



Effet du paysage sur la structure des communautés fongiques foliaires

Thomas Fort

► To cite this version:

Thomas Fort. Effet du paysage sur la structure des communautés fongiques foliaires. Biodiversité et Ecologie. Université de Bordeaux, 2016. Français. NNT : 2016BORD0266 . tel-01441448

HAL Id: tel-01441448

<https://theses.hal.science/tel-01441448>

Submitted on 19 Jan 2017

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.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET ENVIRONNEMENTS
ÉCOLOGIE ÉVOLUTIVE, FONCTIONNELLE, ET DES COMMUNAUTÉS

Par **Thomas FORT**

Effet du paysage sur la structure
des communautés fongiques foliaires

Sous la direction de : **Cécile ROBIN**
Co-directrice : **Corinne VACHER**

Soutenue le 22 Novembre 2016

Membres du jury :

M. Christophe MOUGEL	Directeur de recherche	INRA Rennes	Rapporteur
M. Philip ROCHE	Directeur de recherche	IRSTEA Aix-en-Provence	Rapporteur
M. Samuel SOUBEYRAND	Chargé de recherche	INRA Avignon	Rapporteur
Mme. Valérie LAVAL	Ingénieure de recherche	INRA Versailles-Grignon	Examinatrice
M. Frédéric GARABETIAN	Professeur	Université de Bordeaux	Examineur
Mme. Cécile ROBIN	Directrice de recherche	INRA Bordeaux	Directrice de thèse
Mme. Corinne VACHER	Chargée de recherche	INRA Bordeaux	Directrice de thèse

*Nous sommes tous, au delà de nos différences superficielles,
des communautés microbiennes ambulantes. Le monde chatoie,
paysage pointilliste formé de minuscules êtres vivants.*

Lynn Margulis

Remerciements

Dans les articles scientifiques, les remerciements servent souvent à citer les personnes qui ont directement pris part à la conception de l'étude. Leurs noms sont entassés dans un petit paragraphe sobre et froid, coincé entre la discussion et la bibliographie. Pourtant, il y a en réalité une foule de personnes sans qui l'étude n'aurait pas été possible : les remerciements méritent d'être à la hauteur de leur contribution.

Ces trois années de thèse ont été l'occasion d'une multitude de rencontres, de discussions, de travaux, de loisirs, de joies, d'ennuis, de plaisirs, de sensations fortes... mais jamais de solitude. Je remercie donc toutes les personnes qui ont été amenées à contribuer à ce manuscrit, même indirectement, et qui ont fait de cette thèse un fragment de vie inoubliable. Plus qu'un timide *merci...*, ou qu'un franc *merci beaucoup.*, c'est un colossal *MERCI!!* que je vous adresse, avec toute la chaleur, l'ardeur, la folie et la démesure dont vous me savez être capable !

Mes premiers remerciements sont évidemment destinés à mes directrices, Cécile et Corinne. Dès notre première rencontre inopinée à Toulouse (rencontre orchestrée par Mélanie Roy, que je remercie), le courant est bien passé et j'ai senti que la transition vers Bordeaux, cette grande rivale de la ville rose, se ferait sans aucune difficulté. Vous avez toujours été là aux moments cruciaux de la thèse, tout en me laissant l'autonomie que j'aime avoir au travail : le dosage des deux était parfait. Vous m'avez permis de n'en faire qu'à ma tête tout en sachant me recadrer aux moments opportuns. Vos divergences de points de vue n'ont pas toujours été simples à gérer, mais se sont révélées être une richesse scientifique et technique. Et mieux, votre compréhension et votre soutien quant à mes choix personnels et professionnels ont été un soulagement.

Je remercie ceux qui ont plus que largement contribué à mon encadrement, sans lesquels cette thèse ne serait pas ce qu'elle est. Laurent d'abord, sans qui les premières manipulations n'auraient jamais vu le jour, et qui a toujours répondu à mes questions et requêtes, aussi invraisemblables soient-elles. Luc et Adrien ont comblé mon ignorance en écologie du paysage et leurs avis et conseils ont fait prendre un tournant tout autre à ma thèse. Je remercie aussi l'ensemble des membres de l'équipe qui m'ont martelé de questions lors des multiples présentations, en particulier Marie-Laure et Cyril. Merci à tous les autres partenaires des projets Flux.Com et ANALOG, Sylvain D., Yves B., Thierry C., Chantal F., Armelle M., ainsi que les membres de mon comité de thèse, Jean-Jacques G., Agnès C., Virgil F., et Isabelle M.P.

Merci aux membres du LabEx COTE, et tout particulièrement à Julien qui a organisé, d'une main de maître, l'école d'été qui restera l'une des expériences les plus enrichissantes de ma thèse.

Un grand merci à ceux qui ont transformé les longues journées sur le terrain et au

labo en parties de plaisir. Un immense merci à Xavier qui a participé à l'ensemble des échantillonnages muni de son casque, de son échenilloir et de ses remarques cinglantes (mais drôles et méritées!). Mille mercis à Morgane, Lionel, Fred et Marie pour leur coup de main occasionnel mais salulaire. Et merci à Gaby qui est venu crapahuter dans les vignes avec moi à 4h du matin, pour récolter des échantillons que je n'aurais finalement pas utilisés. Je remercie aussi les viticulteurs pour nous avoir laissé utiliser leurs parcelles quand bon nous semblait.

Un grand merci à Olivier, Martine, Patrick et Jessica pour m'avoir remis sur les rails des manips de biomol et de microbio. Merci à Jérôme qui m'a permis, l'espace de quelques heures, de renouer avec l'écologie chimique. Merci à Jean-Benoist, Jean-Paul et tous les membres du réseau Stack Exchange (notamment Frédéric M.), qui m'ont aidé à y voir clair dans les méandres de la bioinformatique. Merci aussi à Virgil et Bastien pour leurs conseils avisés en statistiques.

La thèse m'aura permis de découvrir l'enseignement. Faire découvrir l'écologie aux étudiants, à la fois sur le terrain et à travers les statistiques, a été un défi mais aussi une expérience enrichissante. J'y ai pris beaucoup de plaisir, et c'est aussi grâce à tous les collègues que je remercie, Marie-Lise, Sophie, Yolanda, Frédéric, Virgil et Blaise.

Et parce qu'il n'y a pas que la science, merci à tous ceux qui ont contribué à ce que cette thèse ait été conviviale, joyeuse et pleine d'humour. Merci à Chloé et Olivia qui m'ont aidé à dissiper le brouillard et m'ont indiqué la meilleure des routes à prendre. Merci à Carole, Bastien, Xavier, Fabrice et Gilles pour leur bonne humeur matinale autour d'un thé ou d'un café (ou d'une tisane). Merci aux collègues de jeux, de soirées, de voyages et autres joyeux festoient : Marie qui a tous les jours subi mes humeurs et délires quotidiens au bureau sans jamais rechigner ; Fred qui a en plus subi mes excentricités musicales (c'était pour ton bien!); Gaby qui venait apporter chaque jour sa dose de délire à la mienne (on a un dictionnaire à terminer); Olivier, mon partenaire de potins et ragots en tous genres ; et tous les autres bien sûr, Cécile, Paul, Jennifer, David, Damien, Alex, Pili, Adib, Marjorie, Marie, Nastasia, Nadège, Gustave H... J'en oublie sûrement, mais tous ces moments autour d'un verre, ou d'un jeu de tarot resteront, eux, inoubliables.

Merci aussi à ma famille, qui a tenté de me faire plaisir en essayant de comprendre mon travail : vous avez réussi haut la main ! Moi qui ai tenté de fuir la vigne durant toutes ces années, celle-ci aura fini par me rattraper et c'est grâce à vous ! Merci aussi à tous mes amis de longue date pour leur soutien : celui-ci a été précieux, et sans failles !

Pour finir, merci du fond du cœur à Camille, qui a partagé ma vie et qui m'a supporté tout au long de ces trois ans : du déménagement vers "le Nord", jusqu'à mon renfermement névrotique lors de la rédaction, en passant par les déboires quotidiens, les crises existentielles, les explosions de joies (amplement exagérées), les réveils matinaux, les corrections de copies, les journées à rallonge, les envies irrépressibles de changer l'agencement du salon, les taches de chocolat sur le mur de la cuisine, les éternelles procrastinations... Alors que ma thèse occupait toutes mes pensées et la plupart de mon temps libre, tu as toujours été là pour m'aider à redresser la tête, rehausser les épaules, bomber le torse, me relever quand tout m'écrasait. L'éternel étudiant peut maintenant se consacrer à nos projets communs, au milieu des cigales, des grillons, des vignes et des demi-muids.

Avant propos

Cette thèse gravite autour de trois disciplines : l'écologie microbienne, l'écologie des communautés et l'écologie du paysage. Elle s'intègre aussi à l'interface entre plusieurs échelles spatiales et entre plusieurs niveaux d'organisation, depuis les communautés de micro-organismes jusqu'aux interactions entre écosystèmes. Tout au long de ce manuscrit, les concepts, les terminologies et les méthodes issues de chaque discipline s'enchevêtrent et se complètent.

L'introduction de cette thèse est donc rédigée de façon à apporter les bases de chaque discipline, essentielles au reste du manuscrit. Certaines parties sont donc volontairement très générales, alors que d'autres sont autrement plus précises et détaillées. J'ai choisi d'aborder en premier l'écologie microbienne, puis de monter dans les niveaux d'organisation et dans les échelles spatiales pour terminer par l'écologie du paysage.

Cette thèse est rédigée sur la base d'articles scientifiques. Les trois principaux chapitres sont structurés sous la forme d'articles, destinés à être publiés dans des revues scientifiques. Ce travail de recherche s'intègre dans le projet Flux.Com, financé par le LabEx COTE.

Table des matières

Remerciements	5
Avant propos	7
Chapitre 1 Introduction générale	11
Chapitre 2 Caractérisation des communautés fongiques	55
Chapitre 3 Comparaison des communautés fongiques forestières et viticoles au cours d'une saison végétative	77
Chapitre 4 Effet d'une lisière forestière sur les communautés fongiques de la vigne	107
Chapitre 5 Effet de la composition du paysage sur les communautés fongiques foliaires de la vigne	129
Chapitre 6 Discussion générale et perspectives	149
Annexes	168
Annexe A Pipeline bioinformatique	171
Annexe B Deciphering the Pathobiome : Intra- and Interkingdom Interactions Involving the Pathogen <i>Erysiphe alphitoides</i>	191
Annexe C Plant communication with associated microbiota in the spermosphere, rhizosphere and phyllosphere	195

Chapitre 1

Introduction générale

Sommaire

1.1	Microbiome foliaire	13
1.1.1	Histoire de l'écologie microbienne	13
1.1.2	Définitions	13
1.1.3	La phyllosphère : terminologie	15
1.1.4	Caractéristiques de l'habitat foliaire	17
1.2	Processus d'assemblage des communautés	19
1.2.1	Écologie des communautés	19
1.2.2	La diversification	19
1.2.3	La dérive écologique	21
1.2.4	La sélection	21
1.2.5	La dispersion	23
1.3	Écologie du Paysage	27
1.3.1	Définition	27
1.3.2	Les éléments du paysage	28
1.3.3	Les lisières - échelle locale	28
1.3.4	Hétérogénéité du paysage - échelle régionale	31
1.4	Objectifs et hypothèses	32
1.5	Références	36

1.1 Microbiome foliaire

1.1.1 Histoire de l'écologie microbienne

Les micro-organismes sont partout. Ils colonisent un stupéfiant éventail d'habitats comme l'air, les sols, les eaux douces et marines, les nuages, les déserts polaires, les sources hydrothermales, les claviers d'ordinateurs, mais surtout, les êtres vivants (Anderson & Palombo, 2009; Fierer & Lennon, 2011).

Dès l'Antiquité, la présence d'organismes invisibles est supposée dans l'environnement. Aristote, malgré ses idées sur la théorie de la génération spontanée, avait supposé que la contagion de certaines maladies se faisait via quelque chose dans l'air, *«parce qu'il y a dans cet air quelque chose de morbide»* (Aristote, 1891). Ce n'est qu'au 17^{ème} siècle que l'observation de microbes se fit, grâce à l'invention du microscope par Anton van Leeuwenhoek (Caumette et al., 2011).

Dès lors, notre connaissance des micro-organismes n'a cessé de s'enrichir (Barton & Northup, 2011; Caumette et al., 2011). Au 18^{ème} siècle, l'abbé Lazzaro Spallanzani fut le premier à cultiver des microbes en utilisant un milieu nutritif. C'est d'ailleurs l'un des premiers à porter atteinte à la théorie de la génération spontanée. Il faudra attendre les travaux de Louis Pasteur sur la fermentation, près d'un siècle plus tard, pour mettre un terme définitif à cette théorie. Parallèlement, Robert Koch et Pasteur s'intéressèrent au rôle des micro-organismes pathogènes dans les infections et démontrèrent que tous les micro-organismes ne sont pas nécessairement cultivables.

Le précurseur de l'écologie microbienne fut Sergei Winogradsky qui, à partir de 1887, mit en évidence le rôle des micro-organismes dans la transformation des composés minéraux (Barton & Northup, 2011). A peu près en même temps, Martinus Beijerinck découvrit les bactéries fixatrices d'azote. Par la suite, ses travaux mirent en évidence le rôle déterminant des micro-organismes dans les cycles biogéochimiques. Depuis, nos connaissances sur les relations entre les micro-organismes et leur milieu n'ont cessé de s'étoffer, en particulier avec l'avènement des techniques de biologie moléculaire dans les années 1980 (Segata et al., 2013; Simon & Daniel, 2009).

1.1.2 Définitions

Le terme «micro-organisme» n'a pas de définition propre et regroupe généralement les domaines des Bactéries, des Archées ainsi que les Eucaryotes microscopiques tels que les champignons, les algues unicellulaires ou encore des protistes (Martiny et al., 2006). Durant de nombreuses années, la réelle diversité de micro-organismes a été sous-estimée car seule une infime fraction d'entre eux est cultivable (Müller & Ruppel, 2014). Ce n'est qu'avec l'apparition des méthodes culture-indépendantes, et particulièrement l'avènement et la démocratisation des techniques de séquençage haut débit à la fin du 20^{ème} siècle que l'incroyable diversité en micro-organismes a été découverte (Pace, 1997).

Les micro-organismes sont caractérisés par une immense diversité spécifique (**Fig. 1.1**). Locey & Lennon (2016) estiment que la planète hébergerait pas moins d'un trillion d'espèces microbiennes, soit une diversité largement supérieure à celle des macro-organismes. Cependant, Fierer & Lennon (2011) argumentent que cette comparaison

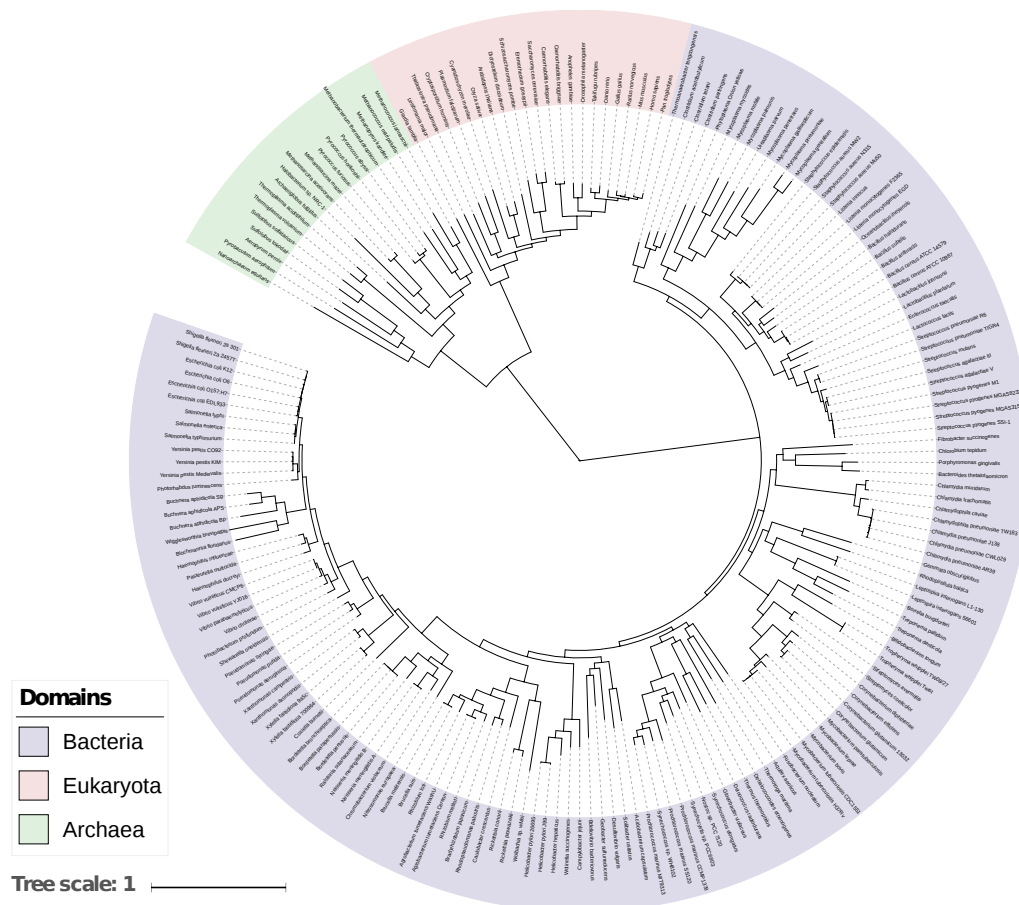


Figure 1.1 – Arbre phylogénétique du vivant. Seuls quelques taxons parmi les eucaryotes ne sont pas considérés comme des micro-organismes. Source : Interactive Tree Of Life.

est souvent erronée. En cause, la différence d'ampleur phylogénétique - comparaison d'un domaine entier de la vie par rapport à quelques fragments du domaine eucaryote - et un problème de rapport entre la pression d'échantillonnage et la taille des individus concernés. En revanche, les diversités morphologique, structurelle, métabolique et écologique sont incontestablement considérables (Brown, 2015).

Le microbiome désigne l'intégralité d'un habitat microbien, incluant l'ensemble des micro-organismes qui le peuplent (microbiote), leur génome (métagénome) et les conditions environnementales (Marchesi & Ravel, 2015). Le nombre de microbiomes distincts à travers le globe est immense (Fierer & Lennon, 2011). Certains bénéficient cependant d'un intérêt particulier : c'est par exemple le cas des océans, dont la connaissance approfondie des organismes qui le peuplent permet de mieux comprendre les cycles biogéochimiques à l'échelle du globe (Lima-Mendez et al., 2015; Moran, 2015). Les microbiomes des différents organes humains sont aussi devenus le terrain de jeu de prédilection de nombreux médecins (Boers et al., 2016), en particulier le tube digestif (Shreiner et al., 2015). Ces micro-organismes contribuent à de nombreuses fonctions vitales, et leur absence affecterait significativement la vie sur la planète (Gilbert & Neufeld, 2014).

Ce constat a remis en question la notion d'individu, si chère aux biologistes et aux

philosophes (O'Malley, 2013). Le concept d'holobionte a alors été introduit, terme qui regroupe l'hôte ainsi que l'ensemble des organismes vivant en association étroite et durable avec cet hôte (Margulis, 1991; Zilber-Rosenberg & Rosenberg, 2008). Récemment, ce concept a même donné naissance à la théorie évolutive de l'hologénome (Rosenberg & Zilber-Rosenberg, 2014; Zilber-Rosenberg & Rosenberg, 2008) : l'évolution des êtres vivants ne se ferait pas uniquement à travers le patrimoine génétique de l'hôte, mais plutôt par celui de l'ensemble des organismes composant l'holobionte. Cette théorie, encore récente, ne fait cependant pas consensus au sein du monde scientifique (Moran & Sloan, 2015). Par exemple, Douglas & Werren (2016) expliquent que, contrairement à ce que suppose cette théorie, la transmission de nombreux symbiontes n'est pas systématique. Des conflits sélectifs peuvent aussi avoir lieu entre plusieurs membres de l'holobionte (Douglas & Werren, 2016).

1.1.3 La phyllosphère : terminologie

Le concept d'holobionte ne s'applique pas exclusivement à l'homme, mais aussi à l'ensemble des organismes vivants, y compris les plantes. Immédiatement, ce sont les mycorhizes et les *Rhizobium* qui viennent à l'esprit, ces champignons et bactéries vivant en association étroite avec les racines des plantes (Bonfante & Anca, 2009). Les racines ne sont cependant pas les seuls organes végétaux à servir d'habitat pour des communautés microbiennes. De nombreuses études se sont intéressées au microbiome foliaire, et plusieurs reviews ont déjà été écrites à ce sujet (voir Lemanceau et al. Annexe 3).

La surface et l'intérieur des tissus foliaires constituent un habitat immense pour les micro-organismes. L'habitat foliaire totaliserait ainsi, sur l'ensemble de la planète, une surface de $1 \times 10^9 \text{ km}^2$ (Vorholt, 2012), soit deux fois la surface des continents. Un grande diversité d'organismes occupent ces feuilles : bactéries, champignons filamenteux, levures, algues, archées, protozoaires, nématodes et virus (Lindow & Brandl, 2003). Vorholt (2012) a estimé que chaque cm^2 de feuille hébergerait entre 10^6 et 10^7 cellules bactériennes ce qui, à l'échelle planétaire, correspondrait à un total de 10^{26} cellules. (Lambais et al., 2006) ont quant à eux estimé qu'il y aurait entre 2 et 13 millions d'espèces bactériennes distinctes qui coloniseraient les 20 000 plantes vasculaires des forêts atlantiques brésiliennes.

Cet habitat foliaire est communément appelé la phyllosphère. Ce terme a été introduit pour la première fois par Last (1955) et presque parallèlement par Ruinen (1956). Pour eux, la phyllosphère est, par analogie avec la rhizosphère, la surface externe des feuilles en tant qu'environnement pour les micro-organismes (Ruinen, 1961). Cette définition, finalement assez vague, a par la suite été interprétée de différentes manières. La surface d'une feuille ne présentant pas de frontière physique claire avec les autres organes aériens de la plante (bourgeons, tiges, fleurs et fruits), nombreux sont ceux qui définissent la phyllosphère comme l'habitat formé par l'ensemble des parties aériennes de la plante (Lindow & Brandl, 2003; Lindow & Leveau, 2002; Turner et al., 2013; Vorholt, 2012; Whipps et al., 2008). De même, la frontière entre la surface de la feuille et ses tissus internes n'est pas nette puisque des micro-organismes peuvent profiter des ouvertures naturelles (les stomates par ex.) pour transiter entre ces deux compartiments (Morris & Kinkel, 2002) (**Fig. 1.2**). Plusieurs auteurs étendent donc la

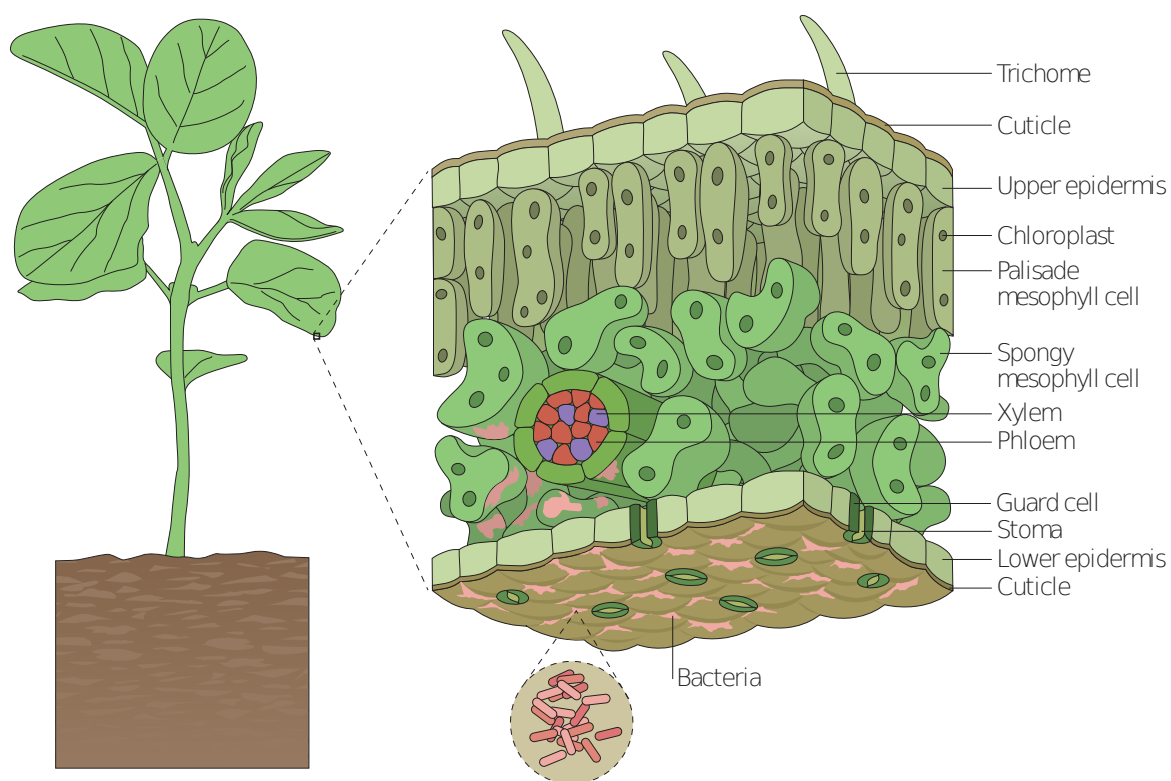


Figure 1.2 – Schéma d'une coupe transversale de feuille. Adapté de Vorholt (2012).

définition initiale de la phyllosphère aux tissus internes de la feuille (Morris & Kinkel, 2002; Müller & Ruppel, 2014; Newton et al., 2010a; Vacher et al., 2016). Récemment, Doan & Leveau (2015) ont même séparé la surface de la feuille en deux compartiments distincts : le phylloplane, paysage formé par la surface de la feuille, et le phyllotelma, le paysage hydrique de la plante.

La phyllosphère ne présentant pas de définition clairement établie, j'ai donc choisi de ne pas employer ce terme tout au long de ma thèse. Je lui préférerais la terminologie plus générale d'habitat foliaire, incluant ainsi la surface comme l'intérieur des tissus de la feuille. Cependant, selon qu'ils colonisent la surface ou l'intérieur des tissus foliaires, les micro-organismes ne subissent pas les mêmes pressions environnementales et ne présentent pas les mêmes caractéristiques trophiques (Newton et al., 2010b; Vorholt, 2012). On distingue ainsi deux fractions : les épiphytes, colonisant la surface des feuilles, et les endophytes, colonisant les tissus internes. Certaines espèces, sont considérées à la fois comme épiphytes et endophytes : c'est par exemple le cas des oïdiums (*Erysiphe* sp.) dont les hyphes peuvent coloniser les deux compartiments au cours de leur cycle de vie (Ravichandra, 2013). Enfin, certains micro-organismes arrivent totalement par hasard à la surface de la feuille, mais n'ont pas les adaptations nécessaires pour s'y implanter à long terme. On parle alors d'épiphyte passager ("transient epiphytes").

1.1.4 Caractéristiques de l’habitat foliaire

L’habitat foliaire se distingue tout d’abord par son microclimat, souvent considéré comme rigoureux (Vorholt, 2012) bien que de nombreuses espèces microbiennes s’y soient adaptées. La surface des feuilles est directement exposée aux rayonnements ultra-violets et à des variations journalières de température (Chelle, 2005). Les ressources en eau et en nutriments y sont réparties de façon hétérogène, à la fois dans l’espace et dans le temps (Vacher et al., 2016; Vorholt, 2012). De même, certains paramètres en lien avec l’air autour de la feuille peuvent avoir des répercussions sur les micro-organismes foliaires, tels que la vitesse du vent (Chelle, 2005).

La surface d’une feuille paraît, de prime abord, lisse et régulière. A l’échelle microscopique, c’est loin d’être le cas (**Fig. 1.3**). Le relief est tel que Vacher et al. (2016) l’ont comparé à une jungle, formée par les nervures, stomates, hydathodes et trichomes. Chacune de ces structures joue un rôle pour la plante et conditionne la structuration des communautés microbiennes foliaires. La cuticule, la couche la plus externe de la feuille, est la première surface que rencontrent les micro-organismes foliaires. Celle-ci est couverte de cire, pouvant être irrégulière (Koch et al., 2009). La topographie générale influence la répartition des micro-organismes à la surface de la feuille. Par exemple, les bactéries vont former des agrégats au niveau des dépressions formées à la base des nervures, des trichomes ou à la jonction des cellules de l’épiderme (Lindow & Brandl, 2003; Monier & Lindow, 2004).

Une feuille ne se résume pas qu’à une surface, aussi irrégulière soit-elle. Les différentes activités biologiques de la plante se répercutent ainsi sur les communautés microbiennes foliaires. Un des éléments déterminant la structuration des communautés microbiennes foliaires est la disponibilité en nutriments. La plante produit des glucides par photosynthèse, dont une partie est émise à la surface des feuilles (Fiala et al., 1990; Tukey, 1970; van der Wal & Leveau, 2011). De même, le méthanol issu du métabolisme primaire de la plante peut être utilisé par certains micro-organismes comme source de carbone, tels que les bactéries du genre *Methylobacter* (Iguchi et al., 2015; Knief et al., 2012). Les micro-organismes foliaires doivent aussi être adaptés à la multitude de composés impliqués dans les défenses de la plante et émis dans l’air, dans les organes ou à la surface des feuilles. Par exemple, des terpénoïdes ou des alcaloïdes, ont des fonctions antimicrobiennes ou inhibitrices de croissance bactériennes (Junker & Tholl, 2013; Radulovic et al., 2013).

Les micro-organismes foliaires n’établissent pas d’interactions exclusivement avec la plante hôte. Lors de leur arrivée sur la feuille, ceux-ci vont entrer en interaction avec les micro-organismes déjà installés, puis avec ceux qui viendront s’établir par la suite. Les interactions mises en place sont plus ou moins durables, et vont de la compétition au mutualisme en passant par le parasitisme, l’amensalisme ou le commensalisme (Lindow & Brandl, 2003).

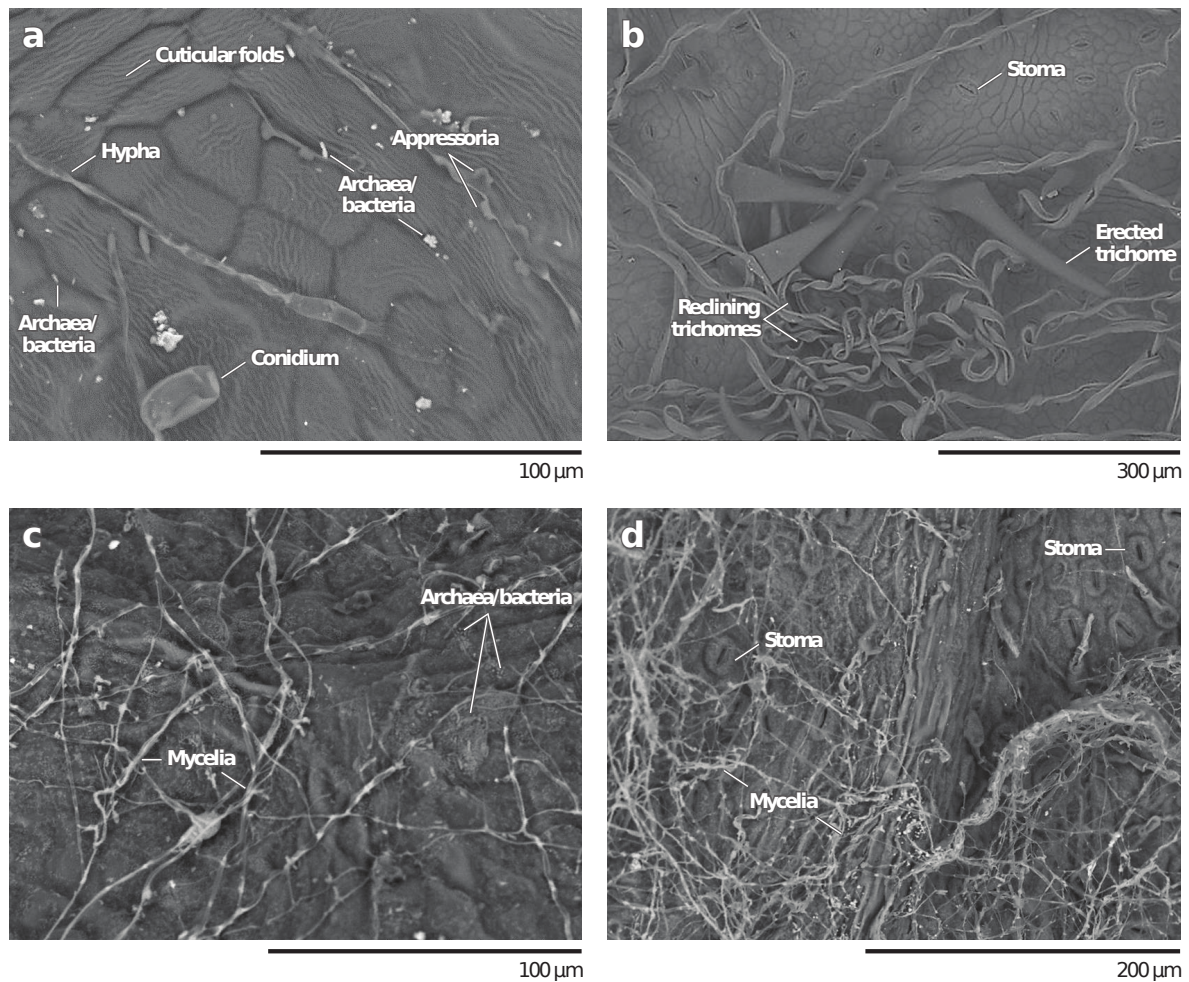


Figure 1.3 – Structure tridimensionnelle de la phyllosphère par microscopie électronique à balayage. (a) Face supérieure d’une feuille de vigne (*Vitis vinifera* cv. Neuburger) colonisée par de l’oïdium (*Erysiphe necator*). (b) Face inférieure d’une feuille de vigne (*V. vinifera* cv. Welschriesling), avec un stomate et deux types de trichomes. (c) Face supérieure d’une feuille de chêne (*Quercus robur*) colonisée par de l’oïdium *Erysiphe* sp.. (d) Face inférieure de feuille de chêne (*Q. robur*), montrant plusieurs stomates partiellement couverts de mycelium. Source : Vacher et al. (2016).

1.2 Processus d'assemblage des communautés

1.2.1 Écologie des communautés

En écologie, une communauté est un ensemble d'organismes issus de populations d'espèces distinctes, qui cohabitent sur une aire géographique donnée à un moment donné et qui constituent un réseau d'interactions. L'écologie des communautés constitue ainsi l'étude des patrons de diversité, d'abondance et de composition d'espèces au sein de ces communautés, ainsi que des processus responsables de ces patrons (Ricklefs & Miller, 2005). Durant plusieurs années, de nombreuses théories ont émergé pêle-mêle de cette discipline, sans aucune tentative concluante de les réunir en un cadre théorique satisfaisant. Lawton (1999) qualifiera d'ailleurs cette discipline de "mess". Ce n'est qu'en 2010 que Vellend propose un schéma d'organisation de la discipline, inspiré des quatre grands processus de génétique des populations : dispersion, sélection, spéciation et dérive. La dispersion est le déplacement d'organismes dans l'espace ; la sélection représente les différences déterministes de fitness entre espèces ; la spéciation crée de nouvelles espèces ; et la dérive conditionne les changements stochastiques d'abondance des espèces.

Ces processus d'assemblage ont par la suite été repris et adaptés aux communautés microbiennes par Nemergut et al. (2013), intégrant les caractéristiques particulières aux micro-organismes. En particulier, le processus de spéciation est difficile à évaluer pour les micro-organismes, notamment à cause des nombreux échanges de gènes horizontaux se produisant entre les espèces (Papke & Gogarten, 2012; Soanes & Richards, 2014). Le terme de diversification est alors proposé en remplacement, celui-ci étant plus général puisqu'il intègre la diversité phénotypique et fonctionnelle. Récemment, Vacher et al. (2016) ont adapté ce cadre conceptuel aux communautés microbiennes foliaires. Je vais reprendre ici les principales caractéristiques de chacun de ces quatre processus (**Fig. 1.4**).

1.2.2 La diversification

L'apport de diversité microbienne dans les communautés foliaires peut se faire par mutation. Bien qu'il soit difficile de le quantifier, le taux de mutation est supposé être élevé car les micro-organismes sont soumis à de forts stress abiotiques favorisant les mutations, tels que les rayonnements UVs ou des dérivés réactifs de l'oxygène (Vorholt, 2012). Les flux de gènes horizontaux, fréquents chez les bactéries mais aussi chez les champignons (Papke & Gogarten, 2012; Soanes & Richards, 2014) sont supposés être à l'origine de nombreuses fonctions dans les communautés microbiennes (Soanes & Richards, 2014). Enfin, le mécanisme de dormance qui existe chez de nombreuses espèces microbiennes peut aussi être considéré comme une source de variabilité dans la communauté. Certaines cellules ou certaines structures, telles que les spores des champignons, peuvent rester en dormance durant plusieurs années, jusqu'à ce que les conditions redeviennent favorables (Jackson & Denney, 2011; Lennon & Jones, 2011; Wyatt et al., 2013). La sortie de dormance réinjecte alors du matériel génétique dans la communauté, n'ayant pas subi les mêmes pressions de sélection que les autres membres de la communauté restés actifs (Nemergut et al., 2013).

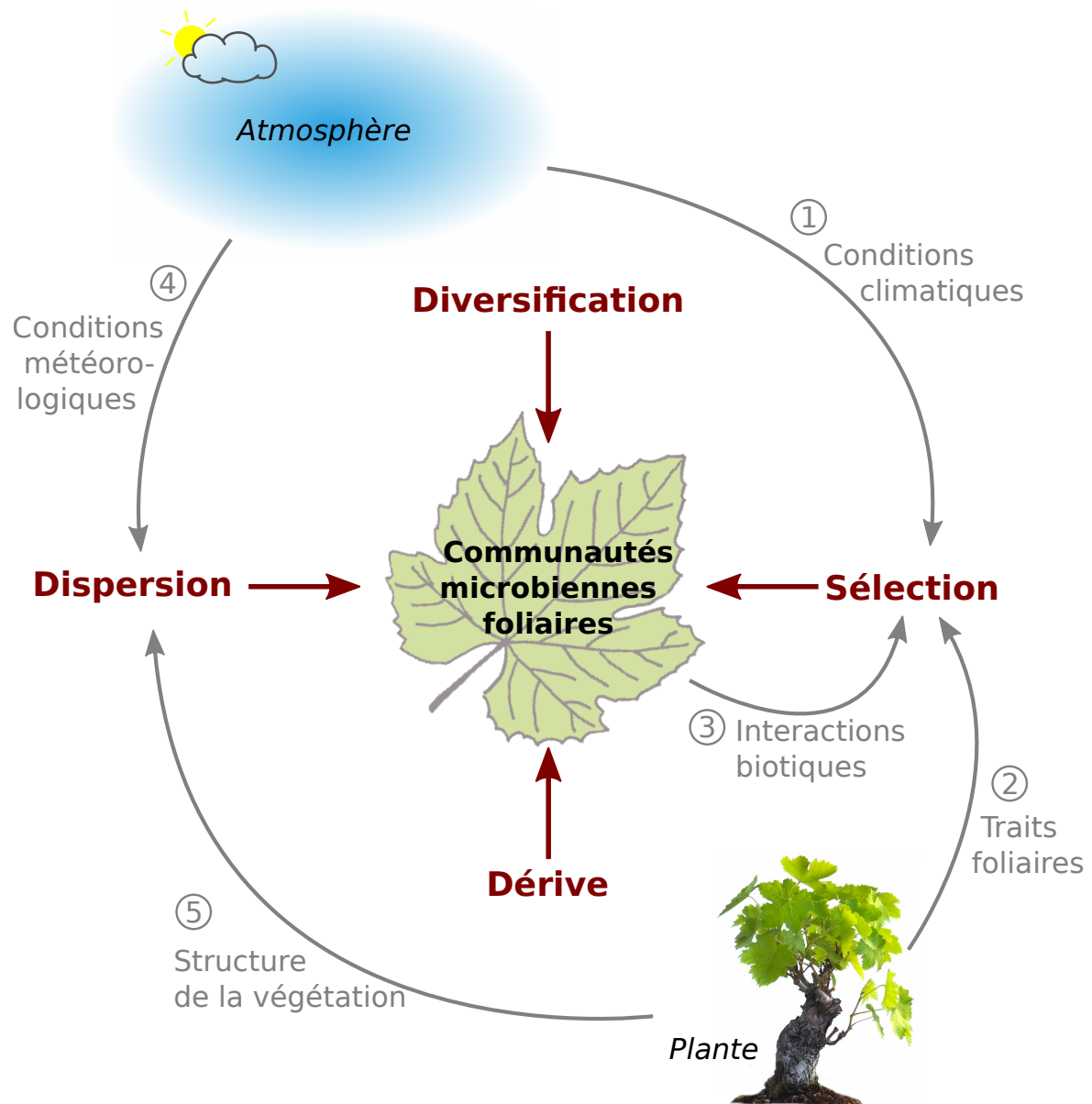


Figure 1.4 – Cadre théorique de structuration des communautés microbiennes foliaires. Celles-ci sont représentées à l'interface entre la plante et l'atmosphère. Les quatre processus éco-évolutifs sont présentés en rouge. Les effets de la plante et de l'atmosphère sur ces processus sont représentés par des flèches grises. Inspiré de Vacher et al. (2016).

1.2.3 La dérive écologique

La dérive écologique induit la modification stochastique de l'abondance relative des organismes au sein de la communauté. Les communautés microbiennes foliaires sont composées de nombreux taxons rares (Unterseher et al., 2011). De petites modifications stochastiques de leur abondance peuvent ainsi rapidement conduire à leur extinction (Nemergut et al., 2013), ou au contraire à leur expansion dans le milieu, modifiant en cascade la succession de la communauté (Maignien et al., 2014). Cependant, très peu d'études sont parvenues à quantifier la contribution relative de la dérive dans la structuration des communautés. Maignien et al. (2014) ont montré, en conditions contrôlées, que des événements stochastiques conditionnaient l'abondance des premiers colonisateurs des feuilles d'*Arabidopsis thaliana* puis conduisait, sous l'action de la sélection, à des trajectoires de succession distinctes.

1.2.4 La sélection

De nombreuses pressions de sélection agissent sur les communautés microbiennes foliaires. Les micro-organismes adaptés à la vie à la surface ou à l'intérieur des feuilles présentent un certain nombre de traits fonctionnels. Le moindre changement de conditions écologiques de l'habitat foliaire - caractérisé par le microclimat, la plante hôte et les interactions biotiques - peut alors conduire à une modification de la communauté microbienne foliaire.

Le microclimat foliaire

Les micro-organismes colonisant la surface de la feuille sont capables de résister aux rayonnements ultraviolets (Jacobs et al., 2005; Kadivar & Stapleton, 2003). Des mécanismes de résistance aux UVs sont connus à la fois chez les champignons et les bactéries, notamment via la production de pigments (Jacobs et al., 2005; Stahmann et al., 2001). Les micro-organismes foliaires sont aussi capables de résister à la dessiccation, lors de longues périodes de sécheresse par exemple (Peñuelas et al., 2012). Chez les bactéries, la formation d'agrégats (Monier & Lindow, 2003) ou l'excrétion de certains composés (Knoll & Schreiber, 2000; Schreiber et al., 2005) permettent d'éviter la dessiccation. Les communautés microbiennes foliaires sont modifiées par des variations dans le micro-climat (**Fig. 1.4 ①**), comme par exemple à différents emplacements de la canopée d'un même arbre (Cordier et al., 2012a; Leff et al., 2015; Osono, 2014) ou le long de gradients altitudinaux (Coince et al., 2014; Cordier et al., 2012b) et latitudinaux (Bálint et al., 2015; Millberg et al., 2015). Récemment, Ueda et al. (2016) ont aussi montré que la concentration en ozone dans la troposphère modifiait les communautés bactériennes des feuilles de riz.

La plante hôte

La plante définit l'habitat foliaire via la morphologie de ses feuilles, et son activité physiologique (section 1.1.4). L'ensemble de ces paramètres régissent les communautés microbiennes foliaires (**Fig. 1.4 ②**). Les composantes topographiques influencent peu la diversité et la composition des communautés bactériennes (Reisberg et al., 2011). Le développement de surfaces foliaires artificielles, mimant à l'échelle du nanomètre la topographie foliaire, permettra dans les années à venir une meilleure compréhension

du rôle de la topographie sur les communautés microbiennes foliaires (Doan & Leveau, 2015). La composition chimique de la cuticule influence néanmoins la structure des communautés foliaires (Bodenhausen et al., 2014; Reisberg et al., 2013).

Les différentes activités biologiques de la plante, telles que la photosynthèse ou la protection contre les nuisibles, ont des répercussions sur les communautés microbiennes foliaires. Bien que la concentration en nutriments issus de la photosynthèse soit largement inférieure à la surface qu'à l'intérieur des tissus foliaires (Fiala et al., 1990), leur quantité modifie l'abondance de bactéries à la surface des feuilles, ainsi que la composition des communautés (Iguchi et al., 2015; Knief et al., 2012; Mercier & Lindow, 2000). Des études ont par ailleurs relié la production d'azote à la structure des communautés bactériennes foliaires (Kembel & Mueller, 2014; Kembel et al., 2014; Laforest-Lapointe et al., 2016). Lors de l'attaque de la plante par un pathogène, l'induction des voies signalétiques de défense telles que celles de l'éthylène, des GABA, de l'acide salicylique ou de l'acide jasmonique, provoquent une modification des communautés microbiennes foliaires (Balint-Kurti et al., 2010; Bodenhausen et al., 2014; Horton et al., 2014; Kniskern et al., 2007; Vogel et al., 2016).

Cette vaste diversité phénotypique végétale est notamment issue de la variabilité génétique inter et intra-spécifique. De multiples études ont ainsi montré que les communautés microbiennes foliaires diffèrent fortement d'une plante hôte à l'autre, même lorsqu'elles sont géographiquement proches (Arfi et al., 2012; Dees et al., 2015; Kembel & Mueller, 2014; Kembel et al., 2014; Kim et al., 2012; Laforest-Lapointe et al., 2016; Lambais et al., 2014; Ortega & Pascual, 2014; Redford et al., 2010; Sapkota et al., 2015). De même, la composition des communautés microbiennes varie entre différents génotypes d'une même espèce (Bálint et al., 2013; Balint-Kurti et al., 2010; Bodenhausen et al., 2014; Cordier et al., 2012a; Horton et al., 2014; Hunter et al., 2010, 2015).

Les interactions entre micro-organismes

Les interactions entre micro-organismes à la surface de la feuille sont nombreuses et se répartissent le long d'un continuum entre parasitisme, mutualisme, compétition, commensalisme, amensalisme et neutralisme Faust & Raes (2012); Lindow & Brandl (2003) (**Fig. 1.4 ③**). Pour donner quelques exemples, Remus-Emsermann et al. (2012) ont mis en évidence la compétition entre bactéries pour l'acquisition de nutriments sur la feuille. Le champignon *Aureobasidium pullulans* est connu pour sa forte compétitivité (Dimakopoulou et al., 2008) et est d'ailleurs utilisé en agriculture comme méthode de lutte biologique (Chi et al., 2009). *Epicoccum nigrum* et *Alternaria alternata* sécrètent des substances anti-microbiennes (Alcock et al., 2015; Musetti et al., 2007), modifiant ainsi la structure des communautés. Enfin, le champignon *Ampelomyces quisqualis* est parasite d'*Erysiphe* sp., un autre champignon responsable de l'oïdium chez plusieurs plantes (Angeli et al., 2009). Les interactions entre micro-organismes se font aussi à travers la cuticule : les endophytes influencent en effet la composition des communautés épiphytes (Osono, 2014; Suda et al., 2009; Verma & Gange, 2013).

Maignien et al. (2014) a montré, en conditions contrôlées, que les premiers colonisateurs de la feuille conditionnaient la succession écologique de cette communauté (effet de priorité). Récemment, plusieurs études ont tenté d'analyser la complexité des inter-

actions au sein de l'habitat foliaire via des approches de réseaux d'interaction (Agler et al., 2016; Jakuschkin et al., 2016).

Interactions avec des macro-organismes

La présence d'autres organismes peut aussi influencer les communautés microbiennes foliaires. Les attaques d'herbivores induisent les défenses chimiques de la plante et modifient ainsi, indirectement, les communautés microbiennes foliaires (Biere & Bennett, 2013; Humphrey et al., 2014). Les activités humaines peuvent aussi engendrer des modifications du microclimat de la plante, se répercutant par la suite sur les communautés microbiennes foliaires. Par exemple, la pollution atmosphérique engendre une modification des communautés microbiennes foliaires (Yutthammo et al., 2010), augmentant l'abondance de champignons dégradant les hydrocarbures aromatiques (Undugoda et al., 2016). La concentration en ozone dans la troposphère, qui modifie les communautés bactériennes des feuilles de riz, peut aussi être issue des activités humaines à grande échelle (Ueda et al., 2016). En agriculture, l'action humaine a aussi un effet sur les communautés microbiennes foliaires. Le mode de gestion influence notamment ces communautés (Jensen et al., 2013; McGarvey et al., 2015; Pascazio et al., 2015; Varanda et al., 2016). En particulier, l'application de pesticides réduit la croissance bactérienne et fongique, la diversité microbienne et altère la composition de la communauté (Bertelsen et al., 2001; Cordero-Bueso et al., 2014; Gu et al., 2010; Karlsson et al., 2014; Moulas et al., 2013; Patyka et al., 2016; Walter et al., 2007). À l'inverse, d'autres études ont montré que les communautés foliaires étaient fortement résilientes à l'application de certaines molécules actives (Ottesen et al., 2015; Walter et al., 2007), notamment sur la vigne (Perazzolli et al., 2014).

1.2.5 La dispersion

La dispersion se définit comme le mouvement des organismes à travers l'espace (Nemergut et al., 2013). C'est un processus fondamental puisque il conditionne l'arrivée des espèces microbiennes sur la feuille.

Origine du microbiote foliaire

Les micro-organismes immigrant sur les feuilles peuvent provenir de diverses sources. Au tout début du stade de développement de la plante, des espèces microbiennes peuvent provenir des graines - et donc de la mère - ou de l'environnement de la germination (Barret et al., 2015; Darrasse et al., 2010; Darsonval et al., 2008; Lopez-Velasco et al., 2013). Ce type de transmission verticale est très commun chez les champignons endophytes (Hodgson et al., 2014; Rodriguez et al., 2009), en particulier les pathogènes (Galperin et al., 2003; Oliver et al., 2001; Sowley et al., 2010). En début de saison végétative, des micro-organismes peuvent provenir des bourgeons dans lesquels ils ont passé l'hiver (Osono, 2014). L'immigration des micro-organismes sur les feuilles peut aussi se faire via la pluie et les éclaboussures engendrées par les gouttes d'eau (Constantinidou, 1990; Morris et al., 2008; Rossi & Caffi, 2012). Des animaux peuvent aussi transporter des micro-organismes : c'est le cas d'insectes pollinisateurs ou d'herbivores (Alekkett et al., 2014; Osono, 2014). Cependant, le vecteur de micro-organismes foliaire considéré comme le plus important est l'atmosphère, et plus précisément les bioaérosols qui s'y trouvent (Bulgarelli et al., 2013).

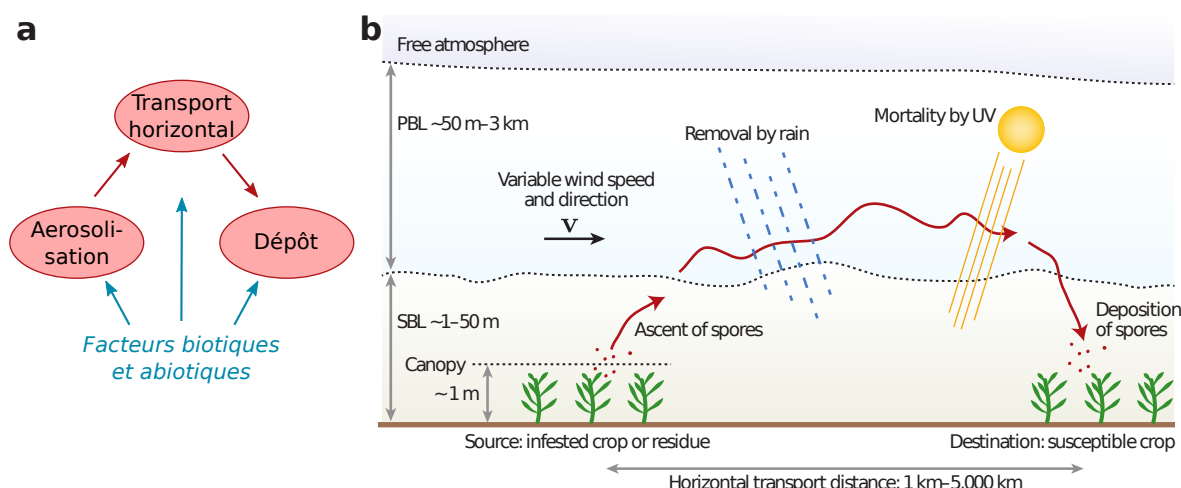


Figure 1.5 – Représentation des trois mécanismes de dispersion de propagules dans l’atmosphère. (a) De nombreux facteurs biotiques et abiotiques influencent l’aérosolisation depuis la source, le transport horizontal dans l’atmosphère et le dépôt à destination (Adapté de Schmale & Ross, 2015). (b) Exemple de la dispersion longue distance de spores de champignons pathogènes des cultures. SBL signifie *Surface Boundary Layer*, soit la couche de l’atmosphère la plus proche du sol, généralement épaisse de moins de 50 m. Les spores peuvent rejoindre la couche atmosphérique supérieure (PBL, *Planetary Boundary Layer*). L’un des principaux facteurs affectant le transport horizontal est la météorologie. Extrait de Schmale & Ross, 2015.

L’atmosphère comme vecteur de dispersion

Les bioaérosols sont des particules d’origine biologique en suspension dans l’air (Morris et al., 2014; Vacher et al., 2016). Une partie des bioaérosols se compose de particules vivantes, impliquées dans le processus de dispersion des micro-organismes : des cellules, des spores, ou encore des fragments d’hyphes (Després et al., 2012). L’air est ainsi considéré comme un vecteur passif de dispersion du microbiote foliaire, plutôt que comme un habitat à part entière (Womack et al., 2010). Trois mécanismes successifs sont impliqués dans la dispersion via l’atmosphère : l’aérosolisation, soit l’émigration des particules de leur source ; le transport dans l’air ; et le dépôt sur la feuille (**Fig. 1.5.a**).

Les sources à l’origine des micro-organismes immigrant sur les feuilles via l’atmosphère peuvent être multiples. Il peut bien entendu s’agir d’organes végétaux (feuilles, bourgeons, tiges, écorces, fleurs, fruits), mais aussi d’animaux, du sol, ou encore de surfaces aquatiques (Bulgarelli et al., 2013). L’aérosolisation peut être passive, impliquant alors l’action de nombreux paramètres environnementaux tels que le vent (Morris et al., 2014). Elle peut aussi être active, via par exemple, des mécanismes d’éjection des spores retrouvés chez certaines espèces de champignons (Bailey et al., 2014; Morris et al., 2014).

Une fois ces particules dans l’air, leur transport dans l’atmosphère puis leur dépôt se fait grâce au mouvement des molécules de l’air et à la gravité (Després et al., 2012; Morris et al., 2014) (**Fig. 1.5.b**). Le temps de rétention des particules dans l’atmosphère, la distance qu’elles parcourent et la vitesse à laquelle elles se déplacent sont

ainsi conditionnés par de nombreux facteurs biotiques et abiotiques : les paramètres atmosphériques, tels que la turbulence ou les cellules de convection (Chamecki et al., 2009; Dressaire et al., 2016); les conditions météorologiques telles que les précipitations (Isard et al., 2005); la topographie (Morris et al., 2014); ou encore les propriétés aérodynamiques des particules véhiculées - moins elles sont grandes et denses, moins la gravité a d'influence sur elles (Burrows et al., 2009; Norros et al., 2014; Wilkinson et al., 2012) (**Fig. 1.4 ④**).

