Composition du jury**

| | |
|---|---|
| *Présidente :* | Mme Pascale Besse, Professeur à l'Université de La Réunion |
| *Rapporteurs :* | Mme Marie-Louise Cariou, Directrice de recherche au CNRS de Gif-sur-Yvette<br>M. Raymond Tremblay, Professeur à l'Université de Porto Rico |
| *Examinatrice :* | Mme Pascale Besse, Professeur à l'Université de La Réunion |
| *Directeurs :* | M. Thierry Pailler, Maître de conférences HDR à l'Université de La Réunion<br>M. Marc-André Selosse, Professeur à l'Université de Montpellier |

# Résumé

Les plantes n'exploitent pas seules les nutriments du sol, mais dépendent de champignons avec lesquels elles forment des symbioses mycorhiziennes dans leurs racines. C'est en particulier vrai pour les 25 000 espèces d'orchidées actuelles qui dépendent toutes de champignons mycorhiziens pour accomplir leur cycle de vie. Elles produisent des graines microscopiques qui n'ont pas les ressources nutritives pour germer, mais qui dépendent de la présence de partenaires adéquats pour nourrir l'embryon (hétérotrophie) jusqu'à l'apparition des feuilles (autotrophie). Les mycorhiziens restent présents dans les racines des adultes où ils contribuent à la nutrition, ce qui permet d'étudier plus facilement la diversité des symbiotes à l'aide des outils génétiques. Conscients des biais des études en faveur des régions tempérées, nous avons étudié la diversité des mycorhiziens d'orchidées tropicales à La Réunion. Nous avons montré que (1) les orchidées tropicales ont des partenaires semblables aux orchidées tempérées et méditerranéennes (Sebacinales, Ceratobasidiaceae et surtout Tulasnellaceae), et que ces taxons de champignons sont largement représentés dans différents biomes et dans différentes plantes hôtes. Nous avons aussi démontré pour la première fois que (2) les orchidées épiphytes (dont les associations étaient peu connues) ont des cortèges mycorhiziens différents de ceux des orchidées terrestres dans les communautés tropicales. De plus, en développant une approche à l'échelle de réseaux d'interactions (78 espèces de La Réunion), nous avons montré que (3) les espèces tropicales ont tendance à être généralistes et que (4) le réseau mycorhizien des orchidées montre des propriétés semblables à celles des réseaux d'interactions mutualistes (*nestedness* et asymétrie d'interaction), alors que la nature mutualiste de cette symbiose mycorhizienne fait débat. Dans un second volet de la thèse, nous avons étudié les partenaires des orchidées non chlorophylliennes (mycohétérotrophes) tropicales. Nous avons montré que (5) les espèces tropicales peuvent s'associer à des champignons saprophytes qui les nourrissent en carbone issu de la décomposition de la litière dans les forêts tropicales humides et que (6) les modèles tropicaux (en n'étant pas spécifiques) remettent en question les idées reçues sur la mycohétérotrophie des plantes. Nous avons confirmé que (7) la my-

cohétérotrophie dérive d'un régime nutritionnel intermédiaire (mixotrophie) mis en place dans des lignées chlorophylliennes. Dans un dernier volet de la thèse, nous avons posé la question du déterminisme phylogénétique des associations orchidées-champignons. En analysant la force du signal dans les phylogénies des deux partenaires, nous avons vérifié que (8) les associations mycorhiziennes sont peu conservées à l'échelle supra-générique dans la phylogénie des orchidées, et qu'elles (9) peuvent être maintenues à une échelle plus récente (cas de certains clades d'angraecoïdes). Ces résultats soulignent l'empreinte relative des processus écologiques et évolutifs sur les patrons d'associations actuels, et remettent en question l'idée qu'un processus de coévolution pourrait guider le système.

Mots clés : symbioses mycorhiziennes ; Orchidaceae ; forêts tropicales ; épiphytisme ; réseaux d'interactions ; *nestedness* ; signal phylogénétique ; coévolution ; mycohétérotrophie ; La Réunion ; Caraïbes ; Japon.

# Abstract

Plants generally do not exploit soil nutrients themselves, but they depend upon mycorrhizal symbioses with root-associating fungi. This is the case for the current 25,000 orchid species that depend on the development of a mycorrhizal association to germinate and establish. They produce minute seeds lacking nutritional ressources required to germinate, so that they depend on the presence of suitable fungal partners to obtain carbon (heterotrophy) until the development of leaves (autotrophy). Mycorrhizal fungi remain present in the roots of adult plants where they contribute to the plant nutrition, which makes the molecular identification of fungal partners easier. Given the fact that most studies have been conducted in temperate regions, we have studied the diversity of mycorrhizal fungi in tropical orchids of La Réunion. We have found that (i) tropical orchids have the same partners as temperate and mediterranean orchids (Sebacinales, Ceratobasidiaceae, and above all Tulasnellaceae), and that these fungi are widespread in biomes and host plants. We have also showed for the first time that (ii) epiphytic orchids—that have hardly been studied—have partners that differ from terrestrial orchids' in tropical plant communities. Moreover, by developing an interaction network approach (78 species of La Réunion), we have found that (iii) most tropical species are generalists and that (iv) the mycorrhizal network shows the same properties as the mutualistic interaction networks' (*nestedness* and interaction asymmetry), whereas the mutualistic nature of the orchid symbiosis is still a current issue. In the second part of our thesis, we have studied the fungal partners of achlorophyllous (i.e. mycoheterotrophic) tropical orchids. We have found that (v) tropical species often associate with saprophytic fungi that provide carbon extracted from decaying wood or leaves in tropical soils, and that (vi) tropical models, because of their lack of specificity, challenge the rule drawn from temperate models. We have also confirmed in tropical models that (vii) mycoheterotrophy evolved from mixotrophic ancestors (i.e. intermediate nutritional mode). In the last part of our thesis, we have dealt with the influence of orchid and fungal phylogenies in explaining the structure of the observed networks. By measuring the phylogenetic signals in both orchid and fungal phylogenies, we have checked that

(viii) mycorrhizal interactions are not explained by the phylogenetic placements of either orchid genera or fungal taxa. However, we have noticed that (ix) a phylogenetic signal can occur in recent clades of orchid species (but not in fungal species). These results provide insights in the relative imprint of ecological and evolutionnary processes on the current patterns of fungus-orchid associations, and challenge the idea that the coevolutionary process could drive the system.

Keywords : mycorrhizal symbioses ; Orchidaceae ; tropical forests ; epiphytism ; interaction networks ; *nestedness* ; phylogenetic signal ; coevolution ; mycoheterotrophy ; La Réunion ; West Indies ; Japan.

# Remerciements

Cette thèse sur les symbioses mycorhiziennes des orchidées de La Réunion est née d'une collaboration récente entre deux équipes de recherches : l'UMR C53 *Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical* (PVBMT) de l'Université de La Réunion et l'UMR CNRS 5175 *Centre d'Écologie Fonctionnelle et Évolutive* (CEFE) de Montpellier. Je tiens avant tout à remercier les personnes qui ont contribué à la mise en place de cette collaboration, en particulier Bernard Reynaud (Directeur de l'UMR PVBMT), Dominique Strasberg (Directeur adjoint de l'UMR PVBMT), et Martine Hossaert-McKey (Responsable de l'équipe *Interactions Biotiques* de l'UMR CEFE).

Je remercie la Région Réunion qui m'a apporté un soutien financier durant mes trois premières années de doctorat, ainsi que l'Université de La Réunion et le département de Biologie qui m'ont donné l'opportunité de me former à l'enseignement supérieur durant ces quatre années consécutives.

Je remercie les membres du jury qui ont accepté d'examiner la thèse et qui ont fait le déplacement jusqu'à La Réunion.

J'adresserais enfin des remerciements à titre personnel à tous ceux qui ont contribué de près comme de loin à la réalisation de ce travail, à savoir :

- Thierry Pailler, mon directeur de thèse, qui m'a incité à poursuivre ma formation dans la recherche en écologie en Master 2 puis en Doctorat. Pour m'avoir appris à reconnaître les plantes de La Réunion, pour nos échanges sur la biologie et l'écologie des orchidées, et pour notre mission inoubliable à Madagascar. J'espère que nous aurons encore l'occasion de collaborer sur les orchidées de la zone Océan Indien ;

- Marc-André Selosse, mon co-directeur de thèse, qui m'a fait confiance en ac-

ceptant de co-encadrer ce travail depuis Montpellier. Pour m'avoir transmis ta passion pour les symbioses, les champignons et les orchidées "moches" ! Pour m'avoir accueilli chez toi lors de mes passages à Montpellier, et pour les nombreuses fois où tu as su te rendre disponible malgré la distance. Je n'ai pas dit mon dernier mot sur les symbioses mycorhiziennes des orchidées, et j'espère que nous continuerons d'explorer les modèles tropicaux ensemble ;

- François Munoz, mon mentor en analyses, qui s'est montré comme un troisième encadrant durant cette dernière année de thèse. Pour ton apport précieux dans la réflexion sur les analyses de structure des réseaux et de signal phylogénétique. J'espère que nous continuerons de mettre en lumière les facteurs structurant les symbioses mycorhiziennes des orchidées ;

- Marie-Pierre Dubois, Ingénieur d'étude au CNRS de Montpellier, pour m'avoir dévoilé tous tes secrets en matière d'identification moléculaire des champignons mycorhiziens d'orchidées ;

- Marie-Louise Cariou (Directrice de recherche au CNRS) et Marta Andriantsiferana (Professeur à l'Université d'Antananarivo), pour m'avoir permis de réaliser une mission de prospection à Madagascar dans le cadre du GDRI franco-malgache ;

- Chantal Misandeau et les guides de l'association ADEFA, pour m'avoir donné la chance de découvrir la merveilleuse forêt d'Ambodiriana à Madagascar ;

- Nathalie Glaudert, ma compagne, pour tes encouragements et ton soutien durant ces quatre années, et pour tes précieux conseils d'angliciste ;

- Nicolas Juillet, pour m'avoir accompagné sur le terrain à plusieurs reprises lors de ton année ATER à La Réunion, et pour m'avoir aidé à semer des graines d'orchidées ;

- Timothée Lepechon, pour tes conseils en matière de phylogénie moléculaire ;

- Un grand merci à tous les collègues de l'Université de La Réunion, Gaël, Frederick, Mireille, Laurence, Johanna, Cédric, Aurélie, Finn et Cécile, pour votre aide et vos conseils précieux.

*On va dans les étoiles et on ne sait*
*toujours pas ce qui se passe sur le*
*talus en face de chez soi...*
*Jean GIONO*

# Table des matières

**Résumé** **3**

**Abstract** **5**

**Remerciements** **7**

**Table des matières** **11**

**Liste des figures** **15**

**Liste des tableaux** **17**

**Introduction** **19**

**I Concepts et modèles étudiés** **21**

**1 Revue bibliographique** **23**

1.1 La symbiose, facteur clé de l'évolution des espèces . . . . . 23

1.1.1 Concepts de mutualisme et de symbiose . . . . . 23

1.1.2 Diversité des symbioses mutualistes . . . . . 24

1.1.3 Fidélité des partenaires dans les symbioses mutualistes . . . . 26

1.1.4 Rôle des symbioses dans l'évolution . . . . . 28

1.2 Une symbiose mycorhizienne propre aux orchidées . . . . . 31

1.2.1 Particularités structurales . . . . . 31

1.2.2 Particularités fonctionnelles . . . . . 32

1.2.3 Mutualisme ou parasitisme orchestré par l'orchidée ? . . . . . 33

1.3 La mycohétérotrophie chez les orchidées . . . . . 34

1.3.1 Mycohétérotrophe à la germination . . . . . 34

1.3.2 Cas d'adultes plus ou moins hétérotrophes . . . . . 37

1.3.3 Évolution de la mycohétérotrophie . . . . . 39

1.4 Des partenaires mycorhiziens et des niveaux de spécificité variables . 41

1.4.1 Rhizoctonias chez les orchidées chlorophylliennes . . . . . 41

1.4.2 Spécificité des orchidées chlorophylliennes . . . . . 44
1.4.3 Spécificité des orchidées mycohétérotrophes . . . . . 46
1.5 Des orchidées diversifiées dans les régions tropicales . . . . . 47
1.5.1 Centres de diversification . . . . . 47
1.5.2 Épiphytisme chez les orchidées tropicales . . . . . 47
1.5.3 Adaptations à la vie à l'ombre . . . . . 49

**2 Présentation des orchidées étudiées 51**
2.1 Les communautés d'orchidées tropicales étudiées à La Réunion . . . . 51
2.1.1 La Réunion, île océanique aux habitats contrastés . . . . . 51
2.1.2 Les communautés terrestres et épiphytes . . . . . 54
2.1.3 Les orchidées de la sous-tribu des Angraecinae à La Réunion . 55
2.2 Les orchidées mycohétérotrophes et mixotrophes étudiées dans les régions tropicales . . . . . 59
2.2.1 Les orchidées mycohétérotrophes de La Réunion et de la Guadeloupe . . . . . 59
2.2.2 Les orchidées mycohétérotrophes et mixotrophes du Japon . . 60

**II Publications scientifiques 61**

**3 Article 1. *Independent recruitment of saprotrophic fungi as mycorrhizal partners by tropical achlorophyllous orchids* 63**

**4 Article 2. *Saprotrophic fungal mycorrhizal symbionts in achlorophyllous orchids : finding treasures among the molecular scraps ?* 85**

**5 Article 3. *Mycoheterotrophy evolved from mixotrophic ancestors : evidence in Cymbidium (Orchidaceae)* 93**

**6 Article 4. *Sebacinales Everywhere : Previously Overlooked Ubiquitous Fungal Endophytes of Plants* 109**

**7 Article 5. *Assessing the diversity of tropical fungal symbionts and phylogenetic determinants of the orchids-fungi networks from a large study in La Réunion Island* 139**

**III Synthèse des travaux de recherches 167**

**8 Diversité taxonomique et fonctionnelle des mycorhiziens tropicaux 169**

8.1 Comme chez les modèles tempérés, les orchidées autotrophes tropicales s'associent aux rhizoctonias . . . . . 170
8.2 À la différence des modèles tempérés, les orchidées mycohétérotrophes tropicales peuvent s'associer à des saprophytes . . . . . 176
8.3 D'autres partenaires mycorhiziens à découvrir chez les orchidées autotrophes tropicales ? . . . . . 180

**9 Spécificité mycorhizienne et structure des réseaux d'interactions 182**
9.1 Structure écologique des réseaux mycorhiziens des orchidées autotrophes 183
9.2 L'absence de spécificité chez les orchidées mycohétérotrophes tropicales 190
9.3 Qu'en est-il de la spécificité mycorhizienne à la germination ? . . . . . 193

**10 Signal phylogénétique des symbioses mycorhiziennes 196**
10.1 Le signal phylogénétique des symbioses mycorhiziennes à l'échelle des genres . . . . . 197
10.2 Le signal phylogénétique dans les symbioses mycorhiziennes des angraecoïdes . . . . . 201

**Conclusions et perspectives 205**

**Bibliographie 223**

**IV Annexes 225**

**A *Phylogenetic species delimitation in ectomycorrhizal fungi and implications for barcoding : the case of the Tricholoma scalpturatum complex (Basidiomycota)* 227**

**B *L'adaptation à la vie à l'ombre chez les orchidées : étude des orchidées non-chlorophylliennes dans les régions tropicales* 243**

# Table des figures


1.1 Échanges de nutriments mis en jeu dans les symbioses mycorhiziennes. . . 25
1.2 Types de symbioses mycorhiziennes chez les végétaux. . . . . 25
1.3 Deux plantes non chlorophylliennes qui renversent les flux de carbone dans les symbioses endomycorhiziennes à arbuscules. . . . . 28
1.4 Spécificité et cospéciation entre les espèces non chlorophylliennes *Afrothismia spp.* (Burmanniaceae) et leurs champignons endomycorhiziens *Glomus spp.*. . . . . 30
1.5 Pelotons endomycorhiziens des orchidées. . . . . 32
1.6 Transfert de carbone radioactif en microcosme de l'orchidée *Goodyera repens* vers un champignon mycorhizien. . . . . 35
1.7 Germination symbiotique de *Dactylorhiza majalis* avec une souche de *Ceratobasidium sp.* en culture artificielle. . . . . 36
1.8 Fonctionnement de la mycohétérotrophie chez les orchidées non chlorophylliennes tempérées. . . . . 38
1.9 Signatures isotopiques du carbone et de l'azote des plantes autotrophes et mycohétérotrophes. . . . . 39
1.10 Apparitions indépendantes de la mycohétérotrophie chez les orchidées. 40
1.11 Polyphylétisme et polymorphisme ultrastructural des champignons rhizoctonias. . . . . 43
1.12 Distribution des différents mycorhiziens dans la phylogénie des Orchidaceae. . . . . 45
1.13 Photographie de l'orchidée épiphyte aphylle *Microcoelia sp.* à Madagascar. . . . . 49

2.1 Localisation de l'archipel des Mascareignes dans le bassin sud-ouest de l'Océan Indien. . . . . 52
2.2 Types d'habitats à La Réunion. . . . . 53
2.3 Photographies de l'orchidée épiphyte *Bulbophyllum variegatum* qui pousse spécifiquement sur l'arbre *Agauria salicifolia* à La Réunion. . . 55
2.4 Sites et habitats échantillonnés à La Réunion. . . . . 56

2.5 Photographie de l'orchidée *Angraecum sesquipedale* dans la forêt de Tampolo à Fénérive-est (Madagascar). . . . . 57
2.6 Phylogénie des orchidées du clade des angraecoïdes (tribu des Vandeae) en radiation dans les îles du sud-ouest de l'Océan Indien. . . . . 58
2.7 Photographies de l'orchidée mycohétérotrophe *Gastrodia similis* à La Réunion. . . . . 59
2.8 Positions phylogénétiques et photographies des orchidées chlorophylliennes et non chlorophylliennes *Cymbidium spp.* étudiées au Japon. . 60

8.1 Diversité taxonomique des mycorhiziens d'orchidées de La Réunion. . 171
8.2 Arbre phylogénétique des Sebacinales du groupe B. . . . . 172
8.3 Arbre phylogénétique des Ceratobasidiaceae. . . . . 174
8.4 Distribution actualisée des différents mycorhiziens dans la phylogénie des orchidées. . . . . 176
8.5 Comparaison entre le fonctionnement des orchidées mycohétérotrophes tempérées et le saprophytisme de certaines orchidées mycohétérotrophes tropicales. . . . . 178
8.6 Caractères ultrastructuraux des hyphes des champignons Attractiellales observés dans des pelotons d'orchidées néotropicales . . . . . 181

9.1 Architecture emboîtée (*nestedness*) du réseau mycorhizien formé dans les communautés d'orchidées autotrophes de La Réunion. . . . . 184
9.2 Fréquences des assemblages des différents rhizoctonias dans les espèces et dans les individus d'orchidées autotrophes de La Réunion. . . . . 184
9.3 Comparaison de l'architecture des réseaux mycorhiziens formés dans les communautés épiphytes et dans les communautés terrestres. . . . 189
9.4 Diversité et abondance relative des champignons saprophytes identifiés dans les racines des plantes de *Wullschlaegelia aphylla* en Guadeloupe et de *Gastrodia similis* à La Réunion. . . . . 191
9.5 Morphes clair et foncé de l'espèce *Gastrodia similis* coexistant en sympatrie dans certaines forêts humides de basse altitude à La Réunion. . 192
9.6 Dispositif expérimental de semis de graines d'orchidées *in situ*. . . . . 194

10.1 Analyse du signal phylogénétique dans les associations des genres d'orchidées de La Réunion. . . . . 198
10.2 Comparaison du signal phylogénétique entre le réseau mycorhizien des communautés épiphytes et le réseau mycorhizien des communautés terrestres. . . . . 200
10.3 Analyse du signal phylogénétique dans les associations des espèces du clade des angraecoïdes. . . . . 203

# Liste des tableaux

1.1 Quelques définitions. . . . . 24
1.2 Caractéristiques des principaux types de symbioses mycorhiziennes. . . . . 26
1.3 Correspondance entre téléomorphes et anamorphes chez les rhizoctonias. . 42

# Introduction

La biodiversité semble positivement influencée par les réseaux d'interactions mutualistes. Comprendre la structure écologique et l'évolution de ces interactions est d'actualité. L'approche phylogénétique à l'échelle des communautés est, par ailleurs, une discipline en plein essor et prometteuse pour la compréhension du lien entre processus écologiques et évolutifs.

Dans les symbioses mycorhiziennes des orchidées, où l'association à un champignon est indispensable à la germination de l'orchidée et nourrit la plante adulte, on connaît mal la nature des pressions écologiques et évolutives structurant le cortège mycorhizien. De plus, on connaît peu la diversité taxonomique des mycorhiziens dans les régions tropicales, alors que les orchidées y sont plus diversifiées phylogénétiquement et écologiquement (épiphytes) que dans les zones tempérées et méditerranéennes.

Au cours de la thèse, nous avons exploré les liens *in situ* entre les orchidées adultes et leurs champignons mycorhiziens dans les communautés tropicales, à La Réunion, et ponctuellement en Guadeloupe et au Japon. Nous avons cherché en particulier à répondre à quatre questions en relation avec la diversité et la structuration écologique et évolutive des symbioses mycorhiziennes des orchidées :

- **La diversité taxonomique des mycorhiziens tropicaux est-elle comparable à celle décrite dans les régions tempérées et reflète-t-elle des processus fonctionnels analogues ?**

- **Existe-t-il des cortèges mycorhiziens distincts entre espèces terrestres et espèces épiphytes (dont le cortège reste mal connu) ?**

- **Les orchidées tropicales ont-elles tendance à s'associer spécifiquement à un partenaire ou sont-elles généralistes ? Quelle est la structure du réseau d'interactions orchidées-champignons à l'échelle des communautés d'orchidées ?**

- **Existe-t-il un signal phylogénétique des associations mycorhiziennes ? Si c'est le cas, se manifeste-il dans la phylogénie des plantes, des champignons ou des deux partenaires ? Une coévolution peut-elle alors s'engager ?** Les données de l'Université de La Réunion sur la phylogénie des orchidées de la sous-tribu des Angraecinae, en radiation récente à La Réunion, font de cette tribu d'orchidées un modèle prioritaire.

Cette thèse est présentée sous la forme d'articles scientifiques selon un ordre chronologique (Partie 2). Les articles sont précédés par une présentation des concepts et des modèles étudiés dans la thèse (Partie 1). Ils sont suivis par une synthèse des apports de ce travail aux problématiques énoncées ci-dessus (Partie 3).

# Première partie

# Concepts et modèles étudiés

# Chapitre 1

# Revue bibliographique

## 1.1 La symbiose, facteur clé de l'évolution des espèces

### 1.1.1 Concepts de mutualisme et de symbiose

Le terme mutualisme a été proposé par Van Beneden (1875) pour désigner des organismes qui se procurent l'un l'autre des services. Actuellement, on l'utilise pour désigner des relations interspécifiques à bénéfices réciproques (Selosse, 2000). Les partenaires mutualistes peuvent interagir transitoirement, comme lors de la pollinisation ou de la dispersion des graines par les frugivores. Dans d'autres situations, les partenaires sont associés plus durablement au cours de leur vie : on parle alors de symbiose.

Le terme symbiose a été introduit par Frank (1877) qui parlait de *Symbiotismus* pour décrire la nature mixte des mycorhizes. Ce terme a ensuite été popularisé sous la forme *Symbiosis* par De Bary (1879). De Bary soutenait notamment que les lichens, auparavant considérés comme des organismes à part entière, associaient en fait un champignon et une algue. Selon lui, cela illustrait un phénomène plus général dans la nature : la vie en commun d'organismes d'espèces distinctes. Cette première définition, conforme à l'étymologie (du grec *sun-*, avec, et *-bios*, vie) désigne une coexistence durable, impliquant tout ou partie du cycle de vie de deux organismes, quels que soient les échanges entre ceux-ci. Une seconde définition restreint la symbiose aux coexistences durables et mutualistes. Proposée par Laloy (1906), elle est souvent utilisée dans la littérature française (Selosse, 2000). Nous étudierons ici les symbioses mutualistes, en évoquant ponctuellement les mutualismes non symbiotiques (comme la pollinisation), dans lesquels la coexistence est plus transitoire.

TABLE 1.1 – Quelques définitions.

| Type d'interaction | Bénéfice | | Coexistence | |
|---|---|---|---|---|
| | Partenaire A | Partenaire B | Durable = Symbiose (De Bary, 1879) | Transitoire |
| Mutualisme | + | + | Symbiose mutualiste (lichens, mycorhizes, symbioses fixatrices d'azote) | Mutualisme non symbiotique (pollinisation, dispersion) |
| Parasitisme ou prédation | + | — | Symbiose parasitaire (parasites biotrophes, rouilles) | Parasitisme nécrotrophe et prédation |

*(+) effet favorable ; (—) effet défavorable. D'après Selosse (2000).*

### 1.1.2 Diversité des symbioses mutualistes

La diversité des symbioses mutualistes rend fascinante leur étude, mais dissimule trop souvent l'unité du phénomène. Nous ne présenterons ici qu'un nombre limité de symbioses (lichens, mycorhizes, symbioses fixatrices d'azote), en nous concentrant sur des aspects fonctionnels.

**Nature des bénéfices.** Les bénéfices les plus souvent observés sont trophiques. Un partenaire accède alors à une ressource dont l'autre est privé, ou qui lui est limitante. Nombre de symbioses impliquent ainsi des autotrophes pour le carbone. Dans les associations lichéniques ou mycorhiziennes, un partenaire photosynthétique nourrit un champignon qui, en retour, lui apporte de l'eau et des sels minéraux du milieu (Figure 1.1). De nombreuses symbioses impliquent des bactéries fixatrices d'azote atmosphérique, avec un hôte qui leur fournit du carbone. Les organismes hétérotrophes établissent aussi des symbioses trophiques. Certains insectes coloniaux (fourmis, termites et coléoptères) cultivent des champignons dans leurs nids en collectant la biomasse végétale hors du nid (Mueller et Gerardo, 2002). Incapables de digérer la matière végétale, ils consomment une partie du mycélium du champignon. Le bénéfice est souvent la protection contre les agressions du milieu, en particulier quand un partenaire englobe l'autre. Dans les mycorhizes, le champignon est protégé dans la racine où il stocke ses réserves, mais il peut aussi protéger la racine en formant un feutrage autour de celle-ci (manteau des ectomycorhizes ; Figure 1.2). Au bilan, des symbioses au fonctionnement semblable ont été sélectionnées plusieurs fois au cours de l'évolution. Lorsque les groupes sont proches phylogénétiquement, on peut penser à une prédisposition pour un type de symbiose. Toutes les plantes à symbioses fixatrices d'azote, à *Rhizobium* (Légumineuses, Ulmacées) ou à *Frankia* (Casuarinacées, Eleagnacées, Myricacées, Rosacées, etc.), appartiennent au même sous-clade des Rosidées (Soltis *et al.*, 1995). Dans le cas général, néanmoins, il

s'agit d'évolutions convergentes car les partenaires sont phylogénétiquement distants. Ainsi, la symbiose ectomycorhizienne est apparue indépendamment chez les gymnospermes et chez les angiospermes, de même que chez les Ascomycètes et chez les Basidiomycètes (Tedersoo *et al.*, 2010 ; Tableau 1.2).

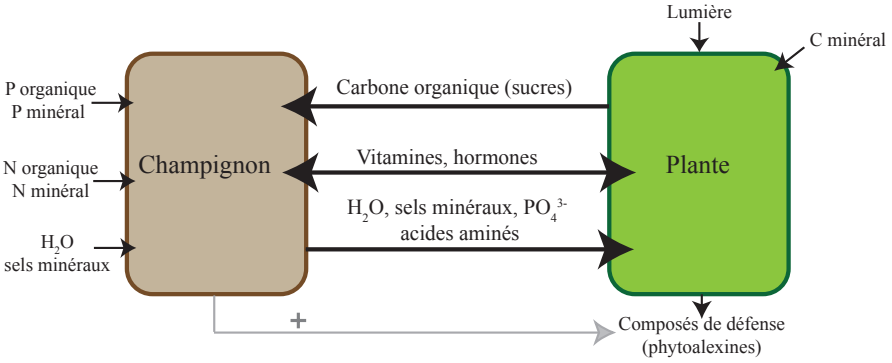



FIGURE 1.1 – Échanges de nutriments mis en jeu dans les symbioses mycorhiziennes.

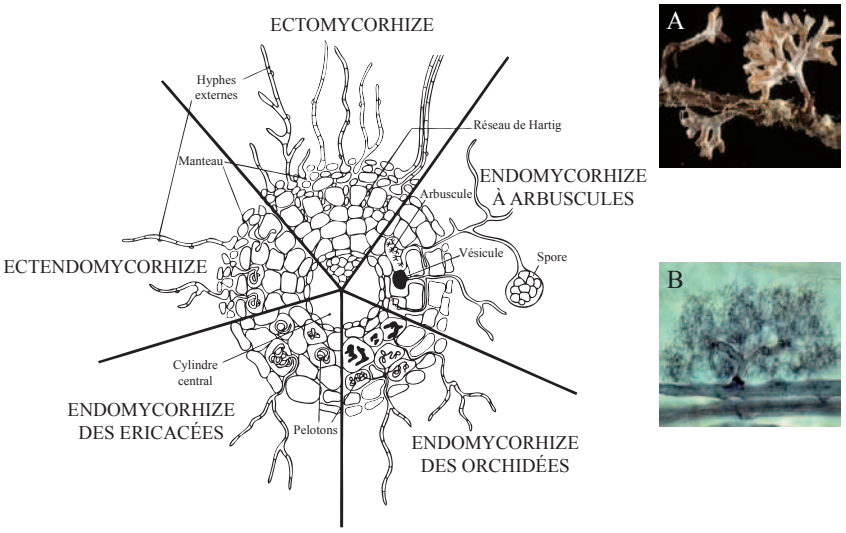



FIGURE 1.2 – Types de symbioses mycorhiziennes chez les végétaux. D'après Selosse et Le Tacon (1998). A : ectomycorhize ; B : endomycorhize à arbuscules ; voir Figure 1.5 pour l'endomycorhize des orchidées. Photos M. Brundrett.

**Propriétés émergentes.** En plus de l'addition des capacités des deux partenaires, la symbiose exprime des propriétés que n'ont pas les partenaires séparément. Au niveau morphologique, la symbiose peut créer des structures nouvelles. C'est le cas des lichens (organismes chimériques), mais aussi des ectomycorhizes qui sont induites dans les racines par la présence de certains champignons (Figure 1.2 A).

TABLE 1.2 – Caractéristiques des principaux types de symbioses mycorhiziennes.

| **Type** | **Structures formées** | **Végétaux concernés** | **Champignons impliqués** | **Répartition géographique** |
|---|---|---|---|---|
| Endomycorhize à arbuscules (AM) | Arbuscules et vésicules intracellulaires | Bryophytes, Ptéridophytes, Gymnospermes et Angiospermes, environ 200 000 espèces | Gloméromycètes (Glomales) | Partout et dominante en régions tropicales |
| Endomycorhize des orchidées (ORM) | Pelotons intracellulaires | Orchidaceae, environ 25 000 espèces | Basidiomycètes (Rhizoctonias) et Ascomycètes (rarement) | Partout, dans tous les biomes des orchidées |
| Endomycorhize des ericacées (ERM) | Pelotons intracellulaires | Ericaceae, environ 1 500 espèces | Ascomycètes (Helotiales) | Partout, dans tous les biomes des ericacées |
| Ectomycorhize (ECM) | Racine épaissie, manteau, et réseau de Hartig | Gymnospermes et Angiospermes, environ 10 000 espèces | Basidiomycètes et Ascomycètes | En régions tempérées où elle est dominante |

D'autres émergences sont fonctionnelles. Chez les lichens, l'algue induit la synthèse de métabolites secondaires chez le champignon. Ces substances lichéniques ont un rôle essentiel dans la protection contre les forts éclairements et contre les herbivores. Au niveau écologique, la symbiose peut étendre la niche des espèces. Les plantes à endomycorhizes à pelotons (ericacées, orchidées) sont favorisées dans les écosystèmes oligotrophes, où la faible disponibilité des nutriments contraint l'installation des autres plantes (Smith et Read, 1997). Plusieurs indices suggèrent que les endosymbioses à arbuscules, observées dans des fossiles datant de 400 millions d'années, seraient ancestrales à tous les végétaux terrestres et auraient favorisé la colonisation des terres émergées par les végétaux à cette époque (Selosse et Le Tacon, 1998). Globalement, le phénotype d'un organisme résulte aussi de ses symbiotes, soit par l'addition des capacités de ceux-ci, soit parce que ceux-ci le modifient. Le phénotype est donc plus que ce que code le génome. Les symbiotes constituent une partie de ce que Dawkins (2006) qualifie de phénotype étendu, c'est-à-dire l'ensemble des éléments recrutés dans le milieu qui contribuent à assurer la transmission des gènes. L'homme en est également un bon exemple, car le cortège de bactéries présent dans son tube digestif comporte 100 fois plus de gènes que son propre génome (Hooper et Gordon, 2001).

### 1.1.3 Fidélité des partenaires dans les symbioses mutualistes

**Modalités de transmission des symbiotes.** Lors de la reproduction de l'hôte, la transmission des symbiotes peut se faire verticalement. Dans ce cas, l'organisme hérite directement des symbiotes de l'association initiale. Pour les organismes à re-

production asexuée, il y a multiplication végétative de l'association initiale. Certains lichens libèrent ainsi des propagules, plus ou moins différenciées, de nature mixte (Selosse, 2000). Pour les organismes à reproduction sexuée, la transmission verticale peut opérer soit parce que les gamètes portent le symbiote (cas des mitochondries et des plastes ; Birky, 1995), soit parce que les symbiotes sont transmis peu après la fécondation. Dans d'autres situations, la transmission des symbiotes se fait horizontalement à chaque génération, c'est-à-dire à partir du milieu. Dans les symbioses mycorhiziennes, le partenaire mycorhizien est capable de survivre à l'état libre pour opérer le rapprochement, et dispose d'un mécanisme de mise en place de l'association. Mais, l'incertitude de ce processus est un inconvénient, en particulier pour les organismes pionniers qui sont peu disposés à rencontrer des partenaires dans le nouveau milieu. Cela explique probablement pourquoi les plantes pionnières ont rarement des mycorhizes. La transmission horizontale s'inscrit donc entre la symbiose à transmission verticale et les mutualismes non symbiotiques dans lesquels les partenaires doivent se rencontrer en permanence. Comme les mutualismes non symbiotiques, les symbioses à transmission horizontale favorisent la mise en place de réseaux d'associations où chaque individu peut interagir avec une multitude de partenaires disponibles. La possibilité d'accéder à plusieurs partenaires permet aussi de sélectionner ceux qui offrent le meilleur bénéfice. Or, si le comportement animal autorise des choix, leur existence est moins apparente chez les végétaux. Enfin, lorsque la transmission est horizontale par son mécanisme mais exploite les mêmes partenaires que l'association initiale, alors une forte proportion de partenaires sera retrouvée chez les descendants. Cette transmission pseudo-verticale nuance les inconvénients et les avantages des deux types précédents. Dans les symbioses mycorhiziennes, elle prévaut pour les plantules qui tombent aux pieds des plantes mères et s'associent potentiellement aux mêmes symbiotes (Richard *et al.*, 2005).

**Risque des tricheurs.** Lorsqu'un partenaire A maximise ses bénéfices, en minimisant son investissement dans la symbiose ou en surexploitant son partenaire B, l'interaction symbiotique peut basculer vers le parasitisme. Si la *fitness* de A est effectivement augmentée de cette façon, alors on prévoit la sélection récurrente de partenaires A non mutualistes dans les mutualismes : on parle alors de tricheurs (Bronstein, 2001). Les tricheurs peuvent dériver soit des symbiotes eux-mêmes, soit d'autres organismes qui se sont introduits dans la symbiose. Si les mutualismes non symbiotiques (comme la pollinisation) montrent de nombreuses formes de tricheries (Cozzolino et Widmer, 2005), les mutualismes symbiotiques n'échappent pas non plus aux tricheurs. Ainsi, des plantes non chlorophylliennes renversent les flux dans les symbioses mycorhiziennes dans lesquelles la plante (chlorophyllienne) fournit habituellement du carbone à son champignon (Figure 1.3 ; Leake, 1994). Cependant,

FIGURE 1.3 – Des plantes non chlorophylliennes qui renversent les flux de carbone dans les symbioses endomycorhiziennes à arbuscules. A : *Seychellaria madagascariensis* (Triuridaceae) ; B : *Geosiris aphylla* (Geosiridaceae). Photos F. Martos et T. Pailler ; Madagascar. En cours d'étude avec S. Imhof.

dans cet exemple, on ne connaît pas l'effet sur le *fitness* du champignon. D'autre part, une plante peut sélectionner des symbiotes plus profitables à d'autres plantes, cela pouvant à terme conduire à son remplacement. Des champignons du sol forment des réseaux mycorhiziens communs qui interconnectent des plantes entre elles (Simard *et al.*, 1997; Selosse *et al.*, 2006). Ainsi, la graminée *Panicum sphaerocarpon* favorise le développement d'espèces de champignons endomycorhiziens qui nourrissent mieux les Plantains voisins (*Plantago major* ; Bever, 2002). Ces rétrocontrôles mycorhiziens façonnent la dynamique des communautés végétales, en contribuant notamment à la succession des espèces végétales dans un habitat donné ou aux rapports de dominance dans les communautés (Klironomos, 2002). Par conséquent, le mutualisme d'une symbiose n'est pas sélectionné en lui-même et des tricheurs peuvent apparaître spontanément et l'envahir à long terme.

### 1.1.4 Rôle des symbioses dans l'évolution

**Devenir évolutif des symbioses mutualistes.** L'apparition récurrente de tricheurs dans les symbioses mutualistes démontre le continuum entre mutualisme et parasitisme. Il existe d'ailleurs des traits similaires entre les symbioses mutualistes et les symbioses parasitaires (Selosse, 2000). Pour désigner les structures d'échanges au contact de la cellule, on parle de suçoirs chez les champignons parasites et d'arbuscules chez les champignons endomycorhiziens. Or, ces termes cachent une fonction d'échange unique pouvant autoriser les inter-conversions. Tous les champignons mycorhiziens ne sont donc pas mutualistes car le coût en carbone pour la plante surpasse parfois le bénéfice en nutrition hydro-minérale (Jones et Smith, 2004). De même, nous avons vu que des plantes non chlorophylliennes ne fournissent pas de

carbone à leurs partenaires mycorhiziens (Leake, 1994).

**Cortège symbiotique et spécificité.** L'ensemble des symbiotes auxquels une espèce est associée constitue son cortège symbiotique. Le cortège symbiotique d'une espèce peut être très diversifié, comme dans le cas des bactéries du tube digestif de l'homme (Hooper et Gordon, 2001). On sous-estime parfois l'étendue d'un cortège symbiotique, car certains partenaires peuvent rester non identifiés dans les études (en particulier quand il s'agit de micro-organismes). Des cortèges larges de champignons et bactéries (aux rôles souvent méconnus) colonisent régulièrement les tissus des plantes vivantes, sans former de structure symbiotique apparente et sans causer de symptôme : on les appelle endophytes. Parmi les champignons endophytes, certains sont des saprophytes ou des parasites latents, mais d'autres pourraient représenter d'authentiques mutualistes pour les plantes. Dans d'autres cas, le cortège symbiotique d'une espèce est réduit à un genre ou à une espèce : on parle alors de spécificité. Contrairement à une idée reçue, le niveau de spécificité d'une symbiose n'est pas nécessairement corrélé à son ancienneté, ni à son caractère obligatoire (Thompson, 2005). Les endomycorhizes à arbuscules datant de 400 millions d'années sont généralement peu spécifiques : quelques centaines d'espèces de Glomales colonisent plus de 200 000 espèces de plantes (Tableau 1.2). La mise en place d'une spécificité entre les partenaires peut avoir plusieurs origines. Soit elle est liée à une transmission strictement verticale (cas des mitochondries et des plastes), soit elle se reproduit de façon horizontale grâce au choix récurrent du même partenaire dans l'habitat (cas de certaines associations ectomycorhiziennes).

**Notions de coévolution et de cospéciation.** Lorsque la spécificité se répète strictement de génération en génération, une coévolution peut alors s'engager sur le long terme. On parle de coévolution lorsqu'une espèce évolue en réponse à la sélection exercée par une autre espèce qui, réciproquement, évolue elle-même sous l'effet de la sélection exercée par la première (Janzen, 1980; Thompson, 2005). Ainsi, une espèce qui évolue en populations isolées crée une forme d'allopatrie pour les populations de ses partenaires. Ce mécanisme est d'autant plus efficace lorsque les partenaires dépendent fortement de la symbiose. Cela peut conduire à des spéciations jointes des partenaires eux-mêmes. Dans ce cas, les arbres phylogénétiques des deux partenaires sont congruents : on parle alors de cospéciation (un cas particulier de coévolution). C'est pour cette raison que des gènes mitochondriaux et plastidiaux sont souvent utilisés pour reconstituer les phylogénies des Eucaryotes. Dans d'autres cas, la situation peut être plus complexe. Dans les symbioses Légumineuses/Rhizobiacées, il n'y a pas de cospéciation entre les plantes hôtes et les bactéries. Or, les gènes liés à la symbiose (gènes *nod*) ne sont pas sur le chromosome bactérien mais sur un plasmide

transmis horizontalement. Il y a alors coévolution entre les gènes *nod* et les plantes hôtes (Provorov, 1998). La coévolution opère donc essentiellement entre les gènes. Elle ne se traduit dans les arbres phylogénétiques des organismes que si les gènes liés à la symbiose sont transmis verticalement. Il existe aussi un cas de cospéciation parmi les symbioses endomycorhiziennes. L'histoire évolutive des plantes non chlorophylliennes du genre *Afrothismia* (Burmanniaceae) est congruente avec celle des champignons endomycorhiziens auxquels elles sont spécifiquement associées (Figure 1.4 ; Merckx et Bidartondo, 2008). Enfin, dans les mutualismes non symbiotiques, une coévolution peut aussi s'engager. Un exemple classique est l'allongement corrélé de la longueur des tubes nectarifères (éperons) et de la trompe des insectes pollinisateurs chez des orchidées du genre *Angraecum* (Darwin, 1862).

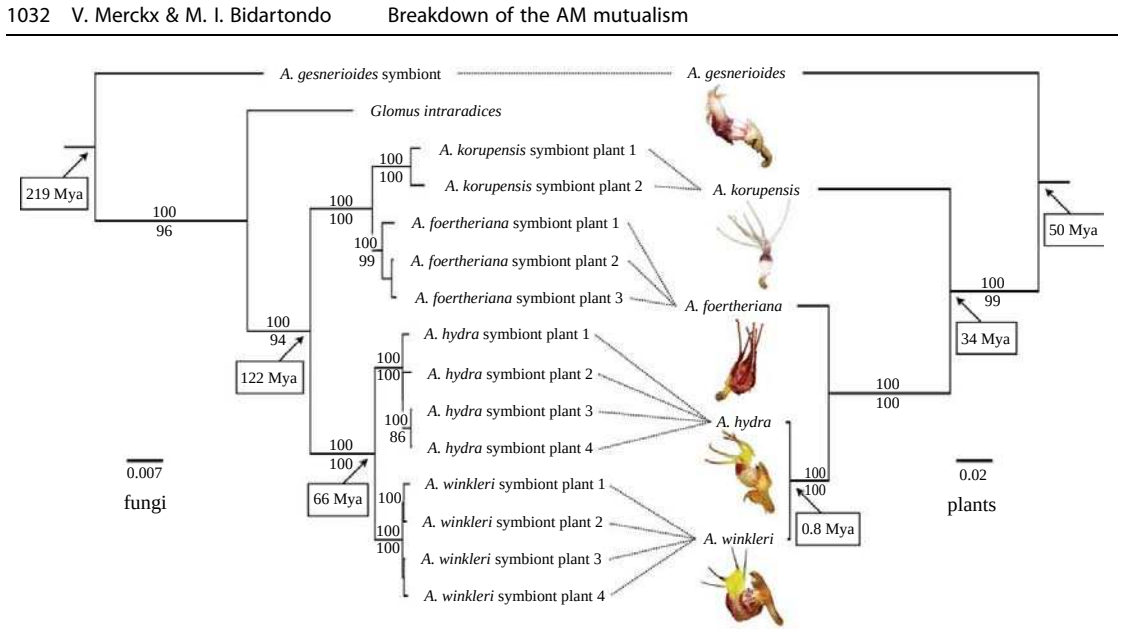



Figure 2. Comparison of multi-gene phylogenies for Afrothismia plants (right) and Glomus fungi (left) shows evidence of delayed cospeciation by the plants. Afrothismia species are extreme specialists that have tracked ancient fungal lineages over considerable evolutionary time. Thus, the plants' evolutionary history closely mirrors that of mycorrhizal fungi. Each photograph shows a flower of the plant species named above. Bayesian posterior probabilities (more than 95%) are shown above branches and non-parametric bootstrap percentages (more than 85%) are shown below branches. Branch lengths represent the number of substitutions per site. Divergence time estimates are indicated in boxes.

FIGURE 1.4 – Spécificité et cospéciation entre les espèces non chlorophylliennes *Afrothismia spp.* (Burmanniaceae) et leurs champignons endomycorhiziens *Glomus spp.*. Notons que les datations ne sont cependant pas congruentes. D'après Merckx et Bidartondo (2008).

electronic supplementary material). The topology is well resolved and shows high congruence with previous 18s rDNA-based hypotheses for Glomeromycota ( Schwarzott et al. 2001 ). All fungal symbionts are placed within a maximally supported Glomus group A lineage and there is no fungal lineage overlap among the different myco-heterotrophic plant species. The mycorrhizal fungi obtained from the roots of Sciaphila ledermannii, Kupea martinetugei, Afrothismia korupensisare all placed in strongly supported monophyletic groups. The fungal symbionts of A. winkleri and A. foertheriana are part of paraphyletic groups due to the inclusion of the A. hydra and A. korupensis symbiont clades, respectively.

(b) Multigene Afrothismia and fungal symbiont phylogenies

The three-gene phylogenies of Afrothismia and its fungal symbionts are both well resolved and strongly supported (figure 2). No incongruence was observed between parsimony and Bayesian analyses. The three-gene Glomus phylogeny shows improved resolution over the single 18s rDNA tree with fungal symbionts of each Afrothismia species in strongly supported clades. There is one

clade is estimated at 1307 G 30 (PL) and 1223 G 63 Mya (TK), much older than the oldest known Glomeromycota fossils ( Redecker et al. 2000 ). Under the same priors, the split between Ascomycota and Basidiomycota is estimated at 1208 G 53 Mya (PL) and 1135 G 92 Mya (TK). This is congruent with prior estimates ( Heckman et al. 2001 ; Padovan et al. 2005 ) when using the calibration date of 1576 Mya for the plant–animal–fungus split for this node. In contrast, when applying the 590 million year constraint for calibration point I, we inferred an estimate of 800 G 38 (PL) and 595 G 32 Mya (TK) for the origin of the Glomeromycota. Table 6 in the electronic supplementary material lists the divergence time estimates obtained for the Afrothismia symbionts with both calibration strategies.

The resulting monocot topology based on 18s rDNA and atpA data is shown in the electronic supplementary material, figure 4. Our analysis shows a maximally supported placement for Afrothismia as sister clade to Tacca–Thismia–Haplothismia. The paraphyly of Burmanniaceae tribe Thismieae is unexpected, yet a previous study has indicated that in Burmanniaceae tribe Burmannieae many lineages lost their chlorophyll independently leading to convergent morphological evolution ( Merckx

En conclusion, nous tirons que les organismes ont contracté une ou plusieurs symbiose(s) au cours de leur évolution. La symbiose apparaît comme un facteur clé de l'évolution biologique dans son ensemble. Elle l'est en particulier pour les espèces qui dépendent spécifiquement, ou strictement, de partenaires pour leur survie dans les milieux.

## 1.2 Une symbiose mycorhizienne propre aux orchidées

Malgré un âge récent évalué à 76-84 millions d'années et correspondant à la fin du Crétacé (Ramírez *et al.*, 2007), les orchidées comptent parmi les familles de plantes à fleurs les plus diversifiées sur terre. On estime le nombre d'orchidées actuelles à environ 25 000 espèces (Dressler, 2006), et la classification phylogénétique des Angiospermes (APG III pour *Angiosperm Phylogeny Group III*) reconnaît que cette famille est monophylétique dans l'ordre des Asparagales (Chase *et al.*, 2003). Les orchidées ont plusieurs traits communs, et certains traits peuvent être expliqués par la symbiose mycorhizienne particulière dont elles ont hérité (Smith et Read, 1997). Nous décrirons ici la symbiose mycorhizienne des orchidées, objet de ce travail, en nous concentrant dans un premier temps sur ses particularités structurales et fonctionnelles.

### 1.2.1 Particularités structurales

**Pelotons endomycorhiziens.** La symbiose mycorhizienne des orchidées est une endosymbiose, car les hyphes du champignon colonisent les cellules du parenchyme cortical racinaire. Elle présente d'ailleurs des similitudes avec les symbioses endomycorhiziennes à arbuscules. Pour ces deux types, les hyphes traversent la paroi de la cellule végétale en repoussant la membrane plasmique sans la franchir. Ainsi, ils colonisent l'intérieur de la cellule, jusqu'à occuper une proportion considérable du volume cellulaire. La matrice d'interface entre la paroi des hyphes et la membrane plasmique de l'hôte rappelle beaucoup les endomycorhizes à arbuscules par l'étendue de sa surface et par sa minceur. Lors de la mycorhization des orchidées, en revanche, les hyphes repoussent la membrane plasmique, non pas en formant des arbuscules mais en s'enroulant indéfiniment sur eux-mêmes. Les hyphes croissent ainsi en formant progressivement une sorte de pelote avec la membrane de l'hôte. Ces structures enroulées sont appelées pelotons (Bernard, 1899; Burgeff, 1909 ; Figure 1.5). Il est intéressant de remarquer que la symbiose endomycorhizienne des ericacées, apparue indépendamment de celle des orchidées, est assez similaire si l'on considère ce trait structural (Figure 1.2).

**Organes colonisés.** Chez les orchidées, les pelotons intracellulaires sont facilement observés sur des coupes fines au microscope optique, avec ou sans coloration. On les observe le plus souvent dans les racines ou dans les protocormes, parfois dans les rhizomes et plus rarement dans les tubercules de certaines orchidées (Rasmussen, 1995). Toutes les racines d'une plante ne sont pas colonisées, mais celles

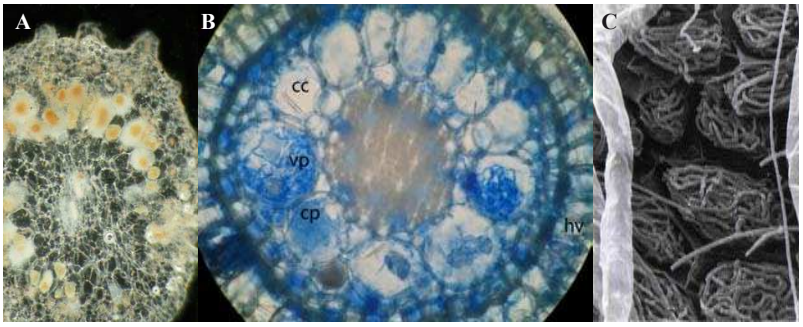



FIGURE 1.5 – Pelotons endomycorhiziens des orchidées. A : pelotons vus à la loupe binoculaire ; B : vus au microscope optique (coloration au bleu de lactophénol ; cc : cellule corticale ; vp : peloton jeune ; cp : peloton lysé ; hv : passage de l'hyphe) ; C : vus en microscope électronique à balayage, d'après Beyrle *et al.*, 1995.

qui le sont présentent souvent une coloration brune-orangée visible en surface. Les organes qui stockent les réserves glucidiques (amidon) et les organes chlorophylliens ne sont pas ou peu colonisés. C'est une des raisons qui expliquent pourquoi les orchidées épiphytes sont généralement moins colonisées que les orchidées terrestres, dans la mesure où elles peuvent avoir des pigments chlorophylliens dans leurs racines (Otero *et al.*, 2002). Lors de la mycorhization, les hyphes du champignon traversent l'épiderme de la racine (très développé chez les orchidées épiphytes), sans jamais le coloniser. Ils colonisent en revanche certaines cellules du parenchyme cortical de la racine. On observe alors des cellules libres ou des cellules colonisées par des pelotons clairs et relâchés (pelotons jeunes) ou par des amas compacts brun-orangés (pelotons âgés souvent lysés ; voir section 1.2.2).

### 1.2.2 Particularités fonctionnelles

**Lyse des pelotons.** La symbiose mycorhizienne des orchidées pose encore des interrogations sur ses mécanismes de transfert des nutriments. Bien que ceux-ci ne soient pas clairement élucidés, il n'en reste pas moins que cette symbiose montre un processus original de nécrotrophie. Dans le cas général, les pelotons intracellulaires sont lysés par la plante. Ce processus est appelé tolypophagie (Rasmussen, 1995; Peterson *et al.*, 1996). Lors de ce processus, qui a parfois été présenté comme une réaction de défense de la plante (sans vraie preuve), tous les contenus cellulaires des hyphes sont libérés dans la matrice d'interface. L'hypothèse selon laquelle des transferts de nutriments vers la plante opéreraient juste après la lyse a été proposée, mais la croissance du protocorme commence avant toute lyse (Cameron *et al.*, 2006). Dans d'autres cas, les hyphes ne se constituent pas en pelotons, mais se déforment simplement à leurs extrémités. La lyse des hyphes est alors partielle

et intervient uniquement au niveau des extrémités déformées. Ce processus, appelé ptyophagie, n'a été observé que ponctuellement chez des orchidées non chlorophylliennes tropicales des genres *Gastrodia* et *Lecanorchis* (Kusano, 1911; Burgeff, 1932). Ces deux mécanismes diffèrent du fonctionnement des autres endomycorhizes, dans lequel la matrice d'interface est alimentée en continu par des échanges biotrophes. Ils n'excluent cependant pas l'hypothèse de transferts de nutriments entre membranes intactes avant la lyse. La lyse pourrait alors constituer un mécanisme secondaire, comme par exemple, le recyclage de structures vieillissantes. Au bilan, il n'existe pas de preuve directe d'échanges biotrophes chez les orchidées.

**Renouvellement de l'interface symbiotique.** Nous venons de voir que la lyse des pelotons intracellulaires est un processus fréquent dans les racines des orchidées. Ce processus exige de ce fait un renouvellement constant de l'interface symbiotique. Le renouvellement est assuré soit par une progression des hyphes de cellule en cellule dans le cortex de la racine, soit par des pénétrations répétitives des hyphes depuis l'extérieur à travers l'épiderme (ou par les deux voies simultanément). Ce renouvellement constant de l'interface symbiotique autorise donc des variations de la mycorhization dans l'espace et au cours du temps. La dynamique spatio-temporelle de la mycorhization a été peu étudiée chez les orchidées. On sait néanmoins que la mycorhization apparaît très rapidement dès la formation des nouvelles racines (Alexander et Alexander, 1984), et que la quantité de pelotons dans les racines peut chuter durant la floraison, selon les espèces (Masuhara et Katsuya, 1992).

### 1.2.3 Mutualisme ou parasitisme orchestré par l'orchidée ?

**Parasitisme orchestré par l'orchidée.** Cette symbiose mycorhizienne a d'abord été considérée comme un parasitisme orchestré par l'orchidée. Le partenaire mycorhizien, alors recruté par la plante, apporte à celle-ci tous les éléments nutritifs nécessaires à son développement. Plusieurs explications concourent à cette vision de la symbiose. D'une part, les premières expérimentations sur la réciprocité des échanges ont été réalisées sur des germinations d'orchidées. Des expériences *in vitro* de suivi du carbone radioactif ont mis en évidence un transfert de carbone (trehalose) du champignon vers des germinations (Beau, 1920; Smith, 1966, 1967; Purves et Hadley, 1974; Alexander et Hadley, 1985). Or, toute orchidée connaît une phase d'hétérotrophie aux premiers stades du cycle de vie, durant laquelle elle dépend totalement de son symbiote pour subvenir à ses besoins (voir section 1.3.1). D'autre part, la preuve directe du bénéfice pour le champignon a longtemps fait défaut. Les mêmes expériences, reproduites sur des plantules de *Goodyera repens* alors autotrophes, n'ont pas détecté de flux de carbone de la plante vers le champignon.

Ces résultats ont aboutit à deux conclusions : chez l'orchidée, il doit exister une transition physiologique qui stoppe le flux de carbone dès l'apparition de la photosynthèse et le champignon mycorhizien ne reçoit pas de carbone de sa plante hôte, même lorsque celle-ci devient autotrophe (Hadley et Purves, 1974). Cette vision de la symbiose comme un parasitisme orchestré par l'orchidée a été aussi influencée, plus récemment, par l'existence de nombreuses orchidées tricheuses dans la nature (voir section 1.3.2).

**Mutualisme chez l'orchidée *Goodyera repens*.** La question de la réciprocité des échanges a été revue récemment chez des plantules de *Goodyera repens* (Cameron *et al.*, 2006, 2007). Des expériences *in vitro* de suivi des éléments marqués (carbone, azote et phosphate) ont mis en évidence des flux de nutriments dans les deux sens (Figure 1.6) : un flux important de carbone de la plante vers le champignon, aussi fort que celui mesuré dans certaines endomycorhizes à arbuscules (Leake *et al.*, 2006) ; un flux de carbone moins important du champignon vers la plante hôte ; un flux important d'azote du champignon vers la plante, plus de deux fois supérieur au flux de carbone qui va dans le même sens ; et un flux important de phosphate du champignon vers la plante hôte. L'azote et le phosphate apparaissent donc pour la première fois comme des composés mis en jeu dans cette symbiose. Les orchidées ont d'ailleurs la particularité de concentrer fortement les composés azotés dans leurs tissus aériens, ce qui pourrait suggérer des besoins importants en azote (Gebauer et Meyer, 2003).
En conclusion de cette section, la symbiose mycorhizienne des orchidées peut mettre en jeu des échanges réciproques de nutriments entre les partenaires. Cependant, on ne connaît pas l'effet des échanges sur le *fitness* du champignon. De plus, cela ne fait qu'un exemple de réciprocité et non une règle. La nature mutualiste de la symbiose mycorhizienne des orchidées fait donc encore débat (Rasmussen et Rasmussen, 2009). Dans la partie suivante, nous étudierons des situations où le mutualisme paraît encore moins évident.

## 1.3 La mycohétérotrophie chez les orchidées

### 1.3.1 Mycohétérotrophe à la germination

**Structure de la graine d'orchidée.** Pour comprendre le phénomène de mycohétérotrophie chez les orchidées, il est nécessaire de décrire la structure de leur graine. Elle est la plus petite parmi les angiospermes, car elle ne contient pratiquement pas de réserves. Sa taille microscopique varie entre 50 et 100 microns selon les espèces (Arditti et Ghani, 2000). Chez les angiospermes, la graine contient habi-

Mycorrhiza (2007) 17:475–486

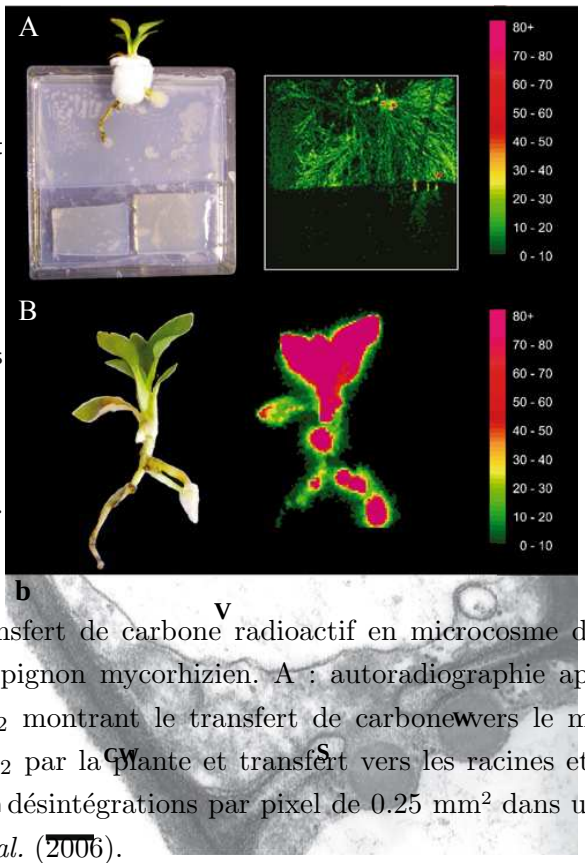



FIGURE 1.6 – Transfert de carbone radioactif en microcosme de l'orchidée *Goodyera repens* vers un champignon mycorhizien. A : autoradiographie après 72 h d'exposition des plantes au $^{14}CO_2$ montrant le transfert de carbone vers le mycélium externe ; B : assimilation du $^{14}CO_2$ par la plante et transfert vers les racines et le rhizome. L'échelle indique le nombre de désintégrations par pixel de 0.25 mm² dans une période de 60 min. D'après Cameron *et al.* (2006).

Fig. 1 Important recent discoveries in orchid mycorrhizal physiology and ecology. a. False colour digital autoradiographs showing movement of $^{14}C$ from G. repens (upper and lower images) to intact colonising fungal hyphae (RHS block of top image). The colour scale is indicative of the number of counts detected in pixel areas of 0.25 mm² over 60 min (Fig. 5 from Cameron et al 2006) reproduced (with kind permission of Blackwell Publishing). b. Transmission electron micrograph of non-dolipore ascomycete peloton forming hyphae in roots of E. mitrophylla. W Wall in bodies, S septum, CW fungal cell wall, V vacuole. Scale bar is 0.2 µm (Fig. 1c from Selosse et al. 2002 reproduced with kind permission of Springer Science and Business Media)

view by Rasmussen (2002) elegantly summarised the
urrent state of orchid mycorrhizal research. In her
she described the latest cytological, ecological and
ogical aspects of this mycorrhizal field. Rasmussen
d some of the early studies on orchid mycobiont
cation using molecular techniques (e.g. Taylor and
997, 1999) and highlighted new evidence that some
chids could derive their carbon from tree species via
omycorrhizal (ECM) connection (McKendrick et al.
In the past 5 years, there has been a steady flow of
esearch published on orchid mycorrhizas, with a
hinance of molecular mycobiont identification studies
have clarified some major issues in orchid mycorrhizal
. Recently, Cameron et al. (2006) published results of
y showing, for the first time, carbon transfer from
to fungus, which has important implications for all
uent research into photosynthetic orchid mycorrhizas.

scoveries in orchid-mycorrhizal physiology
mark new paper demonstrating orchid mycorrhizas
rue mutualism
mycorrhizas have historically been depicted as
lous mycorrhizal associations in that nutrient flow
ant focussed, and the fungal partner received little
for its services (Smith and Read 1997). In two
ent papers, Hadley and Purves (1974) and Alexander
dley (1985) reported that when mycorrhizal Good-
pens (L.) R.Br. was exposed to $^{14}CO_2$, they were
to detect any passage of carbon to the fungal partner.
ecent repeat of these experiments, Cameron et al.
have clearly shown that $^{14}CO_2$ passes from adult G.
to the mycobiont (Fig. 1a). These authors also
d that mycorrhizal fungi continued to provide some
to adult photosynthetic plants, a result again in
st to Alexander and Hadley (1985). Differences in
have been attributed to the higher physiological
of both partners (i.e. sink sizes) in the later study
d by more naturally equivalent experimental condi-
uch as moderate temperature, humidity and light
hids receive compounds other than carbon from their
partners. Alexander et al. (1984) found that mycor-
G. repens acquired 100 times more P than non-
hizal controls. P and N (as glycine) transfer from
to plant was confirmed in radiolabeling experiments
on et al. 2006, 2007). Mycorrhizal fungi may also be
source of water for orchids. In both the terrestrial
hera integrilabia (Correll) Luer and the epiphytic
drum conopseum R.Br., water content was higher for
hizal seedlings than uncolonised controls (Yoder
000). Thus, the overall picture of nutrient exchange
ger

tuellement un embryon, un albumen (tissu nourricier plus ou moins développé), un ou deux cotylédons (feuilles primordiales), un tégument (enveloppe protectrice), et des réserves nutritives destinées à la germination. Chez les orchidées, en revanche, la graine ne contient ni albumen, ni cotylédon. Un embryon d'une centaine de cellules indifférenciées entouré par son tégument, vit une dormance physiologique et morphologique. Il peut néanmoins contenir quelques réserves lipidiques et protéiques (Richardson *et al.* 1992), mais l'absence de réserve glucidique est la règle chez les orchidées. Une très grande quantité de graines facilement disséminées peut être ainsi produite par l'orchidée à chaque reproduction, une capsule d'orchidée contenant plusieurs dizaines de milliers à quelques millions de graines (Arditti et Ghani, 2000). En minimisant l'investissement énergétique par graine, les orchidées ont adapté un trait qui maximise leur fécondité et leur capacité de dispersion par les vents. Cette stratégie leur confère vraisemblablement un atout majeur pour la colonisation des nouveaux espaces. Il n'est donc pas étonnant que les orchidées soient représentées à toutes les latitudes, sur tous les continents (Dressler, 1981 ; voir section 1.5).

**Germination symbiotique.** Cette particularité de la graine pose néanmoins une contrainte : l'orchidée dépend de la présence d'un partenaire mycorhizien pour ger-

mer et se développer à ses premiers stades (Rasmussen, 1995; Smith et Read, 1997). Bernard (1899) a observé pour la première fois des pelotons endomycorhiziens dans des germinations d'orchidées. Pour lui, les germinations qu'il avait collectées au pied d'une orchidée *Neottia nidus-avis* avaient été induites par la présence du champignon échappé des racines. Aujourd'hui, la germination symbiotique des orchidées est un phénomène bien connu (Figure 1.7). Le champignon pénètre la graine par le pôle inférieur de l'embryon (suspenseur ; Bernard, 1899; Richardson *et al.*, 1992) et colonise le parenchyme en y formant des pelotons (comme dans les racines). Il intervient dans la levée de la dormance physiologique de l'embryon, en facilitant l'absorption d'eau (Yoder *et al.*, 2000) et en apportant des sucres. L'orchidée connaît donc une phase hétérotrophe durant ses premiers stades de développement. Le partenaire mycorhizien fournit alors tous les nutriments à son hôte, dont le carbone : on parle de mycohétérotrophie. On comprend mieux à présent pourquoi les expériences faites sur des germinations ont conduit à la vision d'une symbiose non mutualiste, car on conçoit difficilement ce que la graine d'orchidée puisse céder à son partenaire. Actuellement, il est possible, pour certaines espèces, d'obtenir des germinations asymbiotiques (sans partenaire) *in vitro*, en plaçant les graines sur un substrat enrichi en sucres simples et en vitamines (Rasmussen, 1995). En revanche, on pense que les graines n'arrivent pas à germer seules dans la nature, car les éléments nécessaires ne devraient pas circuler librement dans le milieu.

FIGURE 1.7 – Germination symbiotique de *Dactylorhiza majalis* avec une souche de *Ceratobasidium sp.* en culture artificielle. Les germinations ont atteint le stade de protocormes. Photo G. Wojtczak.

### 1.3.2 Cas d'adultes plus ou moins hétérotrophes

**Traits dérivés des mycohétérotrophes.** Parmi les 25 000 espèces d'orchidées (Dressler, 2006), on rencontre des espèces qui ne développent pas la capacité photosynthétique durant tout leur cycle de vie. Ces plantes ont d'abord été nommées plantes saprophytes, puis plantes mycohétérotrophes après que leur mode de vie ait été dévoilé (Leake, 1994). On les retrouve dans plusieurs familles d'angiospermes et même chez les Hépatiques (Figure 1.3), mais ce sont les orchidées qui en comptent le plus grand nombre avec près de 200 espèces réparties dans 43 genres (Leake, 1994). Les orchidées mycohétérotrophes ont une distribution géographique large à l'échelle du globe, mais sont inégalement réparties entre les écosystèmes. La majorité d'entre elles vit dans les forêts tropicales, en Asie du Sud-Est (au Japon notamment) et en Amérique du Sud essentiellement. Seule une dizaine d'espèces habitent les forêts tempérées d'Amérique du Nord et d'Eurasie. Paradoxalement, toutes les études ont été menées dans ces régions (Leake et Cameron, 2010). Elles colonisent les sous-bois sombres des forêts (Leake, 1994) où l'humidité est importante. L'absence relative de lumière dans leurs habitats est défavorable au développement de la plupart des plantes chlorophylliennes. Au niveau morphologique, elles partagent certains traits caractéristiques. Leurs feuilles sont réduites à des écailles et ne présentent généralement ni stomate ni pigment chlorophyllien. Les parties aériennes se limitent à une tige—de coloration brunâtre ou rougeâtre, dressée sur quelques dizaines de cm tout au plus—qui n'apparaît qu'au moment de la floraison (Leake, 1994; Rasmussen, 1995). Les fleurs, en nombre variable, sont fécondées en autogamie ou par de petits insectes, et les fruits produisent une grande quantité de graines microscopiques. Les espèces mycohétérotrophes produisent d'ailleurs plus de graines que les espèces autotrophes apparentées (Arditti et Ghani, 2000). Les parties souterraines (racines, rhizomes ou tubercules) sont souvent hypertrophiées, ce qui montre l'importance de la vie souterraine chez ces espèces (Leake, 1994; Rasmussen, 1995). Les parties aériennes, en revanche, apparaissent de façon sporadique à des saisons parfois variables.

**Fonctionnement de la mycohétérotrophie.** Bien que la majorité des espèces habite les écosystèmes tropicaux, l'étude des orchidées mycohétérotrophes a été cantonnée aux espèces tempérées (Leake et Cameron, 2010). Leur mode de nutrition a été élucidé progressivement par différentes méthodes. Selosse *et al.* (2002) ont identifié génétiquement (*barcoding* sur l'ADNr ITS) les champignons dans les racines de *Neottia nidus-avis*, démontrant ainsi que leurs partenaires endomycorhiziens étaient les mêmes que ceux identifiés dans les ectomycorhizes d'arbres voisins. Certains auteurs qualifient même ce phénomène d'épiparasitisme ectomycorhizien (Taylor et

Bruns, 1997 ; Figure 1.8).

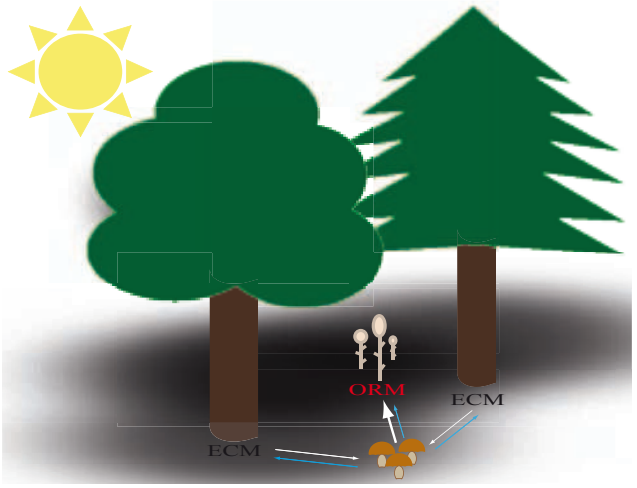



FIGURE 1.8 – Fonctionnement de la mycohétérotrophie chez les orchidées non chlorophylliennes tempérées. ECM : ectomycorhizes ; ORM : endomycorhizes des orchidées ; flèches blanches : flux de carbone organique ; flèches bleues : flux d'eau et de sels minéraux (N, P).

Plus tard, McKendrick *et al.* (2000) ont mis en évidence, après marquage, un flux de carbone radioactif de deux espèces d'arbres, *Salix repens* (Saule) et *Betula pendula* (Bouleau), vers des plantules de *Corrallorhiza trifidata*. Actuellement, d'autres méthodes moins fastidieuses permettent d'identifier la source de carbone chez ces espèces. Les teneurs des plantes en isotopes stables $^{12}C$ et $^{13}C$ sont des indicateurs indirects de la source de carbone (Dawson *et al.*, 2002). Les isotopes stables du carbone sont naturellement présents dans l'atmosphère. Lors de la fixation du carbone atmosphérique, les organismes autotrophes assimilent préférentiellement les isotopes légers (le ratio $^{13}C/^{12}C$ mesuré dans les tissus est donc faible). Les organismes hétérotrophes, en revanche, ont la même signature isotopique que la matière organique qu'ils consomment. Il en est de même pour les isotopes stables de l'azote ($^{14}N$ et $^{15}N$), excepté pour les organismes hétérotrophes qui sont enrichis en $^{15}N$ par rapport à la source. La comparaison des signatures isotopiques des plantes mycohétérotrophes avec celles des champignons et des plantes autotrophes du milieu permet de retracer les chaînes alimentaires (Figure 1.9 ; Trudell *et al.*, 2003). En facilitant l'exploration des modèles *in situ*, les méthodes isotopiques ont aussi révélé l'existence de régimes mixtes chez des orchidées chlorophylliennes. Alors que les espèces mycohétérotrophes reçoivent tout leur carbone des mycorhiziens, certaines espèces chlorophylliennes de sous-bois obtiennent ainsi jusqu'à 85% de leur budget carboné (Gebauer et Meyer, 2003). Ces espèces utilisent à la fois le carbone atmosphérique par la photosynthèse et le carbone organique obtenu des mycorhi-

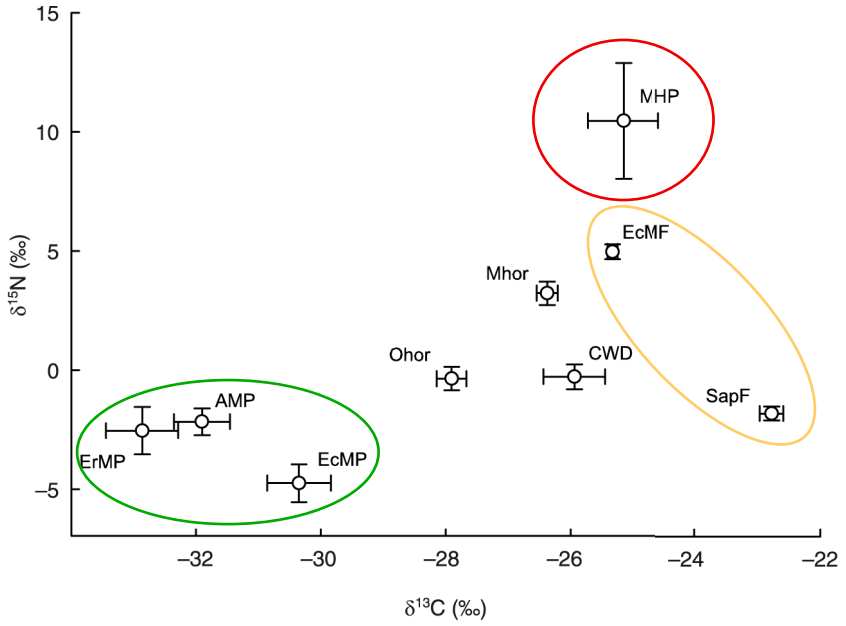



FIGURE 1.9 – Signatures isotopiques du carbone et de l'azote des plantes autotrophes et mycohétérotrophes. Vert : plantes autotrophes ; orange : champignons (dont ectomycorhiziens, EcMF) ; rouge : plantes mycohétérotrophes. D'après Trudell *et al.*, 2003.

ziens : on les appelle mixotrophes (Bidartondo *et al.*, 2004; Julou *et al.*, 2005; Abadie *et al.*, 2006). La mixotrophie est susceptible d'être rencontrée chez des espèces apparentées aux lignées mycohétérotrophes. Les espèces mixotrophes constituent de fait des modèles idéaux pour comprendre les voies qui mènent à la mycohétérotrophie chez les orchidées.

### 1.3.3 Évolution de la mycohétérotrophie

L'histoire évolutive de la mycohétérotrophie chez les orchidées n'est pas totalement résolue. D'abord, les espèces mycohétérotrophes ne sont visibles que lors de la floraison et apparaissent à des niveaux de populations faibles, quels que soient les effectifs souterrains. Ces deux particularités ont limité leur observation dans la nature. De plus, les traits morphologiques dans leurs parties aériennes convergent en réponse à la pression exercée par des niches écologiques similaires. Cette particularité a limité leur assignation taxonomique dans telle ou telle tribu des orchidées. Enfin, en perdant la capacité photosynthétique, elles ont aussi perdu certains gènes chloroplastiques qui ne répondent plus aux protocoles d'amplifications classiques. La divergence de l'ADN chloroplastique chez ces espèces a donc limité leur étude en phylogénie moléculaire. Par exemple, certaines espèces ne possèdent pas le gène codant pour la ribulose-bisphosphate carboxylase (rbcL), et d'autres

n'abritent peut-être même pas de chloroplaste dans leurs cellules (Cameron, 2004). Une phylogénie moléculaire basée sur des marqueurs nucléaires a établi les relations d'apparentés entre les genres mycohétérotrophes à l'échelle de la famille des orchidées (Molvray *et al.*, 2000). Leur distribution phylogénétique révèle au moins 20 apparitions indépendantes de la mycohétérotrophie (Figure 1.10). La stratégie mycohétérotrophe, qui a été adaptée à plusieurs reprises chez les orchidées, ne semble pas avoir un impact fort sur la radiation évolutive des espèces, car les genres mycohétérotrophes actuels ne comptent que quelques espèces. Cependant, ces taxons peuvent avoir de nombreuses espèces cryptiques, comme dans le genre *Hexalectris* (Kennedy et Watson, 2010).

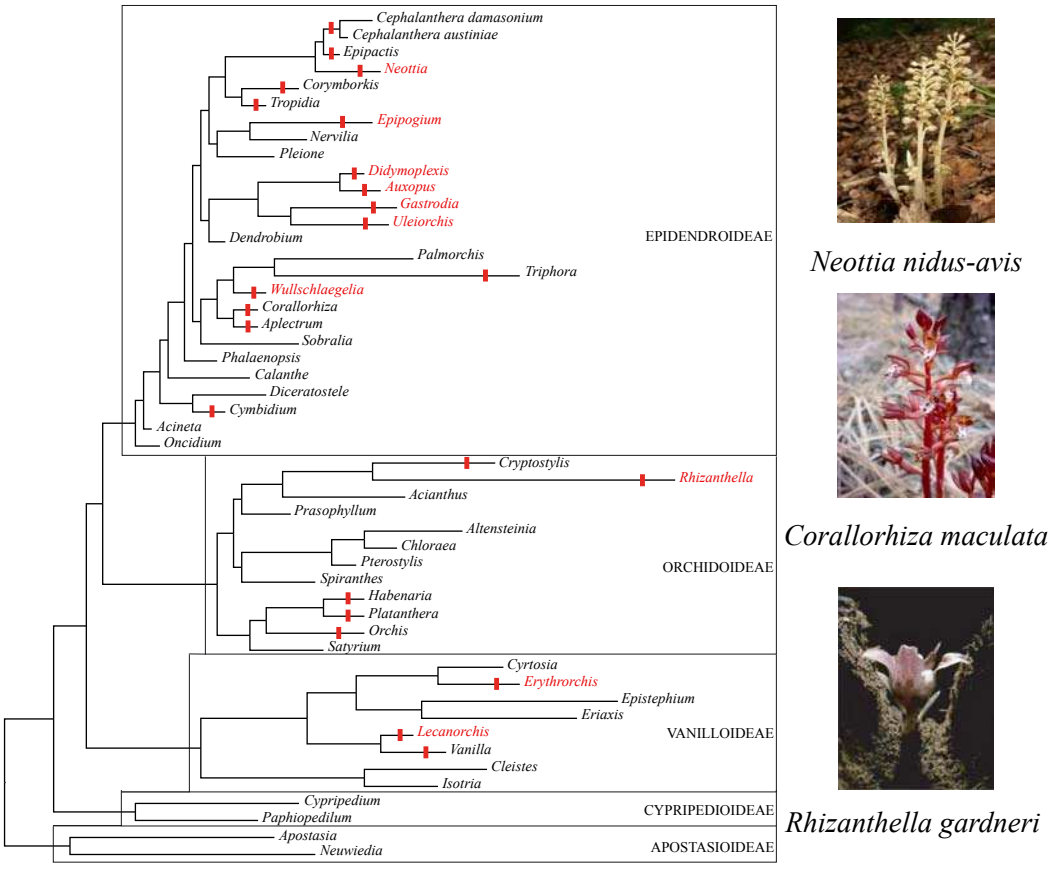



FIGURE 1.10 – Apparitions indépendantes de la mycohétérotrophie chez les orchidées. Arbre phylogénétique (ADNr 18S) montrant les lignées mycohétérotrophes chez les orchidées. Barres rouges : genres ayant des espèces mycohétérotrophes ; en rouge : genres entièrement mycohétérotrophes. D'après Molvray *et al.* (2000).

En conclusion de cette section, les orchidées sont pour la plupart chlorophylliennes, mais nombre d'entre elles vivent préférentiellement dans les sous-bois ombragés des forêts. C'est le cas notamment de l'orchidée *Goodyera repens* qui peut obtenir une

certaine quantité de carbone de son symbiote. Le renversement du flux de carbone peut résulter d'un déterminisme génétique (cas des genres mycohétérotrophes), mais est susceptible aussi d'apparaître spontanément chez certaines espèces chlorophylliennes sous certaines conditions écologiques. Il est donc raisonnable de penser qu'à côté des espèces mycohétérotrophes se cachent une multitude d'espèces et/ou d'individus partiellement hétérotrophes. Les orchidées mixotrophes en sont d'ailleurs un bon exemple. De ce fait, la distinction qui est faite ici entre orchidées chlorophylliennes et orchidées mycohétérotrophes est une commodité de présentation, compte tenu de la variabilité de leurs partenaires mycorhiziens et des niveaux de spécificité.

## 1.4 Des partenaires mycorhiziens et des niveaux de spécificité variables

### 1.4.1 Rhizoctonias chez les orchidées chlorophylliennes

**Polymorphisme des rhizoctonias.** L'identification des mycorhiziens d'orchidées par culture *in vitro* a longtemps masqué leur identité réelle, ainsi que l'étendue de leur diversité taxonomique. Bernard (1904) a isolé pour la première fois des mycorhiziens d'orchidées, les assignant alors dans le genre *Rhizoctonia*. Le genre *Rhizoctonia* forme un groupe artificiel de champignons dont les téléomorphes (formes sexuées) ne sont pas connus ou n'existent pas dans la nature, et dont les anamophes (formes asexuées) en culture présentent des traits analogues à ceux du pathogène *Rhizoctonia solani*. Le polymophisme des *Rhizoctonia* n'a été révélé que très progressivement, en commençant par l'induction des téléomorphes à partir des anamorphes en culture (Warcup et Talbot, 1967). Les téléomorphes *Sebacina*, *Ceratobasidium*, *Thanathephorus* et *Tulasnella* ont ainsi été identifiés. Plus tard, l'observation des dolipores et des parenthosomes en microscopie électronique à transmission a permis de répartir les anamorphes entres les genres asexués *Rhizoctonia sensu stricto*, *Ceratorhiza*, *Moniliopsis* et *Epulorhiza* (Moore, 1987). Chez les Basidiomycètes, le septum (cloison transversale de l'hyphe) présente en effet des nappes de réticulum endoplasmique de part et d'autre du dolipore (pore du septum), appelées parenthosomes. La correspondance entre téléomorphes et anamorphes a alors été établie (Tableau 1.3). Cependant, la culture peut avoir masqué des partenaires mycorhiziens incapables de se développer *in vitro*. Par exemple, Zelmer *et al.* (1996) ont observé des Basidiomycètes atypiques dans des pelotons intracellulaires de trois espèces de *Cypripedium*, mais ils n'ont jamais réussi à les isoler en culture.

Table 1.3 – Correspondance entre téléomorphes et anamorphes chez les rhizoctonias.

| **Famille** | **Téléomorphe** | | **Anamorphe** | |
|---|---|---|---|---|
| | **Genre** | **ORM majeur** | **Genre** | **ORM majeur** |
| Sebacinales | *Sebacina* | *S. vermifera* | *Rhizoctonia* | — |
| Ceratobasidiaceae | *Ceratobasidium* | *C. cornigerum* | *Ceratorhiza* | *C. goodyerae-repentis* |
| | *Thanatephorus* | — | *Moniliopsis* | *T. cucumeris* |
| Tulasnellaceae | *Tulasnella* | *T. calospora* | *Epulorhiza* | *E. repens* |

**Polyphylétisme des rhizoctonias.** Le développement de la PCR, puis d'amorces nucléotidiques permettant d'amplifier spécifiquement l'ADN ribosomal des champignons (White *et al.*, 1990; Gardes et Bruns, 1993; Selosse *et al.*, 2007), a permis une avancée considérable dans l'exploration de la diversité des champignons mycorhiziens. Dans l'exemple précédent, Shefferson *et al.* (2005) ont montré par la suite que sept espèces de *Cypripedium* sont associées surtout à des Tulasnellaceae, parfois à des Sebacinales et à des Ceratobasidiaceae, et plus rarement à des *Phialophora* (Ascomycètes). De plus, les phylogénies moléculaires des Basidiomycètes ont révélé que les familles Sebacinales, Ceratobasidiaceae et Tulasnellaceae sont phylogénétiquement distantes (Figure 1.11).

Le genre *Rhizoctonia* constitue donc un groupe polyphylétique de champignons. Néanmoins, ce terme reste présent dans la littérature, par commodité : on parle aujourd'hui de rhizoctonias pour désigner l'ensemble des mycorhiziens des orchidées chlorophylliennes appartenant aux groupes sus-nommés. Les rhizoctonias sont souvent considérés comme des champignons saprophytes (décomposeurs de la matière organique), pouvant vivre ainsi hors de l'association. Cependant, des études récentes ont montré qu'une famille de mycorhiziens pouvait être très diversifiée phylogénétiquement et du point de vue de l'écologie des champignons. Parmi les plus étudiés, les Sebacinales sont décrits aujourd'hui comme des endomycorhiziens des orchidées, des ericacées et de certaines hépatiques, mais aussi comme des ectomycorhiziens des arbres tempérés. Dans la phylogénie des Sebacinales, on identifie un clade de champignons ectomycorhiziens (clade A) et un clade de champignons endomycorhiziens (clade B ; Weiss *et al.*, 2004). Chez les Ceratobasidiaceae et les Tulasnellaceae, les connaissances sont plus diffuses. Toutefois, quelques séquences de champignons ectomycorhiziens ont déjà été identifiées chez les Ceratobasidiaceae et les Tulasnellaceae (Yagame *et al.*, 2008; Bidartondo *et al.*, 2003) qui pourraient aussi se distribuer en d'authentiques clades endomycorhiziens et ectomycorhiziens au sein de ces familles (Tedersoo, Selosse et Martos, données préliminaires).