Historiquement, ce sont surtout les étapes d'aérosolisation et de dépôt qui ont été étudiées, en particulier chez les organismes pathogènes de cultures (Schmale & Ross, 2015). Les transports horizontaux de propagules dans l'atmosphère sont largement moins étudiés. En effet, afin de déterminer avec précision la direction du mouvement des particules et d'estimer leur provenance et leur destination, il est essentiel de quantifier un flux. Les méthodes permettant la quantification de flux de particules dans l'air ne sont pas encore totalement maîtrisées (Morris et al., 2014). A l'heure actuelle, on ne peut que quantifier des concentrations de particules à un moment donné, et estimer les patrons spatiaux de dispersion par modélisation (Miller et al., 2015; Morris et al., 2014; Schmale & Ross, 2015).

Les échelles de la dispersion

La distance parcourue par une propagule dans l'air dépend ainsi de nombreuses conditions environnementales. Ces conditions sont variables dans l'espace mais aussi dans le temps. La dissémination des spores de champignons dépend souvent de son cycle de vie, engendrant des patrons de dispersion saisonniers (Barberán et al., 2014; Bowers et al., 2013; Schmale & Ross, 2015) (**Fig. 1.6.b**). Dans l'espace, les patrons géographiques de dispersion sont principalement conditionnés par la restriction du mouvement des micro-organismes, appelée limitation à la dispersion (Hanson et al., 2012). Cette dernière crée un changement de composition des communautés dans l'espace, appelé distance-decay. Néanmoins, l'étude de ces patrons spatiaux de dispersion des propagules peut se faire à plusieurs échelles spatiales distinctes, entre lesquelles l'effet de la limitation à la dispersion diffère.

A l'échelle locale (inférieure au kilomètre), les patrons spatiaux de dispersion sont très bien connus car la source est souvent identifiée (**Fig. 1.6.a**). En général, l'abondance et la richesse spécifique des propagules décroît exponentiellement à partir de la source (**Fig. 1.6.c**). Ce type de patron a été montré chez des espèces d'ectomycorhizes (Dickie & Reich, 2005; Galante et al., 2011), ainsi que chez des champignons pathogènes (Schmale & Ross, 2015). Galante et al. (2011) ont par exemple montré que 95% des spores d'ectomycorhizes tombaient à moins d'1 m de la source.

A l'échelle régionale (au delà du kilomètre), les patrons de dispersion sont moins bien connus. En effet, une certaine partie des particules est toujours véhiculée dans la couche atmosphérique la plus proche du sol : la limitation à la dispersion identifiée à l'échelle locale est donc toujours présente (Schmale & Ross, 2015). Bowers et al. (2013, 2011); Pellissier et al. (2016) montrent par exemple que le type d'habitat conditionne la composition bactérienne et fongique des bioaérosols. En effet, la végétation impacte fortement les communautés microbiennes aériennes (Lymperopoulou et al.,

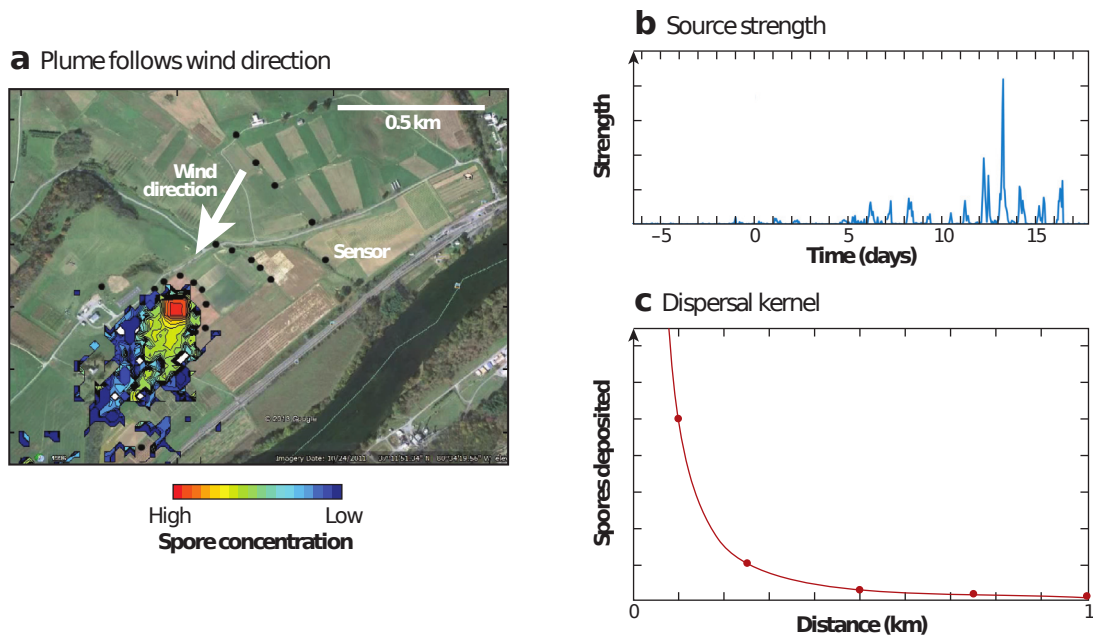


Figure 1.6 – Modélisation de la dispersion spatiale et temporelle du nombre de spores à l'échelle locale. (a) Modélisation spatiale de la concentration de spores dans l'air, dispersant à partir d'un champ considéré comme une grande source d'inoculum (carré rouge). (b) Estimation du nombre de spores libéré chaque jour par la source ("source strength"). (c) Kernel de dispersion : quant la distance à la source augmente, le nombre de spores diminue exponentiellement. Extrait de Schmale & Ross, 2015.

2016) (**Fig. 1.4 ⑤**). Cependant, une partie des particules peut être, à cette échelle, véhiculée dans les couches atmosphériques supérieures, au delà de 50 m d'altitude (Schmale & Ross, 2015). Dans ce cas, la limitation à la dispersion est bien moins forte car, bien que les conditions météorologiques puissent conditionner la survie et la retombée des propagules, les vents peuvent les transporter sur de très longues distances (Aylor, 1999; Schmale & Ross, 2015) (**Fig. 1.5.b**). La source des micro-organismes est alors souvent inconnue (Schmale et al., 2006). Par conséquent, certaines études n'ont pas trouvé de distance-decay dans la composition des communautés aériennes à l'échelle régionale (Barberán et al., 2014; Kivlin et al., 2014).

A l'échelle globale (plusieurs centaines, voire milliers de kilomètres), la dispersion des particules se fait par les courants atmosphériques dans les couches supérieures de l'atmosphère. Les événements de dispersion à longue distance, bien que souvent localisés dans le temps, concernent un grand nombre d'espèces microbiennes qui sont alors retrouvées un peu partout dans un pays, un continent, voire même la planète (Barberán et al., 2015; Brown & Hovmøller, 2002; Finlay, 2002; Schmale & Ross, 2015; Womack et al., 2010). Dans ce cas, la limitation à la dispersion est très réduite : de nombreux micro-organismes sont alors considérés comme ubiquistes (Fenchel & Finlay, 2004).

Conséquences sur les communautés microbiennes foliaires

Les conséquences de la dispersion des micro-organismes sur les communautés microbiennes foliaires sont assez peu connues car difficiles à quantifier. Certaines espèces

sont considérées comme innées, soit parce qu'elles ont été transmises verticalement par la mère via les graines, soit, dans le cas des espèces pérennes décidues, parce qu'elles ont passé la mauvaise saison dans les bourgeons ou dans d'autres organes de la plante (Vorholt, 2012). Lors du débourrement des bourgeons foliaires, la colonisation via les autres vecteurs de dispersion peut commencer, et en particulier, via l'atmosphère (Bulgarelli et al., 2013). Les patrons de dispersion aériens devraient donc influencer les communautés microbiennes foliaires via l'apport d'un certain pool d'espèces pouvant potentiellement coloniser les feuilles. La limitation à la dispersion aérienne des propagules peut ainsi conduire à une modifications des communautés microbiennes foliaires en fonction de la distance géographique entre les feuilles (distance-decay). Cependant, un tel effet peut aussi provenir d'un gradient environnemental, et donc être issu de modifications continues des pressions de sélection plutôt que d'un changement du pool d'espèces fourni par l'air (Hanson et al., 2012).

A l'échelle locale, les communautés foliaires peuvent être modifiées lorsqu'elles sont à proximité d'une source de micro-organismes distincte. C'est par exemple le cas des lisières : Lindow & Andersen (1996) ont montré que l'abondance bactérienne était plus élevée sur les feuilles d'orangers au niveau des lisières avec d'autres habitats. Cordier et al. (2012a) a néanmoins montré que la distance géographique avait un faible effet sur la structuration des communautés fongiques foliaires dans une forêt de hêtres. A plus large échelle, Redford et al. (2010) ont montré que la différenciation géographique entre communautés fongiques et bactériennes des aiguilles de *Pinus ponderosa* est minime, même entre individus distants de plusieurs milliers de kilomètres. Cela se justifie soit par une absence de limitation à la dispersion chez ces espèces microbiennes, soit par l'absence d'effet de la dispersion sur ces communautés foliaires. A l'inverse, d'autres études ont bien mis en évidence un effet de la distance géographique sur les communautés microbiennes foliaires d'une même espèce végétale (Finkel et al., 2012; Galès et al., 2014), mais cet effet n'a pas toujours pu être séparé de l'effet potentiel d'un gradient écologique.

Finalement, l'habitat foliaire a servi à tester un grand nombre de théories écologiques, et il a été montré qu'un très grand nombre de facteurs influençait les communautés microbiennes foliaires. L'effet de la dispersion, considéré comme essentiel à l'apport de diversité microbienne à l'habitat foliaire, reste cependant peu connu. En particulier, des éléments paysagers pourraient influencer la composition de ces communautés, tels que les lisières ou l'hétérogénéité d'habitats voisins. Néanmoins, l'influence du paysage sur les communautés microbiennes foliaires reste méconnu.

1.3 Écologie du Paysage

1.3.1 Définition

A l'origine, le terme "écologie du paysage" a été introduit en 1939 par Carl Troll (Wiens, 2007), dans le but de relier géographie et écologie. Cette discipline, relativement récente, a fortement évolué depuis, parallèlement à la définition du paysage. Le paysage peut se définir comme une aire géographique hétérogène, caractérisée par une mosaïque dynamique de patches d'habitats en interactions (Bastian, 2001; Burel & Baudry, 1999; Turner et al., 2001; Wu & Hobbs, 2007). Burel & Baudry (1999) considèrent

même que c'est "*un niveau d'organisation supérieur à l'écosystème ; il se caractérise essentiellement par son hétérogénéité et par sa dynamique gouvernée pour partie par les activités humaines. Il existe indépendamment de la perception*". La notion de paysage est en effet intimement liée aux activités humaines. Les géographes considèrent d'ailleurs le paysage comme un lien entre la nature et la société.

L'écologie du paysage est donc une branche des sciences largement inter-disciplinaire. L'International Association for Landscape Ecology (IALE) la définit comme l'étude de la variation spatiale dans les paysages à différentes échelles, incluant les causes biophysiques et sociétales de l'hétérogénéité paysagère, ainsi que ses conséquences. A l'heure actuelle, l'une des principales thématiques étudiée en écologie du paysage est la modification de la structure paysagère en réponse aux activités humaines, ainsi que les répercussions sur les populations et les communautés biologiques. Par exemple, l'urbanisation ou l'agriculture intensive conduisent à une homogénéisation du paysage et à la fragmentation des habitats (*i.e.* la réduction et l'isolement des habitats naturels ou semi-naturels), affectant ainsi la dispersion et la migration des populations animales ou végétales (Fahrig, 2003).

1.3.2 Les éléments du paysage

Un paysage se compose d'éléments de natures différentes (**Fig. 1.7**). La matrice est considérée comme l'élément dominant du paysage, c'est à dire l'habitat principal composant ce paysage. Cette matrice est parsemée de taches, ou patches, correspondant à des zones d'habitats différents englobés par la matrice (Forman & Godron, 1981). Historiquement, cette représentation binaire est une transposition de la théorie biogéographique des îles de MacArthur & Wilson (1967). La matrice est assimilée à l'océan, habitat radicalement différent des îles et des continents qui le parsèment (Burel & Baudry, 1999; Fahrig et al., 2011). En réalité, la structure du paysage est rarement aussi binaire : désormais, un paysage est plutôt considéré comme composé de patches d'habitats distincts (Fahrig et al., 2011). Cette diversité d'habitats forme une mosaïque hétérogène (**Fig. 1.7**). Les éléments linéaires de cette mosaïque sont appelés corridors. En fonction des espèces, ils peuvent servir de couloirs de migration ou de dispersion, ou à l'inverse, de barrières (Burel & Baudry, 1999).

1.3.3 Les lisières - échelle locale

Définition et description

Deux patches d'habitats distincts sont séparés par une zone géographique, généralement étroite, présentant des caractéristiques propres, car elle est influencée par les deux habitats à la fois. C'est aussi la zone à travers laquelle vont avoir lieu les échanges entre les deux patches, que ce soient des flux physiques, chimiques ou biologiques (Cadenasso et al., 2003). Cette zone géographique est généralement appelée lisière, frontière, ou encore écotone (Hufkens et al., 2009). Le terme lisière est plutôt utilisé lorsque l'on parle d'une zone de transition entre deux patches d'habitats, alors que les termes écotones et frontières, plus généraux, sont aussi utilisés pour parler des interfaces entre milieux aquatique, terrestre et aérien (Cadenasso et al., 2003), voir même entre grandes régions biogéographiques (Ferro & Morrone, 2014). Les lisières, bien que représentant une proportion réduite de la surface d'un paysage, jouent un rôle clé dans les interactions

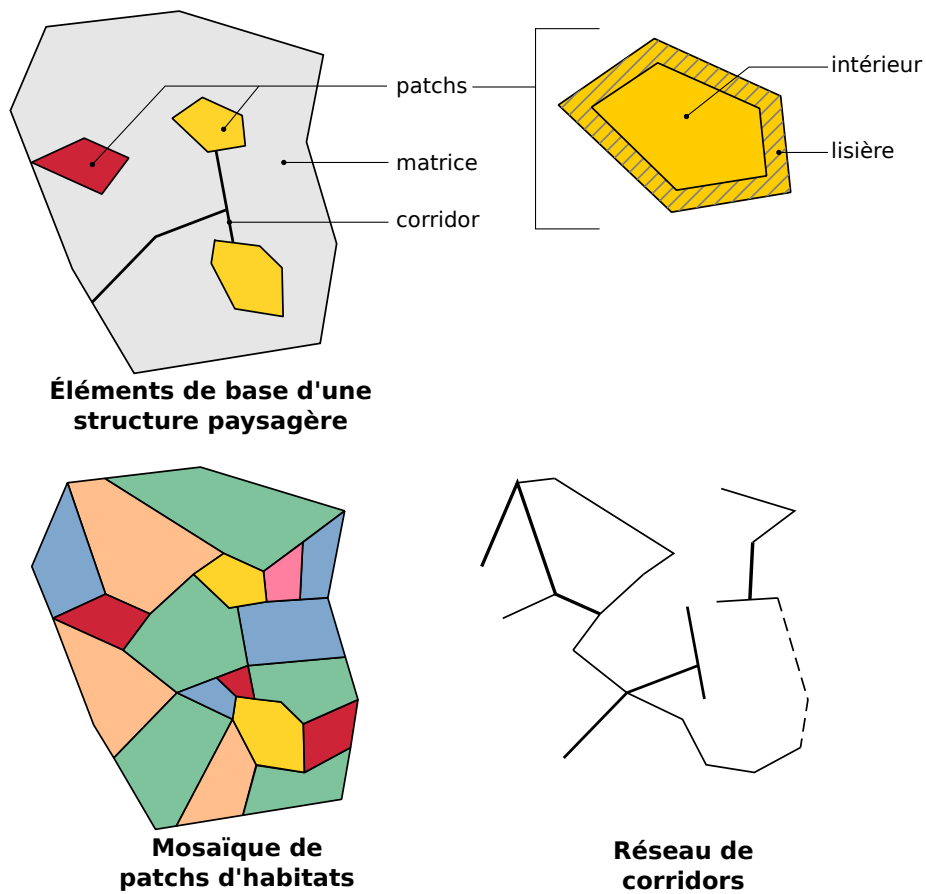


Figure 1.7 – Catégories d'éléments du paysage. Les couleurs représentent des habitats distincts. Inspiré de Burel & Baudry (1999).

inter-patches (Cadenasso et al., 2003; Laurance et al., 2001).

Transferts d'espèces

En écologie, une lisière est caractérisée par sa perméabilité, c'est à dire sa capacité à laisser passer les organismes d'un habitat à l'autre (Stamps et al., 1987). La perméabilité d'une lisière diffère en fonction des organismes : elle peut-être une barrière infranchissable pour certains, tout en freinant à peine la dispersion d'autres. Par exemple, les lisières de forêts peuvent être perméables à des espèces généralistes, mais empêcher le transfert de spécialistes forestiers (Laurance et al., 2001; Ries et al., 2004). La perméabilité aura donc des répercussions sur les populations à plus large échelle, puisqu'elle influence la dispersion des individus dans le paysage.

Des transferts d'espèces vont ainsi se produire entre les habitats, que ce soit via le déplacement d'individus ou via la dispersion de propagules. Les causes de ces transferts vers un habitat qui n'est pas optimal sont multiples : recherche de ressources complémentaires, d'un abri temporaire ou colonisation aléatoire (Bianchi et al., 2006; Blitzer et al., 2012; Landis et al., 2000; Rusch et al., 2010; Tschardt et al., 2005). Ces transferts d'espèces ont particulièrement été étudiés à l'interface entre les systèmes culturels et les habitats naturels ou semi-naturels. Les conséquences agronomiques sont en effet multiples : le transfert d'espèces issues de certains groupes fonctionnels, tels que des herbivores, pathogènes, prédateurs, pollinisateurs ou disperseurs de graines, peuvent engendrer des conséquences favorables ou défavorables sur la santé et la productivité des cultures (Bianchi et al., 2006; Blitzer et al., 2012). De tels transferts sont souvent baptisés "spillovers". Par exemple, Inclán et al. (2015) ont mis en évidence le transfert de parasitoïdes d'insectes entre habitats forestiers et vergers, pouvant avoir des conséquences sur le taux d'herbivorie des arbres fruitiers.

L'effet de lisière

Une lisière présente généralement des caractéristiques écologiques distinctes de l'intérieur de l'habitat (Baker et al., 2016; Chen et al., 1993; Murcia, 1995; Ries et al., 2004; Wright et al., 2010). Par exemple, en lisière de forêt, la température moyenne et la vitesse moyenne du vent sont plus élevées alors que l'humidité moyenne est plus faible (Chen et al., 1993). L'écart journalier de chacune de ces variables est lui aussi plus élevé en lisière qu'au centre de la forêt. Un milieu ouvert jouxtant une forêt peut aussi, au niveau de sa lisière, subir un effet d'ombrage par les arbres de l'habitat voisin (Baker et al., 2013; Murcia, 1995).

Ces différences microclimatiques, ainsi que les transferts d'espèces depuis l'habitat voisin, ont pour conséquence un changement local de la densité des organismes décroissant avec la distance à la lisière. Cet effet est appelé effet de lisière (Ries et al., 2004). Par exemple, Thomson & Hoffmann (2009) ont montré que l'abondance d'arthropodes prédateurs et de parasitoïdes dans des vignobles décroissait avec la distance à la lisière forestière. Des effets de lisière ont été mis en évidence sur l'abondance et par conséquent sur la composition des communautés d'une multitude d'organismes : plantes, arthropodes, amphibiens, reptiles, oiseaux, ou encore mammifères (Aragón et al., 2015; Baker et al., 2013; Chacoff & Aizen, 2006; Eldegard et al., 2015; Hart, 2007; Ohara & Ushimaru, 2015; Watson et al., 2004). Par exemple, Hart (2007) a montré que la densité,

la richesse, et la diversité d'oiseaux diminuait avec la distance à la lisière entre forêt et champs.

1.3.4 Hétérogénéité du paysage - échelle régionale

Hétérogénéité

A l'échelle régionale, l'hétérogénéité du paysage joue un rôle crucial dans la répartition des espèces (Fahrig et al., 2011; Stein et al., 2014). Par analogie avec la relation hétérogénéité-diversité observée à l'intérieur d'un habitat, plusieurs études ont étudié la relation entre la diversité spécifique d'un habitat et l'hétérogénéité du paysage environnant (Bar-Massada & Wood, 2014; Smith & Lundholm, 2012; Stein et al., 2014). Cependant, le terme hétérogénéité reste assez vague et ne correspond pas à une mesure bien précise (Stein & Kreft, 2015). Fahrig et al. (2011) proposent de différencier deux types d'hétérogénéité - de composition et de configuration - au sein desquelles de nombreuses métriques sont communément utilisées (**Fig. 1.8**).

Composition du paysage

Le terme générique de composition rassemble tout ce qui a trait à la quantité et à la proportion d'habitats dans un paysage (Fahrig et al., 2011). Plus un paysage contient d'habitats différents, plus la composition de ce paysage est hétérogène (**Fig. 1.8**). De

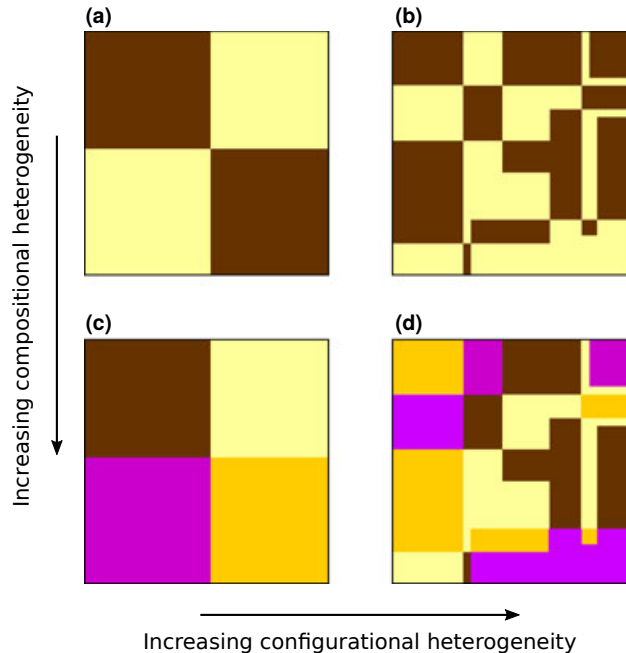


Figure 1.8 – Illustration des deux principaux axes d'hétérogénéité spatiale : composition et configuration. Chaque grand carré est un paysage, et les couleurs représentent différents habitats. L'augmentation du nombre ou de la proportion de chaque habitat augmente l'hétérogénéité de la composition du paysage. La modification de l'agencement des patches les uns par rapport aux autres augmente l'hétérogénéité de la configuration du paysage. Extrait de Fahrig et al. (2011).

même, la proportion d'un habitat dans le paysage caractérise la composition de celui-ci. Comme pour les effets de lisière, l'effet de la composition du paysage sur les communautés a été mis en évidence pour de nombreux groupes taxonomiques ou fonctionnels tels que les lépidoptères (Liivamägi et al., 2014; Rusch et al., 2015), les araignées (Schmidt et al., 2005), les pollinisateurs (Holzschuh et al., 2008; Power et al., 2016), les carabes (Purtauf et al., 2004, 2005), les amphibiens (Guerry & Hunter, 2002; Jacobs & Houlihan, 2011), les oiseaux (Dallimer et al., 2010; Devictor & Jiguet, 2007; Geiger et al., 2010), et les mammifères (Ritchie et al., 2009). Dans un certain nombre d'études, c'est le terme de complexité du paysage qui est utilisé. Ce terme qualifie généralement, en agronomie, la proportion d'habitats naturels ou semi-naturels dans le paysage. Il quantifie ainsi, dans le paysage, les habitats où l'action de l'Homme est réduite, par opposition aux cultures, aux prairies ou aux territoires urbanisés. L'effet de la complexité du paysage est étudié, en particulier, sur les espèces issues de groupes fonctionnels ayant un intérêt agronomique fort. Une méta-analyse de Chaplin-Kramer et al. (2011) met ainsi en évidence que les ennemis généralistes des ravageurs de cultures répondent positivement à la complexité du paysage.

Configuration du paysage

Contrairement à la composition, la configuration du paysage a trait à l'agencement des patchs les uns par rapport aux autres (Fahrig et al., 2011, **Fig. 1.8**). Cela inclue ainsi les mesures de forme des patchs (périmètre, surface), les mesures de proximité et d'isolement entre les patchs (distance entre habitats) ou encore les mesures d'agrégation. Cela inclue aussi la quantification de la connectivité, c'est à dire la mesure des relations spatiales entre les patchs. Cette notion est fortement liée à celle de la fragmentation des habitats : une espèce, dont l'habitat est fragmenté (suite à des pressions anthropiques, par exemple) ne peut survivre qu'au sein des patchs suffisamment connectés entre eux pour permettre la dispersion des individus (Kindlmann & Burel, 2008). La bibliographie traitant de l'effet de la fragmentation des habitats sur les populations et les communautés est riche et abondante, et vise encore une fois une large gamme d'organismes (Erős & Campbell Grant, 2015; Fontúrbel et al., 2015; Haddad et al., 2015; Hadley & Betts, 2012; Magrach et al., 2014).

1.4 Objectifs et hypothèses

Cet état de l'art montre que, depuis une quinzaine d'années, un nombre considérable d'études a permis de caractériser les communautés microbiennes foliaires, et d'identifier les multiples facteurs responsables de leur structuration. De même, la bibliographie traitant de l'effet de la structuration du paysage sur les communautés de macro-organismes est extrêmement riche. Cependant, le rôle du paysage dans la structuration des communautés microbiennes foliaires a jusque ici été très peu étudié. Le paysage peut en effet influencer les communautés microbiennes foliaires via le processus de dispersion. A l'échelle locale, les habitats voisins peuvent abriter des communautés microbiennes foliaires distinctes. Certaines de ces espèces pourraient disperser à travers la lisière, et coloniser les feuilles de l'autre habitat. L'échange de micro-organismes foliaires entre deux espèces différentes colonisant le même habitat a déjà été mis en

évidence (Beckstead et al., 2010; Mordecai et al., 2013; Power & Mitchell, 2004; Wilson et al., 2014), suggérant que les transferts entre habitats à proximité des lisières sont possibles. De même, à l'échelle régionale, la structure du paysage peut influencer le pool d'espèces microbiennes pouvant éventuellement coloniser les feuilles, et par conséquent, modifier la composition des communautés microbiennes foliaires.

L'objectif principal de cette thèse est donc d'évaluer l'influence de la structure paysagère sur les communautés microbiennes foliaires. Notre hypothèse de travail est que les habitats naturels ou semi-naturels sont une source de micro-organismes foliaires pour les cultures. En effet, les cultures sont des systèmes sous forte influence humaine : la diversité végétale y est réduite au niveau spécifique et génétique, et la lutte contre les adventices, les ravageurs et les pathogènes nécessite une intervention humaine régulière via diverses pratiques agricoles. À l'inverse, les habitats naturels ou semi-naturels sont plus hétérogènes, présentent une diversité végétale spécifique et génétique plus importante, et l'impact humain y est sensiblement plus réduit. La diversité microbienne pourrait donc y être plus élevée que dans les cultures.

Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé comme modèle d'étude le paysage à l'est de Bordeaux, dominé par des habitats forestiers et viticoles (**Fig. 1.9**). La vigne est un agro-écosystème qui subit une intense pression humaine. La diversité spécifique végétale y est maintenue très basse, afin de réduire la compétition pour les nutriments et la ressource en eau (Celette & Gary, 2013). L'utilisation de produits phytosanitaires est particulièrement intense et fréquente en viticulture, et ce quelque soit la méthode de conduite du vignoble (conventionnelle, biologique ou biodynamique). En 2006, le Ministère de l'Agriculture estimait que la vigne occupait 3,3% des surfaces agricoles en France, mais consommait 14,4% des pesticides vendus dans le pays (source : <http://agriculture.gouv.fr/>). Certains traitements sont même obligatoires, comme le traitement préventif contre l'insecte vecteur de la flavescence dorée, soumis à un arrêté ministériel depuis 2013 (source : www.legifrance.gouv.fr/ ; NOR : AGRG1329211A). À l'inverse, les forêts composant ce paysage sont peu gérées par l'homme. Les essences dominantes sont le chêne (*Quercus sp.*), le charme (*Carpinus betulus*) et le châtaignier (*Castanea sativa*). Bien que certaines de ces parcelles soient destinées à la production de bois, leur gestion ne nécessite que très peu d'interventions humaines.

Nous avons fait le choix de nous focaliser sur la caractérisation des communautés fongiques. En effet, bien que les champignons ne soient pas nécessairement les plus abondants à la surface des feuilles, ceux-ci sont connus pour jouer des rôles fonctionnels importants en association avec la plante (Christian et al., 2015). Plusieurs espèces fongiques associées à la vigne sont bien connues car de nombreuses maladies foliaires sont causées par des champignons, tels que l'oïdium (*Erysiphe necator*), le black rot (*Guignardia bidwellii*), ou encore la pourriture grise (*Botrytis cinerea*). À l'inverse, d'autres champignons sont bien connus en tant qu'antagonistes, et sont même utilisés en lutte biologique, comme *Aureobasidium pullulans* ou *Ampelomyces quisqualis* (Angeli et al., 2009; Berg, 2009; Chi et al., 2009). Ces deux champignons sont aussi des exemples d'antagonistes généralistes (Jumpponen & Jones, 2009; Kiss, 2003; Pinto & Gomes, 2016; Zambell & White, 2014), pouvant coloniser indifféremment des feuilles de vigne ou d'essences forestières. Outre les micro-organismes foliaires, les communau-

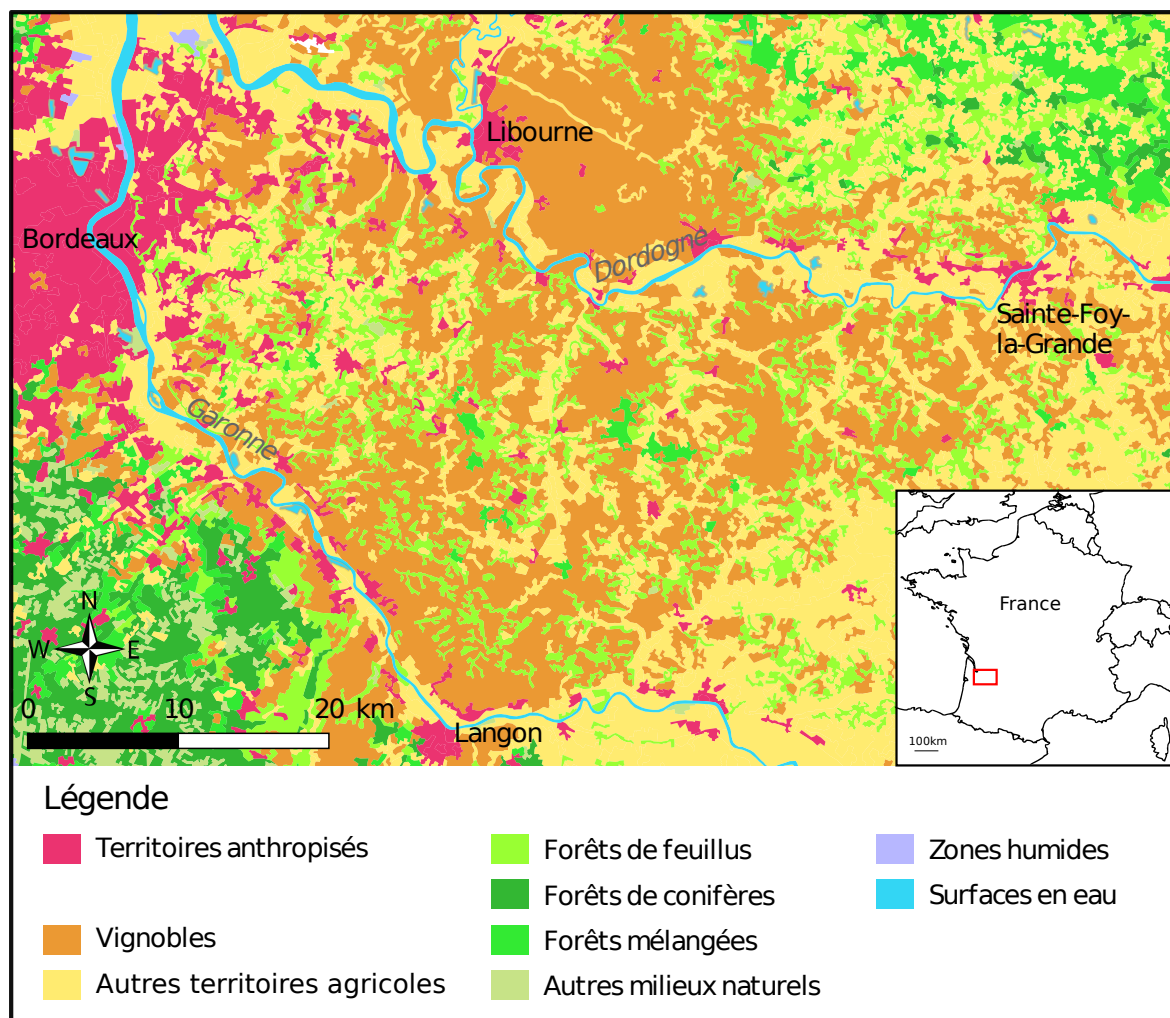


Figure 1.9 – Carte d'utilisation des sols (Corine Land Cover 2016) de la région à l'est de Bordeaux. Au nord et à l'est de la Garonne, le paysage est dominé par des vignes et par des forêts de feuillus ou des forêts mixtes.

tés fongiques des baies sont bien connues (Martins, 2012; Pinto & Gomes, 2016), et là encore, des champignons sont bien décrits pour leur impact négatif ou positif sur la production de raisin ou a posteriori, dans l'étape de vinification. C'est par exemple le cas du champignon pathogène généraliste *Botrytis cinerea*, l'agent responsable de la pourriture grise mais aussi de la pourriture noble permettant la production de vins liquoreux (Fournier et al., 2013), ou encore de nombreuses levures impliquées dans la fermentation alcoolique (Garijo et al., 2011).

Pour tester l'hypothèse que les parcelles forestières sont une source de micro-organismes pour les vignes adjacentes, nous avons (1) comparé la richesse et la composition fongique foliaire en vigne et en forêt au cours d'une saison de végétation, (2) testé l'effet d'une lisière forestière sur les communautés fongiques foliaires de la vigne, et (3) évalué l'effet de la composition du paysage sur les communautés fongiques foliaires de la vigne.

Chap. 2 : choix méthodologiques

La première étape de la thèse a été de cibler et mettre au point une méthode de caractérisation des communautés fongiques foliaires. Nous avons fait le choix de caractériser ces communautés par métabarcoding et séquençage haut débit. Le chapitre 2 de cette thèse justifie le choix de cette méthode, ainsi que ses conséquences sur la conduite de l'échantillonnage, le traitement des échantillons, le traitement des données issues du séquençage, et la mise en place des analyses statistiques.

Chap. 3 : comparaison des communautés fongiques forestières et viticoles au cours d'une saison végétative

La première approche pour tester notre hypothèse de travail a consisté à faire un suivi temporel des communautés fongiques foliaires, à la fois sur vigne et sur les espèces forestières dominantes. Nous avons spécifiquement testé les hypothèses suivantes : (1) la richesse est plus élevée dans les forêts que dans les vignes adjacentes, (2) la similarité entre les communautés fongiques des deux habitats augmente au cours de la saison, et (3) particulièrement au niveau des lisières. Pour tester cela, nous avons étudié l'interface vigne-forêt sur trois sites, et à cinq dates distinctes au cours de l'année 2013. Les communautés fongiques foliaires et aériennes ont été caractérisées le long de transects depuis le centre de la vigne jusqu'au centre de la forêt adjacente. Deux des dates étudiées n'ont cependant pas été prises en compte dans les analyses : en Avril, plusieurs échantillons étaient manquants à cause des différences de phénologie entre les espèces, et en Juin, de fortes précipitations ont eu lieu pendant l'échantillonnage, et auraient potentiellement biaisé les résultats.

Chap. 4 : effet d'une lisière forestière sur les communautés fongiques foliaires viticoles

La seconde approche a consisté à étudier la structuration spatiale des communautés fongiques foliaires à l'échelle d'une parcelle de vigne. Nous avons testé l'existence d'un effet de la lisière forestière sur les communautés microbiennes foliaires de la vigne. Pour cela, nous avons sélectionné une parcelle de vigne présentant une lisière avec une forêt. Les communautés fongiques foliaires et aériennes ont été caractérisées au niveau de 99 points, répartis sur l'ensemble de la parcelle en utilisant une grille systématique d'échantillonnage. Des mesures micro-climatiques ont aussi été enregistrées au niveau de 15 points, répartis sur toute la parcelle, au cours du mois précédent l'échantillonnage. Ces données n'ont cependant pas été incluses dans l'analyse car la panne de deux des capteurs utilisés a empêché l'obtention de données détaillées sur l'ensemble de la parcelle. Des données physiologiques ont aussi été mesurées sur des feuilles provenant de 24 pieds de vignes, répartis dans toute la parcelle. Le potentiel hydrique de base a été mesuré, et la composition chimique des cires épicuticulaires a été analysée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). Ces données ont été analysées, mais ne montraient aucune variabilité à l'échelle de la parcelle. Elles n'ont donc pas été incluses dans les analyses présentées dans le chapitre.

Chap. 5 : effet de la composition du paysage sur les communautés fongiques foliaires de la vigne

La troisième approche consistait à changer d'échelle, et à étudier l'effet de la structure du paysage environnant sur les communautés fongiques foliaires. Nous avons testé l'hypothèse que, plus il y a de forêt dans le paysage environnant une vigne, plus la richesse fongique foliaire est élevée dans cette parcelle, entraînant une modification de la composition des communautés. Pour cela, nous avons étudié les communautés fongiques foliaires de 36 parcelles de vigne dans la région bordelaise. La proportion d'habitats forestiers dans un rayon d'1 km autour de chaque parcelle a été mesurée, et a été mise en relation avec la richesse et la composition des communautés fongiques foliaires.

1.5 Références

- Agler, M. T., Ruhe, J., Kroll, S., Morhenn, C., Kim, S.-T., Weigel, D., & Kemen, E. M. (2016). Microbial hub taxa link host and abiotic factors to plant microbiome variation. *PLOS Biology*, 14, e1002352.
- Alcock, A., Elmer, P., Marsden, R., & Parry, F. (2015). Inhibition of *Botrytis cinerea* by Epirocin: A Secondary Metabolite from New Zealand Isolates of *Epicoccum nigrum*. *Journal of Phytopathology*, 163, 841–852.
- Aleklett, K., Hart, M., & Shade, A. (2014). The microbial ecology of flowers: an emerging frontier in phyllosphere research. *Botany*, 92, 253–266.
- Anderson, G., & Palombo, E. A. (2009). Microbial contamination of computer keyboards in a university setting. *American Journal of Infection Control*, 37, 507–509.
- Angeli, D., Pellegrini, E., & Pertot, I. (2009). Occurrence of *Erysiphe necator* Chasmothecia and Their Natural Parasitism by *Ampelomyces quisqualis*. *Phytopathology*, 99, 704–710.
- Aragón, G., Abuja, L., Belinchón, R., & Martínez, I. (2015). Edge type determines the intensity of forest edge effect on epiphytic communities. *European Journal of Forest Research*, 134, 443–451.
- Arfi, Y., Buée, M., Marchand, C., Levasseur, A., & Record, E. (2012). Multiple markers pyrosequencing reveals highly diverse and host-specific fungal communities on the mangrove trees *Avicennia marina* and *Rhizophora stylosa*. *FEMS Microbiology Ecology*, 79, 433–444.
- Aristote, I. S. (1891). De quelques effets de sympathie. In *Les problèmes d'Aristote (Traduction par Barthélémy Saint-Hilaire)*. Ici-eBooks volume Tome Premier Section VII. (Hachette ed.).
- Aylor, D. E. (1999). Biophysical scaling and the passive dispersal of fungus spores: relationship to integrated pest management strategies. *Agricultural and Forest Meteorology*, 97, 275–292.

- Bailey, B. N., Stoll, R., Pardyjak, E. R., & Mahaffee, W. F. (2014). Effect of vegetative canopy architecture on vertical transport of massless particles. *Atmospheric Environment*, *95*, 480–489.
- Baker, S. C., Spies, T. A., Wardlaw, T. J., Balmer, J., Franklin, J. F., & Jordan, G. J. (2013). The harvested side of edges: Effect of retained forests on the re-establishment of biodiversity in adjacent harvested areas. *Forest Ecology and Management*, *302*, 107–121.
- Baker, T. P., Jordan, G. J., & Baker, S. C. (2016). Microclimatic edge effects in a recently harvested forest: Do remnant forest patches create the same impact as large forest areas? *Forest Ecology and Management*, *365*, 128–136.
- Bálint, M., Bartha, L., O'Hara, R. B., Olson, M. S., Otte, J., Pfenninger, M., Robertson, A. L., Tiffin, P., & Schmitt, I. (2015). Relocation, high-latitude warming and host genetic identity shape the foliar fungal microbiome of poplars. *Molecular Ecology*, *24*, 235–248.
- Bálint, M., Tiffin, P., Hallström, B., O'Hara, R. B., Olson, M. S., Fankhauser, J. D., Piepenbring, M., & Schmitt, I. (2013). Host Genotype Shapes the Foliar Fungal Microbiome of Balsam Poplar (*Populus balsamifera*). *PLOS ONE*, *8*, e53987.
- Balint-Kurti, P., Simmons, S. J., Blum, J. E., Ballaré, C. L., & Stapleton, A. E. (2010). Maize Leaf Epiphytic Bacteria Diversity Patterns Are Genetically Correlated with Resistance to Fungal Pathogen Infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *23*, 473–484.
- Bar-Massada, A., & Wood, E. M. (2014). The richness–heterogeneity relationship differs between heterogeneity measures within and among habitats. *Ecography*, *37*, 528–535.
- Barberán, A., Henley, J., Fierer, N., & Casamayor, E. O. (2014). Structure, inter-annual recurrence, and global-scale connectivity of airborne microbial communities. *Science of The Total Environment*, *487*, 187–195.
- Barberán, A., Ladau, J., Leff, J. W., Pollard, K. S., Menninger, H. L., Dunn, R. R., & Fierer, N. (2015). Continental-scale distributions of dust-associated bacteria and fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*, 5756–5761.
- Barret, M., Briand, M., Bonneau, S., Préveaux, A., Valière, S., Bouchez, O., Hunault, G., Simoneau, P., & Jacques, M.-A. (2015). Emergence Shapes the Structure of the Seed Microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*, 1257–1266.
- Barton, L. L., & Northup, D. E. (2011). Microbial Ecology: Beginnings and the Road Forward. In *Microbial Ecology* (pp. 1–28). John Wiley & Sons, Inc.
- Bastian, O. (2001). Landscape Ecology – towards a unified discipline? *Landscape Ecology*, *16*, 757–766.
- Beckstead, J., Meyer, S. E., Connolly, B. M., Huck, M. B., & Street, L. E. (2010). Cheatgrass facilitates spillover of a seed bank pathogen onto native grass species. *Journal of Ecology*, *98*, 168–177.

- Berg, G. (2009). Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84, 11–18.
- Bertelsen, J. R., De Neergaard, E., & Smedegaard-Petersen, V. (2001). Fungicidal effects of azoxystrobin and epoxiconazole on phyllosphere fungi, senescence and yield of winter wheat. *Plant Pathology*, 50, 190–205.
- Bianchi, F. J. J. A., Booij, C. J. H., & Tscharntke, T. (2006). Sustainable pest regulation in agricultural landscapes: a review on landscape composition, biodiversity and natural pest control. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273, 1715–1727.
- Biere, A., & Bennett, A. E. (2013). Three-way interactions between plants, microbes and insects. *Functional Ecology*, 27, 567–573.
- Blitzer, E. J., Dormann, C. F., Holzschuh, A., Klein, A.-M., Rand, T. A., & Tscharntke, T. (2012). Spillover of functionally important organisms between managed and natural habitats. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 146, 34–43.
- Bodenhausen, N., Bortfeld-Miller, M., Ackermann, M., & Vorholt, J. A. (2014). A Synthetic Community Approach Reveals Plant Genotypes Affecting the Phyllosphere Microbiota. *PLOS Genet*, 10, e1004283.
- Boers, S. A., Jansen, R., & Hays, J. P. (2016). Suddenly everyone is a microbiota specialist. *Clinical Microbiology and Infection*, 22, 581–582.
- Bonfante, P., & Anca, I.-A. (2009). Plants, Mycorrhizal Fungi, and Bacteria: A Network of Interactions. *Annual Review of Microbiology*, 63, 363–383.
- Bowers, R. M., Clements, N., Emerson, J. B., Wiedinmyer, C., Hannigan, M. P., & Fierer, N. (2013). Seasonal Variability in Bacterial and Fungal Diversity of the Near-Surface Atmosphere. *Environmental Science & Technology*, 47, 12097–12106.
- Bowers, R. M., McLetchie, S., Knight, R., & Fierer, N. (2011). Spatial variability in airborne bacterial communities across land-use types and their relationship to the bacterial communities of potential source environments. *The ISME Journal*, 5, 601–612.
- Brown, J. K. M., & Hovmøller, M. S. (2002). Aerial Dispersal of Pathogens on the Global and Continental Scales and Its Impact on Plant Disease. *Science*, 297, 537–541.
- Brown, J. W. (2015). *Principles of Microbial Diversity*. ASM Press.
- Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., van Themaat, E. V. L., & Schulze-Lefert, P. (2013). Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. In S. S. Merchant (Ed.), *Annual Review of Plant Biology*, Vol 64 (pp. 807–838). Palo Alto: Annual Reviews volume 64. WOS:000321699500032.
- Burel, F., & Baudry, J. (1999). *Ecologie du paysage: concepts, méthodes et applications*. Éd. Tec & doc.

- Burrows, S. M., Butler, T., Jöckel, P., Tost, H., Kerkweg, A., Pöschl, U., & Lawrence, M. G. (2009). Bacteria in the global atmosphere—Part 2: Modeling of emissions and transport between different ecosystems. *Atmospheric Chemistry and Physics*, *9*, 9281–9297.
- Cadenasso, M. L., Pickett, S. T. A., Weathers, K. C., Bell, S. S., Benning, T. L., Carreiro, M. M., & Dawson, T. E. (2003). An Interdisciplinary and Synthetic Approach to Ecological Boundaries. *BioScience*, *53*, 717–722.
- Caumette, P., Bertrand, J.-C., & Normand, P. (2011). Quelques éléments historiques de l'écologie microbienne. In *Écologie microbienne: microbiologie des milieux naturels et anthropisés* (pp. 9–26). Presses universitaires de Pau et des Pays de l'Adour.
- Celette, F., & Gary, C. (2013). Dynamics of water and nitrogen stress along the grapevine cycle as affected by cover cropping. *European Journal of Agronomy*, *45*, 142–152.
- Chacoff, N. P., & Aizen, M. A. (2006). Edge effects on flower-visiting insects in grapefruit plantations bordering premontane subtropical forest. *Journal of Applied Ecology*, *43*, 18–27.
- Chamecki, M., Meneveau, C., & Parlange, M. B. (2009). Large eddy simulation of pollen transport in the atmospheric boundary layer. *Journal of Aerosol Science*, *40*, 241–255.
- Chaplin-Kramer, R., O'Rourke, M. E., Blitzer, E. J., & Kremen, C. (2011). A meta-analysis of crop pest and natural enemy response to landscape complexity. *Ecology Letters*, *14*, 922–932.
- Chelle, M. (2005). Phylloclimate or the climate perceived by individual plant organs: What is it? How to model it? What for? *New Phytologist*, *166*, 781–790.
- Chen, J., Franklin, J. F., & Spies, T. A. (1993). Contrasting microclimates among clearcut, edge, and interior of old-growth Douglas-fir forest. *Agricultural and Forest Meteorology*, *63*, 219–237.
- Chi, Z., Wang, F., Chi, Z., Yue, L., Liu, G., & Zhang, T. (2009). Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *82*, 793–804.
- Christian, N., Whitaker, B. K., & Clay, K. (2015). Microbiomes: unifying animal and plant systems through the lens of community ecology theory. *Microbial Symbioses*, (p. 869).
- Coince, A., Cordier, T., Lengellé, J., Defosse, E., Vacher, C., Robin, C., Buée, M., & Marçais, B. (2014). Leaf and root-associated fungal assemblages do not follow similar elevational diversity patterns. *PloS one*, *9*, e100668.
- Constantinidou, H. A. (1990). Atmospheric Dispersal of Ice Nucleation-Active Bacteria: The Role of Rain. *Phytopathology*, *80*, 934.

- Cordero-Bueso, G., Arroyo, T., & Valero, E. (2014). A long term field study of the effect of fungicides penconazole and sulfur on yeasts in the vineyard. *International Journal of Food Microbiology*, 189, 189–194.
- Cordier, T., Robin, C., Capdevielle, X., Desprez-Loustau, M.-L., & Vacher, C. (2012a). Spatial variability of phyllosphere fungal assemblages: genetic distance predominates over geographic distance in a European beech stand (*Fagus sylvatica*). *Fungal Ecology*, 5, 509–520.
- Cordier, T., Robin, C., Capdevielle, X., Fabreguettes, O., Desprez-Loustau, M.-L., & Vacher, C. (2012b). The composition of phyllosphere fungal assemblages of European beech (*Fagus sylvatica*) varies significantly along an elevation gradient. *New Phytologist*, 196, 510–519.
- Dallimer, M., Marini, L., Skinner, A. M. J., Hanley, N., Armsworth, P. R., & Gaston, K. J. (2010). Agricultural land-use in the surrounding landscape affects moorland bird diversity. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 139, 578–583.
- Darrasse, A., Darsonval, A., Boureau, T., Brisset, M.-N., Durand, K., & Jacques, M.-A. (2010). Transmission of Plant-Pathogenic Bacteria by Nonhost Seeds without Induction of an Associated Defense Reaction at Emergence. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 6787–6796.
- Darsonval, A., Darrasse, A., Meyer, D., Demarty, M., Durand, K., Bureau, C., Manceau, C., & Jacques, M.-A. (2008). The Type III Secretion System of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* Is Involved in the Phyllosphere Colonization Process and in Transmission to Seeds of Susceptible Beans. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 2669–2678.
- Dees, M. W., Lysøe, E., Nordskog, B., & Brurberg, M. B. (2015). Bacterial Communities Associated with Surfaces of Leafy Greens: Shift in Composition and Decrease in Richness over Time. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 1530–1539.
- Després, V. R., Huffman, J. A., Burrows, S. M., Hoose, C., Safatov, A. S., Buryak, G., Fröhlich-Nowoisky, J., Elbert, W., Andreae, M. O., Pöschl, U., & Jaenicke, R. (2012). Primary biological aerosol particles in the atmosphere: a review. *Tellus B*, 64.
- Devictor, V., & Jiguet, F. (2007). Community richness and stability in agricultural landscapes: The importance of surrounding habitats. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 120, 179–184.
- Dickie, I. A., & Reich, P. B. (2005). Ectomycorrhizal fungal communities at forest edges. *Journal of Ecology*, 93, 244–255.
- Dimakopoulou, M., Tjamos, S. E., Antoniou, P. P., Pietri, A., Battilani, P., Avramidis, N., Markakis, E. A., & Tjamos, E. C. (2008). Phyllosphere grapevine yeast *Aureobasidium pullulans* reduces *Aspergillus carbonarius* (sour rot) incidence in wine-producing vineyards in Greece. *Biological Control*, 46, 158–165.
- Doan, H. K., & Leveau, J. H. J. (2015). Artificial Surfaces in Phyllosphere Microbiology. *Phytopathology*, 105, 1036–1042.

- Douglas, A. E., & Werren, J. H. (2016). Holes in the Hologenome: Why Host-Microbe Symbioses Are Not Holobionts. *mBio*, 7, e02099–15.
- Dressaire, E., Yamada, L., Song, B., & Roper, M. (2016). Mushrooms use convectively created airflows to disperse their spores. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113, 2833–2838.
- Eldegard, K., Totland, Ø., & Moe, S. R. (2015). Edge effects on plant communities along power line clearings. *Journal of Applied Ecology*, 52, 871–880.
- Erős, T., & Campbell Grant, E. H. (2015). Unifying research on the fragmentation of terrestrial and aquatic habitats: patches, connectivity and the matrix in riverscapes. *Freshwater Biology*, 60, 1487–1501.
- Fahrig, L. (2003). Effects of Habitat Fragmentation on Biodiversity. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 34, 487–515.
- Fahrig, L., Baudry, J., Brotons, L., Burel, F. G., Crist, T. O., Fuller, R. J., Sirami, C., Siriwardena, G. M., & Martin, J.-L. (2011). Functional landscape heterogeneity and animal biodiversity in agricultural landscapes. *Ecology Letters*, 14, 101–112.
- Faust, K., & Raes, J. (2012). Microbial interactions: from networks to models. *Nature Reviews Microbiology*, 10, 538–550.
- Fenchel, T., & Finlay, B. J. (2004). The Ubiquity of Small Species: Patterns of Local and Global Diversity. *BioScience*, 54, 777–784.
- Ferro, I., & Morrone, J. J. (2014). Biogeographical transition zones: a search for conceptual synthesis. *Biological Journal of the Linnean Society*, 113, 1–12.
- Fiala, V., Glad, C., Martin, M., Jolivet, E., & Derridj, S. (1990). Occurrence of soluble carbohydrates on the phylloplane of maize (*Zea mays* L.): variations in relation to leaf heterogeneity and position on the plant. *New Phytologist*, 115, 609–615.
- Fierer, N., & Lennon, J. T. (2011). The generation and maintenance of diversity in microbial communities. *American Journal of Botany*, 98, 439–448.
- Finkel, O. M., Burch, A. Y., Elad, T., Huse, S. M., Lindow, S. E., Post, A. F., & Belkin, S. (2012). Distance-decay relationships partially determine diversity patterns of phyllosphere bacteria on Tamrix trees across the sonoran desert. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 6187–6193.
- Finlay, B. J. (2002). Global Dispersal of Free-Living Microbial Eukaryote Species. *Science*, 296, 1061–1063.
- Fontúrbel, F. E., Candia, A. B., Malebrán, J., Salazar, D. A., González-Browne, C., & Medel, R. (2015). Meta-analysis of anthropogenic habitat disturbance effects on animal-mediated seed dispersal. *Global Change Biology*, 21, 3951–3960.
- Forman, R. T. T., & Godron, M. (1981). Patches and Structural Components for A Landscape Ecology. *BioScience*, 31, 733–740.