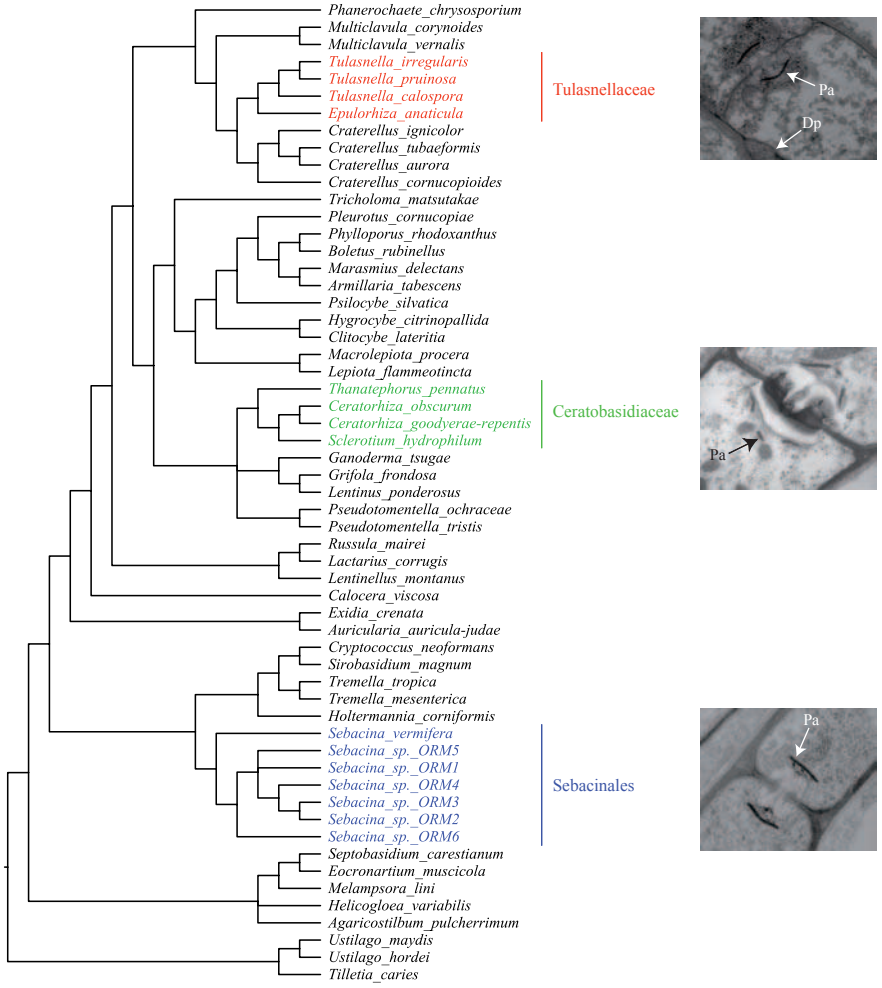



FIGURE 1.11 – Polyphylétisme et polymorphisme ultrastructural des champignons rhizoctonias. Arbre phylogénétique (ADNr 28S) des Basidiomycètes mycorhiziens. D'après Taylor *et al.* (2002). Clichés de microscopie électronique à transmission montrant la structure des dolipores et des parenthosomes des différents rhizoctonias. Pa : parenthosome ; Dp : dépôt pariétal. Photos I. Kottke.

### 1.4.2 Spécificité des orchidées chlorophylliennes

**Transmission des mycorhiziens.** Les symbiotes mycorhiziens ne sont pas transmis verticalement lors de la reproduction de l'orchidée, car ceux qui sont présents dans les racines n'atteignent pas les organes reproducteurs. Les graines sont enfermées dans la capsule, puis disséminées par le vent sans symbiote (Otero *et al.*, 2007). Il est probable qu'une partie des graines libérées tombent directement au pied de la plante mère, et de ce fait, que les mêmes partenaires soient acquis par des plantes filles (transmission pseudo-verticale). Cette modalité de transmission pourrait être d'autant plus importante chez les espèces d'orchidées développant une graine dont la taille et la forme la rendent moins flottante, et donc, moins dispersive (Arditti et Ghani, 2000). Dans la majorité des cas, cependant, les graines peuvent être disséminées à une distance suffisamment longue pour ne pas retrouver les partenaires de la plante mère. Des champignons adéquats doivent donc être retrouvés dans l'habitat à chaque reproduction (transmission horizontale ; Bidartondo et Read, 2008). Cette modalité de transmission devrait être assurée par le trait adapté par les orchidées qui consiste à produire une quantité énorme de graines à chaque reproduction. Ainsi, la sélection pourrait avantager les génotypes capables de se développer avec plusieurs types de partenaires dans l'habitat : on s'attend alors à une spécificité faible et à des cortèges symbiotiques diversifiés chez les espèces d'orchidées. Mais, la sélection pourrait aussi avantager les génotypes capables de se développer avec un partenaire qui serait abondant dans son habitat : on s'attend dans ce cas à une spécificité élevée et à ce que de nombreuses espèces sympatriques partagent le même symbiote.

**Différents niveaux de spécificité.** La spécificité des espèces d'orchidées a fait l'objet de nombreuses recherches dès lors que le rôle des mycorhiziens dans la germination a été reconnu. Pour autant, elle reste peu comprise chez les orchidées chlorophylliennes. Une première explication est que la spécificité a longtemps été étudiée *in vitro* en testant la réponse en germination avec différents isolats (Curtis, 1937; Hadley, 1970; Masuhara et Katsuya, 1989, 1994). L'ensemble de ces expériences ont aboutit à la conclusion que les orchidées peuvent établir des symbioses *in vitro* avec plusieurs types de rhizoctonias, et de ce fait, qu'elles devraient être peu spécifiques dans la nature. Or, les conditions *in vitro* ne reflètent pas les conditions écologiques des partenaires et altèrent probablement les mécanismes de mise en place de la symbiose. Ainsi, des études chez *Spiranthes sinensis* ont montré que des germinations pouvaient être obtenues *in vitro* avec plusieurs souches de Ceratobasidiaceae et de Tulasnellaceae (spécificité potentielle faible ; Masuhara *et al.*, 1993), alors que les germinations n'étaient observées *in situ* qu'avec une souche de Tulasnellaceae

(spécificité écologique élevée ; Masuhara et Katsuya, 1994). Une seconde explication est qu'il existe vraisemblablement des niveaux de spécificité variables entre les espèces. Plus récemment, McCormick *et al.* (2004) ont montré par des identifications génétiques que *Goodyera pubescens* et *Liparis lilifolia* ont une spécificité élevée avec un clade de Tulasnellaceae, alors que *Tipularia discolor* a un cortège symbiotique fait de trois clades de Tulasnellaceae et de deux clades de Sebacinales. De nombreuses études ont depuis relaté des niveaux de spécificité variables selon les espèces (Dearnaley, 2007). Lorsque les observations actuelles sont reportées sur la phylogénie des orchidées, on n'observe pas de spécificité apparente entre les clades des orchidées et les familles de mycorhiziens (Figure 1.12). Cependant, il est intéressant de noter que l'endosymbiose des orchidées est retrouvée chez des espèces des lignées les plus basales (Kristiansen *et al.*, 2004; Yukawa *et al.*, 2009) aux plus récemment apparues, tandis que les familles proches s'associent avec des Gloméromycètes. L'endosymbiose à pelotons des orchidées constitue vraisemblablement un trait dérivé (synapomorphie) du phylum des orchidées.

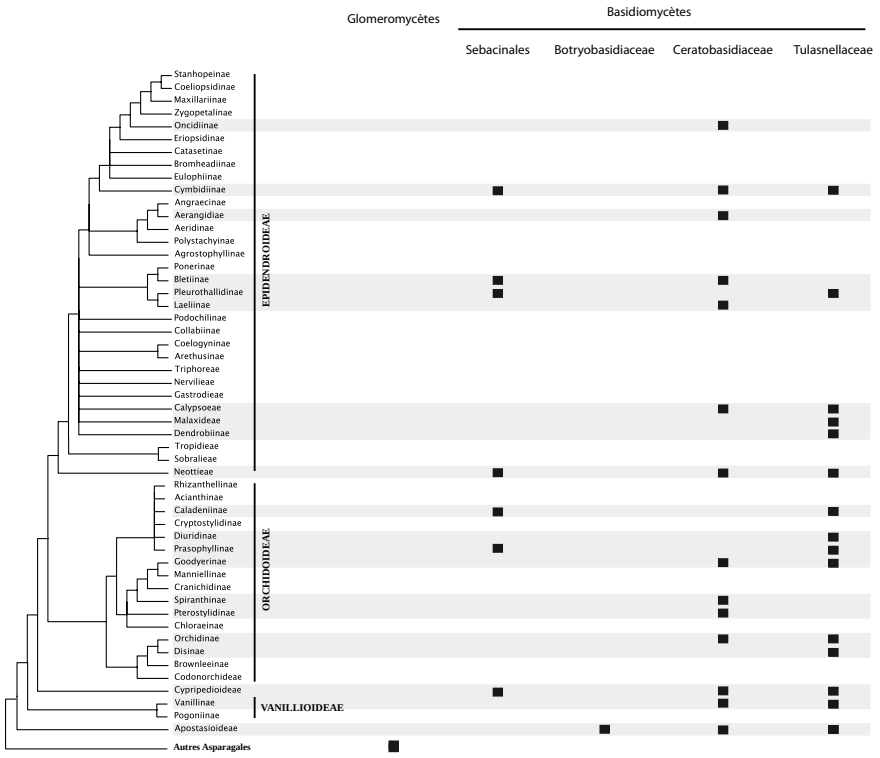



FIGURE 1.12 – Distribution des différents mycorhiziens dans la phylogénie des Orchidaceae. Sont représentés ici uniquement les cas dans lesquels les champignons mycorhiziens ont été identifiés par des méthodes moléculaires. Modifié selon Yukawa *et al.* (2009).

### 1.4.3 Spécificité des orchidées mycohétérotrophes

La culture des mycorhiziens des orchidées mycohétérotrophes s'est longtemps soldée par des échecs (Rasmussen, 1995) dans la mesure où ces champignons peinent à se développer en conditions *in vitro*. Là encore, la diversité des partenaires, chez des espèces tempérées essentiellement, a pu être explorée par l'avancée des techniques de biologie moléculaire. Les espèces mycohétérotrophes tempérées montrent des similitudes dans leurs associations mycorhiziennes. Premièrement, les partenaires identifiés appartiennent toujours à des groupes de champignons ectomycorhiziens, tels que les Telephoraceae, les Russulaceae et les Sebacinales (Taylor *et al.*, 2002; Dearnaley, 2007). Les Sebacinales des espèces mycohétérotrophes sont en effet tous issus du clade A qui est ectomycorhizien (Weiss *et al.*, 2004). Deuxièmement, ces champignons forment simultanément une association endomycorhizienne avec l'orchidée mycohétérotrophe et des associations ectomycorhiziennes avec des arbres voisins, transférant ainsi à l'orchidée des sucres issus de la photosynthèse des arbres (voir section 1.3.2). Enfin, les associations des espèces mycohétérotrophes tempérées sont très spécifiques, une espèce s'associant à un clade de champignon de l'un des groupes ectomycorhiziens cités. Deux hypothèses non exclusives ont été proposées pour expliquer la spécificité élevée des espèces mycohétérotrophes par rapport à celle des espèces chlorophylliennes (Bruns *et al.*, 2002). La coadaptation fonctionnelle stipule que le mécanisme de transfert du carbone nécessite des adaptations trop spécialisées pour pouvoir mettre en jeu plusieurs types de partenaires. La coévolution parasitaire stipule que le champignon tente d'échapper au parasitisme alors que l'orchidée tente de le maintenir (voir section 1.1.4). Ce processus engage alors une "course aux armements" qui conduit à la mise en place d'une spécialisation au cours de l'évolution des deux partenaires jusqu'à un état de spécialisation irréversible.

En conclusion de cette section, les orchidées ont des partenaires mycorhiziens variés, qui diffèrent par leur position phylogénétique et leur écologie hors de l'association. Les espèces chlorophylliennes s'associent plus ou moins spécifiquement à trois familles des rhizoctonias, tandis que les espèces mycohétérotrophes s'associent très spécifiquement à des clades de champignons ectomycorhiziens. L'évolution de la mycohétérotrophie chez les orchidées se manifeste donc par des changements de partenaires et par la sélection récurrente de champignons ectomycorhiziens pouvant subvenir au besoin en carbone de ces plantes.
Cependant, les inventaires taxonomiques des mycorhiziens d'orchidées sont largement biaisés en faveur des modèles tempérés, car les équipes de recherche intéressées par ces thématiques se situent surtout en Amérique du Nord et en Europe (Alexander et Selosse, 2009). À l'exception de certaines études réalisées sur des modèles

tropicaux en Amérique (Otero *et al.*, 2002; Suárez *et al.*, 2006; Porras-Alfaro et Bayman, 2007), la connaissance des cortèges mycorhiziens est limitée dans les régions tropicales, là où les orchidées sont pourtant plus diversifiées (Dressler, 1981).

## 1.5 Des orchidées diversifiées dans les régions tropicales

### 1.5.1 Centres de diversification

La distribution géographique des orchidées est quasi mondiale. Elles colonisent tous les continents sous toutes les latitudes, à l'exception des pôles et des déserts les plus arides. On les rencontre dans les forêts ou prairies des écosystèmes boréaux, tempérés, méditerranéens, et même dans certains déserts, mais les écosystèmes tropicaux en abritent le plus grand nombre (Dressler, 1981). De nombreuses tribus des orchidées sont inféodées à la zone intertropicale, voire même à une région biogéographique de la zone où certaines ont suivi des radiations évolutives spectaculaires—comme les orchidées de la sous-tribu des Angraecinae dans les îles du sud-ouest de l'Océan Indien (Micheneau *et al.*, 2008b). Les centres de diversification des orchidées coïncident souvent avec les régions biogéographiques désignées comme étant des *hotspots* de la biodiversité terrestre tropicale (Myers *et al.*, 2000) : essentiellement en Amérique Centrale et du Sud (*Cattleya*, *Epidendrum*, etc.), en Asie du Sud-Est (*Dendrobium*, *Phalaenopsis*, etc.) et dans la région Afrique tropicale-Madagascar (*Angraecum*, *Eulophia* ; Dressler, 1981). Enfin, certaines lignées d'orchidées montrent une répartition pantropicale, c'est-à-dire qu'elles sont largement répandues dans la ceinture intertropicale. C'est le cas notamment du genre *Bulbophyllum* qui compte parmi les genres les plus diversifiés chez les Angiospermes, avec près de 2 400 espèces décrites (Fischer *et al.*, 2007).

### 1.5.2 Épiphytisme chez les orchidées tropicales

**Écologie de l'épiphytisme.** Les forêts tropicales humides sont particulièrement riches en espèces d'orchidées car la chaleur et l'humidité, mais aussi la relative stabilité du climat, sont favorables à leur développement. Or, si ces conditions climatiques sont favorables à l'installation des orchidées, elles le sont aussi pour la plupart des végétaux. L'accès à l'espace et à la lumière engendre alors une forte compétition au sol qui a probablement exercé une pression sur les végétaux pour la conquête des habitats aériens. On parle d'épiphytisme pour désigner le mode de vie où des plantes (généralement herbacées) germent sur d'autres plantes (généralement des arbres) et réalisent ainsi leur cycle de vie. À la différence des plantes hémiparasites

comme le gui, elles n'établissent pas de connexion vasculaire avec l'hôte qui n'est alors qu'un support. Elles puisent, directement ou par voie mycorhizienne, l'eau et les nutriments qui ruissellent sur leur support ou bien dans l'air (gaz, aérosols). Les communautés épiphytes sont plus diversifiées dans les forêts humides de montagne situées entre 800 et 1800 m d'altitude, que dans les forêts humides de plaine. On retrouve des plantes épiphytes chez les Bryophytes et les Ptéridophytes, ainsi que chez quelques familles d'Angiospermes comme les Bromelliacées, mais ce sont les orchidées qui en comptent le plus avec près de 18 000 espèces (Gravendeel *et al.*, 2004). Les orchidées épiphytes se développent parfois au contact de l'écorce ; mais le plus souvent, elles sont enracinées dans des microhabitats formés par la présence de Bryophytes, de lichens, ou d'un sol retenu par la topologie de la branche. Elles colonisent toutes les strates verticales des forêts humides, depuis la base des troncs jusqu'au plus hautes branches dans la canopée. Dans les forêts tropicales semi-sèches, il arrive que des espèces de la canopée soient retrouvées sur des blocs rocheux ou des falaises exposées : on parle dans ce cas de plantes lithophytes.

**Traits dérivés des orchidées épiphytes.** Les orchidées épiphytes tropicales appartiennent presque toutes à la sous-famille des Epidendroideae. Cependant, en dépit du fait qu'elles occupent une position basale dans la phylogénie des Orchidaceae, plusieurs espèces de Vanilloideae développent des lianes qui croissent verticalement sur les arbres et qui colonisent des habitats aériens. L'épiphytisme chez les orchidées est vraisemblablement apparu plusieurs fois au cours de l'évolution, et ce, même à l'échelle des Epidendroideae. Or, si ce mode de vie a permis à certaines lignées d'échapper à la compétition au sol, il les expose néanmoins à de nouvelles contraintes. En effet, les habitats épiphytes sont empreints à une sécheresse périodique, plus ou moins marquée selon les niveaux d'ensoleillement. Face à cette contrainte, les orchidées épiphytes ont adapté plusieurs traits morphologiques et fonctionnels liés pour la plupart au stockage interne de l'eau et des nutriments. Nombre d'entre elles ont des tiges et/ou des feuilles succulentes, ainsi que des racines entourées d'un épiderme épais et hydrophile (appelé velamen) qui facilite l'absorption hydrominérale. Chez le genre *Bulbophyllum*, les tiges renflées forment des sortes de bulbes aériens appelés pseudo-bulbes. Parmi les espèces adaptées aux habitats les plus empreints à la sécheresse, certaines ne développent pas de feuille (comme des espèces du genre *Vanilla*), voire ni feuille ni tige (comme le genre *Microcoelia* à Madagascar ; Figure 1.13). Elles compensent toutefois l'absence d'organe photosynthétique par des racines chlorophylliennes qui assurent la photosynthèse. Enfin, de nombreuses espèces épiphytes semblent avoir évolué vers un métabolisme photosynthétique de type CAM (*Crassulacean Acid Metabolism* ; Silvera *et al.*, 2009). Le métabolisme CAM permet à ces plantes de découpler la phase photochimique qui a lieu durant

la journée, de la phase de fixation du carbone qui se produit durant la nuit. Ainsi, les stomates peuvent rester fermés durant la journée limitant ainsi les pertes par évapotranspiration.

FIGURE 1.13 – Photographie de l'orchidée épiphyte aphylle *Microcoelia sp.* à Madagascar. Photo F. Martos.

### 1.5.3 Adaptations à la vie à l'ombre

Certaines orchidées terrestres tropicales ont aussi échappé à la compétition au sol en s'adaptant à la vie en sous-bois. Les conditions de température et d'humidité y sont plus constantes que dans les habitats épiphytes, mais la lumière y est le facteur limitant. La mycohétérotrophie est vraisemblablement l'adaptation la plus extrême développée par les orchidées, et ce sont les forêts tropicales qui ont vu naître le plus d'espèces mycohétérotrophes (voir section 1.3.2). Néanmoins, chez les orchidées, il existe d'autres adaptations à la vie dans les sous-bois ombragés. Ces adaptations impliquent généralement des modifications de la structure ou de la pigmentation des feuilles, qui tendent à maximiser l'absorption de la lumière. À titre d'exemple, les espèces du genre *Nervilia* ont des feuilles aux reflets moirés qui devraient agir en baissant les pertes par reflexion. Des espèces du genre *Goodyera* concentrent, dans les cellules de la face inférieure des feuilles, des anthocyanes ou des caroténoïdes qui réfléchissent la lumière traversant la feuille, ce qui permet ainsi un second passage de la lumière à travers la feuille.

# Chapitre 2

# Présentation des orchidées étudiées

La Réunion est un contexte intéressant pour aborder la problématique de la structure écologique et évolutive posée dans la thèse, car les communautés d'orchidées indigènes y sont diversifiées en termes écologiques (habitats contrastés et présence d'espèces terrestres et épiphytes) et phylogénétiques (groupes taxonomiques distants). De plus, sa situation insulaire et son âge jeune ont fait que certaines orchidées en radiation dans la zone se sont récemment diversifiées sur l'île. C'est principalement le cas du clade des angraecoïdes pour lesquels nous disposons d'une phylogénie moléculaire (Micheneau *et al.*, 2008a). Ce modèle a donc constitué une cible prioritaire dans notre étude de la structure phylogénétique des symbioses mycorhiziennes. D'autre part, afin de mieux connaître la mycohétérotrophie et la mixotrophie hors de la zone tempérée, nous avons aussi étudié les relations mycorhiziennes de deux orchidées non chlorophylliennes tropicales de La Réunion et de la Guadeloupe (Caraïbes), ainsi que les sources de carbone de quatre orchidées chlorophylliennes ou non chlorophylliennes subtropicales dans le genre *Cymbidium* au Japon. Nous présentons ici brièvement le contexte écologique de La Réunion ainsi que les orchidées étudiées.

## 2.1 Les communautés d'orchidées tropicales étudiées à La Réunion

### 2.1.1 La Réunion, île océanique aux habitats contrastés

L'archipel des Mascareignes est formé de trois îles océaniques (Rodrigues, Maurice, La Réunion) nées d'un même point chaud volcanique situé à environ 700 km à l'est de Madagascar (Figure 2.1). Contrairement aux îles continentales comme

Madagascar, les Mascareignes n'ont été rattachées à aucune masse continentale au cours de leur histoire géologique. Ces îles n'ont donc pas directement hérité du patrimoine biologique continental, mais ont été colonisées successivement par des organismes dispersés depuis Madagascar et l'Afrique de l'Est essentiellement (Cadet, 1977). Certaines populations fondatrices ont évolué en isolement génétique vis-à-vis des populations continentales, générant progressivement de la biodiversité par endémisme. Les Mascareignes montrent, en ce sens, certaines similitudes avec les archipels d'Hawaii ou des Galápagos, où les Drosophiles ou les pinsons de Darwin comptent parmi les cas de spéciations les plus spectaculaires et sans doute les plus importants dans l'histoire des sciences (Grant, 1999; Baker et DeSalle, 1997). La

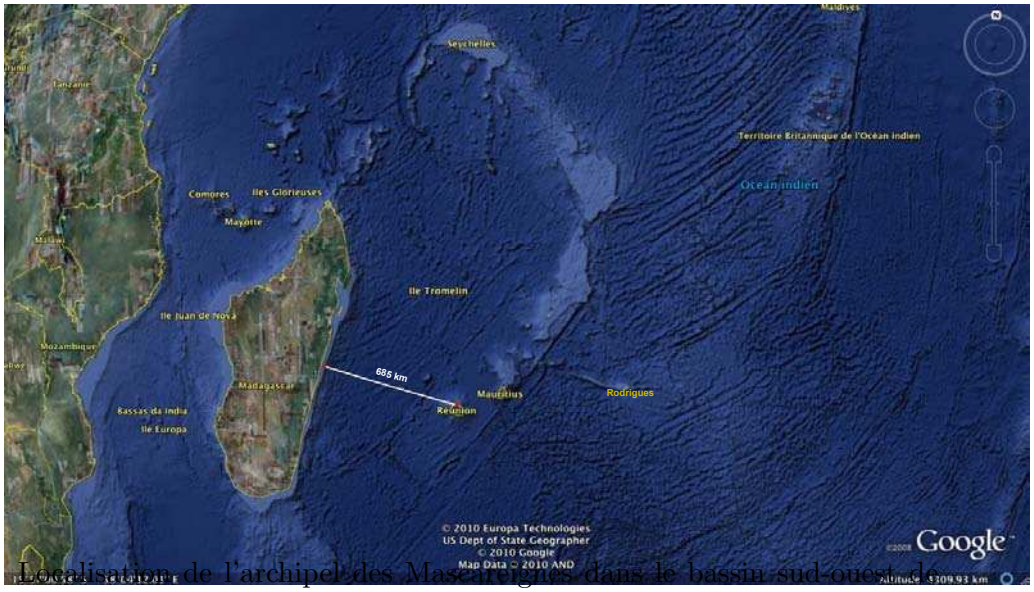



FIGURE 2.1 – Localisation de l'archipel des Mascareignes dans le bassin sud-ouest de l'Océan Indien. D'après ©2009 Google.

Réunion (21°09' S ; 55°30' E) est naît il y a environ 2,5 millions d'années (McDougall et Compston, 1965), ce qui fait d'elle la plus jeune des trois îles de l'archipel des Mascareignes. Son relief actuel culmine à 3070 m au centre de l'île (Piton des Neiges) et à 2632 m dans le sud-est de l'île (Piton de la Fournaise). Son climat est de type tropical humide, avec une saison pluvieuse de décembre à avril et une saison relativement sèche et fraîche entre mai et novembre. Les précipitations annuelles moyennes sont élevées sur le versant est et au centre de l'île (1500-8000 mm), alors qu'elles sont remarquablement faibles sur le versant ouest de l'île (500-1500 mm). En dépit de sa faible surface (2500 km$^2$), 19 types d'habitats terrestres sont reconnus actuellement (Figure 2.2 ; Strasberg *et al.*, 2005). Cependant, ces habitats peuvent être regroupés dans quatre types de formations végétales qui ont été décrites par Cadet (1977) et qui sont réparties selon les gradients d'altitude et de pluviométrie. Les forêts humides de basse altitude (versant est principalement) sont caractérisées par une canopée élevée et la présence de plantes adaptées à la vie dans le sous-bois

où la lumière fait défaut. Les forêts semi-sèches de basse altitude (versant ouest) sont caractérisées par la rareté des espèces épiphytes du fait de la sécheresse, bien qu'on les rencontre ponctuellement sur les rochers du sous-bois. Les forêts humides de montagne (1000-2000 m d'altitude) sont caractérisées par une canopée basse et par la richesse des communautés épiphytes. Les végétations éricoïdes ou subalpines (au-dessus de 2000 m) sont dominées par des plantes de la famille des éricacées. La flore indigène de La Réunion compte environ 500 espèces de plantes à fleurs, dont 34% sont endémiques de La Réunion et 22% sont endémiques des Mascareignes (Bosser *et al.*, 1976). Avec Madagascar et les îles du sud-ouest de l'Océan Indien,

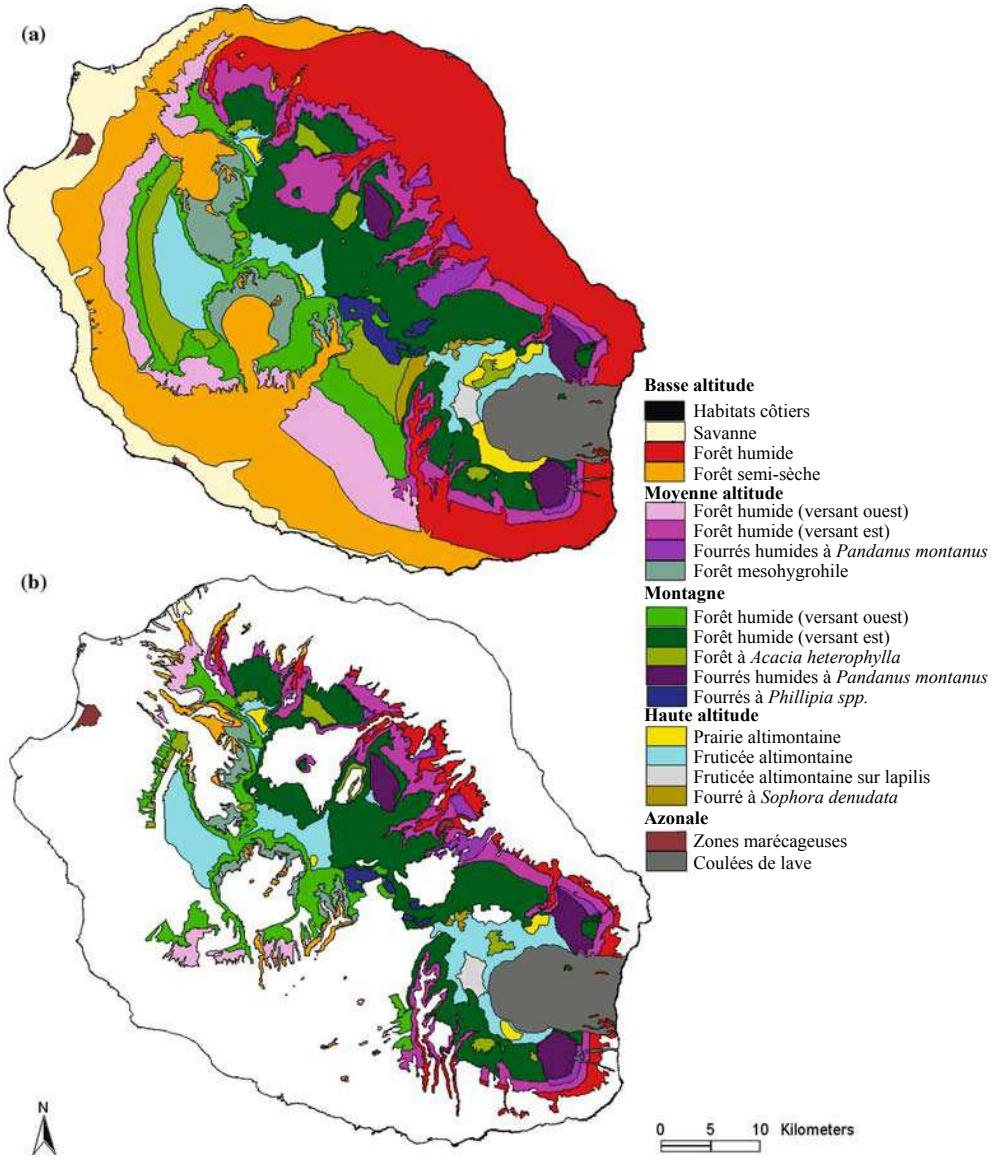



FIGURE 2.2 – Types d'habitats à La Réunion. (a) habitats originels ; (b) habitats actuels. D'après Strasberg *et al.* (2005).

les Mascareignes appartiennent à l'un des 34 hotspots de la biodiversité terrestre (Myers *et al.*, 2000), et ce autant pour la richesse de leurs écosystèmes (dont les taxons endémiques) que pour leur vulnérabilité. Après seulement quatre siècles de colonisation humaine, la perte de biodiversité a été considérable à Rodrigues et à Maurice. La plupart des habitats y ont disparu, et les communautés animales et végétales y sont aujourd'hui éteintes ou en danger critique d'extinction. En revanche, La Réunion a été mieux préservée dans le centre de l'île, là où le relief ne permet pas le développement des pratiques agricoles et urbaines. Elle conserve des habitats naturels sur environ 35% de sa surface et représente aujourd'hui un enjeu pour la préservation de la biodiversité des Mascareignes (Strasberg *et al.*, 2005). Le centre de l'île est protégé par un Parc National depuis janvier 2007, et est reconnu en tant que site naturel remarquable au patrimoine mondiale de l'humanité (UNESCO) depuis août 2010.

### 2.1.2 Les communautés d'orchidées terrestres et épiphytes à La Réunion

Les orchidées sont les plantes à fleurs les plus représentées dans la flore indigène de La Réunion, avec environ 150 espèces réparties dans 35 genres (Roberts, 2001). Près de 50% et 25% des espèces sont respectivement endémiques des Mascareignes et de La Réunion (Roberts, 2001). Les orchidées de La Réunion posent généralement peu de problèmes d'identification taxonomique, à l'exception de certaines espèces du genre *Cynorkis* qui présentent parfois une grande variabilité intraspécifique. Elles occupent tous les habitats naturels situés entre 100 et 2500 m d'altitude, sur les versants est et ouest de l'île. Cependant, la diversité spécifique atteint son maximum dans les habitats de transition situés à environ 800-900 m, entre la basse altitude et la montagne (Jacquemyn *et al.*, 2005). Le gradient d'altitude influence fortement la répartition des communautés d'orchidées, mais aussi des types biologiques terrestres et épiphytes. Les forêts humides de basse altitude abritent des espèces terrestres du sous-bois (*Calanthe spp.*, *Phaius spp.*), notamment l'orchidée mycohétérotrophe *Gastrodia similis* (Figure 2.7) et quelques espèces épiphytes qui colonisent les strates des forêts jusqu'à la canopée. On y rencontre notamment l'orchidée *Bulbophyllum variegatum* qui se développe spécifiquement sur l'espèce d'arbre *Agauria salicifolia* (Figure 2.3 ; Lancaster, 2004). Les forêts semi-sèches abritent essentiellement des espèces terrestres (*Liparis spp.*, *Eulophia sp.*), mais aussi certaines espèces épiphytes vivant sur les rochers et parfois observées dans la canopée des forêts littorales humides (*Angraecum eburneum*, *A. patens*, *Jumellea recta*, etc.). En revanche, les forêts humides de montagne sont très riches en communautés épiphytes (*Angraecum spp.*, *Bulbophyllum spp.* et *Jumellea spp.*). Enfin, les végétations subalpines n'abritent que

FIGURE 2.3 – Photographies de l'orchidée épiphyte *Bulbophyllum variegatum* qui pousse spécifiquement sur l'arbre *Agauria salicifolia* à La Réunion. Photos T. Pailler.

des espèces terrestres tubéreuses (*Cynorkis spp.*, *Benthamia spp.*, *Habenaria spp.*, *Disa sp.*, *Satyrium sp.*) qui vivent dans les sols une partie de l'année, tout comme des orchidées tempérées.

Dans la thèse, 78 espèces d'orchidées appartenant à 25 genres ont été étudiées pour leurs associations mycorhiziennes. Les échantillonnages ont été réalisés à raison de trois à quatre populations par espèces, excepté pour les espèces qui ne sont connues que sur une ou deux localités, et à raison de deux individus par population. Au total, ils ont été réalisés dans 33 localités.

Les échantillonnages des cortèges mycorhiziens ont été conduits de manière à balayer le plus largement possible la diversité taxonomique des orchidées locales, c'est-à-dire que nous avons échantillonné un grand nombre d'espèces différentes à raison de trois ou quatre populations par espèces. Au total, nous avons échantillonné 78 espèces d'orchidées, dans tous les habitats naturels de l'île, et dans 33 sites forestiers de La Réunion (Figure 2.4).

### 2.1.3 Les orchidées de la sous-tribu des Angraecinae à La Réunion

Parmi les genres d'orchidées qui ont colonisé les Mascareignes, certains ont suivi une diversification plus importante dans la région biogéographique. C'est le cas des orchidées épiphytes de la sous-tribu des Angraecinae (tribu des Vandeae). Cette sous-tribu est représentée en Afrique de l'Est et en Amérique du Sud, mais son centre de diversification se situe dans les îles du sud-ouest de l'Océan Indien (Madagascar,

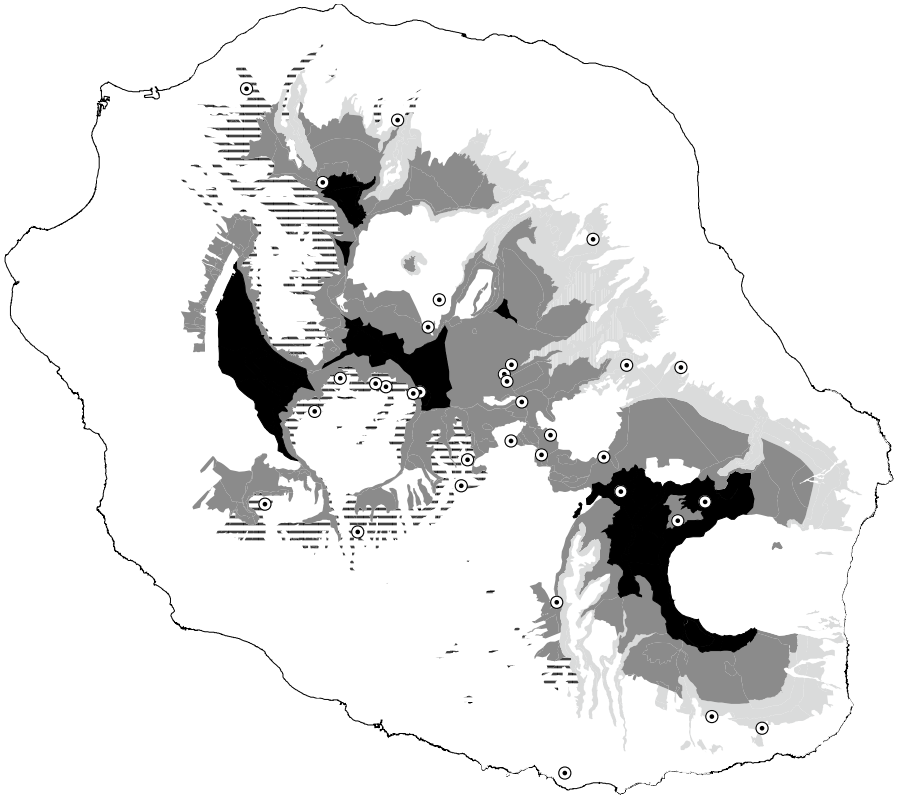


FIGURE 2.4 – Sites et habitats échantillonnés à La Réunion. Gris clair : forêts humides de basse altitude ; gris foncé : forêts humides de montagne ; noir : végétations subalpines ; hachures : forêts semi-sèches.

Comores et Mascareignes ; Micheneau, 2005). Les Angraecinae sont bien connues des naturalistes et des scientifiques depuis la rencontre entre Charles Darwin et l'orchidée malgache *Angraecum sesquipedale*. Après avoir observé l'éperon impressionnant de cette orchidée (environ 30 cm ; Figure 2.5), Darwin (1862) avait prédit l'existence d'un sphinx dont la trompe devait être suffisamment longue pour atteindre le nectar floral sécrété au fond de l'éperon. Le sphinx n'a été découvert que 40 ans plus tard, et la pollinisation de *A. sesquipedale* a été démontrée plus d'un siècle plus tard (Wasserthal, 1997). À La Réunion, les Angraecinae sont représentées par trois

FIGURE 2.5 – Photographie de l'orchidée *Angraecum sesquipedale* dans la forêt de Tampolo à Fénérive-est (Madagascar). Photo F. Martos.

genres (*Angraecum*, *Jumellea* et *Aeranthes* ; le genre *Bonniera* ayant récemment été reclassé dans le genre *Angraecum* ; Micheneau *et al.*, 2008b) et environ 50 espèces (35% des orchidées locales). Des genres proches des Angraecinae appartenant à la sous-tribu des Aerangidinae (tribu des Vandeae) sont aussi présents localement, mais n'ont pas suivi une diversification aussi importante que les Angraecinae : on parle généralement des orchidées angraecoïdes pour désigner ces deux sous-tribus partageant des traits similaires. Récemment, une phylogénie moléculaire des angraecoïdes a été reconstruite à l'Université de La Réunion (en collaboration avec *Kew Royal Botanical Gardens of London*), à partir de quatre régions de l'ADN chloroplastique (Figure 2.6 ; Micheneau *et al.*, 2008b). La phylogénie de ce groupe, qui inclut les espèces réunionnaises que nous avons étudiées dans la thèse, constitue donc une opportunité unique pour évaluer la force du signal phylogénétique dans les symbioses mycorhiziennes des orchidées.

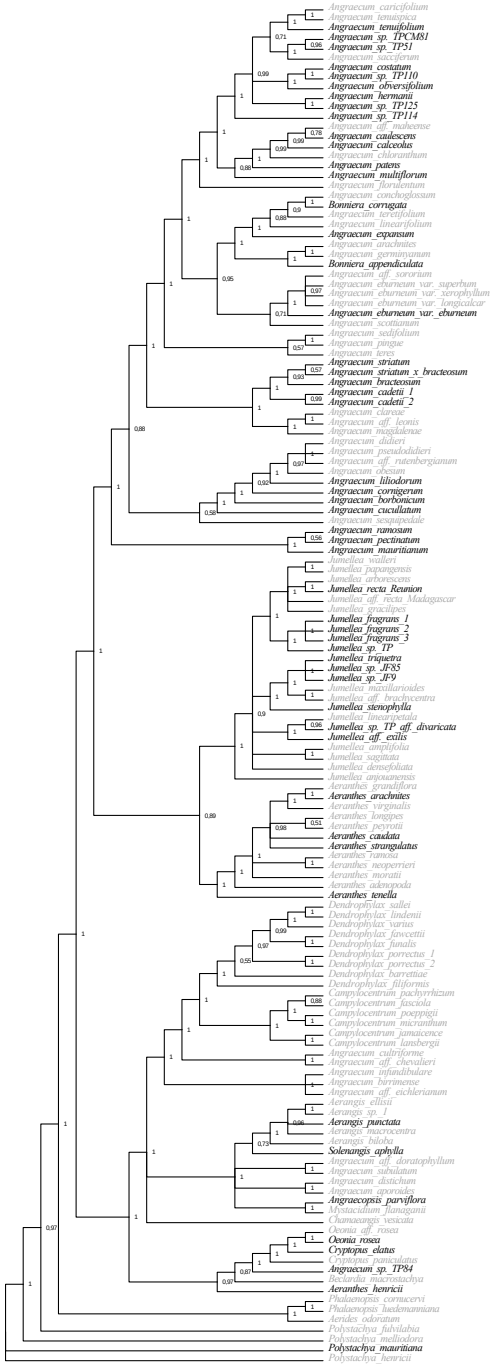



FIGURE 2.6 – Phylogénie des orchidées du clade des angraecoïdes (tribu des Vandeae) en radiation dans les îles du sud-ouest de l'Océan Indien. Noir : espèces de La Réunion. D'après Micheneau *et al.* (2008b).

## 2.2 Les orchidées mycohétérotrophes et mixotrophes étudiées dans les régions tropicales

### 2.2.1 Les orchidées mycohétérotrophes de La Réunion et de la Guadeloupe

La flore indigène de La Réunion compte une seule espèce d'orchidée mycohétérotrophe, *Gastrodia similis* (tribu des Gastrodieae), qui vit dans les sous-bois sombres des forêts humides de basse altitude (Figure 2.7 ; Bosser, 2006). Cette espèce était auparavant connue dans trois populations dans le sud-est de l'île (Bosser, 2006) : forêt de Mare Longue à Saint-Philippe, forêt de Bois Blanc et forêt du Tremblet à Sainte-Rose. Afin de mieux comprendre la mycohétérotrophie en milieu tropical, nous nous sommes donc intéressés à cette espèce, à ses symbiotes et à ses sources de carbone. En début de thèse, nous avons étudié les associations mycorhiziennes de cette orchidée durant sa floraison et sa fructification entre août et septembre 2006. Deux nouvelles populations ont été découvertes durant cette étude : forêt du Brûlé Takamaka à Sainte-Rose et forêt secondaire du Bassin Bœuf à Sainte-Suzanne dans le nord-est de l'île. Plus récemment, nous avons observé deux populations supplémentaires qui n'ont pas encore été étudiées : forêt de Sainte-Marguerite à Saint-Benoît et forêt secondaire du Plateau des Fraisiers au Dimitile (versant ouest). Pour généraliser

FIGURE 2.7 – Photographies de l'orchidée mycohétérotrophe *Gastrodia similis* à La Réunion. Photos T. Tully.

les résultats hors de la zone de La Réunion où ne se trouve qu'une espèce mycohétérotrophe, et vérifier la généralité des patrons originaux relevés dans les associations mycorhiziennes de *G. similis* dans d'autres modèles tropicaux (Article 1), nous avons étudié l'espèce *Wullschlaegelia aphylla* en Guadeloupe en collaboration avec M. Dulorme (Université de Guadeloupe, Pointe à Pitre ; échantillonnage réalisé par M.-A. Selosse et M. Dulorme). L'espèce *W. aphylla* a été d'abord assignée dans

la sous-famille des Orchidoideae, mais une étude phylogénétique récente réalisée à partir des marqueurs nucléaires ITS replace cette espèce dans la sous-famille des Epidendroideae qui est toutefois distante des Gastrodieae (Figure 1.10 ; Molvray *et al.*, 2000). Elle constitue un répliquât phylogénétiquement indépendant de *G. similis*.

### 2.2.2 Les orchidées mycohétérotrophes et mixotrophes du Japon

Une autre grande question concerne l'existence d'espèces partiellement mycohétérotrophes (mixotrophes ; Selosse et Roy, 2009) qui sont souvent phylogénétiquement très proches d'espèces mycophétérotrophes. À La Réunion, on ne connaît pas de proches parents de *G. similis* qui seraient de bons candidats. Gardant cette recherche pour plus tard sur les Mascareignes, nous avons mis à profit une collaboration sur des espèces subtropicales avec T. Yukawa (*Tsukuba Botanical Garden*, Japon) pour commencer à élargir notre connaissance de la stratégie des orchidées mixotrophes hors de la zone tempérée. Au Japon, nous avons étudié deux espèces non chlorophylliennes, *Cymbidium macrorhizon* et *C. aberrans*, ainsi que deux espèces chlorophylliennes, *C. lancifolium* et *C. goeringii*, qui leur sont directement apparentées dans la phylogénie du genre *Cymbidium* (Yukawa *et al.*, 2002).

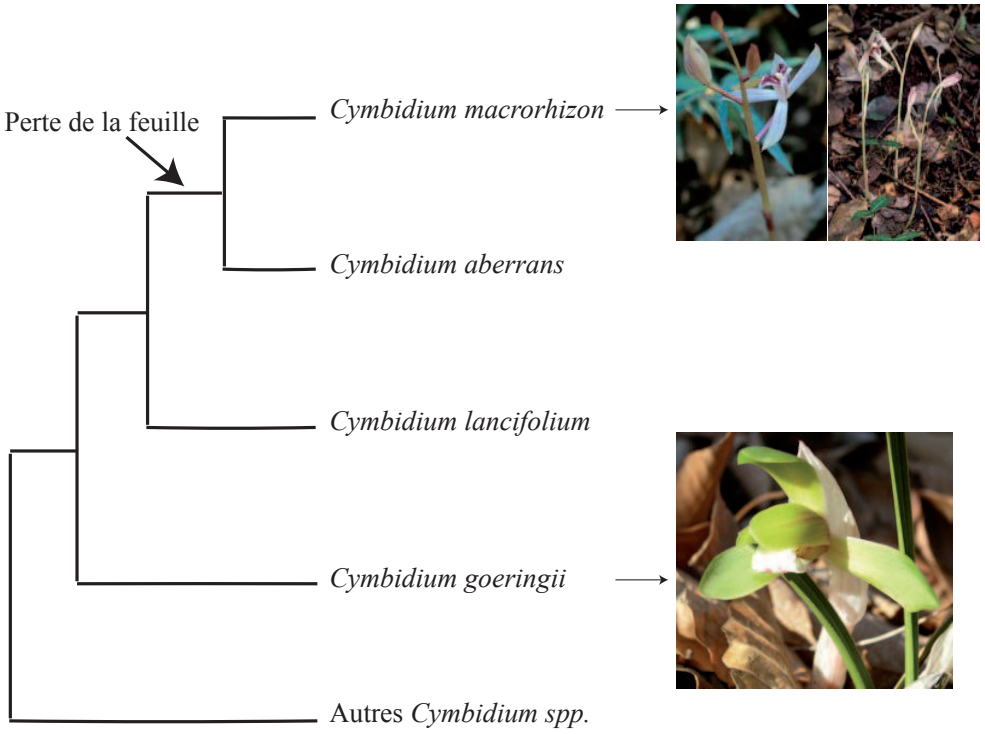



FIGURE 2.8 – Positions phylogénétiques et photographies des orchidées chlorophylliennes et non chlorophylliennes *Cymbidium spp.* étudiées au Japon. D'après Yukawa *et al.* (2002).

# Deuxième partie

# Publications scientifiques

# Chapitre 3

# Article 1. *Independent recruitment of saprotrophic fungi as mycorrhizal partners by tropical achlorophyllous orchids*

**Résumé** Les orchidées mycohétérotrophes se sont adaptées à vivre à l'ombre des forêts en perdant leur capacité de photosynthèse et en dépendant de champignons mycorhiziens comme source de carbone. Dans les forêts tempérées, ces espèces sont associées chacune très spécifiquement à un clade de champignons ectomycorhiziens, exploitant ainsi le carbone organique issu de la photosynthèse des arbres de la canopée avoisinante. Cependant, les communautés ectomycorhiziennes sont absentes de la plupart des forêts tropicales, là où de nombreuses orchidées mycohétérotrophes sont pourtant présentes. Ce constat soulève alors la question des stratégies adoptées par les modèles tropicaux dans l'évolution de la mycohétérotrophie.

Nous avons examiné cette question chez deux espèces mycohétérotrophes, qui ne sont pas directement apparentées et qui vivent dans des régions éloignées : *Gastrodia similis* à La Réunion et *Wullschlaegelia aphylla* en Guadeloupe. J'ai échantillonné les populations de *G. similis* à La Réunion avec T. Pailler et J. Fournel de l'Université de La Réunion. Les populations de *W. aphylla* ont été échantillonnées par M.-A. Selosse et M. Dulormne de l'Université des Antilles et de la Guyane. J'ai réalisé les identifications moléculaires des champignons mycorhiziens, ainsi que les broyages des échantillons pour les analyses isotopiques, à Montpellier. J'ai mis des échantillons de racines colonisées à la disposition de P. Bonfante et de A. Faccio du CNR de Turin (Italie), qui disposent d'un équipement de microscopie électronique. Enfin, j'ai analysé les résultats et rédigé cet article en interaction avec M-A Selosse

et T. Pailler.
Les deux espèces étudiées ont révélé des associations mycorhiziennes à différents groupes de champignons saprophytes (Basidiomycètes). L'espèce *W. aphylla* s'associe non spécifiquement à des mycènes (*Mycena spp.*) et à des marasmes (*Gymnopus spp.*), sans spécialisation locale, alors que l'espèce *G. similis* s'associe plus étroitement à un champignon des Hymenochaetales (*Resinicium sp.*). L'analyse des signatures isotopiques du carbone et de l'azote chez ces plantes corrobore nos hypothèses sur les sources de carbone : *G. similis* obtient du carbone indirectement de la décomposition du bois mort, tandis que *W. aphylla* en reçoit plus probablement de la décomposition des feuilles mortes au sol. Cette étude a révélé une diversité nouvelle de champignons mycorhiziens, et surtout la stratégie adoptée par les modèles tropicaux dans l'évolution de la mycohétérotrophie. Plus généralement, elle démontre que les organismes peuvent interagir différemment entre les écosystèmes tempérés et tropicaux, et appelle aujourd'hui à revisiter les interactions biotiques négligées dans les régions tropicales.

**Publié dans *New Phytologist*.**

# New Phytologist

November 2009
Vol. 184
No. 3
ISSN 0028-646X

www.newphytologist.org

*International Journal of Plant Science*

- Links between tree growth and galactic cosmic rays
- Metal toxicity symptoms
- Genome duplication and water relations

- Tansley reviews
  - The CBL–CIPK $Ca^{2+}$-decoding signaling network
  - Microbiological control of soil-borne diseases

TANSLEY REVIEWS

# Independent recruitment of saprotrophic fungi as mycorrhizal partners by tropical achlorophyllous orchids

Florent Martos[1,2], Maguy Dulormne[3,4], Thierry Pailler[2], Paola Bonfante[5], Antonella Faccio[5], Jacques Fournel[2], Marie-Pierre Dubois[1] and Marc-André Selosse[1]

[1]Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive (CNRS, UMR 5175), Equipe Interactions Biotiques, 1919 Route de Mende, F–34293 Montpellier cedex 5, France; [2]UMR C53 Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical, Université de La Réunion, 15 Avenue René Cassin, BP 7151, F–97715 Saint-Denis cedex 9, France; [3]Conservatoire Botanique des Antilles Françaises, F–97100 Basse Terre, Guadeloupe, France; [4]EA 926 DYNECAR, Université des Antilles et de la Guyane, BP 592, F–97159 Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, France; [5]Dipartimento di Biologia Vegetale dell'Università, Istituto per la Protezione delle Piante – CNR, Viale Mattioli 25, I–10125 Torino, Italy

Author for correspondence:
*Florent Martos*
*Tel: +262 262 938179*
*Email: florent.martos@univ-reunion.fr*

Received: *1 April 2009*
Accepted: *9 June 2009*

*New Phytologist* (2009) **184**: 668–681
**doi**: 10.1111/j.1469-8137.2009.02987.x

**Key words:** mycorrhizas, mycoheterotrophy, orchids, rainforests, saprotrophic fungi, stable isotopes.

## Summary

- Mycoheterotrophic orchids have adapted to shaded forest understory by shifting to achlorophylly and receiving carbon from their mycorrhizal fungi. In temperate forests, they associate in a highly specific way with fungi forming ectomycorrhizas on nearby trees, and exploiting tree photosynthates. However, many rainforests lack ectomycorrhizal fungi, and there is evidence that some tropical Asiatic species associate with saprotrophic fungi.
- To investigate this in different geographic and phylogenetic contexts, we identified the mycorrhizal fungi supporting two tropical mycoheterotrophic orchids from Mascarene (Indian Ocean) and Caribbean islands. We tested their possible carbon sources by measuring natural nitrogen ($^{15}N$) and carbon ($^{13}C$) abundances.
- Saprotrophic basidiomycetes were found: *Gastrodia similis* associates with a wood-decaying *Resinicium* (Hymenochaetales); *Wullschlaegelia aphylla* associates with both litter-decaying *Gymnopus* and *Mycena* species, whose rhizomorphs link orchid roots to leaf litter. The $^{15}N$ and $^{13}C$ abundances make plausible food chains from dead wood to *G. similis* and from dead leaves to *W. aphylla*.
- We propose that temperature and moisture in rainforests, but not in most temperate forests, may favour sufficient saprotrophic activity to support development of mycoheterotrophs. By enlarging the spectrum of mycorrhizal fungi and the level of specificity in mycoheterotrophic orchids, this study provides new insights on orchid and mycorrhizal biology in the tropics.

## Introduction

Plant–fungal interactions play major roles in terrestrial ecosystems by contributing to the structure of plant communities (Smith & Read, 2008) and food chains (Wardle *et al.*, 2004). Although most research on plant–fungal interactions has hitherto been conducted in temperate regions (Alexander & Lee, 2005), there is an increasing interest in tropical ecosystems (Alexander & Selosse, 2009). In addition to playing crucial roles as carbon sinks and in regulating global climate, tropical forests are the Earth's biologically richest ecosystems (Butler & Laurance, 2008), as species richness is inversely correlated with latitude for many organisms such as plants (Hillebrand, 2004) and fungi (Öpik *et al.*, 2006; Arnold & Lutzoni, 2007). Beyond the diversity of species, plant–fungal interactions in tropical regions show some differences compared with temperate ones. For example, leaves of tropical plants are hotspots for endophytic fungi, which are more specific (Arnold & Lutzoni, 2007) and have stronger protective effects against plant pathogens (Arnold *et al.*, 2003) than temperate endophytes. Major differences also occur in mycorrhizal symbiosis, in which plant roots and soil fungi establish a common, dual organ called a mycorrhiza for nutrient exchange (Smith & Read, 2008). In temperate forests, ectomycorrhizal (ECM) symbiosis involving ascomycetes and basidiomycetes predominates among trees. The ECM fungi are rare or missing in many rainforests, where



© The Authors (2009)
Journal compilation © *New Phytologist* (2009)

most trees form arbuscular mycorrhizal (AM) symbiosis with glomeromycetes (Smith & Read, 2008). The AM symbiosis also occurs in temperate forests, but AM fungal communities differ and are more diverse in the tropics (Öpik *et al.*, 2006).

The lack of ECM fungi in many rainforests raises questions about tropical mycoheterotrophic (MH) plants. Having evolved independently in several plant lineages, MH species have adapted to shaded forest understory by shifting to achlorophylly (Leake, 1994) and receiving carbon from their mycorrhizal fungi over their whole life cycle. In temperate forests, tens of MH species have been investigated in the last decade (Taylor *et al.*, 2002; Bidartondo, 2005; Roy *et al.*, 2009). They show high mycorrhizal specificity in the sense that each MH species associates with a narrow fungal clade. Moreover, these fungi also form ECM on surrounding trees (Leake, 2004) and give them indirect access to tree photosynthates, as shown for MH orchids (Taylor *et al.*, 2002; Leake, 2004; Roy *et al.*, 2009) and MH Ericaeae (Bidartondo, 2005). Some tropical MH species associate with specific glomeromycete taxa, and thereby connect to nearby AM autotrophic plants (Franke *et al.*, 2006; Merckx & Bidartondo, 2008). The MH orchids do not associate with glomeromycetes (Rasmussen, 1995; Dearnaley, 2007) and there is evidence, in some tropical Asiatic species at least, that the ecology of associated fungi and the origin of carbon drastically differ.

During *in vitro* cultivation attempts, saprotrophic or parasitic fungi were isolated from tropical (incl. subtropical) MH orchids (Rasmussen, 2002), i.e. wood-decaying *Erythromyces* in *Galeola* species (Umata, 1995; Dearnaley, 2007), litter-decaying *Mycena* in *Cymbidium* (Fan *et al.*, 1996) and pathogenic *Armillaria* in *Gastrodia* species (Kusano, 1911; Burgeff, 1932; Kikuchi *et al.*, 2008). However, these works were based on *in vitro* isolations, where contaminant saprotrophs can overgrow the mycorrhizal partner, or *ex-situ* mycorrhiza resyntheses, which can be biased by the absence of suitable partners. Thus, the *in situ* mycorrhizal status of these fungi was not always confirmed. Recently, molecular approaches revealed *Mycena* species in *Gastrodia confusa* (Ogura-Tsujita *et al.*, 2009) and a clade of Coprinaceae in *Eulophia zollingeri* (Ogura-Tsujita & Yukawa, 2008) and *Epipogium roseum* (Yamato *et al.*, 2005). Since the latter species can successfully complete its life cycle in *in vitro* association with isolated Coprinaceae, this saprotrophic fungus is a plausible partner. Thus, association with ECM or AM fungi does not apply for some MH orchids from tropical Asia, although high specificity seems a general feature of all MH plants.

Some MH species have evolved independently in this family, mainly in rainforests (Leake, 1994), but little is known about tropical MH orchids outside of Asia. In this paper, cellular and molecular approaches, which have not been combined in other studies, demonstrate that saprotrophic fungi form intracellular coils (pelotons), making them the mycorrhizal partners of nonAsiatic tropical MH orchids. Furthermore, we support the notion that saprotrophic fungi supply organic matter to MH orchids by using stable isotope methods. The concentrations of carbon ($^{13}C$) and nitrogen ($^{15}N$) isotopes enable tracking of nutrient sources in ecosystems (Dawson *et al.*, 2002). Organisms often have $^{13}C$ abundance similar to that of their food source (e.g. MH plants and their associated fungi have very similar composition; Trudell *et al.*, 2003). Forming a conspicuous exception, fungi that obtain C from living or decaying plants are less depleted in $^{13}C$ than their substrate (Zeller *et al.*, 2007) and, because of this, MH plants are richer in $^{13}C$ than surrounding autotrophs. For $^{15}N$, organisms are usually more or less enriched compared with their food source, as demonstrated for fungi (Zeller *et al.*, 2007) and MH plants (Trudell *et al.*, 2003). Thus, $^{13}C$ and $^{15}N$ contents enable evaluation of the plausibility of hypotheses about a given food source. To date, a single study has been performed on tropical MH orchids, and this showed that *Gastrodia confusa* had similar $^{13}C$ content to its saprotrophic *Mycena* associates, and slightly a higher $^{15}N$ content (Ogura-Tsujita *et al.*, 2009).

Here, we investigate two distantly related tropical MH orchids from the subfamily Epidendroideae, growing in lowland primary rainforests (see the Supporting Information, Table S1) devoid of ECM fungi: the neotropical *Wullschlaegelia aphylla* (Fig. 1a) from La Guadeloupe, a Caribbean island (Feldmann & Barré, 2001), and the paleotropical *Gastrodia similis*, an endemic orchid from La Réunion island (Mascarene islands, Indian Ocean; Bosser, 2006; Fig. 1e). The MH abilities arose independently in these two lineages (Molvray *et al.*, 2000), one of which has already been investigated in Asia (*Gastrodia*: Kusano, 1911; Burgeff, 1932; Wang *et al.*, 1997; Xu & Guo, 2000). We thus investigated two distant regions where no MH orchid had yet been investigated. We show that litter- and wood-decaying fungi, respectively, colonize their roots, and that association is not necessarily highly specific in tropical MH orchids. These observations are contrary to the previous findings in temperate MH plants, and offer new insights into the ecology of plant–fungal interactions in tropical rainforests.

## Materials and Methods

### Sampling

*Wullschlaegelia aphylla* (Sw.) Rchb. f. was sampled from four primary rainforests on the island of Guadeloupe (Table 1), during the rainy season, in early December 2007. Two to ten individuals per population were fully harvested and washed. After checking for fungal colonization on a thin section under the microscope, 0.5-mm long infected root fragments were kept for molecular analysis at −80°C (up to 10 per individual). Fungal rhizomorphs sometimes emanated from decaying leaves and coalesced with the roots (Fig. 1c,d): rhizomorphs and root fragments from such points were sampled and kept separately (13 pairs, Table 1). Hyphal pelotons were extracted following Rasmussen (1995) from six root sections (Table 1) neighbouring a 0.5 mm fragment kept for molecular analysis. For each section,

© The Authors (2009)
Journal compilation © *New Phytologist* (2009)

**Table 1** Populations of *Wullschlaegelia aphylla* and *Gastrodia similis* investigated in this study, with identification of the fungi recovered from the orchid roots (and linked rhizomorphs for *W. aphylla*)

| Location | Plant[a] | Putative taxonomic identity | GenBank accession number | Number of samples | Putative ecology |
|---|---|---|---|---|---|
| ***W. aphylla*** Route de la Traversée | *W.a.* AV1 | Mycenoid sp. 1[b] | FJ179470 | 5 | Saprotrophic |
| (16°10′32″N; 61°41′58″O) | *W.a.* AV2 | Mycenoid sp. 1 | FJ179470 | 3 | Saprotrophic |
| | | Gymnopoid sp. 1 | FJ179475 | 1 | Saprotrophic |
| | *W.a.* AV2 rhiz. | Mycenoid sp. 1 | FJ179470 | 1 | Saprotrophic |
| | *W.a.* AV3 | Mycenoid sp. 2 | FJ179471 | 2 | Saprotrophic |
| | | Gymnopoid sp. 1[b] | FJ179475 | 3 | Saprotrophic |
| | | Hypocreales sp. 1 | FJ179478 | 1 | Endophyte? |
| | *W.a.* AV3 rhiz. | Mycenoid sp. 2 | FJ179471 | 1 | Saprotrophic |
| | *W.a.* AV3 rhiz. | Gymnopoid sp. 1 | FJ179475 | 2 | Saprotrophic |
| | *W.a.* AV4 | Gymnopoid sp. 2 | FJ179476 | 1 | Saprotrophic |
| | *W.a.* AV5 | Mycenoid sp. 1 | FJ179470 | 3 | Saprotrophic |
| | *W.a.* AV5 rhiz. | Mycenoid sp. 1 | FJ179470 | 1 | Saprotrophic |
| | *W.a.* AV6 | Mycenoid sp. 1[b] | FJ179470 | 1 | Saprotrophic |
| | *W.a.* AV6 rhiz. | Mycenoid sp. 1 | FJ179470 | 1 | Saprotrophic |
| | *W.a.* AV7 | *Psathyrella* sp. 1[c] | FJ179474 | 2 | Saprotrophic |
| | | Hypocreales sp. 1 | FJ179478 | 2 | Endophyte? |
| | *W.a.* AV8 | Gymnopoid sp. 2[b] | FJ179476 | 3 | Saprotrophic |
| | | Trechisporales sp. 1 | FJ179480 | 1 | ? |
| | *W.a.* AV9 | Gymnopoid sp. 1[b] | FJ179475 | 3 | Saprotrophic |
| | | Hypocreales sp. 2 | FJ179479 | 1 | Endophyte? |
| Sofaia (16°17′00″N; 61°43′00″O) | *W.a.* FA1 | Mycenoid sp. 1 | FJ179470 | 2 | Saprotrophic |
| | | Gymnopoid sp. 1 | FJ179475 | 2 | Saprotrophic |
| | *W.a.* FA1 rhiz. | Mycenoid sp. 1 | FJ179470 | 2 | Saprotrophic |
| | *W.a.* FA2 | Mycenoid sp. 3[b] | FJ179472 | 4 | Saprotrophic |
| | | Gymnopoid sp. 1[b] | FJ179475 | 1 | Saprotrophic |
| | *W.a.* FA2 rhiz. | Gymnopoid sp. 1 | FJ179475 | 1 | Saprotrophic |
| Tambour (16°09′46″N; 61°38′32″O) | *W.a.* UR1 | Mycenoid sp. 3[b] | FJ179472 | 1 | Saprotrophic |
| | | Mycenoid sp. 4 | FJ179473 | 1 | Saprotrophic |
| | *W.a.* UR2 | Mycenoid sp. 3[b] | FJ179472 | 6 | Saprotrophic |
| | *W.a.* UR2 rhiz. | Mycenoid sp. 3 | FJ179472 | 1 | Saprotrophic |
| | *W.a.* UR3 | Mycenoid sp. 2[b] | FJ179471 | 3 | Saprotrophic |
| | | Cystofilobasidiales sp. 1 | FJ179477 | 2 | ? |
| | *W.a.* UR3 rhiz. | Mycenoid sp. 2 | FJ179471 | 3 | Saprotrophic |
| Contrebandiers | *W.a.* CC1 | Mycenoid sp. 1[b] | FJ179470 | 2 | Saprotrophic |
| (16°07′01″N; 61°44′22″O) | *W.a.* CC2 | Mycenoid sp. 1 | FJ179470 | 1 | Saprotrophic |
| ***G. similis*** Mare Longue | *G.s.* ML1 | *Resinicium* sp. 1 | FJ179463 | 3 | Saprotrophic |
| (ML; 21°22′01″S; 55°44′38″E) | | Helotiales sp. 1 | FJ179465 | 1 | Endophyte? |
| | *G.s.* ML2 | Stereaceae sp. 1 | FJ179464 | 3 | Saprotrophic |
| | *G.s.* ML3 | *Resinicium* sp. 1 | FJ179463 | 2 | Saprotrophic |
| | | *Fusarium* sp. 1 | FJ179466 | 1 | Endophyte |
| | *G.s.* ML4 | Mycenoid sp. 5 | FJ179469 | 2 | Saprotrophic |
| | | Gymnopoid sp. 3 | FJ179468 | 2 | Saprotrophic |
| | *G.s.* ML5 | *Resinicium* sp. 1 | FJ179463 | 3 | Saprotrophic |
| | | *Trichoderma* sp. 1[c] | FJ179467 | 1 | Saprotrophic? |
| Le Tremblet (21°16′55″S; 55°48′02″E) | *G.s.* TR1 | *Resinicium* sp. 1 | FJ179463 | 2 | Saprotrophic |
| | *G.s.* TR2 | *Resinicium* sp. 1 | FJ179463 | 2 | Saprotrophic |
| Bois Blanc (21°11′44″S; 55°48′33″E) | *G.s.* BO1 | *Resinicium* sp. 1 | FJ179463 | 2 | Saprotrophic |
| | *G.s.* BO2 | *Resinicium* sp. 1 | FJ179463 | 4 | Saprotrophic |
| Brûlé Takamaka (21°21′50″S; | *G.s.* KM1 | *Resinicium* sp. 1 | FJ179463 | 1 | Saprotrophic |
| 55°44′44″E) | *G.s.* KM2 | *Resinicium* sp. 1 | FJ179463 | 2 | Saprotrophic |
| Rivière Sainte-Suzanne | *G.s.* RS1 | *Resinicium* sp. 1 | FJ179463 | 1 | Saprotrophic |
| (RS; 20°56′57″S; 55°35′00″E) | *G.s.* RS2 | *Resinicium* sp. 1 | FJ179463 | 1 | Saprotrophic |
| | *G.s.* RS3 | *Resinicium* sp. 1 | FJ179463 | 3 | Saprotrophic |
| | *G.s.* RS4 | *Resinicium* sp. 1 | FJ179463 | 3 | Saprotrophic |

[a]'rhiz.' indicates analysis of an emanating fungal rhizomorph.
[b]Pelotons extracted from a root section neighbouring one sample gave the same PCR product.
[c]Only ITS sequences for *Trichoderma* sp. 1 and *Psathyrella* sp. 1 (otherwise, the 5′ part of the 28S rDNA was also sequenced).
See Supporting Information Table S3 and Fig. 5 for detailed fungal identification.



© The Authors (2009)
Journal compilation © *New Phytologist* (2009)

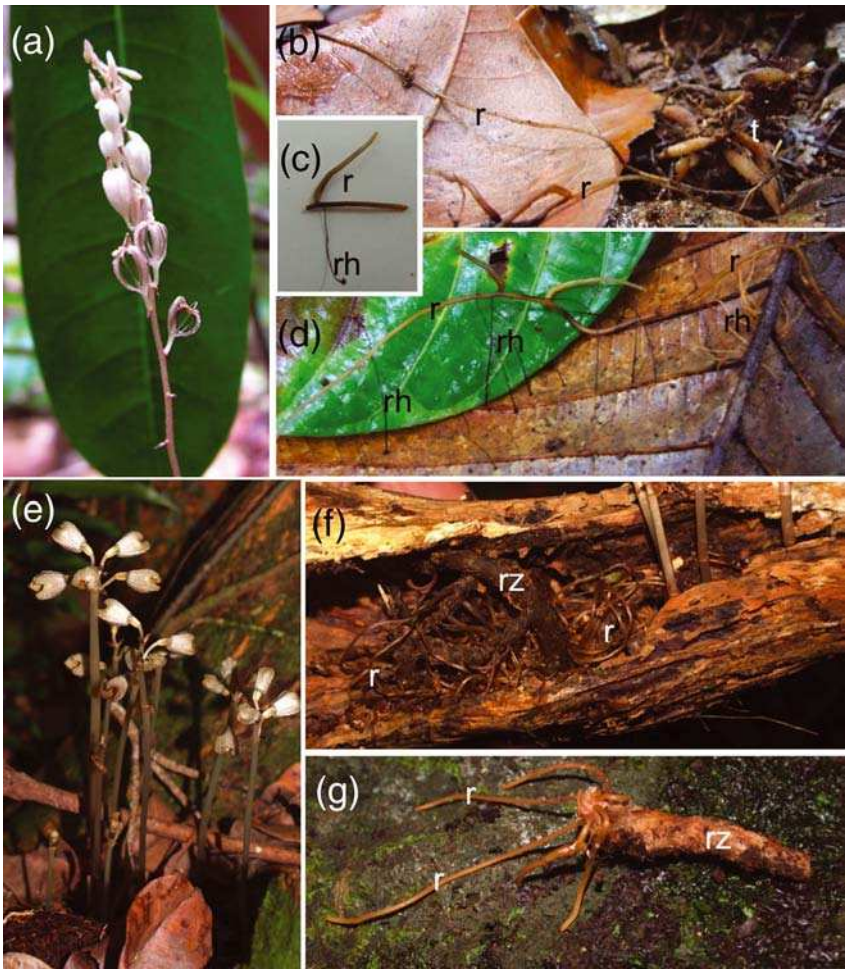



**Fig. 1** Morphology of *Wullschlaegelia aphylla* (a–d) and *Gastrodia similis* (e–g). (a) Inflorescence of *W. aphylla*. (b) Ramified mycorrhizal roots (r) and short tuberous roots (t) in leaf litter. (c) Fungal rhizomorphs (rh) linking mycorrhizas and decaying leaves (rhizomorphs are dark on the left and pale on the right). (d) Contact between a rhizomorph and a mycorrhiza. (e) inflorescence of *G. similis*. (f) Thick starch-filled rhizomes (rz) and long mycorrhizal roots (r) in dead wood. (g) A rhizome with emanating mycorrhizas.

three pools of 15 pelotons each were obtained and kept at −80°C for molecular analysis. Sampling for isotopic studies was conducted at Route de la Traversée in December 2007, and included ($n$ = 7 each): green leaves recently fallen from the forest canopy; orchid tuberous roots (without fungus); brown dead tree leaves; and tree leaves attached to rhizomorphs coalescing with *W. aphylla* roots. Dead leaves were from unidentified tree species. We also sampled fruitbodies of seven litter saprotrophic basidiomycetes (Table S2; $n$ = 2 each) collected in 2007 and inflorescences ($n$ = 7) of *W. aphylla* collected in May 2006.

*Gastrodia similis* Bosser was sampled between August and September 2006 in La Réunion from four primary rainforests and one second-growth forest (Rivière Sainte-Suzanne, Table 1). Root fragments were sampled as for *W. aphylla* (up to five per individual). Sampling for isotopic studies was conducted in Mare Longue (ML) and Rivière Sainte-Suzanne (RS). In each site, we collected ($n$ = 6 each): decaying wood where the orchid was growing, orchid inflorescences, mycorrhizas, dead and living tree leaves of two green tree species (*Agarista salicifolia* G. Don and *Syzygium jambos* Alston at RS, and *Gaertnera vaginata* Poir. and *Mimusops balata* (Aubl.) C.F. Gaertn. at ML). In addition, wood-decaying basidiomycetes were collected (three species at ML and one at RS, $n$ = 6 fruitbodies for each; Table S2).

## Microscopy

We randomly sampled fragments adjacent to those kept for molecular analysis; some contact points between fungal rhizomorphs and *W. aphylla* mycorrhizas were also harvested. Twelve samples for *W. aphylla* and eight for *G. similis* were quickly fixed and handled as in Roy *et al.* (2009) to obtain semithin 0.05 µm sections for transmission electron microscopy and semithin 1 µm sections stained with 1% toluidine blue for light microscopy.

## Molecular identification of the fungi

To identify the fungus, we amplified the fungal internal transcribed spacer (ITS) plus the 5′ part of the 28S rDNA, using the primers ITS1F and TW13, as described in Roy *et al.* (2009). To further control the absence of usual orchid symbionts, additional PCR amplifications were carried out using

© The Authors (2009)
Journal compilation © *New Phytologist* (2009)

specific primers ITS4tul for tulasnelloids and ITS3S for sebacinoids, as described in Selosse *et al.* (2004) and positive controls; no amplification was obtained (not shown). Sequencing was performed as described in Roy *et al.* (2009). To check for contamination, sequences were compared with the fungal sequences obtained in our laboratory since 2004; no similarity was discovered (not shown). Corrected sequences were deposited in GenBank. Sequences were identified by BLAST analysis against GenBank (Table S3) and phylogenetic placements (Fig. 5).

### Isotopic analysis

All samples were dried at 45°C for 48 h and ground in 1.5 ml Eppendorf tubes using 1.1 mm diameter tungsten carbide balls (Biospec Products, Inc., Bartlesville, OK, USA) in a Retch MM301 vortexer (Retch Gmbh and Co., Haan, Germany). Total abundances of $^{13}C$ and $^{15}N$ were measured using an on-line continuous flow CN analyser coupled with an isotope ratio mass spectrometer (Ohlsson & Wallmark, 1999). Isotope abundances are expressed in $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ values in parts per thousand relative to international standards Vienna-Pee-Dee Belemnite and atmospheric $N_2$: $\delta^{13}C$ or $\delta^{15}N = (R_{sample}/R_{standard} - 1) \times 1000$, where $R$ is the molar ratio (i.e. $^{13}C/^{12}C$ or $^{15}N/^{14}N$). The standard deviation of the replicated standard samples ($n = 13$) was 0.029‰ for $^{13}C$ and 0.288‰ for $^{15}N$.

### Statistics

Total N, C : N ratio, $^{13}C$ and $^{15}N$ values were tested for normality and homogeneity of variances using a Shapiro–Wilks test and a Levene test, respectively. One-way ANOVAS were performed for each variable and each site, followed by a pairwise *t*-test (Bonferroni corrected) to calculate pairwise comparisons between group levels at $\alpha = 0.01$. All values were estimated by mean values followed by 95% confidence intervals (CI 95). Statistical analyses were computed using R 2.7.1 (R Foundation, Vienna, Austria).

## Results

### Patterns of fungal colonization

*Wullschlaegelia aphylla* had starch-filled, uncolonized tuberous roots, and long mycorrhizal roots (Figs 1b, S1a) that densely ramified within the leaf litter during the rainy season (Fig. S1b). Mycorrhizas were often connected to decaying leaves by fungal rhizomorphs (elongated bundles of fungal hyphae; Figs 1c,d, S3). The epidermal layer of mycorrhizas was often senescent (Fig. 2a), and some cells contained densely packed hyphae (boxed in Fig. 2b), glued together by an amorphous material (Fig. 2c) and morphologically similar to those forming rhizomorphs. The outer root cortex layer was uncolonized, while polygonal cells of the middle and inner cortical layers consistently hosted fungal coils (pelotons; Fig. 2b). A host membrane consistently surrounded the hyphae (Fig. 2d), suggesting a biotrophic relationship. *Gastrodia similis* had thick starch-filled rhizomes devoid of fungi, and mycorrhizal roots (Fig. 1f,g) growing in decaying wood (Fig. S2). Epidermal cells were collapsed and rarely colonized, although hyphae sporadically contacted the epidermis (Fig. 2e). As in *W. aphylla*, the outer cortex cells were uncolonized, while cells of the middle cortical layer consistently hosted hyphae (Fig. 2e). These host cells were highly vacuolated (Fig. 2f), so that biotrophy could not be verified at the cellular level. At the junction between outer and middle cortical layers, papillae-like cell wall thickenings (arrows in Fig. 2e) often corresponded to hyphal entries (Fig. 3). The other inner cortical layers were uncolonized (not shown). In both orchids, the junctions between fungal cells showed perforate dolipores (insets in Fig. 2c,f) typical for basidiomycetes.

### Molecular identification of mycorrhizal fungi

The observed basidiomycetes were identified by sequencing the fungal internal transcribed spacer (ITS) of ribosomal DNA plus the 5′ part of the 28S rDNA. Sequences were obtained for 67 *W. aphylla* mycorrhizas from four Guadeloupe populations (Tables 1, S3). Among 16 individuals, all but one were colonized by a mycenoid or a gymnopoid (Agaricales, Basidiomycetes), and four harboured both; the remaining individual revealed only a *Psathyrella* sp. (Agaricales, Basidiomycetes) and a *Hypocrea* sp. (Ascomycetes). Mycenoids were 2.4 times more abundant than gymnopoids (Fig. 4a) and a total of four mycenoids and two gymnopoids were identified (Fig. 5a,b). Mycenoid sp. 1 and 2 were 98% similar in sequences and occurred simultaneously at Traversée and separately at the other sites investigated. Mycenoid sp. 3 and 4 were 97% similar and occurred only at one site each. The two gymnopoids co-occurred at Traversée, and one was also found on another site (Table 1). In other orchid individuals, putative endophytic or saprotrophic ascomycetes or basidiomycetes were found (in only one root each, Fig. 4a; Table 1). Pelotons extracted from mycorrhizas of nine individuals (Table 1) revealed the same sequence as the surrounding mycorrhiza (i.e. a mycenoid ($n = 6$) or a gymnopoid ($n = 4$) sequence). In one individual (*W.a.* FA2), a mycenoid and a gymnopoid sequence were recovered from different pelotons. Rhizomorphs emanating from roots had ITS sequences identical to those of the corresponding orchid mycorrhizas (i.e. mycenoids ($n = 7$) or gymnopoids; $n = 2$; Table 1) so that the same litter-decaying basidiomycetes formed mycorrhizas and rhizomorphs.

Fungal rDNA sequences were obtained for 39 *G. similis* mycorrhizas from five Réunion populations (Tables 1, S3). Thirteen out of 15 individuals contained the same *Resinicium* sp. (Hymenochaetales, Basidiomycetes), closely related to *R. mutabile* (Fig. 5c): the corresponding sequence was recovered from the five study sites, and was the most abundant (Fig. 4b)



© The Authors (2009)
Journal compilation © *New Phytologist* (2009)

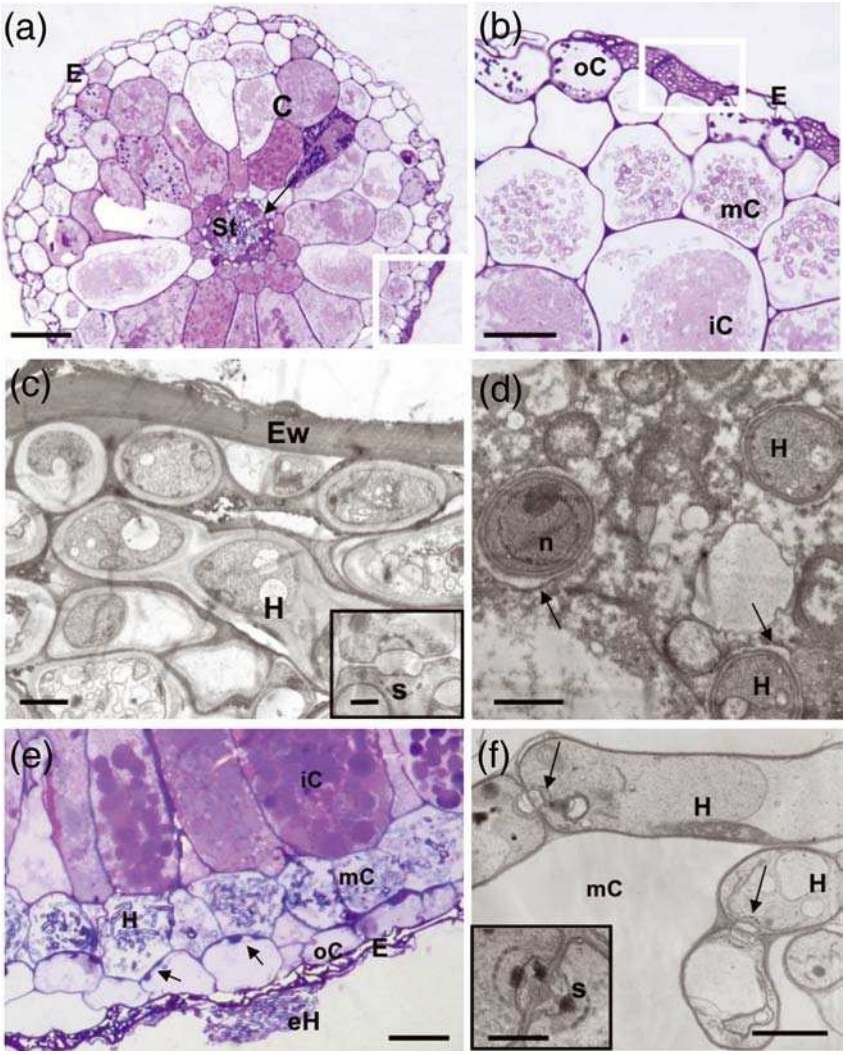



**Fig. 2** Anatomy of mycorrhizas in *Wullschlaegelia aphylla* (a–d) and *Gastrodia similis* (e–f). (a) Light microscopy (LM) section of a *W. aphylla* root with endodermis (arrow) and collapsed epidermal cells. (b) LM of the boxed section in panel (a) showing the hyphal pelotons; note the mycelium at root surface (boxed). (c) Transmission electron microscopy (TEM) of the boxed section in panel (b) showing hyphae with dolipores (inset; root colonized by mycenoids sp. 1). (d) TEM view of living inner cortex cells of *W. aphylla* colonized by hyphae surrounded by host membrane (arrow). (e) LM of *G. similis* roots with collapsed epidermal cells and fungal colonization in the middle cortex layer only (arrows show papillae at sites of entrance of fungal hyphae). (f) TEM view of hyphae in *G. similis* middle cortex colonized by a *Resinicium* sp., with dolipores (arrows and inset). C, cortex; E, collapsed epidermal cells; eH, external hyphae; Ew, cell wall of epidermal cell; H, fungal hyphae; iC, inner cortex; mC, middle cortex; n, nucleus; oC, outer cortex; s, dolipore septum; St, stele. Bars, (a) 100 mm, (b,e) 40 mm, (c,d,f) 1.5 mm; inset bars, (c,f) 0.05 mm.

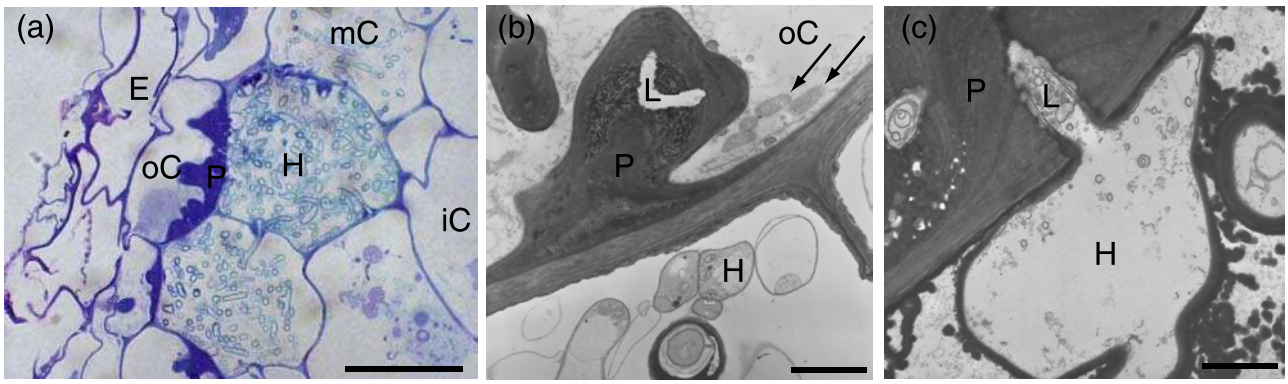



**Fig. 3** Papillae-like (P) cell wall thickenings in *Gastrodia similis* mycorrhizas at the junction between outer and middle cortical layers, with a lumen (L) allowing passage of fungal hyphae. Arrow, plant mitochondrion; E, collapsed epidermal cells; H, fungal hyphae; iC, inner cortex; mC, middle cortex; oC, outer cortex. (a) Papillae in light microscopy, (b,c) details in transmission electron microscopy showing the lumens. Bars, (a) 40 μm, (b) 1 mm, (c) 0.2 mm.

(it was the single sequence obtained from 10 individuals; Table 1). At ML, one individual revealed only a gymnopoid and a mycenoid (Fig. 5a,b), and another revealed an unknown species in the Stereaceae (Polyporales, Basidiomycetes). Thus, all basidiomycetes belonged to taxa generally regarded as saprotrophs. Three individuals harboured putative parasitic or saprotrophic ascomycetes (in only one root each, Fig. 4b). The *Resinicium* sp. sequence was also amplified from decaying

© The Authors (2009)
Journal compilation © *New Phytologist* (2009)

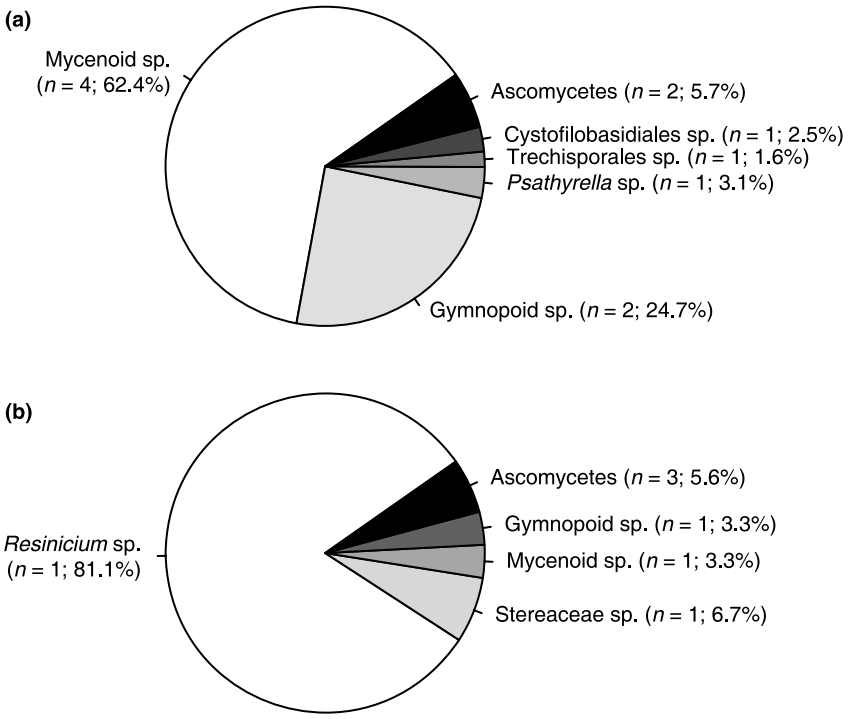



**Fig. 4** Identity and average abundance of identified fungi in (a) the 16 *Wullschlaegelia aphylla* individuals and (b) the 15 *Gastrodia similis* individuals (*n*, number of diverging sequences found for each taxon).

wood surrounding two individuals at ML (not shown). Although no pelotons could be separated from mycorrhizas, *G. similis* seemed rather specifically associated with a wood-decaying *Resinicium* sp.

We consider that the same fungi produced the external and internal colonizations because hyphae linking external and internal structures were seen in light microscopy and the pelotons in *W. aphylla*, at least, confirmed identity between fungi in root cells and in rhizomorphs. A *Resinicium* sp. was also found in *G. similis* roots lacking any colonization of epidermal cells ($n = 14$), thus supporting the notion that external hyphae are not the only source of the PCR signal.

### C : N ratio and stable isotope abundances

Stable isotopic analyses were performed to test whether the organic substrates, where the saprotrophic fungi and orchids proliferated (Fig. 1), can represent a food source. One *W. aphylla* population and two *G. similis* populations, at Mare Longue (ML) and Rivière Sainte-Suzanne (RS), were investigated. We sampled leaf-decaying fungi around *W. aphylla* (including mycenoids and gymnopoids) and found only wood-decaying fungi around *G. similis* (see identifications in Table S2). As expected, saprotrophic fungi were higher in $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ compared with their putative substrates (leaves or decaying wood, Fig. 6). Neither orchid differed significantly in $\delta^{13}C$ from saprotrophic fungi but were higher in $\delta^{15}N$ (nonsignificantly for *W. aphylla* inflorescences; +1.2‰ at RS and +0.9‰ at ML for *G. similis* inflorescences, with intermediate values for *G. similis* mycorrhizas; Fig. 6). These observations were expected under the hypothesis of use of C and N from saprotrophic fungi. As a result, orchid inflorescences had significantly higher amounts of isotopes than green tree leaves (+4.3‰ $\delta^{13}C$ and +5.4‰ $\delta^{15}N$ for *W. aphylla*; +11.8‰ $\delta^{13}C$ and +1.4‰ $\delta^{15}N$ for *G. similis* at ML; and +6.9‰ $\delta^{13}C$ and +3.2‰ $\delta^{15}N$ at RS). For *W. aphylla*, C : N ratios in roots (11.3 ± 1.5) or inflorescences (12.2 ± 1.3) did not significantly differ from saprotrophic fungi (7.5 ± 2.2), but were significantly lower than in any leaf type (average 42.1 ± 7.2; Fig. S4a). For *G. similis*, C : N ratios decreased in the order decaying wood (155.8 ± 21.8 at RS; 130.0 ± 28.7 at ML) > saprotrophic fungi > mycorrhizas > inflorescences (15.3 ± 1.7 at RS and 13.6 ± 1.5 at ML; Fig. S4b,c). Thus, the increase in $\delta^{15}N$ and decrease in C : N ratios are consistent with a food chain linking decaying material to saprotrophic fungi and to the MH orchids investigated.

## Discussion

Two phylogenetically independent MH orchids from tropical rainforests revealed several features that are not observed in temperate MH plants: (1) morphological features of mycorrhizas; (2) association with litter- and wood-decaying basidiomycetes, which differ from most usual orchid symbionts in systematic position and ecology; (3) lack of high mycorrhizal specificity (for *W. aphylla* at least); and (4) the probable use of C from dead plant material. Previous reports on some tropical Asiatic MH orchids showed a highly specific association with saprotrophic fungi: we observed similar fungi in MH orchids outside of Asia, confirmed the identification at cellular (peloton) level, and showed that the association is not always highly



© The Authors (2009)
Journal compilation © *New Phytologist* (2009)

specific. Moreover, this study enlarges the spectrum of saprotrophic taxa recruited by MH orchids, even within the genus *Gastrodia*. We will discuss features (1) to (4), and their links to tropical climatic conditions.

## Unusual morphology of the mycorrhizal association

Some features were typical for orchid mycorrhizas (Rasmussen, 1995; Smith & Read, 2008; Roy *et al.*, 2009): intracellular pelotons were surrounded by a host membrane and finally collapsed in living plant cells (Fig. 2b); fungal colonization was limited to one (*G. similis*) or two (*W. aphylla*) cortical layers (Fig. 2). The colonization pattern in *G. similis* roots was similar to that already published for *Gastrodia elata* (Wang *et al.*, 1997; Rasmussen, 2002). More unexpectedly, whereas epidermal cells are usually living and uncolonized in orchid mycorrhizas (Rasmussen, 1995), they were dead and harboured hyphae in both species investigated. Necrosis of epidermis (Fig. 2) might contribute to attracting saprotrophic fungi by the release of organic substances. Two other striking features unusual for orchid mycorrhizas were observed: *W. aphylla* roots were physically connected to dead leaves by fungal rhizomorphs (Fig. 1d,e) showing the same ITS sequence as fungi in the roots (Table 1); and papillae-like cell thickenings consistently developed in inner walls of outer cortex cells of *G. similis* (Figs 2e, 3), corresponding to pathways for fungal hyphae.

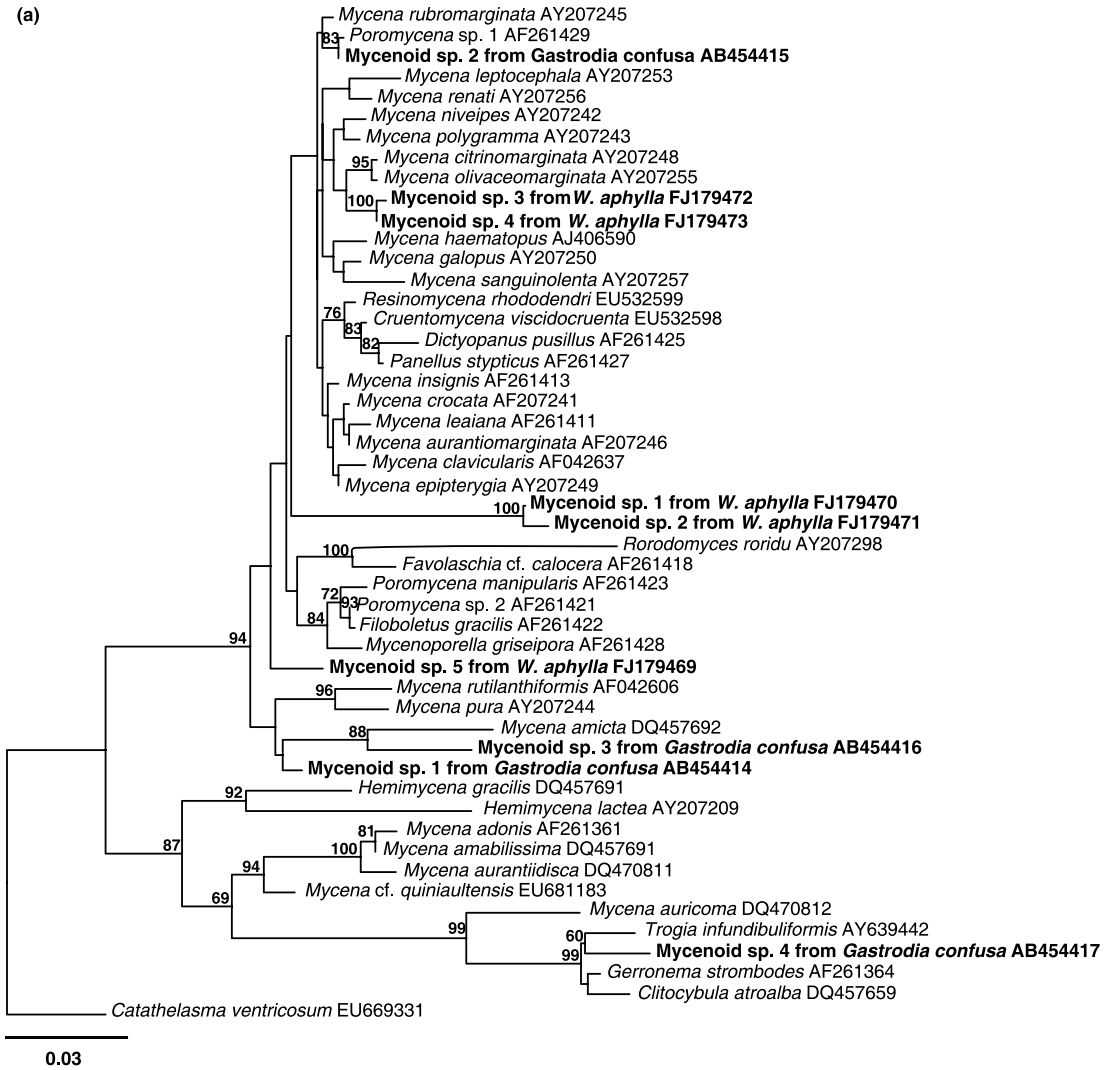



**Fig. 5** Phylogenetic positions of mycenoid species (a, with position of mycorrhizal fungi found in *Gastrodia confusa* by Ogura-Tsujita *et al.*, 2009), gymnopoid species (b) and *Resinicium* species (c) found in *Wullschlaegelia aphylla* or *Gastrodia similis*, based on Bayesian analyses of the combined ITS-28S rDNA data set (877 bp, 970 bp and 1484 bp, respectively). We used a general-time-reversible model with a proportion of invariant sites and gamma distributed rates (GTR + I + Γ). Six Markov chains were simultaneously run for 2 000 000 generations, sampling trees every 100 generations under MRBAYES 3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001 ). Nonsignificant runs were discarded from the consensus trees. Posterior probabilities of clades are shown above the branches.

© The Authors (2009)
Journal compilation © *New Phytologist* (2009)

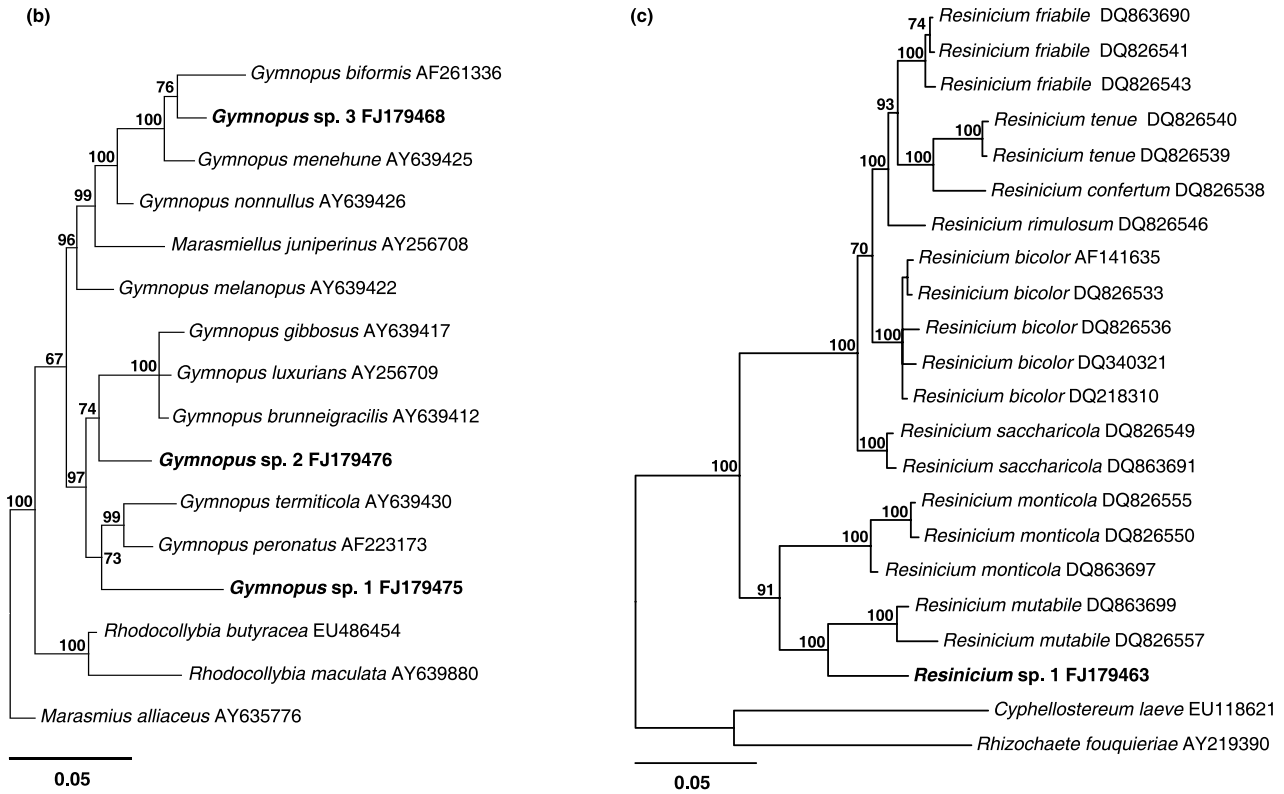



**Fig. 5 continued**

The latter feature confirmed that these cells were living at the time hyphae penetrated. The MH plants often showed mycorrhizal patterns deviating from the related species (Imhof, 2007), whose functional purpose remains unclear. The plants showed unusually long roots (Figs 1, S1, S2) compared with most MH species, which tend to have more compact roots systems (Leake, 1994). Investigating more tropical MH orchids from diverse subfamilies could further test whether the observed features are related to the MH lifestyle or to ecological factors, or even vary with plant's phylogenetic placement.

## Unusual taxonomic position of fungal partners

In temperate regions, green orchids form mycorrhizas with the so-called 'rhizoctonia' basidiomycetes (Rasmussen, 1995), whereas MH species associate with ECM Hymenomycetes (Leake, 2004; Roy *et al.*, 2009). Fully different taxa were found here (Fig. 4), with at least a *Resinicium* sp. (Hymenochaetales), mycenoids and gymnopoids being mycorrhizal. Indeed, the observed fungal dolipores (Fig. 2c,f) had parenthesomes differing from rhizoctonias, whose parenthesomes have no (in tulasnelloids and sebacinoids) or very few perforations (in Ceratobasidiales; Moore, 1996). We found very few of the saprotrophic or pathogenic ascomycetes that frequently occur in orchid roots (Julou *et al.*, 2005), demonstrating that the tissues investigated were healthy.

Hymenochaetales (*Erythromyces* spp.) were isolated from *Galeola altissima* (Umata, 1995) and *Erythrorchis cassythoides* (Dearnaley, 2007). Mycenoids, which associate *in vitro* with *G. elata* (Xu & Guo, 2000), occur in *G. confusa* (Ogura-Tsujita *et al.*, 2009); *W. aphylla* mycenoids were close to these found in *G. confusa* (Fig. 5a). From molecular data, Coprinaceae associate with *Eulophia zollingeri* (Ogura-Tsujita & Yukawa, 2008) and *Epipogium roseum* (Yamato *et al.*, 2005), raising the possibility that *Psathyrella* sp. 1, a Coprinaceae from *W. aphylla*, might be mycorrhizal. We provide the first molecular evidence, from multiple populations, that *Resinicium* spp. and gymnopoids are mycorrhizal in MH orchids. This enlarges the diversity of basidiomycetes reported from MH orchids, and further substantiates that MH orchids recruited various basidiomycetes as mycorrhizal partners. This diversity reflects not only the independent evolution of several MH lineages, but also partner shifts during evolution of MH lineages. Such changes of fungal associates in MH evolution are recorded in orchids (Taylor *et al.*, 2002; for example, *Gastrodia* species associate with *Armillaria*, mycenoids and *Resinicium*) and Ericaceae (Bidartondo, 2005), and they may be linked to speciation.

## Variable mycorrhizal specificity

Specificity in biotic interactions shows variable trends in tropical versus temperate ecosystems, for example being higher or lower



© The Authors (2009)
Journal compilation © *New Phytologist* (2009)

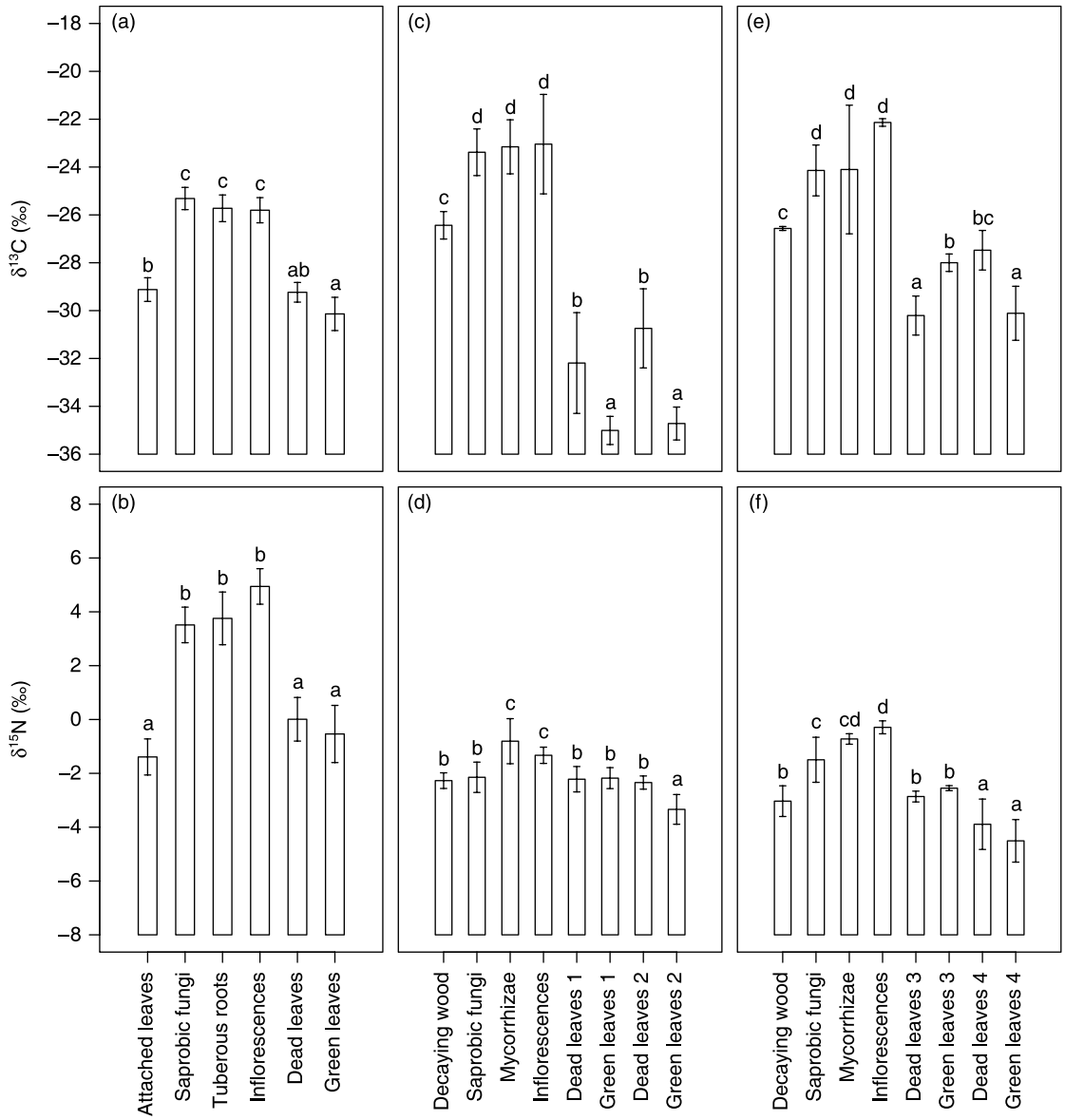



**Fig. 6** $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ values (means ± CI95, in ‰) of plant and fungal materials in a *Wullschlaegelia aphylla* population ($n = 7$ replicates) at Route de la Traversée (a,b) and two *Gastrodia similis* populations ($n = 6$ replicates) at Mare Longue (c,d) and Rivière Sainte-Suzanne (e,f). Plant species names: sp. 1, *Gaertnera vaginata*; sp. 2, *Mimusops balata*; sp. 3, *Agarista salicifolia*; sp. 4, *Syzygium jambos*. Different letters denote significant differences between species according to Bonferroni corrected pairwise *t*-tests ($P < 0.01$).

for predatory and parasitic animals (Beaver, 1979), and higher for endophytic fungi (Arnold & Lutzoni, 2007). The numerous temperate MH species investigated are all highly specific (Leake, 1994, 2004; Roy *et al.*, 2009), as are the few tropical MH models studied so far (Yamato *et al.*, 2005; Franke *et al.*, 2006; Ogura-Tsujita & Yukawa, 2008), allowing the claim that some species are 'specialized parasites' (Xu & Guo, 2000). Here, *G. similis* seems to be *Resinicium*-specific, although we cannot claim that the other saprotrophs found are also mycorrhizal; *W. aphylla* associates with both mycenoids and gymnopoids (and perhaps even Coprinaceae), at population and even at individual levels. However, *W. aphylla* targets a limited number of saprotrophs, whereas several other litter-decaying taxa co-occur (including mycenoids and gymnopoids, Table S2). Thus, these orchids show some kind of selectivity, as do all green orchids (Rasmussen, 2002). Although we ignore which fungi actually provide nutrients to which plants, the analysis of intracellular pelotons excludes strict specificity of association at least for *W. aphylla*.

Another investigation of MH orchids revealed nonspecific association with diverse ECM fungi in MH *Aphyllorchis* spp. from tropical Asia (Roy *et al.*, in press). Therefore, high specificity is

© The Authors (2009)
Journal compilation © *New Phytologist* (2009)

not the rule for tropical MH plants. This questions the existence of a latitudinal gradient in MH mycorrhizal specificity, whose existence and purpose deserves further analyses.

### Association with saprotrophic fungi

All basidiomycetes identified are saprotrophic (i.e. can live on dead organic matter), but we confirm here that tropical MH orchids associate with such partners in the rainforests out of Asia. *Resinicium* spp. are wood-decaying fungi (Nakasone, 2007) and the laccases and peroxidases that exploit complex molecules in dead leaves, such as lignin, cellulose and components of senescent cell cytoplasm are produced by gymnopoids (Valaskova *et al.*, 2007) and mycenoids (Ghosh *et al.*, 2003). It is fascinating to observe these usually saprotrophic fungi are involved in orchid mycorrhizas. Although they are unlikely to receive C from the plant, and thus are not mycorrhizal in the classical physiological sense, they develop a dual structure and colonize living cells, and are thus mycorrhizal in a developmental sense. There are some claims of saprotrophic abilities in mycorrhizal fungi (Martin & Selosse, 2008); by contrast, mycorrhizal abilities have been rarely reported for saprotrophs. During the evolution of basidiomycetes, numerous transitions from saprotrophic to mycorrhizal niches occurred (Matheny *et al.*, 2007; Martin & Selosse, 2008). Moreover, some saprotrophic fungi may live inside living roots (Vasiliauskas *et al.*, 2007). The observation of saprotrophic fungi forming orchid mycorrhizas is thus relevant in this framework. Along with the previous finding of ECM fungi (that usually superficially colonize host roots) internally colonizing root cells of temperate MH orchids (e.g. Selosse *et al.*, 2002; Taylor *et al.*, 2002; Roy *et al.*, 2009), this suggests that the plant orchestrates most of the mycorrhizal development.

The finding of saprotrophic fungi as orchid partners is, however, a bit less unexpected when we recall that rhizoctonias, the usual mycorrhizal partners of autotrophic green orchids, are saprotrophic (Smith & Read, 2008). Although rhizoctonias likely receive C from most adult orchids (Cameron *et al.*, 2006), they provide C to orchids during their underground, MH germination stage (Rasmussen, 1995). The particularity of the MH orchids investigated is thus (1) the MH symbiosis with nonrhizoctonia saprotrophs, and (2) the persistence of C dependency on saprotrophic fungi into adulthood. The reason why saprotrophic rhizoctonias are not involved in adult MH orchids is mysterious.

### The use of C from decaying plant material

In most MH models studied so far, C is obtained from nearby green plants via shared mycorrhizal fungi, either ECM (Taylor *et al.*, 2002; Bidartondo, 2005) or AM (Franke *et al.*, 2006; Merckx & Bidartondo, 2008). Here, *W. aphylla* roots displayed mycelial links to dead leaves (Fig. 1c,d), and *G. similis* mycorrhizas were embedded in decaying wood (Fig. S2), where its mycorrhizal fungus was detected by PCR. Stable isotopes and C : N data (Figs 4, S4), although not excluding other scenarios, make plausible the hypothesis that decaying leaves and wood are the respective ultimate C sources. A decrease in C : N and an increase in $\delta^{15}$N along the continuum decaying organic matter–saprotrophic fungi–MH orchid are expected, respectively, because of the loss of respiratory C (Julou *et al.*, 2005) and isotopic fractionation for $^{15}$N (Dawson *et al.*, 2002; Trudell *et al.*, 2003). As expected, the orchids investigated have higher $\delta^{15}$N and lower C : N ratios than surrounding green plants, as reported in other MH models (Trudell *et al.*, 2003; Julou *et al.*, 2005). However, differences in $\delta^{15}$N between the orchid and saprotrophic fungi (0.8–1.2‰) were smaller than between temperate MH species and ECM fungi (+3–4‰; Trudell *et al.*, 2003), as reported for *G. confusa* associated with *Mycena* (Ogura-Tsujita *et al.*, 2009), the sole saprotroph-associated MH orchid for which isotopic data are available. This could be a result of N-limitation in trophic chains based on dead plant material, since limitation reduces isotopic fractionation (Dawson *et al.*, 2002).

The $\delta^{13}$C values were very similar for fungi and MH plants, a typical feature of temperate MH species (Trudell *et al.*, 2003; Julou *et al.*, 2005). Temperate MH plants thus differ from autotrophic plants in $\delta^{13}$C by, on average, +6.9‰ (Zimmer *et al.*, 2008): smaller differences (+4.8‰) for *W. aphylla* and larger differences (+11.8‰ at ML) for *G. similis* suggest that these two models are functionally different. *Gastrodia confusa* associated with *Mycena* showed a 10.2‰ higher $\delta^{13}$C compared with surrounding autotrophic plants (Ogura-Tsujita *et al.*, 2009): thus, although *W. aphylla* has similar fungi, *G. similis* is more similar to its congeneric model in this respect. As expected for saprotrophs (Zeller *et al.*, 2007), fungi were richer in $^{13}$C than their substrates. Lignocellulose, and thus wood, have higher $\delta^{13}$C than other plant materials, such as leaves and this is usually reflected in higher $\delta^{13}$C content of wood saprotrophs compared with litter-decaying fungi (Taylor & Fransson, 2007). The higher $\delta^{13}$C in *G. similis* compared with *W. aphylla* therefore supports the hypothesis that these orchids receive C from fungi decaying wood and leaves respectively (analyses of other MH models, especially in sympatry, are required to ensure that these different sources do influence plants $\delta^{13}$C). Supplying $^{13}$C or $^{14}$C-labelled dead leaves or wood will provide more direct evidence for this, but stable isotope data support the indirect use of decaying plant material by these tropical MH orchids.

### Does tropical climate favour association with saprotrophs?

In this and other studies, MH orchids associated with saprotrophs tend to be tropical (Dearnaley, 2007). Although some live in more northern latitudes, such as *Gastrodia* spp., they occur in wet forests, with conditions reminiscent of tropical forests (such as *G. confusa* in South Japan; Isagi *et al.*, 1993).



© The Authors (2009)
Journal compilation © *New Phytologist* (2009)

This trend is strikingly exemplified in the genus *Epipogium*, where the temperate *E. aphyllum* associates with ECM fungi (Roy *et al.*, 2009) while the related tropical *E. roseum* associates with saprotrophic Coprinaceae (Yamato *et al.*, 2005).

Activity of saprotrophic fungi is positively influenced by temperature (Osono & Takeda, 2006) and moisture (Lavelle *et al.*, 1993), and water availability is required for activity of secreted fungal enzymes. In temperate forests, Jansson & Berg (1985) reported that temperature and moisture are limiting factors and explain 99% of the variation in litter decomposition rate between sites. Rainforests and tropical climates display long humid seasons with elevated temperatures (Table S1). Observations of *W. aphylla* mycorrhizal roots dynamic emphasize the role of humidity. While individual plants had $0.75 \pm 0.96$ root lengths of $13.0 \pm 18.0$ cm during the dry season (January 2007; Fig. S1a), they exhibited $4.5 \pm 2.3$ root lengths of $806 \pm 14.7$ cm during the rainy season (November 2007; Fig. S1b; $P < 0.006$, according to a Kruskal–Wallis test). Thus, mycorrhizal development was maximal when saprotrophic activity was expected to be the highest. We thus speculate that hot and/or wet conditions favour stronger activity of saprotrophic fungi, allowing a C flux sufficient for growth of adult MH orchids, at least during the rainy season.

Conversely, under drier and colder temperate conditions, saprotrophic rhizoctonias cannot support more than the need of MH germinating orchids, and only ECM fungi have sufficient C resources for adult MH plants (Taylor *et al.*, 2002). It is noteworthy that the orchids investigated have smaller and thinner stems than most temperate MH species, and produce smaller fruits (Figs 1a, S2a), as reported for *E. roseum* (Roy *et al.*, 2009) that also associates with saprotrophic fungi. Whether this results, in physiological or in evolutionary terms, from a less abundant C supply by saprotrophs than by ECM fungi is worth investigating (e.g. by considering more pairs of phylogenetically related tropical and temperate MH orchids).

## Conclusions

The word 'mycoheterotrophic' recently replaced the former, inappropriate word 'saprophytic' (Leake, 1994). Some MH plants have now proved to be indirectly saprotrophic. Our data open new windows on the diversity of symbionts and mycorrhizal morphology in orchids, revealing that some tropical MH plants are not highly specific. Other tropical MH plants share common mycorrhizal fungi with surrounding plants and exhibit mycorrhizal specificity (Franke *et al.*, 2006; Merckx & Bidartondo, 2008). Overall, tropical MH models reveal more variability in fungal associates and specificity levels than temperate ones, and tropical ecosystems therefore display additional ecological niches. Tropical models might thus challenge ideas derived from multiple studies in temperate ecosystems. We hope that more research on plant–fungal interactions will be conducted in the tropics, possibly bringing to light new aspects of their taxonomical, structural and functional diversity. More studies on tropical models will enable understanding of how adaptation to tropical conditions and phylogenetic load contribute to this diversity.

## Acknowledgements

The authors warmly thank C. Debain, J.-Y. Dubuisson, P. Feldmann, A. Jubault, D. Strasberg, C. Lavergne and A. Tillier for help in launching this research program, R. Courtecuisse for help in fungal identification, F. Chiroleu and S. Boutry for help with R software and the Parc National de la Guadeloupe for access to sites (permits 2004–2037 and 2007–022). We thank D. McKey and T. Kuyper as well as three anonymous reviewers for helpful comments on this article. F.M. is funded by the Région Réunion, and M.-A.S. by the Centre National de la Recherche Scientifique and the Société Française d'Orchidophilie.

## References

**Alexander IJ, Lee SS. 2005.** Mycorrhizas and ecosystem processes in tropical rain forest: implications for diversity. In: Burslem DFRP, Pinard MA, Hartley SE, eds. *Biotic interactions in the tropics: their role in the maintenance of species*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 165–203.

**Alexander IJ, Selosse M-A. 2009.** Mycorrhizas in tropical forest: a neglected research imperative. *New Phytologist* **182**: 14–16.

**Arnold AE, Lutzoni F. 2007.** Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecology* **88**: 541–549.

**Arnold AE, Mejía 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, USA* **100**: 15649–15654.

**Beaver RA. 1979.** Host specificity of temperate and tropical animals. *Nature* **281**: 139–141.

**Bidartondo MI. 2005.** The evolutionary ecology of mycoheterotrophy. *New Phytologist* **167**: 335–352.

**Bosser J. 2006.** Contribution à l'étude des Orchidaceae de Madagascar, des Comores et des Mascareignes. XXXV. Description d'un *Oeceoclades* nouveau de Madagascar, et notes sur trois genres nouveaux pour les Mascareignes. *Adansonia* **28**: 45–54.

**Burgeff H. 1932.** *Saprophytismus und symbiose. Studien an tropischen Orchideen*. Jena, Germany: Gustav Fisher.

**Butler RA, Laurance WF. 2008.** New strategies for conserving tropical forests. *Trends in Ecology and Evolution* **23**: 469–472.

**Cameron DD, Leake JR, Read DJ. 2006.** Mutualistic mycorrhiza in orchids: evidence from plant–fungus carbon and nitrogen transfers in the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. *New Phytologist* **171**: 405–416.

**Dawson TE, Mambelli S, Plamboeck AH, Templer PH, Tu KP. 2002.** Stable isotopes in plant ecology. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* **33**: 507–559.

**Dearnaley JDW. 2007.** Further advances in orchid mycorrhizal research. *Mycorrhiza* **17**: 475–486.

**Fan L, Guo SX, Cao WQ, Xiao PG, Xu JT. 1996.** Isolation, culture, identification and biological activity of *Mycena orchidicola* sp. Nov. in *Cymbidium sinense* (Orchidaceae). *Acta Mycologica Sinica* **15**: 251–255.

**Feldmann P, Barré N. 2001.** *Atlas des orchidées sauvages de la Guadeloupe*. Patrimoines Naturels 48. Paris, France: SPN/IEGB/MNHN/CIRAD.

**Franke T, Beenken L, Döring M, Kocyan A, Agerer R. 2006.** Arbuscular mycorrhizal fungi of the *Glomus*-group A lineage (Glomerales; Glomeromycota) detected in myco-heterotrophic plants from tropical Africa. *Mycological Progress* **5**: 24–31.

© The Authors (2009)
Journal compilation © *New Phytologist* (2009)

**Ghosh A, Frankland JC, Thurston CF, Robinson CH. 2003.** Enzyme production by *Mycena galopus* mycelium in artificial media and in *Picea sitchensis* $F_1$ horizon needle litter. *Mycological Research* **107**: 996–1008.

**Hillebrand H. 2004.** On the generality of the latitudinal gradient. *American Naturalist* **163**: 192–211.

**Huelsenbeck JP, Ronquist F. 2001.** MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* **17**: 754–755.

**Imhof S. 2007.** Specialized mycorrhizal colonization pattern in achlorophyllous *Epirixanthes* spp. (Polygalaceae). *Plant Biology* **9**: 786–792.

**Isagi Y, Kawahara T, Kamo K. 1993.** Biomass and net production in a bamboo *Phyllostachys bambusoides* stand. *Ecological Research* **8**: 123–133.

**Jansson PE, Berg B. 1985.** Temporal variation of litter decomposition in relation to simulated soil climate. Long term decomposition in a Scots pine forest. *Canadian Journal of Botany* **63**: 1008–1016.

**Julou T, Burghardt B, Gebauer G, Berveiller D, Damesin C, Selosse MA. 2005.** Mixotrophy in orchids: insights from a comparative study of green individuals and nonphotosynthetic individuals of *Cephalanthera damasonium*. *New Phytologist* **166**: 639–653.

**Kikuchi G, Higuchi M, Morota T, Nagasawa E, Suzuki A. 2008.** Fungal symbiont and cultivation test of *Gastrodia elata* Blume (Orchidaceae). *Journal of Japanese Botany* **83**: 88–95.

**Kusano S. 1911.** *Gastrodia elata* and its symbiotic association with *Armillaria mellea*. *Journal of the College of Agriculture Imperial University of Tokyo* **4**: 1–65.

**Lavelle P, Blanchard E, Martin A, Martin S. 1993.** A hierarchical model for decomposition in terrestrial ecosystems: application to soils of the humid tropics. *Biotropica* **25**: 130–150.

**Leake JR. 1994.** The biology of myco-heterotrophic ('saprophytic') plants. *New Phytologist* **127**: 171–216.

**Leake JR. 2004.** Myco-heterotroph/epiparasitic plant interactions with ectomycorrhizal and arbuscular mycorrhizal fungi. *Current Opinion in Plant Biology* **7**: 422–428.

**Martin F, Selosse MA. 2008.** The *Laccaria* genome: a symbiont blueprint decoded. *New Phytologist* **188**: 296–310.

**Matheny PB, Curtis JM, Hofstetter V, Aime MC, Moncalvo J-M, Ge Z-W, Yang Z-L, Slot JC, Ammirati JF, Baroni TJ *et al.* 2007.** Contributions of *rpb2* and *tef1* to the phylogeny of mushrooms and allies (Basidiomycota, Fungi). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **43**: 430–451.

**Merckx V, Bidartondo MI. 2008.** Breakdown and delayed cospeciation in the arbuscular mycorrhizal mutualism. *Proceedings of the Royal Society London Series B* **275**: 1029–1035.

**Molvray M, Kores PJ, Chase MW. 2000.** Polyphyly of mycoheterotrophic orchids and functional influence on floral and molecular characters. In: Wilson KL, Morrison DA, eds. *Monocots: systematics and evolution*. Melbourne, Australia: CSIRO, 441–447.

**Moore RT. 1996.** The dolipore/parenthosome septum in modern taxonomy. In: Sneh B, Jabaji-Hare S, Neate S, Dijst G, eds. *Rhizoctonia species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control*. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 13–35.

**Nakasone KK. 2007.** Morphological and molecular studies on *Resinicium* s. str. *Canadian Journal of Botany* **85**: 420–436.

**Ogura-Tsujita Y, Yukawa T. 2008.** High mycorrhizal specificity in a widespread mycoheterotrophic plant, *Eulophia zollingeri* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* **95**: 93–97.

**Ogura-Tsujita Y, Gebauer G, Hashimoto T, Umata H, Yukawa T. 2009.** Evidence for novel and specialized mycorrhizal parasitism: the orchid *Gastrodia confusa* gains carbon from saprotrophic *Mycena*. *Proceedings of the Royal Society London Series B* **276**: 761–767.

**Ohlsson KEA, Wallmark PH. 1999.** Novel calibration with correction for drift and non-linear response for continuous flow isotope ratio mass spectrometry applied to the determination of $\delta^{15}N$, total nitrogen, $\delta^{13}C$ and total carbon in biological material. *Analyst* **124**: 571–577.

**Öpik M, Moora M, Liira J, Zobel M. 2006.** Composition of root-colonizing arbuscular mycorrhizal fungal communities in different ecosystems around the globe. *Journal of Ecology* **94**: 778–790.

**Osono T, Takeda H. 2006.** Fungal decomposition of *Abies* needle and *Betula* leaf litter. *Mycologia* **98**: 172–179.

**Rasmussen HN. 1995.** *Terrestrial orchids – from seed to mycotrophic plant*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.

**Rasmussen HN. 2002.** Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. *Plant and Soil* **244**: 149–163.

**Roy M, Whatthana S, Richard F, Vessabutr S, Selosse M-A. (in press).** Mycoheterotrophic orchids from Thailand tropical dipterocarpacean forests associate with a broad diversity of ectomycorrhizal fungi. *BMC Biology*.

**Roy M, Yagame T, Yamato M, Iwase K, Heinz C, Faccio A, Bonfante P, Selosse M-A. 2009.** Ectomycorrhizal *Inocybe* species associate with the mycoheterotrophic orchid *Epipogium aphyllum* Sw., but not with its asexual propagules, throughout its Eurasiatic range. *Annals of Botany* **104**: 595–610.

**Selosse M-A, Weiss M, Jany JL, Tillier A. 2002.** Communities and populations of sebacinoid basidiomycetes associated with the achlorophyllous orchid *Neottia nidus-avis* and neighbouring tree ectomycorrhizae. *Molecular Ecology* **11**: 1831–1844.

**Selosse M-A, Faccio A, Scappaticci P, Bonfante P. 2004.** Chlorophyllous and achlorophyllous specimens of *Epipactis microphylla* (Neottieae, Orchidaceae) are associated with ectomycorrhizal septomycetes, including truffles. *Microbial Ecology* **47**: 416–426.

**Smith SE, Read DJ. 2008.** *Mycorrhizal symbiosis*. Cambridge, UK: Academic Press.

**Taylor AFS, Fransson PMA. 2007.** Natural abundance of $^{15}N$ and $^{13}C$ in saprotrophic fungi: what can they tell us? In: Gadd GM, Watkinson SC, Dyer PS, eds. *Fungi in the environment*. Cambridge, UK: University Press, 141–157.

**Taylor DL, Bruns TD, Leake JR, Read D. 2002.** Mycorrhizal specificity and function in myco-heterotrophic plants. In: Van der Heijden MGA, Sanders I, eds. *Mycorrhizal ecology*. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 375–413.

**Trudell SA, Rygiewicz PT, Edmonds RL. 2003.** Nitrogen and carbon stable isotope abundances support the myco-heterotrophic nature and host-specificity of certain achlorophyllous plants. *New Phytologist* **160**: 391–401.

**Umata H. 1995.** Seed germination of *Galeola altissima*, an achlorophyllous orchid, with aphyllophorales fungi. *Mycoscience* **36**: 369–372.

**Valaskova V, Snajdr J, Bittner B, Cajthaml T, Merhautova V, Hofrichter M, Baldrian P. 2007.** Production of lignocellulose-degrading enzymes and degradation of leaf litter by saprotrophic basidiomycetes isolated from a *Quercus petraea* forest. *Soil Biology and Biochemistry* **39**: 2651–2660.

**Vasiliauskas R, Mankis A, Finlay RD, Stenlid J. 2007.** Wood-decay fungi in fine living roots of conifer seedlings. *New Phytologist* **174**: 441–446.

**Wang H, Wang Z, Zhang F, Liu J, He X. 1997.** A cytological study on the nutrient-uptake mechanism of a saprophytic orchid *Gastrodia elata*. *Acta Botanica Sinica* **39**: 500–504.

**Wardle DA, Bardgett RD, Klironomos JN, Setälä H, van der Putten WH, Wall DH. 2004.** Ecological linkages between aboveground and belowground biota. *Science* **304**: 1629–1633.

**Xu J, Guo S. 2000.** Retrospective on the research of the cultivation of *Gastrodia elata* BI, a rare traditional Chinese medicine. *Chinese Medical Journal* **113**: 686–692.

**Yamato M, Yagame T, Suzuki A, Iwase K. 2005.** Isolation and identification of mycorrhizal fungi associating with an achlorophyllous plant, *Epipogium roseum* (Orchidaceae). *Mycoscience* **46**: 73–77.

**Zeller B, Brechet C, Maurice JP, Le Tacon F. 2007.** $^{13}C$ and $^{15}N$ isotopic fractionation in trees, soils and fungi in a natural forest stand and a Norway spruce plantation. *Annals of Science* **64**: 419–429.

**Zimmer K, Hynson NA, Gebauer G, Allen EB, Allen MF, Read DJ. 2008.** Wide geographical and ecological distribution of nitrogen and carbon gains from fungi in pyroloids and monotropoids (Ericaceae) and in orchids. *New Phytologist* **175**: 166–175.



© The Authors (2009)
Journal compilation © *New Phytologist* (2009)

## Supporting Information

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

**Fig. S1** Above-ground parts of *Wullschlaegelia aphylla* from Route de la Traversée.

**Fig. S2** *Gastrodia similis* from Bois Blanc.

**Fig. S3** Transverse section of a mycenoid rhizomorph from Route de la Traversée, with a central hole and hyphae with thicker, melanized walls at the external border.

**Fig. S4** Carbon–nitrogen (C : N) ratios of plant and fungal materials in a *Wullschlaegelia aphylla* population at Route de la Traversée and two *Gastrodia similis* populations at Mare Longue (ML) and Rivière Sainte-Suzanne (RS).

**Table S1** Meteorological data for Guadeloupe (where *Wullschlaegelia aphylla* was sampled in 2007) and Réunion (where *Gastrodia similis* was sampled in 2006)

**Table S2** Identity of the saprotrophic basidiomycetes collected on leaf litter (for *Wullschlaegelia aphylla*) for isotopic analyses and on wood (for *Gastrodia similis*: ML, Mare Longue; RS, Rivière Sainte-Suzanne)

**Table S3** Putative taxonomic identity and closest taxonomically informative sequence* in GenBank of the fungi found in *Wullschlaegelia aphylla* and *Gastrodia similis*

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting information supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the *New Phytologist* Central Office.

© The Authors (2009)
Journal compilation © *New Phytologist* (2009)

Figure S1

Figure S2

Figure S3

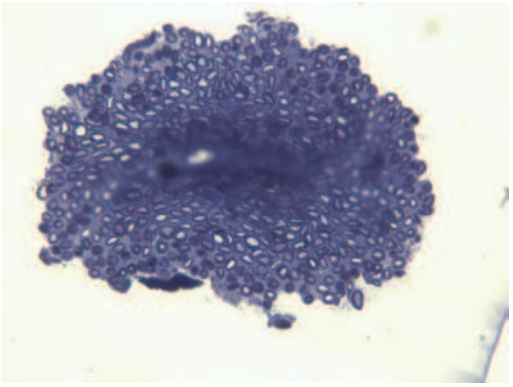


Figure S4

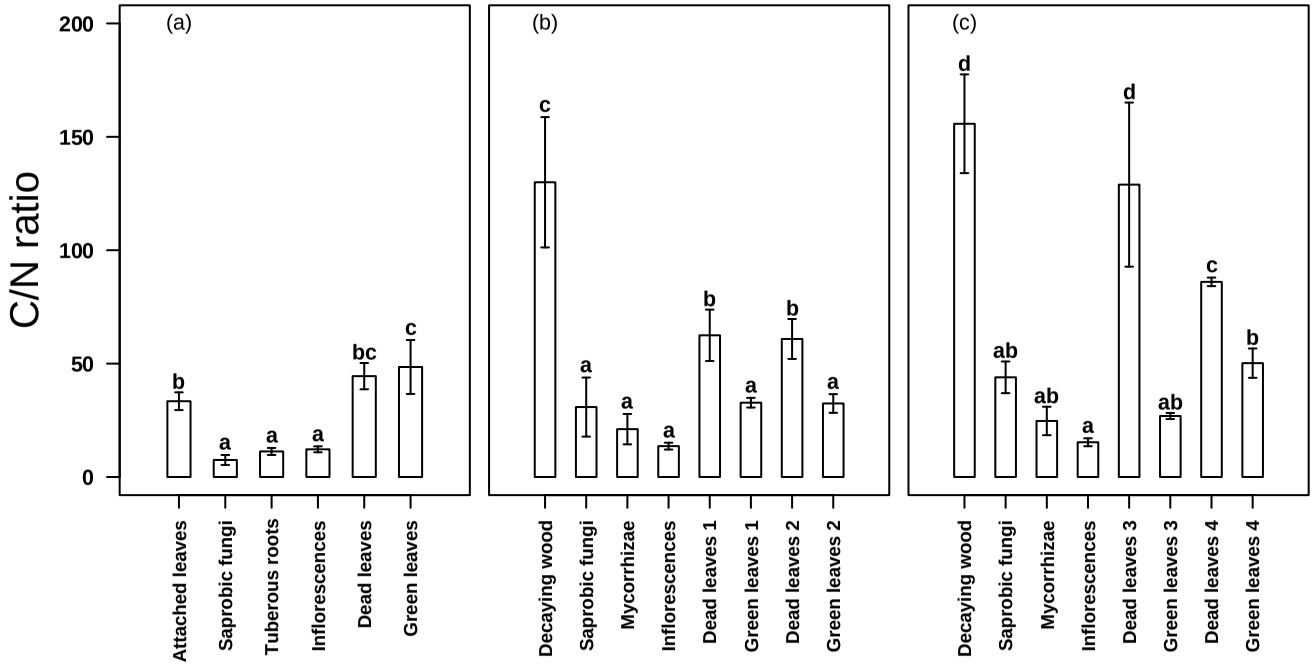

C/N ratio
200
150
100
50
0
(a)
b
a
a
a
bc
c
Attached leaves
Saprobic fungi
Tuberous roots
Inflorescences
Dead leaves
Green leaves
(b)
c
a
a
a
b
a
b
a
Decaying wood
Saprobic fungi
Mycorrhizae
Inflorescences
Dead leaves 1
Green leaves 1
Dead leaves 2
Green leaves 2
(c)
d
ab
ab
a
d
ab
c
b
Decaying wood
Saprobic fungi
Mycorrhizae
Inflorescences
Dead leaves 3
Green leaves 3
Dead leaves 4
Green leaves 4

Table S1 – Meteorological data for Guadeloupe (where *W. aphylla* was sampled in 2007) and Réunion (where *G. similis* was sampled in 2006).

| Island | Guadeloupe | | La Réunion | |
|---|---|---|---|---|
| Site | Prise d'eau (elevation: 110 m; 16°12'00"N; 61°34'00"O) | | Gros Piton Ste-Rose (elevation: 181 m; 21°10'57"S; 55°50'06"E) | |
| Source | Réseau agro-météorologique Rainette | | Météofrance | |
| Years | Average 1998-2007 | Year 2007 | Average 2000-2007 | Year 2006 |
| Total rain per year (m) | 2.33 | 2.15 | 3.39 | 3.39 |
| Average temperature (°C) | 24.7 | 24.8 | 20.2 | 20.7 |
| Coldest month: temperature (month) | 22.8 (Jan.) | 22.8 (Jan.) | 17.7 (Aug.) | 18.0 (Aug.) |
| Hottest month: temperature (month) | 26.2 (Jul.) | 26.4 (Jul.) | 22.8 (Feb.) | 23.2 (Mar.) |
| Driest month: rain in mm (month) | 94.7 (Feb.) | 44.5 (Feb.) | 149.5 (Oct.) | 162.4 (Sept.) |
| Wettest month: rain in mm (month) | 248.4 (Nov.) | 422.0 (Oct.) | 550.4 (Feb.) | 654.6 (Mar.) |

Table S2 – Identity of the saprobic Basidiomycetes collected on leaf litter (for *W. aphylla*) for isotopic analyses and on wood (for *G. similis*: ML = Mare Longue; RS = Rivière Sainte-Suzanne).

| Site: | Morphological identification | GB accession number | Closest GenBank relative | E-value | % id-entity |
|---|---|---|---|---|---|
| *W. aphylla* | | | | | |
| Traversée | *Marasmiellus* sp. | FJ208851 | *Marasmiellus* sp. *(AY216476)* | 0.0 | 99% |
| | *Collybia* sp. | FJ208852 | *Gymnopus subcyathiformis (DQ450041)* | 0.0 | 89% |
| | Unknown sp. | FJ208853 | *Lycoperdon pusillum (AB067724)* | 0.0 | 94% |
| | *Marasmius* sp. | FJ208854 | *Marasmius cladophyllus (AY916705)* | 0.0 | 91% |
| | *Lycogalopsis solmsii* | PCR failed | | | |
| | *Collybia* sp. | FJ208855 | *Gymnopus polygrammus (AY842954)* | 0.0 | 88% |
| | *Mycena holoporphyra* | FJ208856 | *Mycena rubromarginata (EF530939)* | 0.0 | 85% |
| *G. similis* | | | | | |
| ML | Unknown sp. | FJ179481 | *Pleurotus lampas (AY265837)* | 0.0 | 96% |
| | *Marasmius* sp. | FJ179482 | *Marasmius cladophyllus (AY216475)* | 0.0 | 98% |
| | *Inonotus* sp. | FJ179483 | *Inonotus hispida (AY251309)* | 0.0 | 94% |
| RS | Unknown sp. | FJ179484 | *Coriolopsis caperata (EU030178)* | 0.0 | 94% |
| | *Mycena holoporphyra* | FJ208856 | *Mycena rubromarginata (EF530939)* | 0.0 | 85% |

Table S3 – Putative taxonomic identity and closest taxonomically informative sequence* in GeneBank of the fungi found in *W. aphylla* and *G. similis*.

| Putative taxonomic identity | Orchid host | GB accession number | Closest taxonomically informative sequence in GeneBank* |
|---|---|---|---|
| Cystofilobasidiales sp.1 | *W. aphylla* | FJ179477 | *Helicogloea variabilis* L20282 |
| *Fusarium sp.*1 | *G. similis* | FJ179466 | *Fusarium lateritium* AF310981 |
| Gymnopoid sp.1 † | *W. aphylla* | FJ179475 | *Gymnopus fusipes* AY256711 |
| Gymnopoid sp.2 † | *W. aphylla* | FJ179476 | *Gymnopus luxurians* AY256709 |
| Gymnopoid sp.3 † | *G. similis* | FJ179468 | *Gymnopus luxurians* AY256709 |
| Helotiales sp.1 | *G. similis* | FJ179465 | *Cryptosporiopsis ericae* AY853167 |
| Hypocreales sp.1 | *W. aphylla* | FJ179478 | *Hypocrea lutea* AB027384 |
| Hypocreales sp.2 | *W. aphylla* | FJ179479 | *Myrothecium inundatum* AJ302005 |
| Mycenoid sp.1 ‡ | *W. aphylla* | FJ179470 | *Mycena rubromarginata* EF530939 |
| Mycenoid sp.2 ‡ | *W. aphylla* | FJ179471 | *Mycena rubromarginata* EF530939 |
| Mycenoid sp.3 ‡ | *W. aphylla* | FJ179472 | *Mycena rubromarginata* EF530939 |
| Mycenoid sp.4 ‡ | *W. aphylla* | FJ179473 | *Mycena rubromarginata* EF530939 |
| Mycenoid sp.5 ‡ | *G. similis* | FJ179469 | *Mycena rubromarginata* EF530939 |
| *Psathyrella sp.*1 | *W. aphylla* | FJ179474 | *Psathyrella spadicea* AM712288 |
| *Resinicium sp.*1 § | *G. similis* | FJ179463 | *Resinicium mutabile* DQ863699 |
| Stereaceae sp.1 | *G. similis* | FJ179464 | *Wrightoporia tropicalis* AF50649 |
| Trechisporales sp.1 | *W. aphylla* | FJ179480 | *Porpomyces mucidus* AF347092 |
| *Trichoderma sp.*1 | *G. similis* | FJ179467 | *Trichoderma hamatum* EU280105 |

* all closest sequences were found in GeneBank by Blast analysis and had e-values under $10^{-100}$.

† See phylogenetic position on Fig. S5b.

‡ See phylogenetic position on Fig. S5a.

# Chapitre 4

# Article 2. *Saprotrophic fungal mycorrhizal symbionts in achlorophyllous orchids : finding treasures among the molecular scraps ?*

**Résumé** Les plantes mycohétérotrophes sont dépourvues de pigment chlorophyllien et, en l'absence de photosynthèse, se nourrissent en soutirant du carbone aux champignons mycorhiziens qu'elles abritent dans leurs racines. Deux règles ont été établies à partir des études des plantes mycohétérotrophes : (1) elles sont chacune spécifiquement associées à un partenaire mycorhizien ; (2) leurs partenaires forment simultanément des symbioses mycorhiziennes dans les racines de plantes vertes voisines, qui représentent alors la source de carbone du système. Dans cet article, nous commentons les récentes découvertes faites chez les orchidées mycohétérotrophes tropicales : (i) celles-ci s'associent de façon peu spécifique à plusieurs types de partenaires mycorhiziens ; (ii) elles ne sont pas toujours associées à des champignons mycorhiziens de plantes voisines, mais le plus souvent à des champignons saprophytes tropicaux. Ces découvertes révèlent que la spécificité n'est pas la règle dans les associations des plantes mycohétérotrophes, et appellent à envisager la possibilité de l'absence de spécificité dans les études futures. Elles révèlent par la même occasion que l'association orchidée-saprophyte est apparue plusieurs fois au cours de l'évolution des orchidées et des champignons, et illustrent combien les transitions évolutives entre l'état saprophyte et l'état mycorhizien sont fréquentes dans l'évolution des champignons—d'où l'importance de rendre compte de tous les champignons identifiés dans les modèles. C'est une recommandation méthodologique ma-

jeure que nous avons mise en œuvre dans les autres articles de cette thèse. Cet article, invité suite au précédent par la revue qui l'a publié, a été rédigé en interaction avec M.-A. Selosse.

**Publié dans *Plant Signaling and Behavior.***

MINI-REVIEW

Plant Signaling & Behavior 5:4, 1-5; April 2010; © 2010 Landes Bioscience

# Saprotrophic fungal mycorrhizal symbionts in achlorophyllous orchids

## Finding treasures among the 'molecular scraps'?

Marc-André Selosse,[1,*] Florent Martos,[1,2] Brian A. Perry,[3] Mahajabeen Padamsee,[4] Mélanie Roy [1] and Thierry Pailler [2]

[1]Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive (CNRS, UMR 5175); Equipe Interactions Biotiques; Montpellier, France; [2]UMR C53 Peuplements végétaux et Bioagresseurs en milieu tropical; Université de La Réunion; Saint-Denis, France; [3]Department of Biology; University of Hawai'i at Hilo; Hilo, HI USA; [4]Department of Plant Pathology; Louisiana State University Agricultural Center; Baton Rouge, LA USA

**Key words:** endophytic fungi, evolution of mycorrhizae, mycoheterophy, mycorrhizae, saprophytic fungi, specificity

Mycoheterotrophic plants are achlorophyllous plants that obtain carbon from their mycorrhizal fungi. They are usually considered to associate with fungi that are (1) specific of each mycoheterotrophic species and (2) mycorrhizal on surrounding green plants, which are the ultimate carbon source of the entire system. Here we review recent works revealing that some mycoheterotrophic plants are not fungal-specific, and that some mycoheterotrophic orchids associate with saprophytic fungi. A re-examination of earlier data suggests that lower specificity may be less rare than supposed in mycoheterotrophic plants. Association between mycoheterotrophic orchids and saprophytic fungi arose several times in the evolution of the two partners. We speculate that this indirectly illustrates why transition from saprotrophy to mycorrhizal status is common in fungal evolution. Moreover, some unexpected fungi occasionally encountered in plant roots should not be discounted as 'molecular scraps', since these facultatively biotrophic encounters may evolve into mycorrhizal symbionts in some other plants.

Considerable advances were recently made in the ecology of achlorophyllous, heterotrophic plants that obtain carbon from their mycorrhizal fungi (**Fig. 1**). Most plants have contact with soil through mycorrhizal symbioses, in which roots associate with a suitable fungal partner. Fungi utilize soil mineral nutrients, and while sharing them with host plants, they generally receive carbon as a reward. In contrast, some achlorophyllous plants living in the shaded forest understorey have reversed the process. They receive carbon from their mycorrhizal fungi exclusively, hence the designation 'mycoheterotrophic' (MH) plants.[1] Mycoheterotrophy has appeared several times during the evolution of land plants, and more than 20 times among orchids that encompass half of all MH species.[2] In the last decade, the development of molecular tools has enabled researchers to identify many fungal symbionts, which are often uncultivable. The fungi occurring in the densely colonized roots of MH species often produce a stronger PCR signal than any fungal contaminant, making molecular tools very effective for this field of study.

*Correspondence to: Marc-André Selosse; Email: ma.selosse@wanadoo.fr
Submitted: 11/25/09; Accepted: 11/25/09
Previously published online:
www.landesbioscience.com/journals/psb/article/10791

### Unexpectedly Diverse Fungal Partners

Although most MH species occur in tropical region, most MH plants currently investigated are from northern latitudes. In temperate MH plants, two main features were consistently found: high specificity and indirect below ground connection with nearby autotrophic plants.[1,3] Regarding specificity, each of these temperate MH species only associate with a narrow range of closely related fungal taxa, and these taxa differ among MH species. High specificity is often assumed as an outcome of an arms race between coevolving fungi and MH plants; each MH species successfully exploits only one fungus, similar to specialized parasites (epiparasites[4]). Fungal partners of temperate MH species also form mycorrhizae with nearby autotrophic trees that represent the ultimate carbon source of the entire system.[5] Direct evidence of a below-ground connection between a MH plant and surrounding trees was obtained by labelling photosynthates.[6] In most studies, indirect evidence was provided by using stable isotopes;[7] using $^{13}C$, natural abundances in MH plants were found to be similar to that of their mycorrhizal fungi but higher than that of nearby autotrophic plants and using $^{15}N$, natural abundances were found to increase from fungi to MH plants, as is expected along trophic chains.

There are older as well as more recent reports on associations between Asiatic tropical MH orchids and saprotrophic fungi, which were mainly identified by using in vitro isolation,[8,9] a technique that often selects saprotrophic contaminants. Some MH orchids living in wet forests in Asia and Australia have been presumed to be associated with litter decaying fungi[10,11] (reviewed in ref. 3). More recently, saprotrophic fungi were identified in situ using molecular tools on colonized roots or rhizomes. In the Asiatic *Epipogium roseum*, association with saprotrophic Psathyrellaceae[12] (=Coprinaceae; **Fig. 2**) was further supported by in vitro reconstruction of the symbiosis that enabled successful development of the orchid.[13] Psathyrellaceae were molecularly identified in the Asiatic MH *Eulophia zollingeri*[14] (**Fig. 2**), Gymnopus-related fungi in the Australian MH *Erythrorchis cassythoides*,[15] Mycenaceae in the Japanese *Gastrodia confusa*[16]

This manuscript has been published online, prior to printing. Once the issue is complete and page numbers have been assigned, the citation will change accordingly.

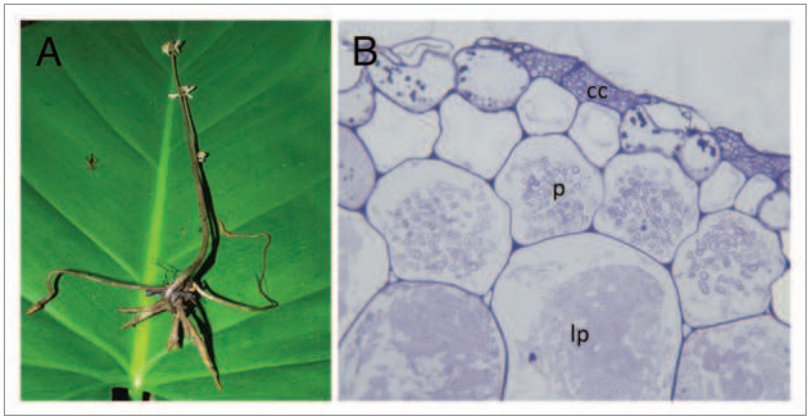



**Figure 1.** *Wullschlaegelia aphylla*, a mycoheterotrophic orchid unspecifically associated with saprotrophic Mycena and Gymnopus species. (A) Whole plant at flowering time, with reduced, tuberoid root system at that period. (B) Section of mycorrhizal root showing intracellular hyphal pelotons at early stage (p), or late stage (undergoing lysis, lp); among orchids, the colonization of dead cortical cell (cc) is a unique feature to some saprotrophic fungi (picture by A. Faccio, University of Torino).

and the Caribbean *Wullschlaegelia aphylla*[17] (**Figs. 1A and 3**), Marasmiaceae in the Australian *Gastrodia sesamoides*,[18] and a Resinicium species (Hymenochaetales) in *Gastrodia similis* from La Réunion[17] (Indian Ocean). Therefore, there are now multiple lines of evidence that several saprotrophic fungal lineages support some MH orchids, and that such symbioses are common in tropical latitudes.

## Specificity of Association: Less than Expected

Additionally, the MH orchid *Wullschlaegelia aphylla* associates with both Mycenaceae and Gymnopus-related fungi, and possibly with a species close to Psathyrellaceae.[17] The former fungi were also identified by PCR from mycorrhizal pelotons—i.e., the fungal coils formed in mycorrhizal root cells (**Fig. 1B**)—supporting these taxa's ability to form orchid mycorrhizae. Some MH plants have thus non-specific associations with several fungal lineages. The recent finding of multiple fungal taxa within a plant or even within a root in two other MH species supports that specificity is not the rule: several fungi, all mycorrhizal on surrounding trees, occur in the orchid Aphyllorchis spp. from Thailand[19] and in the North-American ericaceous *Pyrola picta*.[20]

Previous reports of specialized MH plants may need to be re-investigated to determine whether they are truly non-specific. The African MH *Afrothismia hydra* (Thismiaceae) revealed mostly Glomus species and also an Acaulospora, which was perceived as a facultative partner with a reduced role in plant nutrition.[21] In the MH orchid *Gastrodia confusa*, additional saprotrophic Marasmiaceae (Marasmiellus, Clitocybula) were occasionally recovered in individuals lacking the frequently amplified Mycena spp.;[16] the authors hypothesized that some plant populations may differ in their mycorrhizal fungus, but Marasmiellus and Mycena fungi also co-existed in some plants. Therefore, fungi identified by molecular tools that have been discounted from relevant symbionts in the initial study (the "molecular scraps", i.e., the fungal sequences that are not granted any relevant role) deserve to be reported. As shown in the analysis of the papers cited above, it is valuable to consider their putative mycorrhizal abilities. In the light of recent works, we could indeed find treasures among molecular scraps.

Nevertheless, we still ignore whether all fungal partners actually provide carbon to the unspecialized MH orchids. To date, there is even no direct evidence or experimental design (e.g., by labelling experiments) showing that MH orchids associated with saprotrophs indirectly exploit carbon from dead organic matter. This is only supported by rhizomorphs (elongated bundles of fungal hyphae) that occasionally link dead leaves to mycorrhizal roots[10,17] and $^{13}C$ and $^{15}N$ natural contents, consistent with the use of saprotrophic fungi as a food source.[16,17] *Wullschlaegelia aphylla* is linked to rhizomorphs of Mycenaceae and Gymnopus-related fungi,[17] but this does not entail that they all provide carbon; moreover, isotopic abundances only distinguish the ecology of the fungal species furnishing carbon, not its (or their) species.

## Mycorrhizal Evolution: Promising Molecular Scraps?

The observation of simultaneous morphogenetic processes between plants and saprotrophic fungi (**Fig. 1B**), which usually do not colonize living material, is fascinating. This supports a lead role for MH orchids in the mycorrhizal morphogenetic process, since saprotrophic fungi were never selected for such a trait, and raises the question of how the orchids manipulate these fungi. Moreover, although investigating only a few models, current studies demonstrate that MH orchids recruited several independent saprotrophic lineages in the Hymenochaetales, Psathyrellaceae, Mycenaceae and Marasmiaceae (**Fig. 2 and 3**). Although some clades were targeted twice, such Psathyrellaceae in the unrelated orchids *Epipogium roseum* and *Eulophia zollingeri* (**Fig. 2**), no specific fungal clade is predisposed to associate with MH orchids. One can thus speculate that fungi do not need specific or rare predispositions to be driven to living roots by MH orchids. In other words, the transition to growing in living material might arise fairly easily in fungal evolution, possibly even without any specific genetic modification. Although the genomes of mycorrhizal fungi contain numerous genes specifically involved in symbiosis,[22] it may be that the latter are only secondarily arisen as an adaptation to exploiting the biotrophic niche (indeed, saprotrophs from MH orchids grow in roots, but do not receive carbon from them). This may even explain why the transition to mycorrhizal status occurred so often in the evolution of fungi.[23]

In green orchids, in addition to the usual mycorrhizal symbionts (the rhizoctonias, i.e., members of Sebacinales, Ceratobasidiales and Tulasnellales, often considered as saprotrophs), other saprotrophs sometimes occur, e.g., Mycena species in *Anoectochilus roxburghii*[24] or *Cymbidium sinense*.[25] In these cases, they may be contaminants, or facultatively biotrophic encounters that either form mycorrhizal structures on very small root portions, or colonize the tissues as endophytes (i.e., grow within

©2010 Landes Bioscience. Do not distribute.

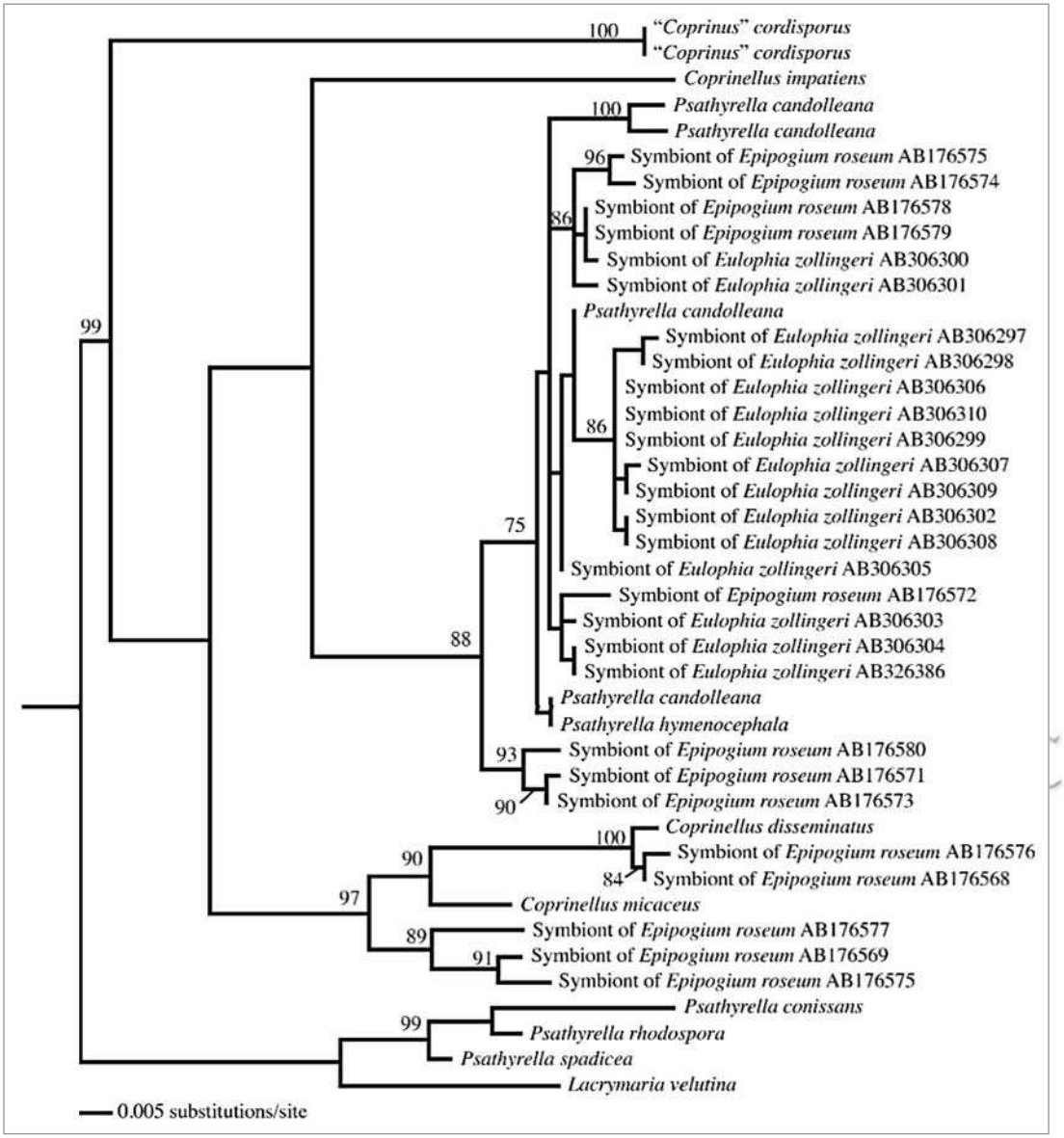



**Figure 2.** A phylogeny of Psathyrellaceae (maximum likelihood) shows that several lineages were recruited as mycorrhizal symbionts of the myco-heterotrophic orchids Eulophia zollingeri and Epipogium roseum. Mycorrhizal taxa fall within a clade consisting of Psathyrella candolleana representatives, while others fall within the Coprinellus clade (sequences from references 12 and 14; the support values on branches correspond to maximum likelihood bootstrap probabilities, and only values above 70% are shown).

living plant tissues, causing an unapparent infection, but do not form true mycorrhizae, nor cause any disease symptoms). The latter cases may be on the pathway from which closer mycorrhizal relationships evolved. Indeed, evolution from saprotrophism to endophytism and then to mycorrhizal association is a possible pathway for the repetitive evolution of mycorrhizal associations seen in fungi.[26] The same applies for the finding of tree mycorrhizal fungi in some rhizoctonia-associated green orchids, e.g., overlooked Russula species in Cypripedium.[27] This may be the starting point for evolution to MH orchids connected by mycorrhizal fungi with surrounding autotrophs. Thus, when investigating green orchids, the report of minor 'contaminant' taxa, usually disregarded as molecular scraps, is also extremely relevant for our understanding of the evolution of the symbiosis! In this respect, a particular issue is that of the fungal shifts that occur in the evolution of some specific MH lineages, such as in Ericaceae, where closely related MH species specifically target different fungal taxa.[28] How did the common ancestor shift to a new symbiont? Indeed, one of these facultatively biotrophic encounters may evolve into an exclusive symbiont.[26]

On the orchids' side, the ability to exploit fungal carbon arose several times[2] using fungi mycorrhizal on other nearby autotrophs, or saprotrophic fungi. Even though some MH taxa only use one kind of fungus, such as tree mycorrhizal fungi in the Neottieae tribe or saprotrophs in the genus Gastrodia, there is evidence that associations with saprotrophic versus mycorrhizal

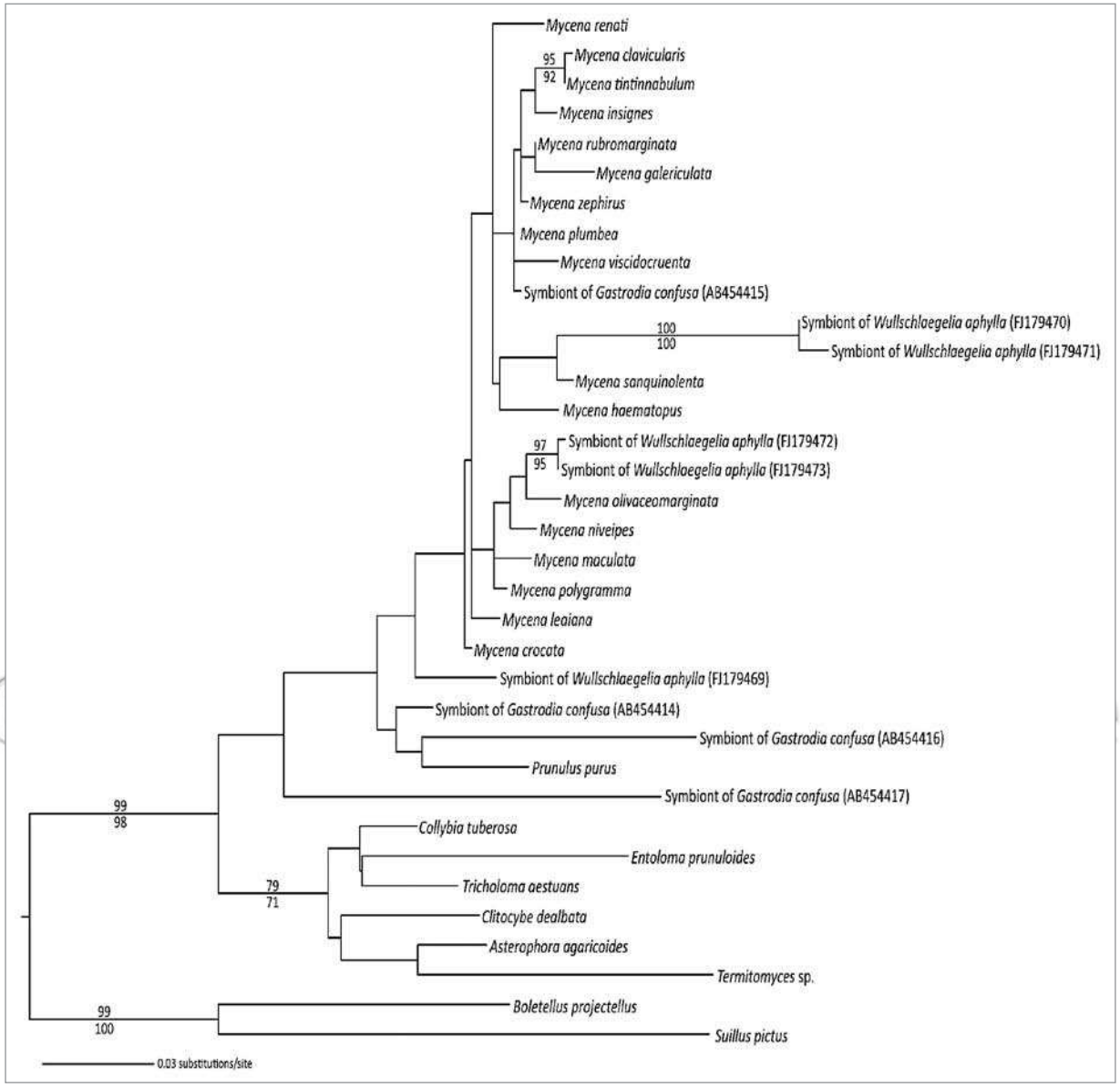



**Figure 3.** A phylogeny of Mycenaceae (maximum likelihood) shows that several lineages were recruited as mycorrhizal symbionts of the myco-heterotrophic orchids Gastrodia similis, G. confusa and Wullschlaegelia aphylla). Mycorrhizal taxa fall out among species of Mycena, while four additional isolates fall out with Mycena pura (= Prunulus purus), or in more basal positions within, or sister to, Mycenaceae (sequences from references 16 and 17; the support values on branches correspond to parsimony bootstrap/maximum likelihood bootstrap probabilities; only values above 70% are shown).

fungi are not phylogenetically constrained in MH orchids. For example, although *Epipogium roseum* associates with saprotrophic Psathyrellaceae,[12,13] the related *E. aphyllum* associates with tree mycorrhizal Inocybe.[29] Strikingly, the saprotrophic fungi involved (**Fig. 2 and 3**) belong to taxa that are abundant in temperate ecosystems where MH plants also exist, however, to our knowledge, these taxa never interact with MH plants outside of the tropics (or very wet temperate forests). The ecological environment may be more relevant than the phylogenetic position of the orchid. A possibility is that a wetter and hotter climate may extend the period of growth and nutrition of saprotrophs, providing surplus carbon that can be provided to a MH plant at little or no cost to the fungus.[17]

Certainly, MH orchids associating with saprotrophic fungi are more tractable models for in vitro experimentation[13] than those associating with mycorrhizal fungi. These taxa offer interesting models for testing the impact of MH orchids on associated fungi, the mechanisms of recognition between the partners or the exchanges at cell level. Beyond this, there is a great need for additional research on biological interactions in MH plants, and more generally on plant-microorganism relationships, in the tropics.

And, please, let's never forget reporting on the molecular scraps!

## References


1. Leake JR. Myco-heterotroph/epiparasitic plant interactions with ectomycorrhizal and arbuscular mycorrhizal fungi. Curr Opin Plant Biol 2004; 7:422-8.
2. Molvray M, Kores PJ, Chase MW. Polyphyly of mycoheterotrophic orchids and functional influence on floral and molecular characters. In: Wilson KL, Morrison DA, eds. Monocots: systematics and evolution. Melbourne, Australia: CSIRO 2000; 441-7.
3. Taylor DL, Bruns TD, Leake JR, Read D. Mycorrhizal specificity and function in myco-heterotrophic plants. In: Van der Heijden MGA, Sanders I, eds. Mycorrhizal Ecology. Berlin, Germany: Springer-Verlag 2002; 375-413.
4. Merckx V, Bidartondo MI, Hynson NA. Myco-heterotrophy: when fungi host plants. Ann Bot 2009; 104:1255-61.
5. Selosse M-A, Roy M. Green plants that feed on fungi: facts and questions about mixotrophy. Trends Plant Sci 2009; 14:64-70.
6. McKendrick SL, Leake JR, Read DJ. Symbiotic germination and development of myco-heterotrophic plants in nature: transfer of carbon from ectomycorrhizal *Salix repens* and *Betula pendula* to the orchid *Corallorhiza trifida* through shared hyphal connections. New Phytol 2000; 145:539-48.
7. Trudell SA, Rygiewicz PT, Edmonds RL. Nitrogen and carbon stable isotope abundances support the myco-heterotrophic nature and host-specificity of certain achlorophyllous plants. New Phytol 2003; 160:391-401.
8. Umata H. In vitro symbiotic association of an achlorophyllous orchid, *Erythrorchis ochobiensis*, with orchid and non-orchid fungi. Memoirs of the Faculty of Agriculture, Kagoshima University 1998a; 34:97-107.
9. Umata H. A new biological function of shiitake mushroom, *Lentinula edodes*, in a myco-heterotrophic orchid, *Erythrorchis ochobiensis*. Mycoscience 1998b; 39:85-8.
10. Kusano S. *Gastrodia elata* and its symbiotic association with *Armillaria mellea*. J Coll Agric Japan 1911; 9:1-73.
11. Burgeff H. Saprophytismus und Symbiose. Studien an tropischen Orchideen. Jena, Germany: Gustav Fischer 1932.
12. Yamato M, Yagame T, Suzuki A, Iwase K. Isolation and identification of mycorrhizal fungi associating with an achlorophyllous plant, *Epipogium roseum* (Orchidaceae). Mycoscience 2005; 46:73-7.
13. Yagame T, Yamato M, Mii M, Suzuki A, Iwase K. Developmental processes of achlorophyllous orchid, *Epipogium roseum*: from seed germination to flowering under symbiotic cultivation with mycorrhizal fungus. J Plant Res 2007; 120:229-36.
14. Ogura-Tsujita Y, Yukawa T. High mycorrhizal specificity in a widespread mycoheterotrophic plant, *Eulophia zollingeri* (Orchidaceae). Am J Bot 2008; 95:93-7.
15. Dearnaley JDW. The fungal endophytes of *Erythrorchis cassythoides*—is this orchid saprophytic or parasitic? Aust Mycol 2006; 25:51-7.
16. Ogura-Tsujita Y, Gebauer G, Hashimoto T, Umata H, Yukawa T. Evidence for novel and specialized mycorrhizal parasitism: the orchid *Gastrodia confusa* gains carbon from saprotrophic Mycena. Proc Royal Soc Lond B 2009; 276:761-7.
17. Martos F, Dulormne M, Pailler T, Bonfante P, Faccio A, Fournel J, et al. Independent recruitment of saprotrophic fungi as mycorrhizal partners by tropical achlorophyllous orchids. New Phytol 2009; 184:668-81.
18. Dearnaley JWD, Bougoure JJ. Molecular identification of Marasmiaceae mycobionts in rhizomes of *Gastrodia sesamoïdes*—evidence for direct orchid parasitism. Fungal Ecol 2009; In press.
19. Roy M, Whatthana S, Richard F, Vessabutr S, Selosse M-A. Two mycoheterotrophic orchids from Thailand tropical dipterocarpacean forests associate with a broad diversity of ectomycorrhizal fungi. BMC Biol 2009a; 7:51.
20. Hynson N, Bruns TD. Evidence of a myco-heterotroph in the plant family Ericaceae that lacks mycorrhizal specificity. Proc Royal Soc Lond B 2009; 276:4053-9.
21. Franke T, Beenken L, Döring M, Kocyan A, Agerer R. Arbuscular mycorrhizal fungi of the Glomus-group A lineage (Glomerales; Glomeromycota) detected in myco-heterotrophic plants from tropical Africa. Mycol Progr 2006; 5:24-31.
22. Martin F, Selosse M-A. The Laccaria genome: a symbiont blueprint decoded. New Phytol 2008; 180:296-310.
23. Hibbett DS, Matheny PB. Relative ages of ectomycorrhizal mushrooms and their plant hosts. BMC Biol 2009; 7:13.
24. Guo S-X, Fan L, Cao W-Q, Xu J-T, Xiao P-G. *Mycena anoectochila* sp. Nov. isolated from mycorrhizal roots of *Anoectochilus roxburghii* from Xishuangbanna, China. Mycologia 1997; 89:952-4.
25. Fan L, Guo S, Cao W, Xiao P, Xu J, Fan L, et al. Isolation, culture, identification and biological activity of *Mycena orchidicola* sp. nov. in *Cymbidium sinense* (Orchidaceae). Acta Mycol Sin 1996; 15:251-5.
26. Selosse M-A, Dubois M-P, Alvarez N. Are Sebacinales common root endophytes? Mycol Res 2009; 113:1062-9.
27. Shefferson RP, Taylor DL, Garnica S, McCormick MK, Adams S, Gray HM, et al. The evolutionary history of mycorrhizal specificity among lady's slipper orchids. Evolution 2007; 61:1380-90.
28. Bidartondo MI, Bruns TD. Fine-level mycorrhizal specificity in the Monotropoideae (Ericaceae): specificity for fungal species groups. Mol Ecol 2002; 11:557-69.
29. Roy M, Yagame T, Yamato M, Iwase K, Heinz C, Faccio A, et al. Ectomycorrhizal Inocybe species associate with the mycoheterotrophic orchid *Epipogium aphyllum* Sw., but not with its asexual propagules, throughout its Eurasiatic range. Ann Bot 2009b; 104:595-610.