- Fournier, E., Gladieux, P., & Giraud, T. (2013). The ‘Dr Jekyll and Mr Hyde fungus’: noble rot versus gray mold symptoms of *Botrytis cinerea* on grapes. *Evolutionary Applications*, 6, 960–969.
- Galante, T. E., Horton, T. R., & Swaney, D. P. (2011). 95% of basidiospores fall within 1 m of the cap: a field-and modeling-based study. *Mycologia*, 103, 1175–1183.
- Galès, A., Latrille, E., Wéry, N., Steyer, J.-P., & Godon, J.-J. (2014). Needles of *Pinus halepensis* as Biomonitors of Bioaerosol Emissions. *PLoS ONE*, 9, e112182.
- Galperin, M., Graf, S., & Kenigsbuch, D. (2003). Seed treatment prevents vertical transmission of *Fusarium moniliforme*, making a significant contribution to disease control. *Phytoparasitica*, 31, 344–352.
- Garijo, P., López, R., Santamaría, P., Ocón, E., Olarte, C., Sanz, S., & Gutiérrez, A. R. (2011). Presence of enological microorganisms in the grapes and the air of a vineyard during the ripening period. *European Food Research and Technology*, 233, 359–365.
- Geiger, F., de Snoo, G. R., Berendse, F., Guerrero, I., Morales, M. B., Oñate, J. J., Eggers, S., Pärt, T., Bommarco, R., Bengtsson, J., Clement, L. W., Weisser, W. W., Olszewski, A., Ceryngier, P., Hawro, V., Inchausti, P., Fischer, C., Flohre, A., Thies, C., & Tscharrntke, T. (2010). Landscape composition influences farm management effects on farmland birds in winter: A pan-European approach. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 139, 571–577.
- Gilbert, J. A., & Neufeld, J. D. (2014). Life in a World without Microbes. *PLoS Biology*, 12.
- Gu, L., Bai, Z., Jin, B., Hu, Q., Wang, H., Zhuang, G., & Zhang, H. (2010). Assessing the impact of fungicide enostroburin application on bacterial community in wheat phyllosphere. *Journal of Environmental Sciences*, 22, 134–141.
- Guerry, A. D., & Hunter, M. L. (2002). Amphibian Distributions in a Landscape of Forests and Agriculture: an Examination of Landscape Composition and Configuration. *Conservation Biology*, 16, 745–754.
- Haddad, N. M., Brudvig, L. A., Clobert, J., Davies, K. F., Gonzalez, A., Holt, R. D., Lovejoy, T. E., Sexton, J. O., Austin, M. P., Collins, C. D., Cook, W. M., Damschen, E. I., Ewers, R. M., Foster, B. L., Jenkins, C. N., King, A. J., Laurance, W. F., Levey, D. J., Margules, C. R., Melbourne, B. A., Nicholls, A. O., Orrock, J. L., Song, D.-X., & Townshend, J. R. (2015). Habitat fragmentation and its lasting impact on Earth’s ecosystems. *Science Advances*, 1, e1500052.
- Hadley, A. S., & Betts, M. G. (2012). The effects of landscape fragmentation on pollination dynamics: absence of evidence not evidence of absence. *Biological Reviews*, 87, 526–544.
- Hanson, C. A., Fuhrman, J. A., Horner-Devine, M. C., & Martiny, J. B. (2012). Beyond biogeographic patterns: processes shaping the microbial landscape. *Nature Reviews Microbiology*, 10, 497–506.
- Hart, J. L. (2007). Biodiversity and edge effects: an activity in landscape ecology. *Journal of Natural Resources & Life Sciences Education*, 36, 103–106.

- Hodgson, S., de Cates, C., Hodgson, J., Morley, N. J., Sutton, B. C., & Gange, A. C. (2014). Vertical transmission of fungal endophytes is widespread in forbs. *Ecology and Evolution*, 4, 1199–1208.
- Holzschuh, A., Steffan-Dewenter, I., & Tschardt, T. (2008). Agricultural landscapes with organic crops support higher pollinator diversity. *Oikos*, 117, 354–361.
- Horton, M. W., Bodenhausen, N., Beilsmith, K., Meng, D., Muegge, B. D., Subramanian, S., Vetter, M. M., Vilhjálmsson, B. J., Nordborg, M., Gordon, J. I., & Bergelson, J. (2014). Genome-wide association study of *Arabidopsis thaliana* leaf microbial community. *Nature Communications*, 5, 5320.
- Hufkens, K., Scheunders, P., & Ceulemans, R. (2009). Ecotones in vegetation ecology: methodologies and definitions revisited. *Ecological Research*, 24, 977–986.
- Humphrey, P. T., Nguyen, T. T., Villalobos, M. M., & Whiteman, N. K. (2014). Diversity and abundance of phyllosphere bacteria are linked to insect herbivory. *Molecular Ecology*, 23, 1497–1515.
- Hunter, P. J., Hand, P., Pink, D., Whipps, J. M., & Bending, G. D. (2010). Both Leaf Properties and Microbe-Microbe Interactions Influence Within-Species Variation in Bacterial Population Diversity and Structure in the Lettuce (*Lactuca* Species) Phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 8117–8125.
- Hunter, P. J., Pink, D. A. C., & Bending, G. D. (2015). Cultivar-level genotype differences influence diversity and composition of lettuce (*Lactuca* sp.) phyllosphere fungal communities. *Fungal Ecology*, 17, 183–186.
- Iguchi, H., Yurimoto, H., & Sakai, Y. (2015). Interactions of Methylophilic Bacteria with Plants and Other Heterotrophic Bacteria. *Microorganisms*, 3, 137–151.
- Inclán, D. J., Cerretti, P., & Marini, L. (2015). Landscape composition affects parasitoid spillover. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 208, 48–54.
- Isard, S. A., Gage, S. H., Comtois, P., & Russo, J. M. (2005). Principles of the Atmospheric Pathway for Invasive Species Applied to Soybean Rust. *BioScience*, 55, 851–861.
- Jackson, C. R., & Denney, W. C. (2011). Annual and Seasonal Variation in the Phyllosphere Bacterial Community Associated with Leaves of the Southern Magnolia (*Magnolia grandiflora*). *Microbial Ecology*, 61, 113–122.
- Jacobs, J. L., Carroll, T. L., & Sundin, G. W. (2005). The Role of Pigmentation, Ultraviolet Radiation Tolerance, and Leaf Colonization Strategies in the Epiphytic Survival of Phyllosphere Bacteria. *Microbial Ecology*, 49, 104–113.
- Jacobs, L., & Houlahan, J. E. (2011). Adjacent land-use affects amphibian community composition and species richness in managed forests in New Brunswick, Canada. *Canadian Journal of Forest Research*, 41, 1687–1697.
- Jakuschkin, B., Fievet, V., Schwaller, L., Fort, T., Robin, C., & Vacher, C. (2016). Deciphering the Pathobiome: Intra- and Interkingdom Interactions Involving the Pathogen *Erysiphe alphitoides*. *Microbial Ecology*, (pp. 1–11).

- Jensen, B., Knudsen, I. M. B., Andersen, B., Nielsen, K. F., Thrane, U., Jensen, D. F., & Larsen, J. (2013). Characterization of microbial communities and fungal metabolites on field grown strawberries from organic and conventional production. *International Journal of Food Microbiology*, *160*, 313–322.
- Jumpponen, A., & Jones, K. L. (2009). Massively parallel 454 sequencing indicates hyperdiverse fungal communities in temperate *Quercus macrocarpa* phyllosphere. *New Phytologist*, *184*, 438–448.
- Junker, R. R., & Tholl, D. (2013). Volatile Organic Compound Mediated Interactions at the Plant-Microbe Interface. *Journal of Chemical Ecology*, *39*, 810–825.
- Kadivar, H., & Stapleton, A. E. (2003). Ultraviolet Radiation Alters Maize Phyllosphere Bacterial Diversity. *Microbial Ecology*, *45*, 353–361.
- Karlsson, I., Friberg, H., Steinberg, C., & Persson, P. (2014). Fungicide effects on fungal community composition in the wheat phyllosphere. *PLoS ONE*, *9*, e111786.
- Kembel, S. W., & Mueller, R. C. (2014). Plant traits and taxonomy drive host associations in tropical phyllosphere fungal communities. *Botany*, *92*, 303–311.
- Kembel, S. W., O'Connor, T. K., Arnold, H. K., Hubbell, S. P., Wright, S. J., & Green, J. L. (2014). Relationships between phyllosphere bacterial communities and plant functional traits in a neotropical forest. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*, 13715–13720.
- Kim, M., Singh, D., Lai-Hoe, A., Go, R., Rahim, R. A., A.N., A., Chun, J., & Adams, J. M. (2012). Distinctive Phyllosphere Bacterial Communities in Tropical Trees. *Microbial Ecology*, *63*, 674–681.
- Kindlmann, P., & Burel, F. (2008). Connectivity measures: a review. *Landscape Ecology*, *23*, 879–890.
- Kiss, L. (2003). A review of fungal antagonists of powdery mildews and their potential as biocontrol agents. *Pest Management Science*, *59*, 475–483.
- Kivlin, S. N., Winston, G. C., Goulden, M. L., & Treseder, K. K. (2014). Environmental filtering affects soil fungal community composition more than dispersal limitation at regional scales. *Fungal Ecology*, *12*, 14–25.
- Knief, C., Delmotte, N., Chaffron, S., Stark, M., Innerebner, G., Wassmann, R., von Mering, C., & Vorholt, J. A. (2012). Metaproteogenomic analysis of microbial communities in the phyllosphere and rhizosphere of rice. *The ISME Journal*, *6*, 1378–1390.
- Kniskern, J. M., Traw, M. B., & Bergelson, J. (2007). Salicylic acid and jasmonic acid signaling defense pathways reduce natural bacterial diversity on *Arabidopsis thaliana*. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI*, *20*, 1512–1522.
- Knoll, D., & Schreiber, L. (2000). Plant-microbe interactions: wetting of ivy (*Hedera helix* L.) leaf surfaces in relation to colonization by epiphytic microorganisms. *Microbial ecology*, *40*, 33–42.

- Koch, K., Bhushan, B., & Barthlott, W. (2009). Multifunctional surface structures of plants: An inspiration for biomimetics. *Progress in Materials Science*, 54, 137–178.
- Laforest-Lapointe, I., Messier, C., & Kembel, S. W. (2016). Host species identity, site and time drive temperate tree phyllosphere bacterial community structure. *Microbiome*, 4, 27.
- Lambais, M. R., Crowley, D. E., Cury, J. C., Büll, R. C., & Rodrigues, R. R. (2006). Bacterial Diversity in Tree Canopies of the Atlantic Forest. *Science*, 312, 1917–1917.
- Lambais, M. R., Lucheta, A. R., & Crowley, D. E. (2014). Bacterial community assemblages associated with the phyllosphere, dermosphere, and rhizosphere of tree species of the atlantic forest are host taxon dependent. *Microbial Ecology*, (pp. 1–8).
- Landis, D. A., Wratten, S. D., & Gurr, G. M. (2000). Habitat Management to Conserve Natural Enemies of Arthropod Pests in Agriculture. *Annual Review of Entomology*, 45, 175–201.
- Last, F. T. (1955). Seasonal incidence of *Sporobolomyces* on cereal leaves. *Transactions of the British Mycological Society*, 38, 221–239.
- Laurance, W. F., Didham, R. K., & Power, M. E. (2001). Ecological boundaries: a search for synthesis. *Trends in Ecology & Evolution*, 16, 70–71.
- Lawton, J. H. (1999). Are There General Laws in Ecology? *Oikos*, 84, 177–192.
- Leff, J. W., Del Tredici, P., Friedman, W. E., & Fierer, N. (2015). Spatial structuring of bacterial communities within individual *Ginkgo biloba* trees. *Environmental Microbiology*, 17, 2352–2361.
- Lennon, J. T., & Jones, S. E. (2011). Microbial seed banks: the ecological and evolutionary implications of dormancy. *Nature Reviews Microbiology*, 9, 119–130.
- Liivamägi, A., Kuusemets, V., Kaart, T., Luig, J., & Diaz-Forero, I. (2014). Influence of habitat and landscape on butterfly diversity of semi-natural meadows within forest-dominated landscapes. *Journal of Insect Conservation*, 18, 1137–1145.
- Lima-Mendez, G., Faust, K., Henry, N., Decelle, J., Colin, S., Carcillo, F., Chaffron, S., Ignacio-Espinosa, J. C., Roux, S., Vincent, F., Bittner, L., Darzi, Y., Wang, J., Audic, S., Berline, L., Bontempi, G., Cabello, A. M., Coppola, L., Cornejo-Castillo, F. M., d’Ovidio, F., Meester, L. D., Ferrera, I., Garet-Delmas, M.-J., Guidi, L., Lara, E., Pesant, S., Royo-Llonch, M., Salazar, G., Sánchez, P., Sebastian, M., Souffreau, C., Dimier, C., Picheral, M., Searson, S., Kandels-Lewis, S., Coordinators, T. O., Gorsky, G., Not, F., Ogata, H., Speich, S., Stemmann, L., Weissenbach, J., Wincker, P., Acinas, S. G., Sunagawa, S., Bork, P., Sullivan, M. B., Karsenti, E., Bowler, C., Vargas, C. d., & Raes, J. (2015). Determinants of community structure in the global plankton interactome. *Science*, 348, 1262073.
- Lindow, S. E., & Andersen, G. L. (1996). Influence of immigration on epiphytic bacterial populations on navel orange leaves. *Applied and environmental microbiology*, 62, 2978–2987.

- Lindow, S. E., & Brandl, M. T. (2003). Microbiology of the phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 1875–1883.
- Lindow, S. E., & Leveau, J. H. (2002). Phyllosphere microbiology. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 238–243.
- Locey, K. J., & Lennon, J. T. (2016). Scaling laws predict global microbial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113, 5970–5975.
- Lopez-Velasco, G., Carder, P. A., Welbaum, G. E., & Ponder, M. A. (2013). Diversity of the spinach (*Spinacia oleracea*) spermosphere and phyllosphere bacterial communities. *FEMS Microbiology Letters*, 346, 146–154.
- Lymperopoulou, D. S., Adams, R. I., & Lindow, S. E. (2016). Contribution of Vegetation to the Microbial Composition of Nearby Outdoor Air. *Applied and Environmental Microbiology*, 82, 3822–3833.
- MacArthur, R. H., & Wilson, E. O. (1967). *The Theory of Island Biogeography*. Princeton University Press.
- Magrath, A., Laurance, W. F., Larrinaga, A. R., & Santamaria, L. (2014). Meta-Analysis of the Effects of Forest Fragmentation on Interspecific Interactions. *Conservation Biology*, 28, 1342–1348.
- Maignien, L., DeForce, E. A., Chafee, M. E., Eren, A. M., & Simmons, S. L. (2014). Ecological succession and stochastic variation in the assembly of arabidopsis thaliana phyllosphere communities. *mBio*, 5, e00682–13.
- Marchesi, J. R., & Ravel, J. (2015). The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*, 3, 1–3.
- Margulis, L. (1991). Symbiogenesis and Symbioticism. In *Symbiosis as a source of evolutionary innovation* (pp. 1–14). Boston: Massachusetts Institute of Technology: L. Margulis, & R. Fester (Eds.).
- Martins, G. (2012). *Communautés microbiennes de la baie de raisin : incidence des facteurs biotiques et abiotiques*. Ph.D. thesis Université Bordeaux 2 Bordeaux.
- Martiny, J. B. H., Bohannan, B. J., Brown, J. H., Colwell, R. K., Fuhrman, J. A., Green, J. L., Horner-Devine, M. C., Kane, M., Krumins, J. A., Kuske, C. R., Morin, P. J., Naeem, S., Øvreås, L., Reysenbach, A.-L., Smith, V. H., & Staley, J. T. (2006). Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nature Reviews Microbiology*, 4, 102–112.
- McGarvey, J., Han, R., Connell, J., Stanker, L., & Hnasko, R. (2015). Bacterial populations on the surfaces of organic and conventionally grown almond drupes. *Journal of Applied Microbiology*, 119, 529–538.
- Mercier, J., & Lindow, S. E. (2000). Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 369–374.
- Millberg, H., Boberg, J., & Stenlid, J. (2015). Changes in fungal community of Scots pine (*Pinus sylvestris*) needles along a latitudinal gradient in Sweden. *Fungal Ecology*, 17, 126–139.

- Miller, N. E., Stoll, R., Mahaffee, W. F., Neill, T. M., & Pardyjak, E. R. (2015). An experimental study of momentum and heavy particle transport in a trellised agricultural canopy. *Agricultural and Forest Meteorology*, 211–212, 100–114.
- Monier, J.-M., & Lindow, S. E. (2003). Differential survival of solitary and aggregated bacterial cells promotes aggregate formation on leaf surfaces. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 15977–15982.
- Monier, J.-M., & Lindow, S. E. (2004). Frequency, Size, and Localization of Bacterial Aggregates on Bean Leaf Surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 346–355.
- Moran, M. A. (2015). The global ocean microbiome. *Science*, 350, aac8455.
- Moran, N. A., & Sloan, D. B. (2015). The Hologenome Concept: Helpful or Hollow? *PLOS Biology*, 13, e1002311.
- Mordecai, E. A., Adler, A. E. F. R., & Bronstein, E. J. L. (2013). Consequences of Pathogen Spillover for Cheatgrass-Invaded Grasslands: Coexistence, Competitive Exclusion, or Priority Effects. *The American Naturalist*, 181, 737–747.
- Morris, C. E., & Kinkel, L. L. (2002). Fifty years of phyllosphere microbiology: significant contributions to research in related fields. *Phyllosphere Microbiology*, (pp. 365–375).
- Morris, C. E., Leyronas, C., & Nicot, P. C. (2014). Movement of Bioaerosols in the Atmosphere and the Consequences for Climate and Microbial Evolution. In I. Colbeck, & M. Lazaridis (Eds.), *Aerosol Science: Technology and applications* (pp. 393–415). John Wiley & Sons, Ltd.
- Morris, C. E., Sands, D. C., Vinatzer, B. A., Glaux, C., Guilbaud, C., Buffière, A., Yan, S., Dominguez, H., & Thompson, B. M. (2008). The life history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* is linked to the water cycle. *The ISME Journal*, 2, 321–334.
- Moulas, C., Petsoulas, C., Rousidou, K., Perruchon, C., Karas, P., & Karpouzas, D. G. (2013). Effects of systemic pesticides imidacloprid and metalaxyl on the phyllosphere of pepper plants. *BioMed Research International*, 2013, 1–8.
- Müller, T., & Ruppel, S. (2014). Progress in cultivation-independent phyllosphere microbiology. *FEMS Microbiology Ecology*, 87, 2–17.
- Murcia, C. (1995). Edge effects in fragmented forests: implications for conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 10, 58–62.
- Musetti, R., Polizzotto, R., Vecchione, A., Borselli, S., Zulini, L., D’Ambrosio, M., Toppi, L. S. d., & Pertot, I. (2007). Antifungal activity of diketopiperazines extracted from *Alternaria alternata* against *Plasmopara viticola*: An ultrastructural study. *Micron*, 38, 643–650.
- Nemergut, D. R., Schmidt, S. K., Fukami, T., O’Neill, S. P., Bilinski, T. M., Stanish, L. F., Knelman, J. E., Darcy, J. L., Lynch, R. C., Wickey, P., & Ferrenberg, S. (2013). Patterns and processes of microbial community assembly. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77, 342–356.

- Newton, A., Gravouil, C., & Fountaine, J. (2010a). Managing the ecology of foliar pathogens: ecological tolerance in crops. *Annals of Applied Biology*, 157, 343–359.
- Newton, A. C., Fitt, B. D. L., Atkins, S. D., Walters, D. R., & Daniell, T. J. (2010b). Pathogenesis, parasitism and mutualism in the trophic space of microbe–plant interactions. *Trends in Microbiology*, 18, 365–373.
- Norros, V., Rannik, Ü., Hussein, T., Petäjä, T., Vesala, T., & Ovaskainen, O. (2014). Do small spores disperse further than large spores? *Ecology*, 95, 1612–1621.
- Ohara, R. G., & Ushimaru, A. (2015). Plant beta-diversity is enhanced around grassland–forest edges within a traditional agricultural landscape. *Applied Vegetation Science*, 18, 493–502.
- Oliver, E. J., Thrall, P. H., Burdon, J. J., & Ash, J. E. (2001). Vertical disease transmission in the Cakile-Alternaria host-pathogen interaction. *Australian Journal of Botany*, 49, 561–569.
- O'Malley, M. A. (2013). Philosophy and the microbe: a balancing act. *Biology & Philosophy*, 28, 153–159.
- Ortega, M., & Pascual, S. (2014). Spatio-temporal analysis of the relationship between landscape structure and the olive fruit fly *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae). *Agricultural and Forest Entomology*, 16, 14–23.
- Osono, T. (2014). Diversity and Ecology of Endophytic and Epiphytic Fungi of Tree Leaves in Japan: A Review. In V. C. Verma, & A. C. Gange (Eds.), *Advances in Endophytic Research* (pp. 3–26). Springer India.
- Ottesen, A. R., Gorham, S., Pettengill, J. B., Rideout, S., Evans, P., & Brown, E. (2015). The impact of systemic and copper pesticide applications on the phyllosphere microflora of tomatoes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95, 1116–1125.
- Pace, N. R. (1997). A Molecular View of Microbial Diversity and the Biosphere. *Science*, 276, 734–740.
- Papke, R. T., & Gogarten, J. P. (2012). How Bacterial Lineages Emerge. *Science*, 336, 45–46.
- Pascazio, S., Crecchio, C., Ricciuti, P., Palese, A. M., Xiloyannis, C., & Sofo, A. (2015). Phyllosphere and carposphere bacterial communities in olive plants subjected to different cultural practices. *International Journal of Plant Biology*, 6, 15–19.
- Patyka, V., Buletsa, N., Pasichnyk, L., Zhitkevich, N., Kalinichenko, A., Gnatiuk, T., & Butsenko, L. (2016). Specifics of Pesticides Effects on the Phytopathogenic Bacteria. *Ecological Chemistry and Engineering S-Chemia I Inzynieria Ekologiczna S*, 23, 311–331. WOS:000379645000010.
- Pellissier, L., Oppliger, A., Hirzel, A. H., Savova-Bianchi, D., Mbayo, G., Mascher, F., Kellenberger, S., & Niculita-Hirzel, H. (2016). Airborne and Grain Dust Fungal Community Compositions Are Shaped Regionally by Plant Genotypes and Farming Practices. *Applied and environmental microbiology*, 82, 2121–2131.

- Peñuelas, J., Rico, L., Ogaya, R., Jump, A. S., & Terradas, J. (2012). Summer season and long-term drought increase the richness of bacteria and fungi in the foliar phyllosphere of *Quercus ilex* in a mixed Mediterranean forest: Phyllosphere richness under drought. *Plant Biology*, *14*, 565–575.
- Perazzolli, M., Antonielli, L., Storari, M., Puopolo, G., Pancher, M., Giovannini, O., Pindo, M., & Pertot, I. (2014). Resilience of the natural phyllosphere microbiota of the grapevine to chemical and biological pesticides. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*, 3585–3596.
- Pinto, C., & Gomes, A. C. (2016). Vitis vinifera microbiome: from basic research to technological development. *BioControl*, .
- Power, A. G., & Mitchell, C. E. (2004). Pathogen spillover in disease epidemics. *The American Naturalist*, *164*, S79–S89.
- Power, E. F., Jackson, Z., & Stout, J. C. (2016). Organic farming and landscape factors affect abundance and richness of hoverflies (Diptera, Syrphidae) in grasslands. *Insect Conservation and Diversity*, *9*, 244–253.
- Purtauf, T., Dauber, J., & Wolters, V. (2004). The response of carabids to landscape simplification differs between trophic groups. *Oecologia*, *142*, 458–464.
- Purtauf, T., Roschewitz, I., Dauber, J., Thies, C., Tscharntke, T., & Wolters, V. (2005). Landscape context of organic and conventional farms: Influences on carabid beetle diversity. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, *108*, 165–174.
- Radulovic, N., Blagojevic, P., Stojanovic-Radic, Z., & Stojanovic, N. (2013). Antimicrobial Plant Metabolites: Structural Diversity and Mechanism of Action. *Current Medicinal Chemistry*, *20*, 932–952.
- Ravichandra, N. G. (2013). *Fundamentals of Plant Pathology*. PHI Learning Pvt. Ltd.
- Redford, A. J., Bowers, R. M., Knight, R., Linhart, Y., & Fierer, N. (2010). The ecology of the phyllosphere: geographic and phylogenetic variability in the distribution of bacteria on tree leaves: Biogeography of phyllosphere bacterial communities. *Environmental Microbiology*, *12*, 2885–2893.
- Reisberg, E. E., Hildebrandt, U., Riederer, M., & Hentschel, U. (2011). Phyllosphere bacterial communities of trichome-bearing and trichomeless *Arabidopsis thaliana* leaves. *Antonie van Leeuwenhoek*, *101*, 551–560.
- Reisberg, E. E., Hildebrandt, U., Riederer, M., & Hentschel, U. (2013). Distinct Phyllosphere Bacterial Communities on *Arabidopsis* Wax Mutant Leaves. *PLoS ONE*, *8*, e78613.
- Remus-Emsermann, M. N. P., Tecon, R., Kowalchuk, G. A., & Leveau, J. H. J. (2012). Variation in local carrying capacity and the individual fate of bacterial colonizers in the phyllosphere. *The ISME Journal*, *6*, 756–765.
- Ricklefs, R. E., & Miller, G. L. (2005). *Écologie*. De Boeck Supérieur.

- Ries, L., Fletcher, R. J., Battin, J., & Sisk, T. D. (2004). Ecological Responses to Habitat Edges: Mechanisms, Models, and Variability Explained. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 35, 491–522.
- Ritchie, L. E., Betts, M. G., Forbes, G., & Vernes, K. (2009). Effects of landscape composition and configuration on northern flying squirrels in a forest mosaic. *Forest Ecology and Management*, 257, 1920–1929.
- Rodriguez, R. J., White Jr, J. F., Arnold, A. E., & Redman, R. S. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, 182, 314–330.
- Rosenberg, E., & Zilber-Rosenberg, I. (2014). *The Hologenome Concept: Human, Animal and Plant Microbiota*. Springer Science & Business Media.
- Rossi, V., & Caffi, T. (2012). The role of rain in dispersal of the primary inoculum of *Plasmopara viticola*. *Phytopathology*, 102, 158–165.
- Ruinen, J. (1956). Occurrence of *Beijerinckia* species in the ‘phyllosphere’. *Nature*, 177, 220–221.
- Ruinen, J. (1961). The phyllosphere. *Plant and Soil*, 15, 81–109.
- Rusch, A., Delbac, L., Muneret, L., & Thiéry, D. (2015). Organic farming and host density affect parasitism rates of tortricid moths in vineyards. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 214, 46–53.
- Rusch, A., Valantin-Morison, M., Sarthou, J.-P., & Roger-Estrade, J. (2010). Biological control of insect pests in agroecosystems: effects of crop management, farming systems, and seminatural habitats at the landscape scale: a review. In D. L. Sparks (Ed.), *Advances in Agronomy* (pp. 219–259). volume 109.
- Sapkota, R., Knorr, K., Jørgensen, L. N., O’Hanlon, K. A., & Nicolaisen, M. (2015). Host genotype is an important determinant of the cereal phyllosphere mycobiome. *New Phytologist*, 207, 1134–1144.
- Schmale, D. G. I., Leslie, J. F., Zeller, K. A., Saleh, A. A., Shields, E. J., & Bergstrom, G. C. (2006). Genetic Structure of Atmospheric Populations of *Gibberella zeae*. *Phytopathology*, 96, 1021–1026.
- Schmale, D. G. I., & Ross, S. D. (2015). Highways in the Sky: Scales of Atmospheric Transport of Plant Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 53, 591–611.
- Schmidt, M. H., Roschewitz, I., Thies, C., & Tschardt, T. (2005). Differential effects of landscape and management on diversity and density of ground-dwelling farmland spiders. *Journal of Applied Ecology*, 42, 281–287.
- Schreiber, L., Krimm, U., Knoll, D., Sayed, M., Auling, G., & Kroppenstedt, R. M. (2005). Plant–microbe interactions: identification of epiphytic bacteria and their ability to alter leaf surface permeability. *New Phytologist*, 166, 589–594.
- Segata, N., Boernigen, D., Tickle, T. L., Morgan, X. C., Garrett, W. S., & Huttenhower, C. (2013). Computational meta’omics for microbial community studies. *Molecular Systems Biology*, 9, 1–15.

- Shreiner, A. B., Kao, J. Y., & Young, V. B. (2015). The gut microbiome in health and in disease. *Current opinion in gastroenterology*, 31, 69–75.
- Simon, C., & Daniel, R. (2009). Achievements and new knowledge unraveled by meta-genomic approaches. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85, 265–276.
- Smith, T. W., & Lundholm, J. T. (2012). Environmental geometry and heterogeneity–diversity relationships in spatially explicit simulated communities. *Journal of Vegetation Science*, 23, 732–744.
- Soanes, D., & Richards, T. A. (2014). Horizontal Gene Transfer in Eukaryotic Plant Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 52, 583–614.
- Sowley, E. N. K., Dewey, F. M., & Shaw, M. W. (2010). Persistent, symptomless, systemic, and seed-borne infection of lettuce by *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 126, 61–71.
- Stahmann, K.-P., Arst, H. N., Althöfer, H., Revuelta, J. L., Monschau, N., Schlüpen, C., Gätgens, C., Wiesenburg, A., & Schlösser, T. (2001). Riboflavin, overproduced during sporulation of *Ashbya gossypii*, protects its hyaline spores against ultraviolet light. *Environmental Microbiology*, 3, 545–550.
- Stamps, J. A., Buechner, M., & Krishnan, V. V. (1987). The Effects of Edge Permeability and Habitat Geometry on Emigration from Patches of Habitat. *The American Naturalist*, 129, 533–552.
- Stein, A., Gerstner, K., & Kreft, H. (2014). Environmental heterogeneity as a universal driver of species richness across taxa, biomes and spatial scales. *Ecology Letters*, 17, 866–880.
- Stein, A., & Kreft, H. (2015). Terminology and quantification of environmental heterogeneity in species-richness research. *Biological Reviews*, 90, 815–836.
- Suda, W., Nagasaki, A., & Shishido, M. (2009). Powdery mildew-infection changes bacterial community composition in the phyllosphere. *Microbes and Environments*, 24, 217–223.
- Thomson, L. J., & Hoffmann, A. A. (2009). Vegetation increases the abundance of natural enemies in vineyards. *Biological Control*, 49, 259–269.
- Tscharntke, T., Klein, A. M., Kruess, A., Steffan-Dewenter, I., & Thies, C. (2005). Landscape perspectives on agricultural intensification and biodiversity – ecosystem service management. *Ecology Letters*, 8, 857–874.
- Tukey, H. B. J. (1970). The leaching of substances from plants. *Annual review of plant physiology*, 21, 305–324.
- Turner, M. G., Gardner, R. H., & O'Neill, R. V. (2001). *Landscape Ecology in Theory and Practice: Pattern and Process*. Springer.
- Turner, T. R., James, E. K., & Poole, P. S. (2013). The plant microbiome. *Genome Biol*, 14, 209.

- Ueda, Y., Frindte, K., Knief, C., Ashrafuzzaman, M., & Frei, M. (2016). Effects of Elevated Tropospheric Ozone Concentration on the Bacterial Community in the Phyllosphere and Rhizoplane of Rice. *PLOS ONE*, 11, e0163178.
- Undugoda, L. J. S., Kannangara, S., & Sirisena, D. M. (2016). Aromatic Hydrocarbon Degrading Fungi Inhabiting the Phyllosphere of Ornamental Plants on Roadsides of Urban Areas in Sri Lanka. *J Bioremed Biodeg*, 7.
- Unterseher, M., Jumpponen, A., Öpik, M., Tedersoo, L., Moora, M., Dormann, C. F., & Schnittler, M. (2011). Species abundance distributions and richness estimations in fungal metagenomics – lessons learned from community ecology. *Molecular Ecology*, 20, 275–285.
- Vacher, C., Hampe, A., Porté, A. J., Sauer, U., Compant, S., & Morris, C. E. (2016). The Phyllosphere: Microbial Jungle at the Plant–Climate Interface. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 47.
- Varanda, C. M. R., Oliveira, M., Materatski, P., Landum, M., Clara, M. I. E., & Félix, M. R. (2016). Fungal endophytic communities associated to the phyllosphere of grapevine cultivars under different types of management. *Fungal Biology*, *In press*.
- Vellend, M. (2010). Conceptual synthesis in community ecology. *The Quarterly review of biology*, 85, 183–206.
- Verma, V. C., & Gange, A. C. (2013). *Advances in Endophytic Research*. (Springer ed.).
- Vogel, C., Bodenhausen, N., Gruissem, W., & Vorholt, J. A. (2016). The Arabidopsis leaf transcriptome reveals distinct but also overlapping responses to colonization by phyllosphere commensals and pathogen infection with impact on plant health. *New Phytologist*, 212, 192–207.
- Vorholt, J. A. (2012). Microbial life in the phyllosphere. *Nature Reviews Microbiology*, 10, 828–840.
- van der Wal, A., & Leveau, J. H. (2011). Modelling sugar diffusion across plant leaf cuticles: the effect of free water on substrate availability to phyllosphere bacteria. *Environmental microbiology*, 13, 792–797.
- Walter, M., Frampton, C. M., Boyd-Wilson, K. S. H., Harris-Virgin, P., & Waipara, N. W. (2007). Agrichemical impact on growth and survival of non-target apple phyllosphere microorganisms. *Canadian Journal of Microbiology*, 53, 45–55.
- Watson, J. E. M., Whittaker, R. J., & Dawson, T. P. (2004). Habitat structure and proximity to forest edge affect the abundance and distribution of forest-dependent birds in tropical coastal forests of southeastern Madagascar. *Biological Conservation*, 120, 311–327.
- Whipps, J., Hand, P., Pink, D., & Bending, G. (2008). Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. *Journal of Applied Microbiology*, 105, 1744–1755.

- Wiens, J. A. (2007). *Foundation Papers in Landscape Ecology*. Columbia University Press.
- Wilkinson, D. M., Koumoutsaris, S., Mitchell, E. A. D., & Bey, I. (2012). Modelling the effect of size on the aerial dispersal of microorganisms. *Journal of Biogeography*, *39*, 89–97.
- Wilson, H. E., Carroll, G. C., Roy, B. A., & Blaisdell, G. K. (2014). Tall fescue is a potential spillover reservoir host for *Alternaria* species. *Mycologia*, *106*, 22–31.
- Womack, A. M., Bohannon, B. J. M., & Green, J. L. (2010). Biodiversity and biogeography of the atmosphere. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, *365*, 3645–3653.
- Wright, T. E., Kasel, S., Tausz, M., & Bennett, L. T. (2010). Edge microclimate of temperate woodlands as affected by adjoining land use. *Agricultural and Forest Meteorology*, *150*, 1138–1146.
- Wu, J., & Hobbs, R. J. (2007). *Key Topics in Landscape Ecology*. Cambridge University Press.
- Wyatt, T. T., Wösten, H. A., & Dijksterhuis, J. (2013). Fungal Spores for Dispersion in Space and Time. In *Advances in Applied Microbiology* (pp. 43–91). Elsevier volume 85.
- Yutthammo, C., Thongthammachai, N., Pinphanichakarn, P., & Luepromchai, E. (2010). Diversity and Activity of PAH-Degrading Bacteria in the Phyllosphere of Ornamental Plants. *Microbial Ecology*, *59*, 357–368.
- Zambell, C. B., & White, J. F. (2014). In the forest vine *Smilax rotundifolia*, fungal epiphytes show site-wide spatial correlation, while endophytes show evidence of niche partitioning. *Fungal Diversity*, *75*, 279–297.
- Zilber-Rosenberg, I., & Rosenberg, E. (2008). Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiology Reviews*, *32*, 723–735.

Chapitre 2

Caractérisation des communautés fongiques

Sommaire

2.1	Méthodes de caractérisation des communautés microbiennes	57
2.1.1	Méthodes culture-dépendantes ou métabarcoding	57
2.1.2	Techniques de séquençage haut débit	59
2.1.3	Choix de la région barcode	59
2.1.4	Choix du couple d'amorces	61
2.2	Méthodes d'échantillonnage	63
2.2.1	Conditions de stérilité	63
2.2.2	Prélèvement des feuilles	63
2.2.3	Capture des bioaérosols	63
2.3	Méthode d'extraction	65
2.4	Méthode de traitement bioinformatique des séquences . .	66
2.4.1	Pré-traitement	66
2.4.2	Extraction de l'ITS	66
2.4.3	Clustering en OTUs	66
2.4.4	Détection des chimères	68
2.4.5	Création de la table d'OTUs	68
2.4.6	Assignation taxonomique	68
2.5	Traitement statistique	69
2.6	Avantages et limites de la méthode de caractérisation des communautés	70
2.7	Références	71

Contrairement aux communautés végétales ou animales, caractériser avec précision des communautés de micro-organismes est un défi car ceux-ci ne sont pas visibles à l'œil nu. Le choix de la méthode d'identification des communautés est crucial et peut conditionner les résultats obtenus. Ce choix a donc constitué la base de cette thèse. Nous avons choisi d'appliquer une méthode relativement récente, le métabarcoding, afin de caractériser les communautés fongiques sur leur base génétique. L'utilisation de cette méthode implique de prendre de nombreuses précautions au niveau de l'échantillonnage et de l'extraction. Les séquences obtenues après séquençage ne sont pas directement exploitables, et nécessitent une phase de traitement bioinformatique, ainsi qu'un pré-traitement statistique avant de pouvoir être analysées. Les choix que nous avons faits sont détaillés et justifiés dans ce chapitre. La synthèse de ce protocole est schématisée en figure 2.1.

2.1 Méthodes de caractérisation des communautés microbiennes

2.1.1 Méthodes culture-dépendantes ou métabarcoding

Les méthodes culture-dépendantes sont depuis longtemps utilisées pour caractériser les communautés microbiennes. L'isolement, la culture, et le séquençage des organismes présents à la surface et à l'intérieur des feuilles permet, *in fine*, de connaître très précisément l'espèce à laquelle il appartient (Müller & Ruppel, 2014). Cependant, ces méthodes sont chronophages, et manquent de précision : près de 99% des espèces microbiennes ne sont pas cultivables en milieu nutritif, et ne peuvent être détectées par ces méthodes (Müller & Ruppel, 2014).

Nous avons donc choisi de nous orienter vers une méthode culture-indépendante, appelée métabarcoding, en plein essor depuis les années 1980 (Lindahl et al., 2013; Pace et al., 1986; Schmidt et al., 1991). A partir d'un échantillon environnemental (ex. une feuille ou un bioaérosol) est extrait l'ADN total (ADN environnemental, eDNA) (Taberlet et al., 2012)). Par PCR (Polymerase Chain Reaction), un "barcode" est ensuite amplifié, c'est à dire un court fragment d'ADN spécifique à l'ensemble du groupe d'espèces ciblées, mais variable entre les espèces. Par exemple, le gène de la sous-unité 1 de la cytochrome oxydase (COI) est présent chez tous les animaux, mais diffère entre chaque espèce car il présente un taux de mutations élevé (Hebert et al., 2003). L'ADN amplifié est ensuite séquençé, par des méthodes de séquençage haut débit. Les séquences obtenues sont partitionnées en Unités Taxonomiques Opérationnelles (OTUs), souvent assimilées à des "espèces moléculaires" (Lindahl et al., 2013). Chaque OTU est enfin comparée à une base de données afin d'obtenir une assignation taxonomique. Cette méthode, plus onéreuse que les méthodes culture-dépendantes, permet de caractériser plus précisément les communautés microbiennes, et d'identifier une richesse plus importante.

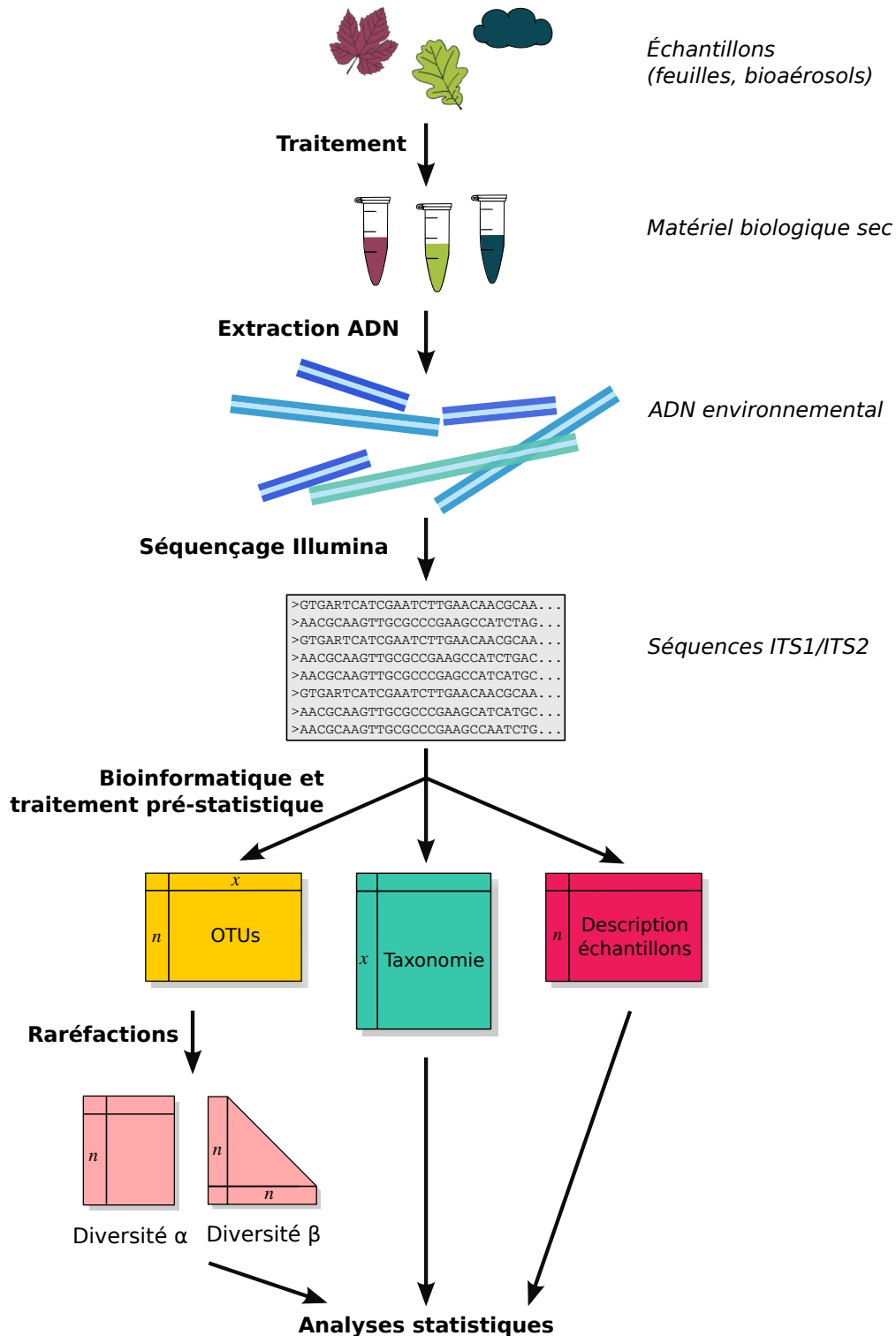


Figure 2.1 – Schéma synthétique de la méthodologie employée pour caractériser les communautés fongiques foliaires. n indique le nombre d'échantillons, et x le nombre total d'OTUs.

2.1.2 Techniques de séquençage haut débit

Depuis une dizaine d'années, l'amélioration des techniques de séquençage haut débit combinée à la baisse de leur coût a permis de généraliser l'utilisation du métabarcoding en écologie, tout en augmentant la qualité des séquences obtenues. Les méthodes les plus communes sont le pyroséquençage (Roche 454), le séquençage par synthèse (Illumina), le séquençage par ligation (SOLiD) et le séquençage par Ion semiconducteur (Ion Torrent) (Goodwin et al., 2016; Heather & Chain, 2016). Nous avons choisi d'utiliser la méthode de séquençage par synthèse Illumina car c'était, au moment de la première expérimentation, la méthode qui permettait d'obtenir la plus grande quantité et la meilleure qualité de séquences, mais aussi la moins coûteuse par échantillon (Edgar, 2013; Liu et al., 2012). C'est l'entreprise LGC Genomics qui a réalisé le séquençage (<http://www.lgcgroup.com/>), en utilisant la plateforme Illumina MiSeq.

Le séquençage Illumina est un séquençage par synthèse (Heather & Chain, 2016). Après extraction de l'eDNA (**Fig. 2.2.a**) et une première amplification par PCR du barcode en utilisant les amorces choisies (**Fig. 2.2.b**), des étiquettes sont ajoutées à chaque séquence (**Fig. 2.2.c₁**). Ces étiquettes (souvent elles aussi appelées barcodes par erreur, ou tags) sont des courtes séquences de nucléotides connues, synthétisées artificiellement, de sorte qu'elles diffèrent entre les échantillons. Tous les échantillons étant par la suite poolés pour être séquencés ensemble, ces étiquettes permettent de connaître l'échantillon auquel appartient chaque séquence. Des adaptateurs Illumina, courtes séquences de nucléotides spécifiques à la méthode, sont ensuite ajoutés aux séquences. On procède alors à une seconde amplification, par Bridge PCR (**Fig. 2.2.c₂**) : les adaptateurs se fixent aléatoirement à la surface d'une cellule support ; l'extrémité non-fixée se courbe pour s'hybrider sur un autre adaptateur seul, sur la cellule ; des nucléotides et des enzymes sont ajoutés afin de procéder à l'élongation ; une fois l'élongation terminée, les molécules double brins synthétisées sont dénaturées. Ce procédé se répète, jusqu'à former des millions de séquences, localement agglomérées en petits groupes de séquences complémentaires. La phase de séquençage *stricto sensu* a alors lieu, par ajout de nucléotides associés à un fluorochrome spécifique de chaque base et un terminateur (**Fig. 2.2.c₃**). A chaque étape, un seul nucléotide s'hybride à chaque séquence (à cause du terminateur), le fluorochrome est excité, l'émission lumineuse est enregistrée, puis le terminateur et le fluorochrome sont clivés. L'opération se reproduit alors avec un second nucléotide, et ainsi de suite jusqu'à l'élongation complète des séquences. Pour chaque groupe de séquences complémentaires, la lecture de la succession d'émission lumineuse permet d'obtenir le code génétique de la séquence.

2.1.3 Choix de la région barcode

Le barcode idéal se définit grâce aux critères suivants : (1) compatibilité à l'ensemble du groupe taxonomique choisi ; (2) variabilité génétique suffisante au sein de la région ciblée pour permettre une bonne différenciation des espèces ; (3) base de données associée suffisamment fournie pour permettre une assignation taxonomique la plus fiable possible.

En phylogénie fongique, de nombreux locus sont utilisés (**Fig. 2.3**), correspondant à des régions de l'ADN ribosomique nucléaire (18S, 28S, ITS, IGS), mitochondrial (mtSSU, mtLSU), de gènes codants pour des protéines comme l'ARN polymérase

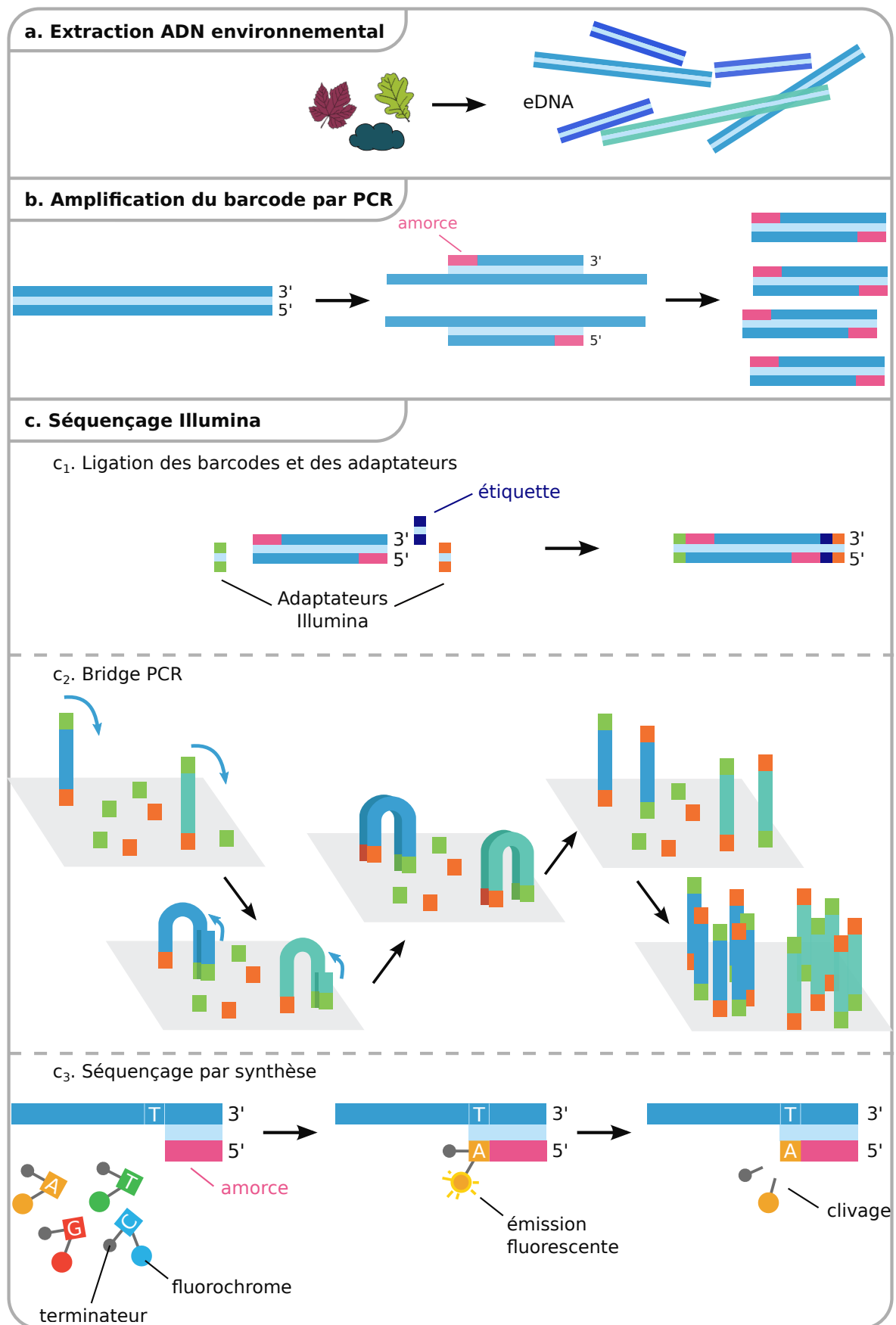


Figure 2.2 – Fonctionnement du séquençage haut débit avec la technique Illumina. Adapté depuis www.abmgood.com.

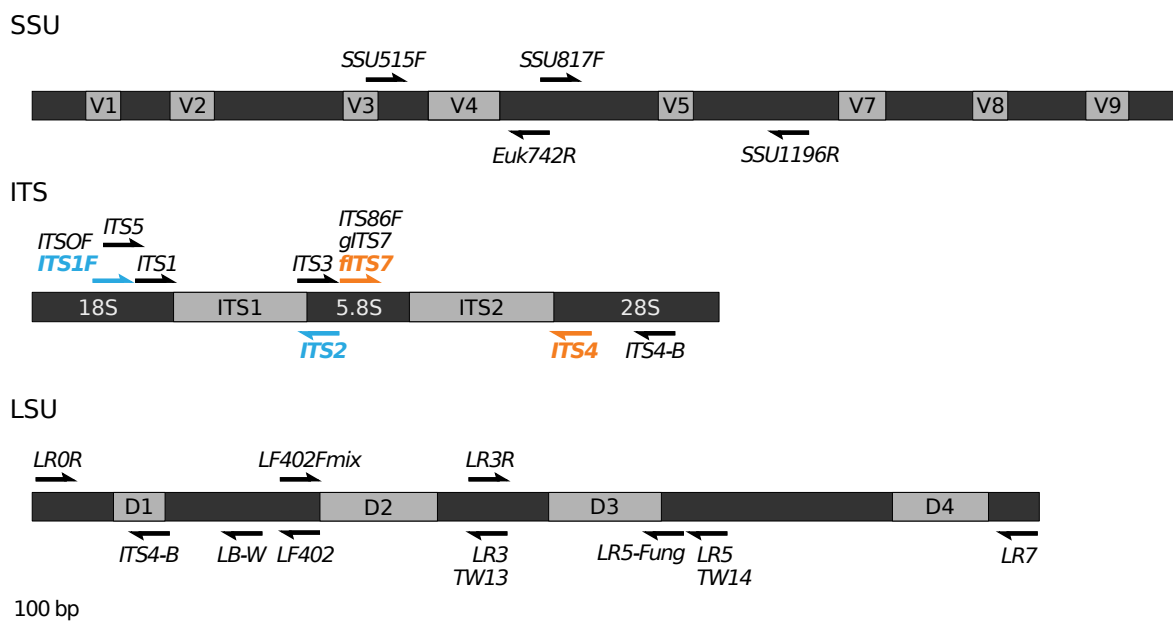


Figure 2.3 – Amorces utilisées classiquement dans le séquençage haut débit des champignons, ciblant les barcodes de l'ADN ribosomique nucléaire. En haut la petite sous-unité du ribosome (SSU), au centre les deux parties de l'ITS, en bas la grande sous-unité du ribosome (LSU). Extrait de (Tedersoo et al., 2015a). Les couples d'amorces représentés en couleur sont ceux utilisés au cours de cette thèse.

(*RPB1*, *RPB2*), la β -tubuline, γ -actin, ATP synthase (*ATP6*), le facteur d'élongation EF-1 α (*TEF1 α*), ou enfin des gènes impliqués dans la biogénèse des ribosomes (*Tsr1*) ou dans la réplication de l'ADN (*Mcm7*) (Schmitt et al., 2009; Tedersoo et al., 2015a). L'ensemble de ces marqueurs sont présents chez tous les champignons, mais leur variabilité inter-spécifique diffère, et les bases de données de référence ne sont pas de taille équivalente.

Nous avons choisi d'utiliser l'ITS qui est l'un des barcodes les plus utilisés, et qui par conséquent, est très bien représenté dans les bases de données de séquences. De plus, l'ITS présente un meilleur pouvoir discriminant entre les espèces comparé aux SSU et LSU (Schoch et al., 2012; Tedersoo et al., 2015a). De nombreuses espèces sœurs restent cependant difficiles à discriminer par manque de variabilité inter-spécifique (Xu, 2016).

2.1.4 Choix du couple d'amorces

L'étude des communautés fongiques foliaires implique inévitablement la présence d'ADN végétal dans les échantillons. Comme l'ITS est un locus présent chez tous les Eucaryotes, l'amplification d'ADN végétal est possible mais doit être limitée afin d'obtenir un maximum de séquences fongiques. Le choix du couple d'amorces est donc crucial : il doit être compatible à l'ensemble des champignons, tout en ciblant spécifiquement les champignons.

Plusieurs études ont comparé les résultats obtenus avec différents jeux d'amorces sur les mêmes données (Bazzicalupo et al., 2013; Blaaid et al., 2013; Op De Beeck et al., 2014; Tedersoo et al., 2015a,b). Dans un premier temps, notre choix s'est porté sur le

Tableau 2.1 – Amorces utilisées en métabarcoding au cours de cette thèse.