©2010 Landes Bioscience. Do not distribute.

# Chapitre 5

# Article 3. *Mycoheterotrophy evolved from mixotrophic ancestors : evidence in Cymbidium (Orchidaceae)*

**Résumé** Les évolutions conjointes des partenaires mycorhiziens et de la nutrition des orchidées partiellement ou totalement mycohétérotrophes n'ont jamais été étudiées dans un cadre phylogénétique connu. Ces changements sont-ils apparus spontanément dans les lignées mycohétérotrophes, ou sont-ils dérivés d'un état nutritionnel intermédiaire à partir d'autotrophes associées à des rhizoctonias ? Dans cet article, nous avons examiné cette question en étudiant la variation des degrés d'hétérotrophie dans des lignées d'orchidées chlorophylliennes et mycohétérotrophes directement apparentées dans la phylogénie du genre *Cymbidium* (tribu des Cymbidieae).

Les degrés d'hétérotrophie de quatre espèces asiatiques *Cymbidium spp.*, chlorophylliennes ou non chlorophylliennes, ayant toutes commuté des rhizoctonias à des partenaires ectomycorhiziens (l'article le montrant n'est pas encore publié car il a essuyé des refus successifs) ont été estimés en mesurant les abondances naturelles des plantes en isotopes du carbone ($^{13}C$) et de l'azote ($^{15}N$), et en comparant leurs signatures à celles de plantes autotrophes et de champignons ectomycorhiziens dans deux sites forestiers du Japon. L'échantillonnage et la préparation des échantillons aux analyses isotopiques ont été réalisés par H. Motomura, A. Kagawa et T. Yukawa. J'ai analysé les résultats (statistiques, mise en forme graphique), et j'ai participé à la rédaction de l'article avec T. Yukawa et M-A Selosse.

Les signatures isotopiques des plantes non chlorophylliennes de *C. macrorhizon* et *C. aberrans* ont révélé un fort degré d'hétérotrophie pour ces espèces qui sont associées à

des champignons ectomycorhiziens. Les espèces *C. lancifolium* et *C. goeringii* (dont les lignées non chlorophylliennes dérivent) ont révélé un degré d'hétérotrophie intermédiaire (mixotrophie) entre ceux des espèces autotrophes et non chlorophylliennes : elles reçoivent 30 à 50% de carbone de leurs partenaires mycorhiziens. Cette étude démontre que la mycohétérotrophie des orchidées dérive d'un état nutritionnel intermédiaire, la mixotrophie, dérivant lui-même d'un état autotrophe. Elle suggère aussi que la mise en place d'une association symbiotique, avec des champignons (ectomycorhiziens ou saprophytes) manipulant plus de carbone que les partenaires habituels, est une préadaptation à la mycohétérotrophie.

**publié dans *Annals of Botany.***

*Annals of Botany* **106**: 573–581, 2010
doi:10.1093/aob/mcq156, available online at www.aob.oxfordjournals.org

ANNALS OF BOTANY Founded 1887

# Mycoheterotrophy evolved from mixotrophic ancestors: evidence in *Cymbidium* (Orchidaceae)

**Hiroyuki Motomura[1], Marc-André Selosse[2], Florent Martos[2,3], Akira Kagawa[4] and Tomohisa Yukawa[1,*]**

[1]*Tsukuba Botanical Garden, National Museum of Nature and Science, Tsukuba, Ibaraki 305-0005, Japan,* [2]*Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive (CNRS, UMR 5175), Equipe Interactions Biotiques, 19129 Route de Mende, Montpellier cedex 5, France,* [3]*UMR C53 Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical, Université de La Réunion, 15 Avenue René Cassin, BP 7151, 97715 Saint-Denis cedex 9, France and* [4]*Forestry and Forest Products Research Institute, Tsukuba Norin PO Box 16, Ibaraki 305-8687, Japan*

* *For correspondence. E-mail yukawa@kahaku.go.jp*

Received: 15 December 2009 Returned for revision: 9 April 2010 Accepted: 25 June 2010 Published electronically: 4 August 2010

• *Background and Aims* Nutritional changes associated with the evolution of achlorophyllous, mycoheterotrophic plants have not previously been inferred with robust phylogenetic hypotheses. Variations in heterotrophy in accordance with the evolution of leaflessness were examined using a chlorophyllous–achlorophyllous species pair in *Cymbidium* (Orchidaceae), within a well studied phylogenetic background.
• *Methods* To estimate the level of mycoheterotrophy in chlorophyllous and achlorophyllous *Cymbidium*, natural $^{13}C$ and $^{15}N$ contents (a proxy for the level of heterotrophy) were measured in four *Cymbidium* species and co-existing autotrophic and mycoheterotrophic plants and ectomycorrhizal fungi from two Japanese sites.
• *Key Results* $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ values of the achlorophyllous *C. macrorhizon* and *C. aberrans* indicated that they are full mycoheterotrophs. $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ values of the chlorophyllous *C. lancifolium* and *C. goeringii* were intermediate between those of reference autotrophic and mycoheterotrophic plants; thus, they probably gain 30–50 % of their carbon resources from fungi. These data suggest that some chlorophyllous *Cymbidium* exhibit partial mycoheterotrophy (= mixotrophy).
• *Conclusions* It is demonstrated for the first time that mycoheterotrophy evolved after the establishment of mixotrophy rather than through direct shifts from autotrophy to mycoheterotrophy. This may be one of the principal patterns in the evolution of mycoheterotrophy. The results also suggest that the establishment of symbiosis with ectomycorrhizal fungi in the lineage leading to mixotrophic *Cymbidium* served as pre-adaptation to the evolution of the mycoheterotrophic species. Similar processes of nutritional innovations probably occurred in several independent orchid groups, allowing niche expansion and radiation in Orchidaceae, probably the largest plant family.

**Key words:** Mycoheterotrophy, nutritional mode, evolution, *Cymbidium*, Orchidaceae, symbiosis, mycorrhizal fungi, $\delta^{15}N$, $\delta^{13}C$.

## INTRODUCTION

Unlike the autotrophic nutritional mode of chlorophyllous and leafy plants, which use atmospheric $CO_2$ as their sole carbon source, some achlorophyllous and leafless plant species obtain carbon from mycorrhizal fungi (Björkman, 1960; McKendrick *et al.*, 2000; Smith and Read, 2008). This fully heterotrophic nutrition, so-called mycoheterotrophy (MH), occurs in >400 species belonging to 87 genera in 11 families (Leake, 1994, 2005).

MH nutrition has evolved repeatedly from autotrophy (AT) in various plant lineages, but detailed evolutionary processes that lead to MH remain unclear. Recent studies demonstrated that several chlorophyllous species in Orchidaceae and Ericaceae obtain carbon not only from their photosynthetic activity, but also from mycorrhizal fungi (Gebauer and Meyer, 2003; Bidartondo *et al.*, 2004; Selosse *et al.*, 2004; Julou *et al.*, 2005; Cameron *et al.*, 2006; Tedersoo *et al.*, 2007; Zimmer *et al.*, 2007, 2008). This nutritional mode, called mixotrophy (MX), has been suggested to be a pre-adaptation in the evolution of MH nutrition (Bidartondo *et al.*, 2004; Selosse *et al.*, 2004, 2006; Abadie *et al.*, 2006). In orchids, both MX and MH species tend to associate with unusual mycorrhizal fungi: instead of the usual saprobic or parasitic *Rhizoctonia* fungi that are the almost exclusive associates of autotrophic orchids (Rasmussen, 1995), most MX and MH orchids recruit various ascomycetes and basidiomycetes, which are ectomycorrhizal fungi on surrounding tree roots (Taylor *et al.*, 2002). MX and MH species thus indirectly exploit tree photosynthates as a carbon source (McKendrick *et al.*, 2000).

Nutritional changes associated with the evolution of achlorophyllous plant species have to date been inferred from assumptions without using clades in which leaflessness appears (Bidartondo *et al.*, 2004; Tedersoo *et al.*, 2007; Roy *et al.*, 2009) or from comparisons between green plants and albino mutants that exist in some species (Julou *et al.*, 2005; Abadie *et al.*, 2006). For these reasons, it is necessary to

© The Author 2010. Published by Oxford University Press on behalf of the Annals of Botany Company. All rights reserved.
For Permissions, please email: journals.permissions@oxfordjournals.org

Downloaded from aob.oxfordjournals.org at INIST-CNRS on October 1, 2010

clarify fluctuations of heterotrophy in accordance with the evolution of leaflessness using a relationship between chlorophyllous and achlorophyllous species based on credible phylogenetic hypotheses.

*Cymbidium*, an orchid genus distributed from east and south-east Asia to Australia, comprises about 52 species (DuPuy and Cribb, 2007). This genus exhibits distinctive ecological diversification (Motomura *et al.*, 2008) and occurs in terrestrial, epiphytic and lithophytic life forms. Two species, *C. macrorhizon* and *C. aberrans*, lack foliage leaves and are thus assumed to be MH (Fig. 1).

Yukawa *et al.* (2002) analysed phylogenetic relationships among 36 *Cymbidium* spp. using nucleotide variation in the nuclear and plastid genomes and found that these achlorophyllous species are sister species, in a clade successively connecting with *Cymbidium lancifolium* and the clade including *Cymbidium goeringii* (Fig. 2). *Cymbidium lancifolium* and *C. goeringii* develop foliage leaves and appear to be capable of AT nutrition. On the other hand, the evolution of characters related to nutritional traits has been well analysed in *Cymbidium*: in an investigation of the vegetative anatomy of the genus, Yukawa and Stern (2002) found degeneration of stomata in *C. macrorhizon*, indicating a lack of $CO_2$ exchange in this species. Yokoyama *et al.* (2002) and Y. Ogura-Tsujita and T. Yukawa (unpubl. res.) found a shift of mycobionts between chlorophyllous and achlorophyllous *Cymbidium*. Chlorophyllous *C. lancifolium* and *C. goeringii* both harbour saprobic (Tulasnellaceae) and tree ectomycorrhizal (Sebacinales, Russulaceae, Thelephoraceae, etc.) fungi, whereas achlorophyllous *C. macrorhizon* and *C. aberrans* establish symbiosis exclusively with ectomycorrhizal fungi. Furthermore, Motomura *et al.* (2008) demonstrated a large diversification of photosynthetic modes in *Cymbidium*. Therefore, *Cymbidium* is an ideal model taxon to test contributions of carbon from mycorrhizal fungi, in accordance with the evolution of leaflessness and associated characters related to nutritional innovations.

MH plants are highly enriched in $^{13}C$ and $^{15}N$ relative to AT plants (Gebauer and Meyer, 2003; Trudell *et al.*, 2003). Their $^{13}C$ contents are similar to, or slightly more elevated than, those of associated mycorrhizal fungi, whereas their $^{15}N$ contents tend to be higher (Trudell *et al.*, 2003; Selosse and Roy, 2009). Fractionation against heavy isotopes occurs commonly in physical and metabolic processes, and thus analysis of the natural abundance of stable isotopes allows tracking of nutrient sources and fluxes in ecosystems (Dawson *et al.*, 2002; Post, 2002). Isotopic abundance in MH plants correlates with the use of resources derived from their mycorrhizal fungi (and ultimately from nearby AT plants). As expected, $^{13}C$ and $^{15}N$ abundances in MX orchid species range between those of AT and MH species (Gebauer and Meyer, 2003; Bidartondo *et al.*, 2004; Julou *et al.*, 2005; Roy *et al.* 2009), and are indicative of variable levels of heterotrophy from one species or one site to another.

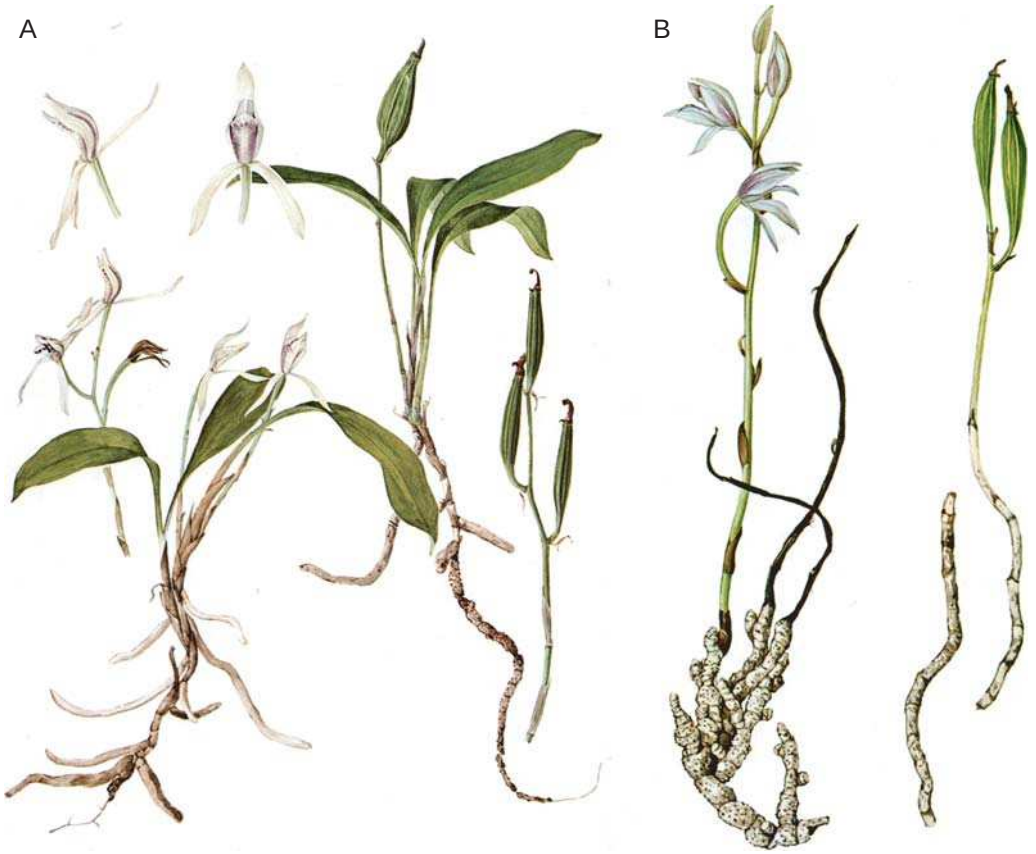



FIG. 1. *Cymbidium lancifolium*, a leafy and chlorophyllous species (A), and *C. macrorhizon*, a leafless and achlorophyllous species (B). *Cymbidium lancifolium* is the closest relative of the achlorophyllous *Cymbidium* species (see Fig. 2). Reproduced from Maekawa (1971), del. Yoai Ohta.

Downloaded from aob.oxfordjournals.org at INIST-CNRS on October 1, 2010

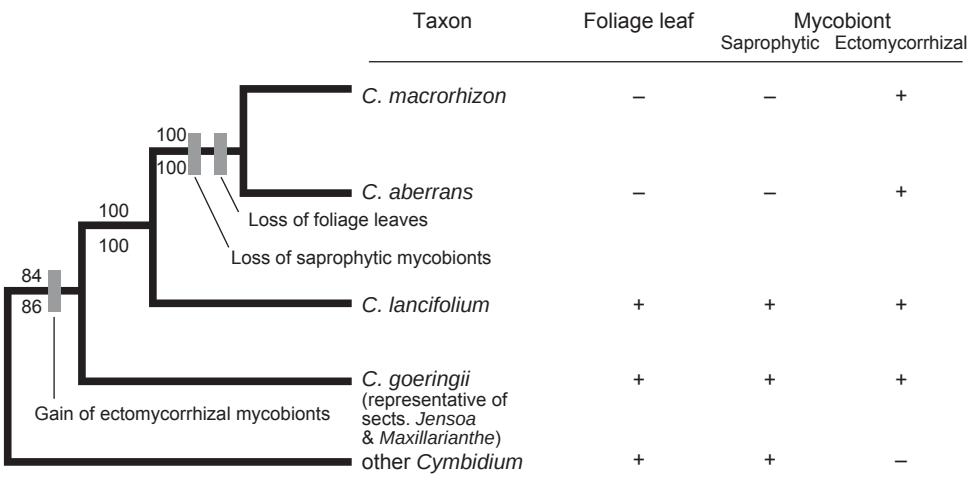



FIG. 2. Reconstruction of character evolution related to nutritional properties in *Cymbidium*. The phylogram of *Cymbidium* is summarized from the results of molecular phylogenetic analyses by Yukawa *et al.* (2002). Numbers above and below internodes indicate bootstrap values from 1000 replicates of Fitch parsimony analysis and neighbor-joining analysis, respectively.

In this study, spontaneous stable isotopic contents ($^{13}C$ and $^{15}N$) of aerial parts from the aforementioned *Cymbidium* species are used to estimate their level of heterotrophy and to draw conclusions about the evolution of MH, comparing an achlorophyllous clade with its closest chlorophyllous relatives.

## MATERIALS AND METHODS

### *Sampling*

Samples were collected in August 2006 from two forest sites in the eastern part of Honshû island, Japan: Minamibouso, Chiba (site A: 35°03′22″N, 140°01′35″E) and Mitaka, Tokyo (site B: 35°41′55″N, 139°34′22″E). At site A, the *Cymbidium* populations were growing under warm-temperate evergreen broadleaved forest in which *Castanopsis sieboldii* (Fagaceae), *Cinnamomum tenuifolium* (Lauraceae), *Lithocarpus edulis* (Fagaceae), *Neolitsea sericea* (Lauraceae) and *Machilus thunbergii* (Lauraceae) dominate. Site B harbours warm-temperate deciduous broadleaved forest in which *Aphananthe aspera* (Ulmaceae) and *Carpinus tschonoskii* (Betulaceae) dominate. The canopy begins to develop in May and leaves are shed in November.

In areas adjacent to site B, the mean annual precipitation from 1977 to 2004 was 1496 mm and mean temperature ranged from 13·9 °C to 16·7 °C. More humid conditions are observed in areas adjacent to site A where the mean annual precipitation from 1977 to 2004 was 1809 mm and mean temperature ranged from 14·4 °C to 16·6 °C (data from the Japan Meteorological Agency).

Shoots of achlorophyllous orchids (*Cyrtosia septentrionalis*, *Lecanorchis nigricans*, *Cymbidium macrorhizon* and *C. aberrans*) and achlorophyllous Ericaceae (*Monotropa uniflora*), and leaves of chlorophyllous *C. lancifolium* and *C. goeringii* (Table 1) were collected. As references, at site A, leaves of 40 non-orchid chlorophyllous species belonging to 26 plant families and four chlorophyllous orchids (*Cephalanthera erecta*, *Liparis nervosa*, *Zeuxine agyokua-na* and *Goodyera schlechtendaliana*) were collected. At site B, eight non-orchid chlorophyllous species belonging to seven plant families were collected. Fruit bodies of ectomycorrhizal fungi growing near the *Cymbidium* populations were also collected at both sites and their genera were identified using morphology and molecular identification on the basis of nucleotide sequences of internal transcribed spacer regions in ribosomal DNA as described in Selosse *et al.* (2002). The sequences obtained were deposited in GenBank (accession numbers GQ359817–GQ359821; Tables S1 and S2 available online).

Except for fungi, all samples were collected at 10–30 cm above the soil and in the same light conditions to avoid carbon isotope distortion due, respectively, to $CO_2$ resulting from soil respiration and different photosynthetic rates (slow rates enhance higher $^{13}C$ discrimination during $CO_2$ assimilation; Julou *et al.*, 2005). To ensure independence of the data, all samples were from different individuals; for each species, the number of replicates was up to six whenever possible, but in some cases the number of available individuals limited the repetition number.

### *Isotopic analysis*

Samples were dried at 60 °C for 4 d before grinding with a steel ball mill (Wig-L-Bug Model 30; International Crystal Laboratories, Garfield, NJ, USA). $^{14}N$ and $^{15}N$ contents were measured using 4 mg of each ground sample and $^{12}C$ and $^{13}C$ contents using 2 mg. Stable isotope ratios were analysed using a combined system of an elemental analyser (NC-2500; CE Instruments, Milan, Italy) and an isotope ratio mass spectrometer (MAT-252; Thermo Electron, Bremen, Germany), as described by Motomura *et al.* (2008). The isotope ratios in the delta notation in per mil units (‰) were expressed using Pee Dee belemnite and atmospheric $N_2$ as standards:

$$\delta^{15}N \text{ or } \delta^{13}C = (R_{sample}/R_{standard} - 1) \times 1000[‰] \quad (1)$$

where $R$ is the molar ratio, i.e. $^{15}N/^{14}N$ or $^{13}C/^{12}C$. The standard deviations for replicate combustions of the internal standards (DL-alanine) were 0·11 ‰ for $\delta^{15}N$ and 0·07 ‰ for $\delta^{13}C$.

Downloaded from aob.oxfordjournals.org at INIST-CNRS on October 1, 2010

TABLE 1. *Plants examined in this study; number of individuals collected at each site and trophic status are provided*

| Species | Family | Collection site A | Collection site B | Trophic status* |
|---|---|---|---|---|
| *Amphicarpaea bracteata* (L.) Fernald subsp. *edgeworthii* (Benth.) H.Ohashi | Fabaceae | 2 | – | FIX |
| *Aphananthe aspera* (Thunb.) Planch. | Ulmaceae | – | 3 | AM/ECM |
| *Arachniodes standishii* (T.Moore) Ohwi | Dryopteridaceae | 3 | – | AM/NON |
| *Ardisia crenata* Sims | Primulaceae | – | 1 | AM |
| *Ardisia japonica* (Thunb.) Blume | Primulaceae | 6 | – | AM |
| *Arisaema aequinoctiale* Nakai & F.Maek. | Araceae | 4 | – | AM |
| *Aucuba japonica* Thunb. | Cornaceae | 3 | – | AM |
| *Carex conica* Boott | Cyperaceae | 2 | – | AM/NON |
| *Carex siderosticta* Hance | Cyperaceae | 3 | – | AM/NON |
| *Carpinus tschonoskii* Maxim. | Betulaceae | – | 3 | ECM |
| *Castanea crenata* Siebold et Zucc. | Fagaceae | 1 | – | ECM |
| *Castanopsis sieboldii* (Makino) Hatus. ex T.Yamaz. & Mashiba | Fagaceae | 6 | – | ECM |
| *Cephalanthera erecta* (Thunb.) Blume | Orchidaceae | 3 | – | OM |
| *Cephalotaxus harringtonia* (Knight ex Forbes) K.Koch | Taxaceae | 2 | – | AM |
| *Chamaecyparis obtusa* (Siebold & Zucc.) Endl. | Cupressaceae | 1 | – | AM |
| *Cinnamomum tenuifolium* (Makino) Sugim. ex H.Hara | Lauraceae | 2 | – | AM |
| *Cryptomeria japonica* (L.f.) D.Don | Taxodiaceae | 1 | – | AM |
| *Cymbidium goeringii* (Rchb.f.) Rchb.f. | Orchidaceae | 6 | 1 | OM |
| *Cymbidium macrorhizon* Lindl.† | Orchidaceae | 4 | 2 | OM |
| *Cymbidium lancifolium* Hook. | Orchidaceae | 6 | – | OM |
| *Cymbidium aberrans* Finet† | Orchidaceae | – | 3 | OM |
| *Cyrtosia septentrionalis* (Rchb.f.) Garay† | Orchidaceae | 1 | – | OM |
| *Damnacanthus indicus* Gaertn.f. | Rubiaceae | 6 | – | AM |
| *Dendropanax trifidus* (Thunb.) Makino ex H.Hara | Araliaceae | 3 | – | AM/NON |
| *Desmodium laxum* DC. | Fabaceae | 1 | – | FIX |
| *Deutzia scabra* Thunb. | Hydrangeaceae | 1 | – | AM/NON |
| *Dioscorea japonica* Thunb. | Dioscoreaceae | 1 | 1 | AM/NON |
| *Dryopteris pacifica* (Nakai) Tagawa | Dryopteridaceae | 1 | – | AM/NON |
| *Elaeagnus macrophylla* Thunb. | Elaeagnaceae | 1 | – | AM |
| *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. | Rosaceae | 1 | – | AM |
| *Eurya japonica* Thunb. | Theaceae | 4 | – | AM |
| *Ficus erecta* Thunb. | Moraceae | 3 | – | AM |
| *Goodyera schlechtendaliana* Rchb.f. | Orchidaceae | 1 | – | OM |
| *Hedera rhombea* (Miq.) Bean | Araliaceae | 6 | – | AM/NON |
| *Ilex crenata* Thunb. | Aquifoliaceae | – | 1 | AM |
| *Ilex serrata* Thunb. f. *argutidens* (Miq.) Satomi | Aquifoliaceae | 3 | – | AM |
| *Lecanorchis nigricans* Honda† | Orchidaceae | 3 | – | OM |
| *Ligustrum lucidum* Aiton | Oleaceae | – | 2 | AM |
| *Lilium auratum* Lindl. | Liliaceae | 1 | – | AM |
| *Liparis nervosa* (Thunb.) Lindl. | Orchidaceae | 3 | – | OM |
| *Lithocarpus edulis* (Makino) Nakai | Fagaceae | 6 | – | ECM |
| *Machilus thunbergii* Siebold & Zucc. | Lauraceae | 2 | – | AM |
| *Monotropa uniflora* L.† | Ericaceae | 3 | – | ECM |
| *Neolitsea sericea* (Blume) Koidz. | Lauraceae | 2 | – | AM |
| *Ophiopogon japonicus* (Thunb.) Ker Gawl. | Asparagaceae | 2 | – | AM |
| *Ophiopogon japonicus* (Thunb.) Ker Gawl. var. *umbrosus* Maxim. | Asparagaceae | 3 | – | AM |
| *Oplismenus undulatifolius* (Ard.) Roem. & Schult. | Poaceae | 3 | 1 | AM |
| *Padus grayana* (Maxim.) C.K.Schneid. | Rosaceae | 1 | – | AM |
| *Piper kadsura* (Choisy) Ohwi | Piperaceae | 3 | – | AM/NON |
| *Pleioblastus chino* (Franch. & Sav.) Makino | Poaceae | 6 | 2 | AM |
| *Pteris cretica* L. | Pteridaceae | 1 | – | AM/NON |
| *Smilax china* L. | Smilacaceae | 1 | – | AM |
| *Stegnogramma pozoi* (Lag.) K.Iwats. subsp. *mollissima* (Fisch. ex Kunze) K.Iwats. | Thelypteridaceae | 3 | – | AM/NON |
| *Trachelospermum asiaticum* (Siebold & Zucc.) Nakai | Apocynaceae | 6 | – | AM/NON |
| *Wisteria floribunda* (Willd.) DC. | Fabaceae | 1 | – | FIX |
| *Zeuxine agyokuana* Fukuy. | Orchidaceae | 1 | – | OM |

* Trophic status based on general assumption: AM, arbuscular mycorrhizal plants; AM/NON: arbuscular mycorrhizal or non-mycorrhizal plants; ECM, ectomycorrhizal plants; FIX, nitrogen-fixing plants; OM, orchid mycorrhizal plants.

† Achlorophyllous species.

$^{13}C$ and $^{15}N$ values were tested for normality and for homogeneity of variances using a Shapiro–Wilk test and a Levene test, respectively.

Nutritional modes of the *Cymbidium* species were tested in comparison with other AT and MH plants using $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ values and one-way ANOVA performed for each variable and

Downloaded from aob.oxfordjournals.org at INIST-CNRS on October 1, 2010

each site, followed by pairwise *t*-tests (Bonferroni correction) to calculate pairwise comparisons between group levels at $\alpha = 0{\cdot}01$. The percentage of carbon acquired in a MH way from fungi was estimated by using a linear two-source mixing model (Phillips and Gregg, 2001; Gebauer and Meyer, 2003; Tedersoo *et al.*, 2007):

$$C = (\delta C_{MX} - \delta C_{MH})/(\delta C_R - \delta C_{MH}) \times 100[\%] \qquad (2)$$

where $\delta C_R$ and $\delta C_{MH}$ are the mean values of AT and MH references, respectively, and $\delta C_{MX}$ is the mean value of the putative MX species. All chlorophyllous plants except *Cymbidium goeringii*, *C. lancifolium* and *Cephalanthera erecta* were assumed to be AT (see below). At site A, the mean values for the chlorophyllous non-orchids and the chlorophyllous orchids were used as references for AT; since chlorophyllous orchid species were absent from site B, the mean value for all chlorophyllous non-orchids was used as the reference for AT. The relative contribution of carbon derived from fungi was estimated from mean values, with approximate standard errors and 95 % confidence intervals as used in Phillips and Gregg (2001). Statistical analyses and graphics were computed using R 2·7·1 (R Foundation, Vienna, Austria).

## RESULTS

Tables S1 and S2 (available online) show the $\delta^{15}N$ and $\delta^{13}C$ values in plants and fungi collected at sites A and B and morphological and molecular identifications of fungal samples collected at these sites that proved to belong to the ectomycorrhizal genera *Amanita*, *Boletus*, *Lactarius* and *Russula* (GenBank accession numbers GQ359817–GQ359821; Tables S1 and S2).

Figure 3 shows that high $\delta^{15}N$ and $\delta^{13}C$ values were recorded in all *Cymbidium* species (*C. macrorhizon*, *C. aberrans*, *C. lancifolium* and *C. goeringii*) at both sites and achlorophyllous plants at site A (Orchidaceae: *Cyrtosia septentrionalis* and *Lecanorchis nigricans*; Ericaceae: *Monotropa uniflora*). At site A, *C. macrorhizon* did not significantly differ from the other MH species in $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ (Fig. 4A and B). At sites A and B, *C. macrorhizon* and *C. aberrans* had higher $\delta^{15}N$ but identical $\delta^{13}C$ values compared with co-occurring ectomycorrhizal fungi (Fig. 4), including Russulaceae which are mycorrhizal with these *Cymbidium* species. At site A, *C. lancifolium* and *C. goeringii* had significantly higher $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ values than the AT plants (orchids or non-orchids; Fig. 4A and B), and the same trend was observed for *C. goeringii* at site B (Fig. 4C and D). At both sites, $\delta^{13}C$ values of the

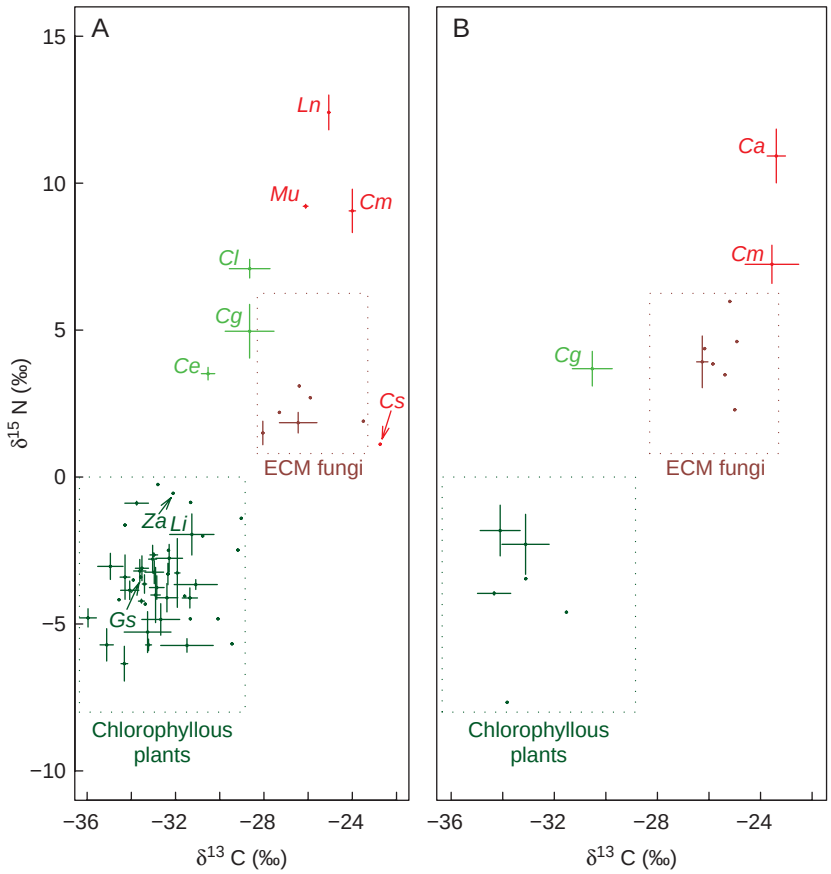



FIG. 3. $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ values in plants and ectomycorrhizal (ECM) fungi collected at site A (A) and site B (B). Bars indicate standard errors, and squares surrounded by dotted lines indicate values for chlorophyllous plants and ECM fungi (see Tables S1 and S2). Chlorophyllous plants, achlorophyllous plants, ECM fungi and green, mixotrophic plants are shown dark green, red, brown–red and light green, respectively. Abbreviations for Orchidaceae: *Ca*, *Cymbidium aberrans*; *Ce*, *Cephalanthera erecta*; *Cm*, *Cymbidium macrorhizon*; *Cl*, *Cymbidium lancifolium*; *Cs*, *Cyrtosia septentrionalis*; *Gs*, *Goodyera schlechtendaliana*; *Ln*, *Lecanorchis nigricans*; *Li*, *Liparis nervosa*; *Za*, *Zeuxine agyokuana*. Abbreviation for Ericaceae: *Mu*, *Monotropa uniflora*.

Downloaded from aob.oxfordjournals.org at INIST-CNRS on October 1, 2010

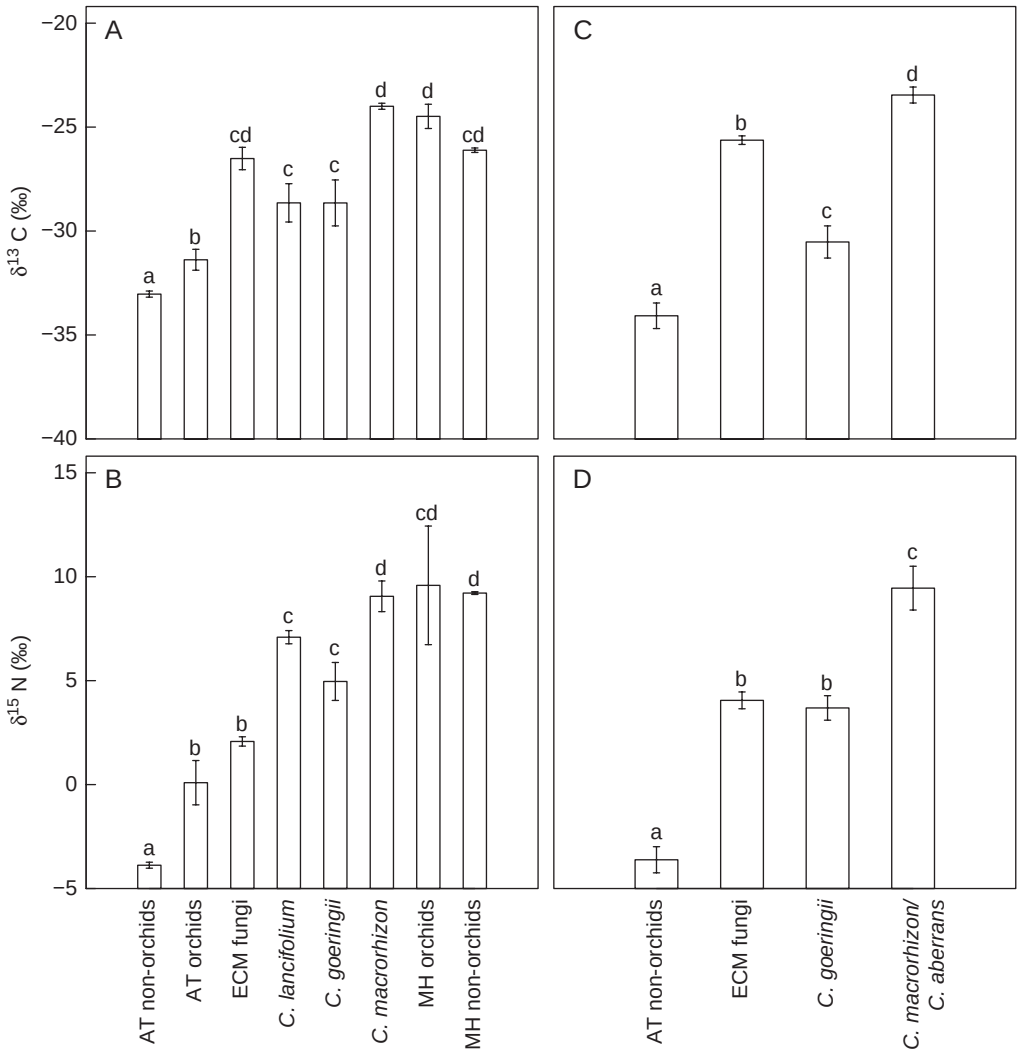



FIG. 4. $\delta^{13}$C and $\delta^{15}$N values (mean ± s.e.) of plants and ectomycorrhizal (ECM) fungi grouped in different species and/or nutritional modes at site A (A, B) and site B (C, D). Different letters denote significant differences between species and functional groups according to Bonferroni corrected pairwise *t*-tests ($P <$ 0·01). *Cymbidium goeringii* and *C. lancifolium* are chlorophyllous; *C. macrorhizon* and *C. aberrans* are achlorophyllous. Mycoheterotrophic (MH) orchids include *Cyrtosia septentrionalis* and *Lecanorchis nigricans*; and MH non-orchids are represented by *Monotropa uniflora*. For details on autotrophic (AT) non-orchids, AT orchids and ECM fungi, see Tables 1, S1 and S2.

chlorophyllous *Cymbidium* species were significantly lower than for the achlorophyllous *Cymbidium* species; similarly, $\delta^{15}$N values of the chlorophyllous *Cymbidium* species tended to be lower, although this was not significant at site A (Fig. 4). Among the remaining chlorophyllous species, *Cephalanthera erecta* at site A showed significantly higher $\delta^{15}$N and non-significantly higher $\delta^{13}$C values as compared with the other AT species ($P < 0{\cdot}0001$ and $P = 0{\cdot}014$, respectively, according to a pairwise *t*-test).

To estimate the percentage of carbon acquired heterotrophically from fungi, references for $\delta^{13}$C were determined in full MH and full AT nutrition, focusing on phylogenetically close lineages. Given the results above, *C. macrorhizon* and *C. aberrans* were hypothesized to be full MH reference. At site A, the mean values for the chlorophyllous non-orchids and the chlorophyllous orchids were used as a reference for AT; the possibly MX *Cephalanthera erecta* was omitted from baseline calculations. Since chlorophyllous orchid species were absent from site B, only the mean value for all chlorophyllous non-orchids was available as reference for AT. Table 2 showed that a significant contribution of fungal C was found in *Cymbidium lancifolium* at site A (between 41·2 % and 48·3 % in the mean value among the different references for AT) and *C. goeringii* at the two sites (between 33·4 % and 48·3 % in the mean value among the sites or the different references for AT). This result was not much changed by using non-*Cymbidium* achlorophyllous orchids as full MH reference at site A (not shown), since these orchids showed $\delta^{13}$C values similar to those of the achlorophyllous *Cymbidium*, whereas using the ericaceous *Monotropa uniflora* (which has lower $\delta^{13}$C) and all chlorophyllous plants as baselines, fungal carbon contribution reached 63 % both for *C. lancifolium* and *C. goeringii*. A two-way analysis of variance showed no effect of either the species ($P = 0{\cdot}88$) or the site for *C. goeringii* ($P = 0{\cdot}27$) on the fungal contribution. For *Cephalanthera erecta* at site A,

Downloaded from aob.oxfordjournals.org at INIST-CNRS on October 1, 2010

TABLE 2. *Net carbon gain from fungi in* Cymbidium *species and* Cephalanthera erecta *at sites A and B (mean ± s.e.), based on a linear mixing model*

| Species | Carbon gain, using all autotrophic plants as 0 % baseline† | Carbon gain, using all non-*Cymbidium* autotrophic orchids as 0 % baseline‡ |
|---|---|---|
| At site A | | |
| *Cymbidium macrorhizon* | 100 % (baseline) | 100 % (baseline) |
| *C.goeringii* | 48·3 ± 12·3 %* | 41·1 ± 14·0 %* |
| *C.lancifolium* | 48·3 ± 10·2 %* | 41·2 ± 11·7 %* |
| *Cephalanthera erecta* | 27·3 ± 3·4 % | 17·3 ± 3·8 %* |
| At site B | | |
| *C. macrorhizon* + *C. aberrans* | 100 % (baseline) | – |
| *C. goeringii* | 33·4 ± 7·3 %* | – |

* Significant difference based on 95 % confidence intervals following Phillips and Gregg (2001).

† In this calculation, the $\delta^{13}$C of autotrophic plants (0 % gain from fungi) is supposed to be the mean $\delta^{13}$C value of all chlorophyllous plants (including non-*Cymbidium* orchids, with the exception of the possible mixotrophic *Cephalanthera erecta*).

‡ In this calculation, the $\delta^{13}$C of autotrophic plants (0 % gain from fungi) is supposed to be the mean $\delta^{13}$C value of all chlorophyllous orchids (with the exception of *Cymbidium* and the possible mixotrophic *Cephalanthera erecta*).

the carbon gain from fungi was lower (17–27 %) and only significant when estimated with the chlorophyllous orchids as baseline (Table 2).

## DISCUSSION

The pattern of evolution of nutritional modes was examined in a *Cymbidium* clade comprising achlorophyllous *C. macrorhizon* and *C. aberrans* and chlorophyllous *C. lancifolium* and *C. goeringii* (Fig. 2). The following data showed that the two achlorophyllous *Cymbidium* species are MH. First, they had significantly higher $\delta^{15}$N but similar (to slightly higher) $\delta^{13}$C values compared with the co-occurring ectomycorrhizal fungi, including Russulaceae, which is mycorrhizal with these *Cymbidium* species (Yokoyama *et al.*, 2002; Y. Ogura-Tsujita and T. Yukawa, unpubl. res.). Trudell *et al.* (2003) showed the same trend in other MH plants relative to co-existing ectomycorrhizal fungi, as expected in trophic chains in which $^{15}$N contents tend to increase from one level to another (Figs 3 and 4). Secondly, *C. macrorhizon* had similar $\delta^{15}$N and $\delta^{13}$C values relative to the other MH species at site A (Figs 3 and 4). Exceptionally, *Cyrtosia septentrionalis* had conspicuously higher $\delta^{13}$C than the other MH species. The divergence is probably due to the fact that *C. septentrionalis* forms mycorrhizae with *Armillaria* (Hamada, 1939), a saprophytic fungus group living on dead or living wood. Zeller *et al.* (2007) showed that $\delta^{13}$C values of fruiting bodies of *Armillaria* are much higher than those of ectomycorrhizal fungi, such as those with which *Cymbidium* and other MH species coexist (Table S1 and Fig. 3). Thirdly, $^{13}$C enrichment in *C. macrorhizon* and *C. aberrans* in comparison with surrounding AT plants (8·9 ± 0·4 ‰ at site A and 10·6 ± 0·8 ‰ at site B) was higher than the range reported for MH plants from temperate regions (6·9 ± 1·5 ‰; Zimmer *et al.*, 2008) and for Japanese MH *Gastrodia confusa* (7·5 ± 0·8 ‰; Ogura-Tsujita *et al.*, 2009). However, $^{13}$C enrichment was in the upper range observed for Thai MH orchids (6·8–9·9 ‰; Roy *et al.*, 2009) and for the MH *Gastrodia similis*, a Mascarene MH orchid (11·8 ‰; Martos *et al.*, 2009). $\delta^{15}$N values for *C. macrorhizon* and *C. aberrans* were also above those of surrounding AT plants (12·9 ± 1·7 ‰ at site A and 13·0 ± 2·2 ‰ at site B) and were in the range reported for other MH plants from temperate regions (11·7 ± 2·3 ‰; Zimmer *et al.*, 2008). In accordance with the above-mentioned results, *C. macrorhizon* has degenerated stomata on its scale leaves, indicating a lack of gas exchange in this species (Yukawa and Stern, 2002).

Chlorophyllous *Cymbidium lancifolium* and *C. goeringii* exhibited higher $\delta^{15}$N and $\delta^{13}$C values than co-existing AT orchids and other AT plants and lower values than MH plants (Figs 3 and 4). The estimated level of MX (approx. one-third to one-half in the mean value depending on species and sites; Table 2) indicates that carbon derived from fungi is at least invested partially in aerial parts of the host plant. The values are within the wide range of previous studies (7–85 % of leaf mass depending on species and sites; Gebauer and Meyer, 2003; Bidartondo *et al.*, 2004; Julou *et al.*, 2005; Abadie *et al.*, 2006; Selosse *et al.*, 2006; Tedersoo *et al.*, 2007). The results are congruent with the life history of MX species: after germination, they exhibit an underground phase in which the rhizomes symbiotic with mycorrhizal fungi are the sole vegetative organ for several seasons (Ogura-Tsujita and Yukawa, 2008*a*, *b*). Subsequently, the leafy shoots appear above the ground, but they still maintain mycorrhizal rhizomes (T. Yukawa, unpubl. res.). A probable MX nutrition was also found for *Cephalanthera erecta*, which belongs to a genus rich in MH and MX species in Europe, Asia and America (Taylor and Bruns, 1997; Julou *et al.*, 2005; Abadie *et al.*, 2006; Roy *et al.*, 2009).

Some *Cymbidium* species operate crassulacean acid metabolism (CAM) as a photosynthetic pathway, entailing $\delta^{13}$C values typically above –20 ‰ (Motomura *et al.*, 2008), i.e. higher than expected for MX and MH species. However, partial CAM photosynthesis is excluded as an explanation for the observed $\delta^{13}$C values, because *C. lancifolium* and *C. goeringii* have negligible diurnal malate fluctuations and low enzymatic activities relative to those associated with CAM metabolism (Motomura *et al.*, 2008). Consequently, it is likely that $\delta^{13}$C values in *C. lancifolium* and *C. goeringii* are due to MX nutrition.

Downloaded from aob.oxfordjournals.org at INIST-CNRS on October 1, 2010

Orchid species ubiquitously show obligate heterotrophic associations with fungi during germination and the subsequent juvenile, underground stage (Bernard, 1899; Rasmussen, 1995; Rasmussen and Rasmussen, 2009). However, most species shift to AT with the development of photosynthetic organs, as supported by isotopic analyses (Gebauer and Meyer, 2003; Bidartondo *et al.*, 2004; Abadie *et al.*, 2006; Tedersoo *et al.*, 2007; this study). It is thus reasonable to postulate that the outgroups of the studied taxa are AT, the plesiomorphic condition in the adult stage. Therefore, the MX *Cymbidium lancifolium* and *C. goeringii* evolved from AT ancestors. Further, the phylogenetic relationships showed that MH *C. macrorhizon* and *C. aberrans* appeared within this MX clade (Fig. 2). These results indicate that MH in *Cymbidium* evolved after the establishment of MX rather than directly from it. This pattern of evolution is also likely to exist in several plant groups that include both chlorophyllous and achlorophyllous species, including *Cephalanthera* (Orchidaceae: Abadie *et al.*, 2006), the *Limodorum–Aphyllorchis* clade (Orchidaceae: Roy *et al.*, 2009), the *Corallorhiza–Oreorchis* clade (Orchidaceae: Zimmer *et al.*, 2008) and tribe Pyroleae (Ericaceae: Tedersoo *et al.*, 2007; Zimmer *et al.*, 2007). In these groups, however, evolution of MH nutrition has been inferred from assumptions without using clades in which leaflessness evolved and/or lack of data from sister groups of achlorophyllous species.

Yokoyama *et al.* (2002) and subsequent investigation by Y. Ogura-Tsujita and T. Yukawa (unpubl. res.) found major shifts of mycobionts in *Cymbidium*. The outgroup species of this study generally have only saprophytic mycobionts (mainly Tulasnellaceae, common orchid partners belonging to the *Rhizoctonia* assemblage; Rasmussen, 1995; Yukawa *et al.*, 2009). The MX species (*C. lancifolium* and *C. goeringii*) harbour both Tulasnellaceae and ectomycorrhizal fungi (Russulaceae and others). The MH species *C. macrorhizon* and *C. aberrans* associate exclusively with the ectomycorrhizal fungi. These results indicate that the nutritional shift from AT to MH through MX in *Cymbidium* may correlate with shifts in mycobionts from saprophytic to ectomycorrhizal fungi. This scenario is in line with the evolution of considerable numbers of MH species within clades of chlorophyllous MX species associated with ectomycorrhizal fungi, such as *Cephalanthera* species (Taylor and Bruns, 1997; Bidartondo *et al.*, 2004; Abadie *et al.*, 2006) and Monotropoideae (Ericaceae; Tedersoo *et al.*, 2007).

Light availability is a major limiting factor for plant distribution. The *Cymbidium* species studied here grow on floors of evergreen broadleaved forests, and *C. goeringii*, *C. macrorhizon* and *C. aberrans* are also distributed in warm-temperate deciduous broadleaved or *Pinus* forests (Maekawa, 1971; Du Puy and Cribb, 2007). Light intensities in these habitats are dark to dim in shaded sites of forests, woodland or scrub, except for during winter in deciduous broadleaved forests. MX or MH abilities of these *Cymbidium* species may have enabled them to survive low light conditions. Indeed, the light level at site A is lower than at site B, and MX *C. goeringii* tended to be more heterotrophic at site A than at site B, perhaps adapting to (or suffering from) a lower level of photosynthesis (Table 2). Gebauer (2005) reviewed the same tendencies in other MX orchids.

Adaptation to low light conditions in MX and MH species may have led to niche expansions and radiation in Orchidaceae. As mentioned above, orchid species ubiquitously show obligate MH nutrition during the juvenile stage. Among the seeds dispersed at shady sites, seedlings that extend MH in later stages of growth and operate more efficient nutritional interactions with fungal partners are expected to survive and adapt better to such environments. This process may select for MX and MH species in many independent orchid lineages. The MX and MH species pairs in *Cymbidium* provide an excellent model for future studies on the adaptive mechanism of plants on the forest floor.

In this study, it is demonstrated for the first time that MH plants evolved after the establishment of MX nutrition rather than directly from AT ancestors, suggesting that this course would be one of the principal patterns in the evolution of MH species. Further, the results confirm that the establishment of symbiosis with ectomycorrhizal fungi in the lineage leading to MX *Cymbidium* is a pre-adaptation to the evolution of the species. In addition, the MX and MH species are well-adapted to environments with low light conditions. Similar processes of nutritional innovations probably occurred in several independent orchid groups and may have contributed to niche expansions and radiation in Orchidaceae, probably the largest plant family (approx. 25000 species; Dressler, 2005).

## SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data are available online at www.aob.oxfordjournals.org. and consist of the following tables. Table S1: $\delta^{15}$N and $\delta^{13}$C of fungi and plants growing at site A. Table S2: $\delta^{15}$N and $\delta^{13}$C of fungi and plants growing at site B.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank K. Ohnuki, K. Suzuki and Y. Ogura-Tsujita for their help in sampling, T. Pailler for helpful discussions and D. Marsh for language corrections. This study was partly supported by a Grant-in-Aid to Scientific Research from the Japan Society for Promotion of Science (no. 21370038) to T.Y., and by the Société Française d'Orchidophilie, the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the Région Réunion to M.-A.S. and F.M.

## LITERATURE CITED

**Abadie JC, Puttsepp U, Gebauer G, Faccio A, Bonfante P, Selosse MA. 2006.** *Cephalanthera longifolia* (Neottieae, Orchidaceae) is mixotrophic: a comparative study between green and non-photosynthetic individuals. *Canadian Journal of Botany* **84**: 1462–1477.

**Bernard N. 1899.** Sur la germination du *Neottia nidus-avis*. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences Paris* **128**: 1253–1255.

**Bidartondo MI, Burghardt B, Gebauer G, Bruns TD, Read DJ. 2004.** Changing partners in the dark: isotopic and molecular evidence of ectomycorrhizal liaisons between forest orchids and trees. *Proceedings of the Royal Society London Series B* **271**: 1799–1806.

**Björkman E. 1960.** *Monotropa hypopithys* L. – an epiparasite on tree roots. *Physiologia Plantarum* **13**: 308–327.

**Cameron DD, Leake JR, Read DJ. 2006.** Mutualistic mycorrhiza in orchids: evidence from the plant-fungus carbon and nitrogen transfers in the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. *New Phytologist* **171**: 405–416.

Downloaded from aob.oxfordjournals.org at INIST-CNRS on October 1, 2010

**Dawson TE, Mambelli S, Plamboeck AH, Templer PH, Tu KP. 2002.** Stable isotopes in plant ecology. *Annual Review of Ecology and Systematics* **33**: 507–559.

**Dressler RL. 2005.** How many orchid species? *Selbyana* **26**: 155–158.

**Du Puy D, Cribb P. 2007.** *The genus* Cymbidium. Richmond, UK: Kew Publishing.

**Gebauer G. 2005.** Partnertausch im dunklen Wald – stabile Isotope geben neue Einblicke in das Ernährungsverhalten von Orchideen. In: Bayerische Akademie der Wissenschaften. *Rundgespräche der Kommission für Ökologie*, Vol. 30. München, Germany: Verlag Dr. Friedrich Pfeil.

**Gebauer G, Meyer M. 2003.** $^{15}$N and $^{13}$C natural abundance of autotrophic and mycoheterotrophic orchids provides insight into nitrogen and carbon gain from fungal association. *New Phytologist* **160**: 209–223.

**Hamada M. 1939.** Studien über die Mykorrhiza von *Galeola septentrionalis* Reichb. F. – ein neuer Fall der Mykorrhiza-Bildung durch intraradicale Rhizomorpha. *Japanese Journal of Botany* **10**: 151–211.

**Julou T, Burghardt B, Gebauer G, Berveiller D, Damesin C, Selosse M-A. 2005.** Mixotrophy in orchids: insights from a comparative study of green individuals and nonphotosynthetic individuals of *Cephalanthera damasonium. New Phytologist* **166**: 639–653.

**Leake JR. 1994.** The biology of myco-heterotrophic 'saprophytic' plants. *New Phytologist* **127**: 171–216.

**Leake JR. 2005.** Plants parasitic on fungi: unearthing the fungi in myco-heterotrophs and debunking the 'saprophytic' plant myth. *Mycologist* **19**: 113–122.

**McKendrick SL, Leake JR, Read DJ. 2000.** Symbiotic germination and development of myco-heterotrophic plants in nature: transfer of carbon from ectomycorrhizal *Salix repens* and *Betula pendula* to the orchid *Corallorhiza trifida* through shared hyphal connections. *New Phytologist* **145**: 539–548.

**Maekawa F. 1971.** *The wild orchids of Japan in colour.* Tokyo, Japan: Seibundoshinkousha [in Japanese].

**Martos F, Dulormne M, Pailler T *et al*. 2009.** Independent recruitment of saprotrophic fungi as mycorrhizal partners by tropical achlorophyllous orchids. *New Phytologist* **184**: 668–681.

**Motomura H, Yukawa Y, Ueno O, Kagawa A. 2008.** The occurrence of crassulacean acid metabolism in *Cymbidium* (Orchidaceae) and its ecological and evolutionary implications. *Journal of Plant Research* **121**: 163–177.

**Ogura-Tsujita Y, Yukawa T. 2008*a*.** High mycorrhizal specificity in a widespread mycoheterotrophic plant, *Eulophia zollingeri* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* **95**: 93–97.

**Ogura-Tsujita Y, Yukawa T. 2008*b*.** *In situ* seed sowing techniques for the recovery of endangered orchids. *Japanese Journal of Conservation Ecology* **13**: 121–127 [in Japanese].

**Ogura-Tsujita Y, Gebauer G, Hashimoto T, Umata H, Yukawa T. 2009.** Evidence for novel and specialized mycorrhizal parasitism: the orchid *Gastrodia confusa* gains carbon from saprotrophic *Mycena. Proceedings of the Royal Society London Series B* **276**: 761–767.

**Phillips DL, Gregg JW. 2001.** Uncertainly in source partitioning using stable isotopes. *Oecologia* **127**: 171–179.

**Post DM. 2002.** Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods, and assumptions. *Ecology* **83**: 703–718.

**Rasmussen HN. 1995.** *Terrestrial orchids – from seed to mycotrophic plants.* Cambridge: Cambridge University Press.

**Rasmussen HN, Rasmussen FN. 2009.** Orchid mycorrhiza: implications of a mycophagous life style. *Oikos* **118**: 334–345.

**Roy M, Watthana S, Stier A, Richard F, Vessabutr S, Selosse M-A. 2009.** Two mycoheterotrophic orchids from Thailand tropical dipterocarpacean forests associate with a broad diversity of ectomycorrhizal fungi. *BMC Biology* **7**: 51.

**Selosse M-A, Roy M. 2009.** Green plants that feed on fungi: facts and question about mixotrophy. *Trends in Plant Science* **14**: 64–70.

**Selosse M-A, Weiss M, Jany JL, Tillier A. 2002.** Communities and populations of sebacinoid basidiomycetes associated with the achlorophyllous orchid *Neottia nidus-avis* (L.) LCM Rich. and neighbouring tree ectomycorrhizae. *Molecular Ecology* **11**: 1831–1844.

**Selosse M-A, Faccio A, Scappaticci G, Bonfante P. 2004.** Chlorophyllous and achlorophyllous specimens of *Epipactis microphylla* (Neottieae, Orchidaceae) are associated with ectomycorrhizal septomycetes, including truffles. *Microbial Ecology* **47**: 416–426.

**Selosse M-A, Richard F, Xinhua H, Simard SW. 2006.** Mycorrhizal networks: des liaisons dangereuses? *Trends in Ecology and Evolution* **21**: 621–628.

**Smith SE, Read DJ. 2008.** *Mycorrhizal symbiosis*, 3rd edn. San Diego, CA: Academic Press.

**Taylor DL, Bruns TD. 1997.** Independent, specialized invasions of ectomycorrhizal mutualism by two nonphotosynthetic orchids. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* **94**: 4510–4515.

**Taylor DL, Bruns TD, Leake JR, Read D. 2002.** Mycorrhizal specificity and function in myco-heterotrophic plants. In: Van der Heijden MGA, Sanders I. eds. *Mycorrhizal ecology.* Berlin, Germany: Springer-Verlag, 375–413.

**Tedersoo L, Pellet P, Koljalg U, Selosse MA. 2007.** Parallel evolutionary paths to mycoheterotrophy in understorey Ericaceae and Orchidaceae: ecological evidence for mixotrophy in Pyroleae. *Oecologia* **151**: 206–217.

**Trudell SA, Rygiewicz PT, Edmonds RL. 2003.** Nitrogen and carbon stable isotope abundances support the myco-heterotrophic nature and host-specificity of certain achlorophyllous plants. *New Phytologist* **160**: 391–401.

**Yokoyama J, Fukuda T, Miyoshi K, Yukawa T. 2002.** Remarkable habitat differentiation and character evolution in *Cymbidium* (Orchidaceae). 3. Molecular identification of endomycorrhizal fungi inhabiting in *Cymbidium. Journal of Plant Research* (Suppl.) **115**: 42.

**Yukawa T, Stern WL. 2002.** Comparative vegetative anatomy and systematics of *Cymbidium* (Cymbidieae: Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **138**: 383–419.

**Yukawa T, Miyoshi K, Yokoyama J. 2002.** Molecular phylogeny and character evolution of *Cymbidium* (Orchidaceae). *Bulletin of the National Science Museum, Series B (Botany)* **28**: 129–139.

**Yukawa T, Ogura-Tsujita Y, Shefferson RP, Yokoyama J. 2009.** Mycorrhizal diversity in *Apostasia* (Orchidaceae) indicates the origin and evolution of the orchid mycorrhiza. *American Journal of Botany* **96**: 1997–2009.

**Zeller B, Brechet C, Maurice JP, Le Tacon F. 2007.** $^{13}$C and $^{15}$N isotopic fractionation in trees, soils and fungi in a natural forest stand and a Norway spruce plantation. *Annals of Science* **64**: 419–429.

**Zimmer K, Hynson NA, Gebauer G, Allen EB, Allen MF, Read DJ. 2007.** Wide geographical and ecological distribution of nitrogen and carbon gains from fungi in pyroloids and monotropoids (Ericaceae) and in orchids. *New Phytologist* **175**: 166–175.

**Zimmer K, Meyer C, Gebauer G. 2008.** The ectomycorrhizal specialist orchid *Corallorhiza trifida* is a partial myco-heterotroph. *New Phytologist* **178**: 395–400.

Downloaded from aob.oxfordjournals.org at INIST-CNRS on October 1, 2010

# SUPPLEMENTARY DATA

TABLE S1. $\delta^{15}N$ and $\delta^{13}C$ of fungi and plants growing at site A.

| | | $\delta^{15}N$ (‰) | | $\delta^{13}C$ (‰) | |
|---|---|---|---|---|---|
| Species | n | mean | s.e. | mean | s.e. |
| Plants | | | | | |
| Amphicarpaea bracteata subsp. edgeworthii | 2 | –0.89 | ± 0.07 | –33.76 | ± 0.54 |
| Arachniodes standishii | 3 | –3.66 | ± 0.17 | –31.09 | ± 0.98 |
| Ardisia japonica | 6 | –5.71 | ± 0.2 | –33.22 | ± 0.14 |
| Arisaema aequinoctiale | 4 | –4.79 | ± 0.31 | –35.96 | ± 0.38 |
| Aucuba japonica | 3 | –4.12 | ± 0.34 | –31.35 | ± 0.35 |
| Carex conica | 2 | –3.3 | ± 0.37 | –32.35 | ± 0.02 |
| Carex siderosticta | 3 | –4.22 | ± 0.07 | –33.54 | ± 0.14 |
| Carpinus tschonoskii | 3 | –3.04 | ± 0.44 | –34.95 | ± 0.57 |
| Castanea crenata | 1 | –1.41 | | –29.03 | |
| Castanopsis sieboldii | 6 | –2.77 | ± 0.47 | –32.29 | ± 0.61 |
| Cephalanthera erecta | 3 | 3.52 | ± 0.21 | –30.53 | ± 0.3 |
| Cephalotaxus harringtonia | 2 | –3.64 | ± 0.32 | –33.41 | ± 0.1 |
| Chamaecyparis obtusa | 1 | –5.68 | | –29.45 | |
| Cinnamomum tenuifolium | 2 | –5.28 | ± 0.7 | –33.27 | ± 1.06 |
| Cryptomeria japonica | 1 | –2.01 | | –30.78 | |
| Cymbidium goeringii | 6 | 4.96 | ± 0.91 | –28.65 | ± 1.11 |
| Cymbidium lancifolium | 8 | 7.09 | ± 0.32 | –28.65 | ± 0.92 |
| Cymbidium macrorhizon | 4 | 9.06 | ± 0.74 | –24 | ± 0.15 |
| Cyrtosia septentrionalis | 1 | 1.12 | | –22.74 | |
| Damnacanthus indicus | 6 | –3.1 | ± 0.42 | –33.52 | ± 0.3 |
| Dendropanax trifidus | 3 | –5.73 | ± 0.23 | –31.48 | ± 1.19 |
| Desmodium laxum | 1 | –1.63 | | –34.29 | |
| Deutzia scabra | 1 | –3.5 | | –33.91 | |
| Dioscorea japonica | 1 | –4.32 | | –33.37 | |
| Dryopteris pacifica | 1 | –4.82 | | –30.08 | |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Elaeagnus macrophylla | 1 | –0.86 | | –31.32 | |
| Eriobotrya japonica | 1 | –4.82 | | –31.33 | |
| Eurya japonica | 4 | –2.79 | ± 0.47 | –33.04 | ± 0.18 |
| Ficus erecta | 3 | –3.41 | ± 0.76 | –34.29 | ± 0.22 |
| Goodyera schlechtendaliana | 1 | –3.4 | | –33.58 | |
| Hedera rhombea | 6 | –6.35 | ± 0.59 | –34.32 | ± 0.15 |
| Ilex serrata f. argutidens | 3 | –3.26 | ± 1.17 | –31.92 | ± 0.12 |
| Lecanorchis nigricans | 3 | 12.41 | ± 0.59 | –25.07 | ± 0.06 |
| Lilium auratum | 1 | –2.49 | | –32.32 | |
| Liparis nervosa | 3 | –1.95 | ± 0.7 | –31.26 | ± 1 |
| Lithocarpus edulis | 6 | –3.24 | ± 0.39 | –32.96 | ± 0.42 |
| Machilus thunbergii | 2 | –2.65 | ± 0.08 | –32.98 | ± 0.18 |
| Monotropa uniflora | 3 | 9.21 | ± 0.07 | –26.11 | ± 0.11 |
| Neolitsea sericea | 2 | –4.01 | ± 0.94 | –32.9 | ± 0.22 |
| Ophiopogon japonicus | 5 | –4.11 | ± 0.48 | –32.39 | ± 0.49 |
| Oplismenus undulatifolius | 3 | –5.71 | ± 0.55 | –35.12 | ± 0.3 |
| Padus grayana | 1 | –4.05 | | –31.59 | |
| Piper kadsura | 3 | –3.85 | ± 0.32 | –34.41 | ± 0.25 |
| Pleioblastus chino | 6 | –3.2 | ± 0.39 | –33.62 | ± 0.28 |
| Pteris cretica | 1 | –4.17 | | –34.56 | |
| Smilax china | 1 | –0.25 | | –32.8 | |
| Stegnogramma pozoi subsp. mollissima | 3 | –3.76 | ± 0.4 | –32.85 | ± 0.33 |
| Trachelospermum asiaticum | 6 | –4.85 | ± 0.54 | –32.67 | ± 0.86 |
| Wisteria floribunda | 1 | –2.48 | | –29.18 | |
| Zeuxine agyokuana | 1 | –0.55 | | –32.11 | |
| Fungi | | | | | |
| Amanita #1 | 1 | 3.1 | | –26.4 | |
| Lactarius #1 | 2 | 1.85 | ± 0.35 | –26.45 | ± 0.85 |
| Russula #1 | 1 | 2.2 | | –27.3 | |
| Russula #2 | 1 | 2.7 | | –25.9 | |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Russula #3 * | 2 | 1.5 | ± 0.4 | –28 | ± 0.05 |
| Unknown sp. #1 | 1 | 1.9 | | –23.5 | |

* Genbank accession number for ITS sequence: GQ359817.

# SUPPLEMENTARY DATA

TABLE S2. $\delta^{15}N$ and $\delta^{13}C$ of fungi and plants growing at site B.

| | | $\delta^{15}N$ (‰) | | $\delta^{13}C$ (‰) | |
|---|---|---|---|---|---|
| Species | n | mean | s.e. | mean | s.e. |
| Plants | | | | | |
| Aphananthe aspera | 3 | –1.82 | ± 0.86 | –34.1 | ± 0.78 |
| Ardisia crenata | 1 | –3.46 | | –33.11 | |
| Cymbidium goeringii | 3 | 3.69 | ± 0.59 | –30.53 | ± 0.77 |
| Cymbidium macrorhizon | 2 | 7.24 | ± 0.65 | –23.56 | ± 1.04 |
| Cymbidium aberrans | 3 | 10.92 | ± 0.92 | –23.39 | ± 0.36 |
| Dioscorea japonica | 1 | –7.67 | | –33.83 | |
| Ilex crenata | 1 | –4.6 | | –31.53 | |
| Ligustrum lucidum | 2 | –3.96 | ± 0.06 | –34.33 | ± 0.65 |
| Oplismenus undulatifolius | 1 | –6.1 | | –39.18 | |
| Pleioblastus chino | 2 | –2.29 | ± 1.02 | –33.11 | ± 0.92 |
| Fungi | | | | | |
| Amanita #2 | 1 | 4.61 | | –24.92 | |
| Amanita #3 | 1 | 3.48 | | –25.38 | |
| Boletus #1 | 1 | 3.85 | | –25.85 | |
| Russula #4 * | 1 | 5.97 | | –25.19 | |
| Russula #5 ** | 1 | 2.29 | | –25 | |
| Russula #6 *** | 2 | 3.92 | ± 0.88 | –26.26 | ± 0.22 |
| Russula #7 **** | 1 | 4.37 | | –26.17 | |

* Genbank accession number for ITS sequence: GQ359818.
** Genbank accession number for ITS sequence: GQ359819.
*** Genbank accession number for ITS sequence: GQ359820.
**** Genbank accession number for ITS sequence: GQ359821.

# Chapitre 6

# Article 4. *Sebacinales Everywhere : Previously Overlooked Ubiquitous Fungal Endophytes of Plants*

**Résumé** Les champignons Basidiomycètes appartenant à l'ordre des Sebacinales montrent de plus en plus d'implication dans les différents types de symbioses mycorhiziennes des plantes, et vivent en endophytes dans une grande variété de plantes (comme *Piriformospora indica*). Or, comment les Sebacinales se répartissent-ils dans les différentes symbioses mycorhiziennes et dans les différentes plantes hôtes ?
Nous avons examiné cette question en reconstruisant la phylogénie moléculaire des Sebacinales à l'échelle des souches identifiées mondialement. L'analyse phylogénétique qui a été réalisée par M. Weiss a inclus une partie des séquences de Sebacinales identifiées dans les orchidées autotrophes de La Réunion. J'ai participé à la rédaction de cet article avec M. Weiss.
Cette étude confirme que les Sebacinales ont deux clades majeurs de champignons dont l'un est impliqué dans des symbioses ectomycorhiziennes (Groupe A) et l'autre dans des symbioses endomycorhiziennes avec des orchidées et des éricacées (Groupe B). Aucun patron géographique n'a été détecté, ce qui suggère que les Sebacinales ont une grande capacité de dispersion à l'échelle mondiale. Le groupe B est ubiquiste vis-à-vis des différentes symbioses formées avec les orchidées et les éricacées. De façon générale, les Sebacinales ont un large spectre de plantes hôtes qui ne sont pas strucurées dans la phylogénie. Notre étude suggère aussi que les deux clades majeurs des Sebacinales auraient dérivé chacun d'un état endophyte : la transition évolutive de l'état endophyte vers l'état mycorhizien a été observée pour la première fois.

**Accepté dans *PLoS ONE.***

Nota Bene : la figure S2 ne tient pas sur une page A4, et est visible sur la version électronique du manuscrit.

# Sebacinales Everywhere: Previously Overlooked Ubiquitous Fungal Endophytes of Plants

Michael Weiß[a], Zuzana Sýkorová[b,1], Sigisfredo Garnica[a], Kai Riess[a], Florent Martos[c], Cornelia Krause[a,2], Franz Oberwinkler[a], Robert Bauer[a], and Dirk Redecker[b,3]

**Running title:** Sebacinales everywhere

*[a]Universität Tübingen, Institut für Evolution und Ökologie, Organismische Botanik, Auf der Morgenstelle 1, D-72076 Tübingen, Germany. [b]Universität Basel, Botanisches Institut, Hebelstrasse 1, CH-4056 Basel, Switzerland. [c]Université de La Réunion, UMR C53 Peuplements végétaux et bioagresseurs en milieu tropical, 15 Avenue René Cassin, BP 7151, F-97715, Saint-Denis cedex 9, France*

Current addresses:

*[1]Department of Mycorrhizal Symbioses, Institute of Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic, Lesní 322, 25243 Pruhonice, Czech Republic. [2]Universität Tübingen, Zentrum für Molekularbiologie der Pflanzen, Auf der Morgenstelle 3, 72076 Tübingen, Germany. [3]UMR Microbiologie du Sol et de l'Environnement, INRA/Université de Bourgogne, BP 86510, 17 rue Sully, 21065 Dijon cedex, France*

**Corresponding author:**

Michael Weiß, Universität Tübingen, Institut für Evolution und Ökologie, Organismische Botanik, Auf der Morgenstelle 1, D-72076 Tübingen, Germany.

Telephone: +49 7071 29-78809; Fax: +49 7071 29-5344

michael.weiss@uni-tuebingen.de

Manuscript in review

## Abstract

Inconspicuous basidiomycetes from the order Sebacinales are known to be involved in a puzzling variety of mutualistic plant-fungal symbioses (mycorrhizae), which presumably involve transport of mineral nutrients. Recently a few members of this fungal order not fitting this definition and commonly referred to as Ôendophytes Õhave raised considerable interest by their ability to enhance plant growth and to increase resistance of their host plants against abiotic stress factors and fungal pathogens. Using DNA-based detection and electron microscopy, we show that Sebacinales are not only extremely versatile in their mycorrhizal associations, but are also almost universally present as symptomless endophytes. They occurred in field specimens of bryophytes, pteridophytes and all families of herbaceous angiosperms we investigated, including liverworts, wheat, maize, and the non-mycorrhizal model plant *Arabidopsis thaliana*. They were present in all habitats we studied on four continents. We even detected these fungi in herbarium specimens originating from pioneering field trips to North Africa in the 1830s/40s. No geographical or host patterns were detected, suggesting broad host range and efficient dispersal. Our data suggest that the multitude of mycorrhizal interactions in Sebacinales may have arisen from an ancestral endophytic habit by specialization, a unique mode of evolution that has not been demonstrated for other mycorrhizal fungi. Considering their proven beneficial influence on plant growth and their ubiquity, endophytic Sebacinales may be a previously unrecognized universal hidden force in plant ecosystems.

## Introduction

Mutualistic interactions between fungi and plant roots have been a fundamental prerequisite for evolution and biodiversity of land plants. More than 80% of known species of land plants are associated with mutualistic fungi in their roots, facilitating mineral nutrient uptake of the plants.

These associations are known as mycorrhizae. There is an amazing morphological and physiological diversity among numerous different types of these plant-fungal interactions. No other fungal group shows a diversity of mycorrhizal types comparable to that found in the Sebacinales, a basidiomycetous order described only recently [1-8]. DNA sequence analyses have demonstrated a high phylogenetic diversity in this group [1,6], which is divided into two distinct subgroups, informally designated group A and group B [1]. Though it is known from molecular phylogenetic analyses that Sebacinales belong to the mushroom-forming basidiomycetes (Agaricomycotina) [9], only a few sebacinalean morphospecies producing basidiomes have been described, all of them belonging to group A. Morphological data on group B Sebacinales is very sparse.

Endophytes, as opposed to mycorrhizal or endoparasitic fungi, are commonly defined as fungi colonizing tissues of living plants without formation of detectable interaction structures and without causing disease symptoms on the hosts [10]. Endophytes were shown to occur in all organs of plants [11]. Classic examples are some ascomycetes in grasses which might have gone unnoticed if they did not produce alkaloids having a strong deleterious effect on cattle feeding on the respective grasses [12]. In practice, the separation of mycorrhizal, pathogenic and endophytic habits often seems to be problematic and a better understanding of symbiont interactions is required to refine these definitions. The recent discovery of the beneficial effects of ascomycetous fungal endophytes of the genus *Curvularia* on host plants in geothermal environments [13] has raised considerable interest for endophytes and the mechanisms of their interaction.

Some Sebacinales strains commonly considered as endophytes, particularly the *Piriformospora indica* model strain belonging to group B, have recently been studied intensively, because they significantly enhance plant growth and seed yield, and induce systemic resistance of

their host plants against abiotic stress and fungal pathogens [14-17]. Experimental studies suggest that programmed death (apoptosis) of cortical cells, which are subsequently densely colonized by *Piriformospora* hyphae, plays an important role in this endophytic interaction [14,18]. Generally, since some Sebacinales can easily be maintained and propagated without their plant hosts, these strains may be ideal models for the study of beneficial fungus-plant interactions and have a promising perspective for application in sustainable horticulture and agriculture [14,16,17,19,20].

Sequences of Sebacinales have been sporadically detected by PCR/cloning approaches from herbaceous plants and soil [17,21]. Sebacinalean fungi other than the strains used in experimental studies were recently detected in a preliminary study based on a few environmental plant samples [22]; these authors raised the question whether Sebacinales may occur as endophytes in the field more frequently than previously thought. Here we address this question and show that these fungi are indeed found as endophytes within plants and that they are ubiquitous.

## Results and Discussion

We analyzed 128 root samples from phylogenetically and ecologically diverse plants from 27 families from four continents and studied the phylogenetic distribution of their sebacinalean endophytes. We used diagnostic group-specific PCR primers for nuclear-encoded rDNA regions designed for this study to detect members of Sebacinales groups A and B and molecular phylogenetics to assess their evolutionary relationships. In addition, we analyzed selected specimens by transmission electron microscopy for the presence of fungal hyphae in the roots with septal pore structures typical for the Sebacinales. This combination of methods is crucial; diagnostic PCR and sequencing alone cannot definitely exclude sebacinalean soil fungi only present on the root surface, and ultrastructural analysis alone cannot discriminate Sebacinales

from certain other groups of Agaricomycotina that exhibit a similar septal pore structure. We classify sebacinalean sequences from plants known to be non-mycorrhizal or hosts of arbuscular mycorrhiza, which is known to exclusively involve fungi from the phylum Glomeromycota, as endophytic (Fig. 1).

Molecular analysis yielded 135 sebacinalean nuclear LSU sequences from 128 root samples. We found sebacinalean endophytes in all examined plant families, which span a broad phylogenetic range, from liverworts to Asteraceae (Table S1). Our PCR approach, which allows to contiguously amplify and analyze two key rDNA regions (ITS + 5.8S and the D1-D3 regions of the nuc LSU) presently used for molecular identification and phylogenetic reconstruction employed in the fungi proved to be efficient and specific. We even succeeded to amplify Sebacinales sequences from herbarium specimens collected in the 1830-1840s by G.W. Schimper and T. Kotschy on their pioneering botanical excursions to North Africa (FJ556825-30, FJ556857; Fig. S2: 15a,b; 16-20), and were able to sequence the type material of *Sebacina vermifera* from the 1960s (Fig. S2: 21). DNA sequences obtained with our new method can be analyzed both in the context of fungal barcoding (using the ITS portion) and for constructing phylogenetic trees that span both Sebacinales group A and group B or even Fungi as a whole (using the LSU portion). Such data is therefore particularly applicable for analyses of Sebacinales communities using recently developed methods that combine phylogenetic and ecological approaches [23,24].

Evidence that Sebacinales were in fact present within the plant roots and not just in the rhizosphere was obtained by electron microscopy (Fig. 2). We found that fungal hyphae colonized few dead cortical cells of their hosts' fine roots, nearly completely filling the host cells. This is well compatible with results obtained from *in vitro* experiments with *P. indica* and the

model plants barley and *Arabidopsis* [14,18]. The colonizing hyphae had the septal pore structure typical for the Sebacinales (Fig. 2).

An overview of the phylogenetic tree of all Sebacinales nuc LSU sequences currently available in GenBank together with our new endophytic sequences is shown in Fig. 1 (full tree see Fig. S2). The endophyte sequences were placed in both Sebacinales subgroups A and B, however they were not evenly distributed across these two groups, as most endophytic sequences were placed in group B (Fig. 1). Within group B some clades were dominated by endophyte sequences (Fig. 1: e.g., 3, 5); on the other hand, there are other clades that at this time nearly completely lack known endophytic sequences (Fig. 1: 1). The most basal clades in groups A and B (Fig. 1: 8-10, 12-14) were endophytic; we therefore hypothesize that the endophytic habit may be ancestral in the Sebacinales and the starting point for the development towards specialized mycorrhizal symbioses. However, the close relationship of endophytes, in particular with orchid mycorrhizal strains, could also be indicative of the capability of Sebacinales strains to switch between symbioses, or to fall back on the endophytic habit if no appropriate mycorrhizal partner is present.

Our analyses demonstrate that Sebacinales with closely related or even identical LSU sequences can be found in geographically distant areas (Fig. 1: 7, 11; Fig. S2: 22). The absence of any obvious geographical patterns suggests efficient dispersal. Diverse sequences could be found in the same field site, even in the root system of the same plant host specimen (Fig. S2: 23a-d; 15a,b; 24-26a-b). Host specificity seems to be low as identical sequences were often found across different hosts (Fig. S2: 7, 11). According to present knowledge, sebacinalean fungi involved in ectomycorrhiza (ECM), ectendomycorrhiza (arbutoid mycorrhiza; EEM), and mycorrhizas with heterotrophic or mixotrophic orchids (ORM) have only been found in group A, while ericoid (ERM) and cavendishioid (CAV) mycorrhizas are only known from group B [1,6].

This is confirmed by the present study. Since links between ORM and ECM as well as between EEM and ECM via the same fungus seem to be common [4,6], it has been hypothesized that all group A Sebacinales are ectomycorrhizal. It was thus surprising to detect endophytic group A Sebacinales (Fig. S2: 12, 27) in meadows where known ECM hosts were missing. Thus, ectomycorrhizal activity is probably not an obligate feature for group A Sebacinales.

In addition to linking ECM to ORM and to EEM, it is likely that Sebacinales are able to connect other mycorrhizal types. We detected the same nuclear LSU sequence in roots of *Sherardia* (Rubiaceae) from Italy and in an Australian orchid (Fig. S2: 6). Other identical sequences were found in an ericad (*Vaccinium*) and a liverwort (*Riccardia*; Fig. S2: 28) or in another ericad (*Cavendishia*), *Melittis* (Lamiaceae) and *Calamagrostis* (Poaceae; Fig. S2: 29). Considering also the numerous cases in which the same nuclear LSU sequence of sebacinalean endophytes was detected in distinct plant species (e.g., Fig. 1: 7, 11), we hypothesize that Sebacinales play a crucial role in connecting individual plants in terrestrial ecosystems across mycorrhizal types. However, nutrient transfer studies are necessary to elucidate this issue.

On the basis of our molecular phylogenetic analysis we can link some of the endophyte sequences to morphospecies (Fig. 1: 6, 13). However, *S. vermifera* strains mostly originating from roots of Australian terrestrial orchids [25] are scattered all over group B, demonstrating the limited usefulness of morphospecies in this context. In fact, from the high genetic distances between specimens that have all been assigned to *S. vermifera* we conclude that much of the huge biodiversity in Sebacinales group B is covered by cryptic species that lack macroscopic fruiting bodies.

Most experimental studies in the Sebacinales have been conducted using the asexual model strain *Piriformospora indica*, which was originally isolated from soil of the Indian Thar desert

[26]. Our study reveals that *P. indica* belongs to a well-supported group of closely related endophytic species, in our study represented by sequences from Western European and Namibian Fabaceae, Poaceae, or Araceae (Fig. 1: 2). In view of the biodiversity of endophytic Sebacinales still to be expected (Fig. S3) there is a huge resource of strains that are potentially useful for plant cultivation. Recent studies have shown that the available strains of *S. vermifera* and *P. indica* differ quantitatively in the plant-beneficial effects they induce in different hosts [14], thus the vast genetic diversity of plant-associated Sebacinales offers interesting perspectives for future experimental research and inoculum development.

We show that *Arabidopsis thaliana* is associated with Sebacinales under natural conditions (Fig. S2: 30). This model species belongs to the *Brassicaceae* which have widely been believed to lack mycorrhizal interactions. Our finding gives new practical relevance to experimental studies on endophytic interactions between *Piriformospora* and the model plant *A. thaliana* [27,28], since Brassicaceae contain many economically important plants such as cabbage and rape. The presence of sebacinalean endophytes in *Triticum* (Fig. S2: 25a,b; Fig. 2) as well as in *Zea mays* (Fig. S2: 31-33) collected in the field is equally important. Given the positive effects that sebacinalean fungi had on growth, yield and resistance against abiotic stress and fungal pathogens of their plant hosts in experiments under controlled conditions [14,16] these results underline the feasibility of applying Sebacinales as biological fertilizers and biocontrol agents for arable crops in the future. At the same time, however, our findings imply that inoculated fungi have to be sufficiently competitive against diverse local Sebacinales communities already present in roots and soil.

The ubiquity and diversity of sebacinalean endophytes shown in this study emphasizes a previously unrecognized aspect of the plant interactions of this fungal group. Sebacinales endophytes are no isolated phenomenon, but extremely common and a potentially important

hidden player in plant ecosystems, which may have given rise to the large diversity of mycorrhizal symbioses the Sebacinales participate in. These findings are both relevant for applied research as well as for basic research on the role of Sebacinales in ecosystem functioning and possible shaping of plant communities.

## Material and Methods

**Sampling.** Root samples were taken from various sites in Germany, Switzerland, France, Italy, Austria, Slovenia, Great Britain, the United States, Ecuador, Ethiopia, Namibia, South Africa, and Iceland. Roots were either frozen in liquid nitrogen and stored at Ð80¡C or washed with tap water and herbarized prior to DNA extraction. Sequences FJ556825-30 and FJ556857 (marked with * in Fig. 1, Fig. S2 and Table S1) were obtained from roots of herbarium vouchers sampled by G.W. Schimper and T. Kotschy on their pioneering field trips to North Africa in the 1830s and 1840s. These vouchers are stored in the herbarium at Tubingen University (TUB).

**DNA extraction, PCR, and sequencing.** The roots were ground in liquid nitrogen using a micropestle, or in a mixer mill (Retsch, Germany). DNA was extracted with a DNeasy Plant Kit (QIAGEN) according to the manufacturerÕs instructions, or using an SDS protocol [29]. To selectively amplify Sebacinales DNA we used nested PCRs involving three variants of primer combinations: (1) ITS1F [30] / TW14 [31], followed by SebITS3 [7,32] / NL4 [7,32]; (2) NS23 [33] / SebLSU2R (5'-GCCCACTAGAAACTCTCACC-3'), followed by ITS1F / LSUSeb1R (5'-CCGCACAAGGCTGATAA-3'); (3) SSUSeb1 (5'-CTTCTTAGAGGGACTGTCAGGA-3') / LSUSeb2R, followed by ITS1F/NL4. Variants 2 and 3, for which we developed Sebacinales-specific primers, allow for amplifying and contiguously sequencing the ITS1-5.8S-ITS2 together with the D1/D2 regions of the nucLSU repeat, i.e., the standard regions used in molecular phylogenetic studies and for fungal barcoding. Success of the PCR experiments was checked

using agarose gel electrophoresis. The PCR products were purified using a QIAquick PCR purification kit (QIAGEN), a High Pure Kit (Hoffman LaRoche), or by enzymatic purification using EXO-SAP-IT (USB Europe). Purified PCR products were sequenced in both directions using an ABI PRISM Dye-Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) and an automated sequencer ABI3130xl, either directly, or after cloning into a vector (TOPO TA, Invitrogen, or pGEM-t, Promega/Catalyse). Sequences were assembled using Sequencher (Gene Codes, Ann Arbor, MI). Taxonomic assignment of the retrieved sequences to the Sebacinales was done by using BLAST [34,35] against the nucleotide collection of the National Center for Biotechnology Information (NCBI, GenBank; www.ncbi.nlm.nih.gov). The final sequences have been deposited in the NCBI nucleotide collection under the accession numbers EU909214-16, EU909218-19, EU909221, EU909223, EU909225, EU909229, EU910898-03, EU910906-07, EU910910-12, EU910914, EU910917-37, EU910939, FJ556805-11, FJ556814-41, FJ556843-68, FJ792843-44, FJ792846-52, FM251923, FM251925-45, HM030724 (see Table S1).

**Phylogenetic Analysis.** A reference dataset was assembled from nuc LSU sequences published in GenBank. To retrieve the full scope of available sebacinalean nuc LSU sequences we used BLAST searches with various query sequences representatively sampled from a recently published molecular phylogenetic analysis [6]. The original dataset was then gradually pruned using preliminary trees produced with MAFFT [36] and RAxML [37] by reducing sets of sequences with identical LSU from identical host plant species to one representative sequence each. The resulting sequence set was complemented with LSU sequences from *Auricularia auricula-judae* and *Trechispora farinacea* as outgroup sequences. The sequences of endophytic Sebacinales determined for this study were added to this set of reference sequences. We aligned the full-length sequences using the 'localpair' option in MAFFT, then restricted the sequences to the nuc LSU D1/D2 region, and realigned them again. New sequences positioned on long

branches in preliminary phylogenetic trees were checked for the presence of chimera artifacts by blasting anterior and posterior halves of the sequences, respectively, against GenBank. Molecular phylogenetic relationships were estimated using the maximum likelihood method [38] as implemented in RAxML; here, a bootstrap analysis [39] was done on 5000 resampled alignments, and every 5th bootstrap tree was used as a starting point for heuristic maximum likelihood analysis of the original alignment.

**Rarefaction Analysis.** We partitioned the endophytic Sebacinales sequences into sequence types by assembling them into contigs using Sequencher; sequences with a D1/D2 minimum match of 99% were treated as representatives of the same sequence type. We then used EstimateS [40] to compute a sample-based analytical rarefaction curve, including confidence intervals based on 1000 replications, treating sequences as samples and sequence types as equivalents of species.

**Microscopy.** The ultrastructure was studied with a Zeiss EM 109 transmission electron microscope at 80 kV. Samples were fixed overnight with 2% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) at room temperature. Following six transfers in 0.1 M sodium cacodylate buffer, samples were postfixed in 1% osmium tetroxide in the same buffer for 1 h in the dark, washed in distilled water, and stained in 1% aqueous uranyl acetate for 1 h in the dark. After five washes in distilled water, samples were dehydrated in acetone, using 10 min changes at 25%, 50%, 70%, 95%, and 3 times in 100 % acetone. Samples were embedded in Spurr's resin [41] and sectioned with a diamond knife. Serial sections were mounted on formvar-coated, single-slot copper grids, stained with lead citrate at room temperature for 5 min, and washed with distilled water. For semi-thin sections, the embedded samples were sectioned, transferred to a microscope slide, stained with new fuchsin and crystal violet, mounted in Entellan (Merck, Germany) under a cover slide, and studied by light microscopy at various magnifications.

## Acknowledgements

We thank H. H. Aegisdottir, A. K. Andrews, Z. W. de Beer, R. Bunn, C. Dilger-Endrulat, B. Greschner-Aschenbrenner, I. Hijri, C. Karasch-Wittmann, Y. Lekberg, P. M□der, U. Oskarsson, M. Tercek and C. Zabinski for collaboration in sample collection or for loan of specimens; S. Appoloni, U. Schweiger and T. Wubet for sharing DNA extractions; J. G□tze and S. Silberhorn for excellent assistance in the lab; and the Namibian administration and the and Yellowstone National Park Research Office for issuing research permits. D. R. would like to acknowledge T. Boller and A. Wiemken for their support.

## References


1. Wei§ M, Selosse M-A, Rexer K-H, Urban A, Oberwinkler F (2004) Sebacinales: a hitherto overlooked cosm of heterobasidiomycetes with a broad mycorrhizal potential. Mycol Res 108: 1003-1010.

2. Glen M, Tommerup IC, Bougher NL, O'Brien PA (2002) Are Sebacinaceae common and widespread ectomycorrhizal associates of *Eucalyptus* species in Australian forests? Mycorrhiza 12: 243-247.

3. Urban A, Wei§ M, Bauer R (2003) Ectomycorrhizae involving sebacinoid mycobionts. Mycol Res 107: 3-14.

4. Selosse M-A, Wei§ M, Jany J-L, Tillier A (2002) Communities and populations of sebacinoid basidiomycetes associated with the achlorophyllous orchid *Neottia nidus-avis* (L.) L.C.M. Rich. and neighbouring tree ectomycorrhizae. Mol Ecol 11: 1831-1844.

5. Kottke I, Beiter A, Wei§ M, Haug I, Oberwinkler F et al. (2003) Heterobasidiomycetes form symbiotic associations with hepatics: Jungermanniales have sebacinoid mycobionts while *Aneura pinguis* (Metzgeriales) is associated with a *Tulasnella* species. Mycol Res 107: 957Ð968.

6. Selosse M-A, Setaro S, Glatard F, Richard F, Urcelay C et al. (2007) Sebacinales are common mycorrhizal associates of Ericaceae. New Phytol 174: 864-878.

7. Setaro S, Wei§ M, Oberwinkler F, Kottke I (2006) Sebacinales form ectendomycorrhizas with *Cavendishia nobilis*, a member of the Andean clade of Ericaceae, in the mountain rain forest of southern Ecuador. New Phytol 169: 355-365.

8. McKendrick SL, Leake JR, Taylor DL, Read DJ (2002) Symbiotic germination and development of the myco-heterotrophic orchid *Neottia nidus-avis* in nature and its requirement for locally distributed *Sebacina* spp. New Phytol 154: 233-247.

9. Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF et al. (2007) A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. Mycol Res 111: 509-547.

10. Wilson D (1995) Endophyte Ðthe evolution of a term, and clarification of its use and definition. Oikos 73: 274-276.

11. Rodriguez RJ, White JF, Arnold AE, Redman RS (2009) Fungal endophytes: diversity and functional roles. New Phytol 182: 314-330.

12. Spatafora JW, Sung GH, Sung JM, Hywel-Jones NL, White JF (2007) Phylogenetic evidence for an animal pathogen origin of ergot and the grass endophytes. Mol Ecol 16: 1701-1711.

13. Redman RS, Sheehan KB, Stout RG, Rodriguez RJ, Henson JM (2002) Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. Science 298: 1581.

14. Deshmukh S, H□ckelhoven R, Sch□fer P, Imani J, Sharma M, et al. (2006) The root endophytic fungus *Piriformospora indica* requires host cell death for proliferation during mutualistic symbiosis with barley. Proc Natl Acad Sci U S A 103: 18450-18457.

15. Varma A, Singh A, Sudha, Sahay NS, Sharma J et al. (2001) *Piriformospora indica*: an axenically culturable mycorrhiza-like endosymbiotic fungus. In: Hock B, editor. The Mycota, Vol IX: Fungal associations. Berlin: Springer. pp. 125-150.

16. Waller F, Achatz B, Baltruschat H, Fodor J, Becker K, et al. (2005) The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. Proc Natl Acad Sci U S A 102: 13386-13391.

17. Barazani O, Benderoth M, Groten K, Kuhlemeier C, Baldwin IT (2005) *Piriformospora indica* and *Sebacina vermifera* increase growth performance at the expense of herbivore resistance in *Nicotiana attenuata*. Oecologia 146: 234-243.

18. Sch□fer P, Khatabi B, Kogel K-H (2007) Root cell death and systemic effects of *Piriformospora indica*: a study on mutualism. FEMS Microbiol Lett 275: 1-7.

19. Varma A, Verma S, Sudha, Sahay N, B□tehorn B, et al. (1999) *Piriformospora indica*, a cultivable plant-growth-promoting root endopyte. Appl Environ Microbiol 65: 2741-2744.

20. Druege U, Baltruschat H, Franken P (2007) *Piriformospora indica* promotes adventitious root formation in cuttings. Sci Hortic 112: 422-426.

21. Neubert K, Mendgen K, Brinkmann H, Wirsel SGR (2006) Only a few fungal species dominate highly diverse mycofloras associated with the common reed. Appl Environ Microbiol 72: 1118-1128.

22. Selosse M-A, Dubois M-P, Alvarez N (2009) Do Sebacinales commonly associate with plant roots as endophytes? Mycl Res 113: 1062-1069.

23. Cavender-Bares J, Kozak KH, Fine PVA, Kembel SW (2009) The merging of community ecology and phylogenetic biology. Ecol Lett 12: 693-715.

24. Emerson BC, Gillespie RG (2008) Phylogenetic analysis of community assembly and structure over space and time. Trends Ecol Evol 23: 619-630.

25. Warcup JH (1988) Mycorrhizal associations of isolates of *Sebacina vermifera*. New Phytol 110: 227-231.

26. Verma S, Varma A, Rexer K-H, Hassel A, Kost G, et al. (1998) *Piriformospora indica*, gen. et sp. nov., a new root-colonizing fungus. Mycologia 90: 896-903.

27. Peškan-Bergh□fer T, Shahollari B, Giong PH, Hehl S, Markert C, et al. (2004) Association of *Piriformospora indica* with *Arabidopsis thaliana* roots represents a novel system to study beneficial plant-microbe interactions and involves early plant protein modifications in the endoplasmic reticulum and at the plasma membrane. Physiol Plant 122: 465-477.

28. Stein E, Molitor A, Kogel KH, Waller F (2008) Systemic resistance in *Arabidopsis* conferred by the mycorrhizal fungus *Piriformospora indica* requires jasmonic acid signaling and the cytoplasmic function of NPR1. Plant Cell Physiol 49: 1747-1751.

29. Wei§ M, Yang ZL, Oberwinkler F (1998) Molecular phylogenetic studies in the genus *Amanita*. Can J Bot 76: 1170-1179.

30. Gardes M, Bruns TD (1993) ITS primers with enhanced specifity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. Molecular Ecology 2: 113-118.

31. Cullings K (1994) Molecular phylogeny of the Monotropoideae (Ericaceae) with a note on the placement of the Pyroloideae. J Evol Biol 7: 501-516.

32. O'Donnell K (1993) *Fusarium* and its near relatives. In: Reynolds DR, Taylor JW, editors. The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics. Wallingford: CAB International. pp. 225-233.

33. Burt A, Carter DA, Koenig GL, White TJ, Taylor JW (1996) Molecular markers reveal cryptic sex in the human pathogen *Coccidioides immitis*. P Proc Natl Acad Sci U S A 93: 770-773.

34. Altschul SF, Madden TL, Sch□ffer AA, Zhang J, Zhang Z, et al. (1997) Gapped BLAST and PSI-Blast: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res 25: 3389-3402.

35. Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W (2000) A greedy algorithm for aligning DNA sequences. J Comput Biol 7: 203-214.

36. Katoh K, Toh H (2008) Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. Brief Bioinformatics 9: 286-298.

37. Stamatakis A (2006) RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. Bioinformatics 22: 2688-2690.

38. Felsenstein J (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. J Mol Evol 17: 368-376.

39. Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39: 783-791.

40. Colwell RK, Mao CX, Chang J (2004) Interpolating, extrapolating, and comparing incidence-based species accumulation curves. Ecology 85: 2717-2727.

41. Spurr AR (1969) A low-viscosity epoxy resin embedding mediumfor electron microscopy. J Ultrastruct Res 26: 31-43.

## Figure Legends

### Fig. 1. Phylogenetic relationships of Sebacinales based on maximum likelihood analysis of partial nuclear-encoded ribosomal large subunit sequences.

Sequences are color-coded by type of symbiosis or origin. Highlighted clades 1-14, including zoomed-in lineages 2, 6,7 and 11, are explained in the text. Sequences marked with an asterisk (clades 7, 11) are from herbarium specimens collected by G.W. Schimper and T. Kotschy in pioneering field trips in the 1830/40s. The full tree, including all host plants, places of origin, bootstrap values, accession numbers and clades/sequences discussed in the text is shown in Fig. S2, using the same colors and three-letter symbiosis-identifying codes.

Red: sequences of endophytes (END), magenta: cavendishioid mycorrhiza (CAV), blue: ericoid mycorrhiza (ERM), dark green: orchid mycorrhiza (ORM), turquoise: jungermannoid mycorrhiza (JMM), bright green: ectomycorrhiza (ECM), brown: soil samples, black: sequences from fruitbodies or cultures.

Country codes used here: AUT, Austria; ECU, Ecuador; EGY, Egypt; ETH, Ethiopia; FRA, France; GER, Germany; GBR, Great Britain; ITA, Italy; NAM, Namibia; USA, United States of America.

### Fig. 2. Anatomy and ultrastructure of a field-collected root sample of wheat (*Triticum aestivum*) infested with a sebacinalean endophyte.

(*A*) cross section through the root as seen in the light microscope; singular dead cells of the rhizodermis are heavily colonized by fungal hyphae (arrowheads). Bar = 100 µm.

(*B*) transmission electron micrograph of a colonized rhizodermal cell; arrowheads point to hyphal septa in cross section showing septal pores. Bar = 3 µm. (*C*) dolipore with continuous parenthesome as typical for members of the Sebacinales (arrowhead). Bar = 200 nm.

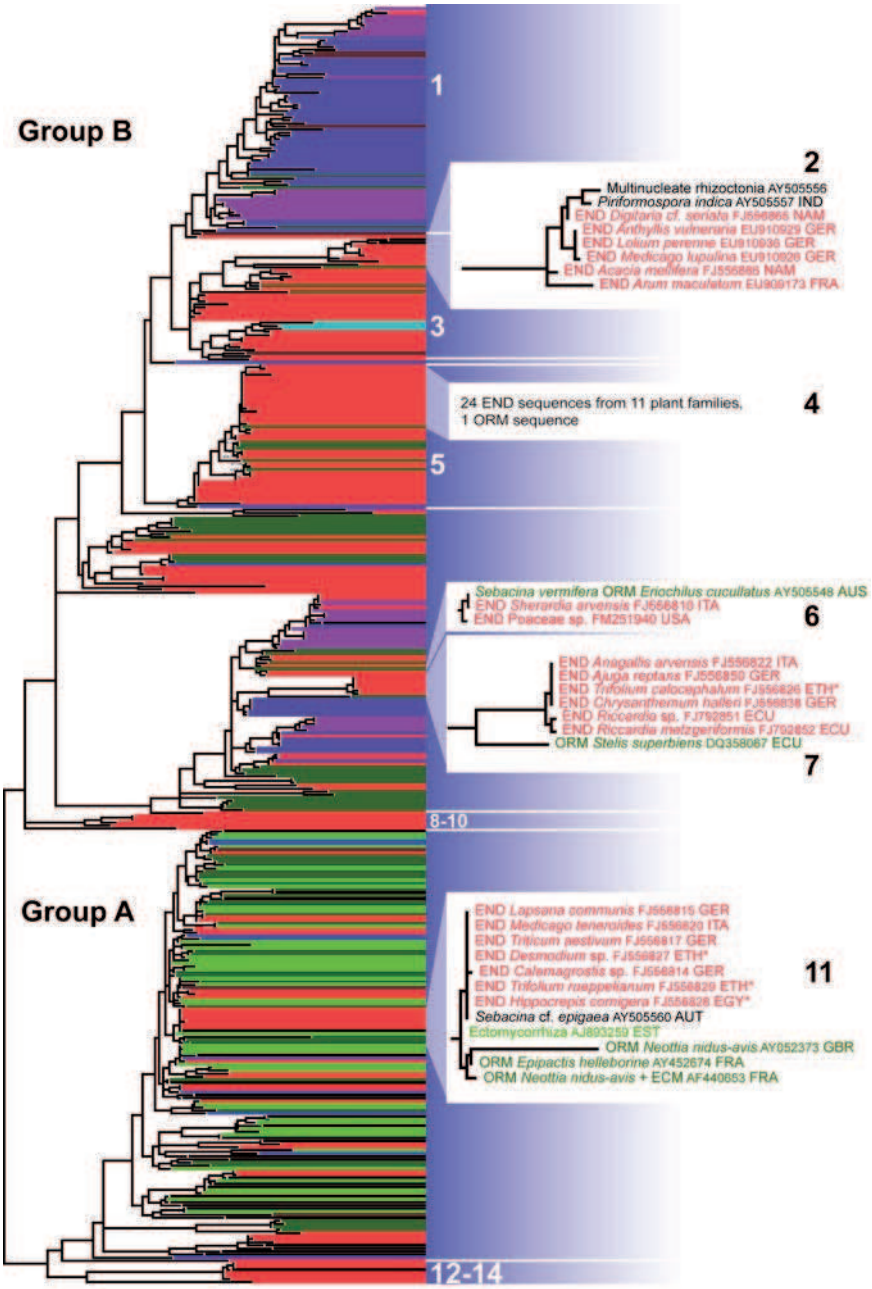

Group B
1
2
Multinucleate rhizoctonia AY505556
Piriformospora indica AY505557 IND
END Digitaria cf. sanguinalis FJ556865 NAM
END Anthyllis vulneraria EU910929 GER
END Lolium perenne EU910936 GER
END Medicago lupulina EU910926 GER
END Acacia mellifera FJ556885 NAM
END Arum maculatum EU909173 FRA
3
24 END sequences from 11 plant families,
1 ORM sequence
4
5
Sebacina vermifera ORM Eriochilus cucullatus AY505548 AUS
END Sherardia arvensis FJ556810 ITA
END Poaceae sp. FM251940 USA
6
END Anagallis arvensis FJ556822 ITA
END Ajuga reptans FJ556850 GER
END Trifolium calocephalum FJ556826 ETH*
END Chrysanthemum halleri FJ556838 GER
END Riccardia sp. FJ792851 ECU
END Riccardia metzgeriformis FJ792852 ECU
ORM Stelis superbiens DQ358067 ECU
7
8-10
Group A
END Lapsana communis FJ556815 GER
END Medicago teneroides FJ556820 ITA
END Triticum aestivum FJ556817 GER
END Desmodium sp. FJ556827 ETH*
END Calamagrostis sp. FJ556814 GER
END Trifolium rueppellianum FJ556829 ETH*
END Hippocrepis comigera FJ556828 EGY*
Sebacina cf. epigaea AY505560 AUT
Ectomycorrhiza AJ893259 EST
ORM Neottia nidus-avis AY052373 GBR
ORM Epipactis helleborine AY452674 FRA
ORM Neottia nidus-avis + ECM AF440653 FRA
11
12-14

**Fig. 1**

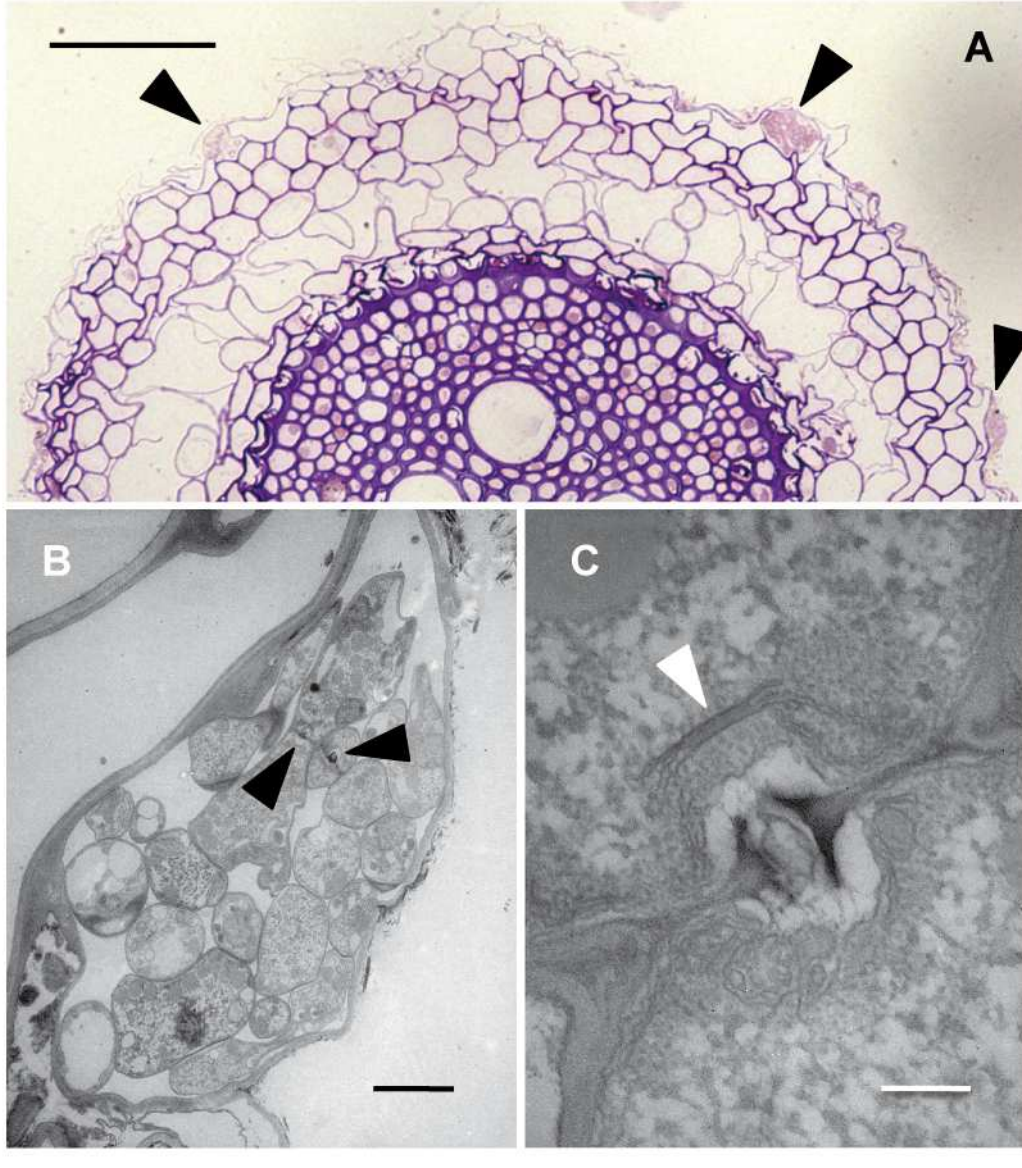



**Fig. 2**

## Supporting Information

### Table S1

Host plants from which endophytic Sebacinales were sequenced for this study and assignment to plant families. Sequences marked with an asterisk are from herbarium specimens collected in the 1830/40s by G.W. Schimper and T. Kotschy.

### Figure S2

Phylogenetic relationships of Sebacinales based on maximum likelihood analysis of partial nuclear-encoded ribosomal large subunit sequences. Color boxes indicate type of symbiosis. Sequences from fruitbodies or cultures that can be assigned to morphospecies are in bold. Circled numbers highlight sequences or clades that are mentioned in the article text. Sequences marked with an asterisk are from herbarium specimens collected in the 1830/40s by G.W. Schimper and T. Kotschy. Numbers on branches are bootstrap support values obtained from 5000 replicates (only values ≥ 50% are shown).

Red: sequences of endophytes (END), magenta: cavendishioid mycorrhiza (CAV), blue: ericoid mycorrhiza (ERM), dark green: orchid mycorrhiza (ORM), turquoise: jungermannoid mycorrhiza (JMM), bright green: ectomycorrhiza (ECM), brown: soil samples.
Country codes: ARG, Argentina; AUS, Australia; AUT, Austria; CAN, Canada; CHL, Chile; CHN, P. R. China; ECU, Ecuador; EGY, Egypt; EST, Estonia; ETH, Ethiopia; FRA, France; GER, Germany; GBR, Great Britain; GUA, Guadeloupe; GUY, French Guyana; ICE, Iceland; IND, India; ITA, Italy; MEX, Mexico; NAM, Namibia; NOR, Norway; REU, Reunion; SAF, South Africa; SLO, Slowenia; SPA, Spain; SUD, Sudan; SUI, Switzerland; THA, Thailand; USA, United States of America.

### Figure S3

Analytical sample-based rarefaction curve of endophytic Sebacinales, derived from partial nuclear-encoded ribosomal large subunit sequences. Sequences are treated as samples, sequences of ≥ 99% similarity are assigned to the same sequence type. Confidence intervals are based on 1000 replicates.

**Table S1.** Host plants from which endophytic Sebacinales were sequenced for this study and assignment to plant families. Sequences marked with asterisks are from herbarium specimens collected in the 1830/40s by G.W. Schimper and T. Kotschy.

| Host species | Host family | GenBank accn. | Provenience | DNA extraction no. |
|---|---|---|---|---|
| Adoxa moschatellina | Adoxaceae | FJ556840 | Germany | 6463 |
| Aneura pinguis | Aneuraceae | EU909216 | Germany | 9761 |
| Ranunculus ficaria | Aneuraceae | EU910920 | Germany | 7032 |
| Riccardia latifrons | Aneuraceae | EU909215 | Germany | 9663 |
| Riccardia latifrons | Aneuraceae | EU909221 | Germany | 9678 |
| Riccardia latifrons | Aneuraceae | EU909223 | Germany | 9610 |
| Riccardia metzgeriformis | Aneuraceae | FJ792852 | Ecuador | 9721 |
| Riccardia palmata | Aneuraceae | EU909214 | Germany | 9595 |
| Riccardia palmata | Aneuraceae | EU909218 | Germany | 9616 |
| Riccardia palmata | Aneuraceae | EU909219 | Germany | 9673 |
| Riccardia palmata | Aneuraceae | EU909225 | Germany | 9614 |
| Riccardia palmata | Aneuraceae | EU909229 | Germany | 9666 |
| Riccardia sp. | Aneuraceae | FJ792851 | Ecuador | 9711 |
| Astrantia major | Apiaceae | FJ556836 | Germany | 6443 |
| Sanicula europaea | Apiaceae | FJ556819 | Germany | 6395 |
| Torulis nodosa | Apiaceae | FJ556811 | Italy | 6380 |
| Anthemis tinctoria | Asteraceae | FJ556835 | Italy | 6442 |
| Chrysanthemum halleri | Asteraceae | FJ556838 | Germany | 6450 |
| Crepis biennis | Asteraceae | FJ556837 | Germany | 6449 |
| Hieracium murorum | Asteraceae | FJ556816 | Germany | 6391 |
| Lapsana communis | Asteraceae | FJ556815 | Germany | 6390 |
| Prenanthes purpurea | Asteraceae | FJ556856 | Germany | 6555 |
| Taraxacum officinale | Asteraceae | FJ792843 | Germany | 6795 |
| Arabidopsis thaliana | Brassicaceae | FJ792850 | Germany | 7021 |
| Lychnis flos-cuculi | Caryophyllaceae | FJ556839 | Slovenia | 6460 |
| Combretum cf. sericeum | Combretaceae | FJ556862 | Namibia | EU17 |
| Dipsacus sylvestris | Dipsacaceae | EU910902 | Germany | 6872 |
| Equisetum arvense | Equisatecae | FJ556841 | Austria | 6467 |
| Phyllanthus venosus* | Euphorbiaceae | FJ556857 | Sudan | 6570 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Acacia hebeclada | Fabaceae | FJ556867 | Namibia | EU41 |
| Acacia mellifera | Fabaceae | FJ556866 | Namibia | EU39 |
| Anthyllis vulneraria | Fabaceae | EU910929 | Germany | 6980 |
| Astragalus falcatus | Fabaceae | EU910911 | Germany | 6894 |
| Coronilla varia | Fabaceae | EU910922 | Germany | 6944 |
| Desmodium sp. | Fabaceae | FJ556827 | Ethiopia | 6430 |
| Hippocrepis comosa | Fabaceae | FJ556843 | Germany | 6470 |
| Hippocrepis cornigera* | Fabaceae | FJ556828 | Egypt | 6431 |
| Lathyrus aphaca | Fabaceae | EU910932 | France | 6997 |
| Lathyrus cicera | Fabaceae | EU910934 | France | 7007 |
| Lathyrus pratensis | Fabaceae | EU910939 | Germany | 7039 |
| Medicago lupulina | Fabaceae | EU910907 | Germany | 6875 |
| Medicago lupulina | Fabaceae | EU910926 | Germany | 6965 |
| Medicago lupulina | Fabaceae | FJ556805 | Italy | 6369K1 |
| Medicago lupulina | Fabaceae | FJ556807 | Italy | 6369K3 |
| Medicago lupulina | Fabaceae | FJ556808 | Italy | 6369K5 |
| Medicago sativa | Fabaceae | FM251933 | Switzerland | ZS743 |
| Medicago sativa | Fabaceae | FM251934 | Switzerland | ZS731 |
| Medicago sativa | Fabaceae | FM251939 | Switzerland | ZS727 |
| Medicago teneroides | Fabaceae | FJ556820 | Italy | 6396 |
| Melilotus albus | Fabaceae | FJ556844 | Germany | 6472 |
| Onobrychis viciifolia | Fabaceae | FJ556845 | Germany | 6473 |
| Trifolium arvense | Fabaceae | EU910931 | France | 6983 |
| Trifolium badium | Fabaceae | FJ556846 | Germany | 6474 |
| Trifolium calocephalum* | Fabaceae | FJ556825 | Ethiopia | 6427 |
| Trifolium calocephalum* | Fabaceae | FJ556826 | Ethiopia | 6427 |
| Trifolium campestre | Fabaceae | EU910930 | France | 6982 |
| Trifolium medium | Fabaceae | EU910927 | Germany | 6968 |
| Trifolium pratense | Fabaceae | EU910924 | Germany | 6960 |
| Trifolium rueppellianum* | Fabaceae | FJ556829 | Ethiopia | 6432 |
| Trifolium sp. | Fabaceae | FM251943 | Switzerland | ZS737 |
| Trifolium thallii | Fabaceae | EU910933 | France | 7006 |
| Trifolium thallii | Fabaceae | FJ792847 | France | 7001 |
| Trifolium thallii | Fabaceae | FJ792849 | France | 7013 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Trifolium tomentosum | Fabaceae | FJ792848 | France | 7005 |
| Trigonella sp.* | Fabaceae | FJ556830 | Sudan | 6433 |
| Vicia cracca | Fabaceae | EU910917 | Germany | 6918 |
| Vicia cracca | Fabaceae | EU910918 | Germany | 6921 |
| Vicia cracca | Fabaceae | EU910919 | Germany | 6922 |
| Vicia cracca | Fabaceae | EU910925 | Germany | 6962 |
| Vicia dumetorum | Fabaceae | EU910914 | Germany | 6905 |
| Vicia hirsuta | Fabaceae | EU910928 | Germany | 6969 |
| Vicia sativa | Fabaceae | EU910910 | Germany | 6890 |
| Vicia sepium | Fabaceae | EU910906 | Germany | 6867 |
| Vicia sepium | Fabaceae | EU910912 | Germany | 6899 |
| Vicia sepium | Fabaceae | EU910923 | Germany | 6959 |
| Medicago lupulina | Fabaceae | FJ556806 | Italy | 6369K2 |
| Gentiana acaulis | Gentianaceae | FM251929 | Switzerland | ZS733 |
| Gentiana acaulis | Gentianaceae | FM251942 | Switzerland | ZS759 |
| Geranium palustre | Geraniaceae | FJ556859 | Germany | 6586 |
| Geranium pyrenaicum | Geraniaceae | FJ556834 | Italy | 6438 |
| Geranium pyrenaicum | Geraniaceae | FJ556849 | Germany | 6482 |
| Ajuga reptans | Lamiaceae | FJ556850 | Germany | 6483 |
| Glechoma hederacea | Lamiaceae | EU910921 | Germany | 6938 |
| Lamium album | Lamiaceae | FJ556851 | Germany | 6485 |
| Melittis melissophyllum | Lamiaceae | FJ556852 | Slovenia | 6486 |
| Origanum vulgare | Lamiaceae | FM251931 | Switzerland | ZS745 |
| Origanum vulgare | Lamiaceae | FM251944 | Switzerland | ZS747 |
| Prunella vulgaris | Lamiaceae | FJ556860 | Great Britain | 6758 |
| Linum austriacum | Linaceae | FJ556821 | Austria | 6399 |
| Rhinanthus alectorolophus | Orobanchaceae | FJ556853 | Germany | 6492 |
| Oxalis dillenii | Oxalidaceae | FJ556854 | Germany | 6507 |
| Papaver rhoeas | Papaveraceae | FJ556832 | Italy | 6436 |
| Papaver rhoeas | Papaveraceae | FJ556833 | Italy | 6436 |
| Plantago media | Plantaginaceae | EU910903 | Germany | 6818 |
| Aegilops geniculata | Poaceae | FJ556809 | Italy | 6370 |
| Agrostis scabra | Poaceae | FM251927 | USA | SA531 |
| Agrostis scabra | Poaceae | FM251935 | USA | SA543 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Agrostis stolonifera | Poaceae | FM251941 | Iceland | SA549 |
| Bromus erectus | Poaceae | FM251936 | Switzerland | ZS725 |
| Bromus erectus | Poaceae | FM251937 | Switzerland | ZS730 |
| Calamagrostis epigeios | Poaceae | EU910898 | Germany | 6797 |
| Calamagrostis sp. | Poaceae | FJ556814 | Germany | 6389 |
| Calamagrostis sp. | Poaceae | FJ556823 | Germany | 6402 |
| Calamagrostis sp. | Poaceae | FJ556824 | Germany | 6402 |
| Dactylis glomerata | Poaceae | EU910935 | Germany | 7014 |
| Dichanthelium lanuginosum | Poaceae | FM251926 | USA | SA551 |
| Dichanthelium lanuginosum | Poaceae | FM251938 | USA | SA539 |
| Digitaria cf. seriata | Poaceae | FJ556865 | Namibia | EU31.1 |
| Eragrostis cf. echinochloidea | Poaceae | FJ556861 | Namibia | EU14 |
| Lolium perenne | Poaceae | EU910936 | Germany | 7015 |
| Phleum pratense | Poaceae | EU910901 | Germany | 6811 |
| Phleum pratense | Poaceae | EU910937 | Germany | 7023 |
| Poaceae sp. | Poaceae | FM251932 | Switzerland | ZS761 |
| Poaceae sp. | Poaceae | FM251940 | USA | SA547 |
| Poaceae sp. | Poaceae | FM251930 | Switzerland | ZS763 |
| Schmidtia cf. pappophoroides | Poaceae | FJ556863 | Namibia | EU18 |
| Schmidtia cf. pappophoroides | Poaceae | FJ556864 | Namibia | EU19.3 |
| Triticum aestivum | Poaceae | EU910899 | Germany | 6803 |
| Triticum aestivum | Poaceae | FJ556817 | Germany | 6394 |
| Triticum aestivum | Poaceae | FJ556818 | Germany | 6394 |
| Zea mays | Poaceae | FM251923 | Switzerland | ZS996 |
| Zea mays | Poaceae | FM251925 | Switzerland | ZS986 |
| Zea mays | Poaceae | FM251945 | Switzerland | ZS968 |
| Zea mays | Poaceae | FM251928 | Switzerland | ZS1002 |
| Podocarpus falcatus | Podocarpaceae | FJ556868 | Ethiopia | PF4 |
| Polygala vulgaris | Polygalaceae | FJ556847 | Slovenia | 6477 |
| Rumex acetosa | Polygonaceae | FJ792846 | Germany | 6941 |
| Anagallis arvensis | Primulaceae | FJ556822 | Italy | 6401 |
| Thamnochortus muirii | Restionaceae | FJ556831 | South Africa | 6435 |
| Agrimonia eupatoria | Rosaceae | FJ556858 | Germany | 6581 |
| Fragaria moschata | Rosaceae | FJ792844 | Germany | 6838 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Geum urbanum | Rosaceae | FJ556855 | Germany | 6528 |
| Galium odoratum | Rubiaceae | FJ556848 | Germany | 6479 |
| Sherardia arvensis | Rubiaceae | FJ556810 | Italy | 6379 |
| Veronica persica | Veronicaceae | EU910900 | Germany | 6809 |

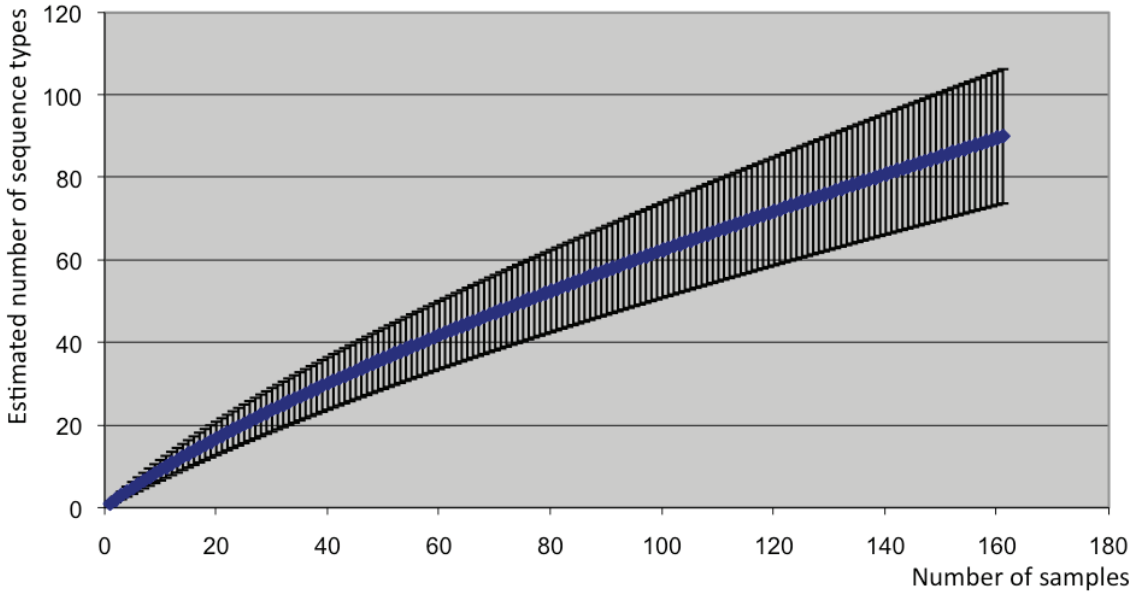

Estimated number of sequence types
120
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
Number of samples

**Fig. S3**

# Chapitre 7

# Article 5. *Assessing the diversity of tropical fungal symbionts and phylogenetic determinants of the orchids-fungi networks from a large study in La Réunion Island*

**Résumé** Les orchidées dépendent de la présence d'une association mycorhizienne pour accomplir leur cycle de vie. Malgré les inventaires croissants sur la diversité des partenaires fongiques et sur la spécificité des plantes hôtes, la structure des associations orchidées-champignons reste une question ouverte. De plus, les connaissances sur les modèles tropicaux sont limitées (en particulier sur les modèles épiphytes), et des études récentes ont montré que les orchidées pourraient avoir des cortèges mycorhiziens plus riches sous les tropiques. Dans cet article, nous étudions la structure écologique et évolutive des réseaux mycorhiziens en posant les deux questions suivantes : quelle est la structure du réseau d'interactions orchidées-champignons à l'échelle de communautés tropicales ? Existe-il un signal phylogénétique des associations ? Les réseaux mycorhiziens ont été étudiés à La Réunion (Mascareignes) qui appartient à un *hotspot* de la biodiversité mondiale et où les habitats naturels sont contrastés et préservés.

Nous évaluons la diversité génétique des cortèges mycorhiziens de 78 espèces d'orchidées à partir des racines de plantes adultes, définissons des unités opérationnelles taxonomiques (OTUs) au seuil de 97% de similarité des séquences ITS, et testons la structure de la matrice d'associations observées. J'ai réalisé ici l'échantillonnage dans les habitats naturels de La Réunion, les identifications moléculaires des cham-

pignons mycorhiziens des 78 espèces d'orchidées étudiées (environ 500 individus ; 33 populations), les analyses phylogénétiques et les analyses de structure des réseaux et de signal phylogénétique. Des échantillons de racines colonisées ont été mis à la disposition de I. Kottke (Tübingen, Allemagne) pour corroborer les identifications moléculaires par des observations des pelotons en microscopie électronique.

Nous montrons que les orchidées terrestres et épiphytes tropicales s'associent très fréquemment à des champignons appartenant aux rhizoctonias (Tulasnellaceae, Sebacinales, Ceratobasidiaceae), surtout à des Tulasnellaceae. L'analyse du réseau mycorhizien formé par 73 espèces d'orchidées (cinq espèces n'ont pas révélé de rhizoctonias) et 95 OTUs de rhizoctonias révèle une structure emboîtée (traduit de l'anglais *nested*). Cette propriété du réseau réfute l'idée d'interactions spécialistes fréquentes dans les symbioses mycorhiziennes des orchidées. Enfin, nous analysons secondairement le signal phylogénétique des associations orchidées-champignons à deux échelles taxonomiques : (1) les genres d'orchidées ; et (2) les espèces appartenant aux angraecoïdes. Nous trouvons un signal faible dans la phylogénie des champignons et des genres d'orchidées, et un signal phylogénétique plus important dans la phylogénie des espèces d'orchidées appartenant aux angraecoïdes. Ces résultats soulèvent des questions quant à l'empreinte des processus écologiques et évolutifs sur les réseaux mycorhiziens actuels, et remettent en question l'idée selon laquelle des processus de coévolution pourraient conduire ce système.
J'ai produit une première version de l'article (en tant que premier auteur) que j'ai annexée dans la présente version du manuscrit. Cependant, cette version n'est pas complète car les derniers résultats doivent être discutés entre co-auteurs.

**Article en cours de production.**

**Article in progress**

# Assessing the diversity of tropical fungal symbionts and phylogenetic determinants of the orchids-fungi networks from a large study in La Réunion Island

Florent MARTOS[1,2], François MUNOZ[3], Thierry PAILLER[1], Ingrid KOTTKE[4], Cédric GONNEAU[1] and Marc-André SELOSSE[2]

[1]Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical (Université de La Réunion, UMR C53), Equipe Dynamiques écologiques au sein des ecosystems naturels, 15 Avenue René Cassin, BP 7151, 97715 Saint-Denis cedex 9, France; [2]Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive (CNRS, UMR 5175), Equipe Interactions Biotiques, 1919 Route de Mende, 34293 Montpellier cedex 5, France; botAnique et bioinforMatique de l'Architecture des Plantes (UMR AMAP), Equipe Organisation et dynamique des peuplements et des paysages, Boulevard de la Lironde, TA A-51/PS2, 34398 Montpellier Cedex 5, France; Institute of Evolution and Ecology, Organismic Botany, Eberhard-Karls-University Tübingen, Auf der Morgenstelle 1, D-72076 Tübingen, Germany.

## Summary

**Keywords:**

Mycorrhizal symbiosis; interaction networks; phylogenetic signals; Orchidaceae; rhizoctonias; tropical forests; epiphytism

## Introduction

Orchidaceae is a monophyletic plant family (Chase *et al*., 2003) that is one of the most diversified among flowering plants (about 24,000 species, Dressler, 2006). Orchids occur on all the continents and at almost all latitudes, but most species are found in tropical regions (Dressler, 1981; Cribb *et al*., 2003) that overlap the biodiversity hotspots (Myers, 2000). Orchid species are particularly abundant in rainforests where many taxonomic groups have undergone specific adaptations to local ecological conditionsÑ such as epiphytic orchids (Dressler, 1981; Benzing, 1990)Ñ and intensive diversifications (Gravendeel *et al*., 2004). Pollinator specialization and pollination by deceit have received much interest in the studies on orchidsÕ diversification (Cozzolino and Widmer, 2005), but some authors have also claimed the ecological and possibly evolutionary role of orchid-fungus symbioses. The obligatory mutualism may result in overdispersed and small populations for many orchid species (Otero and Flanagan, 2006), and lead to low gene flow among populations with few reproducing individuals, two conditions that would lead orchid populations to genetic drift (Tremblay *et al*., 2005).

Orchid species display some specific traits that result from their mycorrhizal symbiosis with fungi (Smith and Read, 1997). At fruiting time, they produce a large amount of ÔdustÕseeds (i.e. minute seeds) lacking nutritional resource required for germination (Arditti and Ghani, 2000), and they therefore depend upon the development of relationships with fungi to germinate and establish (Bernard, 1899; Leake, 1994). Fungal symbionts generally remain present in the roots of adult orchids, where they form intracellular hyphal coils (or pelotons; see Rasmussen, 1995), and to some extent they supply N and P compounds to the plants in return for organic carbon (Cameron *et al*., 2006, 2007).

Previous studies focused on the identification of fungal symbionts of temperate terrestrial orchids (Rasmussen, 1995; McCormick *et al*., 2004; Shefferson *et al*., 2005). Most temperate species have revealed associations with rhizoctonia fungi (Dearnaley, 2007), a polyphyletic fungal group that encompasses three main basidiomycete lineages, i.e. the Ceratobasidiaceae, Tulasnellaceae and Sebacinales (Taylor *et al*., 2002; Smith and Read, 1997). However, few inventories have hitherto been conducted in tropical regions where orchids could have more fungal partners because of species richness and the diversity of habitats, e.g. epiphytism (Zettler *et al*., 2003). There is evidence that some tropical orchids also form associations with rhizoctonia fungi. For

instance, Otero *et al*. (2002, 2004) identified Ceratobasidiaceae in the roots of nine epiphytic species from Puerto Rico, whereas Suarez *et al*. (2006, 2008) reported both Tulasnellaceae and Sebacinales, yet never Ceratobasidiaceae, in the roots of epiphytic species from the Andean cloud forest of Ecuador. Some further unusual mycorrhizal rust fungi (Attractiellales) have recently been identified from the roots of several terrestrial and epiphytic species in the latter region (Kottke *et al*., 2010), and this suggests that the fungal symbionts could be more diverse than currently acknowledged in tropical regions. The spectrum of fungi associating with tropical orchids also includes non-rhizoctonia saprotrophic fungi that have been found in achlorophyllous species from Japan (Yamato *et al*., 2005; Ogura-Tsujita *et al*., 2009), West Indies and La Réunion (Martos *et al*., 2009). Nevertheless, the knowledge about the spectrum of fungal symbionts in tropical regions is still scarce, in particular in African and Malagasy orchid groups, and the lack of data has clearly hampered a better understanding of the underlying evolutionary and ecological processes.

There are conflicting theories and results regarding the degree of specialism in orchid-fungus relationships, and most recent researches have focused on the identification of fungal symbionts and host specificity in orchid species that are either geographically or phylogenetically isolated. Mc Cormick *et al*. (2004) noticed that *Goodyera pubescens* and *Liparis lilifolia*, two temperate orchids, associate with a narrow clade of Tulasnellaceae, whereas *Tipularia discolor* has multiple associations with Tulasnellaceae and Sebacinales. Variations in the degree of specialism were also reported from tropical green autotrophic orchids (Otero *et al*., 2004, 2007; Suarez *et al*., 2006, 2008), as well as from tropical mycoheterotrophic species (Martos *et al*., 2009; Roy *et al*., 2009). It was assumed that some orchid species are able to associate with multiple fungi and can switch from one partner to another under stressful conditions (McCormick *et al*., 2006). To such extent, generalism should be more prevalent in species that colonize nutrient-poor or drought-stressing habitats (Jacquemyn *et al*., 2010).

In a broader perspective, orchid species can interact with a number of fungi that interact themselves with other orchid species, and so on, so as to display a complex interaction network. Investigating the nature and structure of interaction networks has recently received much interest, because they may vary according to the nature of the interactions, especially when comparing mutualistic and trophic relationships (Bascompte and Jordano, 2007; Rezende *et al*., 2007;

Vazquez *et al*., 2009; Blüthgen *et al*., 2007; Thébault and Fontaine, 2010). Interaction systems involving plants are more and more extensively surveyed in this respect (Vazquez *et al*., 2009, Blüthgen *et al*., 2009, Bascompte and Jordano, 2007), because they provide rich information and diverse situations. More specifically, various mutualistic insect-plant systems have been surveyed, but the structure of mycorrhizal fungus-plant networks is still to be investigated. The case of orchids and fungi is all the more interesting than the mutualism is obligatory for orchids but not for fungi (Smith and Read, 1997), and this situation should result in an asymmetry of the interaction network (Thébault and Fontaine, 2008).

Apart from investigating the current ecological factors that drive community assemblage, phylogeny-based approaches further enable to address the underlying evolutionary patterns and co-evolutionary forces (Cavender-Bares *et al*., 2009; Vazquez *et al*., 2009; Bascompte and Jordano, 2007). For instance, a given fungus can more likely relate to phylogenetically-related species of orchids, and/or a given orchid can more likely relate to phylogenetically-related fungi. Such phylogenetic signals (Blomberg *et al*., 2003) can represent the effect of ancient constraints onto the current interaction network, and an asymmetry in the phylogenetic signals may reveal different evolutionary constraints for the partners (Vazquez *et al*., 2009). Methods to quantify phylogenetic signals rely on the averaging of the phylogenetic relatedness over the spectrum of interacting partners, and null models are used to test the significance of the signals against randomized interactions (Ives and Godfray, 2006).

In the present study, we investigated original mycorrhizal networks of tropical orchids in both an ecological and evolutionary perspective. The study area was La Réunion Island (Mascarene Archipelago) that belongs to the Malagasy biodiversity hotspot (Myers, 2000) where many primary forests still occur with contrasting ecological conditions (i.e. rain/semi-dry and lowland/mountain forests), and offers both terrestrial and epiphytic habitats for orchids. We assessed the genetic diversity of fungal symbionts on the roots of 78 species of orchids, identified taxonomic units (OTUs; Hughes *et al*., 2009), and compared their diversity in the terrestrial and epiphytic orchid communities. We then tested the structure of the association matrix, and investigated the phylogenetic signal in the interaction network to assess whether one, the other, or both partners were dependent upon the phylogenetic relatedness of the other (Ives and Godfray, 2006). Finally, we showed that tropical orchids very often associate with Tulasnellaceae, and that

the nature of their mycorrhizal networks is more clearly explained by current adaptations rather than by phylogenetic history. These analyses helped to discuss the relative imprint of ecological and evolutionary processes onto the current pattern of orchid-fungus association, and challenged the idea that coevolutionary process may drive the system.

## Material and methods

### Study area and material

La R□union (21¡09ÕS; 55¡30ÕE) is an oceanic island of recent volcanic origin (3 million years ago) that reaches 3070 m at the centre (Piton des Neiges), and 2632 m in the southeast (Piton de la Fournaise). It undergoes tropical climate with a rainy season from December to April and a cooler, drier season from May to November. Mean annual rainfall is high in the eastern part (1500 mm to >8000 mm), and remarkably lower in the western part (500 mm to 1500 mm) of the island. Natural vegetation occurs along an altitudinal gradient displaying contrasting ecological conditions. Despite its small surface area (2,500 $km^2$), many contrasted habitat types have been defined (Cadet, 1977; Strasberg *et al*., 2005), the most representative of which are lowland rainforests (high canopy), lowland semi-dry forests, mountain rainforests (epiphytism-rich), and sub-alpine heathlands. The flora includes about 150 orchid species from 32 genera, the species-richest one being *Angraecum*. Around 50% and 25% of orchid species are endemic to Mascarene and La R□union, respectively. Terrestrial and epiphytic species occur in all habitat types, but epiphytic species are mostly absent in sub-alpine heathlands. Epiphytic orchid genera can readily be set apart from terrestrial ones given their vegetative traitsÑ especially velamen-forming roots and succulent stems and leavesÑ and their occurrences in aerial parts of forest habitats. We sampled 78 species to get three populations per species and two plants per population. The sampling effort depended on species commonness or rarity insofar as some species could not be found at more than one or two locations. Overall, 452 plants were sampled from 33 forest sites in La R□union between 2007 and 2010 (see Fig. 1).

To investigate the phylogenetic relatedness between the orchid genera, we retrieved sequences of maturase K (matK) chloroplast pseudogene from GenBank by selecting sequences obtained from unambiguous orchid species that belonged to the orchid genera of our study. Plant phylogenetic

138 analyses were performed as described below for phylogenetic analyses of fungi, except for the
139 use of the G-INS-I algorithm that is recommended for sequences with a global homology. We
140 thus obtained a phylogenetic tree including all the orchid genera of our study plus the orchid
141 genera *Vanilla* that was used to root the phylogenetic tree. We also used a phylogenetic tree of
142 epiphytic orchids, namely the Angraecoids species (Vandae tribe). We retrieved a consensus tree
143 obtained from phylogenetic analyses of four plastid DNA regions (matK, trnL intron, trnL-F
144 intergenic spacer and rps16 intron) thanks to Micheneau *et al*. (2008), and obtained the
145 phylogenetic tree for all the species we sampled in this clade.

146 **Root sampling and observation with transmission electron microscope (TEM)**

147 For each sampled plant, we reported the forest and terrestrial or epiphytic habitat type, and we
148 randomly sampled 1-2 cm-long root fragments whenever possible without digging out the whole
149 plant. Freshly collected roots were surface-sterilized for 10 s using 2% sodium hypochloride and
150 5% polysorbate solutions, washed three times in sterile water and then checked for the presence
151 of pelotons on thin sections under optical microscope. Five to ten 2 mm-long colonized root
152 sections were kept at -80 ¡C for fungal molecular analysis. We also randomly sampled 42
153 healthy-looking sections (corresponding to 21 species) adjacent to those colonized by pelotons,
154 and quickly fixed them in 2 % glutaraldehyde (10 mM Na-phosphate buffer; pH 7.2) for TEM to
155 corroborate molecular identifications by morphology. Ultrathin sections were obtained as in
156 Kottke *et al*. (2010) and examined using a ZEISS TEM at 80kV to observe the shape of
157 parenthosomes that enables the identification of basidiomycetes and rhizoctonias fungi (Moore,
158 1987).

159 **Molecular and phylogenetic analyses of fungi**

160 We performed DNA purifications from root sections using a DNeasy¨ Plant Mini Kit (Qiagen).
161 PCR amplifications were run as in Selosse *et al*. (2004) in order to amplify the internal
162 transcribed spacer (ITS) of the fungal rDNA by using four primer sets: the fungal-specific primer
163 set 1F/4 (White *et al*., 1990) amplified most fungi but not Tulasnellaceae; the basidiomycetes-
164 specific primer set 1F/4B (Gardes and Bruns, 1993) amplified most basidiomycetes but not
165 Tulasnellaceae and Sebacinales; the Sebacinales-specific primer set 3Seb/TW13 amplifying ITS2
166 plus the 5Õpart of 28S rDNA (Selosse *et al*., 2007); and the Tulasnellaceae-specific primer set
167 1/4Tul. We subsequently amplified the 5Õpart of 28S rDNA by using the Tulasnellaceae-specific

primer set 5.8STul/TW13 (Suarez *et al*., 2006). The sequencing was performed from both strands directly or, after cloning, whenever multiple amplifications were obtained as in Julou *et al*. (2005): in this case, five clones were sequenced from each successful cloning. Fungal sequences were edited in Geneious Pro 5.0.2, identified by Blast analysis against GenBank, and then deposited in GenBank (NCBI; www.ncbi.nlm.nih.gov; AFXXX-AFXXX). We applied a 3% divergence threshold to the ITS sequences to circumscribe fungal operational taxonomic units (OTUs), which is the usual estimate for speciesÕdelimitation across basidiomycetes (Hughes *et al*., 2009) and which has recently been applied to delimitate the fungal symbionts of European *Orchis* species (Jacquemyn *et al*., 2010).

A multiple sequence alignment was done from the longest sequence of each OTU that we designated as mycorrhizalÑ including the ITS plus the 5Õpart of the 28s rDNAÑ by using the E-INS-i algorithm in MAFFTv6 that is recommended for sequences with multiple conserved domains and long gaps. The alignment was edited in MacClade 4.08 in order to specify sets of characters and taxa. Due to heterogeneity in the ITS1 and ITS2 sequences where the alignment failed, these two domains were excluded prior to phylogenetic analyses. Phylogenetic analyses were performed by heuristic searches using both Maximum Parsimony (MP) and Maximum Likelihood (ML) criterions, followed by 500 repetitions bootstrap analyses in PAUP 4.0b10 (Swofford, 2002). For the 5.8s and 28s aligned domains, we designated models of nucleotide substitutions by calculating approximate AIC values in MrModelTest 2.3 (Nylander, 2004) prior to ML analysis.

**Nature and structure of the mycorrhizal networks**

We designed the overall matrix of association including the frequency of each rhizoctonia OTU for each orchid species (matrix 1). The interaction network included 360 links involving the rhizoctonia fungi recorded in the study. We investigated the overall nestedness of this network, i.e. the tendency of specialized species to associate with some partners of more generalized species. In a perfectly nested network, generalized species interact with generalized partners and specialized species interact with a subset of interaction partners of more generalized species, so that generalists form a core in the interaction network (Bascompte *et al.*, 2003). We calculated the nestedness using the *binmatnest* method (Rodr□guez-Giron□s and Santamar□a, 2006) as implemented in the nestedness function of the bipartite package of R (Dormann *et al*., 2008), and

198 used three different null models with 1,000 randomizations to check for statistical significance of
199 the nestedness pattern. We further assessed the overall interaction strength asymmetry of this
200 network, i.e. the imbalance in the interaction strength/dependence of both interacting levels
201 (Bascompte *et al*., 2006). We used the *ISA* method (Blüthgen *et al*., 2007) as implemented in the
202 *networklevel* function of the bipartite package of R (Dormann *et al*., 2008), and three different
203 null models with 1,000 randomizations were used to check for statistical significance. We
204 subsequently investigated separately the structure of the association for epiphyte and terrestrial
205 orchids by applying the same framework to the corresponding submatrices.

206 **Phylogenetically-informed analysis of the mycorrhizal networks**

207 We restricted the subsequent phylogenetically-informed analysis to a matrix of mycorrhizal
208 associations including the frequency of each rhizoctonia OTU for each orchid genus (matrix 2)
209 because we could not get enough phylogenetic resolution at species level for all the orchids we
210 sampled. We tested whether closely related orchids were more likely to associate with related
211 fungus and whether closely related fungi were more likely to associate with related orchids, by
212 applying the method of Ives and Godfray (2006) to the matrix 2 (all genera). Linear models were
213 used to fit the phylogenetic variance-covariance matrix to the association matrix, and thereby
214 enabled to assess the strength of the phylogenetic signal. The significance and the nature of the
215 signal were discussed by comparing the mean square error (MSE) of this model with the actual
216 data ($MSE_d$), the MSE derived under the assumption of no phylogenetic signal ($MSE_s$) and the
217 MSE assuming maximum phylogenetic signal under Brownian motion ($MSE_b$). Whether MSEd
218 was closer to MSEs or to MSEb informed on the strength of the signal. The model further yielded
219 two independent indexes of phylogenetic structure based on the plant and the fungal phylogenies,
220 namely $d_p$ and $d_f$, which helped to detect some asymmetry in the phylogenetic constraint for each
221 partner. We used the *pblm* function in the *picante* package of R (Kembel *et al*. 2008) to perform
222 these analyses. We likewise analyzed separately two submatrices of matrix 2, including the
223 epiphyte and terrestrial orchid genera respectively, to assess any variation in evolutionary
224 constraints in such contrasted ecological contexts. To focus on epiphytic orchids at species level,
225 we finally analyzed a submatrix of matrix 1 including the epiphytic species belonging to the
226 Angraecoids clade (matrix 3, 177 links) because a reliable phylogeny was available at species
227 level.

228

229 **Results**

230 We observed pelotons in the roots of all the plant individuals, but terrestrial species generally
231 showed a higher mycorrhizal colonization than epiphytic orchids. We detected 549 diverging
232 fungal sequences (all primer sets included; Fig. 2) on 453 individuals belonging to 78 orchid
233 species. We found at least one fungal sequence for all but three orchid species. Most sequences
234 (n=360 in 73 orchid species) were from rhizoctonia fungi, i.e. Tulasnellaceae (n=248 in 68
235 species; only amplified with the Tulascellaceae-specific primer set), Sebacinales (n=64 in 32
236 species), and Ceratobasidiaceae (n=48 in 14 species) (Fig. 2a). Some Sebacinales (n=17) were
237 identified with the universal primer set through cloning, when they did not amplify with the
238 Sebacinales-specific primer set. Therefore, our reduced cloning effort with universal primer set
239 could have underestimated the occurrence of Sebacinales fungi. In addition, a few sequences of
240 non-rhizoctonia basidiomycetes were found, mainly Trechisporales (n=24 in 18 species) and
241 Atractiellales (n=8 in 7 species; Fig. 2a). Finally, sequences of ascomycetes that are related to
242 parasitic, endophytic or saprotrophic taxa were identified, mainly Chaetotyriales (n=50),
243 Capnodiales (n=27) and Hypocreales (n=16; Fig. 2b).

244 In order to test the robustness of the molecular typing, we repeated the overall procedure using
245 ten replicate colonized root sections in 15 randomly-selected plant individuals of 12 different
246 species. In every case, the same rhizoctonia sequences (i.e. sequences with more than 99%
247 similarity) were found, whereas ascomycetes sequences were rarely found twice (data not
248 shown). To corroborate the molecular assessment of fungal symbionts by hyphal morphology in
249 pelotons, we examined ultrathin root sections in 25 randomly-selected individuals of 21 different
250 species. Whenever healthy peloton hyphae were detected (n=11 individuals), they had
251 parenthosomes and cell walls that were typical for one of the rhizoctonia taxa. In every case, the
252 features were congruent with the molecular identifications from adjacent root sections, except for
253 two individuals where Tulasnellaceae were seen whereas they never amplified. Other common
254 basidiomycetes taxa, i.e. Trechisporales and Atractiellales, were not revealed by molecular
255 analyses in these 25 individuals. No ascomycete was seen in pelotons, suggesting that those
256 identified by cloning should not be mycorrhizal. Although we could not exclude the mycorrhizal

257 nature of some other fungal taxa, non-rhizoctonia fungi were not taken into consideration for
258 further analyses.

259 **Structure of the association of rhizoctonia OTUs and orchids**

260 We circumscribed 95 fungal OTUs from all sequences belonging to rhizoctonia fungi by
261 applying a ≤ 3% threshold to the ITS sequences, that is Tulasnellaceae (n=58), Sebacinales
262 (n=23) and Ceratobasidiaceae (n=14) (Fig. 2a). By regarding the distribution of the 95
263 rhizoctonia OTUs in terrestrial and epiphytic orchid species, we found these two orchid
264 communities associate with significantly different fungal partners (p-value<0.01, according to a
265 Monte-Carlo test). Ten out of 95 rhizoctonia OTUs were found in both terrestrial and epiphytic
266 orchids. The overall mycorrhizal network, as formed by 73 orchid species revealing mycorrhizal
267 associations, and 95 fungal OTUs displayed a significant nested structure (Matrix Temperature
268 T=4.46; p-value <0.001; Fig. 3), and a positive interaction strength asymmetry across both
269 interacting levels (ISA=0.05; P<0.01). This respectively meant that (i) specialized orchid species
270 tended to associate with some OTU partners of more generalized species, and so on, and that (ii)
271 the orchids tend to be more specialized than the mycorrhizal fungi. However, when analyzing
272 separately the association networks of epiphytic and terrestrial orchids, the mycorrhizal network
273 as formed by epiphytic orchids displayed a non-nested structure (T=47.7; p-value >0.03) in
274 opposition to the network formed by terrestrial orchids (T=7.03; p-value <0.001). This suggests
275 that the mycorrhizal networks as formed by epiphytic and terrestrial orchids do not show the
276 same ecological structure.

277 **Phylogenetic signal in the mycorrhizal association**

278 The overall phylogenetic structure of association based on orchid genera is very small if not
279 different from 0 for both orchids and fungi ($d_p$ = 0.12 and confidence interval is [0; 0.23]; $d_f$ =
280 0.07 and confidence interval is [0; 0.16]; Fig. 4). Furthermore the actual phylogenetic signal
281 (MSEd=0.54) does not depart from the situation of a star phylogeny (MSEstar = 0.57) and is
282 clearly far from the situation of maximum inertia (MSEb = 1.06). At this taxonomic resolution of
283 orchids, there is no phylogenetic structure in the association, hence the association is mainly
284 driven by recent ecological processes. We further analysed separately the association networks of
285 epiphytic and terrestrial orchids. In epiphytic situations, this signal was clearly higher for both

286 partners ($d_p$ =0.18, confidence interval is [0.12,0.25]; and $d_f$ = 0.24, confidence interval is [0.06,
287 0.32]) than in the terrestrial situations ($d_p$ =0.03, confidence interval is [0,0.16]; and $d_f$ = 0.03,
288 confidence interval is [0, 0.13]) where no phylogenetic structure was acknowledged. This
289 suggests that the evolutionary inertia is clearly stronger for orchids as well as for fungi in
290 epiphytic situations. We then analysed the data at species resolution for the epiphytic Angraecoid
291 clade. The independent phylogenetic signal of the fungi phylogeny was weak ($d_f$ = 0.01) and its
292 confidence interval included zero (95% limits, [0; 0.10]), while the independent orchid
293 phylogenetic signal was far stronger ($d_p$ = 0.27) and did not overlap zero (95% limits: [0.19;
294 0.61]; Fig. 5). The strength of the actual phylogenetic signal (MSEd = 0.24) was much closer to
295 the assumption of no phylogenetic structure (the star phylogeny: MSEstar = 0.24) than to the
296 assumption of maximum signal (Brownian motion evolution: MSEb = 0.38). Finally,
297 phylogenetic relationships among these orchids impose some structure on the association matrix
298 but not the phylogenetic relationships among fungi, and the overall phylogenetic signal is weak.
299 Because there was no signal in the overall analysis on orchid genera, this suggests that the ancient
300 evolutionary history of orchids does not play, but recent diversification at low taxonomic level
301 may have been driven by associations with fungi.

302

303 **Discussion**

304 **Tulasnellaceae are major symbionts of tropical orchids**

305 From the molecular assessment of the whole diversity of peloton-forming fungi, we found that
306 Tulasnellaceae were the main fungal symbionts of the tropical orchids we studied. Indeed, more
307 than 90% of the 78 terrestrial or epiphytic orchid species we investigated in La R□union
308 displayed one or several associations with Tulasnellaceae fungi. Tulasnellaceae have already
309 been identified as common symbionts of tropical epiphytic orchids (Suarez *et al*., 2006), as well
310 as in terrestrial species from temperate and Mediterranean regions (McCormick *et al*., 2004;
311 Jacquemyn *et al*., 2010; Roche *et al*., 2010). Regarding their distribution along the phylogeny of
312 Orchidaceae, they have been reported in the more basal orchid lineages Apostasioideae
313 (Kristiansen *et al*., 2004), Vanillioideae (Porras-Alfaro and Bayman, 2007) and Cypripedioideae
314 (Shefferson *et al*., 2005), and in the more recent orchid lineage Higher Epidendroideae (Yukawa

315 *et al*., 2009), as well as in many different orchid genera within the lineages Orchidioideae and
316 Epidendroideae (as in the present study). But the results here further stress the relative
317 prominence of this group against other lineages of fungi. This is all the more important that
318 Tulasnellaceae appear to be the major fungal symbionts of the Orchidaceae, whereas those
319 involved in other common mycorrhizal symbioses with plants rarely belong to Tulasnellaceae.
320 Two groups of basidiomycetes were often identified, namely Actractiellales and Trechisporales.
321 Atractiellalles belong to the group of rust species (i.e. Pucciniomycetes) that have been already
322 reported in neotropical orchid species (Kottke *et al*., 2010), but Trechisporales were never
323 reported as developping mycorrhizal associations. Further research is needed to confirm these
324 original results on the mutualistic behavior of these basidiomycetes, by performing more TEM
325 observations of detected samples.

326 **Weak host specificity, nestedness and asymmetry of the association network**

327 In this study, we frequently identified more than one OTU of rhizoctonia fungi for a given orchid
328 species, within an individual or even within a root. Although most of the individuals associate
329 with one or two Tulasnellaceae, associations with Sebacinales clade B or Ceratobasidiaceae were
330 not excluded. However, Sebacinales clade B and Ceratobasidiaceae were rarely found within the
331 same plant. The significant nestedness of the matrix of association implies that specialists interact
332 with species that form well-defined subsets of the species with which generalists interact
333 (Bascompte and Jordano, 2007; Bascompte *et al*., 2003). That means that there is a core of
334 generalist orchid and fungi species that interact together and thereby a few species are involved in
335 many interactions. More specialized species then interact with more generalist ones, and the
336 structure contributes to the overall cohesion and the persistence of specialists in mutualistic
337 networks (Bascompte *et al*., 2003). Our work is only the second one to highlight such structure in
338 an orchid-fungi mycorrhizal system (Jacquemyn *et al*., 2010), but the first to highlight the pattern
339 in a tropical context and for epiphytic orchids.

340 **Phylogenetic signal and evolutionary perspective**

341 The phylogenetic structure of the association network was found to be weak, when considering
342 all the orchid genera along with the corresponding fungi. This suggests that the current overall
343 assemblage is driven by recent ecological forces rather than by ancient evolutionary trends.

However, we found the phylogenetic signal of the association to dramatically increase when focusing on the situation of epiphytic orchids. This suggests that the orchid-fungi association in epiphytic conditions is more clearly associated to ancient coevolutionary forces and retains ancestral relationships at some level of the phylogeny. What is more, the phylogenetic signal was detected among the epiphytic Angraecoids orchid species. The pattern among Angraecoids is consistent with the results of Vazquez *et al*. (2009) on plant-pollinator networks.

Further research is needed to understand the role of multiple-fungi partners during the life of orchids. The establishment of young orchids is quite dependent upon developing associations with fungi, hence the opportunity to associate with many taxa may increase the survival and the orchid fitness. On the other hand, there may be a variation in association during the life cycle of the orchid, and different species may be involved at different periods and under different conditions (McCormick *et al*., 2006), and even the trophic nature relationship may change.

## References


Arditti, J. and Ghani, A.K.A. 2000 Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytologist* 145(3), 367-421.

Bascompte, J. and Jordano, P. 2007 Plant-animal mutualistic networks: the architecture of biodiversity. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 38(1), 567-593.

Bascompte, J., Jordano, P. and Olesen, J.M. 2006 Asymmetric coevolutionary networks facilitate biodiversity maintenance. *Science* 312(5772), 431-433.

Bascompte, J., Jordano, P., Meli□n, C.J. and Olesen, J.M. 2003 The nested assembly of plantÑ animal mutualistic networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 100, 9383-9387.

Benzing, D.H. 1990 *Vascular epiphytes: general biology and related biota*. Cambridge : Cambridge University Press.

Bernard, N. 1899 Sur la germination du *Neottia nidus-avis*. *Comptes Rendus Hebdomadaires Des S□ances de lÕAcad□mie Des Sciences* 128, 1253-1255.

Blomberg, S.P., Garland, J.R. and Ives, A.R. 2003 Testing for phylogenetic signal in comparative data: behavioral traits are more labile. *Evolution* 57(4), 717-745.

Bl□thgen, N., Menzel, F., Hovestadt, T., Fiala, B. and Bl□thgen N. 2007 Specialization, constraints and conflicting interests in mutualistic networks. *Current Biology* 17, 1Ð6.

Cadet, L.J.T. 1977 La v□g□tation de l'□le de la R□union: □tude phyto□cologique et phytosociologique. Th□se de doctorat, Universit□dÕAix-Marseilles.

Cameron, D.D., Leake, J.R. and Read, D.J. 2006 Mutualistic mycorrhiza in orchids: evidence from plant-fungus carbon and nitrogen transfers in the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens. New Phytologist* 171(2), 405-416.

Cavender-Bares, J., Kozak, K.H., Fine, P.V.A. and Kembel, S.W. 2009 The merging of community ecology and phylogenetic biology. *Ecology Letters* 12, 693-715.

Chase, M., Cameron, K., Barrett, R. and Freudenstein, J. 2003 DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. In *Orchid Conservation*, pp.69-89. Kota Kinabalu, Sabah: Natural History Publications (Borneo).

Cozzolino, S. and Widmer, A. 2005 Orchid diversity: an evolutionary consequence of deception? *Trends in Ecology and Evolution* 20, 487-494.

Cribb, P., Kell, S., Dixon, K. and Barrett, R. 2003 Orchid conservation: a global perspective. In *Orchid Conservation*, pp. 1-24.

Dearnaley, J.D.W. 2007 Further advances in orchid mycorrhizal research. *Mycorrhiza* 17(6), 475-486.

Dormann , C.F., Gruber, B. and Fr□nd J. 2008 The bipartite Package, version 0.5. R Project for Statistical Computing.

Dressler, R. L. 2006 How many orchid species? *Selbyana* 26, 155-158.

Dressler, R.L. 1981 *The orchids: natural history and classification*. Cambridge: Harvard University Press.

Gardes, M. and Bruns, T. 1993 ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetesÑ application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2(2), 113-118.

Gravendeel, B., Smithson, A., Slik, F.J.W.and Schuiteman, A. 2004 Epiphytism and pollinator specialization: drivers for orchid diversity? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 359, 1523-1535.

Hughes, K.W., Petersen, R.H. and Lickey, E.B. 2009 Using heterozygosity to estimate a percentage DNA sequence similarity for environmental speciesÕ delimitation across basidiomycete fungi. *New Phytologist* 182(4), 795-798.

Ives, A.R. and Godfray, H.C.J. 2006 Phylogenetic analysis of trophic associations. *American Naturalist* 168, E1-E14.

Jacquemyn, H., Honnay, O., Cammue, B., Brys, R. and Lievens, B. 2010 Low specificity and nested subset structure characterize mycorrhizal associations in five closely related species of the *Orchis*. *Molecular Ecology* 19, 4086-4095.

Julou, T., Burghardt, B., Gebauer, G., Berveiller, D., Damesin, C. and Selosse, M.A. 2005 Mixotrophy in orchids: insights from a comparative study of green individuals and nonphotosynthetic individuals of *Cephalanthera damasonium*. *New Phytologist* 166(2), 639-653.

Kembel, S.W., Cowan, P.D., Helmus, M.R., Cornwell, W.K., Morlon, H., Ackerly, D.D., Blomberg, S.P. and Webb, C.O. 2010 Picante: R tools for integrating phylogenies and ecology. *Bioinformatics* 26, 1463-1464.

Kottke, I., Su□rez, J.P., Herrera, P., Cruz, D., Bauer, R., Haug, I. and Garnica, S. 2010 Atractiellomycetes belonging to the ÔrustÕlineage (Pucciniomycotina) form mycorrhizae with terrestrial and epiphytic neotropical orchids. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 277(1685), 1289-1298.

Kristiansen, K.A., Freudenstein, J.V., Rasmussen, F.N. and Rasmussen, H.N. 2004 Molecular identification of mycorrhizal fungi in *Neuwiedia veratrifolia* (Orchidaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 33(2), 251-258.

Leake, J.R. 1994 The biology of myco-heterotrophic ('saprophytic') plants. *New Phytologist* 127(2), 171-216.

Martos, F., Dulormne, M., Pailler, T., Bonfante, P., Faccio, A., Fournel, J., Dubois, M.P. and Selosse, M.A. 2009 Independent recruitment of saprotrophic fungi as mycorrhizal partners by tropical achlorophyllous orchids. *New Phytologist* 184, 668-681.

McCormick, M., Whigham, D., Sloan, D., O'Malley, K. and Hodkinson, B. 2006 Orchid-fungus fidelity: a marriage meant to last? *Ecology* 87(4), 903-911.

McCormick, M.K., Whigham, D.F. and O'Neill, J. 2004 Mycorrhizal diversity in photosynthetic terrestrial orchids. *New Phytologist* 163(2), 425-438.

Micheneau, C., Carlsward, B., Fay, M., Bytebier, B., Pailler, T. and Chase, M. 2008 Phylogenetics and biogeography of Mascarene angraecoid orchids (Vandeae, Orchidaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, Elsevier, 2008, 46, 908-922.

Moore, R.T. The genera of *Rhizoctonia*-like fungiÑ *Ascorhizoctonia*, *Ceratorhiza* Gen-Nov, *Epulorhiza* Gen-Nov, *Moniliopsis*, and *Rhizoctonia*. *Mycotaxon* 29, 91-99.

Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., da Fonseca, G.A.B, and Kent, J. 2000 Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403, 853-858.

Nylander, J.A.A. 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.

Ogura-Tsujita, Y., Gebauer, G., Hashimoto, T., Umata, H. and Yukawa, T. 2009 Evidence for novel and specialized mycorrhizal parasitism: the orchid *Gastrodia confusa* gains carbon from saprotrophic *Mycena*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 276, 761-767.

Otero, J., Ackerman, J. and Bayman, P. 2002 Diversity and host specificity of endophytic *Rhizoctonia*-like fungi from tropical orchids. *American Journal of Botany* 89(11), 1852-1858

Otero, J., Ackerman, J. and Bayman, P. 2004 Differences in mycorrhizal preferences between two tropical orchids. *Molecular Ecology* 13(8), 2393-2404.

Otero, J., Flanagan, N., Herre, E., Ackerman, J. and Bayman, P. 2007 Widespread mycorrhizal specificity correlates to mycorrhizal function in the neotropical, epiphytic orchid *Ionopsis utricularioides* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 94(12), 1944-1950.

Otero, J.T. and Flanagan, N.S. 2006 Orchid diversity-beyond deception. *Trends in Ecology and Evolution* 21, 64-65.

Porras-Alfaro, A. and Bayman, P. 2007 Mycorrhizal fungi of *Vanilla*: diversity, specificity and effects on seed germination and plant growth. *Mycologia* 99(4), 510-525.

Rasmussen, H.N. 1995 *Terrestrial orchids: from seed to mycotrophic plant*. Cambridge: Cambridge University Press.

Rezende, E. L., Jordano, P. and Bascompte, J. 2007 Effects of phenotypic complementarity and phylogeny on the nested structure of mutualistic networks. *Oikos* 116, 1919-1929.

Roche, S.A., Carter, R.J., Peakall, R., Smith, L.M., Whitehead, M.R. and Linde, C.C. 2010 A narrow group of monophyletic *Tulasnella* (Tulasnellaceae) symbiont lineages are associated with multiple species of *Chiloglottis* (Orchidaceae): Implications for orchid diversity. *American Journal of Botany* 97(8), 1313-1327.

Rodr□guez-Giron□s M.A. and Santamar□a L. 2006 A new algorithm to calculate the nestedness temperature presence-absence matrices. *Journal of Biogeography* 33, 924-935.

Roy, M., Watthana, S., Stier, A., Richard, F., Vessabutr, S. and Selosse, M.A. 2009 Two mycoheterotrophic orchids from Thailand tropical dipterocarpacean forests associate with a broad diversity of ectomycorrhizal fungi. *BMC biology* 7, 51-68.

Selosse, M.A., Dubois, M.P. and Alvarez, N. 2009 Do Sebacinales commonly associate with plant roots as endophytes? *Mycological Research* 113, 1062-1069.

Selosse, M.A., Setaro, S., Glatard, F., Richard, F., Urcelay, C. and Wei§, M. Sebacinales are common mycorrhizal associates of Ericaceae. *New Phytologist* 174, 864-878.

Shefferson, R.P., Wei§, M., Kull, T. and Taylor, D.L. 2005 High specificity generally characterizes mycorrhizal association in rare lady's slipper orchids, genus *Cypripedium*. *Molecular Ecology* 14(2), 613-626.

Smith, S.E. and Read, D.J. 1997 *Mycorrhizal symbiosis*, 2nd edition. San Diego: Academic Press.

Strasberg, D., Rouget, M., Richardson, D.M., Baret, S., Dupont, J. and Cowling, R.M. 2005 An assessment of habitat diversity and transformation on La R□union Island (Mascarene Islands, Indian Ocean) as a basis for identifying broad-scale conservation priorities. *Biodiversity and Conservation* 14(12), 3015-3032.

Su□rez, J., Wei§, M., Abele, A., Garnica, S., Oberwinkler, F. and Kottke, I. 2006 Diverse tulasnelloid fungi form mycorrhizas with epiphytic orchids in an Andean cloud forest. *Mycological Research* 110(11), 1257-1270.

Su□rez, J., Wei§, M., Abele, A., Oberwinkler, F. and Kottke, I. 2008 Members of Sebacinales subgroup B form mycorrhizae with epiphytic orchids in a neotropical mountain rain forest. *Mycological Progress* 7(2), 75-85.

Swofford, D.L. 2002. PAUP* Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Taylor, D.L., Bruns, T.D., Leake, J.R. and Read, D.J. 2002 Mycorrhizal specificity and function in myco-heterotrophic plants. In *Mycorrhizal Ecology*, pp.375-414. Berlin, Germany: Springer-Verlag.

Th□bault, E. and Fontaine, C. 2008 Does asymmetric specialization differ between mutualistic and trophic networks? *Oikos* 117(4), 555-563.

Th□bault, E. and Fontaine, C. 2010 Stability of Ecological Communities and the Architecture of Mutualistic and Trophic Networks. *Science* 329(5993), 853-856.

Tremblay, R.L., Ackerman, J.D., Zimmerman, J.K. and Calvo, R.N. 2005 Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. *Biological Journal of the Linnean Society* 84, 1-54.

499 V□zquez, D.P., Chacoff, N.P. and Cagnolo, L. 2009. Evaluating multiple determinants of the
500 structure of plant-animal mutualistic networks. *Ecology* 90, 2039-2046.

501 White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. and others. 1990 Amplification and direct sequencing of
502 fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and*
503 *applications* 18, 315-322.

504 Yamato, M., Yagame, T., Suzuki, A. and Iwase, K. 2005 Isolation and identification of
505 mycorrhizal fungi associating with an achlorophyllous plant, *Epipogium roseum*
506 (Orchidaceae). *Mycoscience* 46(2), 73-77.

507 Yukawa, T., Ogura-Tsujita, Y., Shefferson, R.P. and Yokoyama, J. 2009 Mycorrhizal diversity in
508 *Apostasia* (Orchidaceae) indicates the origin and evolution of orchid mycorrhiza. *American*
509 *Journal of Botany* 96(11), 1997-2009.

510 Zettler, L.W., Sharma, J. and Rasmussen, F.N. Mycorrhizal diversity. In *Orchid Conservation*,
511 pp. 205-226.

512

513 **Figure captions**

514 **Fig. 1** Map of La R□union Island depicting all survey sites in this study. Light grey: lowland
515 rainforests; dark grey: mountain rainforests; black: sub-alpine heathlands; hachured: lowland
516 semi-dry forests.

517 **Fig. 2** Fungal diversity found in the 78 studied orchid species. The numbers of fungal sequences
518 and OTUS are shown in brackets. Other putative mycorrhizal fungi are marked by a (*).

519 **Fig. 3** Ordered association matrix showing the nested structure in the overall mycorrhizal
520 network. Red: Tulasnellaceae; blue: Sebacinales; green: Ceratobasidiaceae. Species are ordered
521 from generalists (up) to specialists (down).

522 **Fig. 4** Analysis of phylogenetic signal in the network as formed by orchid genera. Red:
523 Tulasnellaceae; blue: Sebacinales; green: Ceratobasidiaceae; dp: signal in orchid phylogeny; df:
524 signal in fungal phylogeny. Confidence intervals are shown in square brackets.

525 **Fig. 5** Analysis of phylogenetic signal in the network as formed by Angraecoides species. Red:
526 Tulasnellaceae; blue: Sebacinales; green: Ceratobasidiaceae; dp: signal in orchid phylogeny; df:
527 signal in fungal phylogeny. Confidence intervals are shown in square brackets.