Nom	Sens	Séquence (5' - 3')	Barcode	Référence
fITS7	Forward	GTGARTCATCGAATCTTG	ITS2	Ihrmark et al. (2012)
ITS4	Reverse	TCCTCCGCTTATTGATATGC	ITS2	White et al. (1990)
ITS1F	Forward	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	ITS1	Gardes & Bruns (1993)
ITS2	Reverse	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	ITS1	White et al. (1990)

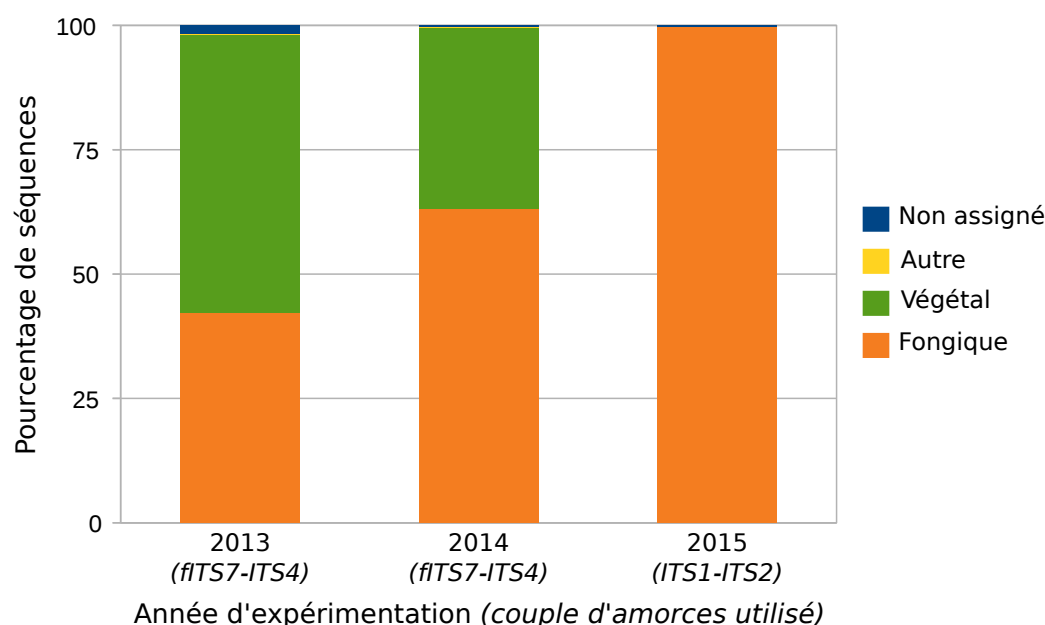


Figure 2.4 – Proportion de séquences fongiques et non fongiques des trois jeux de données récoltés au cours de cette thèse. L'assignation taxonomique s'est faite en utilisant l'algorithme en ligne BLAST, contre la base de données GenBank, en excluant les séquences environnementales. Les séquences fongiques correspondent à celles assignées au règne *Fungi*, les végétales à la division des *Tracheophyta*, et les autres celles étant assignées à des taxons différents de ceux-ci. Les séquences non assignées correspondent à celles auxquelles BLAST n'a trouvé aucune assignation.

couple d'amorces fITS7-ITS4, décrit par Ihrmark et al. (2012) (**Table 2.1**). Ce couple d'amorce est décrit comme spécifique des champignons (Ihrmark et al., 2012), et cible la seconde région de l'ITS (ITS2, **Fig. 2.3**), qui montre une meilleure résolution taxonomique que la première région de l'ITS (ITS1) (Tedersoo et al., 2015a). Cependant, les deux premières expérimentations de cette thèse ont révélé que ce couple d'amorces amplifiait aussi largement plusieurs espèces de plantes (**Fig. 2.4**), en particulier *Vitis vinifera*. Nous avons donc, pour la dernière expérimentation, utilisé le couple d'amorce décrit par Gardes & Bruns (1993). Bien que ciblant l'ITS1, et présentant une résolution taxonomique plus faible (Tedersoo et al., 2015a), ce couple d'amorce n'amplifie que très peu d'ADN végétal (**Fig. 2.4**).

2.2 Méthodes d'échantillonnage

2.2.1 Conditions de stérilité

La caractérisation des communautés fongiques par métabarcoding et séquençage haut débit implique de prendre de nombreuses précautions lors de l'échantillonnage. En effet, de l'ADN fongique contaminant peut provenir de notre peau, d'outils mal nettoyés ou du matériel de stockage (Galan et al., 2016; Nguyen et al., 2015). Il ne suffit pas de tuer les cellules car, même mortes, elles peuvent encore contenir de l'ADN qui est amplifié, même à faible concentration. Nous avons donc tenté d'être aussi méticuleux que possible au cours de l'échantillonnage afin d'éviter les contaminations.

Sur le terrain, le matériel de prélèvement était désinfecté à l'éthanol entre chaque échantillon. L'éthanol permet de tuer les micro-organismes, mais ne dégrade pas l'ADN (Greenstone et al., 2012). Néanmoins, une désinfection à l'éthanol entre chaque prélèvement évite d'inoculer des micro-organismes supplémentaires sur l'échantillon. Le matériel utilisé pour le stockage ou le traitement des échantillons en laboratoire était stérilisé à l'autoclave, à l'alcool et à la flamme ou aux UVs. Ces trois méthodes sont très efficaces en terme de décontamination de l'ADN, bien que des résidus peuvent persister (Ballantyne et al., 2015; Gefrides et al., 2010; Nielsen et al., 2005). Le matériel résistant à des températures et des pressions élevées a été autoclavé : papier filtre, tubes eppendorf, plaques d'extraction, solutions tampons. Le matériel en inox a été stérilisé sous la hotte à l'alcool et à la flamme : pinces, scalpels, emporte pièce. Le matériel restant a été passé aux UVs pendant 30 minutes. Le matériel neuf a été acheté stérile, lorsque c'était possible : pipettes pasteur, cônes de pipettes à filtres, tubes Falcon. Le traitement des échantillons a été réalisé dans un poste de sécurité microbiologique (PSM). Des témoins négatifs (blancs) ont été ajoutés avant l'extraction d'ADN, puis ont été séquencés afin de vérifier la présence de contaminations (Nguyen et al., 2015).

2.2.2 Prélèvement des feuilles

Les feuilles ont été coupées des sarments en utilisant une paire de ciseaux dont les lames étaient désinfectées à l'alcool entre chaque feuille. La feuille était directement insérée dans un sac d'échantillonnage stérile, en prenant soin de ne pas la toucher. Afin d'assurer la dessiccation rapide de la feuille et d'éviter que de l'humidité ne se forme dans le sac, ce dernier contenait du silicagel, au préalable stérilisé aux UVs pendant 30 min. Afin d'assurer une dessiccation plus efficace des feuilles de vigne, plus grandes et plus épaisses, celles-ci étaient insérées dans un feuillet de papier filtre, au préalable autoclavé et passé 30 min aux UVs.

2.2.3 Capture des bioaérosols

Nous avons employé deux méthodes différentes de capture des bioaérosols, donnant deux types d'informations différentes. La première méthode, employée lors de la première session d'expérimentation (chapitre 3), est une méthode de capture active (Morris et al., 2014; West & Kimber, 2015). Un capteur Coriolis® (Bertin Technologies) provoque un flux d'air (200 l/min) qui emprisonne les bioaérosols dans une solution de capture (vendue stérile) contenue dans une fiole (**Fig. 2.5.a**). Cette méthode à



Figure 2.5 – Pièges utilisés afin de capturer les bioaérosols. (a) Capteur Coriolis, piégeant activement les bioaérosols dans un liquide à l’aide d’un flux d’air. (b) Paire de pièges passifs, composés d’un papier filtre scotché au dos d’une boîte de Pétri accrochée à un piquet de vigne.

l’avantage de donner une information sur l’ensemble des organismes présents dans la couche basse de l’atmosphère. Cependant, la durée d’échantillonnage doit être courte car le liquide de capture s’évapore relativement rapidement. De plus, ces appareils étant destinés à un usage intérieur, la batterie qui les équipe ne permet pas de faire des prélèvements pendant de longues durées. Pour la première étude, trois captures successives de 10 min chacune ont été réalisées, à 1 m de hauteur. La fiole renfermant l’échantillon de bioaérosol a ensuite été fermée et conservée à -20°C .

La seconde méthode de capture, employée pour la seconde expérimentation (chapitre 4) est une méthode de capture passive (adaptée de Garbelotto et al. 2008 ; Morris et al. 2014; West & Kimber 2015). Un disque de papier filtre, au préalable autoclavé et passé 15 min par face aux UVs, est accroché par deux morceaux de ruban adhésif sur le dos d’une boîte de Pétri, accrochée par un fil de fer à un support (ex. tronc d’arbre ou piquet de vigne ; **Fig. 2.5.b**). Ce ne sont donc pas directement les bioaérosols qui sont prélevés avec cette méthode, mais ceux qui se déposent passivement à la surface du papier filtre. Contrairement à la méthode précédente, ce filtre peut-être laissé pendant plusieurs jours, voire plusieurs semaines avant d’être récolté. Dans notre expérimentation, deux pièges passifs avaient été placés côte à côte. Ces pièges passifs ont été récoltés en utilisant une pince désinfectée à l’alcool et à la flamme d’un briquet entre chaque paire de pièges. Les deux filtres étaient insérés dans un sac stérile, verso à verso, puis conservés à -20°C .

2.3 Méthode d'extraction

Les feuilles ont été découpées sous PSM : quatre disques de 7 mm de diamètre ont été réalisés à l'aide d'un emporte pièce, stérilisé à l'alcool et à la flamme entre deux échantillons. Les disques de feuilles, placés dans des tubes, ont ensuite été broyés. Les bioaérosols obtenus par capture active, contenus dans un liquide, ont été centrifugés, transférés dans des tubes stériles sous PSM, puis lyophilisés. Les filtres ayant permis la capture passive des bioaérosols ont été lavés dans leur sac à l'aide d'une solution tampon autoclavée (Tris-EDTA). Les particules en suspension ont ensuite été centrifugées et lyophilisées.

L'extraction d'ADN a été réalisée à l'aide du plant minikit DNeasy de QIAGEN. Ce kit, déjà utilisé auparavant dans de multiples études (Coince et al., 2014; Cordier et al., 2012a,b; Dees et al., 2015; Jakuschkin et al., 2016) permet d'obtenir un ADN extrait de bonne qualité, malgré la faible quantité de matériel présente dans les bioaérosols. Lors de la première expérimentation, la plupart des étapes ont été réalisées sous PSM, mais certaines nécessitaient, pour des raisons sanitaires, d'être réalisées sous hotte chimique (Sorbonne). A l'issu du séquençage, les témoins négatifs contenaient alors de nombreuses séquences (**Fig. 2.6**). Nous avons supposé que ces contaminations étaient dues à la manipulation sous hotte chimique, celle-ci créant un flux vertical ascendant, pouvant augmenter le risque de contaminations croisées entre les différents échantillons. Pour les deux expérimentations suivantes, nous avons adapté le protocole afin de réaliser l'ensemble des étapes sous PSM, le flux d'air y étant vertical, descendant, et filtré. Le nombre de séquences contenues dans les témoins négatifs a alors été considérablement réduit (**Fig. 2.6**).

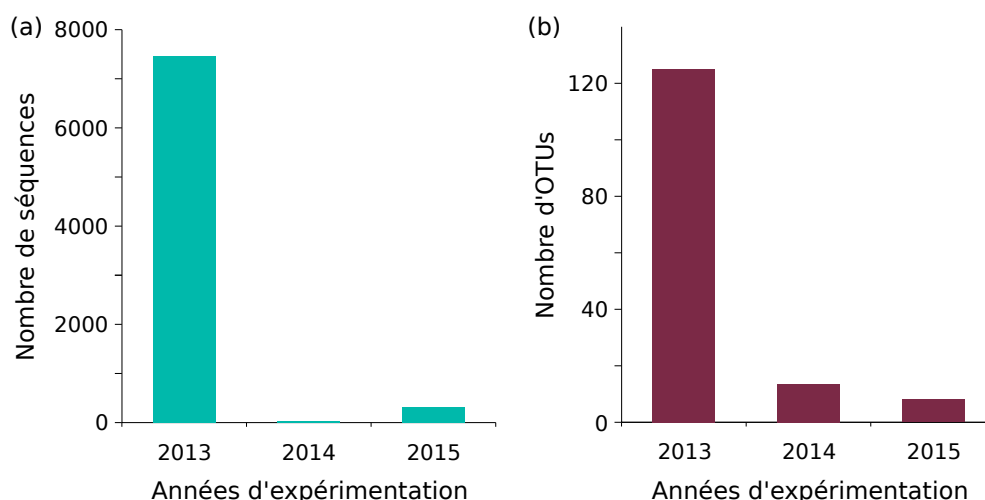


Figure 2.6 – Nombre moyen de séquences (a) et d'OTUs (b) contenus dans les témoins négatifs pour les trois expérimentations. Le nombre de témoins négatifs séquencés pour chaque expérimentation est respectivement de 4, 2 et 1 échantillons.

2.4 Méthode de traitement bioinformatique des séquences

Suite à l'extraction d'ADN, la première PCR (**Fig. 2.2.b**) et le séquençage (**Fig. 2.2.c**) ont été réalisés par LGC Genomics. A l'issue du séquençage Illumina, les séquences brutes obtenues ont nécessité un traitement bioinformatique afin d'obtenir la table d'OTUs finale. Cette analyse bioinformatique s'est faite en plusieurs étapes. Le pipeline bioinformatique complet se trouve en Annexe 1.

2.4.1 Pré-traitement

La première étape a consisté à nettoyer les séquences brutes. L'ensemble de ces étapes a été réalisé par l'entreprise de séquençage LGC Genomics.

- **Demultiplexing.** Les séquences ont d'abord été démultiplexées, c'est à dire qu'elles ont été regroupées par étiquette similaire, et donc par échantillon. Le logiciel Illumina bcl2fastq a été utilisé.
- **Filtrage des étiquettes.** Lorsque l'étiquette d'une séquence était manquante, qu'elle présentait plus d'un mismatch, qu'elle était présente dans un seul sens ou que la paire d'étiquette était en conflit, la séquence a été supprimée. Les étiquettes des séquences conservées ont été coupées.
- **Filtrage des adaptateurs.** Les adaptateurs TruSeq Illumina ont été coupés pour chaque séquence. Toute séquence de longueur inférieure à 100 nucléotides a été supprimée.
- **Filtrage des amorces.** Les séquences dont les amorces présentaient plus de trois mismatches avec l'amorce initiale ont été supprimées. Les amorces des séquences conservées ont été coupées.
- **Combinaison.** Les séquences ont été placées dans le sens forward-reverse, et les paires de séquences complémentaires ont été combinées à l'aide du logiciel BBMerge. Les séquences ne pouvant être combinées ont été supprimées.

2.4.2 Extraction de l'ITS

Dans un second temps le fragment correspondant à l'ITS a été extrait de chaque séquence. En effet, les amorces ciblent des zones conservées entre les espèces (18S, 5.8S ou 28S), situées en amont et en aval de l'ITS qui est lui, à l'inverse, une zone très variable. Supprimer ces fragments de séquence conservées permet d'éviter des biais lors des étapes suivantes, notamment au moment de clusteriser les séquences entre elles (Bálint et al., 2014; Nilsson et al., 2010). Ici, c'est le FungalITSExtractor qui a été utilisé (Nilsson et al., 2010).

2.4.3 Clustering en OTUs

Les séquences ont ensuite été assemblées en un seul fichier, en prenant soin d'ajouter à l'en-tête de chaque séquence le code de son échantillon d'appartenance. De manière à réduire le temps d'analyse, ce fichier a été dérépliqué, c'est à dire que les doublons ont été supprimés. L'abondance de chaque séquence (le nombre de doublons) a été ajouté

à chaque en-tête, permettant le tri des séquences dérépliquées par abondance décroissante. Enfin, les singletons - séquences uniques, sans doublons - ont été supprimés. En effet, le séquençage de communautés artificielles a montré que conserver les singletons augmentait considérablement le nombre total d'OTUs, sans améliorer la qualité du jeu de données final (Flynn et al., 2015).

Les séquences proches ont alors été regroupées en OTUs en utilisant un algorithme de clustering (partitionnement des séquences). De nombreux algorithmes de clustering existent, basés sur des taux de similarités entre séquences tels que ceux implémentés dans les logiciels QIIME (Caporaso et al., 2010), MOTHUR (Schloss et al., 2009) ou USEARCH (Edgar, 2013). Ici, j'ai choisi d'utiliser la méthode UPARSE implémentée dans USEARCH, se basant sur un taux de similarité de 97% entre les séquences (Edgar, 2013) (**Fig. 2.7**). Lorsqu'une séquence est similaire à plus de 97% d'une OTU déjà créée, elle est assignée à cette OTU (**Fig. 2.7.a**). Sinon, elle est ajoutée comme étant une nouvelle OTU (**Fig. 2.7.c**). Utiliser un seuil de similarité inférieur augmente le risque de regrouper dans une même OTU de nombreuses espèces distinctes, mais utiliser un seuil supérieur pose des problèmes de fonctionnement de l'algorithme, notamment lors de la détection de chimères (Edgar R., manuel de usearch). Cette méthode est, pour le moment, une des plus répandues dans la bibliographie (Bálint et al., 2014). D'autres méthodes émergent, basées sur des algorithmes de partitionnement plus complexes (Mahé et al., 2014). L'algorithme de partitionnement agglomératif SWARM a notamment été testé sur nos jeux de données : un nombre excessif d'OTUs avait été obtenu (supérieur à 10 000). Des calibrages supplémentaires sont nécessaires à cet algorithme pour qu'il soit pleinement fonctionnel.

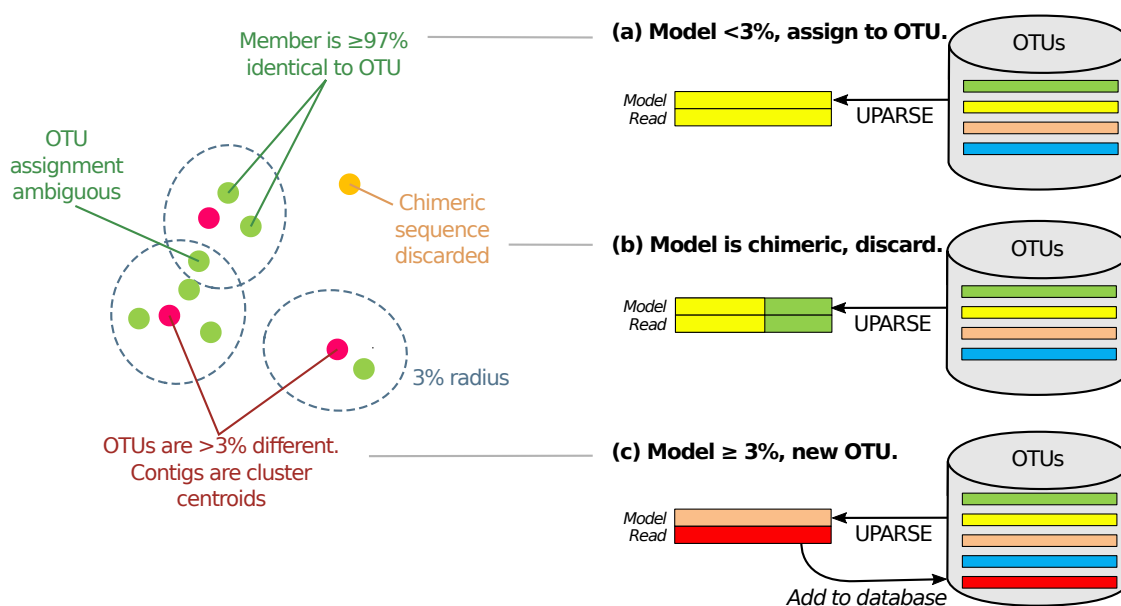


Figure 2.7 – Fonctionnement de l'algorithme UPARSE, permettant le clustering de séquences en OTUs. (a) Une séquence similaire à 97% au modèle est assignée à l'OTU. (b) Une séquence chimérique est écartée. (c) Une séquence similaire à moins de 97% aux modèles crée une nouvelle OTU. Extrait du manuel de usearch (<http://www.drive5.com/uparse/>).

2.4.4 Détection des chimères

Les chimères sont de petits fragments de séquences qui, au moment du séquençage, s'hybrident entre eux. Les séquences chimériques ainsi formées correspondent donc à un mélange génétique de différentes espèces. Un algorithme de détection de chimères *de novo* est intégré à l'algorithme de clustering UPARSE (Edgar, 2013). Il vérifie si des fragments de chaque séquence sont issus de parents distincts en les comparant à la base de données d'OTUs créée avec le jeu de données (**Fig. 2.7.b**). Cependant, certaines séquences chimériques peuvent ne pas être détectées par cet algorithme. Une détection de chimères a posteriori a alors été réalisée (Edgar et al., 2011), en confrontant cette fois les OTUs obtenues à une base de données fongique de référence, issue du projet UNITE (Abarenkov et al., 2010).

2.4.5 Création de la table d'OTUs

Une table d'OTUs a finalement été créée. Il s'agit d'une matrice qui, pour chaque échantillon, indique le nombre de séquences associées à chaque OTU. Cette table a été créée avec USEARCH.

2.4.6 Assignment taxonomique

La séquence consensus de chaque OTU (contig, créée en se basant sur le centroïde de chaque cluster ; **Fig. 2.7**) a ensuite été confrontée à une base de données afin de l'assigner à un taxon connu. La principale base de données fongique s'appelle UNITE (Abarenkov et al., 2010). Cependant, certaines des OTUs que nous avons obtenues étaient en réalité d'origine végétale, voire même animale (**Fig. 2.4**) : l'utilisation de UNITE les a néanmoins assignées à des champignons, biaisant très fortement les jeux de données. Nous nous sommes donc basés sur la base de données internationale de séquences nucléotidiques GenBank. Nous avons utilisé l'interface en ligne BLAST (Madden, 2013), en excluant les séquences de la base de données issues de données environnementales ou de metagénomes. L'algorithme a fourni, en réponse, plusieurs assignments taxonomiques probables pour chaque OTU, et les a classées en fonction des valeurs de e-value calculées. La e-value se base sur les pourcentages d'identité et de recouvrement entre la séquence de l'OTU et chaque assignment, permettant d'identifier la (ou les) assignment taxonomique la plus probable. Lorsqu'une OTU a été assignée à au moins deux taxa différents avec une e-value identique, l'un des deux a été choisi arbitrairement. Pour chaque expérimentation, une vérification supplémentaire de l'assignment taxonomique a été effectuée uniquement pour les OTUs majoritaires. Les assignments présentant une e-value identique étaient toujours phylogénétiquement proches : lorsqu'elles appartenaient au même genre, le nom d'espèce initialement choisi arbitrairement n'a pas été conservé. Enfin, la lignée taxonomique intégrale de chaque assignment a été récupérée à partir des informations fournies par NCBI.

Cette méthode d'assignment taxonomique présente l'avantage de fournir plusieurs assignments possibles pour une même séquence. Cependant, elle ne fournit qu'à posteriori une lignée taxonomique complète, assez longue et fastidieuse à récupérer. D'autres méthodes, telles que UCLUST implémentée dans USEARCH (Edgar, 2010) ou le RDP Classifier (Wang et al., 2007) attribuent une probabilité à chaque niveau taxonomique.

Cependant, ils ne fournissent qu’une seule assignation possible pour chaque séquence, empêchant ainsi de vérifier en détail la robustesse de l’assignation.

2.5 Traitement statistique

La table d’OTUs et la table taxonomique ainsi obtenues ont été filtrées puis analysées à l’aide de l’environnement R (R Development Core Team, 2006). Dans un premier temps, seules les OTUs fongiques ont été conservées. Toutes les OTUs assignées à des plantes ou à tout autre type d’organisme ont été enlevées du jeu de données afin de ne pas biaiser les résultats. Par exemple, la présence d’une OTU assignée à la vigne dans tous les échantillons foliaires viticoles augmente la similarité de ces échantillons, et augmente la dissimilarité avec les autres échantillons. Par précaution, l’ensemble des OTUs non assignées ont aussi été supprimées.

Dans un second temps, les OTUs contenues dans les contrôles négatifs ont été examinées (**Fig. 2.6**). Normalement, ces témoins devraient ne contenir que des séquences issues de contaminants, c’est à dire des séquences provenant de l’air du laboratoire, des personnes ayant effectué l’extraction, ou encore du matériel utilisé (tubes, plaques, réactifs du kit d’extraction, etc.). Dans ce cas, les OTUs présentes dans les témoins devraient être éliminées du jeu de données. Cependant, les séquences présentes dans les témoins peuvent aussi être issues de contaminations croisées, c’est à dire des autres échantillons (Galan et al., 2016; Nguyen et al., 2015). Nous avons essayé de limiter ces contaminations croisées en travaillant sous PSM, aussi proprement que possible. Cependant, elles surviennent surtout au moment du séquençage, et il est difficile de les évaluer (Galan et al., 2016; Nguyen et al., 2015). Dans ce cas, supprimer les OTUs présentes dans les témoins revient à supprimer des OTUs pouvant potentiellement jouer un rôle important dans la structuration de la communauté. Pour cette raison, il n’existe pas de consensus au sein du monde scientifique pour savoir comment prendre en compte ces séquences. Nous avons donc fait le choix de les conserver dans le jeu de données.

Après ces étapes de tri, les échantillons ne contenant qu’un faible nombre de séquences ont été supprimés. Pour chaque expérimentation, nous avons estimé, arbitrairement, un seuil de nombre de séquences en deçà duquel les échantillons étaient supprimés. Ce seuil a été déterminé en se basant sur le nombre de séquences contenues dans chaque témoin négatif, mais aussi de façon à conserver un nombre suffisant d’échantillons pour les analyses statistiques. Plusieurs valeurs de seuil ont été testées, afin de vérifier que la suppression d’échantillons supplémentaires ne modifiait pas fondamentalement les analyses statistiques.

Les trois étapes précédentes permettent d’obtenir la table d’OTUs définitive. A ce stade, le nombre de séquences total de chaque échantillon (abondance) varie fortement entre les échantillons. Cette différence peut provenir d’effets écologiques, mais peut aussi être issue de biais méthodologiques, introduits lors de l’extraction ou du séquençage (McMurdie & Holmes, 2014). Dans ce cas, il est indispensable soit de fixer au même nombre l’abondance de tous les échantillons en supprimant aléatoirement de l’information (raréfaction ; McMurdie & Holmes, 2014), soit de prendre en compte l’abondance dans les analyses statistiques (Bálint et al., 2015), ce qui peut avoir pour

conséquence une diminution de la puissance de ces analyses. Nous avons choisi d'utiliser la méthode de raréfaction, bien qu'elle soit soumise à débat dans la littérature (McMurdie & Holmes, 2014). Réduire aléatoirement le nombre de séquences de chaque échantillon engendre effectivement une perte d'informations considérable. Pour palier à ce problème, nous avons choisi de faire 100 rarefactions de la table d'OTUs, en utilisant un nombre de séquences seuil légèrement inférieur au nombre de séquences du plus petit échantillon. Pour chaque rarefaction, nous avons calculé les indices de diversité alpha et beta qui nous intéressaient, soit la richesse, la diversité de Shannon, l'équitabilité de Pielou pour la diversité alpha ; la dissimilarité de Bray-Curtis et celle de Jaccard pour la diversité beta. Pour chaque indice, les 100 valeurs obtenues ont été moyennées afin d'obtenir un indice moyen sur 100 rarefactions. Cette méthode permet ainsi de palier aux biais potentiels introduits aléatoirement lorsqu'une seule rarefaction est réalisée. Le script réalisé pour cette méthode a par ailleurs été utilisé dans l'article de Jakuschkin et al. (2016) (Annexe B).

Ce sont finalement ces indices moyens qui ont ensuite été utilisés comme variables dépendantes dans les analyses statistiques. Des analyses univariées ont été réalisées sur les indices de diversité alpha (ANOVA et modèle linéaire). Des analyses multivariées ont été utilisées sur les matrices de dissimilarités (diversité beta) (PCoA, NMDS et PERMANOVA). Enfin, des statistiques spatiales ont permis de tester l'autocorrelation des variables et d'intrapoler des valeurs dans l'espace (variogramme, correlogramme, test de Moran, test de Mantel, krigeage).

2.6 Avantages et limites de la méthode de caractérisation des communautés

Le métabarcoding est un outil puissant qui permet, grâce aux méthodes de séquençage haut-débit, de fournir rapidement une description des communautés microbiennes. La quantité de séquences obtenues et la qualité du séquençage sont en constante amélioration, pour un coût de plus en plus réduit (Goodwin et al., 2016). La précision des informations obtenues a permis, depuis une quinzaine d'années, de tester de nombreuses théories écologiques sur les communautés microbiennes. Son utilisation s'est par ailleurs répandue à l'étude des macro-organismes (Coissac et al., 2012), afin par exemple de caractériser la diversité végétale en forêt tropicale (Zinger et al., 2016) ou les réseaux d'interactions entre plantes et pollinisateurs (Pornon et al., 2016).

Cependant, cette méthode présente encore un certain nombre de limites. L'abondance de chaque OTU est relative à chaque échantillon. Le nombre de séquences total d'un échantillon est potentiellement biaisé par l'extraction, l'amplification ou le séquençage. L'obtention d'une quantification absolue nécessite la mise en place, en supplément, de PCR quantitatives. Bien que des avancées considérables aient été faites dans cette voie, les résultats ne sont pas encore optimaux. Le calibrage de la méthode reste lourd à mettre en place, et la reproductibilité des données est encore incertaine (Dannemiller et al., 2014).

L'identification taxonomique est aussi limitée par la richesse ou la pauvreté des bases de données. L'ITS est majoritairement utilisé comme barcode fongique car la

base de données qui lui est associée est très fournie. Cependant, son manque de variabilité inter-spécifique ne permet pas une discrimination optimale des différentes espèces de champignons réellement présentes dans la communauté (Blaalid et al., 2013; Yahr et al., 2016). C'est particulièrement le cas pour les Ascomycètes, largement dominants dans les jeux de données présentés au cours de cette étude. De plus, la polymorphie de l'ITS due à la présence de répétitions en tandem empêche l'utilisation d'approches phylogénétiques dans l'analyse des communautés (Kiss, 2012; Miller et al., 2016). Les bases de données de marqueurs moléculaires plus précis sont cependant encore cruellement pauvres, et requièrent un étoffement considérable afin d'optimiser la caractérisation des communautés fongiques (Tedersoo et al., 2015a; Vrålstad, 2011).

Enfin, la succession des biais potentiellement introduits tout au long de la méthode interpelle sur la fiabilité des informations obtenues. Lors de l'échantillonnage, de l'extraction, de l'amplification et du séquençage, des contaminations peuvent être introduites, et peuvent biaiser les résultats finaux (Galan et al., 2016). L'ajout de témoins négatifs ne permet pas de contourner intégralement ce biais à cause des contaminations croisées entre les échantillons. L'ajout de témoins positifs, contenant un assemblage connu de micro-organismes, permettrait de mieux évaluer les biais d'identification, et de filtrer le jeu de données en conséquence avant l'analyse (Nguyen et al., 2015; Tedersoo et al., 2015a). La méthode de clustering en OTUs utilisée conditionne aussi fortement le nombre d'OTUs à inclure dans les analyses (Flynn et al., 2015). Les algorithmes classiques de partitionnement en OTUs, tels que UPARSE, DNACLUSt et CD-HIT ("greedy heuristic algorithms") dépendent d'un seuil de similarité entre les séquences, choisi arbitrairement, et qui conditionne fortement le nombre d'OTUs du jeu de données (Edgar, 2010; Fu et al., 2012; Ghodsi et al., 2011). De nouvelles méthodes de partitionnement en développement s'affranchissent de ce seuil, tels que l'algorithme SWARM (Mahé et al., 2014, 2015), et devraient permettre l'obtention de résultats plus fiables.

Néanmoins, le métabarcoding reste une méthode puissante de caractérisation des communautés fongiques. L'amélioration des techniques de séquençage, ainsi que l'étoffement des bases de données de séquences devrait permettre, d'ici quelques années, de contourner ces limites.

2.7 Références

- Abarenkov, K., Henrik Nilsson, R., Larsson, K.-H., Alexander, I. J., Eberhardt, U., Erland, S., Høiland, K., Kjølner, R., Larsson, E., Pennanen, T., Sen, R., Taylor, A. F. S., Tedersoo, L., Ursing, B. M., Vrålstad, T., Liimatainen, K., Peintner, U., & Kõljalg, U. (2010). The UNITE database for molecular identification of fungi – recent updates and future perspectives. *New Phytologist*, 186, 281–285.
- Bálint, M., Bartha, L., O'Hara, R. B., Olson, M. S., Otte, J., Pfenninger, M., Robertson, A. L., Tiffin, P., & Schmitt, I. (2015). Relocation, high-latitude warming and host genetic identity shape the foliar fungal microbiome of poplars. *Molecular Ecology*, 24, 235–248.
- Bálint, M., Schmidt, P.-A., Sharma, R., Thines, M., & Schmitt, I. (2014). An Illumina metabarcoding pipeline for fungi. *Ecology and Evolution*, 4, 2642–2653.

- Ballantyne, K. N., Salemi, R., Guarino, F., Pearson, J. R., Garlepp, D., Fowler, S., & van Oorschot, R. A. (2015). DNA contamination minimisation – finding an effective cleaning method. *Australian Journal of Forensic Sciences*, 47, 428–439.
- Bazzicalupo, A. L., Bálint, M., & Schmitt, I. (2013). Comparison of ITS1 and ITS2 rDNA in 454 sequencing of hyperdiverse fungal communities. *Fungal Ecology*, 6, 102–109.
- Blaalid, R., Kumar, S., Nilsson, R. H., Abarenkov, K., Kirk, P. M., & Kauserud, H. (2013). ITS1 versus ITS2 as DNA metabarcodes for fungi. *Molecular Ecology Resources*, 13, 218–224.
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., Fierer, N., Peña, A. G., Goodrich, J. K., Gordon, J. I., Huttley, G. A., Kelley, S. T., Knights, D., Koenig, J. E., Ley, R. E., Lozupone, C. A., McDonald, D., Muegge, B. D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J. R., Turnbaugh, P. J., Walters, W. A., Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld, J., & Knight, R. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods*, 7, 335–336.
- Coince, A., Cordier, T., Lengellé, J., Defosse, E., Vacher, C., Robin, C., Buée, M., & Marçais, B. (2014). Leaf and root-associated fungal assemblages do not follow similar elevational diversity patterns. *PloS one*, 9, e100668.
- Coissac, E., Riaz, T., & Puillandre, N. (2012). Bioinformatic challenges for DNA metabarcoding of plants and animals. *Molecular Ecology*, 21, 1834–1847.
- Cordier, T., Robin, C., Capdevielle, X., Desprez-Loustau, M.-L., & Vacher, C. (2012a). Spatial variability of phyllosphere fungal assemblages: genetic distance predominates over geographic distance in a European beech stand (*Fagus sylvatica*). *Fungal Ecology*, 5, 509–520.
- Cordier, T., Robin, C., Capdevielle, X., Fabreguettes, O., Desprez-Loustau, M.-L., & Vacher, C. (2012b). The composition of phyllosphere fungal assemblages of European beech (*Fagus sylvatica*) varies significantly along an elevation gradient. *New Phytologist*, 196, 510–519.
- Dannemiller, K. C., Lang-Yona, N., Yamamoto, N., Rudich, Y., & Peccia, J. (2014). Combining real-time PCR and next-generation DNA sequencing to provide quantitative comparisons of fungal aerosol populations. *Atmospheric Environment*, 84, 113–121.
- Dees, M. W., Lysøe, E., Nordskog, B., & Brurberg, M. B. (2015). Bacterial Communities Associated with Surfaces of Leafy Greens: Shift in Composition and Decrease in Richness over Time. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 1530–1539.
- Edgar, R. C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26, 2460–2461.
- Edgar, R. C. (2013). UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature Methods*, 10, 996–998.

- Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C., & Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 27, 2194–2200.
- Flynn, J. M., Brown, E. A., Chain, F. J. J., MacIsaac, H. J., & Cristescu, M. E. (2015). Toward accurate molecular identification of species in complex environmental samples: testing the performance of sequence filtering and clustering methods. *Ecology and Evolution*, 5, 2252–2266.
- Fu, L., Niu, B., Zhu, Z., Wu, S., & Li, W. (2012). CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics*, 28, 3150–3152.
- Galan, M., Razzauti, M., Bard, E., Bernard, M., Brouat, C., Charbonnel, N., Dehne-Garcia, A., Loiseau, A., Tatard, C., Tamisier, L., Vayssier-Taussat, M., Vignes, H., & Cosson, J. F. (2016). 16s rRNA amplicon sequencing for epidemiological surveys of bacteria in wildlife: the importance of cleaning post-sequencing data before estimating positivity, prevalence and co-infection. *bioRxiv*, (p. 039826).
- Garbelotto, M., Smith, T., & Schweigkofler, W. (2008). Variation in rates of spore deposition of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pine pitch canker, over a 12-month-period at two locations in northern California. *Phytopathology*, 98, 137–143.
- Gardes, M., & Bruns, T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2, 113–118.
- Gefrides, L. A., Powell, M. C., Donley, M. A., & Kahn, R. (2010). UV irradiation and autoclave treatment for elimination of contaminating DNA from laboratory consumables. *Forensic Science International: Genetics*, 4, 89–94.
- Ghods, M., Liu, B., & Pop, M. (2011). DNAClust: accurate and efficient clustering of phylogenetic marker genes. *BMC Bioinformatics*, 12, 271.
- Goodwin, S., McPherson, J. D., & McCombie, W. R. (2016). Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*, 17, 333–351.
- Greenstone, M. H., Weber, D. C., Coudron, T. A., Payton, M. E., & Hu, J. S. (2012). Removing external DNA contamination from arthropod predators destined for molecular gut-content analysis. *Molecular Ecology Resources*, 12, 464–469.
- Heather, J. M., & Chain, B. (2016). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, 107, 1–8.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270, 313–321.
- Ihrmark, K., Bödeker, I. T. M., Cruz-Martinez, K., Friberg, H., Kubartova, A., Schenck, J., Strid, Y., Stenlid, J., Brandström-Durling, M., Clemmensen, K. E., & Lindahl, B. D. (2012). New primers to amplify the fungal ITS2 region – evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 82, 666–677.

- Jakuschkin, B., Fievet, V., Schwaller, L., Fort, T., Robin, C., & Vacher, C. (2016). Deciphering the Pathobiome: Intra- and Interkingdom Interactions Involving the Pathogen *Erysiphe alphitoides*. *Microbial Ecology*, (pp. 1–11).
- Kiss, L. (2012). Limits of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) sequences as species barcodes for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, E1811.
- Lindahl, B. D., Nilsson, R. H., Tedersoo, L., Abarenkov, K., Carlsen, T., Kjølner, R., Kõljalg, U., Pennanen, T., Rosendahl, S., Stenlid, J., & Kauserud, H. (2013). Fungal community analysis by high-throughput sequencing of amplified markers - a user's guide. *New Phytologist*, 199, 288–299.
- Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L., & Law, M. (2012). Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *BioMed Research International*, 2012, e251364.
- Madden, T. (2013). The BLAST sequence analysis tool. In *The NCBI Handbook*. National Center for Biotechnology Information (US). (2nd ed.).
- Mahé, F., Rognes, T., Quince, C., de Vargas, C., & Dunthorn, M. (2014). Swarm: robust and fast clustering method for amplicon-based studies. *PeerJ*, 2, e593.
- Mahé, F., Rognes, T., Quince, C., Vargas, C. d., & Dunthorn, M. (2015). Swarm v2: highly-scalable and high-resolution amplicon clustering. *PeerJ*, 3, e1420.
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2014). Waste Not, Want Not: Why Rarefying Microbiome Data Is Inadmissible. *PLoS Computational Biology*, 10.
- Miller, K. E., Hopkins, K., Inward, D. J. G., & Vogler, A. P. (2016). Metabarcoding of fungal communities associated with bark beetles. *Ecology and Evolution*, 6, 1590–1600.
- Morris, C. E., Leyronas, C., & Nicot, P. C. (2014). Movement of Bioaerosols in the Atmosphere and the Consequences for Climate and Microbial Evolution. In I. Colbeck, & M. Lazaridis (Eds.), *Aerosol Science: Technology and applications* (pp. 393–415). John Wiley & Sons, Ltd.
- Müller, T., & Ruppel, S. (2014). Progress in cultivation-independent phyllosphere microbiology. *FEMS Microbiology Ecology*, 87, 2–17.
- Nguyen, N. H., Smith, D., Peay, K., & Kennedy, P. (2015). Parsing ecological signal from noise in next generation amplicon sequencing. *New Phytologist*, 205, 1389–1393.
- Nielsen, C. R., Berdal, K. G., Bakke-McKellep, A. M., & Holst-Jensen, A. (2005). Dietary DNA in blood and organs of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *European Food Research and Technology*, 221, 1–8.
- Nilsson, R. H., Veldre, V., Hartmann, M., Unterseher, M., Amend, A., Bergsten, J., Kristiansson, E., Ryberg, M., Jumpponen, A., & Abarenkov, K. (2010). An open source software package for automated extraction of ITS1 and ITS2 from fungal ITS sequences for use in high-throughput community assays and molecular ecology. *Fungal Ecology*, 3, 284–287.

- Op De Beeck, M., Lievens, B., Busschaert, P., Declerck, S., Vangronsveld, J., & Colpaert, J. V. (2014). Comparison and Validation of Some ITS Primer Pairs Useful for Fungal Metabarcoding Studies. *PLOS ONE*, *9*, e97629.
- Pace, N., Stahl, D., Lane, D., & Olsen, G. (1986). The Analysis of Natural Microbial Populations by Ribosomal-Rna Sequences. *Advances in Microbial Ecology*, *9*, 1–55.
- Pornon, A., Escaravage, N., Burrus, M., Holota, H., Khimoun, A., Mariette, J., Pellizari, C., Iribar, A., Etienne, R., Taberlet, P., Vidal, M., Winterton, P., Zinger, L., & Andalo, C. (2016). Using metabarcoding to reveal and quantify plant-pollinator interactions. *Scientific Reports*, *6*, 27282.
- R Development Core Team (2006). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria.
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., Lesniewski, R. A., Oakley, B. B., Parks, D. H., Robinson, C. J., Sahl, J. W., Stres, B., Thallinger, G. G., Horn, D. J. V., & Weber, C. F. (2009). Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*, 7537–7541.
- Schmidt, T. M., DeLong, E. F., & Pace, N. R. (1991). Analysis of a marine picoplankton community by 16s rRNA gene cloning and sequencing. *Journal of Bacteriology*, *173*, 4371–4378.
- Schmitt, I., Crespo, A., Divakar, P., Fankhauser, J., Herman-Sackett, E., Kalb, K., Nelsen, M., Nelson, N., Rivas-Plata, E., Shimp, A., Widhelm, T., & Lumbsch, H. (2009). New primers for promising single-copy genes in fungal phylogenetics and systematics. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, *23*, 35–40.
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., Bolchacova, E., Voigt, K., & Crous, P. W. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*, 6241–6246.
- Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., & Rieseberg, L. H. (2012). Environmental DNA. *Molecular Ecology*, *21*, 1789–1793.
- Tedersoo, L., Anslan, S., Bahram, M., Põlme, S., Riit, T., Liiv, I., Kõljalg, U., Kisand, V., Nilsson, H., Hildebrand, F., Bork, P., & Abarenkov, K. (2015a). Shotgun metagenomes and multiple primer pair-barcode combinations of amplicons reveal biases in metabarcoding analyses of fungi. *MycoKeys*, *10*, 1–43.
- Tedersoo, L., Bahram, M., Põlme, S., Anslan, S., Riit, T., Kõljalg, U., Nilsson, R. H., Hildebrand, F., & Abarenkov, K. (2015b). Response to Comment on “Global diversity and geography of soil fungi”. *Science*, *349*, 936–936.
- Vrålstad, T. (2011). ITS, OTUs and beyond—fungal hyperdiversity calls for supplementary solutions. *Molecular Ecology*, *20*, 2873–2875.

- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., & Cole, J. R. (2007). Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 5261–5267.
- West, J., & Kimber, R. (2015). Innovations in air sampling to detect plant pathogens. *The Annals of Applied Biology*, 166, 4–17.
- White, T., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols* (pp. 315–322). Elsevier.
- Xu, J. (2016). Fungal DNA Barcoding. *Genome*, .
- Yahr, R., Schoch, C. L., & Dentinger, B. T. M. (2016). Scaling up discovery of hidden diversity in fungi: impacts of barcoding approaches. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371, 20150336.
- Zinger, L., Chave, J., Coissac, E., Iribar, A., Louisanna, E., Manzi, S., Schilling, V., Schimann, H., Sommeria-Klein, G., & Taberlet, P. (2016). Extracellular DNA extraction is a fast, cheap and reliable alternative for multi-taxa surveys based on soil DNA. *Soil Biology and Biochemistry*, 96, 16–19.

Chapitre 3

Comparaison des communautés fongiques forestières et viticoles au cours d'une saison végétative

Foliar fungal communities strongly differ between habitat patches in a landscape mosaic

Thomas Fort¹, Cécile Robin¹, Xavier Capdevielle¹, Laurent Delière²,
and Corinne Vacher³

¹BIOGECO, UMR 1202, INRA, Université de Bordeaux, F-33610 Cestas, France

²SAVE, UMR1065, INRA, ISVV, Université de Bordeaux, F-33883 Villenave d'Ornon, France

³BIOGECO, UMR 1202, INRA, Université de Bordeaux, F-33615 Pessac, France

Article accepted in *PeerJ*. Now available as preprint at:
<https://peerj.com/preprints/2458>

Abstract

Background. Dispersal events between habitat patches in a landscape mosaic can structure ecological communities and influence the functioning of agrosystems. Here we investigated whether short-distance dispersal events between vineyard and forest patches shape foliar fungal communities. We hypothesized that these communities homogenize between habitats over the course of the growing season, particularly along habitat edges, because of aerial dispersal of spores.

Methods. We monitored the richness and composition of foliar and airborne fungal communities over the season, along transects perpendicular to edges between vineyard and forest patches, using Illumina sequencing of the ITS2 region.

Results. In contrast to our expectation, foliar fungal communities in vineyards and forest patches increasingly differentiate over the growing season, even along habitat edges. Moreover, the richness of foliar fungal communities in grapevine drastically decreased over the growing season, in contrast to that of forest trees. The composition of airborne communities did not differ between habitats. The composition of oak foliar fungal communities change between forest edge and centre.

Discussion. These results suggest that dispersal events between habitat patches are not major drivers of foliar fungal communities at the landscape scale. Selective pressures exerted in each habitat by the host plant, the microclimate and the agricultural practices play a greater role, and might account for the differentiation of foliar fungal communities between habitats.

Keywords: Bioaerosols, Dispersal, Edges, Forest, Grapevine, Landscape, Phyllosphere, Selection

Introduction

Plant leaves provide one of the largest microbial habitats on Earth (Morris, 2001; Ruinen, 1956; Vorholt, 2012). They harbour highly diverse microbial communities, including many genera of bacteria and fungi (Lindow & Leveau, 2002; Turner et al., 2013; Vorholt, 2012). The eco-evolutionary processes which shape these communities - dispersal, evolutionary diversification, selection and drift - are increasingly well understood (Hanson et al., 2012; Nemergut et al., 2013; Vacher et al., 2016). This new eco-evolutionary framework will undoubtedly have important applications in agriculture. Indeed, crop performance depends on the balance and interactions between pathogenic and beneficial microbial species (Newton et al., 2010a,b). Manipulating whole foliar microbial communities, by acting on the processes shaping them, could thus greatly improve crop health (Newton et al., 2010a; Xu et al., 2011). However, to reach this aim, a better understanding of the structure and dynamics of foliar microbial communities at the landscape scale is required.

The landscape plays a key role in the dynamics of macro-organism populations interacting with crops, such as arthropod pests or their natural enemies (Chaplin-Kramer et al., 2011; Norris & Kogan, 2000). In ecology, the landscape is defined as an heterogeneous geographic area, characterized by a dynamic mosaic of interacting habitat patches (Bastian, 2001). Species movements between habitat patches - referred as dispersal (Vellend, 2010) - modulates the richness, composition and function of macro-organism communities (Hurst et al., 2013; Lacasella et al., 2014; Ma et al., 2013). In agricultural landscape, species dispersal between natural and managed habitats can trigger detrimental or beneficial effects in crops (Blitzer et al., 2012; Chaplin-Kramer et al., 2011), particularly along the edges (Lacasella et al., 2014; Thomson & Hoffmann, 2009).

The influence of dispersal events on the structure of foliar microbial communities at the landscape scale has hardly been studied. Many microbial species colonising plant leaves are horizontally transferred (i.e. from one adult plant to another) by airborne dispersal (Bulgarelli et al., 2013; Whipps et al., 2008), while others can come from the seeds, the rhizosphere or the twigs (Vorholt, 2012). The foliar microbial communities of a given plant can therefore be influenced by those of its neighbours. Plant pathogens, for instance, can be transmitted from a reservoir plant to neighbouring plants (Beckstead et al., 2010; Power & Mitchell, 2004; Wilson et al., 2014). These short-distance dispersal events could have a greater effect on the foliar microbial communities of annual or deciduous plants, because the leaves of those plants are colonised by micro-organisms every spring, after budbreak.

In this study, we analysed the structure and dynamic of foliar and airborne fungal communities in a heterogeneous landscape consisting of vineyard and forest patches in the south west of France. Vineyards are human-engineered agro-ecosystems, characterized by a low specific and genetic diversity, and where weeds, pests and pathogens are regularly controlled with different cultural practices and pesticides to preserve yield and to reduce infection of leaves and grapes. Conversely, deciduous forests in this area remain little managed and much less homogeneous. We expected the fungal communities of forest patches to be richer than those of vineyards, because the higher plant

species richness and biomass in forests increase the diversity of micro-habitats available to foliar fungi. We also expected repeated dispersal events to homogenize foliar fungal communities between the two habitats over the course of the growing season, particularly along habitat edges. We thus tested the following hypotheses for both foliar and airborne fungal communities: (1) community richness is higher in forests than in adjacent vineyards, (2) community similarity between the two habitats increase over the course of the growing season and (3) is higher along habitat edges.

Materials and methods

Sampling design

Three study sites, each consisting of a forest patch and an adjacent vineyard, were selected in the Bordeaux area (France). They were located in the domains of Châteaux Reignac (N 44° 54' 03", O 0° 25' 01"), Grand-Verdus (N 44° 47' 21", O 0° 24' 06") and Couhins (N 44° 45' 04", O 0° 33' 53") (Fig. 1a). At each site, the edge between the forest patch and the vineyard was at least 100 m long. The width of each habitat, perpendicular to the edge, was at least 200 m. The forest patches at all three sites contained mostly deciduous species, dominated by pedunculate oak (*Quercus robur* L.). The second most frequent tree species was European hornbeam (*Carpinus betulus* L.) in Reignac and Grand-Verdus, and sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in Couhins. In the vineyards, the grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivar was Cabernet Sauvignon in Reignac and Grand-Verdus, and Merlot in Couhins.

At each site, leaves were collected along three parallel transects perpendicular to the forest-vineyard edge and separated by a distance of about five meters (Fig. 1b). Leaves were sampled at four locations along each transect: in the centre of the forest (100 m away from the edge), at the edge of the forest, at the edge of the vineyard and in the centre of the vineyard (100 m away from the edge). In forest patches, leaves were sampled from the two most abundant tree species. For each sampling location and each transect, a single tree of each species was selected. Three leaves oriented in different directions were collected from each tree, at a height of 7 m. In vineyards, three leaves were collected from three adjacent cloned grapevine stocks. Each of the sampled leaves was selected from the base of the cane (one-year-old shoot), to ensure the collection of leaves of the same age on each date. The leaves were removed with scissors that had been sterilised with 96 % ethanol, and all contact of the leaves with the hands was carefully avoided. The leaves were stored in clear plastic bags containing silica gel to ensure rapid drying. In addition, grapevine leaves were placed between two sheets of sterile paper filter to ensure good dessication despite their thickness. Leaves were sampled on three dates in 2013: in May (between the 15th and 23rd), July (between the 16th and 18th) and October (3rd). The sampling dates chosen were as far removed as possible from the last chemical treatment performed in the vineyard (Supporting Information Table S1).

Airborne particles were collected along the middle transect of each site, with two Coriolis air sampler devices positioned one meter above the ground. At each sampling location, three successive 10 minute sampling sessions were carried out, with a flow rate of 200 l/min.

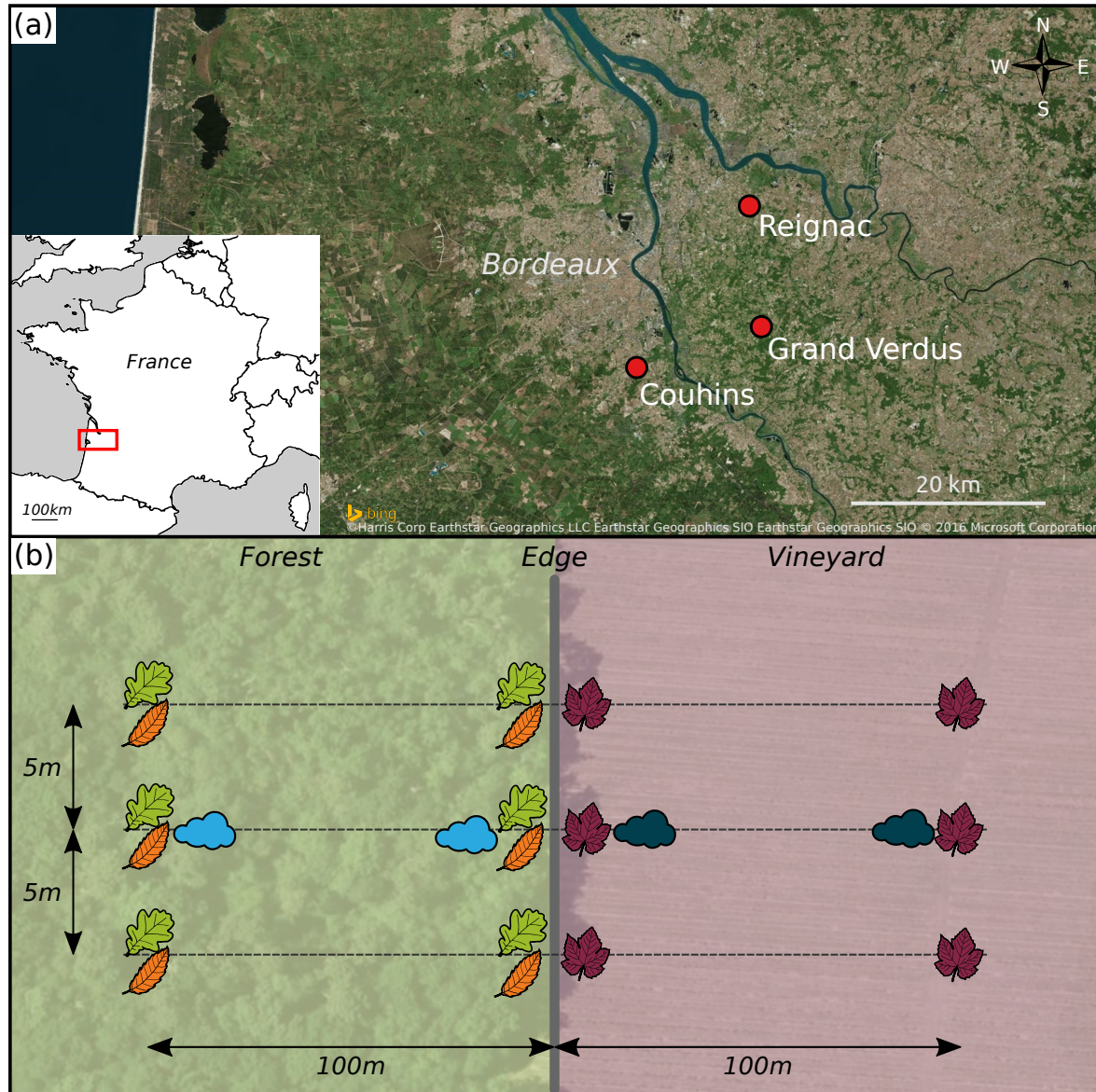


Figure 1: Experimental design. (a) Geographical position of the three sampling sites, represented by red points. (b) Sampling design at each site. Leaf pictograms represent the sampling location of leaves in each site. Three leaves per plant species (i.e. grapevine in the vineyard and oak plus chestnut or hornbeam in the forest patch) were sampled at each location. Cloud pictograms represent the sampling location of airborne communities.

DNA extraction and sequencing

Sample contamination was prevented by exposing all tools and materials required for sample processing and DNA extraction to UV light for 30 minutes in a laminar flow hood. Four discs (each 8.0 mm in diameter) were cut randomly from each leaf, in the flow hood, with a hole-punch sterilised by flaming with 95 % ethanol. The four discs were placed in a single well of an autoclaved DNA extraction plate. Three wells were left empty as negative controls. Two autoclaved metallic beads were added to each well, and the plant material was ground into a homogeneous powder with a Geno/Grinder 2010 (SPEX Sample Prep, Metuchen, NJ).