528

Figure 1

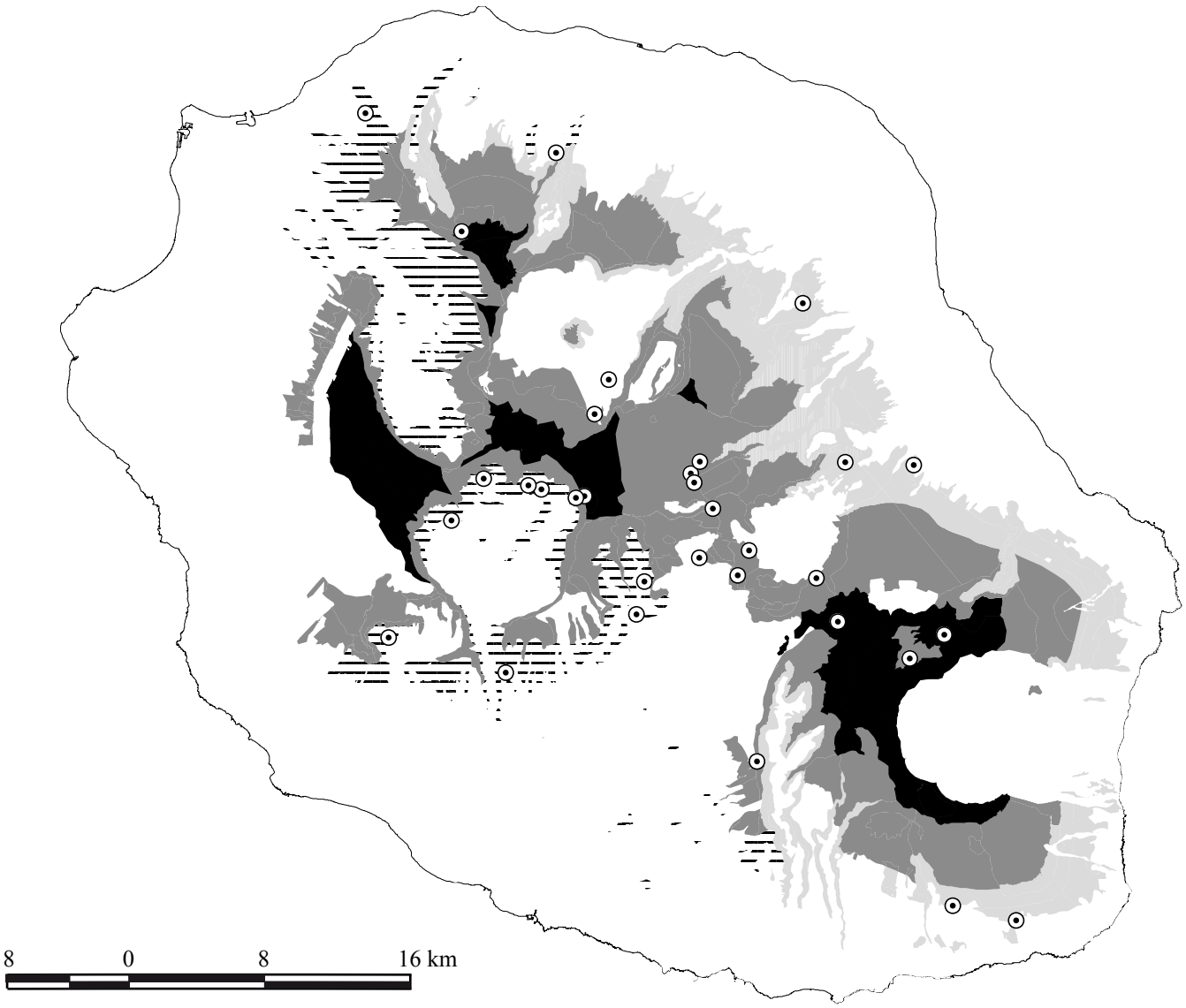


Figure 2

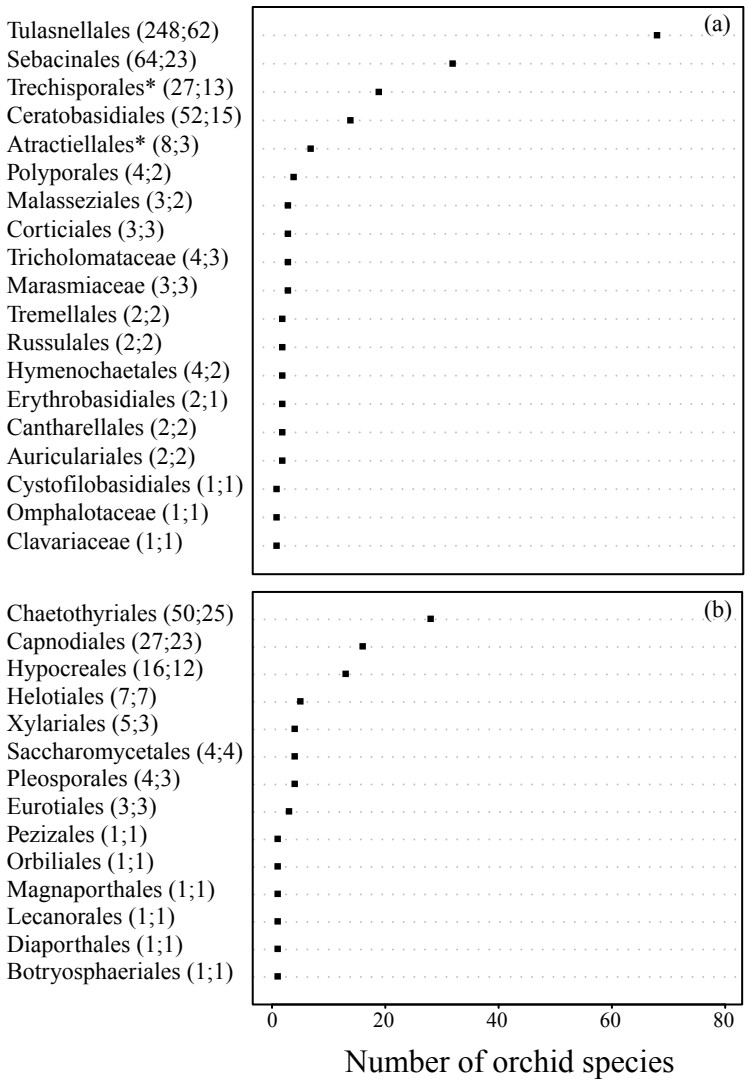

(a)
Tulasnellales (248;62)
Sebacinales (64;23)
Trechisporales* (27;13)
Ceratobasidiales (52;15)
Atractiellales* (8;3)
Polyporales (4;2)
Malasseziales (3;2)
Corticiales (3;3)
Tricholomataceae (4;3)
Marasmiaceae (3;3)
Tremellales (2;2)
Russulales (2;2)
Hymenochaetales (4;2)
Erythrobasidiales (2;1)
Cantharellales (2;2)
Auriculariales (2;2)
Cystofilobasidiales (1;1)
Omphalotaceae (1;1)
Clavariaceae (1;1)
(b)
Chaetothyriales (50;25)
Capnodiales (27;23)
Hypocreales (16;12)
Helotiales (7;7)
Xylariales (5;3)
Saccharomycetales (4;4)
Pleosporales (4;3)
Eurotiales (3;3)
Pezizales (1;1)
Orbiliales (1;1)
Magnaporthales (1;1)
Lecanorales (1;1)
Diaporthales (1;1)
Botryosphaeriales (1;1)
0
20
40
60
80
Number of orchid species

Figure 3

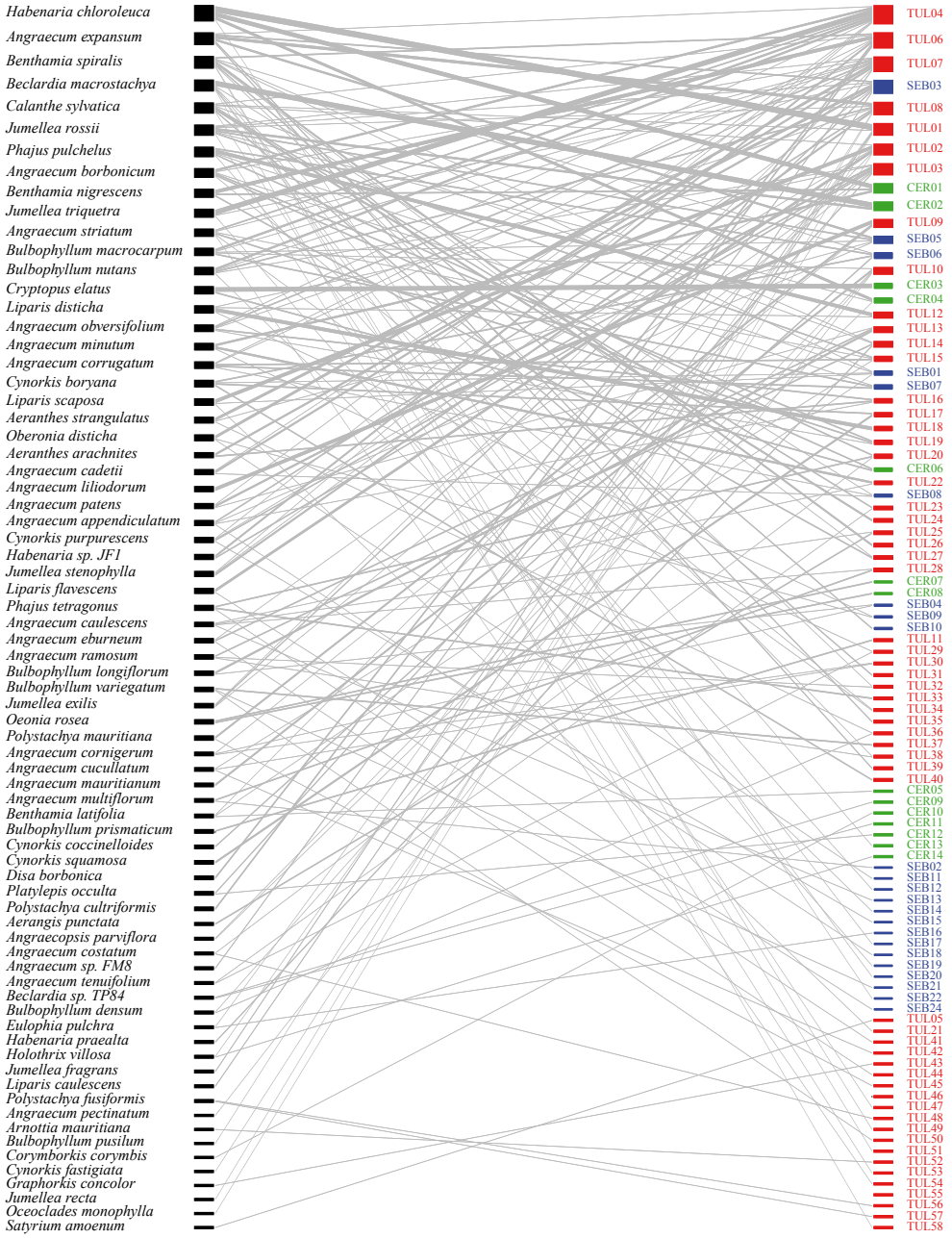

Habenaria chloroleuca
Angraecum expansum
Benthamia spiralis
Beclardia macrostachya
Calanthe sylvatica
Jumellea rossii
Phajus pulchelus
Angraecum borbonicum
Benthamia nigrescens
Jumellea triquetra
Angraecum striatum
Bulbophyllum macrocarpum
Bulbophyllum nutans
Cryptopus elatus
Liparis disticha
Angraecum obversifolium
Angraecum minutum
Angraecum corrugatum
Cynorkis boryana
Liparis scaposa
Aeranthes strangulatus
Oberonia disticha
Aeranthes arachnites
Angraecum cadetii
Angraecum liliodorum
Angraecum patens
Angraecum appendiculatum
Cynorkis purpurescens
Habenaria sp. JF1
Jumellea stenophylla
Liparis flavescens
Phajus tetragonus
Angraecum caulescens
Angraecum eburneum
Angraecum ramosum
Bulbophyllum longiflorum
Bulbophyllum variegatum
Jumellea exilis
Oeonia rosea
Polystachya mauritiana
Angraecum cornigerum
Angraecum cucullatum
Angraecum mauritianum
Angraecum multiflorum
Benthamia latifolia
Bulbophyllum prismaticum
Cynorkis coccinelloides
Cynorkis squamosa
Disa borbonica
Platylepis occulta
Polystachya cultriformis
Aerangis punctata
Angraecopsis parviflora
Angraecum costatum
Angraecum sp. FM8
Angraecum tenuifolium
Beclardia sp. TP84
Bulbophyllum densum
Eulophia pulchra
Habenaria praealta
Holothrix villosa
Jumellea fragrans
Liparis caulescens
Polystachya fusiformis
Angraecum pectinatum
Arnottia mauritiana
Bulbophyllum pusilum
Corymborkis corymbis
Cynorkis fastigiata
Graphorkis concolor
Jumellea recta
Oceoclades monophylla
Satyrium amoenum
TUL04
TUL06
TUL07
SEB03
TUL08
TUL01
TUL02
TUL03
CER01
CER02
TUL09
SEB05
SEB06
TUL10
CER03
CER04
TUL12
TUL13
TUL14
TUL15
SEB01
SEB07
TUL16
TUL17
TUL18
TUL19
TUL20
CER06
TUL22
SEB08
TUL23
TUL24
TUL25
TUL26
TUL27
TUL28
CER07
CER08
SEB04
SEB09
SEB10
TUL11
TUL29
TUL30
TUL31
TUL32
TUL33
TUL34
TUL35
TUL36
TUL37
TUL38
TUL39
TUL40
CER05
CER09
CER10
CER11
CER12
CER13
CER14
SEB02
SEB11
SEB12
SEB13
SEB14
SEB15
SEB16
SEB17
SEB18
SEB19
SEB20
SEB21
SEB22
SEB24
TUL05
TUL21
TUL41
TUL42
TUL43
TUL44
TUL45
TUL46
TUL47
TUL48
TUL49
TUL50
TUL51
TUL52
TUL53
TUL54
TUL55
TUL56
TUL57
TUL58

Figure 4

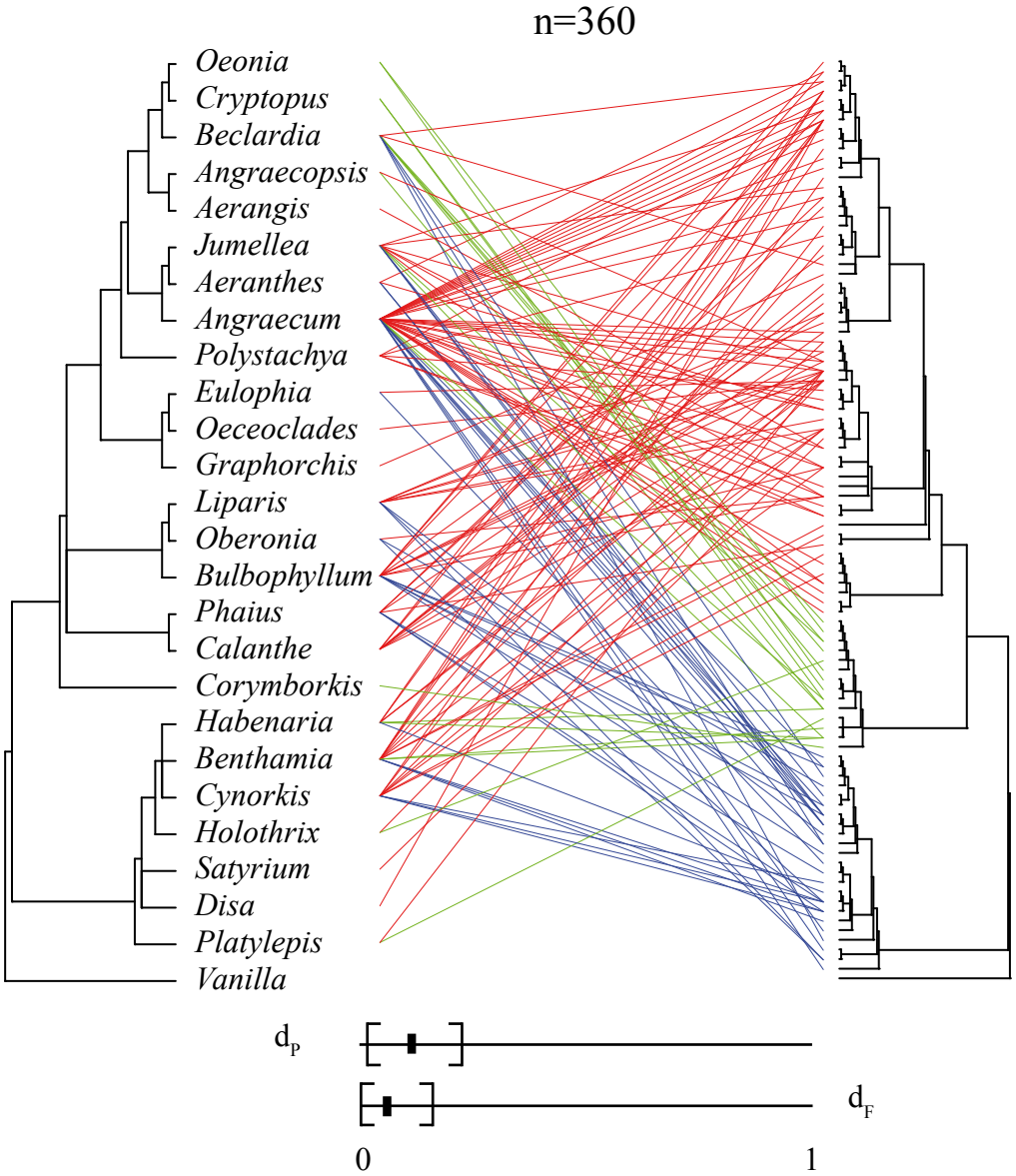
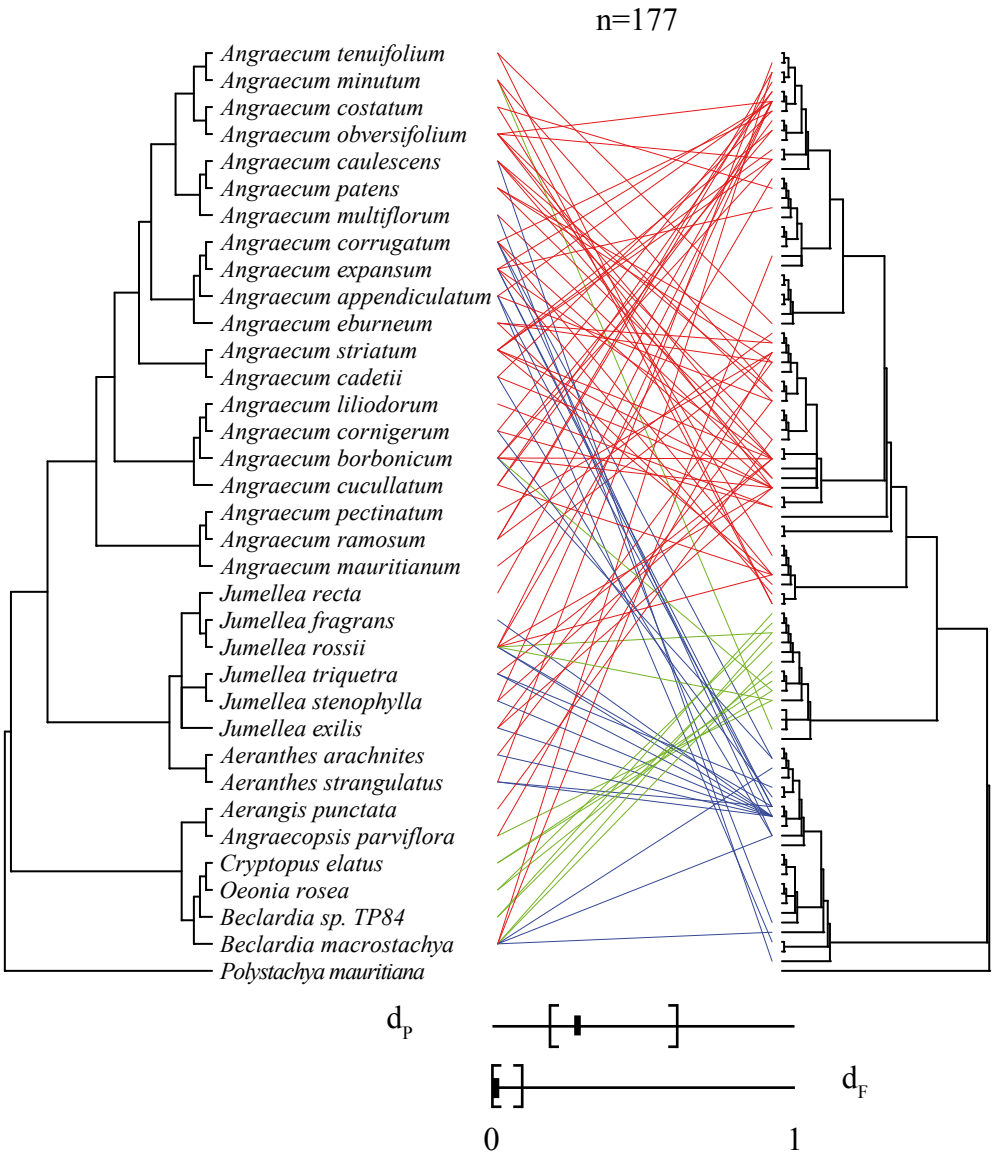

n=360
Oeonia
Cryptopus
Beclardia
Angraecopsis
Aerangis
Jumellea
Aeranthes
Angraecum
Polystachya
Eulophia
Oeceoclades
Graphorchis
Liparis
Oberonia
Bulbophyllum
Phaius
Calanthe
Corymborkis
Habenaria
Benthamia
Cynorkis
Holothrix
Satyrium
Disa
Platylepis
Vanilla
$d_P$
$d_F$
0
1

Figure 5


n=177
Angraecum tenuifolium
Angraecum minutum
Angraecum costatum
Angraecum obversifolium
Angraecum caulescens
Angraecum patens
Angraecum multiflorum
Angraecum corrugatum
Angraecum expansum
Angraecum appendiculatum
Angraecum eburneum
Angraecum striatum
Angraecum cadetii
Angraecum liliodorum
Angraecum cornigerum
Angraecum borbonicum
Angraecum cucullatum
Angraecum pectinatum
Angraecum ramosum
Angraecum mauritianum
Jumellea recta
Jumellea fragrans
Jumellea rossii
Jumellea triquetra
Jumellea stenophylla
Jumellea exilis
Aeranthes arachnites
Aeranthes strangulatus
Aerangis punctata
Angraecopsis parviflora
Cryptopus elatus
Oeonia rosea
Beclardia sp. TP84
Beclardia macrostachya
Polystachya mauritiana
$d_P$
$d_F$
0
1

# Troisième partie

# Synthèse des travaux de recherches

# Chapitre 8

# Diversité taxonomique et fonctionnelle des mycorhiziens tropicaux

Les inventaires taxonomiques des mycorhiziens d'orchidées sont largement biaisés en faveur des modèles terrestres tempérés, car les équipes de recherche intéressées par ces thématiques se situent surtout dans l'hémisphère Nord, en Amérique du Nord ou en Europe (Alexander et Selosse, 2009). À l'exception de quelques études réalisées sur des modèles épiphytes tropicaux en Amérique Centrale et en Amérique du Sud essentiellement (Otero *et al.*, 2002; Suárez *et al.*, 2006; Porras-Alfaro et Bayman, 2007; Kottke *et al.*, 2010), la connaissance des cortèges mycorhiziens est limitée dans les régions tropicales, là où les orchidées sont pourtant plus diversifiées (Dressler, 1981; Cribb *et al.*, 2003). De plus, les inventaires se limitent généralement à la connaissance du cortège d'une poignée d'espèces et non de la communauté, et le manque de données a pu entraver la compréhension des processus écologiques et évolutifs sous-jacents à cette symbiose. Face à ce constat, nous avons posé les questions suivantes : la diversité taxonomique des mycorhiziens tropicaux est-elle comparable à celle des régions tempérées et reflète-t-elle des processus fonctionnels analogues ? Existe-t-il des cortèges mycorhiziens distincts entre espèces terrestres et espèces épiphytes ? Nous discuterons ici des apports de la thèse à ces deux problématiques, à partir de l'étude des orchidées autotrophes de La Réunion, et des orchidées mycohétérotrophes de La Réunion et des Caraïbes.

## 8.1 Comme chez les modèles tempérés, les orchidées autotrophes tropicales s'associent aux rhizoctonias

Parmi les 78 espèces d'orchidées autotrophes étudiées à La Réunion, 73 ont révélé des associations avec un ou plusieurs des trois groupes de rhizoctonias (Tulasnellaceae, Sebacinales du clade B et Ceratobasidiaceae ; Article 5) qui étaient déjà connus comme partenaires mycorhiziens des orchidées des régions tempérées et de certaines régions d'Amérique tropicale (Figure 8.1 ; Otero *et al.*, 2002; Suárez *et al.*, 2006; Porras-Alfaro et Bayman, 2007).

Notre étude a également montré la nette prédominance des Tulasnellaceae comme partenaires mycorhiziens des espèces autotrophes de La Réunion (environ 93% ; 58 OTUs différents), bien que celles-ci appartiennent à des tribus distantes dans la phylogénie des orchidées (Article 5).
Ces résultats, à première vue, confortent l'hypothèse selon laquelle les rhizoctonias (i) sont associés aux orchidées de façon ancestrale (Yukawa *et al.*, 2009), et (ii) pourraient avoir une distribution géographique aussi large que celle des orchidées à l'échelle du globe. Néanmoins, ces taxons abritent chacun une très grande diversité de champignons, et il est aujourd'hui nécessaire d'étudier la répartition de chacun de ces taxons entre les différents biomes. C'est pourquoi, nous nous sommes associés à des projets de collaborations internationales visant à reconstruire des phylogénies moléculaires des Sebacinales et des Ceratobasidiaceae. La phylogénie moléculaire des Sebacinales (Article 4 ; Figure 8.2) a été réalisée pendant la thèse avec M. Weiss (Tübingen, Allemagne), et celle des Ceratobasidiaceae est en cours de traitement avec L. Tedersoo (Tartu, Estonie) mais un arbre peut d'ores et déjà être présenté (Figure 8.3).

Dans chaque phylogénie, on constate que les mycorhiziens des orchidées autotrophes n'appartiennent pas à un clade, mais sont dispersés au sein de plusieurs clades. Ceux qui ont été identifiés chez les espèces de La Réunion sont également dispersés dans plusieurs clades, dont certains sont retrouvés chez des modèles tempérés d'Europe et d'Amérique du Nord. Dans ce cas précis, ils correspondent généralement aux partenaires mycorhiziens d'espèces d'orchidées terrestres. L'absence générale de patron géographique dans les phylogénies des Sebacinales et des Ceratobasidiaceae suggère que ces champignons ont une grande capacité de dispersion à l'échelle globale, mais aussi qu'ils peuvent avoir une grande capacité d'adaptation à des conditions climatiques et écologiques variées. À une échelle systématique supra-spécifique, ceci va largement dans le sens du principe d'écologie microbienne "tout est partout et la Nature choisit", introduit par Becking (1895–1963), défendu par Beijerinck

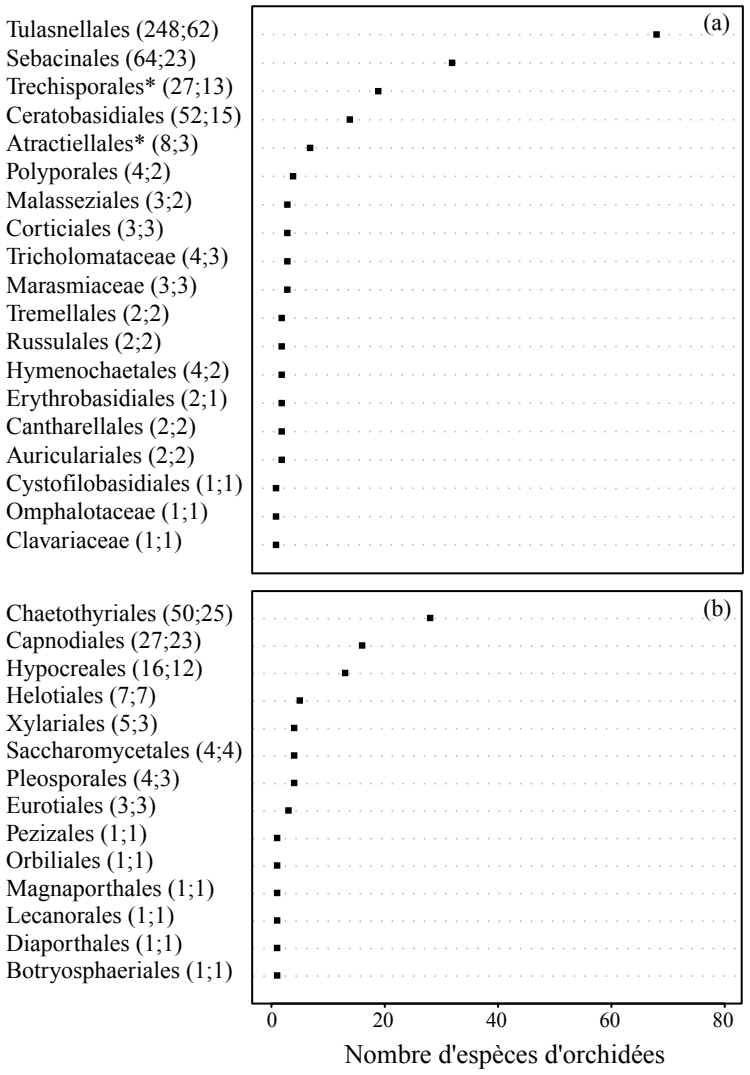



FIGURE 8.1 – Diversité taxonomique des mycorhiziens d'orchidées de La Réunion indiquant la fréquence des groupes fongiques identifiés dans 78 espèces d'orchidées. (a) Basidiomycètes ; (b) : Ascomycètes ; le nombre de séquences et le nombre d'OTUs différentes sont indiqués entre parenthèses ; * groupes taxonomiques potentiellement mycorhiziens mais qui n'ont pas pu être observés en microscopie électronique dans les pelotons (voir section 8.3).

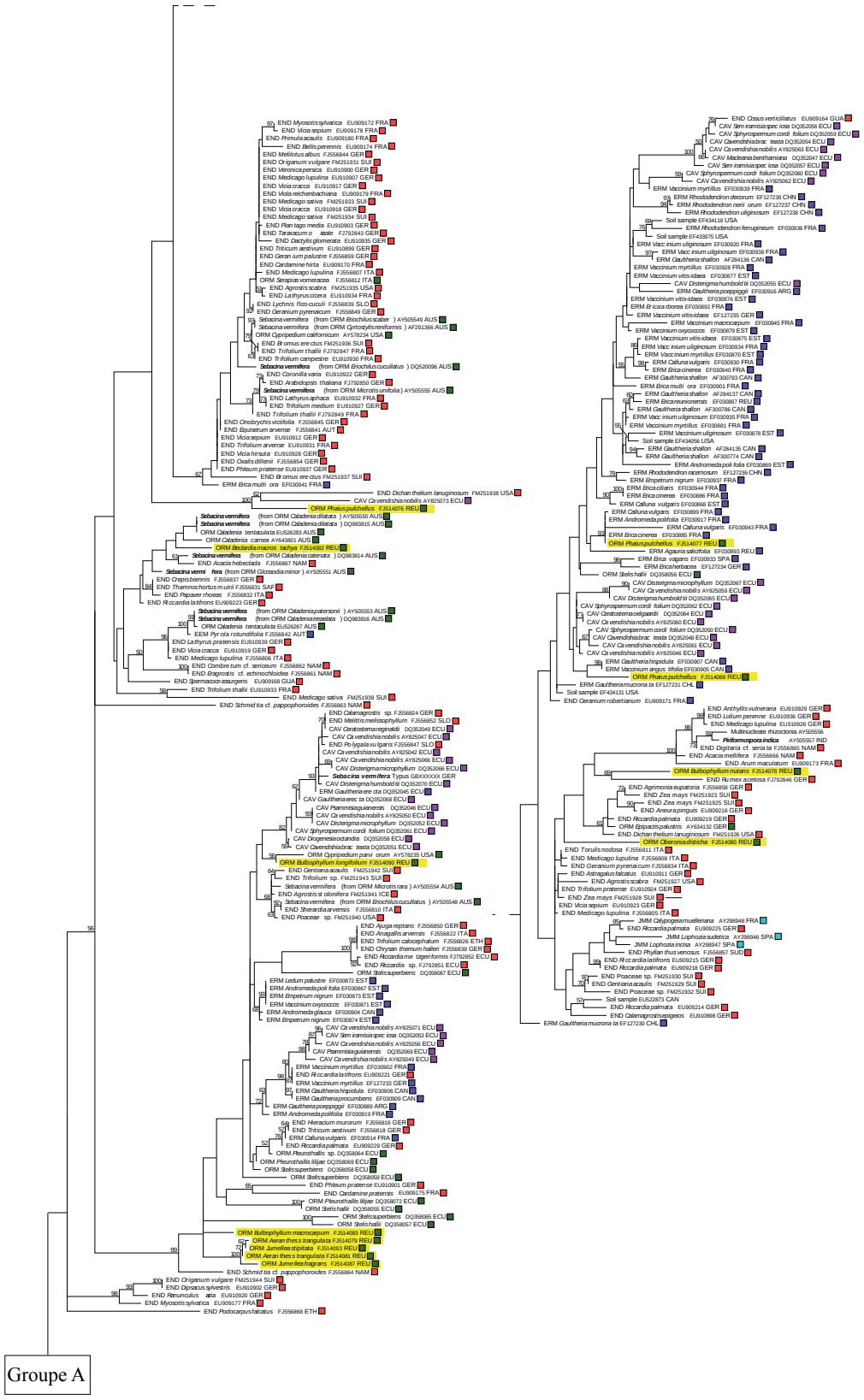



FIGURE 8.2 – Arbre phylogénétique des Sebacinales du groupe B (ADNr 28S) montrant les positions phylogénétiques de séquences identifiées à La Réunion. Carrés verts : mycorhiziens d'orchidées ; surlignages jaunes : mycorhiziens d'orchidées de La Réunion.

(1851-1931), et discuté encore aujourd'hui (O'Malley, 2007). Cependant, des clades de mycorhiziens d'orchidées ne sont retrouvés que dans des régions tropicales. C'est le cas, par exemple, d'un clade de Ceratobasidiaceae observé à La Réunion et au Japon, ou encore de deux clades de Sebacinales et de Ceratobasidiaceae qui ont été nouvellement identifiés à La Réunion (Figures 8.2 et 8.3). Nous remarquons alors que, lorsqu'un clade est inféodé aux régions tropicales, il ne regroupe que des partenaires mycorhiziens d'orchidées épiphytes. Dans la thèse, nous avons étudié la question des cortèges mycorhiziens entre orchidées terrestres et épiphytes, et ce à l'échelle de La Réunion. L'analyse a été réalisée à partir du réseau mycorhizien formé par 73 espèces d'orchidées terrestres ou épiphytes et 95 OTUs de rhizoctonias identifiées. Cette analyse a alors révélé l'existence de cortèges mycorhiziens distincts entre espèces épiphytes et espèces terrestres (Article 5) : sur les 95 OTUs de rhizoctonias identifiées, seuls 10 sont partagées entre des espèces terrestres et épiphytes.

Par ailleurs, la phylogénie des Sebacinales révèle que certaines orchidées terrestres ont des partenaires mycorhiziens proches des ceux des éricacées dont certaines ont été étudiées à La Réunion (Selosse *et al.*, 2007). C'est le cas par exemple des orchidées *Phaius spp.* qui vivent dans les sous-bois des forêts humides et qui peuvent s'associer à des Sebacinales proches de ceux de l'arbre endémique *Agauria salicifolia* (bois de rempart ; éricacée), ou encore des orchidées *Benthamia spp.* et *Cynorkis spp.* qui colonisent les végétations d'altitude à proximité des bruyères endémiques *Erica montana* et *Erica arborescens* (brandes vertes). La proximité des partenaires dans la phylogénie des Sebacinales et celle des plantes dans les habitats naturels ouvrent la possibilité de ponts mycorhiziens entre éricacées et orchidées et d'un transfert de nutriments entre ces plantes. À La Réunion, où des écosystèmes riches en éricacées et orchidées sont encore bien préservés (Strasberg *et al.*, 2005), ces hypothèses pourraient être envisagées dans le cadre d'une étude fonctionnelle. En effet, s'il est aujourd'hui admis que les symbioses ectomycorhiziennes et les symbioses endomycorhiziennes à arbuscules interconnectent les plantes dans les sols des forêts tempérées et tropicales respectivement (Simard *et al.*, 1997), le rôle des endomycorhizes à pelotons dans la formation de réseaux mycorhiziens communs n'a encore jamais été établi et constituerait de ce fait un axe de recherche original.
La prédominance des Tulasnellacae dans les associations mycorhiziennes des orchidées de La Réunion soulève des interrogations quant au biais possible des inventaires passés dans lesquels ces champignons ont été peu ou pas identifiés. En effet, la présence de ces partenaires dans les racines peut rester masquée lors des identifications moléculaires, car la divergence de leur séquence ITS ne permet pas leur amplification avec les amorces universelles ou avec les amorces spécifiques des Basidiomycètes. Leur identification nécessite l'utilisation d'amorces spécifiques de

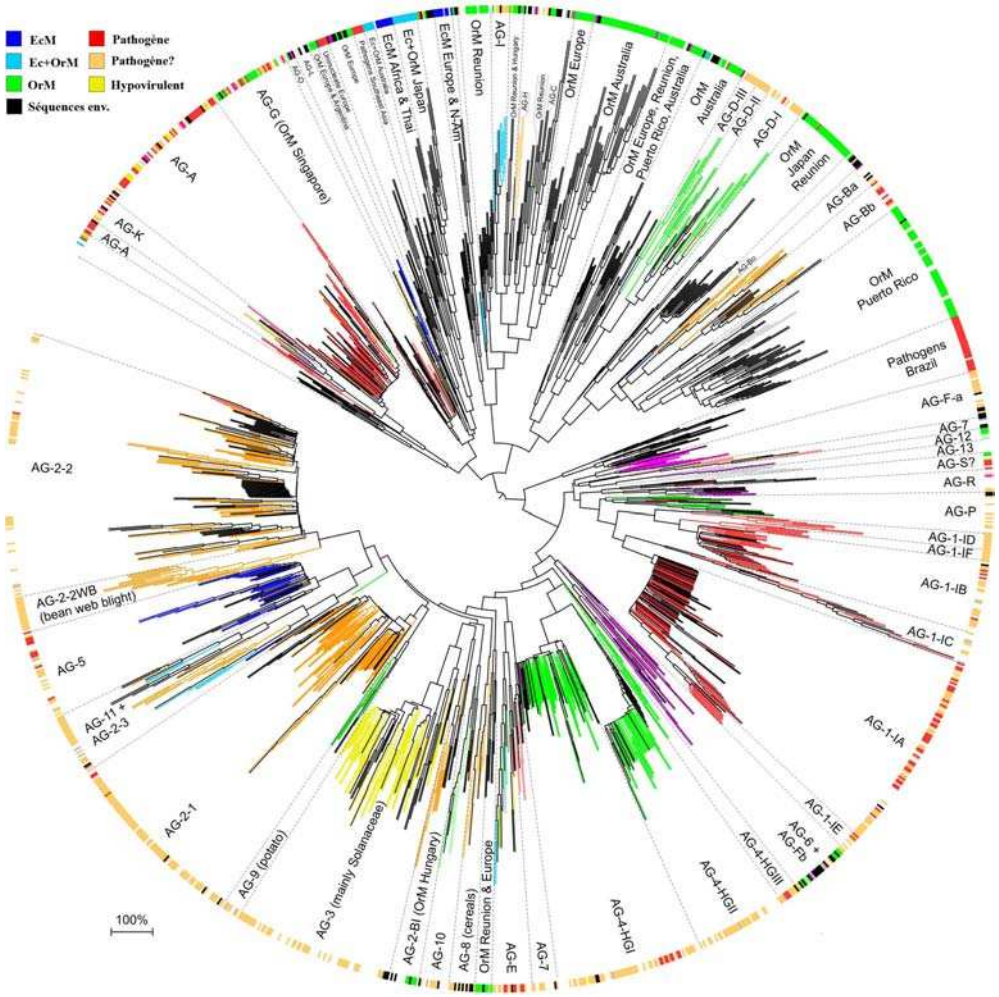



FIGURE 8.3 – Arbre phylogénétique des Ceratobasidiaceae (ADNr ITS+28S) montrant les positions phylogénétiques des clades de mycorhiziens identifiés à La Réunion. Vert : mycorhiziens d'orchidées ; bleu : ectomycorhiziens ; rouge, orange et jaune : pathogènes ; noir : séquences environnementales.

ce taxon (Taylor et McCormick, 2008; Suárez *et al.*, 2006 ; Article 5). De plus, certains Tulasnellaceae ne se développent pas en conditions artificielles (Zelmer *et al.*, 1996 ; Martos et Gonneau, com. pers.), et ont pu être contre-sélectionnés dans les études basées sur des isolements *in vitro*. Pour preuve, tous les inventaires récents réalisés à partir de méthodes moléculaires plus exhaustives identifient une majorité de Tulasnellaceae chez les orchidées épiphytes d'Amérique tropicale comme chez les orchidées terrestres tempérées et méditerranéennes (Suárez *et al.*, 2006, 2008; Jacquemyn *et al.*, 2010; Roche *et al.*, 2010). Ce groupe de champignons montre donc un rôle proéminent dans la symbiose mycorhizienne des orchidées, mais pour autant, il reste très peu connu relativement aux deux autres taxons de rhizoctonias. Son écologie réelle, probablement saprophyte (Smith et Read, 1997), reste mal cernée (car la colonisation de racines d'orchidées n'est sans doute qu'un phénotype marginal, comme pour les autres rhizoctonias). Il ne fait pas encore l'objet d'une phylogénie moléculaire de grande ampleur, probablement car on le croit peu impliqué dans les autres types de symbioses mycorhiziennes ou dans les pathologies des plantes. De plus, nous avons constaté au cours de la thèse que les fortes variations de son ADN ribosomal rendent difficiles les alignements de ce marqueur, qui reste le plus utilisé par défaut d'autres marqueurs. On s'attend toutefois à ce que les Tulasnellaceae abritent une grande diversité phylogénétique, compte tenu de la variation des séquences ITS identifiées dans les mycorhizes d'orchidées à ce jour, et peut-être une grande diversité d'écologie car certains clades pourraient être ectomycorhiziens (Bidartondo *et al.*, 2003). On suppose aussi que les clades sont largement distribués entre les biomes, car on retrouve sur la seule île de La Réunion tous les clades formés par les téléomorphes connus en Amérique et en Europe tempérées. Une étude future de la phylogénie moléculaire des Tulasnellaceae est envisagée par nos équipes de recherche avec pour objectif de tester si les partenaires tropicaux sont différents des partenaires tempérés (diversité phylogénétique), et de vérifier si les partenaires d'orchidées autotrophes peuvent appartenir à des clades ectomycorhiziens (diversité fonctionnelle).

En conclusion, la diversité taxonomique des mycorhiziens d'orchidées autotrophes tropicales est comparable à celle présente chez les orchidées autotrophes tempérées et méditerranéennes. Sur le plan phylogénétique, on identifie cependant des clades de mycorhiziens strictement tropicaux qui sont liés à des orchidées épiphytes. Sur le plan fonctionnel, les orchidées autotrophes tropicales ne s'associent jamais à des champignons ectomycorhiziens (sans doute peu présents dans l'île, faute de plantes hôtes), ni à des champignons parasites, mais à des champignons ayant probablement une écologie saprophyte en dehors de l'association et dont certains peuvent vivre à l'état latent dans les tissus végétaux (cas des Sebacinales endophytes ; Article 3). Enfin, la thèse permet de revisiter la distribution des taxons mycorhiziens connus

dans la phylogénie des orchidées (Figure 8.4).

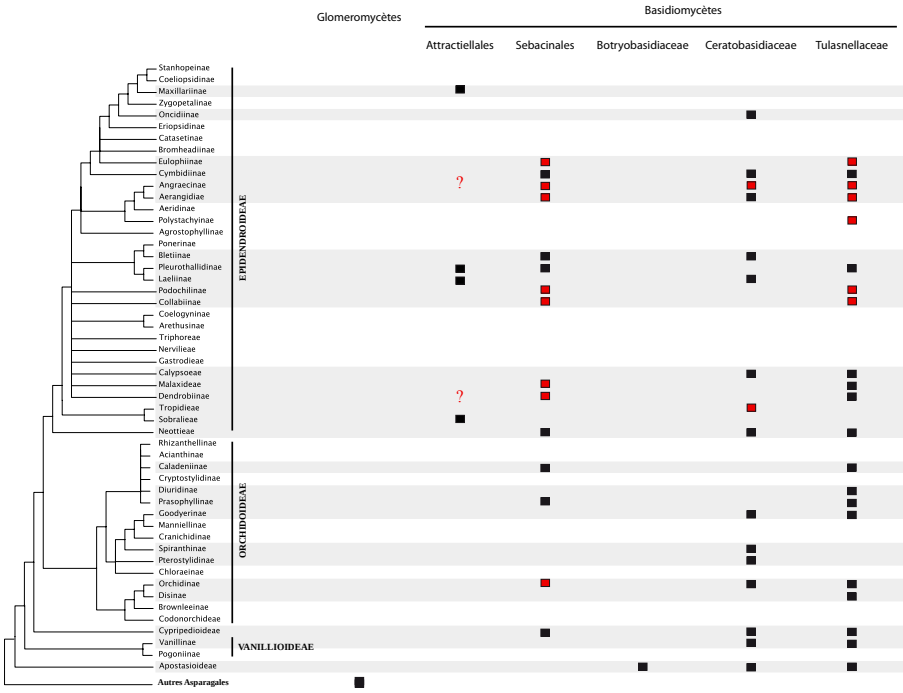



FIGURE 8.4 – Distribution actualisée des différents mycorhiziens dans la phylogénie des orchidées. Carrés rouges : nouvelles observations faites dans la thèse ; ? identifiés en biologie moléculaire mais pas démontrés

## 8.2 À la différence des modèles tempérés, les orchidées mycohétérotrophes tropicales peuvent s'associer à des saprophytes

Les deux espèces d'orchidées mycohétérotrophes, *Gastrodia similis* et *Wullschlaegelia aphylla* étudiées à La Réunion et en Guadeloupe respectivement, ont révélé des associations avec des partenaires atypiques dont certains n'étaient pas décrits comme mycorhiziens auparavant (Articles 1 et 2). Mais au-delà de ces originalités taxonomiques, ces espèces révèlent surtout un mode de mycohétérotrophie dissemblable à celui qui était connu de l'étude des modèles tempérés : en s'associant à des champignons saprophytes dans les forêts humides qu'elles habitent, ces plantes se nourrissent de carbone provenant de la dégradation des débris végétaux (Article 1). Ce résultat est d'autant plus inattendu que de très nombreux modèles tempérés avait été étudiés (Leake et Cameron, 2010).

L'espèce *G. similis* s'associe à un champignon (*Resinicium sp.*) classé parmi les

Hymenochaetales, tandis que *W. aphylla* recrute des champignons des Mycenaceae (mycènes) et des Marasmiaceae (marasmes). Parmi les mycènes, une espèce était connue pour induire la germination et les premiers stades de développement de l'orchidée *G. elata*, cultivée en Asie tropicale pour ses vertus médicinales et qui s'associe avec des armillaires parasites au stade adulte (Xu et Guo, 2000). Plusieurs espèces de mycènes ont également été identifiées comme partenaires mycorhiziens des plantes adultes de *G. confusa* au Japon dans une étude menée en parallèle à la nôtre (Ogura-Tsujita *et al.*, 2009). De même, les marasmes ont été identifiés chez plusieurs espèces d'orchidées mycohétérotrophes, comme *G. sesamoïdes* ou *Erythrorchis cassythioides* dans les forêts du Queensland en Australie (Dearnaley, 2006; Dearnaley et Bougoure, 2010). Nous pensons que des marasmes pourraient aussi développer des associations avec *G. confusa* au Japon, car ces champignons ont été identifiés dans les racines de plusieurs plantes, mais ont été écartés du cortège mycorhizien par les auteurs faute de preuve (et sans doute aussi car ils s'attendaient à une association spécifique ; voir section 9.2 ; Ogura-Tsujita *et al.*, 2009). En revanche, le genre *Resinicium* associé à l'orchidée *G. similis* à La Réunion n'a pas été retrouvé à ce jour, et pourrait potentiellement être rencontré chez les espèces mycohétérotrophes présentes à Madagascar qui sont proches de l'espèce réunionnaise (genres *Auxopus* et *Didymoplexis*). Selon T. Kuyper (com. pers.), le genre *Resinicium* pourrait ne pas être au sein des Hymenochaetales mais pourrait se trouver plus proches des Mycènes ; ce qui reste un point à prouver. Il est finalement surprenant de voir de parfaites associations mycorhiziennes avec ces champignons qui n'ont jamais été sélectionnés pour cela ; ceci suggérant que la plante orchestre tout, ou presque. Et ces associations sont d'autant plus surprenantes qu'elles sont apparues à plusieurs reprises par convergence, chez les orchidées mycohétérotrophes comme chez les champignons saprophytes (Article 2).

Ces champignons atypiques appartiennent à des groupes saprophytes, qui sont connus des mycologues pour former des communautés abondantes dans les litières des forêts tropicales humides et pour leur rôle important dans l'activité de décomposition de la matière organique dans ces habitats (Nakasone, 2007). C'est aussi le cas des Psathyrellaceae (coprins) qui ont été identifiés chez les espèces mycohétérotrophes *Epipogium roseum* et *Eulophia zollingeri* au Japon (Yamato *et al.*, 2005; Ogura-Tsujita et Yukawa, 2008). Leur identification comme partenaires mycorhiziens des orchidées mycohétérotrophes soulève inévitablement la question de l'origine du carbone acquis par ces plantes. Chez les deux espèces étudiées au cours de la thèse (Article 1), les signatures isotopiques du carbone et de l'azote mesurées dans les tissus des plantes (très différentes de celles des modèles tempérés), confirment tout d'abord que ces plantes reçoivent leur carbone de leurs partenaires fongiques. D'autre part, la comparaison de leurs signatures isotopiques avec celles qui ont été relevées dans

les sources potentielles présentes dans l'environnement valide nos hypothèses : *G. similis* peut obtenir du carbone provenant de la décomposition du bois, tandis que *W. aphylla* peut en recevoir de la dégradation de feuilles mortes. Il est aussi probable que leurs partenaires mycorhiziens respectifs soient spécialisés pour ces deux types de substrats. En effet, les plantes de *G. similis* sont parfois enracinées sur des troncs d'arbres couchés, sans contact possible avec le sol. Mais le plus souvent, elles sont enracinées au sol sur des résidus de bois mort appartenant à l'espèce endémique *Nuxia verticillata* (bois maigre ; famille des Loganiaceae), qui est certainement la source principale pour l'orchidée *G. similis*. Le bois maigre produit l'un des bois les plus denses et qui persiste le plus longtemps dans les sols des forêts littorales humides de La Réunion (Kirman *et al.*, 2001), et devrait de ce fait représenter une source de carbone suffisamment pérenne pour assurer le développement des individus et le maintien des populations de l'orchidée. L'orchidée *G. confusa*, qui s'associe à des mycènes et probablement à des marasmes, reçoit quant à elle du carbone provenant de la décomposition des bambous dans les forêts de *Phyllostachys spp.* au Japon (Ogura-Tsujita *et al.*, 2009). La chaleur et l'humidité des forêts tropicales sont plus favorables à une activité durable des champignons saprophytes qui devraient manipuler plus de carbone que dans les régions tempérées. Ils pourraient ainsi satisfaire plus sûrement les besoins d'une plante adulte dans les régions tropicales ; alors qu'en région tempérée, ils ne peuvent qu'assister, au plus, une germination mycohétérotrophe (cas des rhizoctonias ; voir section 1.3.1).

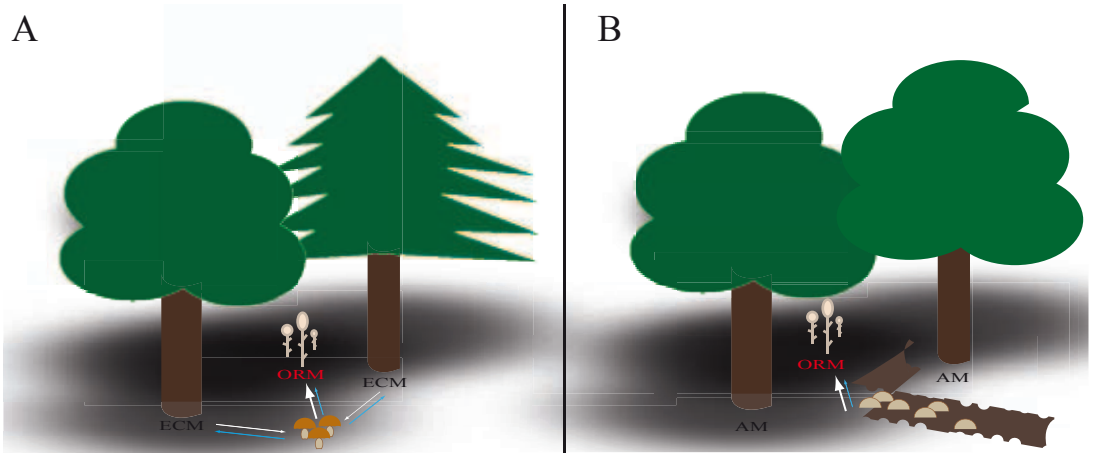



FIGURE 8.5 – Comparaison entre le fonctionnement des orchidées mycohétérotrophes tempérées et le saprophytisme de certaines orchidées mycohétérotrophes tropicales. ECM : ectomycorhizes ; ORM : endomycorhizes des orchidées ; flèches blanches : flux de carbone ; flèches bleues : flux d'eau et de sels minéraux (N, P).

Alors que les plantes mycohétérotrophes ont longtemps été considérées comme des plantes parasites s'associant exclusivement à des champignons mycorhiziens de

plantes autotrophes, il est surprenant de constater ici combien les études récentes sur les modèles tropicaux remettent en question notre compréhension du phénomène de mycohétérotrophie. Pour autant, le déterminisme des deux stratégies adoptées par les orchidées au cours de l'évolution vers la mycohétérotrophie n'est clairement pas résolu. Premièrement, les deux processus fonctionnels ne sont pas nécessairement déterminés par les positions phylogénétiques des orchidées. L'exemple des *Epipogium* est révélateur : tandis que l'espèce tropicale *E. roseum* s'associe à des coprins saprophytes (Yamato *et al.*, 2005), l'espèce tempérée *E. aphyllum* s'associe à des *Inocybes* ectomycorhiziens (Roy *et al.*, 2009b). Le groupe de champignons sélectionné n'est pas non plus contraint par la phylogénie des plantes, car les espèces congénères *G. similis*, *G. elata*, *G. confusa*, *G. sesamoïdes* s'associent respectivement à des Hymenochaetales, armillaires, mycènes et marasmes, qui sont distants dans la phylogénie des Basidiomycètes (ce qui pose d'ailleurs la question du mécanisme de changement de partenaire lors de la spéciation). Deuxièmement, bien que le saprophytisme des orchidées mycohétérotrophes ait toujours été observé dans des régions tropicales, il existe des contre-exemples dans certaines régions tropicales : les espèces *Cephalanthera exigua*, *Aphyllorchis montana* et *A. caudata* s'associent à divers champignons ectomycorhiziens (Russulaceae, Telephoraceae, Sebacinales groupe A, Clavulinaceae, Cortinariaceae et Amanitaceae) dans les forêts thaïlandaises à Dipterocarpaceae et à Fagaceae, où les champignons ectomycorhiziens sont représentés (Roy *et al.*, 2009a). De même, les espèces asiatiques *Cymbidium macrorhizon* et *C. aberrans* s'associent à des Russulaceae et à des Telephoraceae ectomycorhiziens, et les espèces chlorophylliennes *C. goeringii* et *C. lancifolium* qui leur sont directement apparentées peuvent aussi s'associer à ces partenaires.

Ces modèles représentent par ailleurs des cas idéaux pour comprendre les voies qui mènent à la mycohétérotrophie chez les orchidées. Les quatre espèces de *Cymbidium spp.* ont été étudiées dans cette perspective en collaboration avec T. Yukawa (*Tsukuba Botanical Garden*), et ce dans deux sites forestiers du Japon où elles coexistent. L'étude de la variation des signatures isotopiques du carbone a révélé un fort degré d'hétérotrophie dans les espèces non chlorophylliennes, mais surtout des degrés d'hétérotrophie intermédiaires dans les espèces chlorophylliennes (Article 3). Cette étude a alors confirmé au niveau phylogénétique ce qui était déjà pressenti au niveau taxonomique dans les modèles tempérés, à savoir que les orchidées mycohétérotrophes dérivent d'un état nutritionnel intermédiaire dans les lignées chlorophylliennes, et que le changement de partenaire mycorhizien sert de préadaptation à l'évolution de la mycohétérotrophie.

En conclusion, la diversité taxonomique des mycorhiziens des orchidées mycohétérotrophes tropicales est plus large que celle des régions tempérées, et reflète parfois des processus fonctionnels très différents. Cependant, ces patrons ne sont pas

généralisables à l'ensemble des régions tropicales. Les stratégies adoptées par les orchidées au cours de l'évolution vers la mycohétérotrophie semblent donc davantage liées à la disponibilité des partenaires pouvant subvenir au besoin en carbone de ces plantes, qu'à une réelle contrainte pour s'associer à des espèces déjà mycorhiziennes.

## 8.3 D'autres partenaires mycorhiziens à découvrir chez les orchidées autotrophes tropicales ?

Des champignons appartenant aux Attractielalles et aux Trechisporales ont été fréquemment identifiés par les techniques moléculaires lors de l'étude des cortèges mycorhiziens des orchidées autotrophes de La Réunion (Article 5). Cependant, leur état mycorhizien n'a pas pu être confirmé en microscopie électronique à ce jour. Pour plusieurs raisons évoquées plus bas, nous soupçonnons ces groupes taxonomiques de former des symbioses avec certaines espèces réunionnaises.
Les Attractielalles ont été décrits très récemment comme partenaires mycorhiziens d'orchidées terrestres et épiphytes dans les forêts humides de montagne en Équateur, grâce au couplage des méthodes d'identifications moléculaires et des observations de microscopie électronique dans les pelotons (Kottke *et al.*, 2010). Les hyphes de ces champignons montrent des structures singulières en microscopie électronique (pore simple ; Figure 8.6), qui permettent de les distinguer facilement des rhizoctonias qui ont des dolipores avec parenthosomes (voir Figure 1.11). Ils appartiennent à un sous-groupe des Basidiomycètes regroupant des parasites biotrophes des végétaux, les Pucciniomycètes ou Urédinomycètes, qu'on appelle communément rouilles ; cependant, les Attractiellales pourraient avoir une écologie saprophyte (Bauer *et al.*, 2006). Ils occupent une position basale dans la phylogénie des Basidiomycètes et représentent donc les mycorhiziens d'orchidées les plus basaux, avant les Sebacinales. Ils n'ont cependant jamais été identifiés dans les orchidées basales (Figure 8.4 ; Yukawa *et al.*, 2009), ou alors ils ont été exclus comme contaminants (Article 2). De même, ils n'ont jamais été identifiés chez les nombreux modèles tempérés et méditerranéens étudiés, alors qu'ils sont détectés par les amorces universelles de l'ITS. Ces mycorhiziens, qui sont décrits actuellement chez quatre tribus non apparentées des Epidendroideae, pourraient représenter un cortège dérivé propre aux régions néotropicales où ils ont été découverts. Cependant, leur identification chez des espèces épiphytes de La Réunion (dans les genres *Angraecum*, *Jumellea* et *Bulbophyllum*) soulève aussi l'hypothèse d'une répartition plus vaste à l'échelle des régions tropicales (Article 5).

Les Trechisporales, souvent isolés ou amplifiés à partir des sols, n'ont en revanche jamais été décrits dans la littérature comme partenaires mycorhiziens d'orchidées

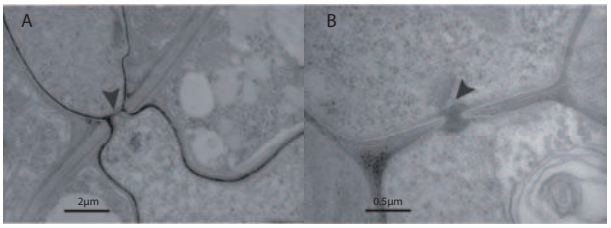



FIGURE 8.6 – Caractères ultrastructuraux des hyphes des champignons Attractiellales observés dans des pelotons d'orchidées néotropicales. A : passage de l'hyphe dans une cellule corticale ; B : septum à pore simple ; flèches : port simple. D'après Kottke *et al.* (2010).

ni comme champignons ectomycorhiziens (Tedersoo *et al.*, 2010), et il existe peu d'informations sur l'écologie de ces champignons. Néanmoins, ils s'apparentent aux Hymenochaetales dans la phylogénie des Basidiomycètes (Tedersoo *et al.*, 2010) qui regroupent notamment des champignons saprophytes tropicaux. À La Réunion, ils ont été fréquemment amplifiés à partir de racines colonisées, et, fait plus marquant, ont parfois été les seuls champignons recensés dans la plante (10 plantes appartenant à 7 espèces). On les identifie chez des espèces terrestres et épiphytes, mais l'espèce des Trechisporales la plus commune ne s'associe qu'aux orchidées épiphytes en radiation dans la zone (genres *Angraecum*, *Jumellea*, *Aeranthes* et *Bulbophyllum*). Au bilan, les Trechisporales ont été identifiés chez plus d'espèces (18 espèces) que les Ceratobasidiaceae mycorhiziens et, bien que ces champignons n'aient jamais été décrits comme mycorhiziens d'orchidées dans la littérature, nous pensons qu'ils pourraient former des symbioses mycorhiziennes avec les orchidées autotrophes. Des études de microscopie électronique en cours devraient aider à préciser ce point.

En conclusion, les rhizoctonias sont incontestablement les partenaires majeurs des orchidées tropicales, mais la diversité des mycorhiziens tropicaux reste probablement sous-estimée, comme le montre la découverte récente des Attractiellales chez les orchidées néotropicales. Les échantillons de mycorhizes d'orchidées de La Réunion (et de Madagascar) représentent aujourd'hui une opportunité d'explorer l'état mycorhizien de ces champignons mal décrits, et ce en multipliant les observations en microscopie électronique.

# Chapitre 9

# Spécificité mycorhizienne et structure des réseaux d'interactions

La majorité des orchidées dépendent obligatoirement de la présence de partenaires mycorhiziens pour accomplir leur cycle de vie (Rasmussen, 1995; Smith et Read, 1997). Mais, malgré les inventaires croissants sur la diversité des symbiotes et sur la spécificité des espèces en milieux naturels (Dearnaley, 2007), la structure de la relation écologique orchidée-champignon reste une question ouverte. Cela s'explique en grande partie par le fait que les études se sont souvent concentrées sur la spécificité de quelques orchidées phares, prises dans un contexte géographique donné, alors que les associations mycorhiziennes (comme toute autre interaction biotique) opèrent comme des réseaux dans les communautés (Selosse *et al.*, 2006). Dans l'objectif de mieux cerner la structure de la relation écologique orchidée-champignon, nous avons développé une approche plus large que les études précédentes, à l'échelle des réseaux mycorhiziens de l'ensemble des communautés d'orchidées de La Réunion.
Plus précisément, nous avons posé les deux questions suivantes : les orchidées tropicales ont-elles tendance à être spécialistes ou sont-elles plutôt généralistes ? Quelle est la structure du réseau d'interactions orchidées-champignons à l'échelle des communautés d'orchidées ? Nous discutons ici des apports de la thèse à ces deux questions, à partir de l'étude du réseau mycorhizien des espèces autotrophes de La Réunion. Nous discutons aussi des apports de l'étude de deux espèces mycohétérotrophes tropicales de La Réunion et des Caraïbes dans la spécificité des plantes mycohétérotrophes.

## 9.1 Structure écologique des réseaux mycorhiziens des orchidées autotrophes

Notre étude de la spécificité mycorhizienne est basée sur les concepts écologiques de spécialistes et de généralistes : le degré de généralisme d'une espèce est égal au nombre d'interactions observées chez cette espèce. Nous avons donc utilisé les termes spécialistes et généralistes pour désigner les cas les plus extrêmes d'un continuum variant des espèces qui interagissent avec un seul partenaire, aux espèces qui interagissent avec de nombreux partenaires. La spécialisation écologique est susceptible d'apparaître comme une conséquence de processus de coévolutions entre les orchidées et les champignons, de co-distributions écologiques des partenaires, ou encore d'effets de neutralité liés aux abondances relatives des partenaires dans la communauté. Les déterminismes de la structure des réseaux seront abordés dans la section 10, et nous ne décrivons ici que les patrons structuraux observés dans le réseau mycorhizien des orchidées autotrophes de La Réunion. Dans les communautés d'orchidées de La Réunion, le réseau mycorhizien global formé par 73 espèces et 95 OTUs de rhizoctonias révèle une structure significativement emboîtée (*nestedness* : T=4.46, P<0.001 ; Article 5), impliquant que les espèces spécialistes ont tendance à interagir avec certains partenaires d'espèces davantage généralistes, et non pas exclusivement avec des partenaires qui leur seraient propres (Figure 9.1).

Autrement dit, il existe dans les communautés un gradient d'espèces plus ou moins généralistes qui ont tendance à interagir avec un même sous-ensemble de partenaires. Cette structure, qui stabilise certaines communautés en interactions comme les réseaux mutualistes plantes-pollinisateurs (Bascompte *et al.*, 2003; Thébault et Fontaine, 2010), a des implications fortes pour la biologie de la conservation : si un partenaire généraliste disparaît de la communauté, cela peut alors se répercuter sur un grand nombre d'espèces de la communauté. Dans le réseau mycorhizien des orchidées de La Réunion, on constate que la majorité des espèces peut s'associer à plusieurs partenaires, tandis que peu d'espèces restent associées au même partenaire sur toutes leurs populations. Une exception est, par exemple, l'espèce *Angraecum liliodorum* qui est toujours associée à la même OTU de Tulasnellaceae dans les forêts sèches et humides de basse altitude. D'autre part, les différents partenaires des espèces généralistes n'appartiennent pas nécessairement au même taxon de rhizoctonias, et il est alors possible pour certaines espèces de s'associer à deux voire trois taxons de rhizoctonias (Figure 9.2).

Cet état généraliste s'observe non seulement à l'échelle de l'espèce, mais aussi à l'échelle de l'individu et de la racine (Figure 9.2). Nous remarquons que les associations généralistes impliquant à la fois des Tulasnellaceae et des Sebacinales sont

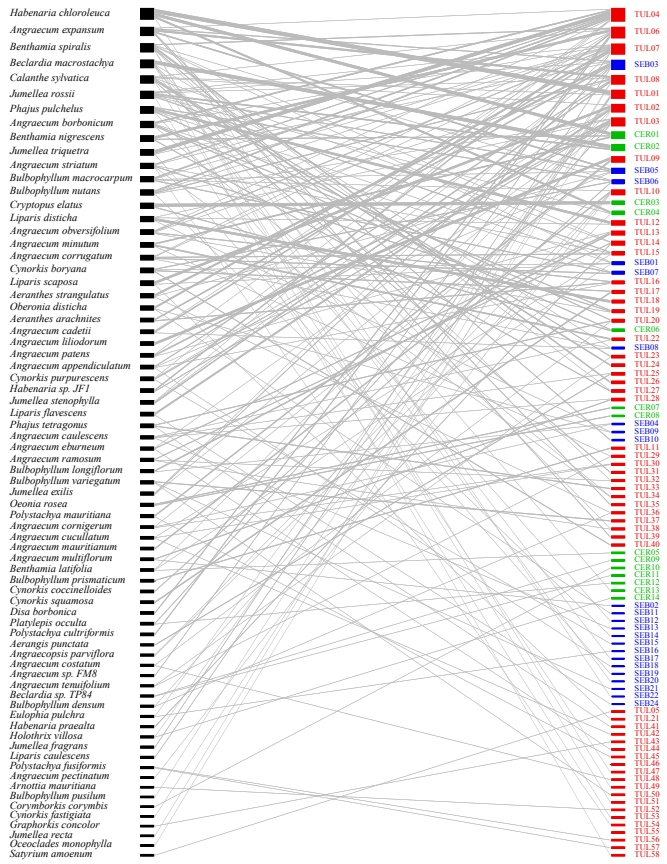



FIGURE 9.1 – Architecture emboîtée (*nestedness*) du réseau mycorhizien formé dans les communautés d'orchidées autotrophes de La Réunion (T=4.46, P<0.001). Rouge : Tulasnellaceae ; bleu : Sebacinales ; vert : Ceratobasidiaceae. Les partenaires sont ordonnés des plus généralistes (haut) au plus spécialistes (bas) des deux côtés du réseau.

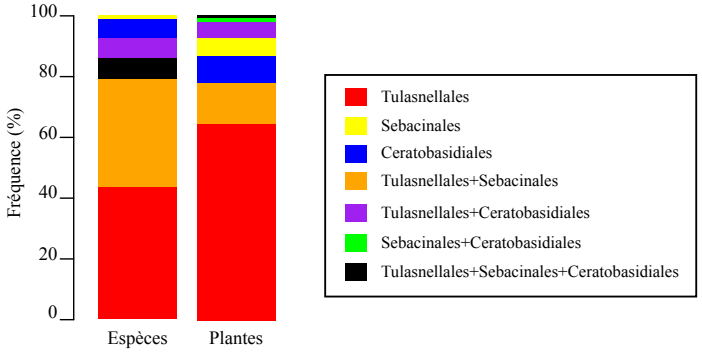



FIGURE 9.2 – Fréquences des assemblages des différents rhizoctonias dans les espèces et dans les individus d'orchidées autotrophes de La Réunion.

fréquentes parmi les espèces de La Réunion, élargissant ainsi des observations plus isolées sur d'autres modèles tropicaux (Suárez *et al.*, 2006, 2008). En revanche, nous constatons aussi que les associations généralistes impliquant à la fois des Sebacinales et des Ceratobasidiaceae sont plus rares. Ce constat soulève aujourd'hui l'hypothèse de *preferenda* différents entre Sebacinales et Ceratobasidiaceae, ou l'hypothèse d'une tendance des plantes à sélectionner exclusivement l'un ou l'autre des deux partenaires mycorhiziens, compte tenu de leurs traits intrinsèques ou de leurs positions écologiques. La structure emboîtée mise en évidence ici ne devrait pas être une particularité des communautés de La Réunion, ni des communautés tropicales, car elle a très récemment été retrouvée dans le réseau mycorhizien formé par sept espèces du genre *Orchis* en Europe tempérée et méditerranéenne (Jacquemyn *et al.*, 2010). Cette structure pourrait stabiliser toutes les communautés orchidées-champignons en interactions, compte tenu de la nature de la relation mycorhizienne. Actuellement, aucune étude portant sur d'autres réseaux mycorhiziens n'est publiée, ce qui limite encore la généralisation à l'ensemble des communautés.

D'autre part, le réseau mycorhizien de La Réunion montre une autre propriété intéressante des réseaux mutualistes plantes-pollinisateurs : l'asymétrie d'interaction ou l'asymétrie de spécialisation (Thébault et Fontaine, 2008 ; Article 5). L'asymétrie d'interaction mesure le déséquilibre des forces d'interaction entre les deux niveaux d'un réseau d'interactions (Vázquez *et al.*, 2009a), et prend en compte l'intensité des liens contrairement à la propriété décrite précédemment. Dans notre cas, l'asymétrie d'interaction est positive, ce qui signifie que le niveau supérieur du réseau (les orchidées) tend à plus de spécialisation que le niveau inférieur du réseau (les champignons). En effet, ces derniers vivent indépendamment des orchidées dans les sols (bien que ce point soit plus supposé par Smith et Read (1997) que réellement démontré), et ne devraient pas dépendre autant de l'association mycorhizienne. De leur côté, les orchidées dépendent strictement des champignons au moins à la germination et aux premiers stades de vie hétérotrophes (protocormes). L'asymétrie d'interaction des différentes espèces d'orchidées a aussi été vérifiée, car, dans les communautés, il devrait exister des espèces d'orchidées qui ne partagent pas la même relation avec les partenaires mycorhiziens. De même, il devrait exister des espèces de champignons qui ne partagent pas la même relation avec les plantes hôtes. Nous constatons effectivement que les orchidées ont des degrés de spécialisation variables, et que les espèces qui présentent les plus hauts degrés de spécialisation dans le réseau global sont des orchidées épiphytes. L'orchidée la plus spécialisée est d'ailleurs l'espèce *Bulbophyllum variegatum*, qui forme plusieurs liens (3 types de liens différents) avec des mycorhiziens qui eux n'en forment jamais avec les autres orchidées de La Réunion. L'asymétrie de spécialisation apporte donc cette information supplémentaire qui est le degré de spécialisation des partenaires auxquels

est associée l'espèce d'orchidée. On perçoit ici l'intérêt d'étudier la spécialisation des espèces à l'échelle du réseau, car une étude isolée de *B. variegatum* n'aurait pu conclure que sur une absence de spécificité mycorhizienne chez cette espèce. Or, cette espèce possède certes plusieurs partenaires, mais surtout un cortège mycorhizien qui lui est propre.

D'ailleurs, une hypothèse intéressante se dégage sur le rôle des symbioses mycorhiziennes dans la spécificité du support de certaines orchidées épiphytes tropicales. Par exemple, l'espèce d'orchidée *Lepanthes caritensis* ne se développe que sur l'espèce d'arbre *Micropholis guyanensis* (famille des Sapotaceae) dans les forêts de Porto Rico (Tremblay *et al.*, 1998; Bayman *et al.*, 1997). Beaucoup d'hypothèses ont été proposées pour expliquer ce phénomène, mais il reste cependant non expliqué. En effet, l'espèce *B. variegatum* est la seule orchidée réunionnaise qui ne se développe que sur un type de support, ou presque, qui est le bois de rempart (*Agauria salicifolia*, famille des Ericaceae ; Lancaster, 2004 ; Figure 2.3). À l'inverse, les autres orchidées épiphytes de la communauté ne colonisent pas ou peu ce support (Lancaster, 2004). De façon hypothétique, l'apparition d'une spécialisation chez *B. variegatum* pour un cortège de champignons uniquement présents sur le bois de rempart à La Réunion, mais excluant le cortège habituel, pourrait adapter cette orchidée à ce support. Une étude plus fine de ce modèle original permettrait de vérifier d'une part si l'espèce *B. variegatum* dépend très spécifiquement de ce cortège de partenaires inhabituels, et d'autre part si ces partenaires ne sont effectivement retrouvés que sur le bois de rempart. Nous avons déjà entrepris des semis de graines *in situ* sur différentes espèces d'arbres présentes dans la communauté, dont le bois de rempart, mais ces expériences préliminaires n'ont alors pas permis d'avoir des germinations (voir Figure 9.6 pour le dispositif expérimental utilisé). Nous reproduirons cette expérience à la prochaine période de fructification en réalisant plus de semis de graines.

Par ailleurs, il est possible que la définition des OTUs au seuil de 3% de divergence des séquences ITS surestime le nombre de partenaires mycorhiziens et ainsi, le généralisme de certaines espèces. Il est admis que la variation intraspécifique des séquences ITS est relativement faible chez les champignons et varie entre 0 et 3% (Hughes *et al.*, 2009), mais il a été démontré récemment que certaines espèces peuvent accumuler des variations intraspécifiques supérieures à 3% (Article 6 en Annexe A ; Nilsson *et al.*, 2008). Pour vérifier ce biais possible, nous avons aussi défini les OTUs de champignons au seuil de 95% de divergence des séquences ITS. Nous identifions alors 88 OTUs de rhizoctonias, mais ce changement de seuil n'affecte pas la structure du réseau mycorhizien obtenu (*nestedness* : $T=3.67$ et $P<0.001$ ; asymétrie d'interaction : $ISA>0$). Toutefois, on remarque que certaines espèces viennent s'ajouter au rang des spécialistes avec l'espèce *Angraecum liliodorum* (comme *Cryptopus elatus*, *Oeonia rosea*, *Angraecum patens* et *Polystachya mauritiana*). Toutes ces

espèces sont adaptées aux habitats des forêts semi-sèches ou aux habitats fortement exposés dans les forêts humides de basse altitude, où la disponibilité des partenaires est pourtant plus importante que celle retrouvée chez ces espèces.
Dans une symbiose à transmission horizontale où des partenaires doivent être retrouvés dans l'habitat à chaque génération, on peut comprendre les avantages procurés par une stratégie généraliste. L'établissement des individus dépend étroitement de la présence d'un partenaire mycorhizien, et l'opportunité de s'associer à plusieurs partenaires augmente leur chance de survie ainsi que leur *fitness*, sélectionnant à plus long terme des génotypes généralistes. Des auteurs ont récemment émis l'hypothèse suivant laquelle la stratégie généraliste pourrait être avantageuse pour les espèces adaptées à des habitats pauvres en nutriments ou fortement exposés à la sécheresse (Jacquemyn *et al.*, 2010). Or, nous observons la tendance inverse à La Réunion : les espèces les plus spécialistes sont celles qui vivent dans les habitats les plus empreints à la sécheresse, ce qui suggère que la spécialisation pourrait être plus dirigée par des conditions de milieu. En revanche, on comprend alors difficilement pourquoi certaines espèces ne s'associent qu'à un seul partenaire pour une même modalité de transmission des symbiotes (cas des espèces spécialistes). Dans les symbioses des Cnidaires par exemple, où un animal hétérotrophe (polype) vit en association avec des algues unicellulaires autotrophes (xanthelles), on observe aussi différents degrés de spécialisation suivant les espèces. Cependant, ces différences peuvent être expliquées par la présence des deux modalités de transmission des symbiotes, verticale ou horizontale (LaJeunesse *et al.*, 2010). Dans la symbiose mycorhizienne des orchidées, il pourrait y avoir des événements de transmissions pseudo-verticales chez certaines espèces plus que d'autres, notamment chez les espèces adaptées aux sous-bois denses où le vent pénètre peu et où les graines sont dispersées de façon limitée par les pluies (Hallé, 2008), ou encore chez les espèces ayant adopté une taille et une forme de graine qui limitent leur flottaison et leur dispersion (Arditti et Ghani, 2000). Cependant, cette modalité ne peut que expliquer des phénomènes de spécialisation locale, et plus difficilement les cas de spécialisation régionale (une telle spécialisation est connue chez l'espèce néotropicale *Inonopsis utricularioides* qui est très spécifiquement associée à un clade de Ceratobasidiaceae à l'échelle de son aire de distribution en Amérique Centrale et en Amérique du Sud ; Otero *et al.*, 2007). L'observation d'espèces répandues mais plus spécifiques que les autres (par rapport à *Ionopsis utricularioides*, d'autres espèces néotropicales sont moins spécifiques mais moins répandues ; Otero *et al.*, 2002, 2004) suggère qu'un autre facteur est la fréquence du champignon dans les écosystèmes : la spécificité d'association avec une espèce commune est sans doute moins risquée. Cependant, nos informations sur la distribution et la fréquence des rhizoctonias dans les écosystèmes sont encore trop fragmentaires pour entamer une telle discussion.

Au bilan de notre étude sur la structure du réseau mycorhizien global, celui-ci montre des propriétés structurales conformes à celles des réseaux d'interactions mutualistes, comme les réseaux plantes-pollinisateurs, plantes-frugivores ou encore plantes-fourmis (Guimarães *et al.*, 2006; Vázquez *et al.*, 2009b). Il a en effet été démontré que la structure emboîtée et asymétrique d'un réseau tend à stabiliser les communautés dans les interactions mutualistes (Bascompte *et al.*, 2006; Bastolla *et al.*, 2009). Dans les réseaux plantes-pollinisateurs par exemple, les plantes spécialisées pour un type de pollinisation interagissent généralement avec un pollinisateur qui visite aussi des plantes plus généralistes. Récemment, Thébault et Fontaine (2010) ont démontré par des approches théorique et empirique que la structure stabilisant les communautés diffère fondamentalement entre réseaux d'interactions mutualistes et réseaux d'interactions trophiques (plantes-herbivores) : la structure emboîtée favorise la stabilité des réseaux mutualistes, alors que la structure compartimentée (où les liens opèrent au sein de compartiments et peu entre compartiments) favorise la stabilité des réseaux trophiques. Le partage de partenaires dans les réseaux mutualistes pourrait s'expliquer par l'effet positif lié à la facilitation entre les partenaires, tandis que le faible partage de partenaires dans les réseaux trophiques pourrait s'expliquer par l'effet négatif dû à la compétition entre les partenaires. Dans la symbiose mycorhizienne des orchidées, la nature mutualiste de la relation fait débat (Rasmussen et Rasmussen, 2009). Le mutualisme n'a en effet été démontré que pour une seule espèce d'orchidée (l'orchidée terrestre et tempérée *Goodyera repens* ; Figure 1.6), et il est difficile de savoir si les très nombreuses autres orchidées autotrophes peuvent se comporter en d'authentiques mutualistes (Cameron *et al.*, 2008). L'étude des propriétés de réseaux mycorhiziens dans les communautés, comme nous l'avons fait dans les communautés tropicales de La Réunion, représente donc une approche intéressante pour mieux comprendre la nature de la relation écologique dans d'autres types de communautés. Notre étude et celle de Jacquemyn *et al.* (2010)—en suggérant que la symbiose orchidée-champignon suit le modèle attendu pour un mutualisme—pourraient constituer une preuve indirecte de mutualisme.
Toutefois, nous avons aussi analysé la structure des réseaux mycorhiziens des orchidées épiphytes et terrestres séparément, car ces deux communautés avaient précédemment révélé des cortèges mycorhiziens significativement différents (Figure 9.3 ; Article 5). Le réseau des orchidées terrestres a révélé les mêmes propriétés structurales que le réseau mycorhizien global ($T=7.03$ et $P<0.01$ ; $ISA>0$), alors que le réseau des orchidées épiphytes a révélé une structure asymétrique mais non emboîtée ($T=47.7$ et $P=0.2$ ; $ISA>0$ ; Figure 9.3).

Le réseau mycorhizien des orchidées épiphytes pourrait alors avoir une structure plus aléatoire, ou bien plus d'interactions compartimentées comme dans les réseaux trophiques (Thébault et Fontaine, 2010). Plusieurs hypothèses peuvent être émises

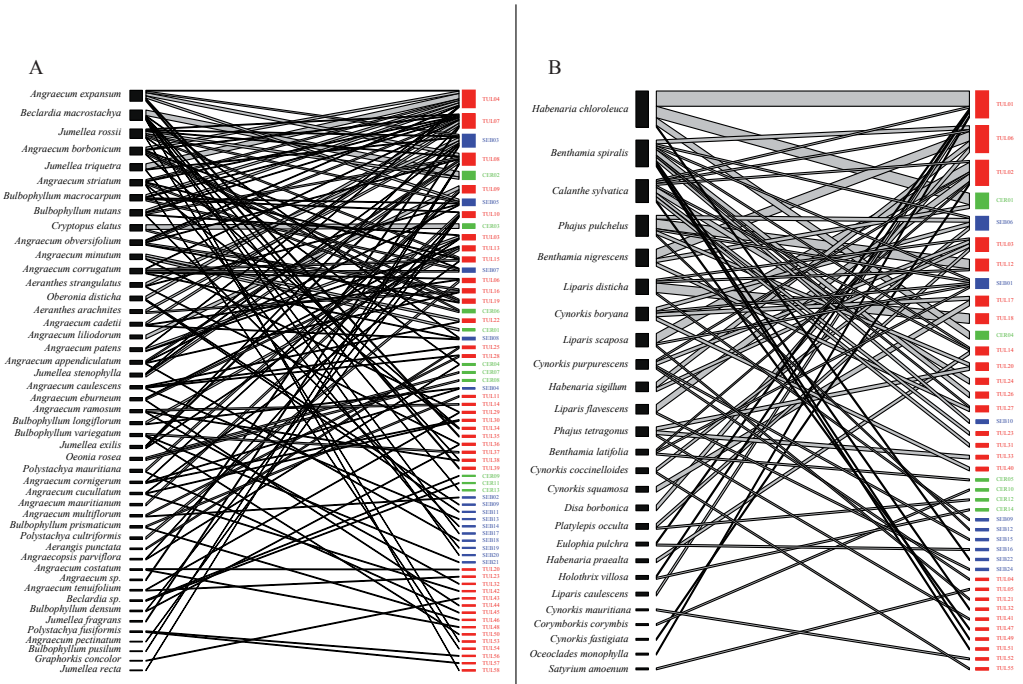



FIGURE 9.3 – Comparaison de l'architecture des réseaux mycorhiziens dans les communautés épiphytes et dans les communautés terrestres. A : réseau des orchidées épiphytes ; B : réseau des orchidées terrestres ; rouge : Tulasnellaceae ; bleu : Sebacinales ; vert : Ceratobasidiaceae. Les partenaires sont ordonnés des plus généralistes (haut) au plus spécialistes (bas) des deux côtés du réseau. Le réseau B est significativement emboîté (T=7.03 ; P<0.01), mais pas le réseau A (T=47.7 ; P=0.2). La fréquence des liens, représentée ici par la largeur des traits, n'est pas prise en compte dans le calcul du *nestedness*.

pour expliquer ces différences structurales, et nous reviendrons sur ce point dans la section 10 où nous confronterons ces résultats à ceux obtenus sur la structure phylogénétique de communautés épiphytes et terrestres.

## 9.2 La surprenante absence de spécificité chez les orchidées mycohétérotrophes tropicales

L'étude de deux orchidées mycohétérotrophes tropicales a révélé une absence de spécificité mycorhizienne, au moins chez l'espèce *Wullschlaegelia aphylla* dans les Caraïbes (Article 1), et d'autres études menées sur les modèles tropicaux asiatiques ont montré des patrons similaires (Article 2 ; Roy *et al.*, 2009a). Il existe aussi des modèles spécifiques en zone tropicale (Ogura-Tsujita et Yukawa, 2008), mais ces données nouvelles remettent alors en question l'idée communément admise d'une spécialisation des plantes mycohétérotrophes durant tout leur cycle de vie (Leake, 2004; Taylor *et al.*, 2002). Elles bousculent les raisons théoriques invoquées pour la spécificité systématiquement observée en région tempérée, c'est-à-dire "la course aux armements" parasitaire ou la contrainte physiologique pour récupérer du carbone (Leake, 2004). *W. aphylla*, une mycohétérotrophe néotropicale que nous avons étudiée en Guadeloupe, forme des associations mycorhiziennes avec plusieurs espèces de mycènes (*Mycena spp.*) et de marasmes (*Gymnopus spp.*). Il est probable que cette orchidée puisse aussi s'associer à l'espèce proche des coprins (*Psathyrella sp.*) qui a été identifiée comme seul partenaire d'un individu (Figure 9.4), car ce genet-là a aussi été identifié comme partenaire mycorhizien de l'orchidée mycohétérotrophe *Eulophia zollingeri* (Ogura-Tsujita et Yukawa, 2008).

La présence de multiples partenaires ne pourrait être expliquée par l'existence d'espèces cryptiques chez *W. aphylla*, car même si tel était le cas, les différents individus d'une population ne partageraient pas nécessairement le même cortège et surtout, un même individu ne s'associerait pas à plusieurs champignons non apparentés. Elle ne pourrait pas non plus être imputable à l'identification de champignons non mycorhiziens contaminants, comme dans le cas de l'éricacée mycohétérotrophe *Sarcodes sanguinacea* (Cullings *et al.*, 1996; Kretzer *et al.*, 2000), car les mycènes et les marasmes ont été identifiés directement à partir des pelotons d'hyphes intracellulaires. Il s'agit donc bien d'un cas d'espèce mycohétérotrophe sans spécialisation locale, ni partenaire obligatoire, et par conséquent pour laquelle la spécificité est absente (même si elle reste sélective, car nous n'y retrouvons pas tous les champignons saprophytes du milieu). Étant donné que nous n'observons aucun taxon qui soit partagé par tous les individus, nous supposons qu'il ne devrait pas non plus exister de spécialisation fonctionnelle pour un type de mycorhizien. L'espèce réunionnaise

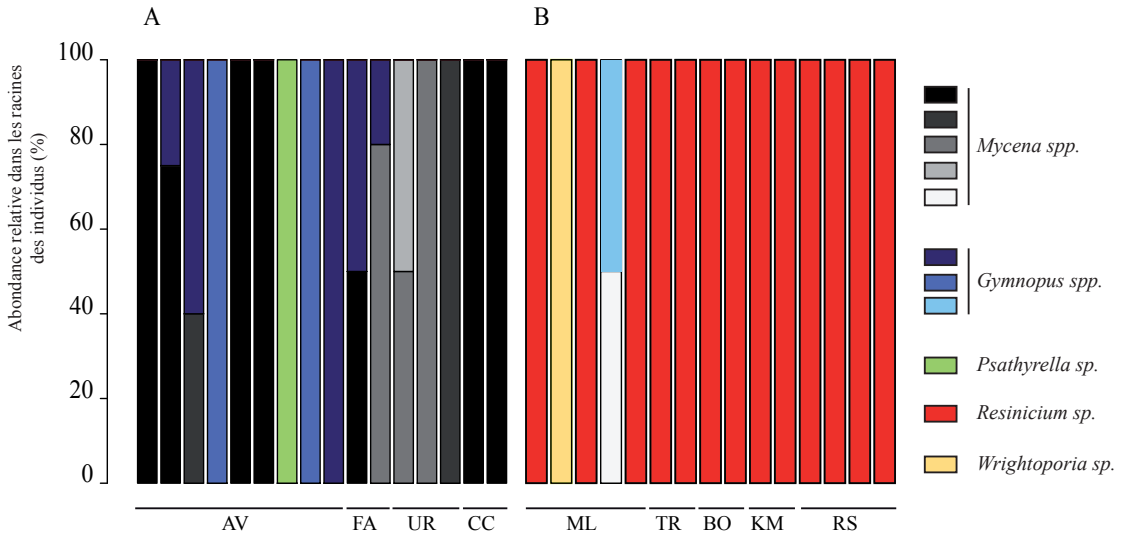



FIGURE 9.4 – Diversité et abondance relative des champignons saprophytes identifiés dans les racines des plantes de *Wullschlaegelia aphylla* en Guadeloupe et de *Gastrodia similis* à La Réunion. A : *W. aphylla* ; B : *G. similis*.

*Gastrodia similis* semble plus spécifiquement associée à un champignon du genre *Resinicium* à l'échelle de ses populations de l'île, mais deux individus ont montré des associations à d'autres partenaires saprophytes (mycène, marasme et *Wrightoporia sp.* ; Figure 9.4) potentiellement mycorhiziens (ici, aucune analyse de peloton n'a pu être menée). Là encore, les différents types de partenaires ont été observés dans la même population de Mare Longue à Saint-Philippe. Cependant, dans le cas de *Gastodia similis*, nous ne pouvons pas écarter l'hypothèse de la présence d'espèces cryptiques qui se seraient séparées récemment. En effet, il existe deux morphes distincts de *G. similis*, clair et foncé, qui coexistent justement dans la forêt de Mare Longue et qui n'avaient pas été vus lors de la révision taxonomique de l'espèce (Bosser, 2006 ; Figure 9.5).

De même, ils n'ont pas été vus au moment de l'échantillonnage réalisé en début de thèse, car la plupart des individus ont été retrouvés au stade de fructification où les deux morphes sont méconnaissables. Nous n'avons pas encore vérifié si les deux phénotypes de *G. similis* correspondent effectivement à des entités génétiques différentes, ni même si les différents types de partenaires y sont corrélés. Ce modèle représente néanmoins une opportunité future d'étudier la question du rôle du changement de partenaire dans la spéciation des orchidées mycohétérotrophes.

Si la découverte du saprophytisme indirect de certaines espèces mycohétérotrophes tropicales révèle la diversité des stratégies adoptées par les orchidées au cours de l'évolution vers la mycohétérotrophie, l'absence de spécificité chez certaines espèces

FIGURE 9.5 – Morphes clair et foncé de l'espèce *Gastrodia similis* coexistant en sympatrie dans certaines forêts humides de basse altitude à La Réunion. Photos T. Tully et J. Fournel.

est une surprise. En effet, les plantes mycohétérotrophes tempérées ont toujours montré des spécialisations mycorhiziennes extrêmes (Leake, 1994, 2004), incitant même certains auteurs à les désigner comme des parasites spécialisés (Taylor et Bruns, 1997; Bidartondo *et al.*, 2003). L'absence de spécialisation pourrait-elle représenter une particularité tropicale ? Toutes les espèces non spécifiques qui ont été décrites à ce jour vivent en effet dans des régions tropicales. Par exemple, l'espèce japonaise *G. confusa* s'associe à plusieurs champignons saprophytes (Article 2 ; Ogura-Tsujita *et al.*, 2009). De même, les espèces thaïlandaises *Aphyllorchis montana* et *A. caudata* s'associent à plusieurs champignons ectomycorhiziens sans spécialisation locale (Roy *et al.*, 2009a), ce qui suggère par la même occasion que l'absence de spécificité des modèles tropicaux n'est pas nécessairement corrélée à l'association à des saprophytes. Dans les communautés tropicales, la richesse spécifique des partenaires et l'hétérogénéité des niches écologiques pourraient en effet avantager les stratégies généralistes, comme chez les orchidées autotrophes. Dans les interactions trophiques plantes-insectes par exemple, il a été démontré que les insectes tropicaux tendent à plus de généralisme que les insectes tempérés, et que les degrés de spécificité sont corrélés à la diversité des plantes hôtes disponibles (Novotny *et al.*, 2002). De même, les champignons endophytes des feuilles (qui comme les orchidées dépendent plus fortement de leur partenaire que l'inverse) sont plus généralistes dans les régions tropicales (Arnold et Lutzoni, 2007). Il est encore trop tôt pour déterminer, faute de connaissances suffisantes, les tendances comparées entre associations tempérées et tropicales. Cependant l'absence de spécialisation des orchidées mycohétérotrophes tropicales pourrait aussi être liée au coût de l'association pour les partenaires mycorhiziens qui est différent du coût engendré par les espèces tempérées. En effet, si

les saprophytes (ou les ectomycorhiziens) tropicaux sont moins limités par les ressources que les ectomycorhiziens tempérés, alors les espèces tropicales pourraient être moins coûteuses que les espèces tempérées. Les espèces tempérées pourraient ainsi tendre à plus de spécialisation sous l'influence de coévolutions parasitaires (Bruns *et al.*, 2002), ce qui ne serait pas le cas des espèces tropicales. D'ailleurs, les orchidées mixotrophes, qui sont moins coûteuses en carbone du fait de leur activité photosynthétique partielle, maintiennent généralement des interactions généralistes dans les deux types d'écosystèmes (Article 3 ; Selosse *et al.*, 2004). Ces observations nouvelles appellent aujourd'hui à revisiter la nature de la relation entre l'orchidée mycohétérotrophe et ses partenaires mycorhiziens dans les modèles tropicaux. Plus globalement, une meilleure connaissance des modèles tropicaux autorisera à mieux comprendre leurs différences avec les modèles tempérés : récemment, les associations ectomycorhiziennes tropicales ont révélé, de façon inattendue et sans raison apparente, une diversité fongique moins importante que les associations ectomycorhiziennes tempérées (Tedersoo et Nara, 2010).

## 9.3 Qu'en est-il de la spécificité mycorhizienne à la germination ?

Comme aucune donnée n'est disponible sur les mycorhiziens d'orchidées à La Réunion, nous avons ciblé notre étude sur les cortèges associés aux plantes adultes, qui sont plus accessibles que ceux liés à la germination. Nous avons tout de même entrepris des inventaires *in situ* de la diversité des mycorhiziens liés à la germination des orchidées autotrophes. Précisément, nous avons réalisé deux campagnes de semis de graines *in situ* (dont le principe est décrit plus bas ; Figure 9.6) durant les périodes de fructification de 2008 et de 2009 (entre mai et août).

Notre expérience a été réalisée pour 15 espèces d'orchidées terrestres et épiphytes, en récoltant des graines à maturité, en contrôlant la présence d'embryons et en les semant dans 10 sites dans les forêts semi-sèches et humides de basse altitude et dans les forêts humides de montagne à La Réunion. Les semis ont été contrôlés pour la présence de germinations tous les trois mois depuis novembre 2008, mais aucune germination n'a pu être observée à ce jour. Nous discutons toutefois ici de la possibilité d'un changement de partenaire au cours du cycle de vie des orchidées.
La germination et les premiers stades de développement de l'orchidée pourraient impliquer d'autres partenaires mycorhiziens, ou bien un cortège de partenaires plus ou moins restreint que celui qui est rencontré dans les racines des plantes adultes. Les études antérieures sur la symbiose mycorhizienne des orchidées se sont d'ailleurs surtout intéressées à ces stades précoces, en reproduisant *in vitro* la germination

FIGURE 9.6 – Dispositif expérimental de semis de graines d'orchidées *in situ*. A : graines piégées dans un filet de nylon fermé par un cache de diapositive ; B : semis de graine de l'orchidée épiphyte *Jumellea rossii* récupérés après trois mois ; flèche : embryon gonflé mais non infecté. Photos J. Jersakova et F. Martos.

des espèces et en contrôlant l'effet de croissance induit par différents partenaires mycorhiziens (Smith et Read, 1997). Mais les études modernes, qui ont bénéficié alors de l'avancée des techniques moléculaires, et conscientes des biais induits par les conditions *in vitro* (Masuhara et Katsuya, 1994), se sont réorientées vers des inventaires de cortèges dans la nature. Cependant, les difficultés d'observation des graines et des germinations d'orchidées (microscopiques) une fois dispersées dans l'habitat, et les difficultés à reconnaître les différentes espèces aux stades juvéniles, ont inévitablement conduit à biaiser les inventaires en faveur des cortèges des plantes adultes. Un dispositif expérimental simple a néanmoins été proposé, mais il reste très peu utilisé car il ne garantit pas toujours des résultats. Il consiste à piéger des graines d'orchidées (préalablement récoltées dans les fruits matures d'une espèce connue) dans un filet de nylon de maille fine permettant le passage des hyphes fongiques mais pas celui des graines, et à les semer *in situ* (Figure 9.6 ; Zettler *et al.*, 2003), de préférence près des adultes où se trouvent au moins les champignons utilisés par ceux-ci. Ainsi, Bidartondo et Read (2008) ont pu, par exemple, étudier les cortèges mycorhiziens associés à trois stades de développement (germination, protocorme et plante adulte) chez plusieurs espèces d'orchidées (*Cephalanthera spp.* et *Epipactis sp.*) en Europe. Ils ont observé que le cortège est soit le même aux trois stades de développement, soit plus restreint dans les plantules de certaines espèces, ce qui suggère alors qu'un contrôle des partenaires devrait opérer dans les protocormes, plutôt qu'à la germination ou chez les adultes qui sont plus ubiquistes. Contrairement à ce que l'on pourrait croire, l'initiation de la germination d'une espèce n'est donc pas nécessairement induite par les mêmes partenaires que ceux nécessaires aux stades ultérieurs. Au contraire, elle semble favoriser les associations généralistes. Et une association peu profitable dans un environnement donné ou un environnement

évoluant vers des conditions stressantes peut conduire à la mort de l'individu jeune, sélectionnant ainsi les associations plus profitables : les protocormes et les plantes de l'orchidée autotrophe *Goodyera pubescens* s'associent spécifiquement à un champignon des Tulasnellaceae, mais quand l'environnement devient trop stressant, les individus qui survivent dans la population ont acquis un nouveau partenaire (McCormick *et al.*, 2006). Enfin, d'autres études indiquent aussi que les partenaires mycorhiziens pourraient changer au cours du cycle de vie de l'orchidée. Par exemple, l'orchidée mycohétérotrophe asiatique *Gastrodia elata* s'associe à un mycène à la germination et à un armillaire dans les plantes adultes (Xu et Guo, 2000). Voir cette espèce changer de partenaire est surprenant, d'autant plus que l'on sait aujourd'hui que les mycènes sont capables de nourrir des plantes adultes (Article 1).

# Chapitre 10

# Signal phylogénétique des symbioses mycorhiziennes des orchidées tropicales

Pourquoi certaines orchidées s'associent-elles à plusieurs champignons, alors que d'autres ne s'associent qu'à un seul partenaire mycorhizien ? De la même façon, pourquoi certains champignons s'associent-ils à plusieurs orchidées tandis que d'autres ne s'associent qu'à une seule espèce ? Ces questions nous ont conduit dans la thèse à nous intéresser aux déterminismes de la structure des réseaux mycorhiziens des orchidées. L'évaluation des facteurs déterminant la structure des réseaux d'interactions dans les communautés est par ailleurs une discipline en plein essor, en particulier sur les interactions mutualistes plantes-pollinisateurs (Bascompte et Jordano, 2007; Vázquez *et al.*, 2009b). Dans les types de réseaux que nous étudions et qui connectent hautement les partenaires entre eux, la structure des liens pourrait être influencée par des facteurs écologiques—la distribution géographique des espèces, leur phénologie, ou encore l'abondance relative des partenaires dans la communauté locale (Bascompte et Jordano, 2007). Mais elle pourrait tout aussi bien être influencée par des traits intrinsèques des espèces, comme l'histoire évolutive des espèces (Darwin, 1859).

Dans les symbioses mycorhiziennes des orchidées, l'évaluation des déterminismes écologiques est très complexe, car on ne peut alors avoir accès à toute la communauté de champignons mycorhiziens. Dans ces conditions, il est donc difficile d'affirmer qu'une orchidée ne s'associe pas à un champignon car celui-ci est absent de la fraction étudiée de la communauté. En revanche, l'influence des facteurs anciens peut être plus raisonnablement étudiée par une approche de signal phylogénétique (Blomberg *et al.*, 2003). De plus, les méthodes récentes permettent aujourd'hui de quantifier la force du signal phylogénétique dans les phylogénies des deux partenaires en interaction qui ne suivent pas nécessairement des processus de cospéciations (Ives

et Godfray, 2006). Ainsi, si l'association à un cortège mycorhizien est déterminée par un trait des orchidées, alors on peut s'attendre à ce que le trait, et donc ce cortège, se maintienne à un certain niveau dans la phylogénie des plantes (et vice-versa pour le champignon). Dans la thèse, nous avons donc posé les dernières questions suivantes : existe-t-il un signal phylogénétique des symbioses mycorhiziennes des orchidées autotrophes tropicales, et se manifeste-t-il dans les phylogénies des plantes, des champignons ou des deux partenaires ? Une coévolution peut-elle alors s'engager ?

## 10.1 Le signal phylogénétique des symbioses mycorhiziennes à l'échelle des genres

Le réseau mycorhizien formé par les genres d'orchidées de La Réunion et leurs champignons mycorhiziens n'a pas présenté de signal phylogénétique, ni dans la phylogénie des plantes, ni dans la phylogénie des champignons (Article 5 ; Figure 10.1). Ces résultats démontrent que les associations mycorhiziennes entre les orchidées et les champignons ne devraient pas être contraintes par les positions phylogénétiques des partenaires à ce niveau de la phylogénie, suggérant par la même occasion qu'elles ne devraient pas avoir coévolué à l'échelle de la famille des orchidées. Ce résultat n'est pas inattendu pour le champignon (dont on pense que l'interaction mycorhizienne n'est pas le cœur de la niche), mais il l'est plus pour les orchidées qui dépendent vitalement du champignon.

Cette première analyse du signal phylogénétique a été conduite à partir de la phylogénie des genres d'orchidées de La Réunion, car aucune phylogénie incluant toutes les espèces d'orchidées locales n'est disponible à ce jour. Néanmoins, les genres réunionnais appartiennent à des tribus d'orchidées suffisamment distantes (dans les Orchidoideae et Epidendroideae) pour pouvoir détecter une structure évolutive si elle existe. L'absence de signal dans la phylogénie des plantes et dans la phylogénie des champignons démontre alors que les associations mycorhiziennes sont peu contraintes par les positions phylogénétiques des partenaires à cette échelle. En d'autres termes, les genres apparentés ne présentent pas de tendance globale à s'associer aux mêmes cortèges mycorhiziens, et les champignons apparentés ne montrent pas de tendance à s'associer aux mêmes genres d'orchidées. La symbiose mycorhizienne des orchidées rejoint en ce sens les interactions mutualistes plantes-pollinisateurs dans lesquelles le signal phylogénétique des associations entre différentes plantes d'une communauté locale et leurs insectes pollinisateurs est globalement faible (Vázquez *et al.*, 2009b). Il est donc peu probable que les orchidées

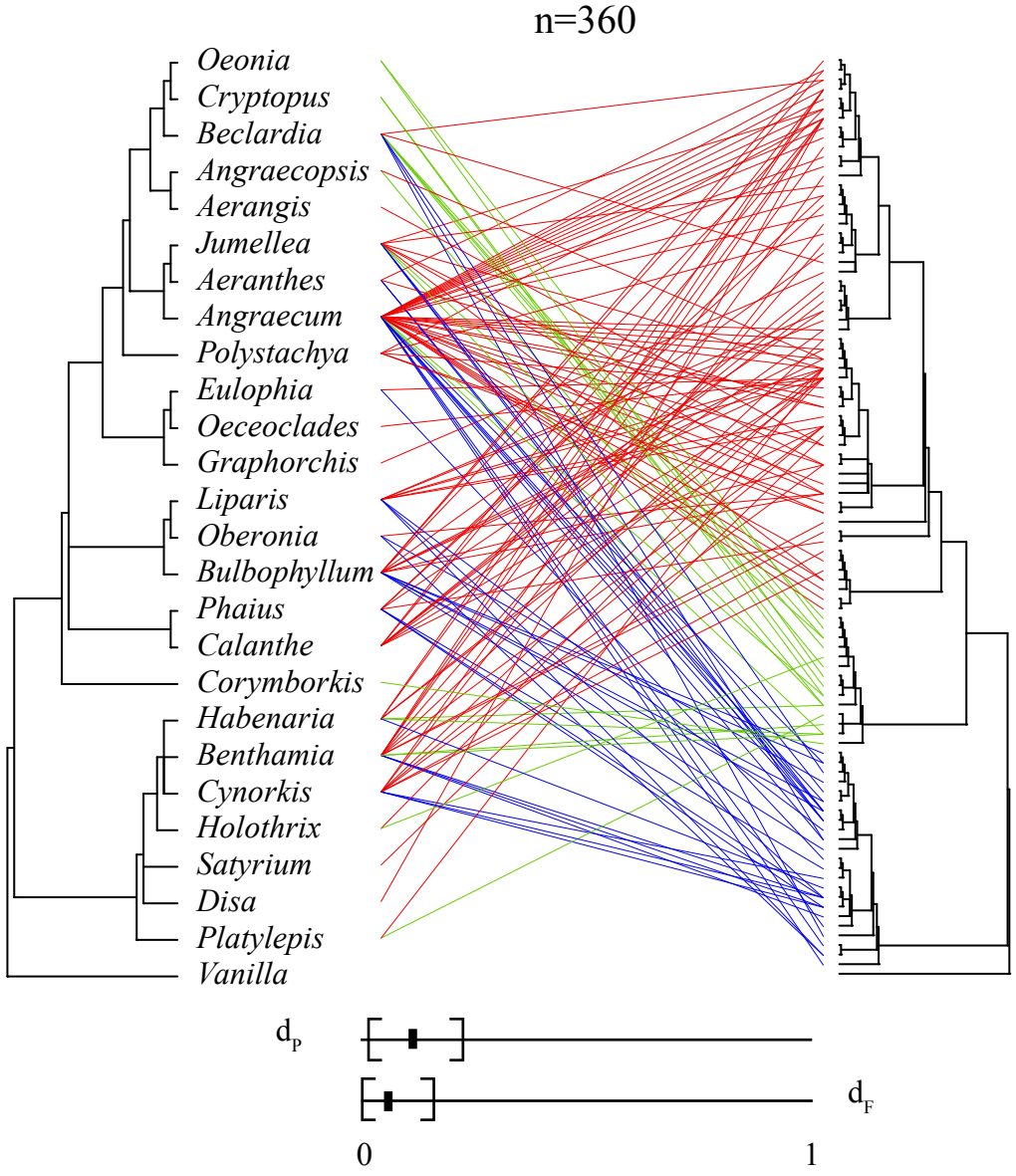



FIGURE 10.1 – Analyse du signal phylogénétique dans les associations des genres d'orchidées de La Réunion. En rouge : Tulasnellaceae ; bleu : Sebacinales ; vert : Ceratobasidiaceae ; dp : signal dans la phylogénie des plantes ; df : signal dans la phylogénie des champignons ; les intervalles de confiance sont donnés entre crochets. Calculé suivant Ives et Godfray (2006). Notons le faible signal phylogénétique des deux côtés du réseau.

et les taxons de rhizoctonias aient coévolué, et ces résultats nous laissent penser que les adaptations récentes des plantes et des champignons expliqueraient mieux la structure des réseaux d'associations observés. D'ailleurs, la symbiose mycorhizienne des orchidées, qui est ancestrale pour cette famille de plantes, semble avoir très tôt impliqué différents partenaires mycorhiziens. En effet, les représentants actuels des lignées d'orchidées les plus basales, c'est-à-dire les Apostasioideae, les Vanilloideae et les Cypripedioideae, forment des associations avec deux voire trois taxons de rhizoctonias (Figure 8.4 ; Shefferson *et al.*, 2005; Porras-Alfaro et Bayman, 2007; Yukawa *et al.*, 2009). La capacité des orchidées à s'associer à différents partenaires mycorhiziens serait donc un trait ancestral, tandis que la spécialisation que l'on observe parfois chez certains groupes taxonomiques d'orchidées pourrait être un trait apparu secondairement (Shefferson *et al.*, 2007).

Par ailleurs, nous pensons que les groupes mycorhiziens connus chez les orchidées actuelles vivaient déjà à l'état endophyte dans les racines des plantes, avant la mise en place de la symbiose. L'exemple des Sebacinales endophytes dans une grande variété de plantes (dont de nombreuses monocotylédones) illustre d'ailleurs bien ce phénomène (Article 4 ; Selosse *et al.*, 2009). En revanche, la présence de Tulasnellaceae et de Ceratobasidiaceae endophytes reste un point à vérifier, même si cela a été proposé dans certaines études sur les Ceratobasidiaceae (Taylor *et al.*, 2003) : cela pourrait être recherché en priorité dans les familles proches des orchidées telles que les iridacées dans l'ordre des Asparagales (selon la classification phylogénétique APGIII).

Comme nous avons pu démontrer la présence de cortèges mycorhiziens différents entre les communautés épiphytes et les communautés terrestres, il a alors été intéressant d'analyser séparément les signatures phylogénétiques des deux réseaux mycorhiziens (celui des genres épiphytes et celui des genres terrestres), puis de les comparer. Les deux réseaux ont révélé chacun un signal global faible, mais le réseau des épiphytes montre plus de signal dans la phylogénie des orchidées et dans celle des champignons, ce qui suggère une contrainte phylogénique plus importante que dans le réseau des communautés terrestres (Figure 10.2).

Rappelons aussi que le réseau formé par les communautés épiphytes n'a pas la même propriété d'emboîtement que le réseau des communautés terrestres, et ce en dépit de l'intensité des liens dans les réseaux. En effet, le calcul du *nestedness* a été fait à partir des matrices de présences-absences et non pas de fréquences. Si on considère l'ensemble des différences observées entre communautés épiphytes et terrestres—c'est-à-dire les différences de cortèges mycorhiziens, de structures de réseaux et de signatures phylogénétiques—cela pourrait indiquer que ces deux communautés n'interagissent pas de la même manière avec leurs cortèges mycorhiziens. De façon hypothétique, le réseau des communautés épiphytes pourrait avoir une

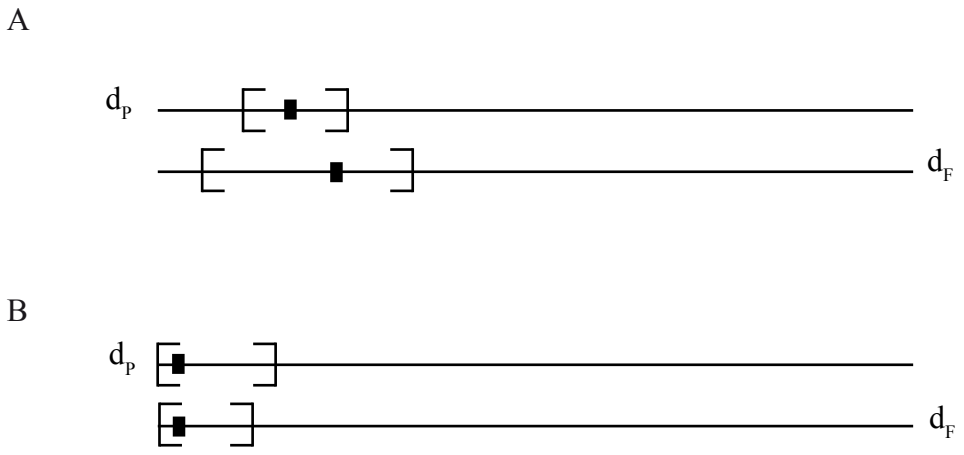



FIGURE 10.2 – Comparaison du signal phylogénétique entre le réseau mycorhizien des communautés épiphytes et le réseau mycorhizien des communautés terrestres. dp : signal dans la phylogénie des plantes ; df : signal dans la phylogénie des champignons ; les intervalles de confiance sont donnés entre crochets. Calculé suivant Ives et Godfray (2006). Notons le gain de signal phylogénétique dans le réseau des communautés épiphytes.

structure plus modulaire à l'image des réseaux d'interactions trophiques (Thébault et Fontaine, 2010). Cependant, la modularité n'a pas encore été analysée dans les réseaux car les méthodes sont encore controversées. On ne connaît pas la nature de la symbiose mycorhizienne dans le cas des orchidées épiphytes, car la seule étude en date ayant quantifié les échanges de nutriments entre l'orchidée et son mycorhizien a été réalisée sur un modèle terrestre (voir Figure 1.6 ; Cameron *et al.*, 2006, 2008). Si les orchidées épiphytes montrent effectivement une structure plus modulaire, alors elles pourraient vivre une compétition plus importante que les communautés terrestres dans l'acquisition des partenaires mycorhiziens. D'autres hypothèses sont aussi envisageables. Premièrement, les différences observées pourraient indiquer des états mycorhiziens plus récents, dérivés, ayant nécessité des changements de cortèges au cours de l'évolution vers l'épiphytisme ; et comme les lignées épiphytes sont plus récentes (elles appartiennent aux Epidendroideae), et dérivées de lignées terrestres, une spécialisation à de nouveaux partenaires serait encore visible dans les communautés épiphytes. Deuxièmement, le signal phylogénétique dans le réseau des épiphytes pourrait être expliqué par la proximité phylogénétique des genres épiphytes qui sont plus proches entre eux que les genres terrestres. En effet, les orchidées épiphytes appartiennent toutes aux Epidendroideae, alors que les orchidées terrestres appartiennent à la fois aux Orchidoideae et aux Epidendroideae (cas de *Calanthe sp.*, *Phaius spp.*, etc.).

## 10.2 Le signal phylogénétique dans les symbioses mycorhiziennes des angraecoïdes

Le réseau mycorhizien formé par les espèces du clade des angraecoïdes (tribu des Vandeae) a révélé un signal phylogénétique relativement important dans la phylogénie des orchidées (Article 5). La présence d'un signal dans la phylogénie des angraecoïdes n'est pas incompatible avec l'absence de signal dans la phylogénie des genres. En effet, la structure des partenaires mycorhiziens dans la phylogénie des angraecoïdes pourrait refléter des adaptations récentes des plantes maintenues à un certain niveau de la phylogénie (Article 5). Un certain conservatisme phylogénétique à court terme évolutif serait donc possible dans certaines lignées.
Cette troisième analyse a été conduite chez les espèces d'orchidées appartenant au clade des angraecoïdes qui regroupe deux sous-tribus à La Réunion : les Angraecinae (la plus diversifiée) et les Aerangidinae. Comme les Angraecinae se sont diversifiées dans la région du sud-ouest de l'Océan Indien, elles ont été étudiées en priorité par l'Université de La Réunion, par la production d'une phylogénie moléculaire (Micheneau, 2005; Micheneau *et al.*, 2008b). Nous avons pu bénéficier de ce cadre phylogénétique pour évaluer le signal phylogénétique des symbioses mycorhiziennes. La phylogénie des plantes impose ici une certaine structure au réseau d'interactions, ce qui n'est pas le cas de la phylogénie des champignons. Autrement dit, les orchidées ont tendance à se diversifier en conservant les cortèges mycorhiziens de leur ancêtre, alors que les champignons n'ont pas suivi la même tendance vis-à-vis de leurs plantes hôtes. D'autre part, l'asymétrie d'interaction des orchidées est plus élevée que celle des champignons quel que soit le réseau mycorhizien : cela indique que les plantes tendent à plus de spécialisation et donc qu'elles tendent à dépendre plus fortement des symbioses mycorhiziennes que les champignons, comme la biologie de l'interaction le suggère. Cela pourrait expliquer pourquoi le signal phylogénétique est aussi asymétrique. Comme aucun signal phylogénétique n'a été détecté à l'échelle taxonomique supra-générique, nous pensons que des changements de cortèges mycorhiziens devraient se produire très fréquemment dans l'évolution des orchidées. Ces changements de cortèges mycorhiziens pourraient être liés aux changements de niches écologiques, mais aussi de traits anatomiques ou fonctionnels.
Il est important de préciser que l'analyse du signal phylogénétique dans un réseau telle que nous l'avons faite dans notre étude montre des effets généraux. Il est donc peu surprenant de constater que le signal global est faible dans le réseau des angraecoïdes. La situation n'est pas différente dans les réseaux mutualistes plantes-pollinisateurs par exemple (Vázquez *et al.*, 2009b). Seules les interactions strictement spécifiques et souvent en coévolution peuvent montrer un signal global fort. C'est le

cas par exemple des interactions *Ficus*-pollinisateurs (Cook et Rasplus, 2003). En effet, la structure phylogénétique du réseau mycorhizien des angraecoïdes présente une forte hétérogénéité entre les clades d'orchidées pour le conservatisme des cortèges (Figure 10.3). Par exemple, dans les associations aux Tulasnellaceae, les relations sont nombreuses et largement réparties tant du côté des champignons que des orchidées. Ce groupe est de nature à brouiller le signal phylogénétique global. En effet, le signal détecté dans la phylogénie des angraecoïdes signe une contrainte d'association plus forte pour deux clades d'orchidées. C'est le cas des espèces appartenant au clade des Aerangidinae (*Cryptopus elatus*, *Oeonia rosea*, *Beclardia macrostachya* qui sont fortement liées aux Ceratobasidiaceae ; Figure 10.3). C'est aussi le cas d'un clade large d'orchidées *Jumellea spp.* et *Aeranthes spp.* qui s'associe à une même OTU des Sebacinales.

Ces clades de champignons correspondent d'ailleurs aux clades tropicaux (voir section 8). Les patrons phylogénétiques observés ne testent pas d'hypothèses sur les processus évolutifs liés au signal phylogénétique observé (Ives et Godfray, 2006). Admettons la présence d'un signal phylogénétique entre un clade d'orchidées et un clade de champignons donnés. Comment savoir si le signal exprime une inertie phylogénétique (c'est-à-dire des associations qui ont une valeur neutre mais qui ne dérivent pas de la sélection) ou une adaptation à un cortège mycorhizien (c'est-à-dire des associations qui résultent de la sélection ; Blomberg et Garland, 2002) ?
Une discussion plus spécifique peut alors être envisagée concernant deux cas d'associations plus fortement contraintes par la phylogénie. Pour les associations du clade large des orchidées *Jumellea* et *Aeranthes* avec une OTU des Sebacinales, la diversification des orchidées a été plus rapide que celle de l'OTU à laquelle elles sont associées, et il est donc peu probable qu'il s'agisse d'une coévolution. Une conjonction de préférence écologique chez ces espèces d'orchidées pourrait probablement expliquer l'association fréquente à une même OTU. Néanmoins, ces espèces d'orchidées occupent des habitats naturels très différents à la Réunion : les espèces *J. exilis*, *A. strangulatus* et *A. arachnites* vivent dans les forêts semi-sèches ou dans les habitats épiphytes exposés dans les forêts humides de basse altitude, alors que les espèces *J. stenophylla*, *J. triquetra* et *J. rossii* sont typiquement des espèces des forêts humides de montagne. Il est aussi possible que ces orchidées apparentées conservent un ou plusieurs traits anatomiques ou fonctionnels qui déterminent l'association à cette OTU des Sebacinales ; et ces traits pourraient aussi bien intervenir lors de la germination ou lors de la croissance des protocormes. D'ailleurs, ces espèces d'orchidées forment aussi des associations avec d'autres mycorhiziens (notamment des Tulasnellaceae) qui pourraient apparaître secondairement dans les racines des adultes (ou l'inverse). Ce modèle est donc intéressant pour comprendre les traits des orchidées qui déterminent une association phylogénétiquement structurée.

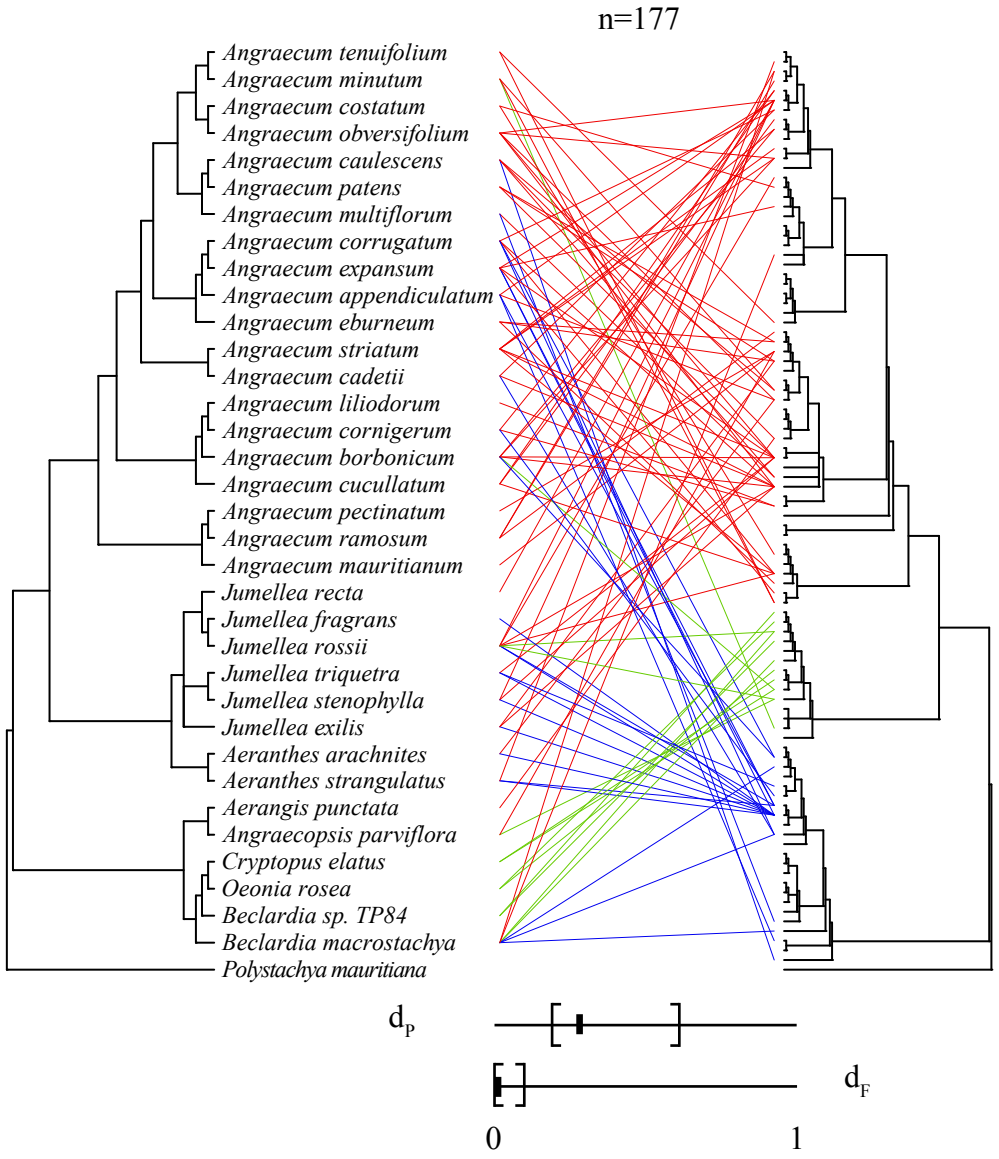



FIGURE 10.3 – Analyse du signal phylogénétique dans les associations des espèces du clade des angraecoïdes. En rouge : Tulasnellaceae ; bleu : Sebacinales ; vert : Ceratobasidiaceae ; dp : signal dans la phylogénie des plantes ; df : signal dans la phylogénie des champignons ; les intervalles de confiance sont donnés entre crochets. Calculé suivant Ives et Godfray (2006). Notons l'intervalle de confiance large pour dp qui exprime l'hétérogénéité de la structure phylogénétique entre les clades des angraecoïdes.

D'autre part, pour les liens entre les Aerangidinae et les Ceratobasidiaceae, l'hypothèse de traits adaptés (ou coadaptés dans ce cas, car la relation est aussi structurée dans la phylogénie des Ceratobasidiaceae) par les plantes est envisageable. Ce clade d'orchidées ne conserve pas toujours l'habitat forestier. Par exemple, *Cryptopus elatus* vit surtout dans les forêts semi-sèches ou dans les habitats exposés dans les forêts humides, alors que l'espèce *Beclardia macrostachya* vit dans les forêts humides de montagne. Dans ce cas précis, la coévolution est aussi envisageable. En effet, les Aerangidinae ne sont pas contraintes pour une OTU mais pour un clade large de Ceratobasidiaceae. De plus, ce clade a aussi été identifié chez plusieurs espèces d'orchidées de Madagascar appartenant aux Aerangidinae (*Cryptopus paniculatus*, *Oeonia polystachys*, *Beclardia macrostachya* ; F. Martos, observations préliminaires). De façon frappante, ce clade de Ceratobasidiaceae n'a été retrouvé ailleurs que dans une orchidée épiphyte aphylle de la sous-tribu des Aeridinae (même tribu des Vandeae) au Japon (espèce *Taeniophyllum aphyllum* ; Yagame, non publié ; GenBank AB449169-AB449205). Il existe vraisemblablement pour ce groupe taxonomique d'orchidées un choix de partenaires mycorhiziens au-delà des régions géographiques, qui pourrait résulter d'un processus de coévolution et/ou d'une coadaptation fonctionnelle entre ces plantes et ces champignons (ce groupe est d'ailleurs particulièrement riche en espèces aphylles, comme le genre *Microcoelia* ; Figure 1.13). Cette sous-tribu pourrait alors servir de modèle pour une première étude de la coévolution entre des orchidées autotrophes et leurs partenaires mycorhiziens. Cette étude pourrait être réalisée rapidement car des marqueurs génétiques des orchidées et des champignons impliqués sont déjà disponibles (Figure 8.3 ; Micheneau *et al.*, 2008b).

# Conclusion générale et perspectives de recherches

Les études antérieures sur les symbioses mycorhiziennes des orchidées se sont principalement focalisées sur les patrons d'associations d'espèces à espèces, ou sur un jeu réduit de partenaires dans la communauté. Bien que les exemples d'interactions très spécifiques existent dans la nature—comme l'interaction entre les sphinx de Darwin et les orchidées du genre *Angraecum* (Darwin, 1862; Nilsson, 1998), ou encore les interactions figuiers-pollinisateurs (Cook et Rasplus, 2003)—la plupart des organismes ne suivent pas de tels patrons d'interactions. Nous pensons, comme Jacquemyn *et al.* (2010), que le contexte des communautés apportera plus de compréhension sur la structure des symbioses orchidées-champignons que les études de cortèges isolés. En développant pour la première fois une approche de réseau dans les symbioses mycorhiziennes des orchidées tropicales, et en obtenant des données sur nombre jamais égalé d'orchidées d'une zone géographique restreinte, nous avons montré que :

- les orchidées autotrophes tropicales interagissent avec une grande diversité de champignons mycorhiziens (surtout des Tulasnellaceae) à une échelle géographique restreinte, et que la majorité de ces champignons sont largement représentés dans différents biomes et dans différentes orchidées hôtes : avec les potentielles exceptions des Trechisporales et des Attractiellales, qui restent peu fréquentes, les partenaires tropicaux ne semblent pas particuliers (apport des études phylogénétiques menées en parallèle de la thèse avec M. Weiss et L. Tedersoo) ;

- les espèces d'orchidées tropicales ont tendance à être généralistes dans leurs associations mycorhiziennes, et que les réseaux mycorhiziens qu'elles forment à l'échelle des communautés montrent une structure écologique semblable à celle des réseaux d'interactions mutualistes plantes-pollinisateurs, plantes-fourmis, etc. (bien que les communautés épiphytes et les communautés terrestres ne montrent pas les mêmes propriétés d'assemblages, ce point reste à confirmer) ; c'est sans doute une preuve forte d'un mutualisme (le bénéfice réciproque

n'étant quant à lui pas démontré physiologiquement) ;

- le signal phylogénétique des symbioses mycorhiziennes est faible à une échelle supra-générique, ce qui suggère que la coévolution (si elle a existé) ne devrait pas avoir été maintenue suffisamment longtemps pour détecter un signal à cette échelle ;

- le signal phylogénétique à l'échelle infra-générique se manifeste dans la phylogénie des orchidées, ce qui signifierait que les orchidées ont une tendance à se diversifier en conservant les partenaires de l'ancêtre commun et non l'inverse, et qu'une coévolution locale pourrait alors s'engager dans certains groupes taxonomiques d'orchidées ; comme la précédente, cette conclusion se comprend bien si on se rappelle que l'orchidée dépend obligatoirement du champignon, pas l'inverse ;

- les communautés épiphytes et terrestres ont des signatures évolutives différentes, soit parce que l'histoire évolutive récente des groupes épiphytes a engendré moins de changements de partenaires que l'histoire ancienne des groupes terrestres, soit parce qu'elles ne partagent pas une symbiose mycorhizienne de même nature.

Un second volet de la thèse a concerné l'étude de la mycohétérotrophie complète ou partielle des orchidées dans les régions tropicales. Nous avons à ce niveau montré que :

- les orchidées mycohétérotrophes tropicales peuvent s'associer à des champignons saprophytes et peuvent recevoir ainsi du carbone issu de l'activité de décomposition de la matière organique morte (feuilles, bois mort) dans les sols tropicaux ;

- les orchidées mycohétérotrophes tropicales peuvent fonctionner très différemment dans les écosystèmes tropicaux et dans les écosystèmes tempérés, surtout en étant parfois moins spécifiques d'un seul clade de champignons, ce qui démontre que le passage à la mycohétérotrophie ne résulte pas d'une adaptation unique mais de plusieurs adaptations indépendantes ;

- la mycohétérotrophie a évolué après l'établissement d'un régime nutritionnel intermédiaire (la mixotrophie) et que les changements de partenaires mycorhiziens servent de préadaptation à la mixotrophie (et donc à la mycohétérotrophie) ;

Au bilan, j'ai l'impression que ma thèse, qui visait à étudier la structure écologique et évolutive des symbioses mycorhiziennes des orchidées tropicales, livre plus de questions que de réponses. Les questions qui pourront être traitées en priorité sont, à mes yeux, les suivantes :

- les cortèges mycorhiziens liés à la germination des orchidées autotrophes tropicales sont-ils de même nature que ceux liés aux plantes adultes ? Les espèces d'orchidées tropicales généralistes au stade adulte sont-elles plus spécifiques à la germination ? Inversement, les espèces les plus spécialistes au stade adulte ont-elles des cortèges plus diversifiés à la germination ? La prochaine étape sera donc l'inventaire des cortèges mycorhiziens liés à la germination et au développement des protocormes par des expériences de semis de graines *in situ* que j'ai déjà entamées ;

- les Attractiellales connus comme partenaires mycorhiziens d'orchidées dans d'autres régions tropicales ont-ils un rôle plus large à l'échelle des tropiques ? De même, les Trechisporales qui ont été si souvent identifiés dans les orchidées de La Réunion (et de Madagascar) sont-ils des partenaires mycorhiziens des orchidées tropicales ? Ces questions pourraient être rapidement traitées à partir des échantillons de racines mycorhizées qui ont été conservées dans un fixateur pour la microscopie électronique. Des observations supplémentaires ont d'ailleurs été entreprises en collaboration avec I. Kottke (Tübingen, Allemagne) ;

- la spécificité du support de l'orchidée *B. variegatum* est-elle liée à une spécialisation pour un cortège de mycorhiziens qui serait lui-même lié à l'espèce d'arbre *Agauria salicifolia* ? Là encore, des expériences de semis de graines sur différents supports présents dans la communauté, dont le bois de rempart, permettraient de répondre à cette question ; des travaux de détection du champignon dans l'environnement (sol, écorce) seraient également utiles ;

- en ciblant des groupes d'orchidées ayant récemment adopté le mode de vie en épiphytes, les réseaux mycorhiziens des espèces terrestres et des espèces épiphytes ont-ils des signatures écologiques et évolutives différentes (comme l'a suggéré l'analyse de la structure des réseaux des genres de La Réunion) ? Le genre *Eulophia* (tribu des Cymbidieae) qui regroupe un grand nombre d'espèces épiphytes et terrestres en Afrique et en Asie tropicales sera un modèle prioritaire (projet de post-doctorat sous la direction du Professeur S. Johnson,

Université KwaZulu Natal, Afrique du Sud) ;

- toujours dans le genre *Eulophia*, les lignées proches de l'espèce asiatique mycohétérotrophe *Eulophia zollingeri* ont-elles adopté un régime nutritionnel intermédiaire (mixotrophie) à l'image des Cymbidieae du Japon ?

- les Aerangidinae suivent-ils un processus de coévolution avec certains clades de Ceratobasidiaceae ou ont-ils tendance à se diversifier en conservant les partenaires de l'ancêtre commun (inertie phylogénétique) ? Dans ce dernier cas, quels sont les traits des espèces pouvant expliquer la contrainte du choix de partenaires (écologiques, anatomiques, fonctionnelles) ? Le genre *Mystacidium* qui appartient à cette sous-tribu et qui s'est diversifié localement en Afrique du Sud et en Tanzanie, ou encore le genre *Microcoelia* à Madagascar, seront des modèles prioritaires (projet de post-doctorat sous la direction du Professeur S. Johnson, Université KwaZulu Natal, Afrique du Sud) ;

- enfin, les réseaux mycorhiziens observés à la Réunion peuvent-ils être prédits par des variables environnementales et/ou géographiques comme la diversité des habitats naturels ou encore les abondances relatives des partenaires dans les communautés ? Cette question devra probablement être traitée en augmentant les inventaires actuels des partenaires mycorhiziens à quelques communautés locales contrastées à La Réunion.

# Bibliographie


J.C. Abadie, U. Puttsepp, G. Gebauer, A. Faccio, P. Bonfante et M.A. Selosse : *Cephalanthera longifolia* (Neottieae, Orchidaceae) is mixotrophic : a comparative study between green and nonphotosynthetic individuals. *Botany*, 84 (9):1462–1477, 2006.

C. Alexander et IJ Alexander : Seasonal changes in populations of the orchid *Goodyera repens* Br. and in its mycorrhizal development. *Botanical Journal of Scotland*, 44(3):219–227, 1984.

C. Alexander et G. Hadley : Carbon movement between host and mycorrhizal endophyte during the development of the orchid *Goodyera repens* Br. *New Phytologist*, 101(4):657–665, 1985.

I. Alexander et M.A. Selosse : Mycorrhizas in tropical forests : a neglected research imperative. *New Phytologist*, 182(1):14–16, 2009.

J. Arditti et A.K.A. Ghani : Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytologist*, 145(3):367–421, 2000.

A.E. Arnold et F. Lutzoni : Diversity and host range of foliar fungal endophytes : are tropical leaves biodiversity hotspots ? *Ecology*, 88(3):541–549, 2007.

R.H. Baker et R. DeSalle : Multiple sources of character information and the phylogeny of Hawaiian drosophilids. *Systematic biology*, 46(4):654–673, 1997.

J. Bascompte et P. Jordano : Plant-animal mutualistic networks : the architecture of biodiversity. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 38 (1):567–593, 2007.

J. Bascompte, P. Jordano, C.J. Melián et J.M. Olesen : The nested assembly of plant–animal mutualistic networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(16):9383–9387, 2003.

J. Bascompte, P. Jordano et J.M. Olesen : Asymmetric coevolutionary networks facilitate biodiversity maintenance. *Science*, 312(5772):431–433, 2006.

U. Bastolla, M.A. Fortuna, A. Pascual-García, A. Ferrera, B. Luque et J. Bascompte : The architecture of mutualistic networks minimizes competition and increases biodiversity. *Nature*, 458(7241):1018–1020, 2009.

R. Bauer, D. Begerow, J.P. Sampaio, M. Weiβ et F. Oberwinkler : The simple-septate basidiomycetes : a synopsis. *Mycological Progress*, 5(1):41–66, 2006.

P. Bayman, L.L. Lebron, R.L. Tremblay et D. Lodge : Variation in endophytic fungi from roots and leaves of *Lepanthes* (Orchidaceae). *New Phytologist*, 135 (1):143–149, 1997.

C. Beau : Sur le rôle trophique des endophytes d'orchidées. *Comptes Rendus de l'Academie Des Sciences*, 171:675–677, 1920.

N. Bernard : Sur la germination du *Neottia nidus-avis*. *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Séances de l'Académie Des Sciences, Paris*, 128:1253–1255, 1899.

N. Bernard : Recherches expérimentales sur les Orchidées. *Revue générale de Botanique*, 16:405–451, 1904.

J.D. Bever : Negative feedback within a mutualism : host–specific growth of mycorrhizal fungi reduces plant benefit. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B : Biological Sciences*, 269(1509):2595–2601, 2002.

HF Beyrle, SE Smith, RL Peterson et CMM Franco : Colonization of *Orchis* mono protocorms by a mycorrhizal fungus : effects of nitrogen nutrition and glyphosate in modifying the responses. *Canadian Journal of Botany*, 73:1128–1140, 1995.

M.I. Bidartondo, T.D. Bruns, M. Weiβ, C. Sérgio et D.J. Read : Specialized cheating of the ectomycorrhizal symbiosis by an epiparasitic liverwort. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B : Biological Sciences*, 270(1517):835–842, 2003.

M.I. Bidartondo, B. Burghardt, G. Gebauer, T.D. Bruns et D.J. Read : Changing partners in the dark : isotopic and molecular evidence of ectomycorrhizal liaisons between forest orchids and trees. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B : Biological Sciences*, 271(1550):1799–1806, 2004.

M.I. Bidartondo et D.J. Read : Fungal specificity bottlenecks during orchid germination and development. *Molecular Ecology*, 17(16):3707–3716, 2008.

CW Birky : Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes : mechanisms and evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92 (25):11331–11338, 1995.

S.P. Blomberg et Jr. T. Garland : Tempo and mode in evolution : phylogenetic inertia, adaptation and comparative methods. *Journal of Evolutionary Biology*, 15(6):899–910, 2002.

S.P. Blomberg, JR Theodore Garland et A.R. Ives : Testing for phylogenetic signal in comparative data : behavioral traits are more labile. *Evolution*, 57(4):717–745, 2003.

J. Bosser : Contribution à l'étude des Orchidaceae de Madagascar, des Comores et des Mascareignes. XXXV. Description d'un *Oeceoclades* nouveau de Madagascar, et notes sur trois genres nouveaux pour les Mascareignes. *Adansonia*, 28(1):45–54, 2006.

J. Bosser, T. Cadet, J. Gueho et W. Marais : *Flore des Mascareignes*. Mauritius Sugar Industry Research Institute (MSIRI), Mauritius. L'Institut de Recherche pour le Developpement (IRD), Paris. The Royal Botanic Gardens, Kew, 1976.

J.L. Bronstein : The exploitation of mutualisms. *Ecology Letters*, 4(3):277–287, 2001.

T.D. Bruns, M.I. Bidartondo et D.L. Taylor : Host specificity in ectomycorrhizal communities : what do the exceptions tell us ? *Integrative and Comparative Biology*, 42(2):352–359, 2002.

H. Burgeff : *Die Wurzelpilze der Orchideen, ihre kulture und ihre leben in der pflanze*. Gustav Fischer : Jena, Germany, 1909.

H. Burgeff : *Saprophytismus und symbiose. Studien an tropischen orchideen*. Gustav Fischer : Jena, Germany, 1932.

L.J.T. Cadet : *La végétation de l'île de la Réunion : étude phytoécologique et phytosociologique*. Thèse de doctorat, Université d'Aix-Marseilles, 1977.

D.D. Cameron, I. Johnson, J.R. Leake et D.J. Read : Mycorrhizal acquisition of inorganic phosphorus by the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. *Annals of Botany*, 99:831–834, 2007.

D.D. Cameron, I. Johnson, D.J. Read et J.R. Leake : Giving and receiving : measuring the carbon cost of mycorrhizas in the green orchid, *Goodyera repens*. *New Phytologist*, 180(1):176–184, 2008.

D.D. Cameron, J.R. Leake et D.J. Read : Mutualistic mycorrhiza in orchids : evidence from plant-fungus carbon and nitrogen transfers in the green-leaved terrestrial orchid Goodyera repens. *New Phytologist*, 171(2):405–416, 2006.

K.M. Cameron : Utility of plastid psaB gene sequences for investigating intrafamilial relationships within Orchidaceae. *Molecular phylogenetics and evolution*, 31 (3):1157–1180, 2004.

M.W. Chase, K.M. Cameron, R.L. Barrett et J.V. Freudenstein : *Orchid Conservation*, pages 69–89. Natural History Publication (Borneo) : Kota Kinabalu, Sabah, 2003.

J.M. Cook et J.Y. Rasplus : Mutualists with attitude : coevolving fig wasps and figs. *Trends in Ecology & Evolution*, 18(5):241–248, 2003.

S. Cozzolino et A. Widmer : Orchid diversity : an evolutionary consequence of deception ? *Trends in Ecology & Evolution*, 20(9):487–494, 2005.

PJ Cribb, SP Kell, KW Dixon et RL Barrett : *Orchid Conservation*, chapitre Orchid conservation : a global perspective, pages 1–24. Natural History Publication (Borneo) : Kota Kinabalu, Sabah, 2003.

KW Cullings, TM Szaro et TD Bruns : Evolution of extreme specialization within a lineage of ectomycorrhizal epiparasites. *Nature*, 379:63–66, 1996.

JT Curtis : Non-specificity of orchid mycorrhizal fungi. *Proceedings Society Experimental Biology and Medicine*, 36:43–44, 1937.

C. Darwin : *The Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life.* John Murray (First edition) : London, 1859.

C. Darwin : *On the Various Contrivances by which British and Foreign Orchids are Fertilised by Insects.* John Murray : London, 1862.

R. Dawkins : *The selfish gene.* Oxford University Press : USA, 2006.

T.E. Dawson, S. Mambelli, A.H. Plamboeck, P.H. Templer et K.P. Tu : Stable isotope in plant ecology. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 33 (1):507–559, 2002.

A. De Bary : *Die Erscheinungen der Symbiose.* Triibner : Strasbourg, Germany, 1879.

J. Dearnaley : The fungal endophytes of *Erythrorchis cassythoides*-is this orchid saprophytic or parasitic ? *Australasian Mycologist*, 25(2):51–57, 2006.

J.D.W. Dearnaley : Further advances in orchid mycorrhizal research. *Mycorrhiza*, 17(6):475–486, 2007.

J.D.W. Dearnaley et J.J. Bougoure : Isotopic and molecular evidence for saprotrophic Marasmiaceae mycobionts in rhizomes of *Gastrodia sesamoides*. *Fungal Ecology*, 3:288–294, 2010.

R.L. Dressler : *The orchids : natural history and classification.* Harvard University Press : Cambridge, 1981.

RL Dressler : How many orchid species ? *Selbyana*, 26:155–158, 2006.

G.A. Fischer, B. Gravendeel, A. Sieder, J. Andriantiana, P. Heiselmayer, P.J. Cribb, E.C. Smidt, R. Samuel et M. Kiehn : Evolution of resupination in Malagasy species of *Bulbophyllum* (Orchidaceae). *Molecular phylogenetics and evolution*, 45(1):358–376, 2007.

AB Frank : Über die biologischen verhältnissen des thallus eineger krustenflechten. *Beitr Biol Pflanzen*, 2:123–200, 1877.

M. Gardes et TD Bruns : ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes—application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2(2):113–118, 1993.

G. Gebauer et M. Meyer : $^{15}$N and $^{13}$C natural abundance of autotrophic and myco-heterotrophic orchids provides insight into nitrogen and carbon gain from fungal association. *New Phytologist*, 160(1):209–223, 2003.

P.R. Grant : *Ecology and evolution of Darwin's finches.* Princeton University Press : Princeton, 1999.

B. Gravendeel, A. Smithson, F.J.W. Slik et A. Schuiteman : Epiphytism and pollinator specialization : drivers for orchid diversity ? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B : Biological Sciences*, 359(1450):1523–1535, 2004.

P.R. Guimarães, V. Rico-Gray, S. Furtado dos Reis et J.N. Thompson : Asymmetries in specialization in ant–plant mutualistic networks. *Proceedings of the Royal Society B : Biological Sciences*, 273(1597):2041–2047, 2006.

G. Hadley : Non-specificity of symbotic infection in orchid mycorrhiza. *New Phytologist*, 69(4):1015–1023, 1970.

G. Hadley et S. Purves : Movement of $^{14}$carbon from host to fungus in orchid mycorrhiza. *New Phytologist*, 73(3):475–482, 1974.

F. Hallé : *Aux origines des plantes : Tome1, Des plantes anciennes à la botanique du XXIe siècle*, chapitre L'adaptation à l'ombre, pages 328–351. Hallé, F., 2008.

L.V. Hooper et J.I. Gordon : Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science*, 292(5519):1115–1118, 2001.

K.W. Hughes, R.H. Petersen et E.B. Lickey : Using heterozygosity to estimate a percentage DNA sequence similarity for environmental species' delimitation across basidiomycete fungi. *New Phytologist*, 182(4):795–798, 2009.

AR Ives et HCJ Godfray : Phylogenetic analysis of trophic associations. *American Naturalist*, 168:E1–E14, 2006.

H. Jacquemyn, O. Honnay, B. Cammue, R. Brys et B. Lievens : Low specificity and nested subset structure characterize mycorrhizal associations in five closely related species of the genus *Orchis*. *Molecular Ecology*, 19:4086–4095, 2010.

H. Jacquemyn, C. Micheneau, D.L. Roberts et T. Pailler : Elevational gradients of species diversity, breeding system and floral traits of orchid species on Reunion Island. *Journal of Biogeography (J. Biogeogr.)*, 32:1751–1761, 2005.

D.H. Janzen : When is it coevolution ? *Evolution*, 34(3):611–612, 1980.

M.D. Jones et S.E. Smith : Exploring functional definitions of mycorrhizas : are mycorrhizas always mutualisms ? *Botany*, 82(8):1089–1109, 2004.

T. Julou, B. Burghardt, G. Gebauer, D. Berveiller, C. Damesin et M.A. Selosse : Mixotrophy in orchids : insights from a comparative study of green individuals and nonphotosynthetic individuals of *Cephalanthera damasonium*. *New Phytologist*, 166(2):639–653, 2005.

A.H. Kennedy et L.E. Watson : Species delimitations and phylogenetic relationships within the fully myco-heterotrophic *Hexalectris* (Orchidaceae). *Systematic Botany*, 35(1):64–76, 2010.

S. Kirman, D. Strasberg, V. Grondin et JD Meunier : Biogeochemical cycles in a tropical lowland rainforest (La Reunion Island) developed on a basaltic flow : first results. *In AGU Fall Meeting Abstracts*, volume 1, 2001.

J.N. Klironomos : Feedback with soil biota contributes to plant rarity and invasiveness in communities. *Nature*, 417(6884):67–70, 2002.

I. Kottke, J.P. Suárez, P. Herrera, D. Cruz, R. Bauer, I. Haug et S. Garnica : Atractiellomycetes belonging to the 'rust' lineage (Pucciniomycotina) form mycorrhizae with terrestrial and epiphytic neotropical orchids. *Proceedings of the Royal Society B : Biological Sciences*, 277(1685):1289–1298, 2010.

A.M. Kretzer, M.I. Bidartondo, L.C. Grubisha, J.W. Spatafora, T.M. Szaro et T.D. Bruns : Regional specialization of *Sarcodes sanguinea* (Ericaceae) on a single fungal symbiont from the *Rhizopogon ellenae* (Rhizopogonaceae) species complex. *American Journal of Botany*, 87(12):1778–1782, 2000.

K.A. Kristiansen, J.V. Freudenstein, F.N. Rasmussen et H.N. Rasmussen : Molecular identification of mycorrhizal fungi in *Neuwiedia veratrifolia* (Orchidaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 33(2):251–258, 2004.

S. Kusano : *Gastrodia elata* and its symbiotic association with *Armillaria mellea*. *Journal of the College of Agriculture : Tokyo*, 4:1–66, 1911.

T.C. LaJeunesse, D.T. Pettay, E.M. Sampayo, N. Phongsuwan, B. Brown, D.O. Obura, O. Hoegh-Guldberg et W.K. Fitt : Long-standing environmental conditions, geographic isolation and host–symbiont specificity influence the relative ecological dominance and genetic diversification of coral endosymbionts in the genus *Symbiodinium*. *Journal of Biogeography*, 37(5):785–800, 2010.

L. Laloy : *Parasitisme et mutualisme dans la nature*. Felix Alcan : Paris, 1906.

N. Lancaster : A study of the distribution of orchids in the mascarene islands. Mémoire de D.E.A., Reading University, 2004.

J.R. Leake : The biology of myco-heterotrophic ('saprophytic') plants. *New Phytologist*, 127(2):171–216, 1994.

J.R. Leake : Myco-heterotroph/epiparasitic plant interactions with ectomycorrhizal and arbuscular mycorrhizal fungi. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(4):422–428, 2004.

J.R. Leake et D.D. Cameron : Physiological ecology of mycoheterotrophy. *New Phytologist*, 185(3):601–605, 2010.

J.R. Leake, N.J. Ostle, J.I. Rangel-Castro et D. Johnson : Carbon fluxes from plants through soil organisms determined by field $^{13}$CO2 pulse-labelling in an upland grassland. *Applied Soil Ecology*, 33(2):152–175, 2006.

G. Masuhara et K. Katsuya : Effects of mycorrhizal fungi on seed germination and early growth of three Japanese terrestrial orchids. *Scientia Horticulturae*, 37 (4):331–337, 1989.

G. Masuhara et K. Katsuya : Mycorrhizal differences between genuine roots and tuberous roots of adult plants of *Spiranthes sinensis var. amoena* (Orchidaceae). *Journal of Plant Research*, 105(3):453–460, 1992.

G. Masuhara et K. Katsuya : *In situ* and *in vitro* specificity between *Rhizoctonia spp.* and *Spiranthes sinensis* (Persoon) Ames, *var. amoena* (M. Bieberstein) Hara (Orchidaceae). *New Phytologist*, 127(4):711–718, 1994.

G. Masuhara, K. Katsuya et K. Yamaguchi : Potential for symbiosis of *Rhizoctonia solani* and binucleate *Rhizoctonia* with seeds of *Spiranthes sinensis var. amoena in vitro*. *Mycological Research*, 97(6):746–752, 1993.

MK McCormick, DF Whigham et J. O'Neill : Mycorrhizal diversity in photosynthetic terrestrial orchids. *New Phytologist*, 163(2):425–438, 2004.

M.K. McCormick, D.F. Whigham, D. Sloan, K. O'Malley et B. Hodkinson : Orchid-fungus fidelity : a marriage meant to last ? *Ecology*, 87(4):903–911, 2006.

I. McDougall et W. Compston : Strontium isotope composition and potassium-rubidium ratios in some rocks from Reunion and Rodriguez, Indian Ocean. *Nature*, 207:252–253, 1965.

SL McKendrick, JR Leake et DJ Read : Symbiotic germination and development of myco-heterotrophic plants in nature : transfer of carbon from ectomycorrhizal *Salix repens* and *Betula pendula* to the orchid *Corallorhiza trifida* through shared hyphal connections. *New Phytologist*, 145(3):539–548, 2000.

V. Merckx et M.I. Bidartondo : Breakdown and delayed cospeciation in the arbuscular mycorrhizal mutualism. *Proceedings of the Royal Society B : Biological Sciences*, 275(1638):1029–1035, 2008.

C. Micheneau : *Systématique moléculaire de la sous-tribu des Angraecinae (Vandeae, Orchidaceae) : perspectives taxonomiques et implications de la relation plante-pollinisateur dans l'évolution des formes florales réunionnaises.* Thèse de doctorat, Université de La Réunion, 2005.

C. Micheneau, B.S. Carlsward, M.F. Fay, B. Bytebier, T. Pailler et M.W. Chase : Phylogenetics and biogeography of Mascarene angraecoid orchids (Vandeae, Orchidaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 46(3):908–922, 2008a.

C. Micheneau, J. Fournel, L. Humeau et T. Pailler : Orchid-bird interactions : a case study from *Angraecum* (Vandeae, Angraecinae) and *Zosterops* (white-eyes, Zosteropidae) on Reunion Island. *Botany*, 86(10):1143–1151, 2008b.

M. Molvray, PJ Kores et MW Chase : *Monocots : Systematics and Evolution*, pages 441–448. CSIRO : Melbourne, Australia, 2000.

RT Moore : The genera of *Rhizoctonia*-like fungi — *Ascorhizoctonia*, *Ceratorhiza* Gen-Nov, *Epulorhiza* Gen-Nov, *Moniliopsis*, and *Rhizoctonia*. *Mycotaxon*, 29:91–99, 1987.

U.G. Mueller et N. Gerardo : Fungus-farming insects : Multiple origins and diverse evolutionary histories. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(24):15247–15249, 2002.

N. Myers, R.A. Mittermeier, C.G. Mittermeier, G.A.B. da Fonseca et J. Kent : Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403(6772):853–858, 2000.

K.K. Nakasone : Morphological and molecular studies on *Resinicium* s. str. *Canadian Journal of Botany*, 85(4):420–436, 2007.

L.A. Nilsson : Deep flowers for long tongues. *Trends in Ecology & Evolution*, 13:259–260, 1998.

R.H. Nilsson, E. Kristiansson, M. Ryberg, N. Hallenberg et K.H. Larsson : 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, 2008.

V. Novotny, Y. Basset, S.E. Miller, G.D. Weiblen, B. Bremer, L. Cizek et P. Drozd : Low host specificity of herbivorous insects in a tropical forest. *Nature*, 416(6883):841–844, 2002.

Y. Ogura-Tsujita, G. Gebauer, T. Hashimoto, H. Umata et T. Yukawa : Evidence for novel and specialized mycorrhizal parasitism : the orchid *Gastrodia confusa* gains carbon from saprotrophic *Mycena*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B : Biological Sciences*, 276:761–767, 2009.

Y. Ogura-Tsujita et T. Yukawa : High mycorrhizal specificity in a widespread mycoheterotrophic plant, *Eulophia zollingeri* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, 95(1):93–97, 2008.

M.A. O'Malley : The nineteenth century roots of 'everything is everywhere'. *Nature Reviews Microbiology*, 5(8):647–651, 2007.

J. Otero, J.D. Ackerman et P. Bayman : Diversity and host specificity of endophytic *Rhizoctonia*-like fungi from tropical orchids. *American Journal of Botany*, 89(11):1852–1858, 2002.

J.T. Otero, J.D. Ackerman et P. Bayman : Differences in mycorrhizal preferences between two tropical orchids. *Molecular Ecology*, 13(8):2393–2404, 2004.

J.T. Otero, N.S. Flanagan, E.A. Herre, J.D. Ackerman et P. Bayman : Widespread mycorrhizal specificity correlates to mycorrhizal function in the neotropical, epiphytic orchid *Ionopsis utricularioides* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, 94(12):1944–1950, 2007.

R.L. Peterson, Y. Uetake, P. Bonfante et A. Faccio : The interface between fungal hyphae and orchid protocorm cells. *Canadian Journal of Botany*, 74(12): 1861–1870, 1996.

A. Porras-Alfaro et P. Bayman : Mycorrhizal fungi of *Vanilla* : diversity, specificity and effects on seed germination and plant growth. *Mycologia*, 99(4):510–525, 2007.

N.A. Provorov : Coevolution of rhizobia with legumes : facts and hypotheses. *Symbiosis*, 24(3):337–368, 1998.

S. Purves et G. Hadley : Movement of carbon compounds between the partners in orchid mycorrhiza. *Endomycorrhizas*, pages 175–194, 1974.

S.R. Ramírez, B. Gravendeel, R.B. Singer, C.R. Marshall et N.E. Pierce : Dating the origin of the Orchidaceae from a fossil orchid with its pollinator. *Nature*, 448(7157):1042–1045, 2007.

H.N. Rasmussen : *Terrestrial orchids : from seed to mycotrophic plant.* Cambridge University Press : Cambridge, 1995.

H.N. Rasmussen et F.N. Rasmussen : Orchid mycorrhiza : implications of a mycophagous life style. *Oikos*, 118(3):334–345, 2009.

F. Richard, S. Millot, M. Gardes et MA Selosse : Diversity and structuration by hosts of the below-ground mycorrhizal community in an old-growth Mediterranean forest dominated by *Quercus ilex*. *New Phytologist*, 166:1011–1023, 2005.

KA Richardson, RL Peterson et RS Currah : Seed reserves and early symbiotic protocorm development of *Platanthera hyperborea* (Orchidaceae). *Canadian Journal of Botany*, 70(2):291–300, 1992.

D.L. Roberts : *Reproductive Biology and Conservation of the Orchids of Mauritius.* Thèse de doctorat, University of Aberdeen, 2001.

S.A. Roche, R.J. Carter, R. Peakall, L.M. Smith, M.R. Whitehead et C.C. Linde : A narrow group of monophyletic *Tulasnella* (Tulasnellaceae) symbiont lineages are associated with multiple species of *Chiloglottis* (Orchidaceae) : Implications for orchid diversity. *American Journal of Botany*, 97(8):1313–1327, 2010.

M. Roy, S. Watthana, A. Stier, F. Richard, S. Vessabutr et M.A. Selosse : Two mycoheterotrophic orchids from Thailand tropical dipterocarpacean forests associate with a broad diversity of ectomycorrhizal fungi. *BMC biology*, 7:51–68, 2009a.

M. Roy, T. Yagame, M. Yamato, K. Iwase, C. Heinz, A. Faccio, P. Bonfante et M.A. Selosse : Ectomycorrhizal *Inocybe* species associate with the mycoheterotrophic orchid *Epipogium aphyllum* but not its asexual propagules. *Annals of Botany*, 104:595–610, 2009b.

M-A. Selosse : *La symbiose : structures et fonctions, rôle écologique et évolutif.* Vuibert : Paris, 2000.

M.A. Selosse, M.P. Dubois et N. Alvarez : Do Sebacinales commonly associate with plant roots as endophytes ? *Mycological Research*, 113:1062–1069, 2009.

M.A. Selosse, A. Faccio, G. Scappaticci et P. Bonfante : Chlorophyllous and achlorophyllous specimens of *Epipactis microphylla* (Neottieae, Orchidaceae) are associated with ectomycorrhizal septomycetes, including truffles. *Microbial Ecology*, 47(4):416–426, 2004.

MA Selosse et F. Le Tacon : The land flora : a phototroph-fungus partnership ? *Trends in Ecology & Evolution*, 13(1):15–20, 1998.

M.A. Selosse, F. Richard, X. He et S.W. Simard : Mycorrhizal networks : des liaisons dangereuses ? *Trends in Ecology & Evolution*, 21(11):621–628, 2006.

M.A. Selosse et M. Roy : Green plants that feed on fungi : facts and questions about mixotrophy. *Trends in Plant Science*, 14(2):64–70, 2009.

M.A. Selosse, S. Setaro, F. Glatard, F. Richard, C. Urcelay et M. Weiss : Sebacinales are common mycorrhizal associates of Ericaceae. *New Phytologist*, 174 (4):864–878, 2007.

M.A. Selosse, M. WEI, J.L. Jany et A. Tillier : Communities and populations of sebacinoid basidiomycetes associated with the achlorophyllous orchid *Neottia nidus-avis* (L.) LCM Rich. and neighbouring tree ectomycorrhizae. *Molecular Ecology*, 11(9):1831–1844, 2002.

R.P. Shefferson, D.L. Taylor, M. Weiss, S. Garnica, M.K. McCormick, S. Adams, H.M. Gray, J.W. McFarland, T. Kull, K. Tali *et al.* : The evolutionary history of mycorrhizal specificity among lady's slipper orchids. *Evolution*, 61(6):1380–1390, 2007.

R.P. Shefferson, M. Weiss, T. Kull et D.L. Taylor : High specificity generally characterizes mycorrhizal association in rare lady's slipper orchids, genus *Cypripedium*. *Molecular Ecology*, 14(2):613–626, 2005.

K. Silvera, L.S. Santiago, J.C. Cushman et K. Winter : Crassulacean acid metabolism and epiphytism linked to adaptive radiations in the Orchidaceae. *Plant physiology*, 149(4):1838–1847, 2009.

S.W. Simard, D.A. Perry, M.D. Jones, D.D. Myrold, D.M. Durall et R. Molina : Net transfer of carbon between ectomycorrhizal tree species in the field. *Nature*, 388(6642):579–582, 1997.

S.E. Smith : Physiology and ecology of orchid mycorrhizal fungi with reference to seedling nutrition. *New Phytologist*, 65(4):488–499, 1966.

S.E. Smith : Carbohydrate translocation in orchid mycorrhizas. *New Phytologist*, 66(3):371–378, 1967.

S.E. Smith et D.J. Read : *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press (Second edition) : San Diego, 2nd edition édition, 1997.

DE Soltis, PS Soltis, DR Morgan, SM Swensen, BC Mullin, JM Dowd et PG Martin : Chloroplast gene sequence data suggest a single origin of the predisposition for symbiotic nitrogen fixation in angiosperms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(7):2647–2651, 1995.

D. Strasberg, M. Rouget, D.M. Richardson, S. Baret, J. Dupont et R.M. Cowling : An assessment of habitat diversity and transformation on La Réunion

Island (Mascarene Islands, Indian Ocean) as a basis for identifying broad-scale conservation priorities. *Biodiversity and conservation*, 14(12):3015–3032, 2005.

J.P. Suárez, M. Weiss, A. Abele, S. Garnica, F. Oberwinkler et I. Kottke : Diverse tulasnelloid fungi form mycorrhizas with epiphytic orchids in an Andean cloud forest. *Mycological Research*, 110(11):1257–1270, 2006.

J.P. Suárez, M. Weiss, A. Abele, F. Oberwinkler et I. Kottke : Members of Sebacinales subgroup B form mycorrhizae with epiphytic orchids in a neotropical mountain rain forest. *Mycological Progress*, 7(2):75–85, 2008.

D.L. Taylor et T.D. Bruns : Independent, specialized invasions of ectomycorrhizal mutualism by two nonphotosynthetic orchids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(9):4510–4515, 1997.

DL Taylor, TD Bruns, JR Leake et DJ Read : *Mycorrhizal Ecology*, chapitre Mycorrhizal specificity and function in myco-heterotrophic plants, pages 375–414. Van der Heijden, M.G.A. and Sanders, I., 2002.

D.L. Taylor, T.D. Bruns, T.M. Szaro et S.A. Hodges : Divergence in mycorrhizal specialization within *Hexalectris spicata* (Orchidaceae), a nonphotosynthetic desert orchid. *American Journal of Botany*, 90(8):1168–1179, 2003.

D.L. Taylor et M.K. McCormick : Internal transcribed spacer primers and sequences for improved characterization of basidiomycetous orchid mycorrhizas. *New Phytologist*, 177(4):1020–1033, 2008.

L. Tedersoo, T.W. May et M.E. Smith : Ectomycorrhizal lifestyle in fungi : global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza*, 20(4):217–263, 2010.

L. Tedersoo et K. Nara : General latitudinal gradient of biodiversity is reversed in ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 185(2):351–354, 2010.

E. Thébault et C. Fontaine : Does asymmetric specialization differ between mutualistic and trophic networks ? *Oikos*, 117(4):555–563, 2008.

E. Thébault et C. Fontaine : Stability of Ecological Communities and the Architecture of Mutualistic and Trophic Networks. *Science*, 329(5993):853–856, 2010.

J.N. Thompson : *The geographic mosaic of coevolution.* University of Chicago Press : Chicago, 2005.

R.L. Tremblay, J.K. Zimmerman, L. Lebrón, P. Bayman, I. Sastre, F. Axelrod et J. Alers-García : Host specificity and low reproductive success in the rare endemic Puerto Rican orchid *Lepanthes caritensis*. *Biological Conservation*, 85(3):297–304, 1998.

S.A. Trudell, P.T. Rygiewicz et R.L. Edmonds : Nitrogen and carbon stable isotope abundances support the myco-heterotrophic nature and host-specificity of certain achlorophyllous plants. *New Phytologist*, 160(2):391–401, 2003.

P.J. Van Beneden : *Les commensaux et les parasites dans le règne animal*. Baillière : Paris, 1875.

D.P. Vázquez, N. Bluthgen, L. Cagnolo et N.P. Chacoff : Uniting pattern and process in plant–animal mutualistic networks : a review. *Annals of Botany*, 103(9):1445–1457, 2009a.

D.P. Vázquez, N.P. Chacoff et L. Cagnolo : Evaluating multiple determinants of the structure of plant-animal mutualistic networks. *Ecology*, 90(8):2039–2046, 2009b.

JH Warcup et PHB Talbot : Perfect states of Rhizoctonias associated with orchids. *New Phytologist*, 66(4):631–641, 1967.

L.T. Wasserthal : The pollinators of the Malagasy star orchids *Angraecum sesquipedale*, *A. sororium* and *A. compactum* and the evolution of extremely long spurs by pollinator shift. *Botanica Acta*, 110(5):343–359, 1997.

M. Weiss, M.A. Selosse, K.H. Rexer, A. Urban et F. Oberwinkler : Sebacinales : a hitherto overlooked cosm of heterobasidiomycetes with a broad mycorrhizal potential. *Mycological Research*, 108(9):1003–1010, 2004.

TJ White, T. Bruns, S. Lee, J. Taylor *et al.* : Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols : a guide to methods and applications*, 18:315–322, 1990.

J Xu et S Guo : Retrospect on the research of the cultivation of *Gastrodia elata* Bl., a rare traditional Chinese medicine. *Chinese Medical Journal*, 113(8):686–692, 2000.

T. Yagame, M. Yamato, A. Suzuki et K. Iwase : Ceratobasidiaceae mycorrhizal fungi isolated from nonphotosynthetic orchid *Chamaegastrodia sikokiana*. *Mycorrhiza*, 18(2):97–101, 2008.

M. Yamato, T. Yagame, A. Suzuki et K. Iwase : Isolation and identification of mycorrhizal fungi associating with an achlorophyllous plant, *Epipogium roseum* (Orchidaceae). *Mycoscience*, 46(2):73–77, 2005.

J.A. Yoder, L.W. Zettler et S.L. Stewart : Water requirements of terrestrial and epiphytic orchid seeds and seedlings, and evidence for water uptake by means of mycotrophy. *Plant Science*, 156(2):145–150, 2000.

T. Yukawa, K. Miyoshi et J. Yokoyama : Molecular phylogeny and character evolution of *Cymbidium* (Orchidaceae). *Bulletin of the National Science Museum Series B*, 28:129–139, 2002.

T. Yukawa, Y. Ogura-Tsujita, R.P. Shefferson et J. Yokoyama : Mycorrhizal diversity in *Apostasia* (Orchidaceae) indicates the origin and evolution of orchid mycorrhiza. *American Journal of Botany*, 96(11):1997–2009, 2009.

C.D. Zelmer, L. Cuthbertson et R.S. Currah : Fungi associated with terrestrial orchid mycorrhizas, seeds and protocorms. *Mycoscience*, 37(4):439–448, 1996.

LW Zettler, J. Sharma et FN Rasmussen : *Orchid Conservation*, chapitre Mycorrhizal diversity, pages 205–226. Natural History Publications : Kota Kinabalu, Sabah, 2003.

# Quatrième partie

# Annexes

# Annexe A

## *Phylogenetic species delimitation in ectomycorrhizal fungi and implications for barcoding : the case of the Tricholoma scalpturatum complex (Basidiomycota)*

M E C 4 8 6 3 B
Journal Name Manuscript No.
Dispatch: 7.10.10 Journal: MEC CE: Anusha
Author Received: No. of pages: 15 PE: Abinaya

Molecular Ecology (2010) doi: 10.1111/j.1365-294X.2010.04863.x

# Phylogenetic species delimitation in ectomycorrhizal fungi and implications for barcoding: the case of the *Tricholoma scalpturatum* complex (Basidiomycota)

PATRICIA JARGEAT,*†§ FLORENT MARTOS,*†§¶ FABIAN CARRICONDE,*†** HERVÉ GRYTA,*† PIERRE-ARTHUR MOREAU‡ and MONIQUE GARDES*†

*Université de Toulouse, UPS, UMR5174 EDB (Laboratoire Evolution et Diversité Biologique); 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse, France, †CNRS, UMR5174 EDB, F-31062 Toulouse, France, ‡Faculté des Sciences Biologiques et Pharmaceutiques, Département de Botanique, BP83, F-59006 Lille, France

## Abstract

**Population studies have revealed that the fungal ectomycorrhizal morphospecies *Tricholoma scalpturatum* consists of at least two genetically distinct groups that occur sympatrically in several geographical areas. This discovery prompted us to examine species boundaries and relationships between members formerly assigned to *T. scalpturatum* and allied taxa using phylogenetic analyses. Sequence data were obtained from three nuclear DNA regions [internal transcribed spacer (ITS), *gpd* and *tef*], from 101 carpophores collected over a large geographical range in Western Europe, and some reference sequences from public databases. The ITS was also tested for its applicability as DNA barcode for species delimitation. Four highly supported phylogenetic clades were detected. The two previously detected genetic groups of *T. scalpturatum* were assigned to the phylospecies *Tricholoma argyraceum* and *T. scalpturatum*. The two remaining clades were referred to as *Tricholoma cingulatum* and *Tricholoma inocybeoides*. Unexpectedly, *T. cingulatum* showed an accelerated rate of evolution that we attributed to narrow host specialization. This study also reveals recombinant ITS sequences in *T. inocybeoides*, suggesting a hybrid origin. The ITS was a useful tool for the determination of species boundaries: the mean value of intraspecific genetic distances in the entire ITS region (including 5.8S rDNA) was <0.2%, whereas interspecific divergence estimates ranged from 1.78% to 4.22%. Apart from giving insights into the evolution of the *T. scalpturatum* complex, this study contributes to the establishment of a library of taxonomically verified voucher specimens, an a posteriori correlation between phenotype and genotype, and DNA barcoding of ectomycorrhizal fungi.**

*Keywords*: DNA barcode, ectomycorrhizal fungi, phylogenetic species recognition, recombinant ITS, *Tricholoma scalpturatum*

*Received 15 July 2010; revision received 7 September 2010; accepted 16 September 2010*

Correspondence: Dr Patricia Jargeat, Fax: +33 561 55 73 27; E-mail jargeat@cict.fr
§These authors have equally contributed to this work.
¶Present address: Université de La Réunion, UMR C53. Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical, 15 Av. R. Cassin, BP 7151, F-97715 Saint Denis Cedex 9, France.
**Present address: Molecular Mycology Research Laboratory, CIDM, ICPMR, Westmead Hospital, Darcy Road, Westmead, NSW 2145, Australia.

## Introduction

In the fungal kingdom, species have historically been defined based on the morphology of asexual and sexual reproductive structures, but increasingly molecular phylogenetic studies are providing new solutions to the problem of species recognition (Taylor *et al.* 2007). Thus, the large and ever-growing number of fungal DNA sequences offers the opportunity of identifying potential

© 2010 Blackwell Publishing Ltd

UNCORRECTED PROOF

cases of cryptic speciation. At the same time, species molecular identification based on comparison between generated sequences and databases (DNA barcoding) is spreading. This method has become particularly crucial for the studies of ectomycorrhizal fungal communities. The use of nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region for the identification of fungi from environmental samples is becoming increasingly popular (Nilsson *et al.* 2008), although the question of the level at which fungal species are discriminated still remains. Interspecific and intraspecific variability does not appear to be uniform across taxonomic groups (Begerow *et al.* 2010). For instance, intraspecific divergence could be high in some groups, e.g. up to 24.2% in *Xilaria hypoxylon* (Nilsson *et al.* 2008). By contrast, interspecific divergence could be low for recently separated species groups such as *Alnicola* (Moreau *et al.* 2006) or in the genus *Cantharellus*, in which sequence divergence values between species range from 1.4% to 3% (Dunham *et al.* 2003).

Molecular studies of the *Tricholoma scalpturatum* complex gave us the opportunity to better define ectomycorrhizal phylogenetic species boundaries and to test the suitability of DNA barcoding based on ITS sequences. *Tricholoma scalpturatum* (Fr.) Quél. is a common ectomycorrhizal basidiomycete (*Tricholomataceae*) that associates with a wide variety of conifers and deciduous trees. The morphological characteristics of *T. scalpturatum* (yellow oxidation of flesh when damaged, farinaceous smell and absence of differentiated subpellis (Christensen & Noordeloos 1999) are shared by several more or less distinguishable species such as *Tricholoma argyraceum* (Bull.) Gillet, *Tricholoma alboconicum* (J.E. Lange) Clémençon, *Tricholoma inocybeoides.* A. Pears., *Tricholoma ramentaceum* (Bull:Fr.) Ricken and *Tricholoma cingulatum* (Almfelt) Jacobashch. This last species is the only easily recognizable species because it is well characterized by a conspicuous partial veil and is strictly associated with willows (*Salix* spp.) (Bon 1984). Substantial knowledge on the ecology and population genetics of *T. scalpturatum* has been accumulated over numerous years of sampling in European populations (Gryta *et al.* 2006; Carriconde *et al.* 2008a,b). These studies have suggested that *T. scalpturatum* is a species complex composed of at least two 'cryptic' genetic species (called genetic 'group 1' and 'group 2' in Carriconde *et al.* 2008a,b), these two groups occurring in sympatry in the same forest site and even on the same spot. Studies on local population dynamics have put forward a pioneer behaviour for *T. scalpturatum.* Indeed, the mode of dispersal is predominantly by sexual reproduction rather than by mycelial spread (Gryta *et al.* 2006; Carriconde *et al.* 2008a,b). A study carried out with mitochondrial markers such as the V9 domain of the mt SSU-rDNA also clearly separated *T. scalpturatum* genetic groups 1 and 2 (Mouhamadou *et al.* 2008). However, the real status of these two genetic groups and their links to other related species remains unclear.

Taylor *et al.* (2000) promoted the use of multiple gene genealogies to delineate genetically isolated species, referred to as phylogenetic species. In this approach, the phylogenetic concordance between different gene genealogies will be because of the fixation of previous polymorphic loci after genetic isolation. Conflicts among independent gene topologies can be caused by recombination events between individuals within a species, and transition from concordance to conflict determines the limits of species (Taylor *et al.* 2000). This approach has been used with a large variety of organisms and successfully demonstrated the existence, for example, of cryptic species in the California turret spider *Antrodiaetus riversi* (Starrett & Hedin 2007), in the cnidaria *Aurelia aurita* (Dawson & Jacobs 2001) and even to demonstrate the existence of two species of elephants in Africa (Roca *et al.* 2001). Among fungi, gene genealogies have also been used to identify genetically isolated lineages and species in some ascomycete taxa but reports for basidiomycetes are few, in saprobic – parasitic (Johannesson & Stenlid 2003; Kauserud *et al.* 2006, 2007a,b) as well as symbiotic, ectomycorrhizal fungi such as *Amanita muscaria* (Geml *et al.* 2006) and the *Paxillus involutus* complex (Hedh *et al.* 2008).