The liquid used to collect airborne particles was transferred into sterile 15 ml centrifuge tubes. Each tube was then centrifuged for 30 minutes at 13000 RCF and the supernatant was removed with a sterile transfer pipette. The pellet was then transferred by resuspension to an autoclaved tube and freeze-dried. A tube of unused sampling liquid was treated in the same way and used as a negative control. Total DNA was extracted from each leaf and airborne sample with the DNeasy 96 Plant Kit (QIAGEN). Foliar DNA samples from the same tree were pooled, as were foliar DNA samples from the three adjacent grapevine stocks.

Fungal ITS2 (Internal Transcribed Spacer 2) was amplified with the fITS7 (forward) and ITS4 (reverse) primers (Ihrmark et al., 2012). Paired-end sequencing (300 bp) was then performed in a single run of an Illumina MiSeq sequencer, on the basis of V3 chemistry. PCR amplification, barcodes and MiSeq adapters addition, library sequencing and data preprocessing were carried out by the LGC Genomics sequencing service (Berlin, Germany). Sequences were deposited in the European Nucleotide Archive (ENA) database, under the PRJEB13880 project accession number.

Bioinformatic analysis

Sequences were first demultiplexed and filtered. All sequences with tag mismatches, missing tags, one-sided tags or conflicting tag pairs were discarded. Tags and Illumina TruSeq adapters were then clipped from all sequences, and sequences with a final length fewer than 100 bases were discarded. All sequences with more than three mismatches with the ITS2 primers were discarded. Primers were then clipped and the sequence fragments were placed in a forward-reverse primer orientation. Forward and reverse reads were then combined, and read pair sequences that could not be combined were discarded.

The pipeline developed by Bálint et al. (2014) was used to process the sequences. The ITS2 sequence was first extracted from each sequence with the FungalITSextractor (Nilsson et al., 2010). All the sequences were then concatenated into a single fasta file, after adding the sample code in the label of each sequence. The sequences were dereplicated, sorted and singletons were discarded with VSEARCH (<https://github.com/torognes/vsearch>). The sequences were then clustered into molecular operational taxonomic units (OTUs) with the UPARSE algorithm implemented in USEARCH v8 (Edgar, 2013), with a minimum identity threshold of 97 %. Additional chimera detection was performed against the UNITE database (Kõljalg et al., 2013), with the UCHIME algorithm implemented in USEARCH v8 (Edgar et al., 2011). The OTU table, giving the number of sequences of each OTU for each sample, was created

with USEARCH v8.

OTUs were taxonomically assigned using the online BLAST web interface (Madden, 2013) against the GenBank database, by excluding environmental and metagenome sequences. The assignment with the lowest e-value was retained. The full taxonomic lineage of each assignment was retrieved from the GI number information provided by NCBI. All the OTUs assigned to plants or other organisms, and all unassigned OTUs were removed, to ensure that only fungal OTUs were retained.

Statistical analyses

All statistical analyses were performed in the R environment. We computed 100 random rarefied OTU matrices, using the smallest number of sequences per sample as a threshold. The number of OTUs per sample (OTU richness) and the dissimilarity between samples (Bray-Curtis index based on abundances and Jaccard index based on occurrences) were calculated for each rarefied matrix and averaged (Cordier et al., 2012; Jakuschkin et al., 2016). However, because the relevance of rarefaction is debated in the scientific community (Hughes & Hellmann, 2005; McMurdie & Holmes, 2014), we also performed the analyses on the raw OTU matrix by including the square root of the total number of sequences per sample (abundance) as first explanatory variable in all the models.

Type III ANOVA, which tests for the presence of an effect, given the other effects and the interactions (Herr, 1986), was used to assess the effect of host plant species (grapevine, oak, hornbeam and chestnut), sampling date (May, July, October), edge (habitat centre or edge) and their interactions on foliar OTU richness. Sampling site was included in the model as a random factor. Marginal and conditional coefficients of determination were calculated to estimate the variance explained by fixed factors (R_m^2) and fixed *plus* random factors (R_c^2). Post-hoc pairwise comparisons were then performed for each level of each factor, with Tukey's adjustment method. A similar ANOVA was performed on airborne OTU richness, including habitat (forest and vineyard), sampling date, sampling site, and their interactions.

Dissimilarities in composition between samples were represented by non-metric multi-dimensional scaling analysis (NMDS) and were analysed by permutational multivariate analyses of variance (PERMANOVA), including the same fixed factors as the ANOVAs, with sampling sites treated as strata. We dealt with complex interactions in PERMANOVA results by calculating post-hoc PERMANOVAs, including sampling date, sampling site and their interaction, separately for each host plant species (or habitat for airborne samples). We then corrected the P-values for multiple testing, as described by Benjamini & Yekutieli (2001).

Results

Taxonomic description of foliar and airborne fungal communities

In total, we obtained 7 946 646 high-quality sequences, which clustered into 4 360 OTUs. Overall, 867 OTUs, corresponding to 4 600 179 sequences (57.9% of the raw OTU table) were not taxonomically assigned to fungi by BLAST. Among them,

4 451 913 sequences were assigned to plant sequences (Tracheophyta division), principally *Vitis* (59%), and *Carpinus* (35%) genus, showing that fITS7-ITS4 primers are not specific of fungi. These OTUs were removed. The negative controls contained 29 857 fungal sequences clustering into 337 OTUs. There is no consensus on how to deal with OTUs found in negative controls (Galan et al., 2016; Nguyen et al., 2015). It is difficult to distinguish real contaminations - sequences originating from the people who performed the experiments, the laboratory environment and the DNA extraction kit – from cross-contaminations between samples, occurring during the DNA extraction, amplification and sequencing (Esling et al., 2015; Galan et al., 2016). It is highly probable that OTUs assigned to [*Erysiphe alphitoides*], the agent responsible for the oak powdery mildew (1.5% of the negative control sequences; Jakuschkin et al. 2016) or *Botrytis cinerea*, responsible for the grey mold on grapes (1.2%; Jaspers et al. 2015) are likely cross-contaminations because they are strongly related to a specific host. Moreover, the removal of very abundant OTUs strongly altered the taxonomic composition of the samples, and removed some species known to be abundant on leaves such as *Aureobasidium pullulans*, known as very abundant on grapevine (Pinto & Gomes, 2016). We thus decided to retain all these OTUs in the dataset. Two samples containing very few sequences (<300 sequences) were removed. These samples corresponded to grapevine leaves collected at the Couhins site, in May. The first was collected in the centre of the vineyard, and the other was collected at its edge. Finally, the OTU table used for the analyses contained 196 samples and 3 487 fungal OTUs, corresponding to 3 316 156 sequences. The number of sequences per sample ranged from 424 to 96 276, with a mean of 16 919. This OTU table was used for taxonomical description. Richness, Bray-Curtis and Jaccard averaged indices were calculated over 100 rarefactions of this OTU table, at a threshold of 420 sequences per sample.

The fungal communities of bioaerosols and leaves from forest trees and grapevines were dominated by ascomycetes (Fig. 2). The sequences assigned to Ascomycota division accounted for 85.7% of all the sequences, followed by Basidiomycota division (11.3%). Overall, 3.0% of the total sequences remained unassigned at the division level. Airborne and foliar samples shared 1440 OTUs (Fig. 3), but there was a significant difference in the composition of foliar and airborne fungal communities (PERMANOVA $F=20.15$, $p=0.001$). The ten most abundant fungal OTUs were shared by airborne, forest foliar and grapevine foliar communities, but their relative abundance differed between each compartment (Table 1).

Variations in the richness of foliar and airborne fungal communities at the landscape scale

ANOVA revealed a significant effect of the interaction between host plant species and sampling date on the richness of foliar fungal communities (Table 2). Differences in fungal community richness between plant species were not significant in May and July (Fig. 4 and Supporting Information Fig. S1). In October, grapevine stocks had significantly less rich foliar fungal communities than oak (post-hoc tests: $P<0.0001$; Fig. 4) and hornbeam trees ($P<0.0001$), but the richness of their fungal communities did not differ significantly from that of chestnut trees ($P=0.147$; Supporting Information Fig. S1). Hornbeam leaves harboured the richest communities of all the plant species

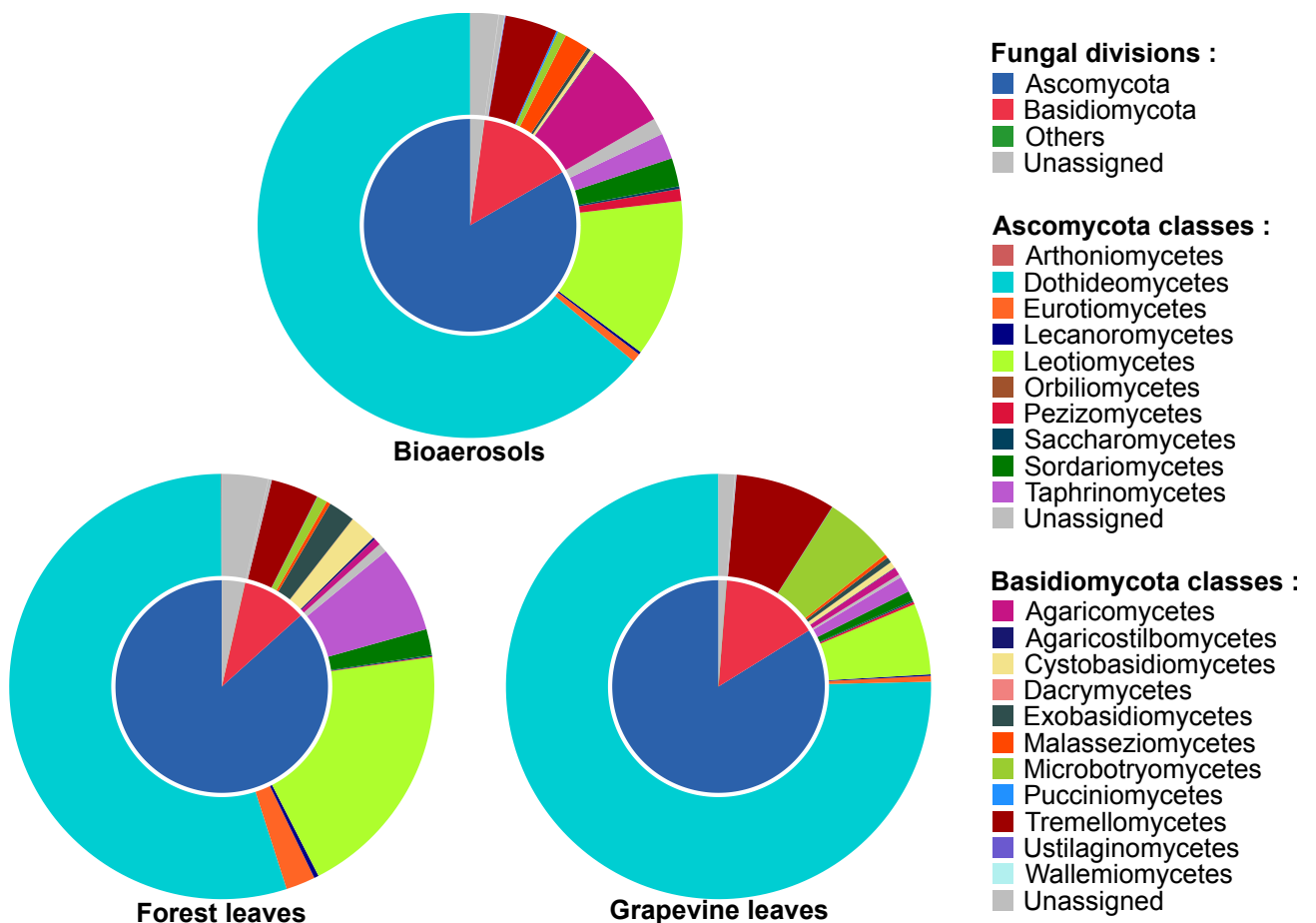


Figure 2: Taxonomic composition of the airborne and foliar fungal communities in forest and vineyard habitats. The inner disc shows the proportion of sequences assigned to each taxonomic division, and the outer disc the proportion of sequences assigned to each class of the Ascomycota and Basidiomycota divisions.

Table 1: Taxonomic assignment of the 10 most abundant OTUs by the online BLAST analysis against the GenBank database. The environmental and metagenome sequences were excluded. Identity is the percentage identity between the OTU representative sequence and the closest matching sequence in GenBank. Taxa shown as unassigned at the species level (sp.) indicate OTUs assigned to at least two species of the same genus with identical e-value. Relative abundance are percentage of abundance of each data subset and brackets contain the rank of the OTU in each data subset.

GI number	Closest match		Relative abundance in percent (rank)			
	Identity	Putative taxon	Total	Airborne	Forest leaves	Grapevine leaves
1034220623	100	<i>Aureobasidium pullulans</i>	15.48	3.8 (4)	12.6 (1)	55.9 (1)
1031917897	100	<i>Cladosporium sp.</i>	8.01	29.8 (1)	2.7 (11)	2.4 (5)
1049480240	85.6	<i>Collophora hispanica</i>	5.64	1.7 (7)	7.4 (2)	1.1 (13)
61619908	100	<i>Ramularia endophylla</i>	4.72	0.6 (20)	6.4 (3)	1.4 (12)
1035371449	100	<i>Cladosporium sp.</i>	4.51	13.7 (2)	2.3 (13)	1.8 (7)
530746702	100	<i>Stromatoseptoria castaneicola</i>	3.48	0.3 (31)	4.8 (4)	0.9 (15)
626419142	99.5	<i>Taphrina carpini</i>	3.35	1.3 (9)	4.3 (6)	0.7 (19)
1024249962	100	<i>Erysiphe sp.</i>	3.17	0.3 (33)	4.4 (5)	0.8 (16)
61619940	100	<i>Naevala minutissima</i>	2.99	1.2 (10)	3.8 (8)	0.7 (20)
961502090	91	<i>Zeloasperisporium searsiae</i>	2.93	0.2 (46)	4.1 (7)	0.6 (21)

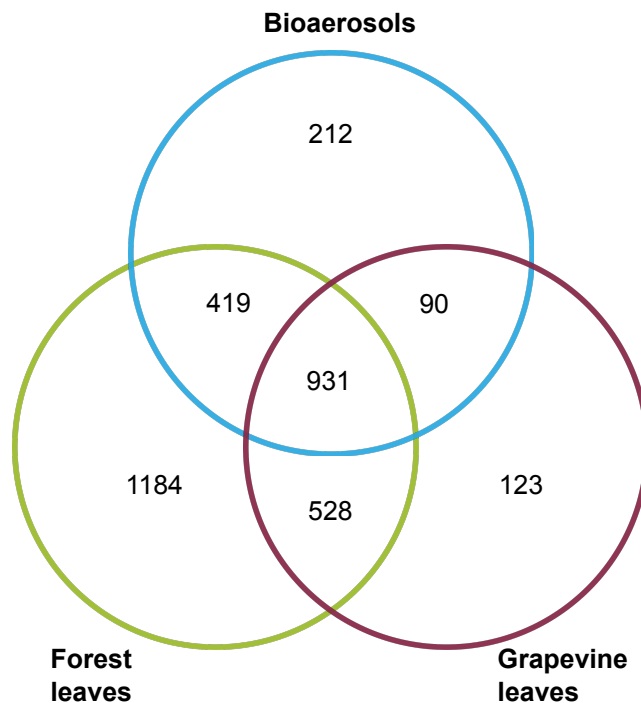


Figure 3: Venn diagram giving the number of OTUs shared between the airborne, forest foliar and vineyard foliar communities.

Table 2: Effect of sampling date (May, July or October), host species (oak, hornbeam, chestnut or grapevine) or habitat (vineyard or forest), edge (habitat centre or center) and their interaction on OTU richness in foliar and airborne fungal communities, assessed using a type III ANOVA. In both models, sampling site was included as a random variable. Rm^2 is the marginal coefficient of determination (for fixed effects) and Rc^2 the conditional coefficient of determination (for fixed and random effects). Bold values are the significant ones.

	F	P-value	Rm^2 (Rc^2)
Foliar OTU richness			
Date	44.49	<0.001	0.64 (0.71)
Species	14.97	<0.001	
Edge	17.21	<0.001	
D x S	23.42	<0.001	
D x E	0.11	0.894	
S x E	6.72	<0.001	
D x S x E	1.13	0.347	
Airborne OTU richness			
Date	1.07	0.362	0.34 (0.52)
Habitat	10.19	0.004	
Edge	4.2	0.052	
D x H	0.86	0.436	
D x E	1.4	0.267	
H x E	0.01	0.912	
D x H x E	1.678	0.209	

considered (post-hoc tests: $P < 0.0001$ between hornbeam and chestnut, $P = 0.0003$ between hornbeam and oak, $P < 0.0001$ between hornbeam and grapevine; Supporting Information Fig. S1).

ANOVA post-hoc tests also revealed a significant decrease in fungal species richness in grapevine over the course of the growing season ($P < 0.0001$ for each pairwise comparison; Fig. 4). Seasonal variations in fungal richness were less marked in oak ($P = 0.081$, $P = 0.999$ and $P = 0.004$, respectively between May and July, July and October, May and October), chestnut ($P = 0.011$, $P = 0.997$ and $P = 0.0002$, respectively) and hornbeam ($P = 1.00$, $P = 0.144$ and $P = 0.185$, respectively).

ANOVA also revealed a significant effect of the interaction between host plant species and edge on the richness of foliar fungal communities (Table 2). The richness of foliar fungal communities was significantly higher at the edge in oak ($P = 0.002$), but not in hornbeam ($P = 0.100$), chestnut ($P = 0.139$), or grapevine ($P = 0.790$) (Supporting Information Fig. S2).

Habitat had a significant effect on the richness of airborne fungal communities (Table 2), which was significantly higher in forests than in vineyards.

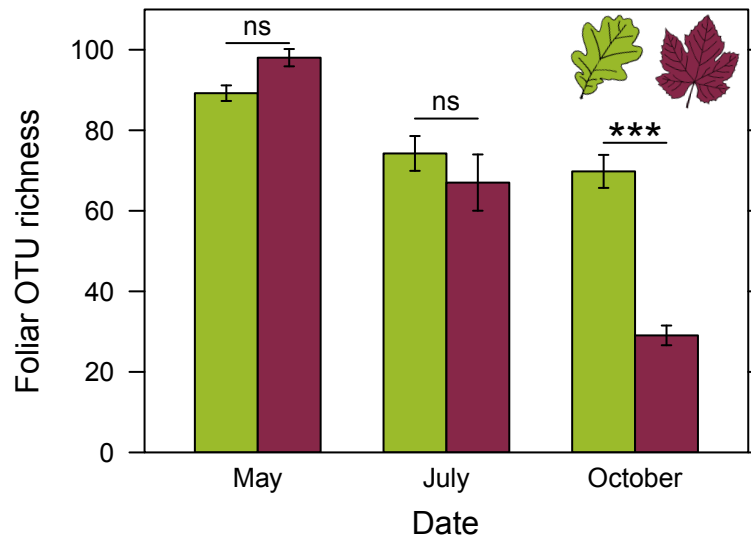


Figure 4: Richness of foliar fungal community in oak (green) and grapevine (red), depending on the sampling date. Error bars represent the standard error.

Conclusions were similar on models performed without rarefaction (Supporting Information, Table SI4).

Variations in the composition of foliar and airborne fungal communities at the landscape scale

PERMANOVA revealed a significant effect of the interaction between host plant species and sampling date on the composition of foliar fungal communities (Table 3). Bray-Curtis dissimilarities between oak and grapevine foliar fungal communities increased over the course of the growing season (mean $\pm$ SD; 0.47 ± 0.07 in May, 0.67 ± 0.09 in July and 0.91 ± 0.06 in October). These results are illustrated by non-metric multidimensional scaling (NMDS; Fig. 5a). Bray-Curtis dissimilarities also increased between each pair of host species (Supporting Information, Table S2 and Fig. S3a). Similar results were obtained with the Jaccard dissimilarity index (Supporting Information, Table S3 and Fig. S3b).

PERMANOVA also revealed significant edge effects on the composition of foliar fungal communities, in interaction with host plant species and sampling date. Post-hoc PERMANOVAs computed separately for each host species indicated differences in community composition between the edge and centre of the forest for oak and hornbeam, in interaction with sampling date ($F=1.68$, $P=0.031$ and $F=1.85$, $P=0.044$, respectively). The composition of the fungal community did not differ between the edge and the centre of the habitat for chestnut ($F=2.27$, $P=0.25$) or grapevine ($F=0.92$, $P=1$). Finally, PERMANOVA analysis of Bray-Curtis dissimilarities revealed a significant effect of sampling date on bioaerosol composition (Table 3 and Fig. 5b). Similar results were obtained for Jaccard dissimilarity (Supporting Information, Table S3). Overall, similar results were also obtained without rarefying (Supporting Information, Table S5).

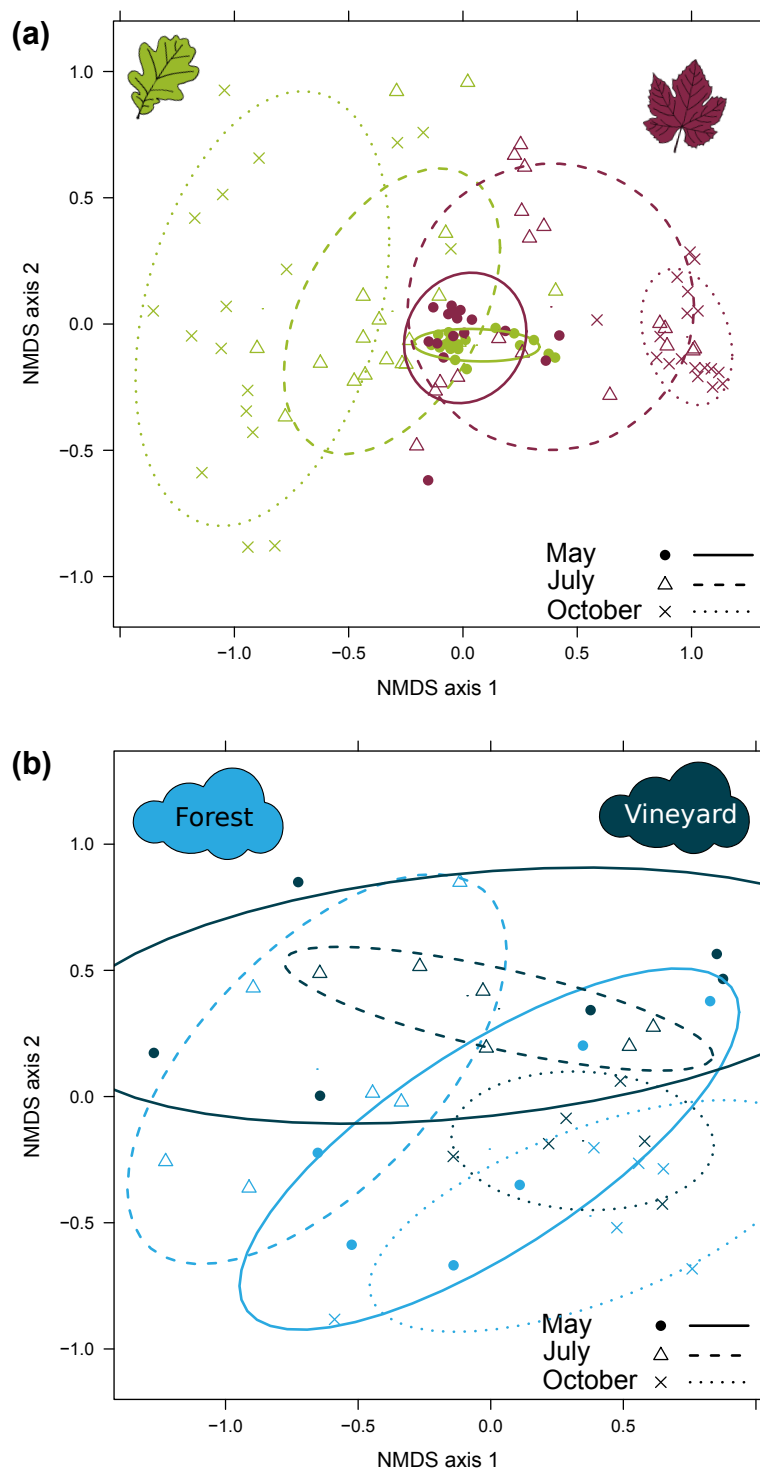


Figure 5: NMDS representing dissimilarities in the composition of fungal communities. (a) Dissimilarities in the composition of foliar fungal communities between the host species (oak in green and grapevine in red), depending on the sampling date. The other two forest species are not shown here, to make the figure easier to read, and are presented in Fig. S2. The stress value associated with this representation was 0.170. (b) Airborne fungal communities between the habitat (forest in light-blue and vineyard in dark-blue), depending on the sampling date. The stress value associated with this representation was 0.188. Dissimilarities between samples were computed with the Bray-Curtis index, averaged over 100 random rarefactions of the OTU table. The confidence ellipsoid at the 0.68 level is shown, for all combinations of these two factors.

Table 3: Effect of sampling date (May, July or October), host species (oak, hornbeam, chestnut or grapevine) or habitat (vineyard or forest), edge (habitat centre or center) and their interaction on the composition of foliar and airborne fungal communities, assessed using a PERMANOVA. In both models, sampling site was included as a stratification variable. Bold values are the significant ones.

	F	R^2	P -value
Foliar OTU richness			
Date	10.13	0.078	0.001
Species	13.7	0.158	0.001
Edge	3.94	0.015	0.001
D x Sp	6.92	0.16	0.001
D x E	2.05	0.016	0.007
Sp x E	2.22	0.026	0.001
D x Sp x E	1.08	0.025	0.239
Airborne OTU richness			
Date	2.94	0.157	0.001
Habitat	1.54	0.041	0.062
Edge	0.68	0.018	0.827
D x H	0.95	0.051	0.418
D x E	0.66	0.035	0.938
H x E	0.77	0.02	0.684
D x H x E	0.71	0.038	0.878

Discussion

To our knowledge, this is the first time that the spatial structure and the temporal dynamic of foliar and airborne fungal communities are assessed simultaneously at the landscape scale. We studied a landscape mosaic consisting of two main habitats, vineyard and forest patches. We expected that repeated dispersal events between habitat patches would homogenize the foliar communities over the course of the growing season. We expected the homogenization to be greater along habitat edges, where grapevine stocks and forest trees are closer to each other.

Accordingly, we found that 26% of the OTUs are shared between airborne and foliar fungal communities. The most abundant ones are principally generalist species, such as *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium sp.* or *Eppicoccum nigrum*, which were already found as abundant in the microbiome of many species (Jumpponen & Jones, 2009; Pinto & Gomes, 2016; Zambell & White, 2014). This result confirms that many fungal species disperse through the atmosphere (Brown & Hovmøller, 2002; Bulgarelli et al., 2013; Lindemann et al., 1982). Moreover, while the richness of airborne fungal communities was higher in forest patches than in adjacent vineyards, their composition did not differ significantly whatever the season. This lack of spatial variation in airborne fungal communities could account for the high similarity between foliar fungal communities of grapevine and forest tree species at the beginning of the growing season. Flushing leaves in May receive similar pools of fungal species through airborne dispersal, whatever the habitat and the host plant species. Our results suggest that dispersal of foliar fungal communities is not limited at the landscape scale. Similar patterns were already observed at far larger spatial scales. The atmosphere is indeed considered as a continental and inter-continental corridor for the dispersal of microorganisms (Barberán et al., 2014; Brown & Hovmøller, 2002; Finlay, 2002; Womack et al., 2010), resulting in global patterns across continents. However, our results contrast with the strong dispersal limitation observed at smaller scale (Bowers et al., 2013). Peay et al. (2010) found that ectomycorrhizal richness is lower in small tree patches located 1 km away from large tree patches than nearer ones. Dickie & Reich (2005) showed that the abundance and richness of ectomycorrhizal fungi decreased up to 20m away from the forest edge. Galante et al. (2011) also showed that 95% of ectomycorrhizal spores fell within 58cm from the source. While the dispersal of ectomycorrhizal fungi can differ from the foliar fungi because of differences in the height of spore emission (Schmale & Ross, 2015), our failure to detect such dispersal limitation at small spatial scales can be explained by the short time of sampling of airborne communities (30 minutes), which can be insufficient to properly characterize the airborne fungal composition of the whole season.

Against expectation, we found that the composition of the foliar fungal communities of forest tree species and grapevine increasingly diverged from May to October. Besides, a severe decline in the richness of foliar fungal communities was observed in grapevine over the course of the growing season, but not in forest tree species. Despite an identical pool of airborne fungi in vineyards and forests, the selective pressures exerted on foliar fungal communities therefore differ between both habitats. These selective pressures can be exerted by several factors, including the host species, the microclimate and the agricultural practices. Host-specificity has been demonstrated in

foliar fungal communities (Kembel & Mueller, 2014; Lambais et al., 2014; Meiser et al., 2014). Our results paralleled these findings: in forest patches, foliar fungal communities significantly differ among tree species at the end of the growing season. Seasonal variations in leaf physiology could also account for the observed temporal variations in foliar communities, especially the richness decline in grapevine fungal foliar communities. Older grapevine leaves indeed produce larger amounts of phytoalexins and tend to be more resistant to pathogens (Steimetz et al., 2012). Selection by the habitat can also be exerted by the microclimate (Vacher et al., 2016). Harsher microclimatic conditions in vineyards than in forests, especially in the summer, could account for the decline in fungal species richness in vineyards but not in forests. Particularly, greater exposure to UV and higher air temperatures in vineyards could decrease the survival of foliar fungi on grapevine leaves. By contrast, tree cover provides a milder microclimate which could be more suitable to foliar micro-organisms. Finally, selection by the habitat can be exerted by agricultural practices. A few studies showed that fungicide applications can reduce the diversity and alter the composition of the foliar microbial community (Cordero-Bueso et al., 2014; Gu et al., 2010; Karlsson et al., 2014; Moulas et al., 2013). However, several other studies showed that the foliar fungal communities of grapevine are highly resilient to some chemical or biological pesticides (Ottesen et al., 2015; Perazzolli et al., 2014; Walter et al., 2007). Further research is required to assess the influence of fungicide applications on the observed decline in the richness of foliar fungal communities.

Our study also showed, for the first time, significant edge effects on foliar fungal community assemblages. A higher level of foliar fungal community richness was found in oak trees growing at the edge of the forest than in oak trees growing 100 m away. Significant differences in community composition between the edge and the centre of the forest were also found for oak and hornbeam. Variations in microclimate and leaf physiology along the forest edge (Chen et al., 1993; Kunert et al., 2015; Zheng et al., 2005) are more likely to account for this result than species dispersal from vineyards to forest patches, since the foliar fungal communities of the two habitats diverged over the course of the growing season. The absence of edge effect in grapevine foliar fungal communities suggests that dispersal of fungal species from forests to vineyards has little influence on community composition and richness. This result contrasts with the findings of many studies on macro-organisms, reporting that dispersal events between managed and non-managed habitats shape communities and influence ecosystem functioning and services (Blitzer et al., 2012; Chaplin-Kramer et al., 2011; Rusch et al., 2010; Thomson & Hoffmann, 2009; Thomson et al., 2010).

Conclusions

Our results suggest that dispersal events between habitat patches are not major drivers of foliar fungal communities at the landscape scale. Selective pressures exerted in each habitat by the plant host, the microclimate and the agricultural practices play a greater role, and might account for the differentiation of foliar fungal communities between habitats. However, our experimental design does not allow us to assess the relative influence of each factor in shaping foliar fungal communities. Our results suggest that the leaves of broad-leaf species are colonised by similar pools of airborne

micro-organisms at the beginning of the growing season. The composition of foliar fungal communities then diverges between habitat patches and between plant species within the same habitat. In contrast, airborne communities remain similar between habitats. Overall, our results support those of Redford et al. (2010) and Morrison-Whittle & Goddard (2015) which indicated that selection predominates over dispersal in structuring plant microbial communities.

Acknowledgements

We thank the vineyard managers for allowing us to carrying out these experiments in their domains: Nicolas Lesaint in Château Reignac, Mathieu Arroyo in Château Couhins, and Antoine Le Grix de la Salle in Château Grand-Verdus. We thank Morgane Petitgenet for assistance with sample collection, and Olivier Fabreguettes and Jessica Vallance for providing help and advice for DNA extraction and bioinformatic analyses. We thank the entire LGC genomics team for assistance and advice concerning sequencing.

References

- Bálint, M., Schmidt, P.-A., Sharma, R., Thines, M., & Schmitt, I. (2014). An Illumina metabarcoding pipeline for fungi. *Ecology and Evolution*, *4*, 2642–2653.
- Barberán, A., Henley, J., Fierer, N., & Casamayor, E. O. (2014). Structure, inter-annual recurrence, and global-scale connectivity of airborne microbial communities. *Science of The Total Environment*, *487*, 187–195.
- Bastian, O. (2001). Landscape Ecology – towards a unified discipline? *Landscape Ecology*, *16*, 757–766.
- Beckstead, J., Meyer, S. E., Connolly, B. M., Huck, M. B., & Street, L. E. (2010). Cheatgrass facilitates spillover of a seed bank pathogen onto native grass species. *Journal of Ecology*, *98*, 168–177.
- Benjamini, Y., & Yekutieli, D. (2001). The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. *Annals of Statistics*, *29*, 1165–1188.
- Blitzer, E. J., Dormann, C. F., Holzschuh, A., Klein, A.-M., Rand, T. A., & Tscharnkte, T. (2012). Spillover of functionally important organisms between managed and natural habitats. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, *146*, 34–43.
- Bowers, R. M., Clements, N., Emerson, J. B., Wiedinmyer, C., Hannigan, M. P., & Fierer, N. (2013). Seasonal Variability in Bacterial and Fungal Diversity of the Near-Surface Atmosphere. *Environmental Science & Technology*, *47*, 12097–12106.
- Brown, J. K. M., & Hovmøller, M. S. (2002). Aerial Dispersal of Pathogens on the Global and Continental Scales and Its Impact on Plant Disease. *Science*, *297*, 537–541.

- Bulgarelli, D., Schlaeppli, K., Spaepen, S., van Themaat, E. V. L., & Schulze-Lefert, P. (2013). Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. In S. S. Merchant (Ed.), *Annual Review of Plant Biology*, Vol 64 (pp. 807–838). Palo Alto: Annual Reviews volume 64. WOS:000321699500032.
- Chaplin-Kramer, R., O'Rourke, M. E., Blitzer, E. J., & Kremen, C. (2011). A meta-analysis of crop pest and natural enemy response to landscape complexity. *Ecology Letters*, 14, 922–932.
- Chen, J., Franklin, J. F., & Spies, T. A. (1993). Contrasting microclimates among clearcut, edge, and interior of old-growth Douglas-fir forest. *Agricultural and Forest Meteorology*, 63, 219–237.
- Cordero-Bueso, G., Arroyo, T., & Valero, E. (2014). A long term field study of the effect of fungicides penconazole and sulfur on yeasts in the vineyard. *International Journal of Food Microbiology*, 189, 189–194.
- Cordier, T., Robin, C., Capdevielle, X., Fabreguettes, O., Desprez-Loustau, M.-L., & Vacher, C. (2012). The composition of phyllosphere fungal assemblages of European beech (*Fagus sylvatica*) varies significantly along an elevation gradient. *New Phytologist*, 196, 510–519.
- Dickie, I. A., & Reich, P. B. (2005). Ectomycorrhizal fungal communities at forest edges. *Journal of Ecology*, 93, 244–255.
- Edgar, R. C. (2013). UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature Methods*, 10, 996–998.
- Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C., & Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 27, 2194–2200.
- Esling, P., Lejzerowicz, F., & Pawlowski, J. (2015). Accurate multiplexing and filtering for high-throughput amplicon-sequencing. *Nucleic Acids Research*, 43, 2513–2524.
- Finlay, B. J. (2002). Global Dispersal of Free-Living Microbial Eukaryote Species. *Science*, 296, 1061–1063.
- Galan, M., Razzauti, M., Bard, E., Bernard, M., Brouat, C., Charbonnel, N., Dehne-Garcia, A., Loiseau, A., Tatard, C., Tamisier, L., Vayssier-Taussat, M., Vignes, H., & Cosson, J. F. (2016). 16s rRNA amplicon sequencing for epidemiological surveys of bacteria in wildlife: the importance of cleaning post-sequencing data before estimating positivity, prevalence and co-infection. *bioRxiv*, (p. 039826).
- Galante, T. E., Horton, T. R., & Swaney, D. P. (2011). 95% of basidiospores fall within 1 m of the cap: a field-and modeling-based study. *Mycologia*, 103, 1175–1183.
- Gu, L., Bai, Z., Jin, B., Hu, Q., Wang, H., Zhuang, G., & Zhang, H. (2010). Assessing the impact of fungicide enostroburin application on bacterial community in wheat phyllosphere. *Journal of Environmental Sciences*, 22, 134–141.
- Hanson, C. A., Fuhrman, J. A., Horner-Devine, M. C., & Martiny, J. B. (2012). Beyond biogeographic patterns: processes shaping the microbial landscape. *Nature Reviews Microbiology*, 10, 497–506.

- Herr, D. G. (1986). On the History of ANOVA in Unbalanced, Factorial Designs: The First 30 Years. *The American Statistician*, 40, 265–270.
- Hughes, J. B., & Hellmann, J. J. (2005). The Application of Rarefaction Techniques to Molecular Inventories of Microbial Diversity. (pp. 292–308). Academic Press volume 397 of *Environmental Microbiology*.
- Hurst, Z. M., McCleery, R. A., Collier, B. A., Fletcher, R. J., Jr, Silvy, N. J., Taylor, P. J., & Monadjem, A. (2013). Dynamic Edge Effects in Small Mammal Communities across a Conservation-Agricultural Interface in Swaziland. *PLoS ONE*, 8, e74520.
- Ihrmark, K., Bodeker, I. T. M., Cruz-Martinez, K., Friberg, H., Kubartova, A., Schenck, J., Strid, Y., Stenlid, J., Brandström-Durling, M., Clemmensen, K. E., & Lindahl, B. D. (2012). New primers to amplify the fungal ITS2 region – evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 82, 666–677.
- Jakuschkin, B., Fievet, V., Schwaller, L., Fort, T., Robin, C., & Vacher, C. (2016). Deciphering the Pathobiome: Intra- and Interkingdom Interactions Involving the Pathogen *Erysiphe alphitoides*. *Microbial Ecology*, (pp. 1–11).
- Jaspers, M. V., Seyb, A. M., Trought, M. C. T., & Balasubramaniam, R. (2015). Necrotic grapevine material from the current season is a source of *Botrytis cinerea* inoculum. *European Journal of Plant Pathology*, 144, 811–820.
- Jumpponen, A., & Jones, K. L. (2009). Massively parallel 454 sequencing indicates hyperdiverse fungal communities in temperate *Quercus macrocarpa* phyllosphere. *New Phytologist*, 184, 438–448.
- Karlsson, I., Friberg, H., Steinberg, C., & Persson, P. (2014). Fungicide effects on fungal community composition in the wheat phyllosphere. *PLoS ONE*, 9, e111786.
- Kembel, S. W., & Mueller, R. C. (2014). Plant traits and taxonomy drive host associations in tropical phyllosphere fungal communities. *Botany*, 92, 303–311.
- Köljal, U., Nilsson, R. H., Abarenkov, K., Tedersoo, L., Taylor, A. F. S., Bahram, M., Bates, S. T., Bruns, T. D., Bengtsson-Palme, J., Callaghan, T. M., Douglas, B., Drenkhan, T., Eberhardt, U., Dueñas, M., Grebenc, T., Griffith, G. W., Hartmann, M., Kirk, P. M., Kohout, P., Larsson, E., Lindahl, B. D., Lücking, R., Martín, M. P., Matheny, P. B., Nguyen, N. H., Niskanen, T., Oja, J., Peay, K. G., Peintner, U., Peterson, M., Pöldmaa, K., Saag, L., Saar, I., Schüßler, A., Scott, J. A., Senés, C., Smith, M. E., Suija, A., Taylor, D. L., Telleria, M. T., Weiss, M., & Larsson, K.-H. (2013). Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Molecular Ecology*, 22, 5271–5277.
- Kunert, N., Aparecido, L. M. T., Higuchi, N., Santos, J. d., & Trumbore, S. (2015). Higher tree transpiration due to road-associated edge effects in a tropical moist lowland forest. *Agricultural and Forest Meteorology*, 213, 183–192.
- Lacasella, F., Gratton, C., Felici, S. D., Isaia, M., Zapparoli, M., Marta, S., & Sbordoni, V. (2014). Asymmetrical responses of forest and “beyond edge” arthropod communities across a forest–grassland ecotone. *Biodiversity and Conservation*, 24, 447–465.

- Lambais, M. R., Lucheta, A. R., & Crowley, D. E. (2014). Bacterial community assemblages associated with the phyllosphere, dermosphere, and rhizosphere of tree species of the atlantic forest are host taxon dependent. *Microbial Ecology*, (pp. 1–8).
- Lindemann, J., Constantinidou, H. A., Barchet, W. R., & Upper, C. D. (1982). Plants as Sources of Airborne Bacteria, Including Ice Nucleation-Active Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 44, 1059–1063.
- Lindow, S. E., & Leveau, J. H. (2002). Phyllosphere microbiology. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 238–243.
- Ma, M., Hietala, R., Kuussaari, M., & Helenius, J. (2013). Impacts of edge density of field patches on plant species richness and community turnover among margin habitats in agricultural landscapes. *Ecological Indicators*, 31, 25–34.
- Madden, T. (2013). The BLAST sequence analysis tool. In *The NCBI Handbook*. National Center for Biotechnology Information (US). (2nd ed.).
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2014). Waste Not, Want Not: Why Rarefying Microbiome Data Is Inadmissible. *PLoS Computational Biology*, 10.
- Meiser, A., Bálint, M., & Schmitt, I. (2014). Meta-analysis of deep-sequenced fungal communities indicates limited taxon sharing between studies and the presence of biogeographic patterns. *New Phytologist*, 201, 623–635.
- Morris, C. E. (2001). Phyllosphere. In *Encyclopedia of Life Sciences*. London: Nature Publishing Group.
- Morrison-Whittle, P., & Goddard, M. R. (2015). Quantifying the relative roles of selective and neutral processes in defining eukaryotic microbial communities. *The ISME Journal*, 9, 2003–2011.
- Moulas, C., Petsoulas, C., Rousidou, K., Perruchon, C., Karas, P., & Karpouzas, D. G. (2013). Effects of systemic pesticides imidacloprid and metalaxyl on the phyllosphere of pepper plants. *BioMed Research International*, 2013, 1–8.
- Nemergut, D. R., Schmidt, S. K., Fukami, T., O'Neill, S. P., Bilinski, T. M., Stanish, L. F., Knelman, J. E., Darcy, J. L., Lynch, R. C., Wickey, P., & Ferrenberg, S. (2013). Patterns and processes of microbial community assembly. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77, 342–356.
- Newton, A., Gravouil, C., & Fountaine, J. (2010a). Managing the ecology of foliar pathogens: ecological tolerance in crops. *Annals of Applied Biology*, 157, 343–359.
- Newton, A. C., Fitt, B. D. L., Atkins, S. D., Walters, D. R., & Daniell, T. J. (2010b). Pathogenesis, parasitism and mutualism in the trophic space of microbe–plant interactions. *Trends in Microbiology*, 18, 365–373.
- Nguyen, N. H., Smith, D., Peay, K., & Kennedy, P. (2015). Parsing ecological signal from noise in next generation amplicon sequencing. *New Phytologist*, 205, 1389–1393.

- Nilsson, R. H., Veldre, V., Hartmann, M., Unterseher, M., Amend, A., Bergsten, J., Kristiansson, E., Ryberg, M., Jumpponen, A., & Abarenkov, K. (2010). An open source software package for automated extraction of ITS1 and ITS2 from fungal ITS sequences for use in high-throughput community assays and molecular ecology. *Fungal Ecology*, *3*, 284–287.
- Norris, R. F., & Kogan, M. (2000). Interactions between weeds, arthropod pests, and their natural enemies in managed ecosystems. *Weed Science*, *48*, 94–158.
- Ottesen, A. R., Gorham, S., Pettengill, J. B., Rideout, S., Evans, P., & Brown, E. (2015). The impact of systemic and copper pesticide applications on the phyllosphere microflora of tomatoes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *95*, 1116–1125.
- Peay, K. G., Garbelotto, M., & Bruns, T. D. (2010). Evidence of dispersal limitation in soil microorganisms: Isolation reduces species richness on mycorrhizal tree islands. *Ecology*, *91*, 3631–3640.
- Perazzolli, M., Antonielli, L., Storari, M., Puopolo, G., Pancher, M., Giovannini, O., Pindo, M., & Pertot, I. (2014). Resilience of the natural phyllosphere microbiota of the grapevine to chemical and biological pesticides. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*, 3585–3596.
- Pinto, C., & Gomes, A. C. (2016). *Vitis vinifera* microbiome: from basic research to technological development. *BioControl*, .
- Power, A. G., & Mitchell, C. E. (2004). Pathogen spillover in disease epidemics. *The American Naturalist*, *164*, S79–S89.
- Redford, A. J., Bowers, R. M., Knight, R., Linhart, Y., & Fierer, N. (2010). The ecology of the phyllosphere: geographic and phylogenetic variability in the distribution of bacteria on tree leaves: Biogeography of phyllosphere bacterial communities. *Environmental Microbiology*, *12*, 2885–2893.
- Ruinen, J. (1956). Occurrence of *Beijerinckia* species in the ‘phyllosphere’. *Nature*, *177*, 220–221.
- Rusch, A., Valantin-Morison, M., Sarthou, J.-P., & Roger-Estrade, J. (2010). Biological control of insect pests in agroecosystems: effects of crop management, farming systems, and seminatural habitats at the landscape scale: a review. In D. L. Sparks (Ed.), *Advances in Agronomy* (pp. 219–259). volume 109.
- Schmale, D. G. I., & Ross, S. D. (2015). Highways in the Sky: Scales of Atmospheric Transport of Plant Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, *53*, 591–611.
- Steimetz, E., Trouvelot, S., Gindro, K., Bordier, A., Poinssot, B., Adrian, M., & Daire, X. (2012). Influence of leaf age on induced resistance in grapevine against *Plasmopara viticola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *79*, 89–96.
- Thomson, L. J., & Hoffmann, A. A. (2009). Vegetation increases the abundance of natural enemies in vineyards. *Biological Control*, *49*, 259–269.

- Thomson, L. J., McKenzie, J., Sharley, D. J., Nash, M. A., Tsitsilas, A., & Hoffmann, A. A. (2010). Effect of woody vegetation at the landscape scale on the abundance of natural enemies in Australian vineyards. *Biological Control*, 54, 248–254.
- Turner, T. R., James, E. K., & Poole, P. S. (2013). The plant microbiome. *Genome Biol*, 14, 209.
- Vacher, C., Hampe, A., Porté, A. J., Sauer, U., Compant, S., & Morris, C. E. (2016). The Phyllosphere: Microbial Jungle at the Plant–Climate Interface. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 47.
- Vellend, M. (2010). Conceptual synthesis in community ecology. *The Quarterly review of biology*, 85, 183–206.
- Vorholt, J. A. (2012). Microbial life in the phyllosphere. *Nature Reviews Microbiology*, 10, 828–840.
- Walter, M., Frampton, C. M., Boyd-Wilson, K. S. H., Harris-Virgin, P., & Waipara, N. W. (2007). Agrichemical impact on growth and survival of non-target apple phyllosphere microorganisms. *Canadian Journal of Microbiology*, 53, 45–55.
- Whipps, J., Hand, P., Pink, D., & Bending, G. (2008). Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. *Journal of Applied Microbiology*, 105, 1744–1755.
- Wilson, H. E., Carroll, G. C., Roy, B. A., & Blaisdell, G. K. (2014). Tall fescue is a potential spillover reservoir host for *Alternaria* species. *Mycologia*, 106, 22–31.
- Womack, A. M., Bohannon, B. J. M., & Green, J. L. (2010). Biodiversity and biogeography of the atmosphere. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 365, 3645–3653.
- Xu, X.-M., Jeffries, P., Pautasso, M., & Jeger, M. J. (2011). Combined use of biocontrol agents to manage plant diseases in theory and practice. *Phytopathology*, 101, 1024–1031.
- Zambell, C. B., & White, J. F. (2014). In the forest vine *Smilax rotundifolia*, fungal epiphytes show site-wide spatial correlation, while endophytes show evidence of niche partitioning. *Fungal Diversity*, 75, 279–297.
- Zheng, D., Chen, J., LeMoine, J. M., & Euskirchen, E. S. (2005). Influences of land-use change and edges on soil respiration in a managed forest landscape, WI, USA. *Forest Ecology and Management*, 215, 169–182.

Supplementary material

Table S1: Detailed characteristics of each sampling site. Active substance abbreviations: *f-al* = *fosetyl-al*, *pp* = *potassium phosphate*, *Cu* = *cuivre*, *S* = *sulphur*, *myb* = *myclobutanil*, *mta* = *metiram*, *tfx* = *trifloxystrobin*, *qxf* = *quinoxifen*, *mz* = *mancozeb*, *mf* = *mefenoxam*, *tb* = *tebuconazole*, *dm* = *deltamethrin*, *zx* = *zoxamide*, *cy* = *cymoxanil*.

	Reignac	Grand-Verdus	Couhins
General characteristics			
GPS	N 44° 54' 03'' W 0° 25' 01''	N 44° 47' 21'' W 0° 24' 06''	N 44° 45' 04'' W 0° 33' 53''
Sampling dates	23 rd May 18 th July 3 rd October	15 th May 16 th July 3 rd October	22 th May 18 th July 3 rd October
Vineyard characteristics			
Grape variety	Cabernet-sauvignon	Cabernet-sauvignon	Merlot
Growing method	Conventional	Conventional	Conventional
Transect direction from forest edge	South-West	West	North
Vineyard row orientation with respect to the edge	Parallel	Perpendicular	Perpendicular
Days between last chemical treatment and sampling (<i>active substance</i>)			
May	10 d (<i>tfx</i> , <i>mz</i> , <i>mf</i>)	9 d (<i>folpel</i> , <i>f-al</i> , <i>qxf</i> , <i>myb</i>)	6 d (<i>mta</i> , <i>f-al</i> , <i>tb</i>)
July	7 d (<i>mta</i> , <i>cy</i> , <i>pp</i> , <i>S</i>)	18 d (<i>folpel</i> , <i>f-al</i> , <i>qxf</i> , <i>myb</i>)	3 d (<i>Cu</i> , <i>S</i>)
October	36 d (<i>Cu</i> , <i>dm</i>)	60 d (<i>Cu</i> , <i>zx</i>)	10 d (<i>Cu</i>)
Forest characteristics			
Species sampled	Oak, hornbeam	Oak, hornbeam	Oak, chestnut
Transect direction from vineyard edge	North-East	East	South
Edge characteristics			
Edge width	5.0 m	3.5 m	6.0 m

Table S2: Bray-Curtis dissimilarity of foliar fungal communities between each pair of host species and for each sampling date. These values were calculated exclusively with dissimilarity between samples within sampling sites (mean $\pm$ SD).

	F	R^2	P -value
Foliar OTU richness			
Date	10.13	0.078	0.001
Species	13.7	0.158	0.001
Edge	3.94	0.015	0.001
D x Sp	6.92	0.16	0.001
D x E	2.05	0.016	0.007
Sp x E	2.22	0.026	0.001
D x Sp x E	1.08	0.025	0.239
Airborne OTU richness			
Date	2.94	0.157	0.001
Habitat	1.54	0.041	0.062
Edge	0.68	0.018	0.827
D x H	0.95	0.051	0.418
D x E	0.66	0.035	0.938
H x E	0.77	0.02	0.684
D x H x E	0.71	0.038	0.878

Table S3: Results of PERMANOVA for OTU composition for both foliar and airborne fungal communities. The response variables are averaged Jaccard dissimilarity matrices, computed over 100 rarefactions of the OTU matrix. In both models, sampling site was included as a stratification variable. The values in bold are significant.

			May	July	October
Grapevine	-	Oak	0.47 $\pm$ 0.07	0.67 $\pm$ 0.09	0.91 $\pm$ 0.06
Grapevine	-	Hornbeam	0.50 $\pm$ 0.08	0.65 $\pm$ 0.12	0.86 $\pm$ 0.06
Grapevine	-	Chestnut	0.49 $\pm$ 0.09	0.52 $\pm$ 0.08	0.92 $\pm$ 0.03
Oak	-	Hornbeam	0.47 $\pm$ 0.08	0.57 $\pm$ 0.11	0.72 $\pm$ 0.10
Oak	-	Chestnut	0.45 $\pm$ 0.03	0.55 $\pm$ 0.09	0.78 $\pm$ 0.09

Table S4: ANOVA table performed on the richness calculated with the unrarefied OTU table. Effect of the abundance (number of sequences per sample), sampling date (May, July or October), host species (oak, hornbeam, chestnut or grapevine) or habitat (vineyard or forest), edge (habitat centre or center) and their interaction on OTU richness in foliar and airborne fungal communities. In both models, sampling site was included as a random variable. Rm^2 is the marginal coefficient of determination (for fixed effects) and Rc^2 the conditional coefficient of determination (for fixed and random effects). Bold values are the significant ones.

	F	P-value	Rm^2 (Rc^2)
	Foliar OTU richness		
Abundance	57.13	<0.001	0.62 (0.63)
Date	1.63	0.199	
Species	12.92	<0.001	
Edge	11.26	0.001	
D x S	9.2	<0.001	
D x E	1.21	0.301	
S x E	5.56	0.001	
D x S x E	1.21	0.306	
	Airborne OTU richness		
Abundance	28.66	<0.001	0.57 (0.66)
Date	0.24	0.786	
Habitat	5.49	0.029	
Edge	1.23	0.279	
D x H	0.34	0.717	
D x E	0.18	0.833	
H x E	0.08	0.78	
D x H x E	0.05	0.948	

Table S5: PERMANOVA table, performed on the Bray-Curtis dissimilarity matrix calculated with the unrarefied OTU matrix. Effect of sampling date (May, July or October), host species (oak, hornbeam, chestnut or grapevine) or habitat (vineyard or forest), edge (habitat centre or center) and their interaction on the composition of foliar and airborne fungal communities. In both models, sampling site was included as a stratification variable. Bold values are the significant ones.

	F	R^2	P-value
Foliar OTU richness			
Abundance	49.21	0.177	0.001
Date	6.8	0.049	0.001
Species	8.6	0.093	0.001
Edge	3.4	0.012	0.001
D x Sp	5.78	0.125	0.001
D x E	1.73	0.012	0.022
Sp x E	2.02	0.022	0.003
D x Sp x E	1.08	0.023	0.266
Airborne OTU richness			
Abundance	6.49	0.157	0.001
Date	1.83	0.089	0.007
Habitat	1.43	0.035	0.086
Edge	0.79	0.019	0.696
D x H	0.72	0.035	0.895
D x E	0.8	0.039	0.808
H x E	0.97	0.023	0.418
D x H x E	0.94	0.046	0.484

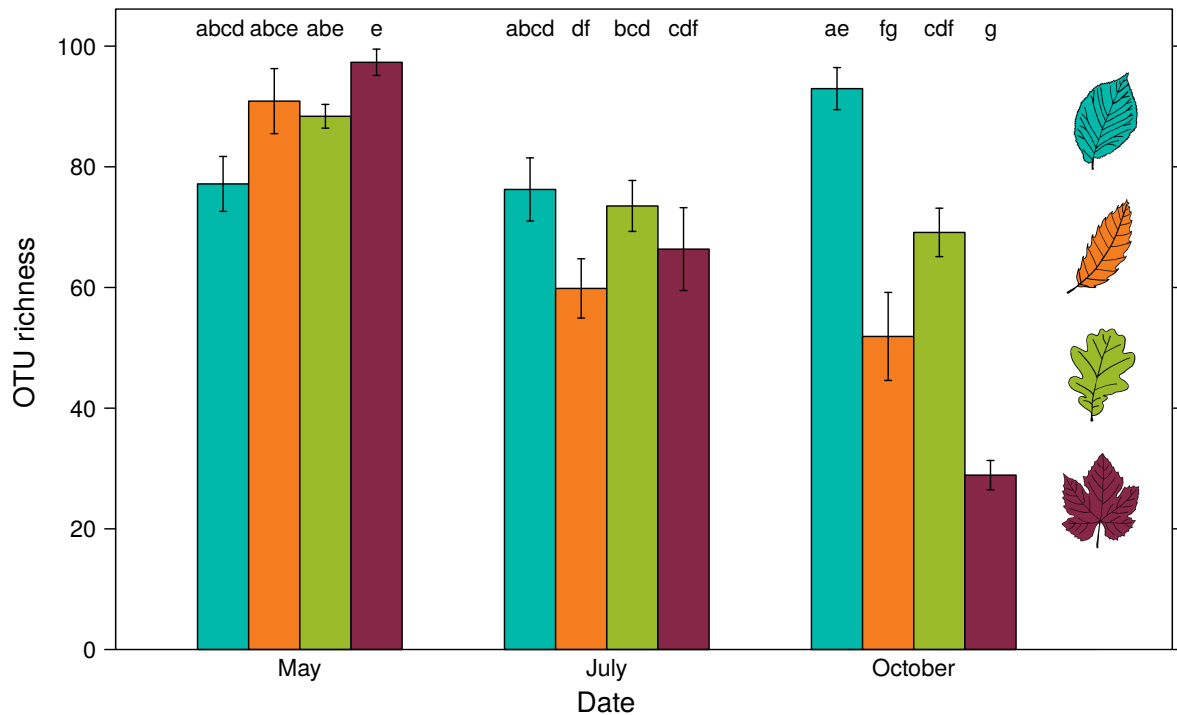


Figure S1: OTU richness of foliar fungal communities for all host species, depending on the sampling date. Oak fungal foliar community richness is represented in green, hornbeam in blue, chestnut in orange and grapevine in red. Error bars represent the SE of the mean. Different letters indicate significant differences in mean (Tukey's post-hoc pairwise comparison test).

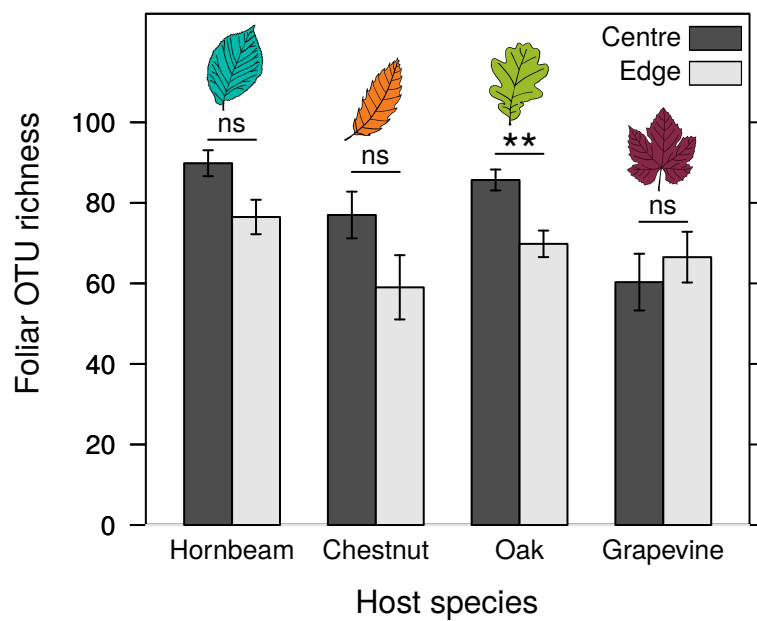


Figure S2: Edge effect on the OTU richness of foliar fungal communities for all host species. Error bars represent the SE of the mean.

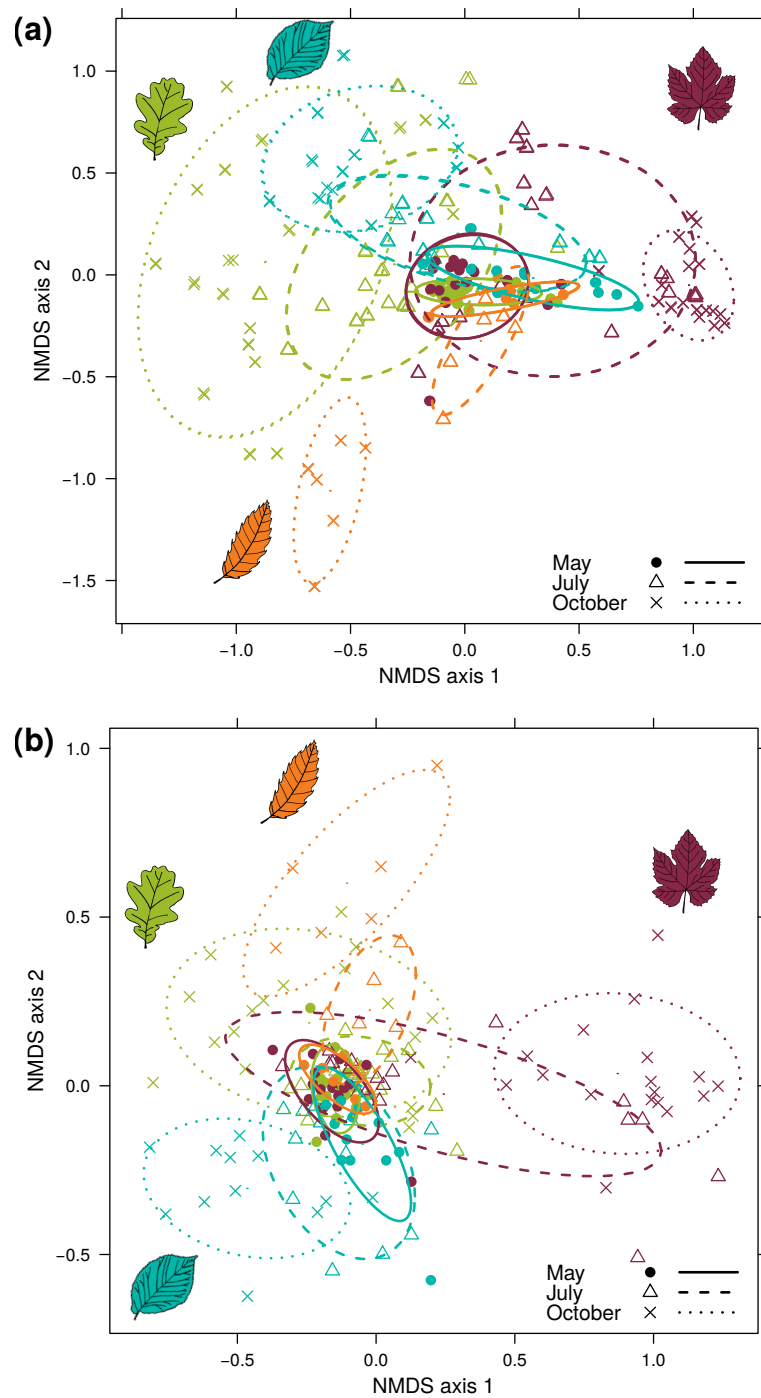


Figure S3: NMDS representing foliar fungal community dissimilarities. (a) Bray-Curtis dissimilarities, computed over 100 random rarefaction matrices. The stress value associated with these representations was 0.170. (b) Jaccard dissimilarities, computed over 100 random rarefaction matrices. The stress value associated with these representations was 0.158. Each point represents a sample: colours indicate the host species (hornbeam in blue, chestnut in orange, oak in green and grapevine in red) and the shape of the symbol indicates the sampling date. The confidence ellipsoid at the 0.68 level is shown for all combinations of these two factors.

Chapitre 4

Effet d'une lisière forestière sur les communautés fongiques de la vigne

Adjacent semi-natural habitats influence airborne but not foliar fungal communities in vineyards

Thomas Fort¹, Corinne Vacher², Luc Barbaro³, and Cécile Robin¹

¹BIOGECO, UMR 1202, INRA, Université de Bordeaux, F-33610 Cestas, France

²BIOGECO, UMR 1202, INRA, Université de Bordeaux, F-33615 Pessac, France

³DYNAFOR, UMR 1201, INRA, Université de Toulouse, INPT-ENSAT, 31326 Castanet Tolosan, France

Article ready for submission in *Applied and Environmental Microbiology*.

Abstract

Background. The dispersal of species through edges between natural and managed habitats can result in local changes of communities and agrosystem functioning. However, the effect of surrounding habitats on crop foliar microbial communities remain understudied. Here, we investigated the spatial variability of both airborne and foliar fungal communities in a vineyard, adjoining a forest. We hypothesized that both airborne and foliar communities were richer along the edges of the vineyard, resulting in local spatial changes of community composition.

Methods. We sampled bioaerosols passively deposited and grapevine leaves in a vineyard, along a systematic sampling grid. Airborne and foliar fungal communities were characterized using Illumina high throughput sequencing of the ITS2 region, and OTU richness and composition were monitored.

Results. According to our expectations, airborne fungal communities were richer near the forest edge. The number of OTUs shared with the forest was high across the entire vineyard, but significantly higher near the edge. The composition of airborne communities displayed spatial patterns, mainly due to the distance to the edges. In contrast, grapevine foliar fungal communities were highly similar among themselves and neither edge effect nor spatial pattern were identified.

Discussion. These results suggest that adjacent habitats affect the local pool of fungal species and its spatial structure in the vineyard atmosphere. Yet, grapevine foliar fungal communities remained unchanged: it suggests that dispersal is not a major driver of foliar fungal communities at this scale. We discussed the numerous selective pressures potentially responsible for the homogeneity among grapevine foliar communities.

Keywords: Bioaerosols, Dispersal, Edge, Grapevine, Landscape, Phyllosphere, Selection.

Introduction

Landscapes are heterogeneous and moving mosaics of interacting habitat patches (Bastian, 2001). As such, they play a key role in the dynamics of species interacting with crops, such as arthropod pests or their natural enemies. Agricultural pests and antagonists are particularly studied at the landscape scale because they both affect crop health and ecological functioning (Chaplin-Kramer et al., 2011; Norris & Kogan, 2000). Blitzler et al. (2012) reviewed the migration or dispersal of organisms which occur at the edge of crops and natural or semi-natural habitats, and showed that species communities can be locally modified at crop edges because of the influence of neighbouring habitats. Adjacent habitats can be sources of organisms or propagules which will colonize crop edges or affect communities already occurring at the edges through their dispersal or migration (Evans et al., 2013; Ries & Sisk, 2008; Thomson et al., 2010). Some species inhabiting natural or semi-natural habitats can use resources or shelter not necessary optimal but sufficient for their survival in the neighbouring crops. In addition, adjacent habitat can locally change the environmental conditions at the habitat edge, for instance, through the shading of an adjacent forest (Baker et al., 2013; Chen et al., 1993; Lacasella et al., 2014; Murcia, 1995). For those reasons, edges are often considered as key landscape elements for the structuring of habitat communities (Cadenasso et al., 2003). However, while it has been widely documented for macro-organism communities, the spatial patterns of foliar microbial communities remain unknown near crop edges.

Plant leaves host a large diversity of microorganisms, including many genera of bacteria and fungi (Morris, 2001; Vorholt, 2012). These microorganisms have been studied for several decades because they have important applications in agronomy. Indeed, crop health and performance depend on interactions between pathogenic and beneficial micro-organisms (Newton et al., 2010; Xu et al., 2011). The factors responsible for foliar microbial community variability are more and more understood thanks to the metabarcoding sequencing method which characterizes more precisely the whole microbial communities (Berg et al., 2014; Peršoh, 2015; Vacher et al., 2016). However, little is known about the spatial patterns of foliar microbiome at a landscape scale, particularly at edges between crops and semi-natural habitats.

Edge effects are expected to affect spatial distribution of many microorganisms colonizing leaves through dispersal via the atmosphere (Bulgarelli et al., 2013; Whipps et al., 2008). The lower layers of the atmosphere are often considered as dispersal corridors of particles (Kuparinen et al., 2007; Lymperopoulou et al., 2016; Schmale & Ross, 2015). The three steps of microorganism dispersal - escape from the source, transport in air flows and deposition (Morris et al., 2014) - depend on many environmental and biological factors, such as air turbulence, wind velocity or particle size (Kuparinen et al., 2007; Miller et al., 2015; Norros et al., 2014; Wuyts et al., 2008). The results are spatial and temporal patterns, at local, regional or global scales (Bowers et al., 2011; Peay et al., 2012; Schmale & Ross, 2015; Womack et al., 2010). Neighbouring habitats, which can host a fully different pool of species, can be a source of microorganisms for crops, including pathogens and beneficial species such as natural enemies. While the dispersal of microbial species is supposed to be unlimited at large scale levels (Barberán et al., 2014), some studies showed that dispersal is really efficient at only short

distance from the source. For instance, most of ectomycorrhizal spores only reach few meters from their source of release (Galante et al., 2011; Horton et al., 2013; Peay et al., 2010). Such dispersal events in space can consequently strongly impact foliar microbial communities in neighbouring habitats.

Here, we investigated the spatial variability of both airborne and foliar fungal communities in a vineyard parcel, adjacent to a forest. We hypothesized that the richness of airborne fungal communities would be higher near the forest edge than elsewhere in the parcel because of the dispersal of fungal species from the forest to the vineyard parcel. In addition, we expected a change in fungal community composition near the forest edge. Grapevine fungal foliar communities were supposed to be consequently impacted in the same way.

Materials and methods

Study site

The study site was a vineyard located in the Bordeaux area in France (Fig. 1a), on the property of Château Couhins (N 44° 45' 04", W 0° 33' 53"). The vineyard measured 120m from North to West by 95m from East to West. Its area was of 11 400m². It consisted of two blocks of grapevine (*Vitis vinifera* L.) Merlot cultivar, separated from East to West by a path of 6.5m width (Fig. 1b). The south edge (8.5 m) adjoined a deciduous forest patch, dominated by pedunculate oaks (*Quercus robur* L.), sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) and European hornbeam (*Carpinus betulus* L.). The west, north and north-east edges adjoined other vineyards of the same cultivar, while the south-east edge adjoined a patch of bare soil. A systematic sampling grid of 11m×11m unit was applied on the vineyard, resulting in 99 sampling points. The grid was distorted at the south edge because the edge was not perfectly straight (Fig. 1b). On the nearest wood post of each sampling point, two passive traps of airborne particles were installed, at 120 cm from the soil, near the grapevine canopy. They consisted in plastic petri dishes, installed upside-down on the posts with an iron wire. On each device, a filter paper disc (80mm diameter, 160g/m²) was taped and left during 12 days from the 12 September 2014 in order to collect all the deposited particles from the airborne pool. The pairs of filters were then collected on 24 September using curved forceps cleaned with 96 % ethanol. They were both inserted back-to-back into a single clear plastic bag and frozen until DNA extraction. A single leaf was collected at each point, on the same day, at the base of the cane (around 50 cm from the soil) in order to collect leaves of the same age. Each leaf was collected using scissors cleaned with 96 % ethanol, taking care not to touch them. They were inserted between two sheets of sterile paper filter and stored into clear plastic bags containing silica gel in order to quickly dry the leaves.

The sampling grid was extended inside the forest edge, where nine sampling points were made. Leaves from the most abundant species were collected, including *Quercus robur*, *Castanea sativa* and *Carpinus betulus*. At each point, leaves from the present species were collected on both tree and shrub layers, at a height of around seven and four meters, respectively. Nine pairs of airborne passive traps were installed on tree trunks at 120 cm from the soil. Leaves and passive traps were collected the same day

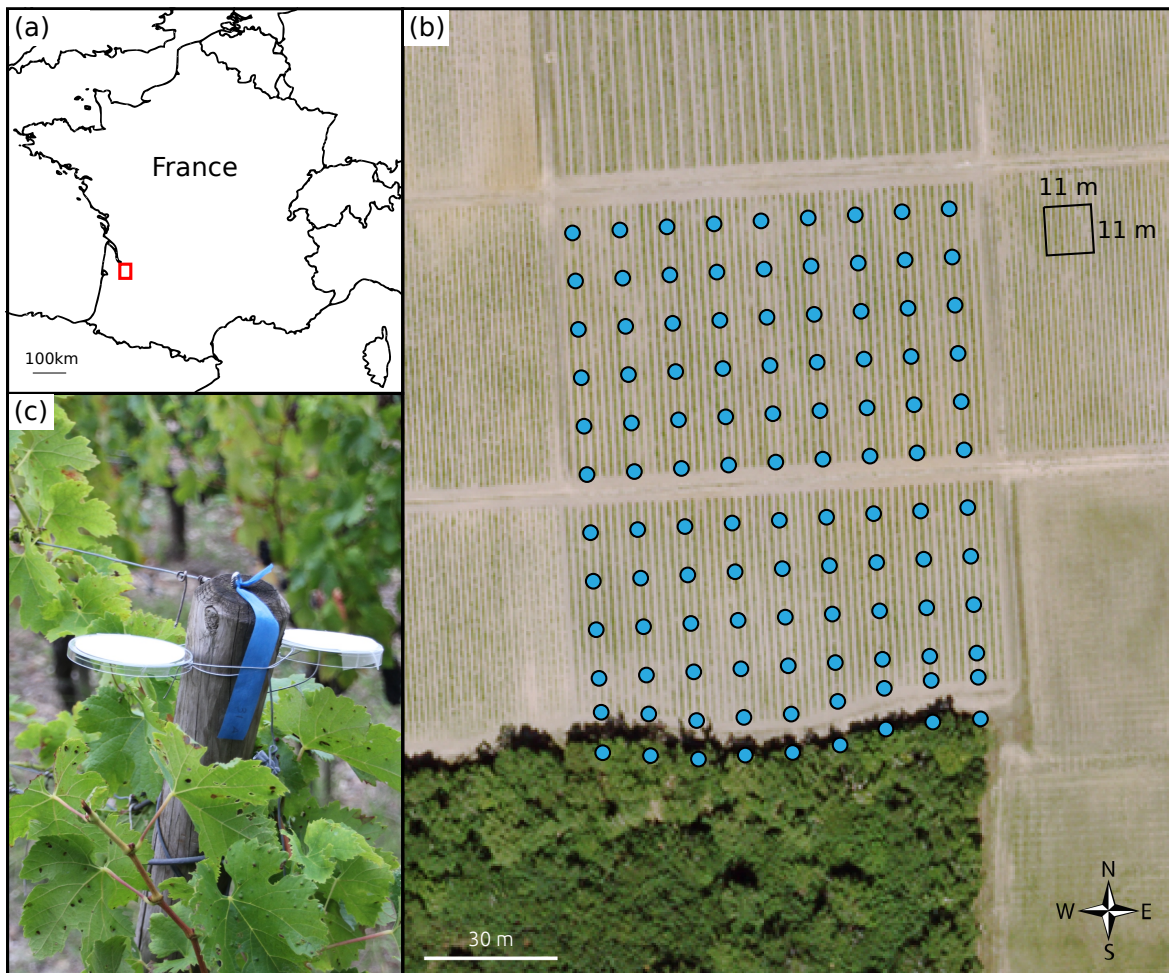


Figure 1: Experimental device. (a) Localisation of the vineyard studied. (b) Position of the points sampled in the vineyard parcel. An airborne trap and a leaf were collected at each point. Ninety-nine samples were made in the vineyard, and nine in the forest edge. (c) Picture of an airborne trap device.

and the same way as in the vineyard.

DNA extraction and sequencing

In order to avoid sample contaminations, all tools and materials required for sample processing and DNA extraction were exposed to UVs during 30 min under a laminar flow hood. On the day of leaf sampling, four discs of 8.0 mm diameter were cut randomly in each leaf under the hood using a hole-punch sterilized with 95 % ethanol and flaming. The four discs were placed in a single well of an autoclaved DNA extraction plate. One well was kept empty and was considered as negative control. Two autoclaved metallic beads were added to each well, and the plant material was ground into a homogeneous powder with a Geno/Grinder 2010 (SPEX Sample Prep, Metuchen, NJ).

Airborne passive traps (filter paper discs) were thawed, washed in their clear bag using sterilized Tris-EDTA 4X buffer solution, heated to 60°C during 40 seconds. The solution was then collected into a 50ml sterile tube. All the collection tubes were centrifuged during 30 minutes at 12 000 RCF at room temperature. The liquid phase was eliminated, and the pellet was transferred into a 2ml Eppendorf tube. The samples were finally frozen at -80°C and freeze-dried. A pair of unexposed filter paper discs was treated in the same way and was considered as a negative control.

Total DNA from each leaf and airborne samples was then extracted with the QIAGEN DNeasy 96 Plant Kit. Foliar DNA samples from all forest species collected on the same spot were pooled together.

Amplification of fungal ITS2 (Internal Transcribed Spacer 2) was performed using the primer pair fITS7 (forward) and ITS4 (reverse) (Ihrmark et al., 2012). Paired-end sequencing (300 bp) was then performed on one run of an Illumina MiSeq sequencer using V3 chemistry. PCR amplification, library sequencing and data pre-processing were carried out by LGC Genomics sequencing service (Berlin, Germany).

Bioinformatic analysis

Sequences were first demultiplexed and filtered. All sequences with tag mismatches, missing tags, one-sided tags or conflicting tag pairs were discarded. Tags and Illumina TruSeq adapters were then clipped from all sequences, and sequences with final length shorter than 100 bases were discarded. All sequences with more than three mismatches with the ITS2 primers were discarded. Primers were then clipped and the sequence fragments were placed in forward-reverse primer orientation. Forward and reverse reads were then combined, and read pair sequences that could not be discarded.

The pipeline developed by Bálint et al. (2014) was used to process the sequences. The ITS2 sequence was first extracted from each sequence with the FungalITSextractor (Nilsson et al., 2010). All the sequences were then concatenated in a single fasta file, after adding the sample code in the label of each sequence. The sequences were dereplicated, sorted and singletons were discarded with VSEARCH (<https://github.com/torognes/vsearch>). The sequences were then clustered into molecular operational taxonomic units (OTUs) with the UPARSE algorithm implemented in USEARCH v8 (Edgar, 2013), with a minimum identity threshold of 97%. Additional chimera detection was performed against the UNITE database (Kõljalg et al., 2013), with the UCHIME algorithm implemented in USEARCH v8 (Edgar et al., 2011). The

OTU table, giving the number of sequence of each OTU for each sample, was created with USEARCH v8.

OTUs were taxonomically assigned with the online BLAST web interface (Madden, 2013) against the GenBank database, by excluding environmental and metagenome sequences. The assignment with the lowest e-value was retained. The full taxonomic lineage of each assignment was retrieved from the GI number information provided by NCBI. All the OTUs assigned to plants or other organisms, and all unassigned OTUs were removed, to ensure that only fungal OTUs were retained.

Statistical analyses

All statistical analyses were performed in the R environment (R Development Core Team, 2006). One hundred random rarefied OTUs matrices were computed, using the smallest number of sequences per sample as a threshold. The number of OTUs per sample (OTU richness) and the dissimilarity between samples (Bray-Curtis index based on abundances) were calculated for each rarefied matrix and averaged.

Moran's indices and empirical semi-variograms were computed to test for richness spatial autocorrelation of both airborne and foliar fungal communities in the vineyard. When autocorrelation was detected, richness values were interpolated in the entire vineyard parcel using the simple kriging method in the geoR package (Ribeiro Jr. & Diggle, 2001), based on a theoretical semivariogram model, estimated by restricted maximum likelihood method without nugget effect. To test whether community richness is higher near the forest edge, simple linear regression models were used. In order to cope with high heteroscedasticity in model residuals, the distances to the south edge were clustered into eleven classes and their effect on airborne and foliar fungal community richness was assessed using ANOVAs and post-hoc pairwise comparisons with the Tukey's method. A pool of airborne forest OTUs and a pool of foliar forest OTUs were estimated with the samples performed in the forest. For each sampling point, the richness was then partitioned into the number of OTUs shared with the forest and those specific of the vineyard. The effect of the distance classes to the south edge on these indices was then performed in the same way than the richness. An indicator species analysis (De Cáceres & Legendre, 2009) was also performed in order to identify OTUs which contribute significantly to the forest, the vineyard edge and the rest of the vineyard communities.

Spatial autocorrelation in community composition was tested using Mantel's correlogramms between averaged Bray-Curtis community dissimilarity matrices and euclidean geographical distances between samples. Dissimilarities in composition between samples were represented using Principal coordinate analysis (PCoA). The two first axes were retrieved and used as proxy of the community composition. When spatial autocorrelation was detected, the two first PCoA axes values were interpolated in the whole vineyard parcel using simple kriging method. The effect of the distance to the edge on the PCoA axes values were assessed using simple linear regression models.

Results

In total, 13 556 235 quality sequences were obtained which clustered into 4 937 OTUs. Overall, 885 OTUs, representing 4 999 539 sequences (37% of the raw OTU table), were not taxonomically assigned to fungi by BLAST. Almost all those OTUs were assigned to plant sequences (Tracheophyta division, 99.0%), principally *Vitis* genus (98.8%), showing that fITS7-ITS4 primers are not specific of fungi. These non-fungal OTUs were removed. The two negative controls contained together only 73 fungal sequences which clustered into 23 OTUs. Some of these OTUs were abundant in the dataset and were assigned to ubiquitous fungal species already described on plant leaves (e.g. the most abundant one, *Aureobasidium pullulans*, Grube et al. 2011; Jumpponen & Jones 2009). Hence, we decided to keep those OTUs in the dataset. Finally, the OTU table used for the analyses contained 4 052 fungal OTUs, corresponding to 8 556 623 sequences. The mean number of sequences per sample was 39 614, ranging from 6 182 to 109 952. This OTU table was used for taxonomical description. Richness and Bray-Curtis averaged indices were calculated over 100 rarefactions of this OTU table, at a threshold of 6 000 sequences per sample.

Both airborne fungi deposited on traps in the vineyard and fungi present on grapevine leaves were dominated by Ascomycota (87.5% and 99.6%, respectively), followed by Basidiomycota (11.6% and 0.4%, respectively). Other divisions and unassigned sequences at the division level represented together less than 1% of the sequences (Fig. 2a). In the vineyard airborne traps, 27 OTUs were found in all the samples, in particular the most abundant ones such as *Aureobasidium pullulans* or *Epicoccum nigrum* (Table 1). In the grapevine leaves, only five OTUs were found in all the leaves collected, and were among the 10 most abundant OTUs (Table 1). 2 547 OTUs were found only in the airborne traps, 58 in leaves, and 606 shared by both compartments. The shared OTUs represented 99.1% of the whole sequences.

Airborne samples were by far richer than foliar ones in the vineyard (mean $\pm$ SD, 163.4 ± 27.2 and 24.6 ± 6.1 respectively ; Fig. 2b) A weak but significant spatial autocorrelation was found for airborne samples under 20m (Moran's $I=0.129$, $p=0.0049$, Supplementary Material Fig. S1), while no autocorrelation was found for foliar samples (Moran's $I=0.044$, $p=0.1579$). The richness of airborne samples changed significantly along the southern edge ($F=5.45$, $p<0.001$) and the eastern edge ($F=4.88$, $p<0.001$, Supplementary Material Fig. S1). Particularly, the traps near the forest edge were richer than all the other classes of distance to the southern edge (Fig. 3a, b). Both richness in forest OTUs and vineyard-specific OTUs changed significantly along the southern edge ($F=7.40$, $p<0.001$ and $F=2.80$, $p=0.005$ respectively ; Fig. 3c). The indicator species analysis performed on airborne samples indicated that 203 OTUs contribute significantly to the group forest *plus* vineyard edge against the remained vineyard samples group. The most abundant one was taxonomically assigned to *Vuilleminia comedens*. For foliar fungal samples, no significant edge effect on the OTU richness was detected, neither for the southern edge ($F=0.76$, $p=0.67$) nor the eastern edge ($F=1.24$, $p=0.29$).

Bray-curtis dissimilarities were on average higher for airborne fungal samples (0.290 ± 0.100 on average) than foliar ones (0.098 ± 0.069 ; Fig. 2c). For airborne traps, a weak but significant positive spatial autocorrelation was found to 40m, and a nega-

Table 1: Taxonomic assignment of the 10 most abundant OTUs by the online BLAST analysis against the GenBank database. The environmental and metagenome sequences were excluded. The occurrence is the number of sample in which the OTU was found, on the 99 airborne traps and 99 leaves collected in the vineyard. Taxa presented as unidentified at the species level (sp.) were assigned to at least two species, with identical e-values. Identity is the percentage identity between the OTU representative sequence and the closest matching sequence in GenBank. The query coverage of all those representative sequences against the closest matching sequence is 100%.

Relative abundance	Occurrence	Putative taxon	GI number	Identity
Vineyard airborne communities				
26.77	99	<i>Aureobasidium pullulans</i>	1034220623	100
21.64	99	<i>Epicoccum nigrum</i>	1031917995	100
13.07	99	<i>Cladosporium sp.</i>	1005816639	100
6.52	99	<i>Epicoccum nigrum</i>	1045857911	99.3
4.72	99	<i>Alternaria sp.</i>	1045859128	100
3.66	99	<i>Pithomyces chartarum</i>	1005817117	100
3.27	99	<i>Aureobasidium sp.</i>	1021395066	100
3.24	99	<i>Rhodotorula sp.</i>	1021759790	100
2.76	99	<i>Sporobolomyces roseus</i>	944204169	100
0.99	99	<i>Sporobolomyces roseus</i>	218664966	97.6
Grapevine foliar communities				
88.93	99	<i>Aureobasidium pullulans</i>	1034220623	100
7.57	99	<i>Erysiphe necator</i>	111434269	100
0.65	99	<i>Cladosporium sp.</i>	1005816639	100
0.58	96	<i>Ramularia sp.</i>	365822679	99.3
0.42	98	<i>Stagonosporopsis sp.</i>	1024251983	100
0.36	95	<i>Aureobasidium sp.</i>	1021395066	100
0.28	99	<i>Epicoccum nigrum</i>	1031917995	100
0.23	99	<i>Alternaria sp.</i>	1045859128	100
0.19	95	<i>Cadophora sp.</i>	1026943332	100
0.18	98	<i>Filobasidium sp.</i>	300681633	100

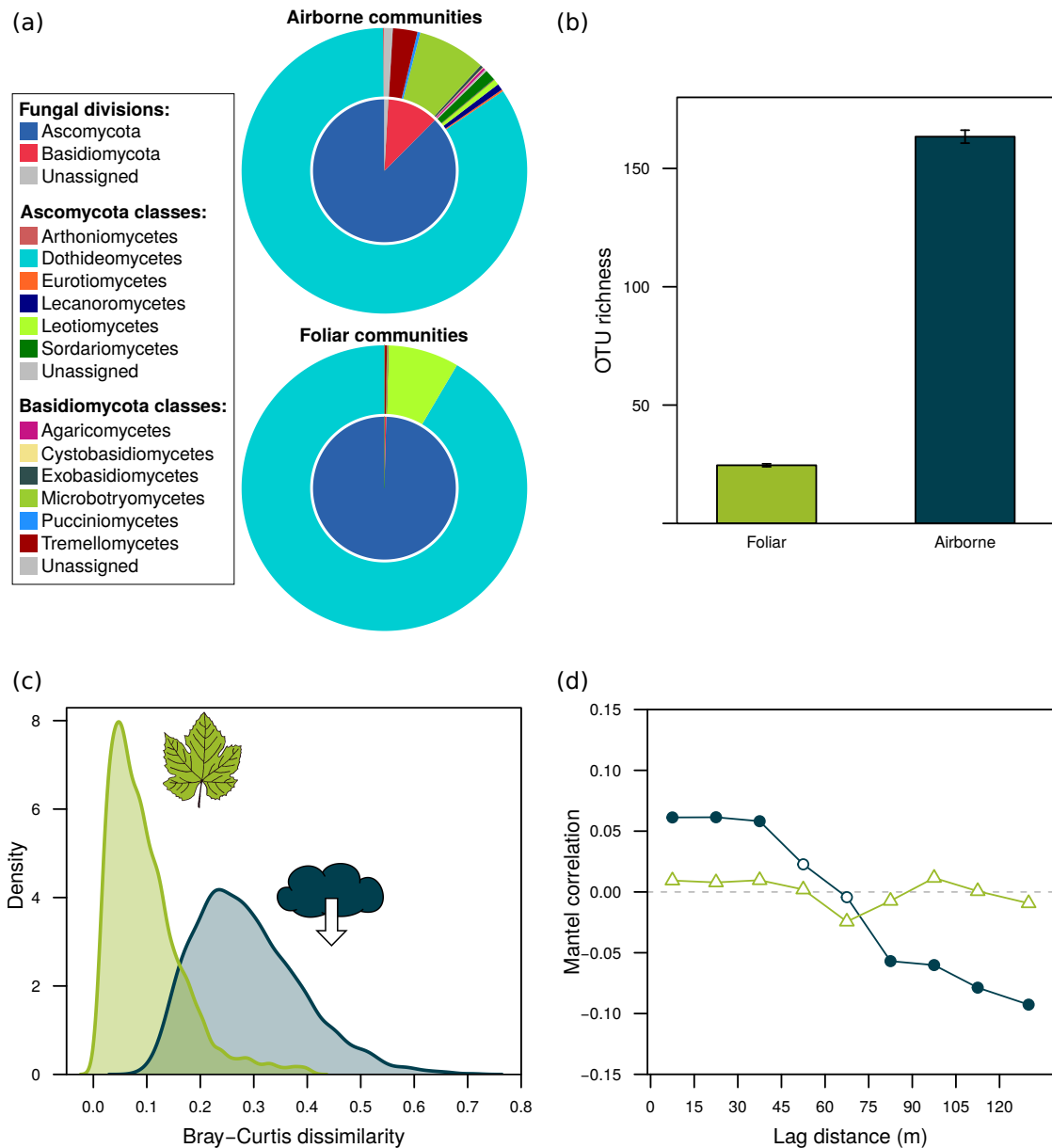


Figure 2: Comparison of airborne and foliar fungal communities in the vineyard. (a) Taxonomic composition of the airborne deposited and foliar fungal communities in the vineyard plot. The inner disc shows the proportion of sequences assigned to each taxonomic division, and the outer disc the proportion of sequences assigned to each class of Ascomycota and Basidiomycota divisions. (b) Average OTU richness. The bars represent the standard error of the mean. (c) Kernel density estimation of the distribution of Bray-Curtis dissimilarity between all the airborne communities (blue) and all the foliar communities (green). (d) Mantel correlograms of the Bray-Curtis dissimilarity between samples and geographical distance, for airborne (blue circles) and foliar (green triangles) fungal communities. The lag distance is the difference of geographical distance between each sample. Filled symbols represent Mantel correlations which significantly differ from zero.

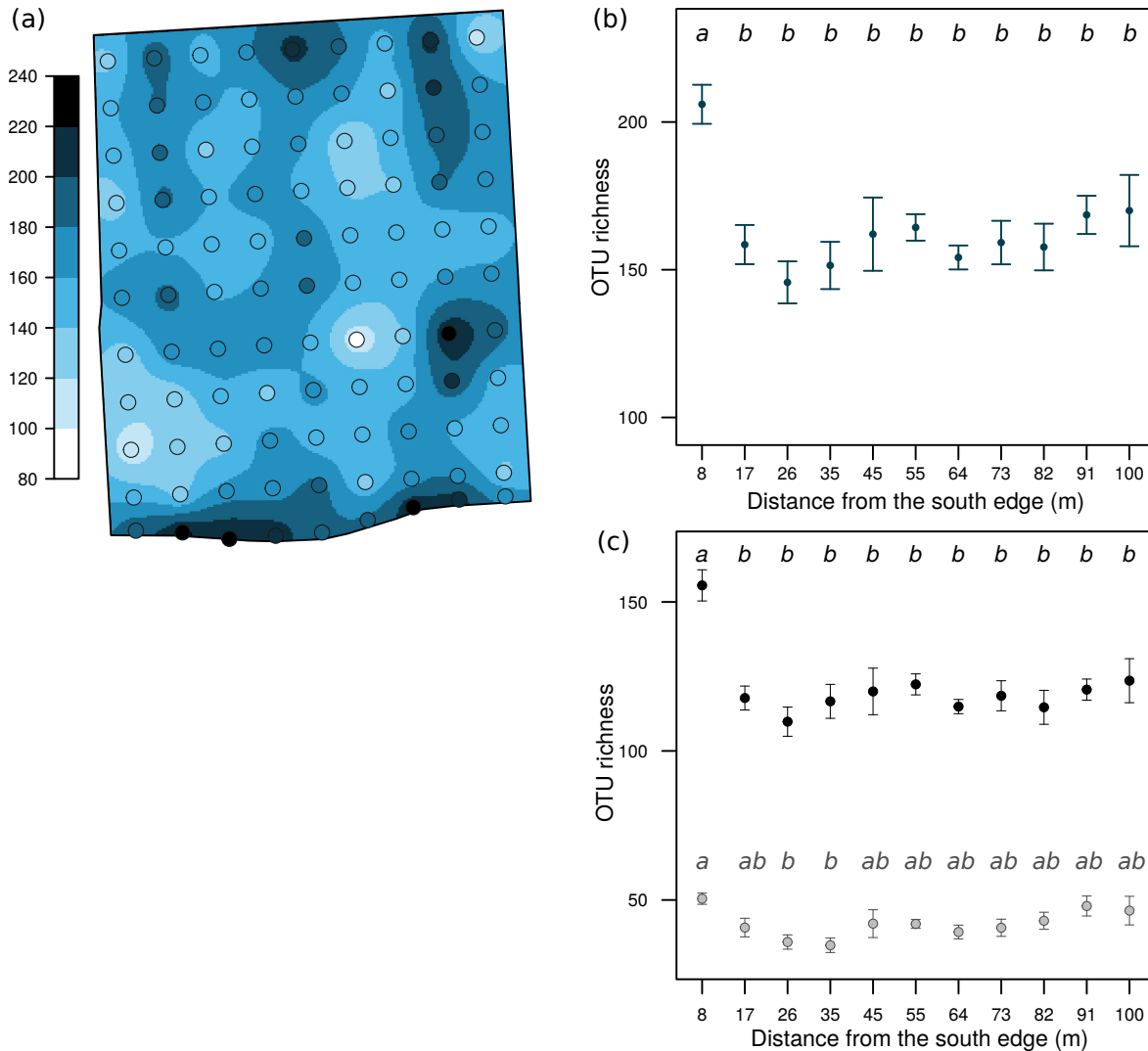


Figure 3: Richness spatial variability of airborne communities. (a) Spatial representation of the OTU richness of the sampled points (circles). Values were interpolated with simple kriging method. (b) Effect of the distance to the south edge of the vineyard parcel on airborne community OTU richness. Points represent the mean OTU richness and error bars the standard error of the mean. Different letters between distance classes indicate significant difference in the Tukey HSD post-hoc tests ($p < 0.05$). (c) Partition of the airborne richness into OTUs shared with the forest (black) and OTUs specific of the vineyard airborne traps (grey).

tive one from 80m (Fig. 2d). No spatial autocorrelation was found on foliar fungal samples beta diversity (Fig. 2d). The first axis of the PCoA performed on airborne samples explained 48.0% of the variance. It exhibited a significant change along the southern edge (ANOVA $F=2.74$, $p=0.006$; Fig. 4a), but was significantly correlated to the airborne OTU richness ($r^2=0.50$, $p<0.001$). This first axis was mainly negatively correlated with the OTU assigned to *Aureobasidium pullulans*. The second axis of the PCoA explained 14.4% of the variance. It exhibited a linear change along the eastern edge (linear regression: $p<0.001$, $r^2=0.26$; Fig. 4b), and was positively correlated with OTUs assigned to *Cladosporium sp.*, *Sporobolomyces roseus* and negatively correlated with *Epicoccum nigrum*. The two first axes of the PCoA performed on foliar fungal samples explained 78.7% and 10.5% of the variance respectively. None of them exhibited any significant changes along the southern edge (ANOVAs: $F=1.62$, $p=0.12$ for the first axis, $F=0.85$, $p=0.58$ for the second axis) nor the eastern one ($F=1.64$, $p=0.13$ for the first axis, $F=1.25$, $p=0.28$ for the second axis).

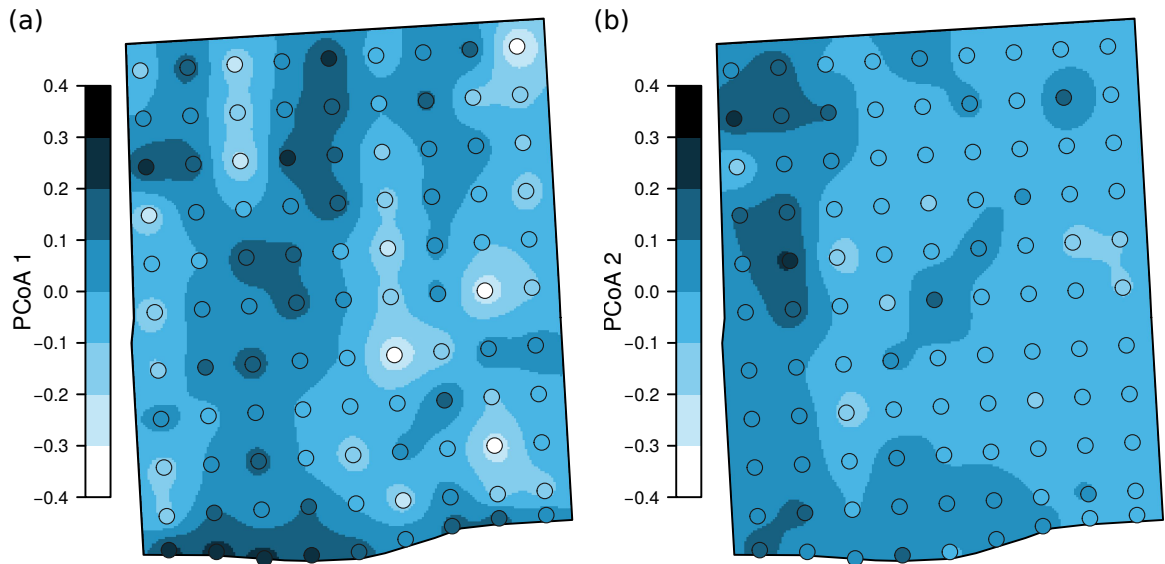


Figure 4: Spatial representation of the first and (a) and second (b) axes of the PCoA, representing the Bray-Curtis dissimilarity between airborne fungal communities. Values were interpolate with simple kriging method.

Discussion

The taxonomic assignments of the OTUs revealed that airborne and fungal communities were both dominated by ubiquitous species such as *Aureobasidium pullulans*, *Epicoccum nigrum* or *Cladosporium spp.*. These species are known to be dominant in bioaerosols (Adams et al., 2013; Pellissier et al., 2016) and plant tissues (Jumpponen et al., 2010; Pinto et al., 2014; Zambell & White, 2014), irrespectively of the ecosystem considered. However, their relative abundance differed strongly between airborne and foliar communities. *Aureobasidium pullulans* was the most dominant OTU of each compartment, but was overwhelmingly dominant in foliar fungal communities (89% versus 27%). This yeast-like fungus is known for dominating grapes (Garijo et al.,

2011; Pinto et al., 2014; Raspor et al., 2010), particularly after successive fungicide applications (Comitini & Ciani, 2008; Martins et al., 2014). The present study was indeed performed late in the season, after many successive pesticide applications. This dominance can be explained by the high competitive abilities of *A. pullulans* on leaves and by its potential higher resilience abilities (Chi et al., 2009; Grube et al., 2011). The second dominant species of foliar communities was the pathogen agent of the powdery mildew, *Erysiphe necator*, while this species was found at less than 1% in the airborne communities. Such difference highlights the selection exerted by the leaf on microbial communities. In the same way, foliar fungi are almost exclusively Ascomycetes, while more Basidiomycetes were found in the air, particularly yeasts such as *Sporobolomyces roseus*.

The taxonomic assignments also disclose the presence, on leaves, of species with key functions in the agrosystem management. *Erysiphe necator*, the second most dominant OTU found in foliar communities, is known to be the pathogen agent of the powdery mildew on grapevine. *Aureobasidium pullulans* is known to be an antagonist against many phytopathogens (Grube et al., 2011), and is used as a biocontrol agent (Chi et al., 2009). *Epicoccum nigrum* and *Alternaria sp.* are also considered as antagonists of the organisms responsible for the downy mildew and the grey mold (Dugan et al., 2002; Musetti et al., 2007). They were found less dominant on leaves, suggesting that they are less competitive than *A. pullulans*.

Airborne particles deposited on passive traps for a 12 days period were characterized by a very high richness (163.4 OTUs on average), confirming that the aerial inoculum for the leaves is composed by a high number of fungal species (Kinkel et al., 1989). In contrast, foliar communities were less rich, suggesting that many species which are able to immigrate on the leaves do not colonize the foliar habitat. It confirms that, while foliar and airborne communities influence the composition of each other (Lymperopoulou et al., 2016), their composition differ because of different selective pressures of each habitat (Vokou et al., 2012). However, the area sampled with airborne traps is far higher than the foliar one: many rare OTUs are potentially sampled with the airborne traps while we failed to sample them on grapevine leaves.

A weak spatial structure was found in the richness and the composition of fungal communities deposited on airborne traps. Thus, when they are closer than 40m, airborne traps tended to host more similar fungal communities. This spatial pattern suggests that the deposition of airborne fungal particles is not homogeneous across the parcel and is driven by spatially-structured factors.

The close edge of the forest is richer and host a distinct community composition on the first axis of the PCoA. This result suggests that the forest can influence airborne communities. A different pool of fungal species can disperse from the forest to the vineyard via the atmosphere. Lymperopoulou et al. (2016) indeed showed that vegetation influence the nearby airborne microbial composition, and can act as source and sink of airborne microbial particles. The host shifts of generalist pathogens between neighbouring plant species are a good example of the existence of such transfer (Beckstead et al., 2010; Power & Mitchell, 2004; Wilson et al., 2014). This assumption is corroborated by the higher richness of OTUs shared by the vineyard with the forest found at the southern edge. *Vuilleminia comedens*, which was the most abundant

OTU significantly specific of the forest and the vineyard edge communities, is indeed described as a fungi inhabiting decaying and dead wood (Ghobad-Nejhad et al., 2010). Moreover, forests edges are characterized by very specific environmental conditions. The dynamics of the air flow change along forest edges because of the abrupt shift in habitat physical characteristics (Wuyts et al., 2008). The very proximity of tree cover can also induce less harsh conditions in an open habitat such as clear-cuts, grasslands or vineyards (Chen et al., 1993; Godefroid et al., 2006; Ohara & Ushimaru, 2015).

The deposited communities also exhibit a gradual change along the eastern edge, as highlighted on the second PCoA axis. This edge effect can be related to the action of the wind during the sampling session. Indeed, other vineyards including a large cover of bare ground are located near this edge: there is therefore no spatial barrier for wind dispersion, and even further habitats can be source of airborne fungal particles. While the wind velocity have an effect on fungal spore dispersal Rieux et al. (2014), a better understanding of the processes responsible for particle dispersal between habitats is needed at the landscape scale (Miller et al., 2015).

In contrast, foliar fungal communities did not exhibit any spatial structure. The Bray-Curtis dissimilarity is very low between the samples, which indicates that all the leaves collected exhibit an homogeneous community composition. Moreover, unlike airborne deposited communities, no edge effect was detected on neither fungal richness nor composition. These results suggest that foliar fungal communities are driven by different processes than those driving the airborne communities. Indeed, the selective pressures exerted by the plant on the foliar fungal communities are stronger than micro-climatic parameters or dispersal processes which are spatially structured. Moreover, the management practices in vineyards, such as the addition of fungicides, can also influence strongly the foliar fungal community (Cordero-Bueso et al., 2014; Gu et al., 2010; Moulas et al., 2013), and homogenize their composition across the space. The variability between foliar communities can also result from other selective pressures, such as micro-variations in the environmental conditions, or from random events, attributed to the drift process (Maignien et al., 2014; Vacher et al., 2016).

This study is the first which compared, within a vineyard parcel, the spatial distribution of fungal particles able to deposit on the leaves and to affect the former foliar fungal communities. While airborne communities displayed a clear spatial structure within the vineyard parcel, grapevine foliar fungal communities did not exhibit the same patterns. Fungi transmitted through the atmosphere are potentially more affected by spatially structured parameters, such as the proximity of another habitat or wind patterns, while the foliar fungal communities are strongly influenced by selective pressures exerted by the host plant or agricultural practices which tend to homogenize the community composition across space. Together, these results support the work of Morrison-Whittle & Goddard (2015), which claimed that selection predominantly shapes grapevine microbial communities.

Acknowledgement

This study has been carried out with financial support from the French National Research Agency (ANR) in the frame of the Investments for the future Programme, within the Cluster of Excellence COTE (ANR-10-LABX-45). We thank Mathieu Ar-

royo, vineyard manager in Château Couhins, for allowing us to experiment on the wine estate. We thank Xavier Capdevielle, Gabriel Gerzabek, Frederic Labbé and Marie Massot for their help in collecting the samples. Many thanks to the LGC Genomics team for their work and advices on the sequencing process.

References

- Adams, R. I., Miletto, M., Taylor, J. W., & Bruns, T. D. (2013). Dispersal in microbes: fungi in indoor air are dominated by outdoor air and show dispersal limitation at short distances. *The ISME Journal*, 7, 1262–1273.
- Baker, S. C., Spies, T. A., Wardlaw, T. J., Balmer, J., Franklin, J. F., & Jordan, G. J. (2013). The harvested side of edges: Effect of retained forests on the re-establishment of biodiversity in adjacent harvested areas. *Forest Ecology and Management*, 302, 107–121.
- Bálint, M., Schmidt, P.-A., Sharma, R., Thines, M., & Schmitt, I. (2014). An Illumina metabarcoding pipeline for fungi. *Ecology and Evolution*, 4, 2642–2653.
- Barberán, A., Henley, J., Fierer, N., & Casamayor, E. O. (2014). Structure, inter-annual recurrence, and global-scale connectivity of airborne microbial communities. *Science of The Total Environment*, 487, 187–195.
- Bastian, O. (2001). Landscape Ecology – towards a unified discipline? *Landscape Ecology*, 16, 757–766.
- Beckstead, J., Meyer, S. E., Connolly, B. M., Huck, M. B., & Street, L. E. (2010). Cheatgrass facilitates spillover of a seed bank pathogen onto native grass species. *Journal of Ecology*, 98, 168–177.
- Berg, G., Grube, M., Schlöter, M., & Smalla, K. (2014). Unraveling the plant microbiome: looking back and future perspectives. *Plant-Microbe Interaction*, 5, 148.
- Blitzer, E. J., Dormann, C. F., Holzschuh, A., Klein, A.-M., Rand, T. A., & Tscharnkte, T. (2012). Spillover of functionally important organisms between managed and natural habitats. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 146, 34–43.
- Bowers, R. M., McLetchie, S., Knight, R., & Fierer, N. (2011). Spatial variability in airborne bacterial communities across land-use types and their relationship to the bacterial communities of potential source environments. *The ISME Journal*, 5, 601–612.
- Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., van Themaat, E. V. L., & Schulze-Lefert, P. (2013). Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. In S. S. Merchant (Ed.), *Annual Review of Plant Biology*, Vol 64 (pp. 807–838). Palo Alto: Annual Reviews volume 64. WOS:000321699500032.
- Cadenasso, M. L., Pickett, S. T. A., Weathers, K. C., & Jones, C. G. (2003). A Framework for a Theory of Ecological Boundaries. *BioScience*, 53, 750–758.

- Chaplin-Kramer, R., O'Rourke, M. E., Blitzer, E. J., & Kremen, C. (2011). A meta-analysis of crop pest and natural enemy response to landscape complexity. *Ecology Letters*, *14*, 922–932.
- Chen, J., Franklin, J. F., & Spies, T. A. (1993). Contrasting microclimates among clearcut, edge, and interior of old-growth Douglas-fir forest. *Agricultural and Forest Meteorology*, *63*, 219–237.
- Chi, Z., Wang, F., Chi, Z., Yue, L., Liu, G., & Zhang, T. (2009). Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *82*, 793–804.
- Comitini, F., & Ciani, M. (2008). Influence of fungicide treatments on the occurrence of yeast flora associated with wine grapes. *Annals of Microbiology*, *58*, 489–493.
- Cordero-Bueso, G., Arroyo, T., & Valero, E. (2014). A long term field study of the effect of fungicides penconazole and sulfur on yeasts in the vineyard. *International Journal of Food Microbiology*, *189*, 189–194.
- De Cáceres, M., & Legendre, P. (2009). Associations between species and groups of sites: indices and statistical inference. *Ecology*, *90*, 3566–3574.
- Dugan, F. M., Lupien, S. L., & Grove, G. G. (2002). Incidence, Aggressiveness and In Planta Interactions of *Botrytis cinerea* and other Filamentous Fungi Quiescent in Grape Berries and Dormant Buds in Central Washington State. *Journal of Phytopathology*, *150*, 375–381.
- Edgar, R. C. (2013). UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature Methods*, *10*, 996–998.
- Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C., & Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, *27*, 2194–2200.
- Evans, D. M., Turley, N. E., & Tewksbury, J. J. (2013). Habitat edge effects alter ant-guard protection against herbivory. *Landscape Ecology*, *28*, 1743–1754.
- Galante, T. E., Horton, T. R., & Swaney, D. P. (2011). 95% of basidiospores fall within 1 m of the cap: a field-and modeling-based study. *Mycologia*, *103*, 1175–1183.
- Garijo, P., López, R., Santamaría, P., Ocón, E., Olarte, C., Sanz, S., & Gutiérrez, A. R. (2011). Presence of enological microorganisms in the grapes and the air of a vineyard during the ripening period. *European Food Research and Technology*, *233*, 359–365.
- Ghobad-Nejhad, M., Nilsson, R. H., & Hallenberg, N. (2010). Phylogeny and taxonomy of the genus *Vuilleminia* (Basidiomycota) based on molecular and morphological evidence, with new insights into Corticiales. *Taxon*, *59*, 1519–1534.
- Godefroid, S., Rucquoi, S., & Koedam, N. (2006). Spatial variability of summer microclimates and plant species response along transects within clearcuts in a beech forest. *Plant Ecology*, *185*, 107.