The aim of this study was (i) to clarify the status of the two *T. scalpturatum* genetic groups, (ii) to explore the species boundaries in the morphotaxon *T. scalpturatum* and with its closely related European morphospecies by the means of concordance of multiple gene genealogies and (iii) to evaluate the ability of genetic divergence in the ITS region to delineate species in a barcoding context. To this end, three nuclear DNA regions (ITS, glyceraldehyde-3-phosphodehydrogenase *gpd* and translation elongation factor 1α *tef*) were sequenced for 101 carpophores, collected in six European countries under different host plants and morphologically identified as *T. scalpturatum*, *T. cingulatum*, *T. ramentaceum*, *T. argyraceum* and *T. inocybeoides* according to traditional systematic definitions (Bon 1984). In addition, sequences of reference specimens such as type material or authentic material (collections identified by the author of the taxon, posterior to its publication) were added to the analysis to attribute a correct name to each clade, according to the International Code of Botanical Nomenclature (McNeill *et al.* 2006).

## Materials and methods

### *Isolates*

The 101 analysed carpophores (Table 1) were originated from France, Switzerland, Sweden, Denmark,

UNCORRECTED PROOF

© 2010 Blackwell Publishing Ltd

**Table 1** Isolates included in the study. Information about the identification of the isolates, their geographical origin and host species is given together with GenBank accession numbers for the sequences of the three genes. EU accession numbers are from Carriconde *et al.* (2008a). ITS type are defined based on deduced haplotypes: majuscule letter corresponds to homozygote (same haplotype for both nuclei), while minuscule letters are used when two different haplotypes were deduced from a heterozygous sequence

| Isolate* | Year of sampling | Site of sampling (country)† | Trees present | ITS type | PS‡ | Accession numbers | | | Source§ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | ITS | GPD | TEF | |
| T.argLille06.1 | 2006 | Lille Nord (F) | *Betula pendula* | i1 i2 | TI | HQ184139 | GU060205 | GU060151 | 2 |
| T.cinFM06.1 | 2006 | Flines les Montagnes Nord (F) | *Salix* sp. | C1 | TC | HQ184135 | – | – | 2 |
| T.cinEme04.1 | 2004 | Emerchicourt Nord (F) | *Salix caprea* | | TC | – | GU060205 | GU060141 | 2 |
| T.cinRim03.1 | 2003 | Rimont Ariège (F) | *Salix caprea* | C1 | TC | GU060262 | GU060206 | GU060142 | 15 |
| T.cinSCV03.1 | 2003 | Ste Croix Volvestre Ariège (F) | *Salix caprea* | C2 | TC | GU060263 | GU060207 | GU060143 | 3 |
| T.cinSCV07.1 | 2007 | Ste Croix Volvestre Ariège (F) | *Salix caprea* | C2 | TC | HQ184136 | GU060208 | GU060144 | 3 |
| T.cinSCV07.2 | 2007 | Ste Croix Volvestre Ariège (F) | *Salix caprea* | | TC | – | GU060209 | – | 3 |
| T.cinWim83.1 | 1983 | Wimereux Pas-de-Palais (F) | *Salix* sp. | C3 | TC | GU060264 | – | – | 1 |
| T.inoEta06.1 | 2006 | Etaples Pas-de-Palais (F) | *Populus tremula* | I1 | TI | HQ184140 | GU060200 | GU060146 | 2 |
| T.ramAmb04.1 | 2004 | Ambleteuse Pas-de-Palais (F) | Unknown | A2 | TA | GU060268 | GU060214 | – | 2 |
| T.ramMer06.1 | 2006 | Merlimont Pas de Calais (F) | *Salix repens* | C2 | TC | HQ184137 | GU060210 | GU060145 | 2 |
| T.ramTal93.1 | 1993 | Talmont St Hilaire Loire-Atlantique (F) | *Quercus ilex* | a1 a3 | TA | HQ184101 | – | – | 2 |
| T.ramVen68.1 | 1968 | La Tranche Vendée (F) | *Salix arenaria* | A1 | TA | HQ184102 | – | – | 5a |
| T.scaAB02.1 | 2002 | Amélie-les-Bains Pyrénées Orientales (F) | *Q. ilex* | s1 s2 | TS | GU060282 | GU060240 | GU060186 | 6 |
| T.scaAB02.3 | 2002 | Amélie-les-Bains Pyrénées Orientales (F) | *Q. ilex* | s1 s2 | TS | HQ184145 | GU060241 | GU060187 | 6 |
| T.scaAB03.1 | 2003 | Amélie-les-Bains Pyrénées Orientales (F) | *Q. ilex* | A1 | TA | EU160586 | GU060211 | GU060152 | 6 |
| T.scaAF00.7 | 2000 | Toulouse Haute Garonne (F) | *Populus nigra* | A1 | TA | HQ184105 | GU060212 | – | 16 |
| T.scaAF00.53 | 2000 | Toulouse Haute Garonne (F) | *P. nigra* | S1 | TS | GU060279 | GU060242 | GU060175 | 16 |
| T.scaAF00.236 | 2000 | Toulouse Haute Garonne (F) | *P. nigra* | S1 | TS | HQ184146 | – | GU060176 | 16 |
| T.scaAF00.242 | 2000 | Toulouse Haute Garonne (F) | *P. nigra* | A1 | TA | HQ184104 | GU060213 | GU060154 | 16 |
| T.scaAV00.1 | 2000 | Ambrans Aveyron (F) | Mixed | a3 a4 | TA | GU060274 | GU060215 | GU060153 | 7 |
| T.scaAV00.5 | 2000 | Ambrans Aveyron (F) | Mixed | A1 | TA | EU160589 | GU060216 | – | 7 |
| T.scaAV00.8 | 2000 | Ambrans Aveyron (F) | Mixed | A1 | TA | HQ184108 | GU060217 | – | 7 |
| T.scaAV00.10 | 2000 | Ambrans Aveyron (F) | Mixed | A1 | TA | HQ184106 | – | – | 7 |
| T.scaAV03.1 | 2003 | Ambrans Aveyron (F) | Mixed | A5 | TA | HQ184109 | – | – | 8 |
| T.scaAV04.105 | 2004 | Ambrans Aveyron (F) | Mixed | s3 s4 | TS | GU060284 | GU060243 | GU060188 | 8 |
| T.scaAV04.189 | 2004 | Ambrans Aveyron (F) | Mixed | s1 s2 | TS | HQ184148 | GU060244 | GU060185 | 8 |
| T.scaAV04.232 | 2004 | Ambrans Aveyron (F) | Mixed | | TS | – | – | GU060190 | 8 |
| T.scaBo06.1 | 2006 | Bonifacio Corse (F) | *Q. ilex* | S1 | TS | HQ184149 | – | – | 2 |
| T.scaCAM03.4 | 2003 | Campet forest, Durance Lot et Garonne (F) | Conifers | S1 | TS | HQ184151 | – | GU060192 | 9 |
| T.scaCAM03.5 | 2003 | Campet forest, Durance Lot et Garonne (F) | Conifers | S1 | TS | HQ184152 | – | GU060193 | 9 |
| T.scaCAM03.15 | 2003 | Campet forest, Durance Lot et Garonne (F) | Conifers | S1 | TS | HQ184150 | – | GU060191 | 9 |
| T.scaCar60.47 | 1960 | Carnelle Val d'Oise (F) | Conifers | S1 | TA | HQ184112 | – | – | ? |
| T.scaCo00.1 | 2000 | Coti Chiavari Corse (F) | *Q. ilex* | S5 | TS | GU060285 | – | – | 10 |
| T.scaCo00.2 | 2000 | Coti Chiavari Corse (F) | *Q. ilex* | n.d. | TS | GU060287 | GU060247 | – | 10 |
| T.scaCo00.13 | 2000 | Coti Chiavari Corse (F) | *Q. ilex* | S5 | TS | HQ184153 | GU060245 | GU060194 | 10 |
| T.scaCo00.14 | 2000 | Coti Chiavari Corse (F) | *Q. ilex* | s5 s6 | TS | GU060286 | GU060246 | GU060195 | 10 |
| T.scaEta06.1 | 2006 | Etaples Pas de Calais (F) | *Populus tremula* | S7 | TS | HQ184154 | – | – | 2 |
| T.scaJHC93.243 | 1993 | Kridtstien NWJ (DK) | *Picea abies*, *Abies* sp. | A3 | TA | HQ184116 | GU060222 | GU0159 | 12 |

© 2010 Blackwell Publishing Ltd

UNCORRECTED PROOF

**Table 1** (Continued)

| Isolate* | Year of sampling | Site of sampling (country)† | Trees present | ITS type | PS‡ | Accession numbers ITS | GPD | TEF | Source§ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| T.scaJHC93.267 | 1993 | Trelde EJ (DK) | *Fagus sylvatica* | S1 | TS | EU160591 | GU060248 | GU0177 | 12 |
| T.scaJHC93.332 | 1993 | Kridtstien NWJ (DK) | *P. abies*, *Abies* sp. | A3 | TA | HQ184117 | – | – | 12 |
| T.scaJHC94.388 | 1994 | Røsnaes NWZ (DK) | *P. abies*, *Abies* sp. | n.d. | TA | GU060278 | GU060223 | GU060160 | 12 |
| T.scaJHC94.414 | 1994 | Røsnaes NWZ (DK) | *P. abies*, *Abies* sp. | A1 | TA | HQ184118 | GU060224 | GU060161 | 12 |
| T.scaJHC95.077 | 1995 | Västanå Medelpad (S) | *Populus* sp. | | TA | – | GU060225 | GU060162 | 12 |
| T.scaJHC95.078 | 1995 | Västanå Medelpad (S) | *Populus* sp. | A6 | TA | HQ184119 | GU060226 | GU060163 | 12 |
| T.scaJHC95.105 | 1995 | Frederiksberg Have NEZ (DK) | *Fagus sylvatica* | S1 | TS | HQ184156 | – | GU060178 | 12 |
| T.scaJHC95.109 | 1995 | Geel Skov NEZ (DK) | *Fagus sylvatica* | s1 s2 | TS | HQ184157 | GU060249 | GU060179 | 12 |
| T.scaJHC95.111 | 1995 | Geel Skov NEZ (DK) | *Fagus sylvatica* | s1 s2 | TS | HQ184158 | GU060250 | – | 12 |
| T.scaJHC95.117 | 1995 | Kongelunden NEZ (DK) | *Fagus sylvatica* | S1 | TS | HQ184159 | GU060251 | GU060180 | 12 |
| T.scaJHC96.249 | 1996 | Frederiksberg Have NEZ (DK) | *Fagus sylvatica* | S1 | TS | EU160590 | – | GU060181 | 12 |
| T.scaJHC96.250 | 1996 | Frederiksberg Have NEZ (DK) | *Fagus sylvatica* | S1 | TS | HQ184161 | GU060252 | GU060196 | 12 |
| T.scaJHC97.092 | 1997 | Långbahn Värmland (S) | Mixed | A3 | TA | HQ184120 | GU060227 | GU060164 | 12 |
| T.scaJHC97.174 | 1997 | Assistens Kirkegård NEZ (DK) | *Betula* sp. | a1 a3 | TA | EU160583 | GU060228 | GU060165 | 12 |
| T.scaJV91.738 | 1991 | Tåsinge Lunkeris F (DK) | *Populus* sp. | A1 | TA | EU160584 | GU060229 | GU060166 | 12 |
| T.scaKM89393 | unknown | Cambridgeshire (UK) | *Betula* sp. | I3 | TI | GU060267 | – | – | 13 |
| T.scaKM90028 | unknown | Bukinghamshire (UK) | *Corylus avellana* | S1 | TS | HQ184164 | – | – | 13 |
| T.scaKM124583 | unknown | West Sussex (UK) | *Betula* sp. | S1 | TS | HQ184162 | – | – | 13 |
| T.scaKM124783 | unknown | Lancashire (UK) | *Taxus baccata* | a1 a3 | TA | HQ184123 | – | – | 13 |
| T.scaKM125572 | unknown | Surrey (UK) | *Betula* sp. | a4 a7 | TA | GU060276 | – | – | 13 |
| T.scaKM135443 | unknown | South Devon (UK) | *Ilex aquifolium* | S1 | TS | HQ184163 | – | – | 13 |
| T.scaLBL02.1 | 2002 | Le Bourget du Lac Savoie (F) | *Populus* sp. | S1 | TS | EU160592 | – | – | 2 |
| T.scaLille06.2 | 2006 | Lille Nord (F) | *Betula pendula* | i1 i2 | TI | HQ184144 | GU060204 | GU060149 | 2 |
| T.scaLille06.139 | 2006 | Lille Nord (F) | *P. nigra* | i1 i2 | TI | HQ184143 | GU060203 | GU060149 | 2 |
| T.scaLM02.2 | 2002 | Les Monts Savoie (F) | *Abies nordmanniana* | s1 s2 | TS | GU060281 | GU060253 | – | 2 |
| T.scaLM02.3 | 2002 | Les Monts Savoie (F) | *Abies nordmanniana* | s1 s2 | TS | HQ184166 | GU060254 | – | 2 |
| T.scaMO98.16 | 1998 | Monbéqui Tarn et Garonne (F) | *P. nigra* | A1 | TA | HQ184125 | GU060231 | GU060168 | 16 |
| T.scaMO98.53 | 1998 | Monbéqui Tarn et Garonne (F) | *P. nigra* | A1 | TA | GU060269 | GU060232 | – | 16 |
| T.scaMO98.56 | 1998 | Monbéqui Tarn et Garonne (F) | *P. nigra* | A1 | TA | EU160587 | GU060233 | GU060159 | 16 |
| T.scaMO98.62 | 1998 | Monbéqui Tarn et Garonne (F) | *P. nigra* | A1 | TA | HQ184127 | GU060234 | GU060170 | 16 |
| T.scaMO99.10 | 1999 | Monbéqui Tarn et Garonne (F) | *P. nigra* | A1 | TA | HQ184128 | GU060235 | GU060171 | 16 |
| T.scaMS02.3 | 2002 | La Motte Servolex Savoie (F) | *Betula pendula* | S1 | TS | HQ184129 | GU060255 | GU060182 | 2 |
| T.scaPou02.1 | 2002 | Pouvourville Haute Garonne (F) | *Pinus* sp. | A1 | TA | EU160588 | – | – | 9 |
| T.scaRa05.15h5 | 2005 | Ramonville St Agne Haute Garonne (F) | *Cedrus* sp. | S7 | TS | GU060280 | GU60256 | GU060183 | 6 |
| T.scaRa05.27h1 | 2005 | Ramonville St Agne Haute Garonne (F) | *Cedrus* sp. | S1 | TS | HQ184167 | GU060257 | GU060184 | 6 |
| T.scaRim03.1 | 2003 | Rimont Ariège (F) | *P. abies* | | TS | | GU060258 | – | 8 |
| T.scaRim03.2 | 2003 | Rimont Ariège (F) | *P. abies* | S7 | TS | HQ184168 | – | GU060185 | 8 |
| T.scaRim03.3 | 2003 | Rimont Ariège (F) | *P. abies* | S1 | TS | EU160596 | GU060259 | GU060197 | 8 |
| T.scaRim04.13 | 2004 | Rimont Ariège (F) | *P. abies* | A1 | TA | HQ184132 | GU060237 | GU060172 | 8 |
| T.scaRim04.53 | 2004 | Rimont Ariège (F) | *P. abies* | a1 a6 | TA | GU06271 | GU060238 | GU060173 | 8 |

UNCORRECTED PROOF

© 2010 Blackwell Publishing Ltd

© 2010 Blackwell Publishing Ltd

UNCORRECTED PROOF

**Table 1** (Continued)

| Isolate* | Year of sampling | Site of sampling (country)† | Trees present | ITS type | PS‡ | Accession numbers | | | Source§ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | ITS | GPD | TEF | |
| T.scaRim05.11h1 | 2005 | Rimont Ariège (F) | *P. abies* | S8 | TS | GU060283 | GU060260 | GU060198 | 8 |
| T.scaRim05.73h1 | 2005 | Rimont Ariège (F) | *P. abies* | A6 | TA | GU060270 | GU060239 | GU060174 | 8 |
| T.scaZur03.1 | 2003 | Zurich Canton of Zurich (CH) | *Fagus sylvatica* | S1 | TS | HQ184170 | – | – | 2 |
| T.scaZur04.1 | 2004 | Zurich Canton of Zurich (CH) | *Carpinus betulus* | A3 | TA | HQ184134 | – | – | 2 |
| *Variant forms* | | | | | | | | | |
| var. *atrocinctum* | | | | | | | | | |
| T.scaArb03.1 | 2003 | Arbucies Catalunya (SP) | *Q. ilex* | S1 | TS | EU160594 | – | – | 2 |
| T.scaSRP73.1 | 1973 | St Rémy de Provence Bouches du Rhône (F) | *Q. ilex* | A1 | TA | HQ184133 | – | – | 14 |
| f. *meleagroides* | | | | | | | | | |
| T.scaBed03.1 | 2003 | Bédarieux Hérault (F) | *Cedrus atlantica* | A3 | TA | GU060272 | GU060218 | GU060155 | 2 |
| T.scaBed03.2 | 2003 | Bédarieux Hérault (F) | *Cedrus atlantica* | A3 | TA | HQ184110 | GU060219 | GU060156 | 2 |
| T.scaBed03.3 | 2003 | Bédarieux Hérault (F) | *Cedrus atlantica* | A3 | TA | HQ184111 | GU060220 | GU060157 | 2 |
| T.scaCD02.1 | 2002 | La Chaise-Dieu Haute Loire (F) | Mixed | A5 | TA | GU060277 | GU060221 | GU060158 | 2 |
| T.scaChey70.1 | 1970 | Cheyrols Ardèche (F) | *Q. ilex* | A1 | TA | HQ184113 | – | – | 5b |
| T.scaEme97.1 | 1997 | Emerchicourt Nord (F) | *Betula* sp. | A1 | TA | HQ184114 | – | – | 2 |
| T.scaLM02.1 | 2002 | Les Monts Savoie (F) | *Quercus pubescens* | A1 | TA | HQ184124 | GU060230 | GU060167 | 2 |
| T.scaMS02.1 | 2002 | La Motte Servolex Savoie (F) | *Corylus avellana* | a1a8 | TA | GU060275 | GU060236 | – | 2 |
| T.scaMS02.4 | 2002 | La Motte Servolex Savoie (F) | *Corylus avellana* | A1 | TA | HQ184130 | – | – | 2 |
| f. *album* | | | | | | | | | |
| T.scaFon92.1 | 1992 | Fontecha Cantabria (SP) | *Q. ilex* | a1a3 | TA | GU060273 | – | – | 11 |
| T.scaFon93.1 | 1993 | Fontecha Cantabria (SP) | *Q. ilex* | A3 | TA | HQ184115 | – | – | 11 |
| *Spring fruiting* | | | | | | | | | |
| T.argAub93.1 | 1993 | Auby Nord (F) | *Populus* | I1 | TI | HQ184138 | – | – | 1 |
| T.inoLille07.2 | 2007 | Lille Nord (F) | *Betula pendula* | i1 i2 | TI | GU06265 | – | – | 2 |
| T.inoRam98.1 | 1998 | Rambouillet Yvelines (F) | *Betula* sp. | I1 | TI | HQ184141 | – | – | 2 |
| T.inoVille06.1 | 2006 | Villepinte Seine Saint Denis (F) | *Betula pendula* | I1 | TI | GU060266 | GU060201 | GU060147 | 4 |
| T.scaAbs04.5 | 2004 | Abscon Nord (F) | *Populus tremula* | I1 | TI | HQ184142 | GU060202 | GU060150 | 2 |
| *Out group* | | | | | | | | | |
| T.terSte06.1 | 2006 | Stella-Plage Pas de Calais (F) | *Pinus* sp. | | | GU060288 | GU060261 | GU060140 | 2 |
| T.terTré03.1 | 2003 | Trédou Aveyron (F) | *Pinus* sp. | | | GU060289 | – | – | 2 |

ITS, internal transcribed spacer.

*Morphological identification: T.arg = *Tricholoma argyraceum* (Bull.) Gillet, T.cin = *Tricholoma cingulatum* (Almfelt) Jacobashch, T.ino = *Tricholoma inocybeoides* A. Pears., T.ram = *Tricholoma ramentaceum* (Bull. Fr.) Ricken, T.sca = *Tricholoma scalpturatum* (Fr.) Quél., T.ter = *Tricholoma terreum* (Schaeff.) P. Kumm.

†CH = Switzerland, DK = Denmark, F = France, S = Sweden, SP = Spain, UK = United Kingdom.

‡PS = Phylogenetic species recognized by concordance of the gene genealogies of the three genes: TA = *T. argyraceum*, TC = *T. cingulatum*, TI = *T. inocybeoides*, TS = *T. scalpturatum s. str.*

§Collectors or sample origin: 1 R. Courtecuisse, 2 P. A. Moreau, 3 H. Gryta, 4 G. Eyssartier, 5a *T. ramentaceum* var *pseudotriste* Bon n°81151 holotype (Bon 1975), 5b M. Bon, 6 P. Jargeat, 7 M. Gardes, 8 Carriconde *et al.* (2008b), 9 G. Durrieu, 10 F. Richard, 11 *T. scalpturatum* f. *album* Hermosilla n°00497 and 00517 (Hermosilla & Sánchez 1994), 12 Copenhagen Herbarium, 13 Kew Herbarium, 14 *T. scalpturatum* var *atrocinctum* Romagn.73.288 holotype (Romagnesi 1974), 15 J. Fournier, 16 Gryta *et al.* (2006).

Spain and the United Kingdom (Fig. 1). Among them, different varieties and forms, identified on the basis of a stronger intensity in colour of pileus (authentic material of *Tricholoma scalpturatum* f. *meleagroides* Bon T.scaChey70.1 and additional samples) or veil (holotype of *T. scalpturatum* var. *atrocinctum* Romagn. T.scaSRP73.1 and T.scaArb03.1) or on the basis of a colour deficiency (topotypic material of *T. scalpturatum* f. *album* C.E. Hermos. & Jul. Sánchez T.scaFon92.1 and T.scaFon93.1), were analysed. Forty-five of the samples (Table S1, Supporting information) were previously used in a population genetic study of the *T. scalpturatum* complex (Carriconde *et al.* 2008a). Four samples corresponding to monokaryotic mycelia (T.scaRa05.15h5, T.scaRa05.27h1, T.scaRim05.11h1 and T.scaRim05.73h1) were also added. They were obtained from germinating spores collected from spore prints and plated on potato dextrose agar (PDA) medium (Difco). Two samples of *Tricholoma terreum* (Schaeff.) P. Kumm. were selected as outgroups for phylogenetic analyses.

### *Supplementary sequences*

ITS sequences of the *Tricholoma argyraceum* epitype MEN9491 (Christensen & Noordeloos 1999) generated by the authors (accession number HQ184098) and of the *T. scalpturatum* neotype MC97165 (Christensen & Noordeloos 1999) generated by Bidartondo & Bruns (2002) (accession number AF377201) were used as references.

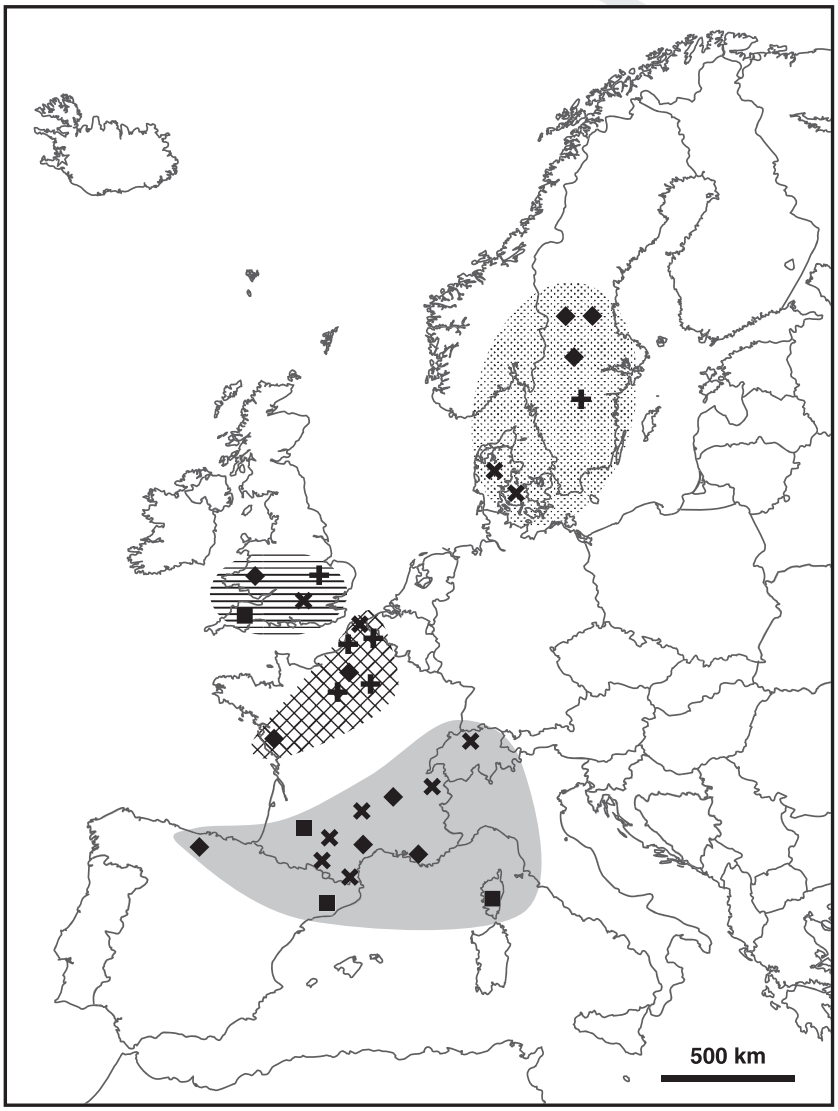



**Fig. 1** European distribution of the analysed specimens of the phylogenetic species *Tricholoma inocybeoides* (+), *Tricholoma argyraceum* (♦),*Tricholoma scalpturatum* (■) alone or *T. argyraceum* and *T. scalpturatum* in sympatry (×). Four geographical zones were defined for further analysis: ??? Denmark and Sweden; ??? United Kingdom, ??? north of France, ??? south of France, Spain and Alps.

© 2010 Blackwell Publishing Ltd

ITS sequence from *Tricholoma cingulatum* MC96170 (accession number HQ184100) and *Tricholoma alboconicum* JHC95.072 (accession number HQ184099) kindly provided by Morten Christensen and ITS sequences from GenBank (*T. scalpturatum* AF377199, DQ658857, EF644118 and *T. cingulatum* AF377197, AF377198, AF349697) were also added to the ITS data set.

### *DNA extraction, PCR and sequencing*

Fungal DNA was extracted from dried carpophores or from the fragments of carpophores stored at −20 °C in 2× CTAB buffer (100 mM Tris HCl pH 8; 1.4 M NaCl; 20 mM $Na_2EDTA$; 2% CTAB), with the WIZARD Genomic DNA Purification kit (Promega, Charbonnière-les-Bains, France). The final pellet was resuspended in 2 40 μL of sterile UHQ water.

The ITS rDNA, *tef* and *gpd* nuclear regions were PCR-amplified using the primer set ITS1-f/ITS4-B (Gardes & Bruns 1993), EF595 (Kauserud & Schumacher 2001)/EF1160′ (CCR ATY TTG TAG ACA TCC TG modified from Kauserud & Schumacher 2001) and GPD-f′ (BGG TGT YTT CAC HAC CRT CGA VAA)/GPD-R′ (GTA RCC CCA CTC GTT GTC GTA CCA both modified from Johannesson *et al.* 2000), respectively. Reactions were carried out in a final volume of 25 μL, containing 10 ng of genomic DNA, 1× Go*Taq* polymerase buffer (Promega), 1 μM of each primer, 200 μM of each dNTP and 1 U of Go*Taq* polymerase (Promega). For ITS and *gpd* markers, PCR cycling conditions of the Eppendorf 3 Master Cycler thermocycler were as follows: initial denaturation at 94 °C for 3 min; 35 cycles at 94 °C for 45 s, 55 °C for 45 s, 72 °C for 1 min; and a final extension at 72 °C for 10 min. For *tef* marker, cycling conditions were similar except for the annealing temperature that was set at 50 °C.

PCR products were sequenced by GENOSCREEN (Lille, France) on both strands using the ITS 1 and ITS 4 primers (White *et al.* 1990) for ITS fragment and on one strand using the EF595 and GPD-R′ for *tef* and *gpd* fragments, respectively. Sequence data are available in the GenBank database under accession numbers GU060140–GU060289 and HQ184101–HQ184170.

### *Phylogenetic analyses*

Sequence chromatograms were manually checked, which allowed the identification of heterozygous sites, and sequences were manually corrected with the BIOEDIT software (Hall 1999).

Multiple sequence alignments were conducted for the three nuclear loci ITS DNAr, *gpd* and *tef* using the G-INS-I algorithm (recommended for sequences with global homology) as implemented in MAFFT v6 (Katoh & Toh 2008).

The three resulting alignments were concatenated in a single sequence alignment (1816 bp), which were subsequently edited in MacClade 4.08 (Maddison & Maddison 2005) to specify the sets of characters (638, 657 and 521 bp for ITS, *gpd* and *tef*, respectively) and sets of taxa (108, 64 and 59 taxa for ITS, *gpd* and *tef*, respectively). Because the ITS1 and ITS2 domains revealed different evolutionary histories, concatenation of the three genes was not pertinent. Phylogenetic analyses were performed for each locus separately using both maximum parsimony (MP) and maximum likelihood (ML) criteria with 100-repetition heuristic searches, followed by 500-repetition bootstrap analyses with PAUP 4.0b10 (Swofford 2003). Before ML analyses, models of nucleotide 4 substitutions were designated by calculating approximate AIC values in MrModelTest2. 5

### *Statistical analyses*

To use the information in the heterozygous sequence sites and thus calculate more accurate estimates of molecular variation, haplotype data sets were constructed for both DNA regions with homozygous sequences and sequences for which heterozygosity could be resolved without cloning (only one heterozygous position). For example, in a DNA sequence (‘genotype’) containing a ‘Y’ (=C/T), the two resulting sequence haplotypes, coded p1 and p2, will include either a ‘C’ or a ‘T’. Sequences with more than one heterozygous site were not taken into account in the statistical analysis.

Estimates of molecular variation [average number of nucleotide substitutions per site within and between populations (π), average number of nucleotide differences (k) and nucleotide divergence (K)] were calculated in DNASP 5.00.07 (Rozas *et al.* 2003).

A median-joining haplotype network was constructed using Network 4.516 (http://www.fluxus-engineering.com; Bandelt *et al.* 1999) from the inferred haplotypes. 6

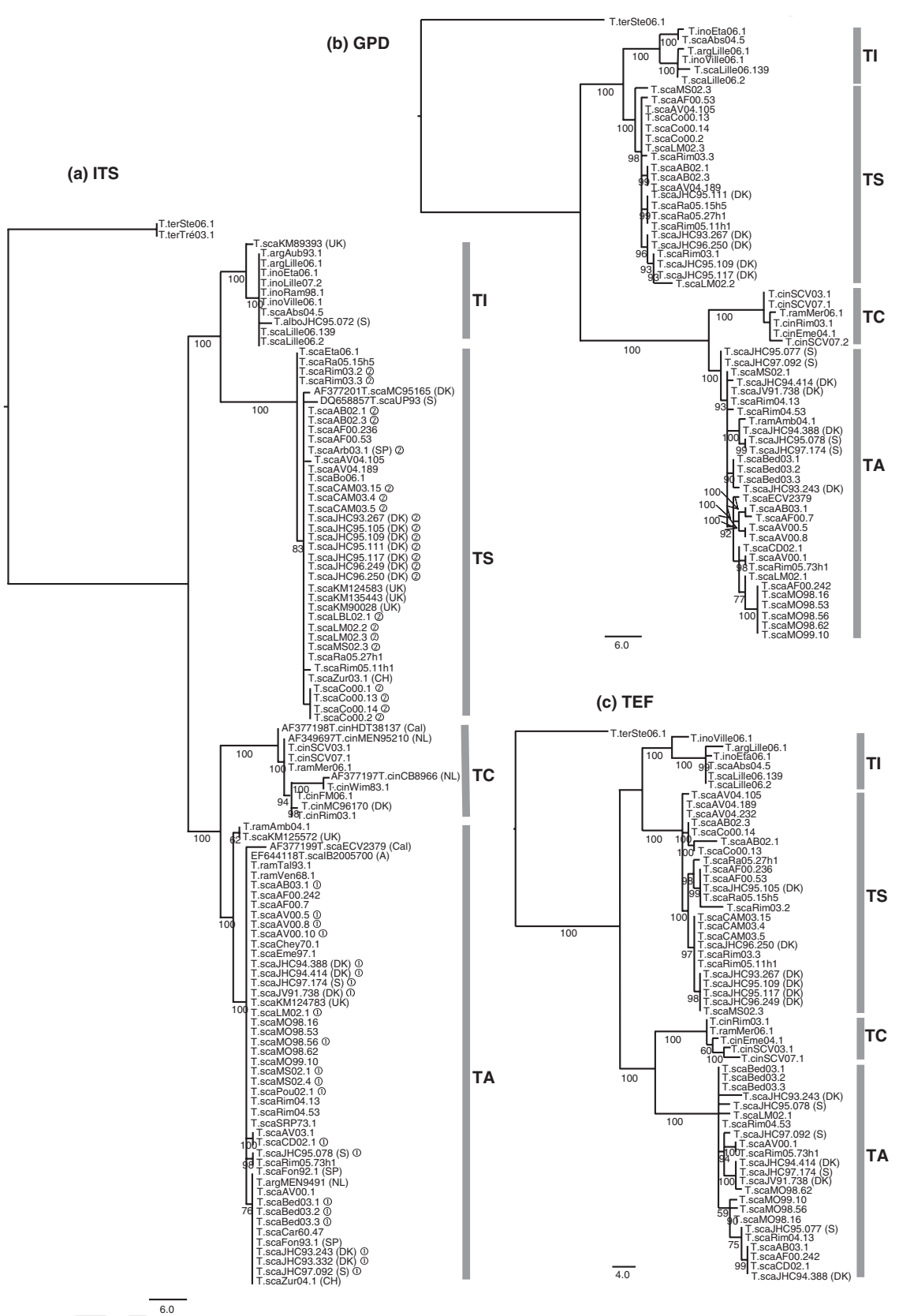
## Results

### *Identification of phylogenetic species*

Complete ITS sequences (638 bp) were obtained for 96 samples, *gpd* sequences (657 bp) for 63 samples and *tef* sequences (521 bp) for 59 samples. The ITS, *gpd* and *tef* phylogenies are highly concordant and reveal four well-supported clades (Fig. 2). A first clade encompasses taxa belonging to the *Tricholoma scalpturatum* ‘genetic group 1’ defined by Carriconde *et al.* (2008a) and most

UNCORRECTED PROOF

© 2010 Blackwell Publishing Ltd




© 2010 Blackwell Publishing Ltd

of the taxa attributed to varieties of *Tricholoma ramentaceum* following Bon's (1984) nomenclature. The *Tricholoma argyraceum* epitype (MEN9491) is also unambiguously included in this clade; therefore for reasons of epitype precedence (McNeill *et al.* 2006; art. 9.7 and 9.18), the name *T. argyraceum* is hereafter applied to this phylogenetic species. A second clade clusters all the *Tricholoma cingulatum* sequences obtained in this study, those collected from GenBank and an additional collection identified as *T. ramentaceum* var. *ramentaceum sensu* Bon (1984). This phylospecies is named *T. cingulatum*. A third clade is represented by all samples identified by collectors as *Tricholoma inocybeoides* and also includes a collection of *Tricholoma alboconicum* (JHC95.072) and some morphologically misidentified collections of *T. scalpturatum* and *T. argyraceum*. This clade is hereafter referred to as the phylogenetic species *T. inocybeoides*. The fourth clade corresponds to the *T. scalpturatum* 'genetic group 2' defined by Carriconde *et al.* (2008a) and includes the neotype of *T. scalpturatum* (AF377201). Therefore, the legitimate name for this species is *T. scalpturatum*, *sensu stricto*. These four species cluster at a higher genetic level into two different groups: on the one hand *T. argyraceum* and *T. cingulatum* and on the other *T. scalpturatum* and *T. inocybeoides*.

The morphological variants *T. scalpturatum* f. *meleagroides*, *T. scalpturatum* var. *atrocinctum* and *T. scalpturatum* f. *album* are clustered in the *T. argyraceum* phylospecies. Thus, the colour variations appear to be merely individual, without phylogenetic significance.

### *Ancient hybridization evidence*

Network analyses carried out with the ITS data set (Fig. 3) highlighted an intermediate position for *T. inocybeoides* phylogenetic species, while *gpd* and *tef* analyses did not (data not shown). To explain this result, independent statistical analysis of the ITS1 and ITS2 regions was conducted. They revealed that *T. inocybeoides* ITS1 is 98.7% similar to the *T. argyraceum* ITS1 (K = 1.34%) and 96.7% similar to *T. scalpturatum* ITS1 (K = 3.3%. By contrast, its ITS2 is 98.25% similar to *T. scalpturatum* ITS2 (K = 1.75%) and only 94.2% similar to *T. argyraceum* ITS1 (K = 5.79%) (Fig. 4). The ITS sequence of *T. inocybeoides* could be interpreted as a recombinant ITS sequence, originating through a former hybridization event between *T. argyraceum* and *T. scalpturatum* ancestors, followed by intralocus recombination between the two divergent ITS. Several mutations were observed (Fig. 4): three fixed differences in ITS1 compared to *T. argyraceum* ITS1 and three in ITS2 compared to ITS2 of *T. scalpturatum*.

### *Haplotype analyses and genetic diversity*

More than half the sequences (58%) included one or more heterozygous positions (ITS: 24%, *gpd*: 75% and *tef*: 59.8% of the sequences) as expected in dikaryotic fungi. As most of the heterozygous sequences contained only one ambiguous site, it was possible to identify haplotypes and to generate three haplophase data sets, with 114 ITS sequences (23 haplotypes), 52 *gpd* sequences (39 haplotypes) and 57 *tef* sequences (36 haplotypes). Phylogenetic analyses conducted with these sequence sets led to phylogenetic trees that are very similar to those generated with the heterozygous data set (data not shown).

Most sequence variation, measured as nucleotide diversity ($\pi$) within each haplophase data set, appeared in the *tef* data ($\pi = 0.038$), less in *gpd* ($\pi = 0.031$) and much less in ITS ($\pi = 0.017$). Within each phylogenetic species and for each marker, the nucleotide diversity was very low and ranged from 0.0005 to 0.009 (Table 2). Intraspecific nucleotide divergence (K) was not higher than 1% (*tef*) and between 0.1% and 0.2% for the ITS (Table 2).

By contrast, interspecific values of $\pi$ were always higher (between 0.004 and 0.032) and genetic divergence values (K) were between 1.78% and 5.72% (Table 2).

### *Geographical distribution and ecological preferences*

From our observations, no geographical segregation could be detected. Indeed, both *T. argyraceum* and *T. scalpturatum* have a wide geographical distribution (Table 1, Fig. 1) and the different *T. argyraceum* and *T. scalpturatum* sequences are widespread in Europe. For instance, the most frequent ITS haplotype for

**Fig. 2** Phylogenies obtained through separate analyses of the three investigated DNA regions (a) internal transcribed spacer, (b) *gpd*, (c) *tef* generated from morphologically identified *Tricholoma scalpturatum* (T.sca), *Tricholoma argyraceum* (T.arg), *Tricholoma ramentaceum* (T.ram), *Tricholoma cingulatum* (T.cin) and *Tricholoma inocybeoides* (T.ino). *Tricholoma terreum* (T.ter) was used as an outgroup. Fifty per cent majority-rule consensus tree of the 1000 best trees found by a 100-repetition heuristic search with maximum parsimony criterion. Node frequency resulting from a 500-repetition bootstrap analysis is shown below branches. The isolates grouped into four clades, representing the phylogenetic species *T. argyraceum* (TA), *T. cingulatum* (TC), *T. inocybeoides* (TI) and *T. scalpturatum* (TS). Genetic group 1 and genetic group 2 according to Carriconde *et al.* (2008a).

© 2010 Blackwell Publishing Ltd

UNCORRECTED PROOF

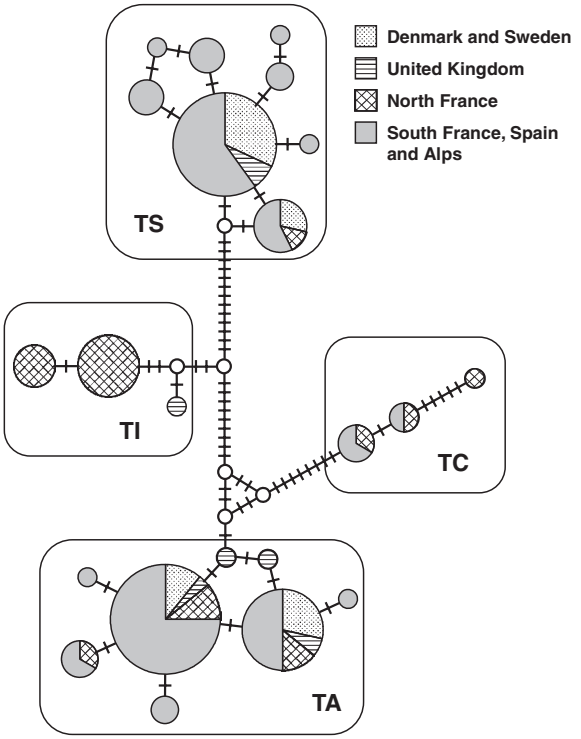



**Fig. 3** Median-joining haplotype network constructed from the 114 inferred haplophase internal transcribed spacer (ITS) sequences showing links between the four phylogenetic species *Tricholoma argyraceum* (TA), *Tricholoma cingulatum* (TC), *Tricholoma inocybeoides* (TI) and *Tricholoma scalpturatum* (TS). Each coloured circle represents an ITS haplotype, and the size of the circle is proportional to haplotype frequency. Sectors of pie charts indicate partition of haplotypes between the four geographical zones as delimited in Fig. 1. Open circles depict nodes with nonrecorded, hypothetical haplotypes. Each small black bar indicates a mutation.

*T. argyraceum* and *T. scalpturatum* (haplotype a1 and s1, respectively) is present from south of Europe to Scandinavia (Table 1, Fig. 3). *Tricholoma argyraceum* is also present in North America (sequence AF377199: Bidartondo & Bruns 2002). These two species occurred in sympatry in different French sites (Ariège, Aveyron, Haute-Garonne, Pyrénées-Orientales, Savoie) and in Switzerland. The third species, *T. cingulatum*, is present in Europe (France, Denmark and Netherlands) and in North America (sequence AF377198: Bidartondo & Bruns 2002). At the locality level, it was found in sympatry with *T. argyraceum* and *T. scalpturatum* in Ariège (Rimont site). The last species, *T. inocybeoides*, is present in the north of Europe (England, Sweden, north of France) and occurred in sympatry (fruitbodies intermixed) with *T. argyraceum* in Pas-de-Calais (north of France).

With respect to host plants (Table 1), there is no evidence for host preference for either *T. argyraceum* or *T. scalpturatum*. Specimens of *T. argyraceum* were found under deciduous trees in 59.25% of the sites where it was collected, under coniferous trees in 29.6% and with both in 11.15%. This is similar to the situation for *T. scalpturatum*: under deciduous trees in 72.25% of the sampled sites, under coniferous trees in 22.25% and with both in 5.5%. The most common host plants for the two species were *Quercus* spp., *Populus* spp. and *Betula* spp. Moreover, the two species were found in sympatry under *Quercus ilex* (Amélie-les-Bains site), *Populus nigra* (Toulouse AF site) and *Picea abies* (Rimont site). Both species were collected under *Cedrus* spp. (Bédarieux for *T. argyraceum* and Ramonville Saint-Agne for *T. scalpturatum*) and *Betula* spp. (Sweden and Emerchicourt for *T. argyraceum*, La Motte-Servolex for *T. scalpturatum*).

In contrast to the aforementioned results for *T. argyraceum* or *T. scalpturatum*, ecological preferences were observed for the two phylospecies *T. cingulatum* and *T. inocybeoides*. All specimens assigned to *T. cingulatum* were collected in wet sites colonized by *Salix* species (Table 1). This observation is congruent with Bon (1984) reporting that the morphospecies *T. cingulatum* is specific to *Salix* spp. *Tricholoma inocybeoides* was found only under *Populus* spp. and *Betula* spp. within the seven localities investigated (Table 1).

## Discussion

The phylogenetic analyses of the three nuclear regions (ITS, *gpd* and *tef*) clearly identified four distinct clades and were highly concordant. The branches separating the four clades were long and well supported compared to those occurring within clades. These results are in

| | ITS1 | | | | | | | | | | | | | | 5.8 S | ITS2 | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 87 | 128 | 138 | 141 | 162 | 163 | 166 | 176 | 184 | 187 | 188 | 192 | 199 | 240 | | 431 | 434 | 490 | 495 | 503 | 509 | 552 | 566 | 571 | 587 | 588 | 594 | 595 | 596 | 599 |
| TA | C | - | T | A | C | T | C | C | A | - | - | - | C | T | | C | T | G | G | G | - | A | A | A | C | C | C | C | C | A |
| TI | C | - | C | **C** | C | T | C | T | A | - | - | - | C | T | | C | **G** | T | T | A | - | G | T | G | T | **Y** | **T** | C | T | **G** |
| TS | T | G | C | A | T | C | T | T | G | T | A | C | T | C | | G | C | T | T | A | C | G | T | G | T | C | - | - | T | A |

**Fig. 4** Alignment including variable sites appearing in the nrDNA internal transcribed spacer region. The alignment includes one sequence representing *Tricholoma argyraceum* (TA), *Tricholoma inocybeoides* (TI) and *Tricholoma scalpturatum* (TS). The alignment illustrates that an intralocus recombination event has happened at the origin of *T. inocybeoides*.

© 2010 Blackwell Publishing Ltd

**Table 2** Statistical data calculated at the intra- and intergroup levels for the four phylogenetic species (TA = *Tricholoma argyraceum*, TS = *Tricholoma scalpturatum*, TC = *Tricholoma cingulatum*, TI = *Tricholoma inocybeoides*) with internal transcribed spacer (ITS), *gpd* and *tef* haplophase data sets

| | Number of sequences | | | Number of polymorphic sites | | | Number of fixed differences | | | π | | | k | | | K % | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ITS | *gpd* | *tef* | ITS | *gpd* | *tef* | ITS | *gpd* | *tef* | ITS | *gpd* | *tef* | ITS | *gpd* | *tef* | ITS | *gpd* | *tef* |
| TA | 51 | 19 | 20 | 5 | 11 | 17 | | | | 0.001 | 0.005 | 0.001 | 0.707 | 3.637 | 5.116 | 0.1 | 0.6 | 1.0 |
| TS | 43 | 18 | 25 | 5 | 8 | 8 | | | | 0.001 | 0.003 | 0.004 | 0.804 | 2.451 | 2.377 | 0.2 | 0.4 | 0.5 |
| TC | 6 | 7 | 7 | 1 | 5 | 8 | | | | 0.0005 | 0.003 | 0.006 | 0.333 | 2.476 | 3.520 | 0.1 | 0.4 | 0.7 |
| TI | 14 | 8 | 5 | 2 | 11 | 12 | | | | 0.0009 | 0.006 | 0.009 | 0.582 | 4.25 | 4.80 | 0.3 | 0.7 | 1.0 |
| TA-TS | | | | 25 | 42 | 46 | 16 | 23 | 22 | 0.017 | 0.025 | 0.032 | 10.04 | 16.08 | 16.56 | 3.24 | 4.43 | 5.72 |
| TA-TC | | | | 15 | 26 | 41 | 10 | 10 | 17 | 0.004 | 0.013 | 0.024 | 2.6 | 8.71 | 12.41 | 1.78 | 2.53 | 4.59 |
| TA-TI | | | | 20 | 49 | 47 | 14 | 27 | 19 | 0.009 | 0.026 | 0.024 | 5.53 | 16.79 | 12.64 | 2.47 | 5.30 | 5.39 |
| TS-TC | | | | 29 | 39 | 38 | 23 | 26 | 22 | 0.010 | 0.022 | 0.021 | 6.12 | 14.28 | 11.22 | 4.22 | 4.78 | 5.31 |
| TS-TI | | | | 17 | 26 | 31 | 11 | 8 | 11 | 0.008 | 0.011 | 0.014 | 4.87 | 7.66 | 7.49 | 1.98 | 2.14 | 3.87 |
| TC-TI | | | | 22 | 46 | 38 | 20 | 30 | 18 | 0.016 | 0.032 | 0.029 | 9.81 | 20.89 | 15.39 | 3.43 | 5.65 | 4.96 |

π, nucleotide diversity; k, average number of nucleotide differences; K %, nucleotide divergence (average number of nucleotide substitutions per site between population × 100).

**Table 3** Xxxxxxxxxxx 12

| Xxxxxxxxxxx | Xxxxxxxxxxx |
|---|---|
| Xxxxxxxxxxx | Xxxxxxxxxxx |
| Xxxxxxxxxxx | Xxxxxxxxxxx |

agreement with results obtained by Mouhamadou *et al.* (2008) with the mitochondrial marker V9. Thus, four phylogenetic species were delimited: *Tricholoma argyraceum*, *Tricholoma scalpturatum*, *Tricholoma cingulatum*, and *Tricholoma inocybeoides*. The first two correspond to genetic groups 1 and 2 described by Carriconde *et al.* (2008a,b) and were named based on reference samples. Diversity and genetic divergence values were always lower within when compared to between the four groups (Table 3), confirming the species status of the four phylogenetic taxa.

This phylogenetic pattern is congruent with the taxonomic treatment proposed by Christensen & Heilmann-Clausen (2008), but not with former authors (e.g. Bon 1984), as the *Tricholoma ramentaceum* morphospecies separated on the basis of veil appearance is not a phylogenetic species. In addition, *T. inocybeoides* is a very polymorphic species, not perfectly matching with any of the morphological descriptions.

According to population studies (Gryta *et al.* 2006; Carriconde *et al.* 2008a,b) and to nucleotide diversity (this study), *T. argyraceum* (genetic group 1) and *T. scalpturatum* (genetic group 2) are unambiguously different species with no gene exchange, but they are often confused and assigned to *T. scalpturatum* species because morphological characters are too weak or too variable to readily distinguish them. This morphological variability is also illustrated by the diversity of infraspecific taxon recognition by taxonomists. In morphologically simple groups of organisms, speciation is not always paired with morphological differentiation. Indeed, molecular-based taxonomy often shows that genetic isolation precedes morphological differentiation in fungi (Taylor *et al.* 2000; Kauserud *et al.* 2007b).

Although it is difficult to estimate the divergence times of different clades without fossil records, it could be assumed that low genetic variation between two species is indicative of recent separation while high divergence suggests ancient separation. Thus, the statistical analyses suggest that separation between *T. scalpturatum* and *T. argyraceum* occurred long ago. Indeed, the π and k values, calculated for ITS sequences, were three times higher than those calculated by Kauserud *et al.* (2007a) between the two groups of *Gloeoporus taxicola* that separated recently (120–10 000 years BP). The high π and k values calculated for *tef* sequences [5–8 times higher than those calculated by Kauserud *et al.* (2007a) for *G. taxicola tef* sequences, obtained with the same

UNCORRECTED PROOF

© 2010 Blackwell Publishing Ltd

primers] and *gpd* sequences illustrated the faster evolution of metabolic genes, related to the presence of introns (two introns in the *tef* fragment analysed in this study and two in the *gpd* fragment).

The speciation scenario for the separation of these two species remains unclear. Based on our sampling and on GenBank sequences, *T. argyraceum* and *T. scalpturatum* are widely distributed and often occur in sympatry. Regarding host specificity, they are both clearly generalists. Hence, no geographical or ecological preferences could be detected that could explain the emergence of these two species.

### *A case of accelerated evolution*

Phylogenetic and network analyses showed that although *T. cingulatum* is characterized by a marked morphological character (annulus), it is genetically closely related to *T. argyraceum* and has a very recent origin. The π and k values calculated between *T. argyraceum* and *T. cingulatum* were lower than those calculated between the two groups of *G. taxicola*, suggesting a more recent separation (100–10 000 years BP). Clear ecological specificity of *T. cingulatum* (associated with *Salix* in wet sites) was constantly observed, and we hypothesize that in this case host specificity drove speciation. Speciation related to host specificity is common for phytopathogenic fungi. For example, *Microbotryum violaceum*, a Basidiomycota that causes anther smut diseases in the plants of Caryophyllaceae, is a complex of cryptic species, highly specialized on different hosts (Le Gac *et al.* 2007). Such a mechanism has also been demonstrated for insects. For instance, it was shown that two strains of *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae), infesting mainly maize (*Zea mays*) or hop (*Humulus lupulus*), are in fact two different species (Malausa *et al.* 2007). Concerning *T. cingulatum*, this is a striking example of a recently differentiated species showing highly distinctive ecological and morphological characters within a generalist and morphologically uniform group of species.

### *Hybridization at the origin of* Tricholoma inocybeoides

The results obtained with *T. inocybeoides* could illustrate another scenario of speciation. This species is highly polymorphic, as shown by our misidentifications of some collections, but genetically strongly clustered with *T. scalpturatum*. Genetic divergence between *T. inocybeoides* and *T. scalpturatum* is similar to genetic divergence between *T. cingulatum* and *T. argyraceum* (mean genetic divergence for the three markers is 2.6% between *T. inocybeoides* and *T. scalpturatum* and 2.9% between *T. cingulatum* and *T. argyraceum*). On this basis, *T. inocybeoides* should be considered an isolated species. The main differences between *T. inocybeoides* and *T. scalpturatum* occur in ITS1, which is very similar to the ITS1 of *T. argyraceum*. This result strongly suggests hybridization between *T. argyraceum* and *T. scalpturatum* ancestors, before complete genetic isolation of the two species. A recombination (or gene conversion) of the two ribosomal sequences certainly occurred during meiosis, after fusion of the two different nuclei. Then, the new recombinant ITS became homogenized across the nrDNA repeats. The appreciable geographical range of *T. inocybeoides* (north of France, United Kingdom, Sweden) indicates a stable and durable event instead of a local or episodic event. The occurrence of mutations indicates an ancient hybridization event but the π and k values calculated between *T. scalpturatum* and *T. inocybeoides* for *tef* and *gpd* fragments were lower than those calculated between *T. argyraceum* and *T. cingulatum*: *T. inocybeoides* is certainly the most recent species. Recombination occurred in the ITS sequence but not in the *gpd*, *tef* and V9 (Mouhamadou *et al.* 2008) fragments studied, very similar to those of *T. scalpturatum*. However, we cannot exclude the possibility of recombination or gene exchange at other loci.

To our knowledge, such recombinant hybrids have only been reported for two Basidiomycota: *Coniophora puteana* (Kauserud *et al.* 2007b) and *Flammulina velutipes* (Hughes & Petersen 2001). However, just one and two specimens, respectively, exhibited this recombinant ITS, and the authors did not draw conclusions over the taxonomic status of the recombinants. By contrast, because nine samples, from seven distinct and remote sites, collected over a period of several years belong to the same phylogenetic species, our results lead to the conclusion that a new species has emerged after hybridization between recent *T. argyraceum* and *T. scalpturatum* ancestors.

Hybridization, although not frequently seen in the fungal kingdom, is probably a relatively common event (Garbelotto *et al.* 2007) but the survival of the hybrids does not seem to be frequent. Postzygotic isolation mechanisms certainly limit this phenomenon or it is underestimated because of a lack of extensive studies that include enough specimens. In our case, the hypothesis of hybrid speciation of *T. inocybeoides* in sympatry with *T. argyraceum* and *T. scalpturatum* ancestors is very plausible (hybridization needs the presence of two organisms in the same place), reinforced by the geographical distribution of the three species: *T. inocybeoides*, *T. scalpturatum* and *T. argyraceum* are all present in the north of Europe (Fig. 1). This hybrid origin could explain the high polymorphism of this species that is sometimes clearly different and sometimes very similar

UNCORRECTED PROOF

© 2010 Blackwell Publishing Ltd

to *T. argyraceum* or *T. scalpturatum*. However, the mechanism of isolation and evolution of this hybrid species through space and time remains unclear. Hybrid fitness should have been equivalent to or higher than that of parents. Maybe differences in ecological traits, such as host specificity, could explain the isolation of this species, as it was shown with *Heterobasidion annosum* (Garbelotto *et al.* 2007). However, all the analysed *T. inocybeoides* samples were collected under *Betula* spp. and *Populus* spp., which are host plants for the other species. It seems difficult to conclude that speciation occurred by host specialization. An alternative explanation is temporal separation, as *T. inocybeoides* fruits in spring and autumn while the other species mainly produce carpophores in autumn. We also noticed a very short *in vitro* viability of *T. argyraceum* and *T. scalpturatum* spores (<8 days). Thus, we could hypothesize that, in spring, probability of mating between hybrid resulting monokaryons is higher than mating between hybrid and parental monokaryons, leading to a partial reproductive isolation. However, it is necessary to collect more specimens to learn more about spore and mycelium viability in soil, ecological and biological traits, to hope to conclude as to the speciation mechanism leading to this hybrid success followed by the emergence of a new species.

### *Implications in DNA barcoding*

The ITS region is the most frequently sequenced genetic marker for fungal systematics and phylogeny (Begerow *et al.* 2010), and it has been used routinely for the molecular characterization of communities of ectomycorrhizal fungi for almost two decades (Gardes & Bruns 1996; Horton & Bruns 2001; Tedersoo *et al.* 2010). In species-level discrimination using BLAST, nucleotide divergence under a 3% threshold value traditionally indicates conspecificity (Hughes *et al.* 2009; Begerow *et al.* 2010). However, this standard practice is known to have limitations as no universal intra- or interspecific percentage of ITS sequence variation can be defined to separate all species of fungi (Nilsson *et al.* 2008; Hughes *et al.* 2009; Begerow *et al.* 2010). In our study, intraspecific variation of the full ITS sequence (including the 5.8S rDNA) was always very low (<0.2%). In contrast, interspecific divergence was at least eight times higher and ranged from 1.78% to 4.22%. This clear distinction between intraspecific and interspecific divergences (the barcode gap), also shown for the *Cortinarius* section Calochroi (Frøslev *et al.* 2007), confirms the effectiveness of the ITS region as a prime target for fungal barcode, at least for Basidiomycetes. For *T. inocybeoides* (the putative hybrid species), taxonomic affiliation by BLAST varied depending on whether the full sequence, the ITS1 or the ITS2 subregion was used. The potential presence of numerous (but still undetected) fungal hybrids in nature may contribute to the high level of discrepancy in taxonomic affiliations between ITS1 and ITS2 queries using BLAST analysis (Nilsson *et al.* 2009).

## Conclusion

The advent of massive parallel sequencing is producing an exponential increase in unidentified fungal DNA sequences from environmental samples and has created a need for guidelines to identify fungal species in fungal communities. Unfortunately, neither a universal method nor a single level of variability can be used to generate the estimates of conspecificity and more formal species descriptions are lacking. Our study contributes to increasing our understanding of phylogenetic species recognition in ectomycorrhizal basidiomycetes and gives new insights into sequence-based identifications of fungi that have applications in the studies of speciation and biogeography.

## Acknowledgements

We thank Sophie Manzi, Frédéric Magné, Nicolas Paoli, Stéphanie Leite, Annabel Bergoënd and Olivier Navé for technical assistance. Thanks are due to Peter Winterton for correcting the English. We are grateful to the curators of the herbaria who kindly gave us material deposited in their institutions: LIP (R. Courtecuisse) and PC (B. Buyck), and to all the persons who provided us with carpophores : Maurice Durand (F), Guy Durrieu (F), Guillaume Eyssartier (F), Carlos Enrique Hermosilla (E), Jacques Fournier (F), Christophe Lécuru (F) and Franck Richard (F). We are grateful to Morten Christensen and Jacob Heilmann-Clausen (DK) for DNA sequences obtained on their collections and types of *T. alboconicum*, *T. argyraceum* and *T. scalpturatum*. We thank Jim Anderson for constructive discussions and Martin Bidartondo for access to Kew herbarium. The Université Toulouse III Paul Sabatier and the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) supported this study financially.

## References

Bandelt HJ, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, **16**, 37–48.

Begerow D, Nilsson H, Unterseher M, Maier W (2010) Current states and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **87**, 99–108.

Bidartondo M, Bruns T (2002) Fine-level mycorrhizal specificity in the Monotropoideae (Ericaceae): specificity for fungal species groups. *Molecular Ecology*, **11**, 557–569.

Bon M (1984) *Les Tricholomes de France et d'Europe Occidentale*, Eds. Lechevalier, Paris.

© 2010 Blackwell Publishing Ltd

UNCORRECTED PROOF

Carriconde F, Gardes M, Jargeat P, Heilmann-Clausen J, Mouhamadou B, Gryta H (2008a) Population evidence of cryptic species and geographical structure in the cosmopolitan ectomycorrhizal fungus *Tricholoma scalpturatum*. *Microbial Ecology*, **56**, 513–524.

Carriconde F, Gryta H, Jargeat P, Mouhamadou B, Gardes M (2008b) High sexual reproduction and limited contemporary dispersal in the ectomycorrhizal fungus *Tricholoma scalpturatum*: new insights from population genetics and spatial autocorrelation analysis. *Molecular Ecology*, **17**, 4433–4445.

Christensen M, Heilmann-Clausen J (2008) *Tricholoma*. Funga Nordica, Copenhagen.

Christensen M, Noordeloos M (1999) Notulae ad floram agaricinam neerlandicam-XXXVI – *Tricholoma*. *Persoonia*, **17**, 295–317.

Dawson MN, Jacobs DK (2001) Molecular evidence for cryptic species of *Aurelia aurita* (Cnidaria, Scyphozoa). *Biology Bulletin*, **200**, 92–96.

Dunham SM, O'Dell TE, Molina R (2003) Analysis of nrDNA sequences and microsatellite allele frequencies reveals a cryptic chanterelle species *Cantharellus cascadensis* sp. nov. from the American Pacific Northwest. *Mycological Research*, **107**, 1163–1177.

Frøslev TG, Jeppesen TS, Laessøe T, Kjøller R (2007) Molecular phylogenetics and delimitation of species in *Cortinarius* section *Calochroi* (Basidiomycota, Agaricales) in Europe. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **44**, 217–227.

Garbelotto M, Gonthier P, Nicolotti G (2007) Ecological constraints limit the fitness of fungal hybrids in the *Heterobasidion annosum* species complex. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**, 6106–6111.

Gardes M, Bruns T (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, **2**, 113–118.

Gardes M, Bruns T (1996) Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: above- and below-grounds views. *Canadian Journal of Botany*, **74**, 1572–1583.

Geml J, Laursen A, O'Neill K, Nusbaum HC, Taylor L (2006) Beringian origins and cryptic speciation events in the fly agaric (*Amanita muscaria*). *Molecular Ecology*, **15**, 225–239.

Gryta H, Carriconde F, Charcosset JY, Jargeat P, Gardes M (2006) Population dynamics of the ectomycorrhizal fungal species *Tricholoma populinum* and *Tricholoma scalpturatum* associated with black poplar under differing environmental conditions. *Environmental Microbiology*, **8**, 773–786.

Hall TA (1999) BIOEDIT: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**, 95–98.

Hedh J, Samson P, Erland S, Tunlid A (2008) Multiple gene genealogies and species recognition in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Mycological Research*, **112**, 965–975.

Hermosilla CE, Sánchez J (1994) Aportaciones a un posible catálogi de *Tricholoma* Fr. *Belarra*, **10**, 71–78.

Horton TR, Bruns TD (2001) The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black box. *Molecular Ecology*, **10**, 1855–1871.

Hughes KH, Petersen RH (2001) Apparent recombination or gene conversion in the ribosomal ITS region of a *Flammulina* (Fungi, Agaricales) hybrid. *Molecular Biology and Evolution*, **18**, 94–96.

Hughes KH, Petersen RH, Lickey EB (2009) Using heterozygosity to estimate a percentage DNA sequence similarity for environmental species delimitation across basidiomycete fungi. *New Phytologist*, **182**, 795–798.

Johannesson HS, Stenlid J (2003) Molecular markers reveal genetic isolation and phylogeography of the S and F intersterility groups of the wood-decay fungus *Heterobasidion annosum*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **29**, 94–101.

Johannesson HS, Johannesson KHP, Stenlid J (2000) Development of primer sets to amplify fragments of conserved genes for use in population studies of the fungus *Daldinia loculata*. *Molecular Ecology*, **9**, 375–378.

Katoh K, Toh H (2008) Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Briefings in Bioinformatics*, **9**, 286–298.

Kauserud H, Schumacher T (2001) Outcrossing or inbreeding: DNA markers provide evidence for type of reproductive mode in *Phellinus nigrolimitatus* (Basidiomycota). *Mycological Research*, **105**, 676–683.

Kauserud H, Stensrud Ø, Decock C, Shalchian-Tabrizi K, Schumacher T (2006) Multiple gene genealogies and AFLP suggest cryptic specialisation and long distance dispersal in the basidiomycete *Serpula himantioides* (Boletales). *Molecular Ecology*, **15**, 421–431.

Kauserud H, Hofton TH, Sætre GP (2007a) Pronounced ecological separation between two closely related lineages of the polyporous fungus *Gloeoporus taxicola*. *Mycological Research*, **111**, 778–786.

Kauserud H, Svegården IB, Decock C, Hallenberg N (2007b) Hybridization among cryptic species of the cellar fungus *Coniophora puteana* (Basidiomycota). *Molecular Ecology*, **16**, 389–399.

Le Gac M, Hood ME, Fournier E, Giraud T (2007) Phylogenetic evidence of host-specific cryptic species in the anther smut fungus. *Evolution*, **61**, 15–26.

Maddison DR, Maddison WP (2005) *MacClade 4: Analysis of Phylogeny and Character Evolution, Version 4.08*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Malausa T, Dalechy A, Ponsard S *et al.* (2007) Genetic structure and gene flow in French populations of two *Ostrinia* taxa: host race or sibling species? *Molecular Ecology*, **16**, 4210–4222.

McNeill J, Barrie FR, Burdet HM *et al.* (2006) *International Code of Botanical Nomenclature (Vienna Code)*. Gantner Verlag, Vienna.

Moreau PA, Peintner U, Gardes M (2006) Phylogeny of the ectomycorrhizal mushroom genus *Alnicola* (Basidiomycota, Cortinariaceae) based on rDNA sequences with special emphasis on host specificity and morphological characters. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **38**, 794–807.

Mouhamadou B, Carriconde F, Gryta H, Jargeat P, Manzi S, Gardes M (2008) Molecular evolution of mitochondrial ribosomal DNA in the fungal genus *Tricholoma*: barcoding implications. *Fungal Genetics and Biology*, **45**, 1219–1226.

Nilsson RH, Kristiansson E, Ryberg M, Hellenberg N, Larsson K-H (2008) Intraspecific ITS variability in the kingdom *Fungi* as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. *Evolutionary Bioinformatics*, **4**, 193–201.

UNCORRECTED PROOF

© 2010 Blackwell Publishing Ltd

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.

Roca AL, Georgiadis N, Pecon-Slattery J, O'Brien SJ (2001) Genetic evidence for species of Elephant in Africa. *Science*, **293**, 1473–1477.

Romagnesi H (1974) Quelques espèces et variétés méconnues d'*Agaricales*. *Bulletin Société. Mycologique de France*, **90**, 161–169.

Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, **19**, 2496–2497.

Starrett J, Hedin M (2007) Multilocus genealogies reveal multiple cryptic species and biogeographical complexity in the California turret spider *Antrodiaetus riversi* (Mygalomorphae, Antrodiaetidae). *Molecular Ecology*, **16**, 583–604.

Swofford DL (2003) *PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4.0b10*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S *et al.* (2000) Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics and Biology*, **31**, 21–32.

Taylor JW, Turner E, Pringle A, Dettman J, Johannesson H (2007) Fungal species: thoughts on their recognition, maintenance and selection. In:*Fungi in the Environment* (eds Gadd GM, Watkinson SC, Dyer PS). pp. 313–339. Cambridge University Press, Cambridge.

Tedersoo L, Nilsson RH, Abarenkov K *et al.* (2010) 454 pyrosequencing and Sanger sequencing of tropical mycorrhizal fungi provide similar results but reveal substantial methodological biases. *New Phytologist*, DOI: 10.1111/j.1469-8137.2010.03373.x. 8

White TJ, Bruns TD, Lee S, Taylor JW (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenies. In:*PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (eds Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White T). pp. 135–322, Academic Press, San Diego.

Xxxx 9

## Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

**Table S1** *Tricholoma scalpturatum* (morphological identification) samples analysed by Carriconde *et al.* (2008a)

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting information supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

UNCORRECTED PROOF

© 2010 Blackwell Publishing Ltd

# Annexe B

## *L'adaptation à la vie à l'ombre chez les orchidées : étude des orchidées non-chlorophylliennes dans les régions tropicales*

CAHIERS
DE LA SOCIÉTÉ FRANÇAISE D'ORCHIDOPHILIE

N°7 - 2010

# Actes du 15e colloque sur les Orchidées

## Corum de Montpellier
## 30, 31 mai & 1 juin 2009

SOCIETE FRANCAISE D'ORCHIDOPHILIE

CENTRE D'ECOLOGIE FONCTIONNELLE & EVOLUTIVE

cnrs dépasser les frontières

SOCIETE FRANCAISE D'ORCHIDOPHILIE STFO-Languedoc Hérault - Gard - Lozère - Aveyron

la Région Languedoc Roussillon

# L'adaptation à la vie à l'ombre chez les orchidées : étude des orchidées non-chlorophylliennes dans les régions tropicales

**Florent MARTOS[1,2], Thierry PAILLER[1], Jacques FOURNEL[1] & Marc-André SELOSSE[2]**

1) UMR C53 Peuplements végétaux et bioagresseurs en milieu tropical, Université de La Réunion
2) UMR 5175 Centre d'écologie fonctionnelle et évolutive, Equipe interactions biotiques, CNRS, 1919 Route de Mende, 34293 Montpellier Cedex 5

**Abstract – Adaptation to shade in orchids: study in achlorophyllous orchids in tropical regions.** Beside species diversity, tropical and temperate forests are expected to offer different biotic interactions. This especially applies to the mycoheterotrophic orchids which have adapted to shaded forest understorey by shifting to achlorophylly. In temperate forests, they specifically associate with some ectomycorrhizal fungi, and thereby exploit carbon from surrounding trees. But do these rules hold in tropical rainforests where ectomycorrhizal fungi are generally absent and such orchids abound? A study of two tropical achlorophyllous orchids shows unexpected mycorrhizal associations with diverse saprotrophic basidiomycetes, and divergence in mycorrhizal specificity. Gastrodia similis (Reunion; Mascarene) specifically associates with a Resinicium (Hymenochaetales), whereas Wullschleaegelia aphylla (Guadeloupe; West Indies) associates with both Gymnopus and Mycena species. Moreover, analyses of natural 15N and 13C abundances support nutrient chains from dead wood to G. similis and from decaying leaf litter to W. aphylla. These findings widen the diversity of mycorrhizal fungi associating with orchids, and open new perspectives on orchid and mycorrhizal biology in the tropics.

**Résumé** – Les organismes peuvent avoir des interactions différentes dans les écosystèmes tempérés et dans les écosystèmes tropicaux. Les orchidées non-chlorophylliennes, adaptées à pousser à l'ombre dans les sous-bois forestiers, en sont un bon exemple. Dans les forêts tempérées, elles ont des associations très spécifiques avec des champignons ectomycorhiziens, et exploitent ainsi la photosynthèse des plantes avoisinantes. Or, les champignons ectomycorhiziens sont absents dans la plupart des forêts tropicales. Cela soulève la question du stratagème développé par les orchidées non-chlorophylliennes dans les régions tropicales. Dans cet article, deux espèces choisies dans des contextes taxonomiques et géographiques différents, révèlent des associations inattendues avec divers champignons saprophytes : Gastrodia similis (La Réunion), associée au genre Resinicium, obtient du carbone issu de la décomposition de bois mort; Wullschlaegelia aphylla (Guadeloupe), associée aux genres Mycena et Gymnopus, reçoit du carbone issu de la décomposition de feuilles mortes. En élargissant le spectre taxonomique des basidiomycètes associés aux orchidées, cette étude démontre l'existence d'interactions fonctionnellement différentes entre les écosystèmes tempérés et tropicaux.

## INTRODUCTION

Les plantes n'exploitent pas directement les ressources du sol, mais dépendent pour cette activité de champignons du sol avec lesquels elles échangent des nutriments dans leurs racines (Smith & Read, 2008). Dans les forêts tempérées, la plupart des plantes ont des symbioses ectomycorhiziennes avec des champignons appartenant aux ascomycètes et aux

basidiomycètes. Dans les forêts tropicales, où l'on rencontre une très grande diversité de plantes, les associations mycorhiziennes sont très peu connues (Alexander & Selosse, 2009).

Toutefois, la symbiose ectomycorhizienne semble absente dans la plupart des forêts tropicales (Smith & Read, 2008). Cela soulève la question du stratagème développé par les orchidées non-chlorophylliennes dans les écosystèmes tropicaux. Apparues indépendamment chez les orchidées (Molvray et al., 2000), les 180 espèces non-chlorophylliennes décrites ne réalisent pas la photosynthèse et exploitent le carbone de leurs champignons mycorhiziens (mycohétérotrophie), s'adaptant ainsi à la vie à l'ombre dans les sous-bois forestiers (Leake, 1994, 2004). Dans les forêts tempérées, plusieurs espèces ont intéressé la recherche ces dix dernières années. Chacune révèle une association très spécifique avec un type de champignon, lui même impliqué dans des symbioses ectomycorhiziennes avec des racines de plantes voisines. Par exemple, la néottie nid d'oiseau (Neottia nidus-avis) des forêts tempérées obtient des sucres de la photosynthèse des plantes avoisinantes, transmis par des champignons ectomycorhiziens (Selosse et al. 2002).

Les espèces tropicales ne semblent pas s'associer à des glomeromycètes (Dearnaley, 2007), groupe de champignons qui forme des symbioses avec la plupart des plantes étudiées dans les régions tropicales. En revanche, certaines espèces asiatiques montrent des stratagèmes différents quant à l'écologie des champignons impliqués et l'origine du carbone obtenu, comme l'espèce Gastrodia elata chez laquelle a été isolé un champignon parasite du genre Armillaria (Kusano, 1911 ; Kikuchi et al., 2008). Cependant, la spécificité chez les orchidées mycohétérotrophes reste une règle générale (Taylor et al., 2002).

Cet article présente la synthèse d'une étude réalisée par nos deux équipes de recherches. Dans cette étude (Martos et al., 2009), nous démontrons par différentes méthodes que des orchidées mycohétérotrophes tropicales ont des associations avec divers champignons saprophytes, de façon peu spécifique, et obtiennent ainsi du carbone provenant de la dégradation de la matière organique végétale morte.

## MATERIEL ET METHODES

Deux orchidées non-chlorophylliennes, appartenant à des genres distincts dans la sous-famille des Epidendroideae (Molvray et al., 2000), ont été étudiées dans deux régions tropicales distantes géographiquement : Gastrodia similis Bosser (Bosser, 2006) (figure 1) à La Réunion (Mascareignes) qui fleurit annuellement entre août et septembre, et Wullschlaegelia aphylla (Sw.) Rchb. F. (Feldmann & Barré, 2001) (figure 2) à La Guadeloupe (Antilles) qui fleurit annuellement entre avril et juin. Toutes les populations connues en 2007 ont été étudiées, soit cinq et quatre populations respectivement, dans des forêts humides denses de basse altitude. Deux à dix individus par population ont été échantillonnés au niveau de leurs racines. Au laboratoire de l'Université de La Réunion, des coupes fines ont été réalisées dans les racines et observées en microscopie optique afin de retenir des zones présentant des colonisations par des champignons. Au niveau de ces zones, des tronçons de racines de 0,5 cm ont été réalisés et traités pour des analyses de génétique et pour des observations de microscopie électronique (non détaillé ici; Martos et al., 2009). D'autre part, pour vérifier nos hypothèses sur l'origine du carbone obtenu indirectement par les orchidées, différents échantillons ont été collectés dans l'environnement proche de plantes étudiées, et analysés pour leurs teneurs naturelles en éléments $^{13}C$ et en $^{15}N$ (non détaillé ici; Martos et al., 2009). Simplement, les concentrations de ces deux éléments lourds dans les tissus des organismes sont utilisés comme des indicateurs permettant de retracer indirectement les chaînes alimentaires dans les écosystèmes (Trudell et al., 2003 ; Zeller et al., 2007).

## RESULTATS

Chez G. similis, espèce endémique de La Réunion, trois nouvelles populations ont été découvertes au cours de cette étude. Les nouvelles populations ont été observées dans les deux forêts naturelles du Tremblet (Saint Philippe) et du Brûlé Takamaka (Sainte Rose), ainsi que dans une forêt secondaire à la Rivière Sainte Suzanne envahie par Syzygium jambos (Myrtaceae). Une sixième population, non étudiée ici, a été découverte récemment dans la forêt naturelle de Sainte Marguerite (Saint Benoît).

G. similis présente dans ses parties souterraines, un rhizome très développé rempli de réserves en amidon et dépourvu de champignons mycorhiziens. Les racines partant du rhizome présentent des colonisations massives par des champignons mycorhiziens au niveau de renflements importants. Ces renflements sont souvent directement en contact avec des débris de bois mort appartenant souvent à l'espèce Nuxia verticillata (Loganiaceae) (figure 1). D'autre part, W. aphylla présente dans ses parties souterraines des racines tubéreuses remplies de réserves en amidon et dépourvues de champignons mycorhiziens. De très longues racines secondaires, colonisées massivement, sont connectées par zones à des débris de feuilles mortes et même indirectement par des faisceaux allongés de champignons (rhizomorphes) (figure 2). En microscopie électronique, l'épiderme des racines colonisées est souvent nécrosé chez les deux espèces, et des colonisations massives sont observées à ce niveau dans des zones plus internes à la racine. Les champignons observés au niveau de ces zones montrent certaines structures microscopiques des basidiomycètes.

L'analyse génétique des champignons a confirmé la présence de plusieurs basidiomycètes. Un champignon Resinicium sp. (Hymenochaetales) a été identifié chez G. similis dans toutes les populations et chez la majorité des plantes. Alors que plusieurs champignons Mycena spp. et Gymnopus spp. ont été identifiés chez W. aphylla au sein des mêmes populations et parfois des mêmes plantes. Tous les champignons identifiés ont été rattachés à des groupes de champignons saprophytes dans les sols forestiers.

Enfin, les teneurs naturelles en $^{13}C$ et en $^{15}N$ ont conforté nos hypothèses sur les chaînes alimentaires des deux espèces, soit bois mort > champignon saprophyte > orchidée chez G. similis, et feuilles mortes > champignons saprophytes > orchidée chez W. aphylla.

## DISCUSSION

Les deux espèces G. similis et W. aphylla montrent plusieurs similarités dans leur morphologie et dans celles de leurs associations mycorhiziennes, bien que ces deux espèces aient des origines taxonomiques différentes (Molvray et al., 2000). De plus, leurs particularités diffèrent en de nombreux points du scénario sur le fonctionnement de la mycohétérotrophie décrit chez les orchidées tempérées :

(1) L'interaction au niveau des racines : notamment au niveau de l'épiderme, vivant chez la plupart des plantes, qui est souvent nécrosé dans les zones colonisées par des champignons. S'agit-il d'un mécanisme orchestré par la plante pour attirer les champignons saprophytes en libérant des substances organiques près des racines?

(2) La morphologie des racines : les deux espèces présentent des systèmes souterrains plus développés que la plupart des espèces tempérées. Ces particularités anatomiques sont-elles liées à une adaptation aux conditions écologiques des forêts tropicales humides ou bien à certaines positions taxonomiques chez les espèces?

(3) Les champignons basidiomycètes impliqués dans des associations mycorhiziennes : les genres Resinicium, Mycena et Gymnopus identifiés dans cette étude, démontrent l'existence d'une diversité encore sous-estimée de basidiomycètes mycorhiziens. Cette étude rejoint les hypothèses de plusieurs apparitions indépendantes de la mycohétérotrophie chez les orchidées (Molvray et al., 2000 et de changements fréquents de partenaires mycorhiziens durant l'évolution des genres

mycohétérotrophes—comme le genre Gastrodia dont les différentes espèces ont des associations avec Armillaria (Kusano, 1911), Mycena (Ogura-Tsujita et al., 2009) et Resinicium. Ces changements ont-ils un rôle dans la diversification des espèces mycohétérotrophes?

(4) De la matière végétale dégrédée comme unique source de carbone: les orchidées mycohétérotrophes considérées comme des espèces « parasites » dans les milieux tempérés, spécialisées dans l'exploitation de la photosynthèse des plantes voisines, montrent un stratagème très différent dans les régions tropicales. Elles obtiennent du carbone par divers associations avec des champignons saprophytes, comme le genre Resinicium spp. décrit comme un groupe saprophyte spécialisé dans la décomposition du bois mort (Nakasone, 2007)

(5) La non-spécificité chez l'espèce W. aphylla : la spécificité dans les interactions entre organismes peut varier entre les types d'écosystèmes. L'orchidée W. aphylla, en s'associant à divers champignons dans les populations et même dans les plantes, présente une spécificité peu marquée dans son choix de partenaires. Récemment, les orchidées Aphyllorchis spp. d'Asie tropicale ont révélé des associations peu spécifiques avec des champignons ectomycorhiziens (Roy et al., 2009).

## CONCLUSION

Les orchidées mycohétérotrophes, longtemps appelées orchidées saprophytes, révèlent dans cette étude des associations inattendues avec divers champignons saprophytes dans leurs racines. Ces résultats appellent à de nouvelles recherches sur d'autres espèces mycohétérotrophes des régions tropicales afin de vérifier si les particularités observées ici sont liées à des adaptations indépendantes aux conditions écologiques tropicales ou bien à certaines positions taxonomiques chez les orchidées. Plus généralement, cette étude montre que les végétaux peuvent avoir des interactions différentes dans les écosystèmes tempérés et tropicaux, ces derniers abritant probablement une grande diversité de niches écologiques originales.

## Bibliographie

Alexander I.J. & Selosse M.-A. 2009. Mycorrhizas in tropical forest: a neglected research imperative. New Phytologist 182: 14-16.

Bidartondo M.I. 2005. The evolutionary ecology of mycoheterotrophy. New Phytologist 167: 335-352.

Bosser J. 2006. Contribution à l'étude des Orchidaceae de Madagascar, des Comores et des Mascareignes. XXXV. Description d'un Oeceoclades nouveau de Madagascar, et notes sur trois genres nouveaux pour les Mascareignes. Adansonia 28: 45-54.

Dearnaley J.D.W. 2007. Further advances in orchid mycorrhizal research. Mycorrhiza 17: 475-486.

Feldmann P. & Barré N. 2001. Atlas des orchidées sauvages de la Guadeloupe. Patrimoines Naturels 48, Paris, SPN/IEGB/MNHN/CIRAD.

Kikuchi G., Higuchi M., Morota T., Nagasawa E. & Suzuki A. 2008. Fungal symbiont and cultivation test of Gastrodia elata Blume (Orchidaceae). Journal of Japanese Botany 83: 88-95.

Kusano S. 1911. Gastrodia elata and its symbiotic association with Armillaria mellea. Journal of the College of Agriculture Imperial University of Tokyo 4: 1-65.

Leake J.R. 1994. The biology of myco-heterotrophic ('saprophytic') plants. New Phytologist 127: 171-216.

Leake J.R. 2004. Myco-heterotroph/epiparasitic plant interactions with ectomycorrhizal and arbuscular mycorrhizal fungi. Current Opinion in Plant Biology 7: 422-428.

Martos F., Dulormne M., Pailler T., Bonfante P., Faccio A., Fournel J., Dubois M.-P. & Selosse M.-A. 2009. Independent recruitment of saprotrophic fungi by tropical achlorophyllous orchids. New Phytologist 184: 668-681.

Molvray M., Kores P.J. & Chase M.W. 2000. Polyphyly of mycoheterotrophic orchids and functional influence on floral and molecular characters. In: Wilson K.L., Morrison D.A., eds. Monocots: systematics and evolution. Melbourne: CSIRO, 441-447.

Nakasone K.K. 2007. Morphological and molecular studies on Resinicium s. str. Canadian Journal of Botany 85: 420-436.

Ogura-Tsujita Y., Gebauer G., Hashimoto T., Umata H. & Yukawa T. 2009. Evidence for novel and specialized mycorrhizal parasitism: the orchid Gastrodia confusa gains carbon from saprotrophic Mycena. Proceedings of the Royal Society London B 276: 761-767.

Roy M., Whatthana S., Richard F., Vessabutr S. & Selosse M.-A. 2009. Mycoheterotrophic orchids from Thailand tropical dipterocarpacean forests associate with a broad diversity of ectomycorrhizal fungi. BMC Biology 7:51.

Selosse M.-A., Weiss M., Jany J.L. & Tillier A. 2002. Communities and populations of sebacinoid basidiomycetes associated with the achlorophyllous orchid Neottia nidus-avis and neighbouring tree ectomycorrhizae. Molecular Ecology 11: 1831-1844.

Smith S.E. & Read D.J. 2008. Mycorrhizal Symbiosis. Cambridge, UK: Academic Press.

Taylor D.L., Bruns T.D., Leake J.R. & Read D. 2002. Mycorrhizal specificity and function in myco-heterotrophic plants. In: Van der Heijden M.G.A., Sanders I, eds. Mycorrhizal Ecology. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 375-413.

Trudell S.A., Rygiewicz P.T., Edmonds R.L. 2003. Nitrogen and carbon stable isotope abundances support the myco-heterotrophic nature and host-specificity of certain achlorophyllous plants. New Phytologist 160: 391-401.

Zeller B., Brechet C., Maurice J.P., Le Tacon F. 2007. $^{13}C$ and $^{15}N$ isotopic fractionation in trees, soils and fungi in a natural forest stand and a Norway spruce plantation. Annals of Science 64: 419-429.

**Figure 1.** Photographies de l'orchidée Gastrodia similis, endémique de La Réunion, enracinée dans des débris de bois mort de l'espèce d'arbre Nuxia verticillata (Loganiaceae). Forêt de Mare Longue à Saint Philippe ; août 2006.

**Figure 2.** Photographies de l'orchidée Wullschlaegelia aphylla à La Guadeloupe, dont les racines sont connectées à des feuilles mortes par des rhizomorphes de champignons (filaments noirs). Forêt de la Traversée ; juin 2007.