- Grube, M., Schmid, F., & Berg, G. (2011). Black fungi and associated bacterial communities in the phyllosphere of grapevine. *Fungal Biology*, 115, 978–986.
- Gu, L., Bai, Z., Jin, B., Hu, Q., Wang, H., Zhuang, G., & Zhang, H. (2010). Assessing the impact of fungicide enostroburin application on bacterial community in wheat phyllosphere. *Journal of Environmental Sciences*, 22, 134–141.
- Horton, T. R., Swaney, D. P., & Galante, T. E. (2013). Dispersal of ectomycorrhizal basidiospores: the long and short of it. *Mycologia*, 105, 1623–1626.
- Ihrmark, K., Bodeker, I. T. M., Cruz-Martinez, K., Friberg, H., Kubartova, A., Schenck, J., Strid, Y., Stenlid, J., Brandström-Durling, M., Clemmensen, K. E., & Lindahl, B. D. (2012). New primers to amplify the fungal ITS2 region – evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 82, 666–677.
- Jumpponen, A., & Jones, K. L. (2009). Massively parallel 454 sequencing indicates hyperdiverse fungal communities in temperate *Quercus macrocarpa* phyllosphere. *New Phytologist*, 184, 438–448.
- Jumpponen, A., Jones, K. L., David Mattox, J., & Yaege, C. (2010). Massively parallel 454-sequencing of fungal communities in *Quercus* spp. ectomycorrhizas indicates seasonal dynamics in urban and rural sites. *Molecular Ecology*, 19, 41–53.
- Kinkel, L. L., Andrews, J. H., & Nordheim, E. V. (1989). Fungal Immigration Dynamics and Community Development on Apple Leaves. *Microbial Ecology*, 18, 45–58.
- Kõljalg, U., Nilsson, R. H., Abarenkov, K., Tedersoo, L., Taylor, A. F. S., Bahram, M., Bates, S. T., Bruns, T. D., Bengtsson-Palme, J., Callaghan, T. M., Douglas, B., Drenkhan, T., Eberhardt, U., Dueñas, M., Grebenc, T., Griffith, G. W., Hartmann, M., Kirk, P. M., Kohout, P., Larsson, E., Lindahl, B. D., Lücking, R., Martín, M. P., Matheny, P. B., Nguyen, N. H., Niskanen, T., Oja, J., Peay, K. G., Peintner, U., Peterson, M., Pöldmaa, K., Saag, L., Saar, I., Schüßler, A., Scott, J. A., Senés, C., Smith, M. E., Suija, A., Taylor, D. L., Telleria, M. T., Weiss, M., & Larsson, K.-H. (2013). Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Molecular Ecology*, 22, 5271–5277.
- Kuparinen, A., Markkanen, T., Riikonen, H., & Vesala, T. (2007). Modeling air-mediated dispersal of spores, pollen and seeds in forested areas. *Ecological Modelling*, 208, 177–188.
- Lacasella, F., Gratton, C., Felici, S. D., Isaia, M., Zapparoli, M., Marta, S., & Sbordoni, V. (2014). Asymmetrical responses of forest and “beyond edge” arthropod communities across a forest–grassland ecotone. *Biodiversity and Conservation*, 24, 447–465.
- Lymperopoulou, D. S., Adams, R. I., & Lindow, S. E. (2016). Contribution of Vegetation to the Microbial Composition of Nearby Outdoor Air. *Applied and Environmental Microbiology*, 82, 3822–3833.
- Madden, T. (2013). The BLAST sequence analysis tool. In *The NCBI Handbook*. National Center for Biotechnology Information (US). (2nd ed.).

- Maignien, L., DeForce, E. A., Chafee, M. E., Eren, A. M., & Simmons, S. L. (2014). Ecological succession and stochastic variation in the assembly of *Arabidopsis thaliana* phyllosphere communities. *mBio*, 5, e00682–13.
- Martins, G., Vallance, J., Mercier, A., Albertin, W., Stamatopoulos, P., Rey, P., Lonvaud, A., & Masneuf-Pomarède, I. (2014). Influence of the farming system on the epiphytic yeasts and yeast-like fungi colonizing grape berries during the ripening process. *International Journal of Food Microbiology*, 177, 21–28.
- Miller, N. E., Stoll, R., Mahaffee, W. F., Neill, T. M., & Pardyjak, E. R. (2015). An experimental study of momentum and heavy particle transport in a trellised agricultural canopy. *Agricultural and Forest Meteorology*, 211–212, 100–114.
- Morris, C. E. (2001). Phyllosphere. In *Encyclopedia of Life Sciences*. London: Nature Publishing Group.
- Morris, C. E., Leyronas, C., & Nicot, P. C. (2014). Movement of Bioaerosols in the Atmosphere and the Consequences for Climate and Microbial Evolution. In I. Colbeck, & M. Lazaridis (Eds.), *Aerosol Science: Technology and applications* (pp. 393–415). John Wiley & Sons, Ltd.
- Morrison-Whittle, P., & Goddard, M. R. (2015). Quantifying the relative roles of selective and neutral processes in defining eukaryotic microbial communities. *The ISME Journal*, 9, 2003–2011.
- Moulas, C., Petsoulas, C., Rousidou, K., Perruchon, C., Karas, P., & Karpouzas, D. G. (2013). Effects of systemic pesticides imidacloprid and metalaxyl on the phyllosphere of pepper plants. *BioMed Research International*, 2013, 1–8.
- Murcia, C. (1995). Edge effects in fragmented forests: implications for conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 10, 58–62.
- Musetti, R., Polizzotto, R., Vecchione, A., Borselli, S., Zulini, L., D'Ambrosio, M., Toppi, L. S. d., & Pertot, I. (2007). Antifungal activity of diketopiperazines extracted from *Alternaria alternata* against *Plasmopara viticola*: An ultrastructural study. *Micron*, 38, 643–650.
- Newton, A., Gravouil, C., & Fountaine, J. (2010). Managing the ecology of foliar pathogens: ecological tolerance in crops. *Annals of Applied Biology*, 157, 343–359.
- Nilsson, R. H., Veldre, V., Hartmann, M., Unterseher, M., Amend, A., Bergsten, J., Kristiansson, E., Ryberg, M., Jumpponen, A., & Abarenkov, K. (2010). An open source software package for automated extraction of ITS1 and ITS2 from fungal ITS sequences for use in high-throughput community assays and molecular ecology. *Fungal Ecology*, 3, 284–287.
- Norris, R. F., & Kogan, M. (2000). Interactions between weeds, arthropod pests, and their natural enemies in managed ecosystems. *Weed Science*, 48, 94–158.
- Norros, V., Rannik, Ü., Hussein, T., Petäjä, T., Vesala, T., & Ovaskainen, O. (2014). Do small spores disperse further than large spores? *Ecology*, 95, 1612–1621.

- Ohara, R. G., & Ushimaru, A. (2015). Plant beta-diversity is enhanced around grassland–forest edges within a traditional agricultural landscape. *Applied Vegetation Science*, *18*, 493–502.
- Peay, K. G., Garbelotto, M., & Bruns, T. D. (2010). Evidence of dispersal limitation in soil microorganisms: Isolation reduces species richness on mycorrhizal tree islands. *Ecology*, *91*, 3631–3640.
- Peay, K. G., Schubert, M. G., Nguyen, N. H., & Bruns, T. D. (2012). Measuring ectomycorrhizal fungal dispersal: macroecological patterns driven by microscopic propagules. *Molecular Ecology*, *21*, 4122–4136.
- Pellissier, L., Oppliger, A., Hirzel, A. H., Savova-Bianchi, D., Mbayo, G., Mascher, F., Kellenberger, S., & Niculita-Hirzel, H. (2016). Airborne and Grain Dust Fungal Community Compositions Are Shaped Regionally by Plant Genotypes and Farming Practices. *Applied and environmental microbiology*, *82*, 2121–2131.
- Peršoh, D. (2015). Plant-associated fungal communities in the light of meta'omics. *Fungal Diversity*, *75*, 1–25.
- Pinto, C., Pinho, D., Sousa, S., Pinheiro, M., Egas, C., & C. Gomes, A. (2014). Unravelling the Diversity of Grapevine Microbiome. *PLoS ONE*, *9*, e85622.
- Power, A. G., & Mitchell, C. E. (2004). Pathogen spillover in disease epidemics. *The American Naturalist*, *164*, S79–S89.
- R Development Core Team (2006). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria.
- Raspor, P., Miklic-Milek, D., Avbelj, M., & Cadez, N. (2010). Biocontrol of Grey Mould Disease on Grape Caused by Botrytis cinerea with Autochthonous Wine Yeasts. *Food Technology and Biotechnology*, *48*, 336–343. WOS:000281138400011.
- Ribeiro Jr., P., & Diggle, P. (2001). geoR: A package for geostatistical analysis. *R-News*, *1*, 15–18.
- Ries, L., & Sisk, T. D. (2008). Butterfly edge effects are predicted by a simple model in a complex landscape. *Oecologia*, *156*, 75–86.
- Rieux, A., Soubeyrand, S., Bonnot, F., Klein, E. K., Ngando, J. E., Mehl, A., Ravigne, V., Carlier, J., & Bellaire, L. d. L. d. (2014). Long-Distance Wind-Dispersal of Spores in a Fungal Plant Pathogen: Estimation of Anisotropic Dispersal Kernels from an Extensive Field Experiment. *PLOS ONE*, *9*, e103225.
- Schmale, D. G. I., & Ross, S. D. (2015). Highways in the Sky: Scales of Atmospheric Transport of Plant Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, *53*, 591–611.
- Thomson, L. J., McKenzie, J., Sharley, D. J., Nash, M. A., Tsitsilas, A., & Hoffmann, A. A. (2010). Effect of woody vegetation at the landscape scale on the abundance of natural enemies in Australian vineyards. *Biological Control*, *54*, 248–254.
- Vacher, C., Hampe, A., Porté, A. J., Sauer, U., Compant, S., & Morris, C. E. (2016). The Phyllosphere: Microbial Jungle at the Plant–Climate Interface. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, *47*.

- Vokou, D., Vareli, K., Zarali, E., Karamanoli, K., Constantinidou, H.-I. A., Monokrousos, N., Halley, J. M., & Sainis, I. (2012). Exploring Biodiversity in the Bacterial Community of the Mediterranean Phyllosphere and its Relationship with Airborne Bacteria. *Microbial Ecology*, *64*, 714–724.
- Vorholt, J. A. (2012). Microbial life in the phyllosphere. *Nature Reviews Microbiology*, *10*, 828–840.
- Whipps, J., Hand, P., Pink, D., & Bending, G. (2008). Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. *Journal of Applied Microbiology*, *105*, 1744–1755.
- Wilson, H. E., Carroll, G. C., Roy, B. A., & Blaisdell, G. K. (2014). Tall fescue is a potential spillover reservoir host for *Alternaria* species. *Mycologia*, *106*, 22–31.
- Womack, A. M., Bohannan, B. J. M., & Green, J. L. (2010). Biodiversity and biogeography of the atmosphere. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, *365*, 3645–3653.
- Wuyts, K., Verheyen, K., De Schrijver, A., Cornelis, W. M., & Gabriels, D. (2008). The impact of forest edge structure on longitudinal patterns of deposition, wind speed, and turbulence. *Atmospheric Environment*, *42*, 8651–8660.
- Xu, X.-M., Jeffries, P., Pautasso, M., & Jeger, M. J. (2011). Combined use of biocontrol agents to manage plant diseases in theory and practice. *Phytopathology*, *101*, 1024–1031.
- Zambell, C. B., & White, J. F. (2014). In the forest vine *Smilax rotundifolia*, fungal epiphytes show site-wide spatial correlation, while endophytes show evidence of niche partitioning. *Fungal Diversity*, *75*, 279–297.

Supplementary material

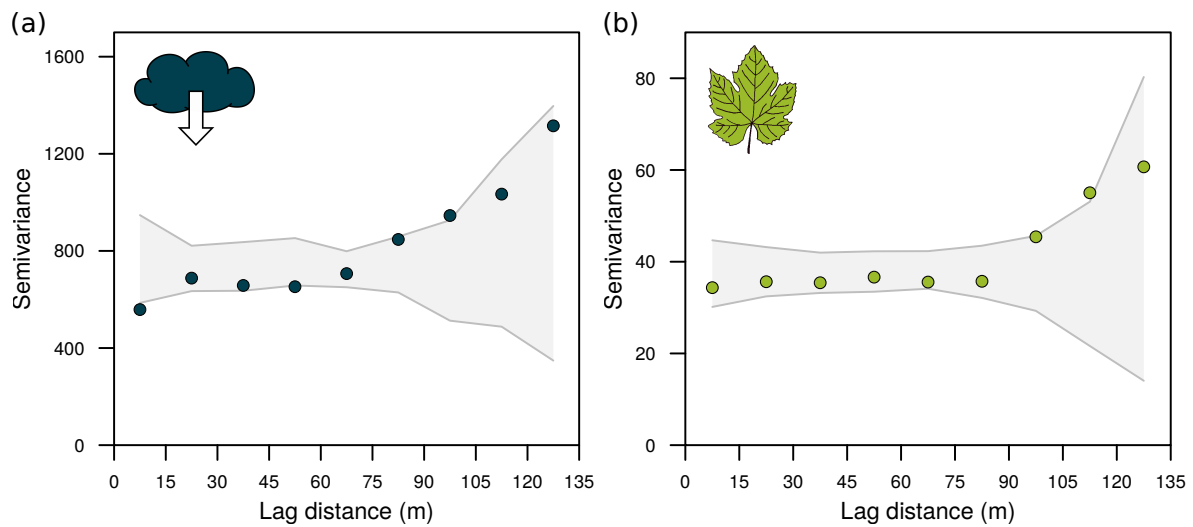


Figure S1: OTU richness autocorrelation airborne deposited (a) and foliar (b,d) fungal communities. (a,b) Empirical semi-variograms of the OTU richness for airborne traps in the vineyard (a) and grapevine leaves (b). The lag distance is the difference of geographical distance between each sample. The grey envelopes represent the maximal and minimal values obtained after 99 random permutations of the data values.

Chapitre 5

Effet de la composition du paysage sur les communautés fongiques foliaires de la vigne

Landscape composition does not influence grapevine foliar fungal communities

Thomas Fort¹, Corinne Vacher², Adrien Rush³, and Cécile Robin¹

¹BIOGECO, UMR 1202, INRA, Université de Bordeaux, F-33610 Cestas, France

²BIOGECO, UMR 1202, INRA, Université de Bordeaux, F-33615 Pessac, France

³SAVE, UMR1065, INRA, ISVV, Université de Bordeaux, F-33883 Villenave d'Ornon, France

Article in preparation.

Improvements scheduled before publication are discussed at the end of the chapter.

Abstract

Introduction. The landscape composition influences the assemblage of many animal and plant communities. It can be crucial for managing crops because many of those organisms have a key functional role in agrosystems, such as pests or antagonists. However, little is known about the effect of landscape composition on foliar fungal communities. Here, we hypothesized that the amount of forest in the landscape surrounding vineyards can enhance the foliar fungal species richness and affect the community composition, through the dispersal process.

Methods. We studied 36 vineyards, chosen on a gradient of forest proportion in the surrounding 1 km landscape. Foliar fungal communities were characterized using Illumina sequencing of the ITS1 region. Alpha diversity indices (OTU richness, Shannon diversity and Pielou evenness) and beta-diversity Bray-Curtis dissimilarity index were monitored.

Results. According to our expectations, the Shannon diversity increased with the proportion of forest in the landscape. However, this relationship was weak and both OTU richness and Pielou evenness did not change significantly. The Bray-Curtis dissimilarity between the vineyards was high, but was not affected by either the proportion of forest in the landscape nor spatial autocorrelation.

Discussion. These results suggest that the landscape composition do not influence foliar fungal community composition. The selection seems to dominate over dispersal in shaping grapevine foliar fungal communities. Many selective pressures, such as the agricultural practices or the grapevine genotype can be responsible for the observed dissimilarity between foliar communities.

Keywords: Dispersal, Edge, Grapevine, Landscape, Phyllosphere, Selection.

1 Introduction

In ecology, the landscape is defined as an heterogeneous geographic area, characterized by a dynamic mosaic of interacting habitat patches (Bastian, 2001). It plays a key role in the dynamics of species populations and communities. In agronomy, its effect on species interacting with crops, such as arthropod pests or their natural enemies has been widely documented (Chaplin-Kramer et al., 2011; Norris & Kogan, 2000). The landscape surrounding a crop influences the presence and the abundance of species which look for shelter or additional resources in neighbouring habitats (Landis et al., 2000). The effect of landscape composition on the abundance and richness of species has been particularly studied for birds (Dallimer et al., 2010; Devictor & Jiguet, 2007; Geiger et al., 2010), amphibians (Guerry & Hunter, 2002; Jacobs & Houlahan, 2011), arthropods (Holzschuh et al., 2008; Purtauf et al., 2005; Rusch et al., 2015; Schmidt et al., 2005) and mammals (Bogoni et al., 2016; Michel et al., 2006; Ritchie et al., 2009). The landscape composition can be crucial for managing crops because many of those organisms have a key functional role in the system. The meta-analysis conducted by Chaplin-Kramer et al. (2011) revealed that natural enemies of crop pests have a strong positive response to landscape complexity. While such effect has been widely documented in crops for many macro-organisms, the influence of landscape structure on micro-organism communities remain unknown.

Plant leaves provide one of the largest microbial habitat on Earth (Morris, 2001; Ruinen, 1956; Vorholt, 2012). They harbour highly diverse microbial communities, including many genera of bacteria and fungi (Lindow & Leveau, 2002; Turner et al., 2013; Vorholt, 2012). These microorganisms have been studied for several decades because they have important applications in agronomy. Crop health and performance indeed depend on interactions between pathogenic and beneficial micro-organisms (Newton et al., 2010; Xu et al., 2011). Over the last decades, the use of high throughput sequencing methods has allowed a better characterization of foliar microbial communities and a better understanding of the factors shaping them (Berg et al., 2014; Peršoh, 2015; Vacher et al., 2016b). Many microbial species colonize the leaves from dispersal through the atmosphere (Bulgarelli et al., 2013; Whipps et al., 2008). The neighbouring environment - and neighbouring plants - can therefore interfere on foliar microbial community composition. Such effect of neighbouring plant species as already been demonstrated for endophytic pathogens (Beckstead et al., 2010; Mordecai et al., 2013; Power & Mitchell, 2004). At the regional scale, dispersal of plant microbial species through the atmosphere is expected to exhibit spatial patterns. Evidences for dispersal limitation were found for plant-associated microbial species, such as ectomycorrhizal fungi (Dickie & Reich, 2005; Galante et al., 2011; Schmale & Ross, 2015). The habitat also determine the airborne microbial composition (Bowers et al., 2013, 2011; Pellissier et al., 2016). As a consequence, microbial foliar communities are expected to exhibit similar spatial patterns. Distance-decay relationship was already highlighted for foliar microbial communities (David et al., 2015; Finkel et al., 2012; Vacher et al., 2016a), but the implication of the landscape remain understudied.

Here, we studied the foliar fungal community of grapevine across a gradient of landscape composition. A previous study showed that, at the scale of a vineyard parcel, there is no effect of the distance to the forest edge on foliar grapevine communities (Fort

et al., In Prep). Specifically, the dissimilarity between leaves from the same parcel was very low (Fort et al., In Prep). While the landscape is supposed to play a scarce role at the parcel level, it can play a significant role at a larger scale because a change in landscape composition can change the pool of species available in vineyards and able to colonize leaves. Here, we hypothesized that a higher amount of forest in the landscape can enhance the pool of species available in a vineyard, increase the grapevine foliar fungal richness and diversity, and alter the grapevine foliar fungal community composition.

2 Materials and methods

Study site

An experimental design was set up in the Bordeaux area in France. It consisted of 40 blocks of vineyards and their surrounding landscape in a 1km radius circular buffer zone, chosen along a gradient of proportion of forested area (Fig. 1). The amount of forest in each buffer was calculated using the forest database of the French National Institute of Geographic and Forest (IFN, 2008). Sampling was performed the 9 and 10 of September 2015. In the centre of each vineyard block, three leaves were collected on separate vine stocks, remote from each other by less than three meters. In order to collect leaves of the same age, they were chosen at the base of the cane (around 50 cm from the soil). Each leaf was collected using scissors cleaned with 96 % ethanol, taking care not to touch them. They were inserted between two sheets of sterile paper filter and stored into clear plastic bags containing silica gel in order to quickly dry the leaves.

DNA extraction and sequencing

In order to avoid sample contaminations, all tools and materials required for sample processing and DNA extraction were exposed to UVs during 30 min under a laminar flow hood. On the day following leaf sampling, four discs of 8.0 mm diameter were cut randomly in each leaf under the hood using a hole-punch sterilized with 95 % ethanol and flaming. The four discs were placed in a single well of an autoclaved DNA extraction plate. Two wells were kept empty and were considered as negative controls. Two autoclaved metallic beads were added to each well, and the plant material was ground into a homogeneous powder with a Geno/Grinder 2010 (SPEX Sample Prep, Metuchen, NJ). Total DNA from each leaf was then extracted with the QIAGEN DNeasy 96 Plant Kit. The three DNA samples from the same site were pooled together.

Amplification of fungal ITS1 (Internal Transcribed Spacer 2) barcode was performed using the primer pair ITS1F (forward) and ITS2 (reverse) (Gardes & Bruns, 1993). Paired-end sequencing (300 bp) was then performed on one run of an Illumina MiSeq sequencer using V3 chemistry. PCR amplification, library sequencing and data pre-processing were carried out by LGC Genomics sequencing service (Berlin, Germany).

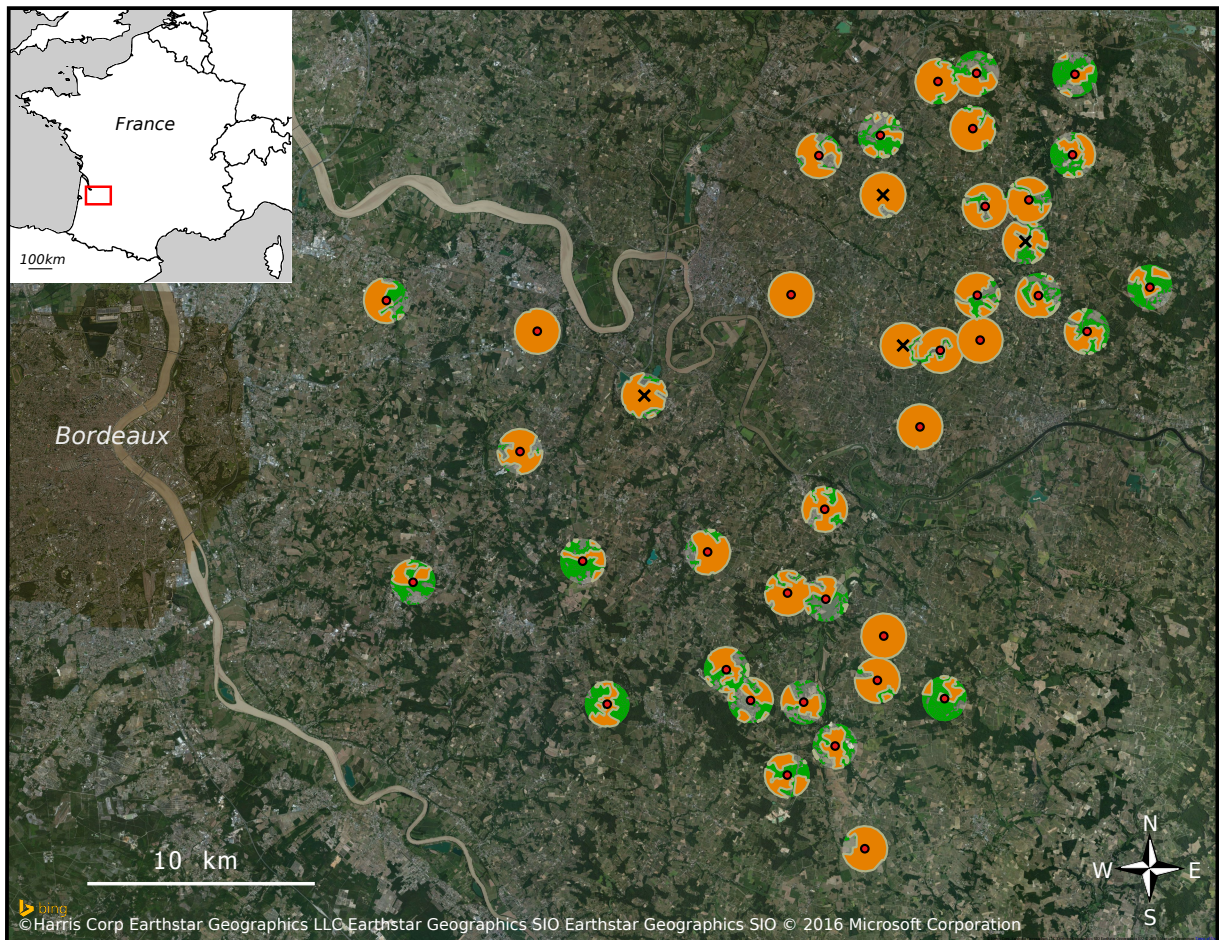


Figure 1: Geographical position of sampling sites. Red points represent sites used in the analyses, and black crosses represent samples with too few sequences to be included in the analyses. The 1km radius buffer is represented around each site. Inside each buffer, forest location from the IFN database are represented in green, and vineyard from the Corine Land Cover database in orange.

Bioinformatic analysis

Sequences were first demultiplexed and filtered. All sequences with tag mismatches, missing tags, one-sided tags or conflicting tag pairs were discarded. Tags and Illumina TruSeq adapters were then clipped from all sequences, and sequences with final length shorter than 100 bases were discarded. All sequences with more than three mismatches with the ITS primers were discarded. Primers were then clipped and the sequence fragments were placed in forward-reverse primer orientation. Forward and reverse reads were then combined with the BBmerge software. Read pair sequences that could not be combined were discarded.

The pipeline developed by Bálint et al. (2014) was used to process the sequences. The ITS2 sequence was first extracted from each sequence with the FungalITSx-extractor (Nilsson et al., 2010). All the sequences were then concatenated in a single fasta file, after adding the sample code in the label of each sequence. The sequences were dereplicated, sorted and singletons were discarded with VSEARCH (<https://github.com/torognes/vsearch>). The sequences were then clustered into molecular operational taxonomic units (OTUs) with the UPARSE algorithm implemented in USEARCH v8 (Edgar, 2013), with a minimum identity threshold of 97%. Additional chimera detection was performed against the UNITE database (Kõljalg et al., 2013), with the UCHIME algorithm implemented in USEARCH v8 (Edgar et al., 2011). The OTU table, giving the number of sequence of each OTU for each sample, was created with USEARCH v8.

OTUs were taxonomically assigned with the online BLAST web interface (Madden, 2013) against the GenBank database, by excluding environmental and metagenome sequences. The assignment with the lowest e-value was retained. The full taxonomic lineage of each assignment was retrieved from the GI number information provided by NCBI. All the OTUs assigned to plants or other organisms, and all unassigned OTUs were removed, to ensure that only fungal OTUs were retained.

Statistical analyses

All statistical analyses were performed in the R environment (R Development Core Team, 2006). One hundred random rarefied OTU matrices were computed, using the smallest number of sequences per sample as a threshold. Alpha and beta diversity indices were calculated for each rarefied matrix, and averaged (Cordier et al., 2012b; Jakuschkin et al., 2016). The alpha-diversity was characterized by the OTU richness, the Shannon diversity and the Pielou evenness. The beta-diversity was calculated with the Bray-Curtis dissimilarity index.

Simple linear models were used to assess the effect of the proportion of forest in the landscape surrounding each site on foliar OTU alpha-diversity. The spatial autocorrelation of each variable was tested on the model residuals by estimating Moran's I with a neighbour matrix.

Bray-Curtis dissimilarities in composition between sites were represented by Principal Coordinates Analysis (PCoA). Simple linear models were used to assess the effect of the proportion of forest in the landscape surrounding each site on the first two axes of the PCoA. Spatial autocorrelation was tested first on the Bray-Curtis dissimilarity

matrix using a Mantel's test, and second on model residuals by estimating Moran's I on a neighbour matrix.

3 Results

Taxonomic description of foliar fungal communities

In total, 798 557 high-quality sequences were obtained which clustered into 389 OTUs. Overall, 16 OTUs, corresponding to 2 559 sequences (0.32% of the raw OTU table) were not taxonomically assigned to fungi by BLAST. Among them, 25 sequences were assigned to plant sequences (Tracheophyta division) and the others were not assigned at all. All these OTUs were removed. The control sample contained 316 fungal sequences which clustered into 23 OTUs. There is no consensus on how to deal with sequences in negative controls (Nguyen et al., 2015). Here, there were few sequences in the control, and some were assigned to fungal species already described on plant leaves (e.g. *Cladosporium sp.* and *Epicoccum nigrum*) (Bensch et al., 2010; Grube et al., 2011). We thus decided to keep those OTUs in the dataset. Four samples containing very few sequences (less than the control sample, <316 sequences) were removed. Finally, the OTU table used for the analyses contained 36 samples and 370 fungal OTUs, representing 794 924 sequences. The mean number of sequences per sample was 22 081, ranging from 743 to 123 781. This OTU table was used for taxonomical description. Alpha and Beta diversity indices were calculated for 100 random rarefactions of this OTU table, at a threshold of 700 sequences per sample, and averaged.

The fungal communities were dominated by ascomycetes (Fig. 2). The sequences assigned to Ascomycota division accounted for 65.4%, followed by Basidiomycota division (33.6%). Other divisions and unassigned sequences at the division level represent together 1% of the sequences. A single OTU was found in all the samples, and was also the most abundant one, assigned to *Aureobasidium pullulans* (Table 1).

Alpha-diversity analyses

The mean ($\pm$ SD) richness of all samples was 20.46 ± 7.60 , the mean Shannon diversity was 1.73 ± 0.62 and the mean Pielou evenness was 0.092 ± 0.006 (Fig. 3). Simple linear models revealed that the richness was not influenced by the proportion of forest in the landscape ($p=0.393$), nor the Pielou evenness ($p=0.326$) (Fig. 3a, c). The Shannon diversity was significantly influenced by the proportion of forest surrounding the vineyards ($p=0.041$), but the coefficient of determination was low ($R^2=0.091$) (Fig. 3b). No spatial autocorrelation was detected in the residuals of the three models ($I=-0.071$, $p=0.691$; $I=-0.002$, $p=0.363$; $I=0.091$, $p=0.069$; respectively).

Beta-diversity analyses

The Bray-Curtis dissimilarity between samples was high and variable (0.744 ± 0.173 , Fig. 4a). The first axes of the PCoA explained 21.9 % and 14.5 % of the variability, respectively (Fig. 4b). None of the first axes changed along the gradient of

Table 1: Taxonomic assignment of the 12 most abundant OTUs by the online BLAST analysis against the GenBank database. The environmental and metagenome sequences were excluded. Taxa presented as unidentified at the species level (sp.) were assigned to at least two species, with identical e-values. The occurrence is the number of sample in which the OTU was found on the 36 foliar fungal communities characterized. Both query coverage and sequence identity of all those representative sequences against the closest matching sequence were 100%.

Relative abundance	Occurrence	Putative taxon	GI number
22.14	36	<i>Aureobasidium pullulans</i>	1034043528
8.04	20	<i>Erysiphe necator</i>	6572481
7.94	26	<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	1021759815
7.83	26	<i>Sporidiobolus sp.</i>	1021759837
6.72	34	<i>Cladosporium sp.</i>	1044656348
5.31	21	<i>Rhodotorula babjevae</i>	1021759790
4.8	30	<i>Epicoccum nigrum</i>	1032965565
4.68	34	<i>Alternaria sp.</i>	1043642110
4.46	34	<i>Cladosporium sp.</i>	1047815329
2.74	15	<i>Cryptococcus sp.</i>	152013615
2.25	23	<i>Epicoccum nigrum</i>	1045857911
2.03	26	<i>Didymella sp.</i>	1003315976

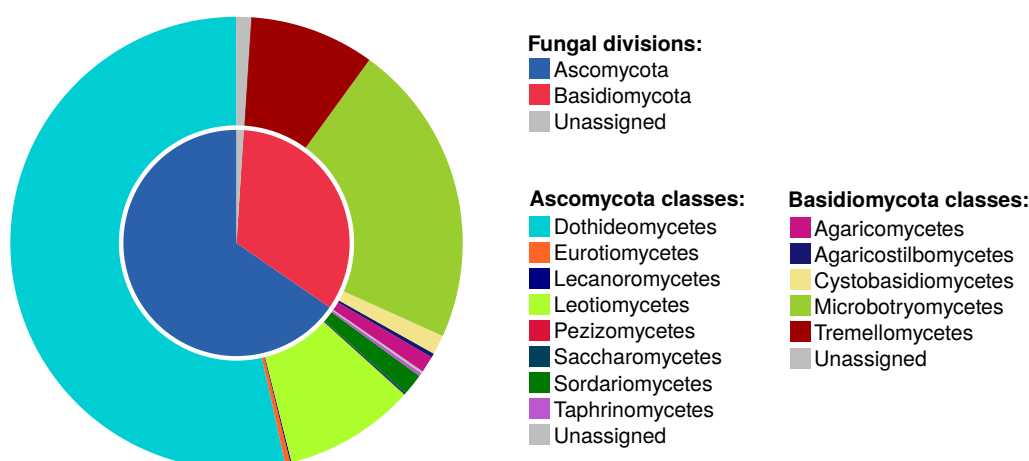


Figure 2: Taxonomic composition of grapevine foliar fungal communities. The inner disc shows the proportion of sequences assigned to each taxonomic division, and the outer disc the proportion of sequences assigned to each class of the Ascomycota and Basidiomycota divisions.

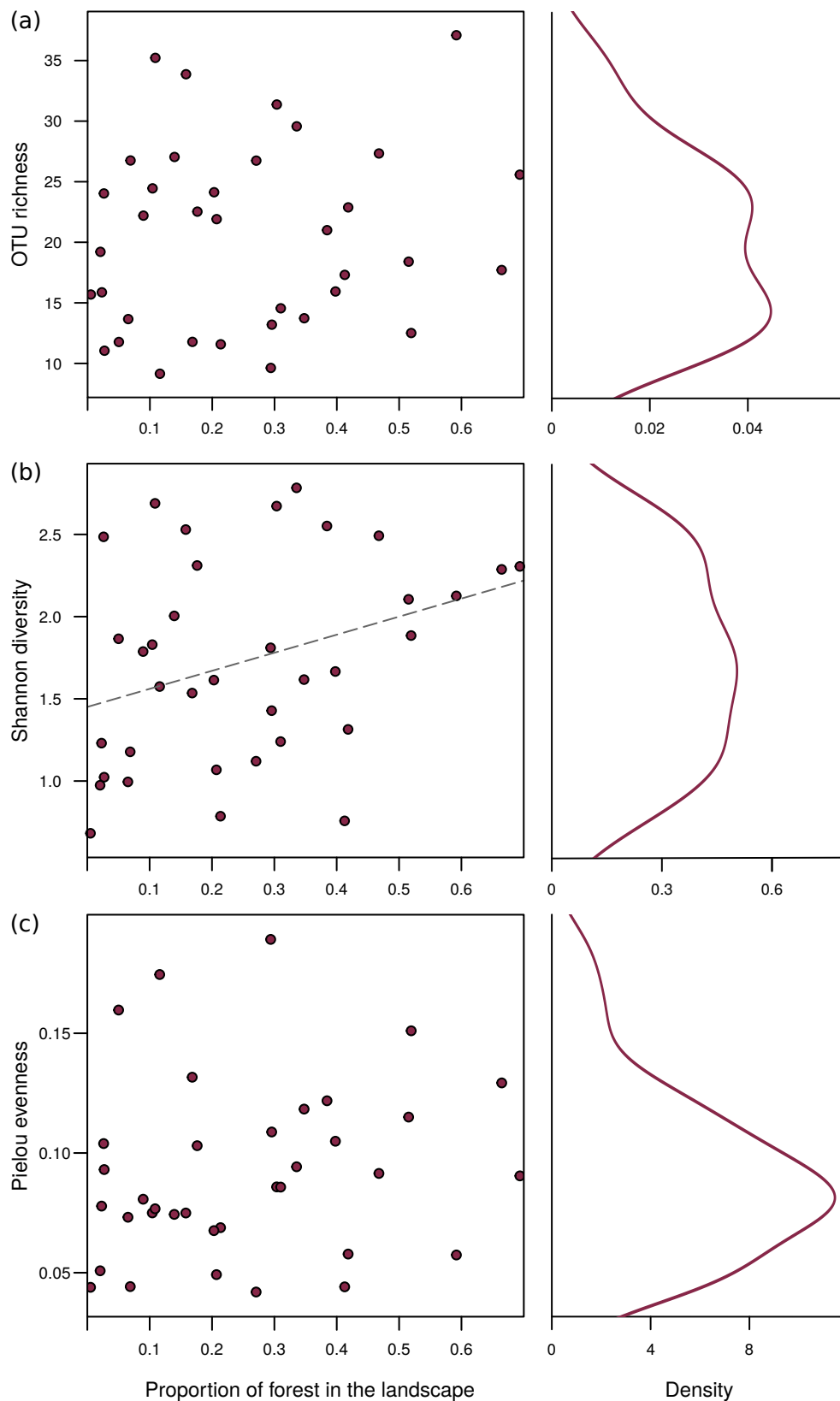


Figure 3: Effect of the proportion of forest in the landscape on alpha-diversity indices: richness (a), Shannon diversity (b) and Pielou evenness (c). The broken line represent the significant linear relationship between landscape composition and Shannon diversity. Density curves for each index are represented on the right.

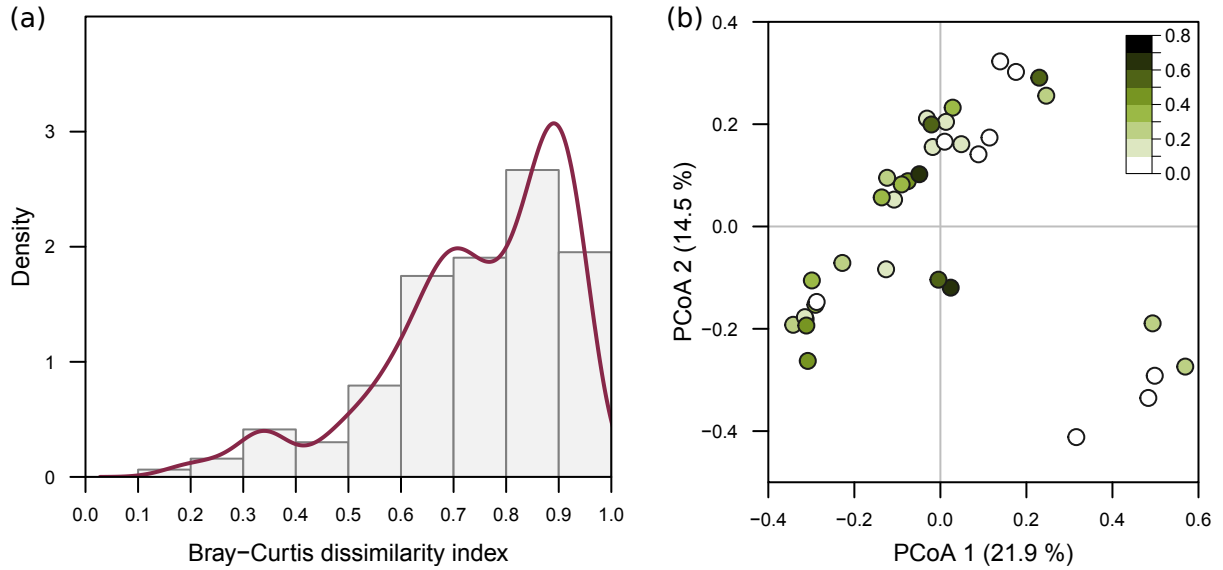


Figure 4: Bray-Curtis dissimilarity between the grapevine foliar fungal communities. (a) Histogram and density curve of the Bray-Curtis index distribution. (b) PCoA first axes performed on the Bray-Curtis dissimilarity matrix. The green colour gradient represents the proportion of forest in the landscape.

landscape forest proportion ($p=0.086$ and $p=0.864$, respectively). No spatial autocorrelation was found neither on the Bray-Curtis dissimilarity matrix (Mantel's $r=-0.09$, $p=0.953$) nor on the residuals of the models ($I=-0.07$, $p=0.70$ and $I=-0.02$, $p=0.45$, respectively).

4 Discussion

Grapevine foliar fungal communities were dominated by *Aureobasidium pullulans* (22 % of the sequences). This yeast-like fungus was already found as dominant on grapes (Garijo et al., 2011; Pinto et al., 2014; Raspor et al., 2010), particularly after successive fungicide applications (Comitini & Ciani, 2008; Martins et al., 2014). The present study was indeed performed late in the season, after many successive pesticide applications. The potential high competitive abilities of *A. pullulans* and its potential higher resilience abilities (Chi et al., 2009; Grube et al., 2011) can explain its dominance on leaves. *A. pullulans* is indeed known to be an antagonist against many phytopathogen, such as the agents responsible for the sour rot (Dimakopoulou et al., 2008) or the grey mould (Raspor et al., 2010). It is used in crops as biocontrol agent (Chi et al., 2009).

A significant effect of the proportion of forest in the landscape was found on the Shannon diversity index. This result is consistent with our hypothesis, and suggests that a higher proportion of forest in the landscape influences microbial species on grapevine leaves. However, the coefficient of determination of Shannon relationship with landscape composition was weak ($r^2=0.09$) : the linear relationship emerged only thanks to the six sites surrounded by more than 45% of forest, which all host a fungal

foliar diversity higher than the mean. This relationship must be confirmed by further studies, with a higher number of sampled site surrounded by a high amount of forest.

The OTU richness, evenness, and overall composition of grapevine foliar fungal community were not influenced by the composition of the surrounding landscape at the sampling date. This result is in contradiction with our hypothesis, and suggests that a higher proportion of forest in the landscape is not a higher pool of species for grapevine leaves, and do not change foliar fungal community composition. This result differs from many studies conducted on various macroorganisms (e.g. Chaplin-Kramer et al. 2011; Geiger et al. 2010; Jacobs & Houlahan 2011; Purtauf et al. 2005; Rusch et al. 2015). Moreover, the Bray-Curtis dissimilarity between samples was high (mean = 0.74) and no spatial autocorrelation was detected on community composition. It indicates that communities diverged strongly within the landscape, but do not follow spatially structured patterns. Such as aerial dispersal of spores at regional scale follow spatial patterns or are related to geographic distance (Bowers et al., 2011; Peay et al., 2010; Pellissier et al., 2016; Schmale & Ross, 2015), this result suggests that the observed dissimilarity between foliar fungal communities do not come from dispersal process at large scale. It can arise from local dispersal patterns, such as those observed by Dickie & Reich (2005); Galante et al. (2011); Peay et al. (2010) on ectomycorrhizal spores dispersal within 1km range. However, we failed to highlight such pattern in two previous studies at a similar crop spatial scale (Fort et al. In prep). Overall, those results contrast with those of Redford et al. (2010), who found that bacterial community composition on *Pinus ponderosa* needles are similar between trees, even those distant from thousand of kilometers.

The high dissimilarity observed between the communities can result from differences in the selective pressures exerted on the grapevine foliar fungal communities. Host genotype has been shown to influence foliar microbial communities (Bodenhausen et al., 2014; Cordier et al., 2012a; Hunter et al., 2015; Sapkota et al., 2015; Wagner et al., 2016). Bokulich et al. (2013) also found that grape microbial communities differed between grapevine varieties. The age of the host plant can also shift foliar microbial composition, as demonstrated by Wagner et al. (2016) on the wild mustard. Moreover, strong differences in agricultural practices can also explain such variability. For instance, the differences in pesticide application in vineyards can alter foliar fungal community composition (Cordero-Bueso et al., 2014; Gu et al., 2010; Karlsson et al., 2014; Moulas et al., 2013). Nevertheless, we do not yet have those informations for each vineyard block and we cannot, at the present time, assess the relative influence of each of those factors in shaping grapevine foliar fungal communities.

5 Improvement scheduled before publication

Further investigations and analyses are needed before the publication of this article. Our results suggest that dispersal is not the main process shaping grapevine foliar fungal communities. However, the scale we chose to characterize the landscape composition can be inadequate. Sundberg (2013) indeed found that the dispersal of bryophyte spores depend on the open peatland in the landscape within 200km. Higher sizes of buffer zone will be created around each vineyard block, the amount of forest will be calculated in each zone and tested on fungal foliar communities. Yet, the size of the

region studied and its global heterogeneity will not allow us to use too large buffer areas.

The landscape composition is not the only factor which can influence foliar fungal community via dispersal. Landscape configurational heterogeneity influences macroorganisms communities (e.g. Fontúrbel et al. 2015; Magrach et al. 2014; Perović et al. 2015) and can therefore influence foliar microbial communities. Many metrics can be retrieved, such as the distance to the closest forest patch, or the size of vineyard patches (Fahrig et al., 2011; Šímová & Gdulová, 2012). These metrics will be calculated using the FRAGSTATS software. The correlation between them will be tested with a multivariate analysis, and the effect of the selected ones will be tested on grapevine foliar community alpha and beta diversity indices.

Many selective pressures can be responsible for the high dissimilarity observed on grapevine foliar fungal communities. At this time, we have complete information about vineyard age, variety and management for only half vineyard blocks studied. We will retrieve the missing information and will take those variables into account in the analyses. We will also retrieve genetic data about the grapevine sampled, in order to compare the genetic distance between the host plants with the ecological distance.

6 Acknowledgement

This study has been carried out with financial support from the French National Research Agency (ANR) in the frame of the Investments for the future Programme, within the Cluster of Excellence COTE (ANR-10-LABX-45). We thank Laurent Delière for his precious advices and Xavier Capdevielle and Lionel Delbac for their help in collecting the samples. Many thanks to the LGC Genomics team for their work and advices on the sequencing process.

References

- Bálint, M., Schmidt, P.-A., Sharma, R., Thines, M., & Schmitt, I. (2014). An Illumina metabarcoding pipeline for fungi. *Ecology and Evolution*, 4, 2642–2653.
- Bastian, O. (2001). Landscape Ecology – towards a unified discipline? *Landscape Ecology*, 16, 757–766.
- Beckstead, J., Meyer, S. E., Connolly, B. M., Huck, M. B., & Street, L. E. (2010). Cheatgrass facilitates spillover of a seed bank pathogen onto native grass species. *Journal of Ecology*, 98, 168–177.
- Bensch, K., Groenewald, J. Z., Dijksterhuis, J., Starink-Willemse, M., Andersen, B., Summerell, B. A., Shin, H. D., Dugan, F. M., Schroers, H. J., Braun, U., & Crous, P. W. (2010). Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (Davidiellaceae, Capnodiales). *Studies in Mycology*, 67, 1–94.
- Berg, G., Grube, M., Schlöter, M., & Smalla, K. (2014). Unraveling the plant microbiome: looking back and future perspectives. *Plant-Microbe Interaction*, 5, 148.

- BodenhauseN, N., Bortfeld-Miller, M., Ackermann, M., & Vorholt, J. A. (2014). A Synthetic Community Approach Reveals Plant Genotypes Affecting the Phyllosphere Microbiota. *PLOS Genet*, 10, e1004283.
- Bogoni, J. A., Cherem, J. J., Giehl, E. L. H., Oliveira-Santos, L. G., Castilho, P. V. d., Filho, V. P., Fantacini, F. M., Tortato, M. A., Luiz, M. R., Rizzaro, R., & Graipel, M. E. (2016). Landscape features lead to shifts in communities of medium-to large-bodied mammals in subtropical Atlantic Forest. *Journal of Mammalogy*, 97, 713–725.
- Bokulich, N. A., Thorngate, J. H., Richardson, P. M., & Mills, D. A. (2013). Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, .
- Bowers, R. M., Clements, N., Emerson, J. B., Wiedinmyer, C., Hannigan, M. P., & Fierer, N. (2013). Seasonal Variability in Bacterial and Fungal Diversity of the Near-Surface Atmosphere. *Environmental Science & Technology*, 47, 12097–12106.
- Bowers, R. M., McLetchie, S., Knight, R., & Fierer, N. (2011). Spatial variability in airborne bacterial communities across land-use types and their relationship to the bacterial communities of potential source environments. *The ISME Journal*, 5, 601–612.
- Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., van Themaat, E. V. L., & Schulze-Lefert, P. (2013). Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. In S. S. Merchant (Ed.), *Annual Review of Plant Biology*, Vol 64 (pp. 807–838). Palo Alto: Annual Reviews volume 64. WOS:000321699500032.
- Chaplin-Kramer, R., O'Rourke, M. E., Blitzer, E. J., & Kremen, C. (2011). A meta-analysis of crop pest and natural enemy response to landscape complexity. *Ecology Letters*, 14, 922–932.
- Chi, Z., Wang, F., Chi, Z., Yue, L., Liu, G., & Zhang, T. (2009). Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82, 793–804.
- Comitini, F., & Ciani, M. (2008). Influence of fungicide treatments on the occurrence of yeast flora associated with wine grapes. *Annals of Microbiology*, 58, 489–493.
- Cordero-Bueso, G., Arroyo, T., & Valero, E. (2014). A long term field study of the effect of fungicides penconazole and sulfur on yeasts in the vineyard. *International Journal of Food Microbiology*, 189, 189–194.
- Cordier, T., Robin, C., Capdevielle, X., Desprez-Loustau, M.-L., & Vacher, C. (2012a). Spatial variability of phyllosphere fungal assemblages: genetic distance predominates over geographic distance in a European beech stand (*Fagus sylvatica*). *Fungal Ecology*, 5, 509–520.
- Cordier, T., Robin, C., Capdevielle, X., Fabreguettes, O., Desprez-Loustau, M.-L., & Vacher, C. (2012b). The composition of phyllosphere fungal assemblages of European beech (*Fagus sylvatica*) varies significantly along an elevation gradient. *New Phytologist*, 196, 510–519.

- Dallimer, M., Marini, L., Skinner, A. M. J., Hanley, N., Armsworth, P. R., & Gaston, K. J. (2010). Agricultural land-use in the surrounding landscape affects moorland bird diversity. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 139, 578–583.
- David, A. S., Seabloom, E. W., & May, G. (2015). Plant Host Species and Geographic Distance Affect the Structure of Aboveground Fungal Symbiont Communities, and Environmental Filtering Affects Belowground Communities in a Coastal Dune Ecosystem. *Microbial Ecology*, .
- Devictor, V., & Jiguet, F. (2007). Community richness and stability in agricultural landscapes: The importance of surrounding habitats. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 120, 179–184.
- Dickie, I. A., & Reich, P. B. (2005). Ectomycorrhizal fungal communities at forest edges. *Journal of Ecology*, 93, 244–255.
- Dimakopoulou, M., Tjamos, S. E., Antoniou, P. P., Pietri, A., Battilani, P., Avramidis, N., Markakis, E. A., & Tjamos, E. C. (2008). Phyllosphere grapevine yeast *Aureobasidium pullulans* reduces *Aspergillus carbonarius* (sour rot) incidence in wine-producing vineyards in Greece. *Biological Control*, 46, 158–165.
- Edgar, R. C. (2013). UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature Methods*, 10, 996–998.
- Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C., & Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 27, 2194–2200.
- Fahrig, L., Baudry, J., Brotons, L., Burel, F. G., Crist, T. O., Fuller, R. J., Sirami, C., Siriwardena, G. M., & Martin, J.-L. (2011). Functional landscape heterogeneity and animal biodiversity in agricultural landscapes. *Ecology Letters*, 14, 101–112.
- Finkel, O. M., Burch, A. Y., Elad, T., Huse, S. M., Lindow, S. E., Post, A. F., & Belkin, S. (2012). Distance-decay relationships partially determine diversity patterns of phyllosphere bacteria on Tamrix trees across the sonoran desert. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 6187–6193.
- Fontúrbel, F. E., Candia, A. B., Malebrán, J., Salazar, D. A., González-Browne, C., & Medel, R. (2015). Meta-analysis of anthropogenic habitat disturbance effects on animal-mediated seed dispersal. *Global Change Biology*, 21, 3951–3960.
- Galante, T. E., Horton, T. R., & Swaney, D. P. (2011). 95% of basidiospores fall within 1 m of the cap: a field-and modeling-based study. *Mycologia*, 103, 1175–1183.
- Gardes, M., & Bruns, T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2, 113–118.
- Garijo, P., López, R., Santamaría, P., Ocón, E., Olarte, C., Sanz, S., & Gutiérrez, A. R. (2011). Presence of enological microorganisms in the grapes and the air of a vineyard during the ripening period. *European Food Research and Technology*, 233, 359–365.

- Geiger, F., de Snoo, G. R., Berendse, F., Guerrero, I., Morales, M. B., Oñate, J. J., Eggers, S., Pärt, T., Bommarco, R., Bengtsson, J., Clement, L. W., Weisser, W. W., Olszewski, A., Ceryngier, P., Hawro, V., Inchausti, P., Fischer, C., Flohre, A., Thies, C., & Tscharnkte, T. (2010). Landscape composition influences farm management effects on farmland birds in winter: A pan-European approach. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, *139*, 571–577.
- Grube, M., Schmid, F., & Berg, G. (2011). Black fungi and associated bacterial communities in the phyllosphere of grapevine. *Fungal Biology*, *115*, 978–986.
- Gu, L., Bai, Z., Jin, B., Hu, Q., Wang, H., Zhuang, G., & Zhang, H. (2010). Assessing the impact of fungicide enostroburin application on bacterial community in wheat phyllosphere. *Journal of Environmental Sciences*, *22*, 134–141.
- Guerry, A. D., & Hunter, M. L. (2002). Amphibian Distributions in a Landscape of Forests and Agriculture: an Examination of Landscape Composition and Configuration. *Conservation Biology*, *16*, 745–754.
- Holzschuh, A., Steffan-Dewenter, I., & Tscharnkte, T. (2008). Agricultural landscapes with organic crops support higher pollinator diversity. *Oikos*, *117*, 354–361.
- Hunter, P. J., Pink, D. A. C., & Bending, G. D. (2015). Cultivar-level genotype differences influence diversity and composition of lettuce (*Lactuca* sp.) phyllosphere fungal communities. *Fungal Ecology*, *17*, 183–186.
- IFN (2008). Nouvelle cartographie forestière - De la production à l'utilisation. *IF*, .
- Jacobs, L., & Houlahan, J. E. (2011). Adjacent land-use affects amphibian community composition and species richness in managed forests in New Brunswick, Canada. *Canadian Journal of Forest Research*, *41*, 1687–1697.
- Jakuschkin, B., Fievet, V., Schwaller, L., Fort, T., Robin, C., & Vacher, C. (2016). Deciphering the Pathobiome: Intra- and Interkingdom Interactions Involving the Pathogen *Erysiphe alphitoides*. *Microbial Ecology*, (pp. 1–11).
- Karlsson, I., Friberg, H., Steinberg, C., & Persson, P. (2014). Fungicide effects on fungal community composition in the wheat phyllosphere. *PLoS ONE*, *9*, e111786.
- Köljal, U., Nilsson, R. H., Abarenkov, K., Tedersoo, L., Taylor, A. F. S., Bahram, M., Bates, S. T., Bruns, T. D., Bengtsson-Palme, J., Callaghan, T. M., Douglas, B., Drenkhan, T., Eberhardt, U., Dueñas, M., Grebenc, T., Griffith, G. W., Hartmann, M., Kirk, P. M., Kohout, P., Larsson, E., Lindahl, B. D., Lücking, R., Martín, M. P., Matheny, P. B., Nguyen, N. H., Niskanen, T., Oja, J., Peay, K. G., Peintner, U., Peterson, M., Põldmaa, K., Saag, L., Saar, I., Schüßler, A., Scott, J. A., Senés, C., Smith, M. E., Suija, A., Taylor, D. L., Telleria, M. T., Weiss, M., & Larsson, K.-H. (2013). Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Molecular Ecology*, *22*, 5271–5277.
- Landis, D. A., Wratten, S. D., & Gurr, G. M. (2000). Habitat Management to Conserve Natural Enemies of Arthropod Pests in Agriculture. *Annual Review of Entomology*, *45*, 175–201.

- Lindow, S. E., & Leveau, J. H. (2002). Phyllosphere microbiology. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 238–243.
- Madden, T. (2013). The BLAST sequence analysis tool. In *The NCBI Handbook*. National Center for Biotechnology Information (US). (2nd ed.).
- Magrath, A., Laurance, W. F., Larrinaga, A. R., & Santamaria, L. (2014). Meta-Analysis of the Effects of Forest Fragmentation on Interspecific Interactions. *Conservation Biology*, 28, 1342–1348.
- Martins, G., Vallance, J., Mercier, A., Albertin, W., Stamatopoulos, P., Rey, P., Lonvaud, A., & Masneuf-Pomarède, I. (2014). Influence of the farming system on the epiphytic yeasts and yeast-like fungi colonizing grape berries during the ripening process. *International Journal of Food Microbiology*, 177, 21–28.
- Michel, N., Burel, F., & Butet, A. (2006). How does landscape use influence small mammal diversity, abundance and biomass in hedgerow networks of farming landscapes? *Acta Oecologica*, 30, 11–20.
- Mordecai, E. A., Adler, A. E. F. R., & Bronstein, E. J. L. (2013). Consequences of Pathogen Spillover for Cheatgrass-Invaded Grasslands: Coexistence, Competitive Exclusion, or Priority Effects. *The American Naturalist*, 181, 737–747.
- Morris, C. E. (2001). Phyllosphere. In *Encyclopedia of Life Sciences*. London: Nature Publishing Group.
- Moulas, C., Petsoulas, C., Rousidou, K., Perruchon, C., Karas, P., & Karpouzas, D. G. (2013). Effects of systemic pesticides imidacloprid and metalaxyl on the phyllosphere of pepper plants. *BioMed Research International*, 2013, 1–8.
- Newton, A., Gravouil, C., & Fountaine, J. (2010). Managing the ecology of foliar pathogens: ecological tolerance in crops. *Annals of Applied Biology*, 157, 343–359.
- Nguyen, N. H., Smith, D., Peay, K., & Kennedy, P. (2015). Parsing ecological signal from noise in next generation amplicon sequencing. *New Phytologist*, 205, 1389–1393.
- Nilsson, R. H., Veldre, V., Hartmann, M., Unterseher, M., Amend, A., Bergsten, J., Kristiansson, E., Ryberg, M., Jumpponen, A., & Abarenkov, K. (2010). An open source software package for automated extraction of ITS1 and ITS2 from fungal ITS sequences for use in high-throughput community assays and molecular ecology. *Fungal Ecology*, 3, 284–287.
- Norris, R. F., & Kogan, M. (2000). Interactions between weeds, arthropod pests, and their natural enemies in managed ecosystems. *Weed Science*, 48, 94–158.
- Peay, K. G., Garbelotto, M., & Bruns, T. D. (2010). Evidence of dispersal limitation in soil microorganisms: Isolation reduces species richness on mycorrhizal tree islands. *Ecology*, 91, 3631–3640.
- Pellissier, L., Oppliger, A., Hirzel, A. H., Savova-Bianchi, D., Mbayo, G., Mascher, F., Kellenberger, S., & Niculita-Hirzel, H. (2016). Airborne and Grain Dust Fungal Community Compositions Are Shaped Regionally by Plant Genotypes and Farming Practices. *Applied and environmental microbiology*, 82, 2121–2131.

- Perović, D., Gámez-Virués, S., Börschig, C., Klein, A.-M., Krauss, J., Steckel, J., Rothenwöhrer, C., Erasmi, S., Tschardtke, T., & Westphal, C. (2015). Configurational landscape heterogeneity shapes functional community composition of grassland butterflies. *Journal of Applied Ecology*, *52*, 505–513.
- Peršoh, D. (2015). Plant-associated fungal communities in the light of meta'omics. *Fungal Diversity*, *75*, 1–25.
- Pinto, C., Pinho, D., Sousa, S., Pinheiro, M., Egas, C., & C. Gomes, A. (2014). Unravelling the Diversity of Grapevine Microbiome. *PLoS ONE*, *9*, e85622.
- Power, A. G., & Mitchell, C. E. (2004). Pathogen spillover in disease epidemics. *The American Naturalist*, *164*, S79–S89.
- Purtauf, T., Roschewitz, I., Dauber, J., Thies, C., Tschardtke, T., & Wolters, V. (2005). Landscape context of organic and conventional farms: Influences on carabid beetle diversity. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, *108*, 165–174.
- R Development Core Team (2006). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria.
- Raspor, P., Miklic-Milek, D., Avbelj, M., & Cadez, N. (2010). Biocontrol of Grey Mould Disease on Grape Caused by *Botrytis cinerea* with Autochthonous Wine Yeasts. *Food Technology and Biotechnology*, *48*, 336–343. WOS:000281138400011.
- Redford, A. J., Bowers, R. M., Knight, R., Linhart, Y., & Fierer, N. (2010). The ecology of the phyllosphere: geographic and phylogenetic variability in the distribution of bacteria on tree leaves: Biogeography of phyllosphere bacterial communities. *Environmental Microbiology*, *12*, 2885–2893.
- Ritchie, L. E., Betts, M. G., Forbes, G., & Vernes, K. (2009). Effects of landscape composition and configuration on northern flying squirrels in a forest mosaic. *Forest Ecology and Management*, *257*, 1920–1929.
- Ruinen, J. (1956). Occurrence of *Beijerinckia* species in the 'phyllosphere'. *Nature*, *177*, 220–221.
- Rusch, A., Delbac, L., Muneret, L., & Thiéry, D. (2015). Organic farming and host density affect parasitism rates of tortricid moths in vineyards. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, *214*, 46–53.
- Sapkota, R., Knorr, K., Jørgensen, L. N., O'Hanlon, K. A., & Nicolaisen, M. (2015). Host genotype is an important determinant of the cereal phyllosphere mycobiome. *New Phytologist*, *207*, 1134–1144.
- Schmale, D. G. I., & Ross, S. D. (2015). Highways in the Sky: Scales of Atmospheric Transport of Plant Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, *53*, 591–611.
- Schmidt, M. H., Roschewitz, I., Thies, C., & Tschardtke, T. (2005). Differential effects of landscape and management on diversity and density of ground-dwelling farmland spiders. *Journal of Applied Ecology*, *42*, 281–287.

- Šímová, P., & Gdulová, K. (2012). Landscape indices behavior: A review of scale effects. *Applied Geography*, *34*, 385–394.
- Sundberg, S. (2013). Spore rain in relation to regional sources and beyond. *Ecography*, *36*, 364–373.
- Turner, T. R., James, E. K., & Poole, P. S. (2013). The plant microbiome. *Genome Biol*, *14*, 209.
- Vacher, C., Cordier, T., & Vallance, J. (2016a). Phyllosphere fungal communities differentiate more thoroughly than bacterial communities along an elevation gradient. *Microbial Ecology*, .
- Vacher, C., Hampe, A., Porté, A. J., Sauer, U., Compant, S., & Morris, C. E. (2016b). The Phyllosphere: Microbial Jungle at the Plant–Climate Interface. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, *47*.
- Vorholt, J. A. (2012). Microbial life in the phyllosphere. *Nature Reviews Microbiology*, *10*, 828–840.
- Wagner, M. R., Lundberg, D. S., Rio, T. G. d., Tringe, S. G., Dangl, J. L., & Mitchell-Olds, T. (2016). Host genotype and age shape the leaf and root microbiomes of a wild perennial plant. *Nature Communications*, *7*, 12151.
- Whipps, J., Hand, P., Pink, D., & Bending, G. (2008). Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. *Journal of Applied Microbiology*, *105*, 1744–1755.
- Xu, X.-M., Jeffries, P., Pautasso, M., & Jeger, M. J. (2011). Combined use of biocontrol agents to manage plant diseases in theory and practice. *Phytopathology*, *101*, 1024–1031.

Chapitre 6

Discussion générale et perspectives

Sommaire

6.1	Effet du paysage sur les communautés fongiques foliaires .	151
6.1.1	Hypothèse de travail	151
6.1.2	Effet du paysage à l'échelle locale	151
6.1.3	Effet du paysage à l'échelle régionale	153
6.2	Comparaison de la variabilité intra et inter-parcelle	154
6.3	Contribution relative des processus de structuration des communautés fongiques foliaires	156
6.4	Rôle fonctionnel des micro-organismes foliaires et conséquences agronomiques	157
6.4.1	Fonctions des micro-organismes identifiés	158
6.4.2	Séparation des communautés épiphytes et endophytes	158
6.4.3	Méthodes alternatives d'identification de fonctions dans les communautés fongiques foliaires	160
6.5	Perspectives	160
6.6	Références	162

6.1 Effet du paysage sur les communautés fongiques foliaires

6.1.1 Hypothèse de travail

L'objectif principal de cette thèse était d'évaluer l'influence de la structure paysagère sur les communautés microbiennes foliaires. Notre hypothèse de travail était que les habitats naturels ou semi-naturels sont une source de micro-organismes foliaires pour les cultures. Plus précisément, nous avons supposé que la forêt influence les communautés microbiennes foliaires de la vigne via le processus de dispersion. Pour tester cette hypothèse, nous avons comparé la richesse et la composition microbienne foliaire en vigne et en forêt, au cours d'une saison de végétation (chapitre 3), testé l'effet d'une lisière forestière sur les communautés microbiennes foliaires de la vigne (chapitre 4) et évalué l'effet de la composition du paysage sur les communautés microbiennes foliaires de la vigne (chapitre 5). L'ensemble des résultats obtenus suggère que le paysage n'influence pas la structure des communautés fongiques foliaires de la vigne (**Fig. 6.1**).

6.1.2 Effet du paysage à l'échelle locale

A l'échelle locale, nous avons montré que les communautés fongiques foliaires forestières et viticoles divergeaient au cours de la saison (chapitre 3), suggérant qu'il n'y a pas de transferts de micro-organismes entre les deux habitats, ou tout du moins, que ces transferts n'influencent pas la composition des communautés foliaires. Nous n'avons pas détecté d'effet de lisière sur les communautés fongiques foliaires de la vigne (chapitres 3 et 4). Une très faible variabilité intra-parcellaire de la composition de ces communautés a même été mise en évidence (chapitre 4). Ces résultats suggèrent soit (i) qu'il n'y a pas de dispersion de micro-organismes à travers la lisière forêt-vigne détectable à cette échelle, soit (ii) qu'il y a dispersion mais que les micro-organismes ne parviennent pas à coloniser la surface des feuilles, soit (iii) qu'ils y parviennent mais que cette colonisation n'a aucune conséquence dans la structuration globale de la communauté microbienne foliaire.

Les prélèvements actifs des bioaérosols ont montré que les communautés fongiques aériennes ne différaient que très peu entre les habitats forestiers et viticoles (chapitre 3). Les prélèvements passifs effectués l'année suivante sur une durée plus longue ont, à l'inverse, montré une différenciation forte de composition de communautés entre la lisière forestière et la parcelle de vigne (chapitre 4). Une structuration spatiale des communautés déposées passivement dans la vigne a été mise en évidence, notamment due à la proximité à la lisière forestière. La richesse spécifique fongique était en effet supérieure à proximité de la lisière de la forêt, en particulier car le nombre d'OTUs partagées avec la forêt y était plus élevé. L'ensemble de ces résultats suggère donc que des espèces de champignons dispersent bien entre l'habitat forestier et l'habitat viticole. Plusieurs OTUs ayant été trouvées à la fois sur les feuilles de chêne, sur les feuilles de vignes et dans les bioaérosols (chapitres 3 et 4), on peut alors supposer que les espèces de champignons qui dispersent entre les deux habitats sont bien capables de coloniser les feuilles de vigne, mais n'influencent pas la structuration des communautés résidentes (iii). Cela suppose donc que les pressions de sélection exercées sur les communautés

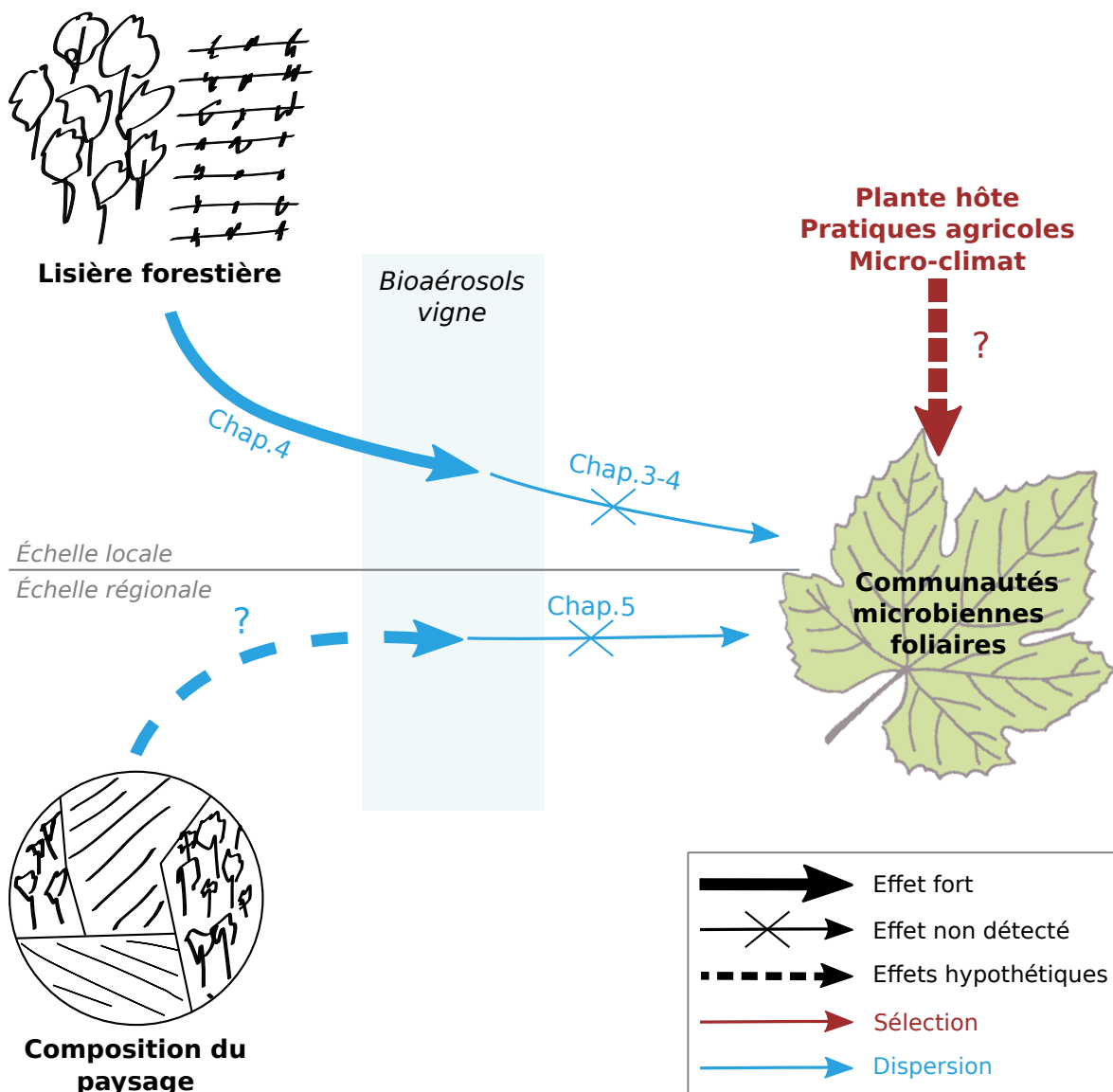


Figure 6.1 – Synthèse des résultats principaux obtenus au cours de cette thèse. La référence au chapitre correspondant est indiquée. Les points d'interrogation indiquent des hypothèses formulées, dont le résultat n'a pas pu être démontré.

fongiques foliaires forestières et viticoles différent.

Les lisières entre forêts et milieux agricoles sont généralement des zones de transition brutale, et sont donc souvent considérées comme des barrières à la dispersion et à la migration (López-Barrera et al., 2006; Nams, 2012; Schultz & Crone, 2001; Wratten et al., 2003). Nos résultats indiquent que cette lisière forestière est perméable à la dispersion de champignons. Il en est donc probablement de même pour les autres micro-organismes. Cependant, les informations dont nous disposons permettent seulement de supposer l'existence d'un flux d'espèces microbiennes entre les deux habitats, sans pouvoir le quantifier. La mesure ou la modélisation des flux horizontaux reste difficile à mettre en place (Morris et al., 2014). En effet, le transport horizontal et le dépôt des particules aériennes dépendent de nombreux paramètres physiques tels que la turbulence, paramètres fortement modifiés au niveau de ces lisières (Pan et al., 2015; Yang et al., 2006). De plus, la dispersion des propagules varie en fonction de paramètres supplémentaires, tels que leur taille, leur densité, leur forme ou la hauteur depuis laquelle elles sont émises (Morris et al., 2014; Norros et al., 2014; Schmale & Ross, 2015; Yamamoto et al., 2012). A l'heure actuelle, des travaux sont réalisés aux États-Unis afin de modéliser la dispersion des particules au niveau de la canopée de la vigne (Bailey et al., 2014; Miller et al., 2015). Le projet Flux.Com, dans lequel cette thèse est intégré, comprend aussi un volet qui cherche à estimer et modéliser les flux de particules biologiques au niveau de la vigne et de la lisière forêt-vigne.

Contrairement à la vigne, dans l'habitat forestier, un effet de lisière a été observé sur les communautés fongiques foliaires des deux espèces étudiées sur plusieurs sites (chêne et charme; chapitre 3). Un transfert d'espèces depuis la vigne vers la forêt pourrait expliquer ce résultat. Cependant, la divergence temporelle observée entre les communautés foliaires viticoles et forestières (chapitre 3) donne peu de crédit à cette explication. Des différences microclimatiques et physiologiques existent entre la lisière et le centre de la forêt, et pourraient expliquer cet effet (Chen et al., 1993; Kunert et al., 2015; Zheng et al., 2005). Par exemple, en lisière de forêt, la température moyenne et la vitesse moyenne du vent sont plus élevées (Chen et al., 1993), et les arbres y ont un taux d'évapotranspiration plus important (Kunert et al., 2015). Ces différences environnementales sélectionneraient ainsi des espèces de micro-organismes foliaires en lisière.

6.1.3 Effet du paysage à l'échelle régionale

A l'échelle régionale, la proportion de forêts dans un rayon d'un kilomètre n'a pas d'effet sur la composition des communautés fongiques des feuilles de vigne (chapitre 5). Cependant, la forte variabilité de composition des communautés observée entre les parcelles suggère que d'autres facteurs pourraient être impliqués dans la structuration de ces communautés. D'autres paramètres paysagers pourraient potentiellement expliquer cet effet : la mesure de nouvelles variables paysagères sera donc réalisée. Nous avons choisi d'estimer la composition du paysage dans un rayon d'1 km. Ce choix, basé initialement sur les études réalisées sur les communautés de vertébrés, d'invertébrés et de plantes (Bertrand et al., 2015; Hahn et al., 2013; Herrera et al., 2016; Holzschuh et al., 2008; Rusch et al., 2015) n'était peut-être pas le plus judicieux étant donné que

les distances de dispersion des micro-organismes peuvent être considérables (Barberán et al., 2014; Brown & Hovmøller, 2002; Morris et al., 2014; Schmale & Ross, 2015). Par exemple, des événements de dispersion longue distance surviennent chez les rouilles, sur plusieurs centaines de kilomètres (Hovmøller et al., 2002), et peuvent avoir des conséquences sanitaires importantes, bien que ces événements soient rares et localisés dans le temps. La proportion de forêts dans le paysage environnant chaque parcelle sera donc calculée en utilisant des zones tampons de diamètre variable. Cependant, la région étudiée ici n'est pas suffisamment vaste pour utiliser des zones tampon trop étendues (chapitre 5 - Fig. 5.1). Au delà de cinq kilomètres de diamètre, la plupart des zones tampons se recoupent entre elles, et la métrique perd en variabilité. Des zones tampons asymétriques peuvent aussi être utilisées, tenant par exemple compte des vents dominants dans la région.

Outre des métriques de composition, des mesures de la complexité du paysage pourraient être utilisées pour expliquer la forte variabilité observée sur les communautés fongiques foliaires de la vigne. En particulier, la distance au patch forestier le plus proche pourrait influencer la dispersion d'espèces microbiennes. Peay et al. (2010) ont montré, au sein de petits patchs forestiers, que la richesse en champignons mycorhiziens diminue quand l'éloignement aux grands patchs forestiers augmente. Ils prédisent ainsi une perte d'espèces de 50% à partir d'1 km de distance des grands patchs forestiers. D'autres métriques, plus complexes, peuvent aussi intégrer la taille des patchs forestiers à proximité, leur connectivité, ou encore la fragmentation des habitats dans le paysage. Par exemple, la richesse en champignons colonisant le bois diminue avec l'augmentation de la fragmentation des habitats forestiers (Abrego & Salcedo, 2014; Ódor et al., 2006).

6.2 Comparaison de la variabilité intra et inter-parcelle

La variabilité de composition des communautés fongiques foliaires de la vigne est plus faible au sein d'une même parcelle qu'entre les parcelles de la région étudiée (chapitres 4 et 5, **Fig. 6.2**). Ce résultat peut être expliqué par l'action de multiples pressions de sélection.

A l'échelle d'une parcelle, les viticulteurs plantent des pieds de vigne greffés avec un cépage qui est une variété multiclonale, c'est à dire que plusieurs clones existent au sein d'un cépage. La variabilité génétique intra-parcellaire de la plante hôte est donc réduite. A l'inverse, les différents viticulteurs de la région peuvent cultiver le même cépage (majoritairement le merlot dans cette étude), mais ils n'utilisent pas forcément le même clone. Il en résulte une variabilité génétique plus importante qu'au sein de la même parcelle. De nombreuses études, réalisées sur différentes espèces de plantes ont justement montré que la distance génétique entre les individus modifie la composition des communautés microbiennes foliaires (Bálint et al., 2013; Bodenhausen et al., 2014; Cordier et al., 2012; Hunter et al., 2015). Les résultats issus des feuilles prélevées sur les espèces forestières vont dans ce sens. Sur le chêne par exemple, en fin de saison, une forte variabilité de composition des communautés fongiques foliaires a été observée (chapitre 3, Fig. 3.5). Ces arbres, malgré leur proximité géographique et phylogénétique présentent des variabilités génotypiques, pouvant conduire à la sélection de communau-

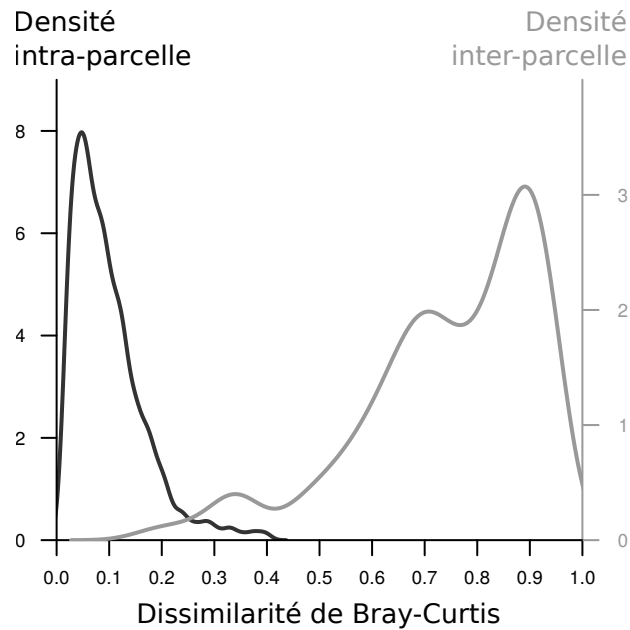


Figure 6.2 – Courbes de densité de probabilité de la dissimilarité de Bray-Curtis entre les communautés fongiques des feuilles de vigne. En noir, dissimilarité entre échantillons prélevés au sein de la même parcelle (chapitre 4); en gris, dissimilarité entre échantillons issus de plusieurs parcelles distinctes (chapitre 5).

tés microbiennes distinctes. Cet effet a notamment été mis en évidence sur des espèces forestières, comme le charme (Cordier et al., 2012) ou le chêne (Jakuschkin, 2015). Une comparaison des génotypes entre les pieds de vigne échantillonnés nous permettra de vérifier si la distance génétique entre ces individus est corrélée à la dissimilarité des communautés fongiques foliaires.

Les pratiques agricoles effectuées dans les vignes, en particulier l'utilisation de pesticides, peuvent aussi être responsables de cette différence de variabilité intra et inter-parcelles. Plusieurs études ont montré que l'application de pesticides influence à la fois la diversité et la composition des communautés fongiques associées aux plantes (Bertelsen et al., 2001; Cordero-Bueso et al., 2014; Karlsson et al., 2014; Moulas et al., 2013; Ottesen et al., 2015). A l'échelle parcellaire, ce sont les mêmes molécules actives qui sont utilisées, et qui sont appliquées au même moment. Leur action devrait donc être similaire sur tous les individus de la parcelle, et induirait une homogénéisation des communautés microbiennes foliaires. La forte dominance d'*Aureobasidium pullulans* en fin de saison est en accord avec cette hypothèse (chapitre 4, 89% des séquences fongiques foliaires viticoles). Cette espèce de champignon a été trouvée abondante sur les communautés fongiques des baies de raisin, en particulier après l'application successive de fongicides (Comitini & Ciani, 2008; Grube et al., 2011; Martini et al., 2009; Pinto et al., 2014). Elle est supposée être plus compétitrice que les autres espèces, et se réimplante facilement après une perturbation (Comitini & Ciani, 2008; Grube et al., 2011). L'application de fongicides aurait alors pour conséquence une perturbation régulière des communautés microbiennes foliaires et provoquerait leur homogénéisation dans le temps. A l'échelle régionale, chaque viticulteur n'utilise pas les mêmes molécules actives, et ne met pas en place le même calendrier de traitements. Il en résulte une diversité de pratiques pouvant sélectionner des communautés fongiques foliaires dis-

tinctes, ce qui expliquerait la variabilité plus importante trouvée à cette échelle. Même si *A. pullulans* était encore une fois dominant (chapitre 5, 22%), différentes pratiques peuvent agir différemment sur les autres membres de la communauté, modifiant leur composition.

Des variations micro-climatiques peuvent enfin expliquer cette différence de variabilité intra et inter-parcellaire. Bien qu'il existe des micro-variations environnementales au sein d'une même parcelle (par exemple dues à des effets de lisière), celles-ci sont supposées être moins fortes qu'entre des parcelles réparties dans la région. La proximité d'un cours d'eau, la pente ou l'exposition peuvent par exemple engendrer des différences micro-climatiques entre les parcelles, pouvant se répercuter sur les communautés fongiques foliaires.

6.3 Contribution relative des processus de structuration des communautés fongiques foliaires

L'ensemble des résultats obtenus suggère donc que la sélection affecte plus la structuration des communautés fongiques foliaires que ne le fait la dispersion. Ces résultats confirment de ceux obtenus lors de précédentes études. Redford et al. (2010) ont montré que, malgré une distance géographique de plusieurs milliers de kilomètres, les aiguilles de *Pinus ponderosa* hébergeaient des communautés bactériennes similaires. De même, Morrison-Whittle & Goddard (2015) ont montré que la sélection était le facteur prédominant dans la structuration des communautés fongiques des baies et de l'écorce des ceps de vigne. Kivlin et al. (2014) ont aussi montré que les communautés fongiques du sol étaient plus structurées par les filtres sélectifs que par la limitation de la dispersion.

Cependant, la première expérimentation (chapitre 3) a mis en évidence que les communautés fongiques foliaires de la vigne étaient, en début de saison, plus similaires de celle des arbres forestiers qu'en milieu et fin de saison. Ainsi, la dispersion pourrait jouer un rôle dans la structuration des communautés microbiennes foliaires en tout début de saison, lors de l'arrivée à la surface des feuilles des premiers colonisateurs. Copeland et al. (2015) montrent ainsi qu'au début de la saison, les communautés bactériennes des feuilles de haricots, de soja et de colza sont relativement proches de celles du sol. Ils supposent que les communautés foliaires sont dans un premier temps confrontées à de multiples colonisations depuis le sol ou l'air. Puis, dans un second temps, les bactéries entrent en compétition inter-spécifiques, conduisant à une dominance d'espèces spécifiques des feuilles. De même, Maignien et al. (2014) ont montré, sur des plants d'*Arabidopsis thaliana* cultivés sur un milieu stérile, que la colonisation initiale dépendait fortement de la dispersion depuis les bioaérosols, et que les communautés microbiennes foliaires évoluaient ensuite en fonction de la compétition inter-spécifique. Ainsi, le processus de dispersion jouerait un rôle clé sur les communautés microbiennes foliaires en début de saison, mais les pressions de sélection deviendraient rapidement dominantes (**Fig. 6.3**). A l'origine, les communautés foliaires fongiques devaient être aussi étudiées juste après le débourrement, en tout début de saison végétative (chapitre 3). A cause des différences de phénologie entre les vignes et les arbres forestiers, nous n'avons finalement pas caractérisé ces communautés, faute de quantité de matériel équivalente.

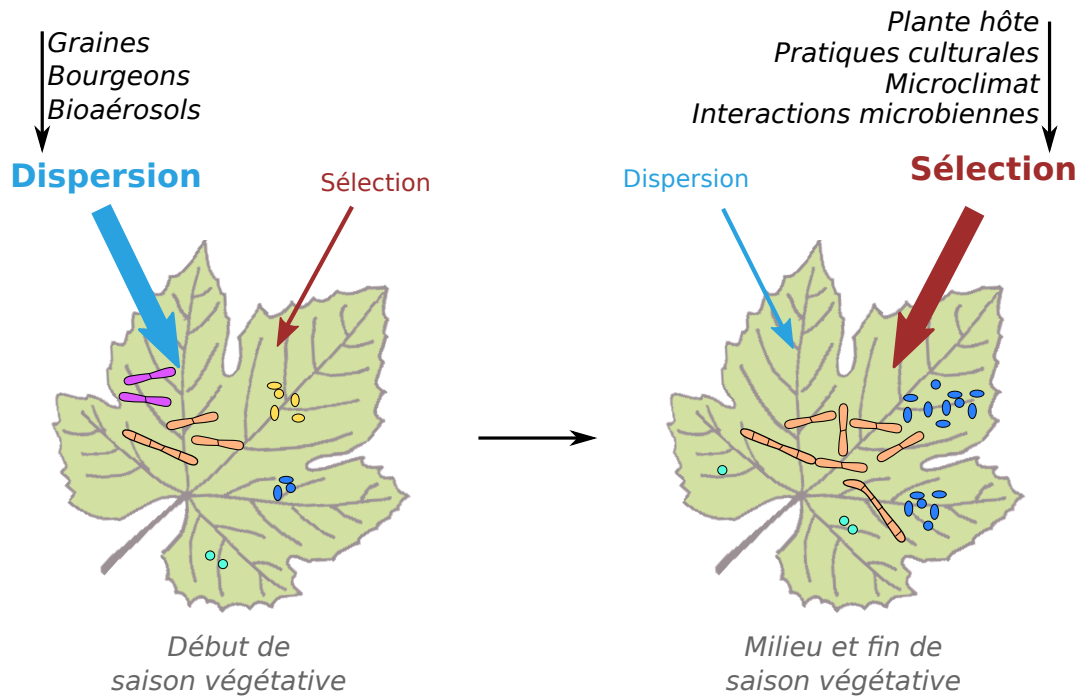


Figure 6.3 – Hypothèse du changement, au cours de la saison, de la contribution relative des processus de sélection et de dispersion sur les communautés microbiennes foliaires. En début de saison végétative, la dispersion serait majoritaire, avant que les pressions de sélections ne deviennent dominantes.

A l'échelle régionale, nous n'avons pas étudié la composition fongique des bioaérosols. Il est donc plus difficile d'estimer la contribution relative de la dispersion dans la structuration des communautés foliaires. Néanmoins, la forte variabilité observée entre les parcelles reste cohérente avec les résultats de Copeland et al. (2015) et Maignien et al. (2014). En début de saison, la colonisation des feuilles a pu se faire à partir des bioaérosols. Si les premiers colonisateurs différaient alors entre les parcelles, chaque communauté a alors pu suivre une trajectoire de succession différente (Maignien et al., 2014). La potentielle structuration spatiale initiale a alors pu être gommée au fil de la saison. Au final, la variabilité observée dans cette étude peut résulter du processus de dispersion, mais l'action de la sélection sur les communautés au cours de la saison aurait masqué la structuration spatiale initiale.

6.4 Rôle fonctionnel des micro-organismes foliaires et conséquences agronomiques

Les micro-organismes d'une communauté foliaire interagissent entre eux ainsi qu'avec la plante et d'autres macro-organismes (Newton et al. 2010b). Par conséquent, chaque espèce microbienne occupe une fonction au sein de la communauté (Saleem, 2015). Par exemple, chaque espèce possède son propre mode d'acquisition des ressources dans le milieu. En ce qui concerne les champignons, trois grands groupes fonctionnels distincts émergent : les saprophytes, se nourrissant de matière organique morte, les pathogènes et les mutualistes (Nguyen et al., 2016; Tedersoo et al., 2014). Des sous-groupes fonc-

tionnels plus fins peuvent ensuite être déterminés. En agronomie, la performance et la santé des cultures dépendent des rôles fonctionnels de chaque membre de la communauté microbienne : une connaissance approfondie des fonctions des micro-organismes foliaires pourrait permettre de faire évoluer les pratiques culturales.

6.4.1 Fonctions des micro-organismes identifiés

Parmi les OTUs identifiées sur les feuilles de vigne, plusieurs ont été assignées à des espèces connues pour leur rôle fonctionnel au sein des communautés microbiennes, ainsi que pour les conséquences agronomiques de cette fonction. *Erysiphe necator*, identifié lors des trois expérimentations, est le champignon responsable de l'oïdium de la vigne. Son impact agronomique sur la santé du vignoble ainsi que sur la qualité et la quantité des récoltes peut être très fort (Gadoury et al., 2012).

A la surface des feuilles, de nombreux antagonistes de pathogènes ont aussi été retrouvés au cours des trois expérimentations. *A. pullulans* est connu en viticulture pour son fort pouvoir compétitif ; certaines souches sont d'ailleurs utilisées en lutte biologique (Chi et al., 2009). D'autres antagonistes généralistes ont par ailleurs été identifiés, tels que *Epicoccum nigrum* ou *Alternaria sp.* (Dugan et al., 2002; Musetti et al., 2007). Un parasite spécialiste des espèces d'oïdium a même été détecté, *Ampe-lomyces quisqualis*, lui aussi utilisé en lutte biologique (Angeli et al., 2009; Gadoury et al., 2012).

L'absence d'effet du paysage sur la composition des communautés fongiques foliaires suggère qu'il n'influence pas non plus le fonctionnement de ces communautés. Cependant, l'analyse des communautés telle qu'elle a été conduite ici décrit l'ensemble de l'ADN fongique trouvé sur ou dans la feuille, mais n'indique pas si chaque espèce joue bien un rôle fonctionnel dans la communauté. Des expérimentations supplémentaires permettraient de mettre en évidence le fonctionnement de ces communautés.

6.4.2 Séparation des communautés épiphytes et endophytes

La différenciation des communautés épiphytes et endophytes de la plante serait un premier moyen d'identifier plus précisément la fonction des champignons au sein du microbiote foliaire. En effet, les adaptations nécessaires à la vie à l'intérieur des tissus et à la surface de la feuille sont totalement différentes. Les endophytes sont généralement des micro-organismes fortement liés à la plante, tels que des pathogènes ou des mutualistes (Beattie & Lindow, 1995; Osono, 2014). Les épiphytes sont quand à eux, pour la plupart, saprophytes (Beattie & Lindow, 1995; Newton et al., 2010a).

Nous avons mené, parallèlement à cette thèse, une expérimentation afin d'identifier, le long d'un transect depuis le centre de la forêt jusqu'au centre de la vigne, les communautés aériennes se déposant passivement, les épiphytes, et les endophytes foliaires. Les prélèvements ont été réalisés en Septembre 2014, sur les trois sites présentés en chapitre 3. Les bioaérosols ont été capturés grâce à des pièges passifs, selon la méthode présentée en chapitre 4. Plusieurs protocoles expérimentaux ont été testés afin de parvenir à séparer correctement les communautés épiphytes et endophytes. La méthode

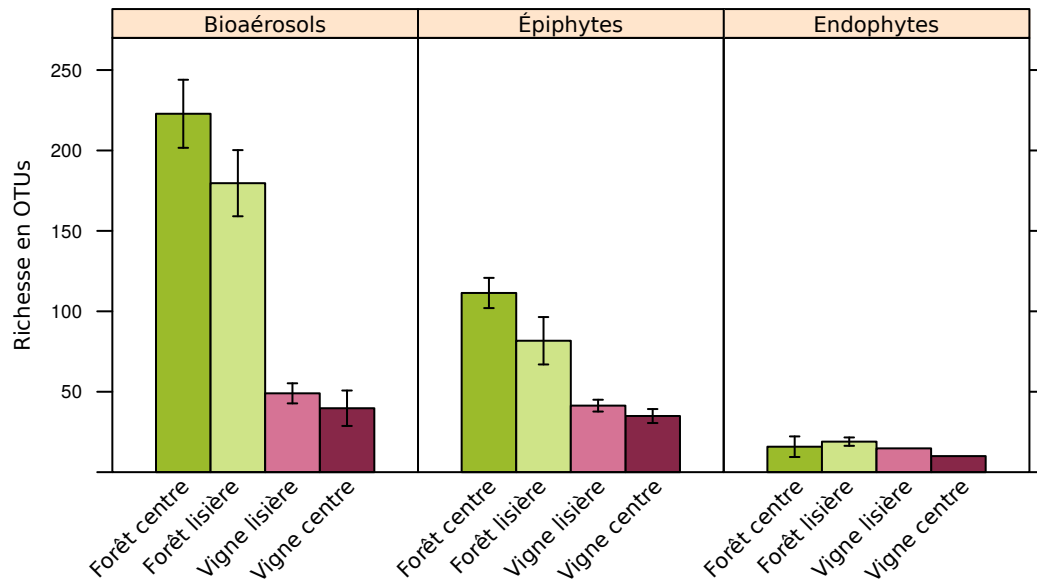


Figure 6.4 – Résultats préliminaires de l’expérimentation caractérisant les communautés fongiques des bioaérosols, des épiphytes et des endophytes foliaires. Deux échantillons contenant trop peu de séquences ont été écartés : c’est pourquoi l’erreur type de la moyenne n’a pu être calculée pour les endophytes de la vigne.

choisie est inspirée de Qvit-Raz et al. (2008), et consistait à effectuer plusieurs phases de sonication. La sonication permet de décrocher les particules présentes à la surface d’un objet, en utilisant des ondes ultrasonores à 42 kHz. C’est une méthode employée principalement dans les hôpitaux et les bijouteries afin de nettoyer le matériel médical ou les bijoux. La fraction épiphyte ainsi obtenue, la surface de la feuille a ensuite été désinfectée à l’eau de javel et à l’éthanol, puis broyée afin d’obtenir la fraction endophyte.

Les premiers résultats obtenus montrent que la richesse en épiphytes est largement supérieure à la richesse en endophytes, mais est inférieure à celle des bioaérosols (**Fig. 6.4**). Pour les bioaérosols et les épiphytes, la richesse est plus forte en forêt qu’en vigne, mais pas pour les endophytes. Aucun effet lisière n’a été détecté ni en forêt, ni en vigne, dans aucun des trois compartiments.

La séparation épiphytes-endophytes présente néanmoins un biais majeur. Parmi les micro-organismes qualifiés d’épiphytes, certains sont arrivés à la surface de la feuille par hasard, et ne présentent pas les adaptations nécessaires à leur survie sur ce milieu (Lindow & Brandl, 2003). La méthode de métabarcoding les détecte néanmoins et les considère comme faisant partie intégrante de la communauté, alors qu’ils ne jouent aucun rôle fonctionnel au sein de celle-ci. Des méthodes alternatives peuvent permettre de mieux identifier les fonctions au sein de ces communautés.

6.4.3 Méthodes alternatives d'identification de fonctions dans les communautés fongiques foliaires

A partir de données issues de métabarcoding, il est possible d'inférer des réseaux d'interactions en se basant sur la co-occurrence des OTUs (Agler et al., 2016; Heijden & Hartmann, 2016; Jakuschkin et al., 2016; Poudel et al., 2016; Vacher et al., 2016). A partir de l'assignation taxonomique des membres de la communauté et du réseau ainsi créé, il est alors possible de mettre en évidence des organismes potentiellement en interaction, et d'inférer leur rôle fonctionnel au sein de la communauté. Cette méthode, déjà utilisée sur des communautés de la phyllosphère, a permis de mettre en évidence des antagonistes potentiels de l'oïdium du chêne (Jakuschkin et al., 2016).

Récemment, Nguyen et al. (2016) ont mis en place un outil appelé FUNGuild. A partir des données issues de métabarcoding, les OTUs fongiques sont séparés en guildes écologiques distinctes en se basant sur leur assignation taxonomique. Autrement dit, les espèces identifiées exploitant les mêmes ressources, partageant donc la même niche écologique, sont regroupées entre elles. Cet outil permettrait ainsi d'obtenir, rapidement, des informations sur la fonction de chaque OTU fongique décrite par métabarcoding. Cependant, la base de données associée est à ce jour encore trop peu fournie pour que cet outil soit pleinement fonctionnel.

Un des principaux problèmes du métabarcoding est qu'il se base sur l'ADN : les micro-organismes en dormance, les spores ou les cellules mortes de l'échantillon contiennent aussi de l'ADN qui sera séquencé. La méta-transcriptomique permet de passer outre ce problème en séquençant des ARN (Peršoh, 2015). En effet, les ARN ne sont pas transcrits lorsque les cellules sont en dormance, et sont très rapidement dégradés lors de la mort de l'organisme (Anderson & Parkin, 2007; van der Linde & Haller, 2013). Cette méthode a déjà été utilisée pour caractériser la communauté microbienne "active" associée à la feuille (Delhomme et al., 2015; Vogel et al., 2016). Cependant, les ARN sont plus fragiles que les ADN et nécessitent beaucoup de plus de précautions au moment de la préparation des échantillons (Peršoh, 2015).

6.5 Perspectives

Les expérimentations mises en place au cours de cette thèse ont permis d'apporter des éléments de réponse à notre hypothèse de travail. L'ensemble des résultats obtenus suggère ainsi que le paysage a un rôle réduit dans la structuration des communautés fongiques foliaires de la vigne. La dispersion pourrait avoir un rôle majeur dans la structuration de ces communautés, mais principalement en début de saison, les nombreuses pressions de sélections devenant par la suite rapidement dominantes. Les applications agronomiques de cette thèse sont donc finalement réduites. Alors que la présence, l'abondance et la diversité de nombreux auxiliaires des cultures sont modifiées par les paramètres du paysage, ce n'est pas le cas des potentiels auxiliaires fongiques de la vigne. Cependant, l'étude de l'ensemble des communautés telle que nous l'avons réalisée reste très générale, et ne permet pas une quantification précise du service écosystémique potentiellement fourni par la forêt à la vigne. Un volet du projet Flux.Com auquel est rattachée cette thèse cible plus précisément une espèce de

champignon, *Ampelomyces quisqualis*, parasite des oïdiums. Les capacités de dispersion et de colonisation de cet auxiliaire sont actuellement étudiées sur des plants de chêne infectés par de l'oïdium.

Les multiples pressions de sélection exercées sur les communautés fongiques foliaires de la vigne ont pu masquer un effet potentiel de la dispersion que nous ne sommes pas parvenus à mettre en évidence. En particulier, l'ajout successif de pesticides dans les vignobles semble conduire à une diminution de la richesse spécifique fongique à la surface des feuilles, ainsi qu'à une modification des communautés. L'un des principaux défis en agriculture à l'heure actuelle est la diminution d'intrants dans les cultures, dans le but de réduire notre impact sur l'environnement. C'est d'ailleurs l'objectif du plan Ecophyto mis en place en 2008, suite au Grenelle de l'environnement. L'utilisation de méthodes de lutttes alternatives contre les pathogènes et les nuisibles est donc encouragée, en utilisant par exemple des variétés résistantes ou des méthodes de lutte biologique. Si l'apport de pesticides au cours de la saison est réduit et moins fréquent, les pressions de sélection exercées par ce facteur devraient être réduites. Dans ce cas, un effet de la dispersion pourrait être révélé, jusqu'à présent masqué par les pressions de sélection.

Afin de vérifier qu'en l'absence de pesticides, la forêt influence la structure des communautés fongiques foliaires, une expérimentation complémentaire pourrait être conduite. Afin de s'affranchir de l'effet des pratiques culturales en vigne, l'expérimentation du chapitre 3 pourrait être mise en place mais dans un milieu ouvert à l'écart des zones viticoles. Plusieurs sites constitués d'une prairie et d'une forêt adjacente seraient sélectionnés. Des plants de vignes en pot seraient disposés le long d'un transect depuis l'intérieur de la forêt jusqu'à plusieurs centaines de mètres à l'intérieur de la prairie, perpendiculairement à la lisière. Un prélèvement régulier de feuilles serait réalisé sur chaque pied, tout au long de la saison végétative, à chaque étape phénologique. Si tout au long de la saison, tous les pieds de vigne hébergent des communautés fongiques foliaires semblables, cela signifierait que la dispersion depuis la forêt n'a définitivement aucun effet sur les communautés fongiques foliaires. La plante hôte serait ainsi le facteur prédominant de structuration des communautés fongiques foliaires. En revanche, si des différences sont observées le long de ce transect, cela pourrait provenir soit d'un effet de la dispersion depuis la forêt, soit d'un effet microclimatique, pouvant varier en fonction de l'habitat ou de la distance à la lisière.

Une expérimentation en conditions contrôlées permettrait de vérifier si les micro-organismes des communautés foliaires forestières sont capables de coloniser des feuilles de vigne, puis de se répercuter sur la succession des communautés microbiennes viticoles. Des plants de vignes pourraient être placés en serre ou en chambre climatique, en prenant soin de limiter au maximum tout apport extérieur de micro-organismes. Des micro-organismes prélevés sur des feuilles d'essences forestières seraient appliqués sur un groupe à l'aide d'un spray, alors que des micro-organismes de feuilles de vigne seraient appliqués sur un second groupe, et qu'un troisième groupe servirait de témoin (sans apport). La dynamique temporelle des communautés fongiques foliaires de chaque groupe serait ensuite suivie. Des différences entre ces trois groupes nous permettrait de tester si des espèces implantées sur des arbres forestiers peuvent coloniser les feuilles de vigne, et si, en conditions naturelles, cet effet est masqué par une sélection par le mi-

croclimat ou par le mode de culture. L'inoculation de pathogènes foliaires de la vigne, tels que l'oïdium (*Erysiphe necator*) ou le mildiou (*Plasmopara viticola*) pourraient aussi être réalisées sur ces plants. La comparaison des symptômes entre les groupes permettrait d'identifier un potentiel service écosystémique apporté par les forêts, et ouvrirait de nouvelles pistes de recherche en terme de gestion de la qualité sanitaire de la vigne et des autres cultures. Cependant, bien que cette expérimentation fournirait des informations précises sur le rôle relatif des processus structurant les communautés fongiques foliaires, elle serait loin de représenter des conditions environnementales et agronomiques réelles.

6.6 Références

- Abrego, N., & Salcedo, I. (2014). Response of wood-inhabiting fungal community to fragmentation in a beech forest landscape. *Fungal Ecology*, 8, 18–27.
- Agler, M. T., Ruhe, J., Kroll, S., Morhenn, C., Kim, S.-T., Weigel, D., & Kemen, E. M. (2016). Microbial hub taxa link host and abiotic factors to plant microbiome variation. *PLOS Biology*, 14, e1002352.
- Anderson, I. C., & Parkin, P. I. (2007). Detection of active soil fungi by RT-PCR amplification of precursor rRNA molecules. *Journal of Microbiological Methods*, 68, 248–253.
- Angeli, D., Pellegrini, E., & Pertot, I. (2009). Occurrence of *Erysiphe necator* Chasmothecia and Their Natural Parasitism by *Ampelomyces quisqualis*. *Phytopathology*, 99, 704–710.
- Bailey, B. N., Stoll, R., Pardyjak, E. R., & Mahaffee, W. F. (2014). Effect of vegetative canopy architecture on vertical transport of massless particles. *Atmospheric Environment*, 95, 480–489.
- Bálint, M., Tiffin, P., Hallström, B., O'Hara, R. B., Olson, M. S., Fankhauser, J. D., Piepenbring, M., & Schmitt, I. (2013). Host Genotype Shapes the Foliar Fungal Microbiome of Balsam Poplar (*Populus balsamifera*). *PLOS ONE*, 8, e53987.
- Barberán, A., Henley, J., Fierer, N., & Casamayor, E. O. (2014). Structure, inter-annual recurrence, and global-scale connectivity of airborne microbial communities. *Science of The Total Environment*, 487, 187–195.
- Beattie, G. A., & Lindow, S. E. (1995). The Secret Life of Foliar Bacterial Pathogens on Leaves. *Annual Review of Phytopathology*, 33, 145–172.
- Bertelsen, J. R., De Neergaard, E., & Smedegaard-Petersen, V. (2001). Fungicidal effects of azoxystrobin and epoxiconazole on phyllosphere fungi, senescence and yield of winter wheat. *Plant Pathology*, 50, 190–205.
- Bertrand, C., Burel, F., & Baudry, J. (2015). Spatial and temporal heterogeneity of the crop mosaic influences carabid beetles in agricultural landscapes. *Landscape Ecology*, 31, 451–466.

- Bodenhausen, N., Bortfeld-Miller, M., Ackermann, M., & Vorholt, J. A. (2014). A Synthetic Community Approach Reveals Plant Genotypes Affecting the Phyllosphere Microbiota. *PLOS Genet*, *10*, e1004283.
- Brown, J. K. M., & Hovmøller, M. S. (2002). Aerial Dispersal of Pathogens on the Global and Continental Scales and Its Impact on Plant Disease. *Science*, *297*, 537–541.
- Chen, J., Franklin, J. F., & Spies, T. A. (1993). Contrasting microclimates among clearcut, edge, and interior of old-growth Douglas-fir forest. *Agricultural and Forest Meteorology*, *63*, 219–237.
- Chi, Z., Wang, F., Chi, Z., Yue, L., Liu, G., & Zhang, T. (2009). Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *82*, 793–804.
- Comitini, F., & Ciani, M. (2008). Influence of fungicide treatments on the occurrence of yeast flora associated with wine grapes. *Annals of Microbiology*, *58*, 489–493. WOS:000259979700020.
- Copeland, J. K., Yuan, L., Layeghifard, M., Wang, P. W., & Guttman, D. S. (2015). Seasonal Community Succession of the Phyllosphere Microbiome. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *28*, 274–285.
- Cordero-Bueso, G., Arroyo, T., & Valero, E. (2014). A long term field study of the effect of fungicides penconazole and sulfur on yeasts in the vineyard. *International Journal of Food Microbiology*, *189*, 189–194.
- Cordier, T., Robin, C., Capdevielle, X., Desprez-Loustau, M.-L., & Vacher, C. (2012). Spatial variability of phyllosphere fungal assemblages: genetic distance predominates over geographic distance in a European beech stand (*Fagus sylvatica*). *Fungal Ecology*, *5*, 509–520.
- Delhomme, N., Sundström, G., Zamani, N., Lantz, H., Lin, Y.-C., Hvidsten, T. R., Höppner, M. P., Jern, P., Van de Peer, Y., Lundeberg, J., Grabherr, M. G., & Street, N. R. (2015). Serendipitous Meta-Transcriptomics: The Fungal Community of Norway Spruce (*Picea abies*). *PLoS ONE*, *10*, e0139080.
- Dugan, F. M., Lupien, S. L., & Grove, G. G. (2002). Incidence, Aggressiveness and In Planta Interactions of *Botrytis cinerea* and other Filamentous Fungi Quiescent in Grape Berries and Dormant Buds in Central Washington State. *Journal of Phytopathology*, *150*, 375–381.
- Gadoury, D. M., Cadle-Davidson, L., Wilcox, W. F., Dry, I. B., Seem, R. C., & Milgroom, M. G. (2012). Grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*): a fascinating system for the study of the biology, ecology and epidemiology of an obligate biotroph. *Molecular Plant Pathology*, *13*, 1–16.
- Grube, M., Schmid, F., & Berg, G. (2011). Black fungi and associated bacterial communities in the phyllosphere of grapevine. *Fungal Biology*, *115*, 978–986.

- Hahn, T., Kettle, C. J., Ghazoul, J., Hennig, E. I., & Pluess, A. R. (2013). Landscape Composition Has Limited Impact on Local Genetic Structure in Mountain Clover, *Trifolium montanum* L. *Journal of Heredity*, *104*, 842–852.
- Heijden, M. G. A. v. d., & Hartmann, M. (2016). Networking in the Plant Microbiome. *PLOS Biol*, *14*, e1002378.
- Herrera, J. M., Salgueiro, P. A., Medinas, D., Costa, P., Encarnação, C., & Mira, A. (2016). Generalities of vertebrate responses to landscape composition and configuration gradients in a highly heterogeneous Mediterranean region. *Journal of Biogeography*, *43*, 1203–1214.
- Holtschuh, A., Steffan-Dewenter, I., & Tschardt, T. (2008). Agricultural landscapes with organic crops support higher pollinator diversity. *Oikos*, *117*, 354–361.
- Hovmøller, M. S., Justesen, A. F., & Brown, J. K. M. (2002). Clonality and long-distance migration of *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici* in north-west Europe. *Plant Pathology*, *51*, 24–32.
- Hunter, P. J., Pink, D. A. C., & Bending, G. D. (2015). Cultivar-level genotype differences influence diversity and composition of lettuce (*Lactuca* sp.) phyllosphere fungal communities. *Fungal Ecology*, *17*, 183–186.
- Jakuschkin, B. (2015). *Genetic architecture of the interactions between English oak (Quercus robur L.) and the microbial community of its phyllosphere*. Ph.D. thesis Bordeaux.
- Jakuschkin, B., Fievet, V., Schwaller, L., Fort, T., Robin, C., & Vacher, C. (2016). Deciphering the Pathobiome: Intra- and Interkingdom Interactions Involving the Pathogen *Erysiphe alphitoides*. *Microbial Ecology*, (pp. 1–11).
- Karlsson, I., Friberg, H., Steinberg, C., & Persson, P. (2014). Fungicide effects on fungal community composition in the wheat phyllosphere. *PLoS ONE*, *9*, e111786.
- Kivlin, S. N., Winston, G. C., Goulden, M. L., & Treseder, K. K. (2014). Environmental filtering affects soil fungal community composition more than dispersal limitation at regional scales. *Fungal Ecology*, *12*, 14–25.
- Kunert, N., Aparecido, L. M. T., Higuchi, N., Santos, J. d., & Trumbore, S. (2015). Higher tree transpiration due to road-associated edge effects in a tropical moist lowland forest. *Agricultural and Forest Meteorology*, *213*, 183–192.
- van der Linde, S., & Haller, S. (2013). Obtaining a spore free fungal community composition. *Fungal Ecology*, *6*, 522–526.
- Lindow, S. E., & Brandl, M. T. (2003). Microbiology of the phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*, 1875–1883.
- López-Barrera, F., Manson, R. H., González-Espinosa, M., & Newton, A. C. (2006). Effects of varying forest edge permeability on seed dispersal in a neotropical montane forest. *Landscape Ecology*, *22*, 189–203.

- Maignien, L., DeForce, E. A., Chafee, M. E., Eren, A. M., & Simmons, S. L. (2014). Ecological succession and stochastic variation in the assembly of arabidopsis thaliana phyllosphere communities. *mBio*, 5, e00682–13.
- Martini, M., Musetti, R., Grisan, S., Polizzotto, R., Borselli, S., Pavan, F., & Osler, R. (2009). DNA-Dependent Detection of the Grapevine Fungal Endophytes *Aureobasidium pullulans* and *Epicoccum nigrum*. *Plant Disease*, 93, 993–998.
- Miller, N. E., Stoll, R., Mahaffee, W. F., Neill, T. M., & Pardyjak, E. R. (2015). An experimental study of momentum and heavy particle transport in a trellised agricultural canopy. *Agricultural and Forest Meteorology*, 211–212, 100–114.
- Morris, C. E., Leyronas, C., & Nicot, P. C. (2014). Movement of Bioaerosols in the Atmosphere and the Consequences for Climate and Microbial Evolution. In I. Colbeck, & M. Lazaridis (Eds.), *Aerosol Science: Technology and applications* (pp. 393–415). John Wiley & Sons, Ltd.
- Morrison-Whittle, P., & Goddard, M. R. (2015). Quantifying the relative roles of selective and neutral processes in defining eukaryotic microbial communities. *The ISME Journal*, 9, 2003–2011.
- Moulas, C., Petsoulas, C., Rousidou, K., Perruchon, C., Karas, P., & Karpouzas, D. G. (2013). Effects of systemic pesticides imidacloprid and metalaxyl on the phyllosphere of pepper plants. *BioMed Research International*, 2013, 1–8.
- Musetti, R., Polizzotto, R., Vecchione, A., Borselli, S., Zulini, L., D'Ambrosio, M., Toppi, L. S. d., & Pertot, I. (2007). Antifungal activity of diketopiperazines extracted from *Alternaria alternata* against *Plasmopara viticola*: An ultrastructural study. *Micron*, 38, 643–650.
- Nams, V. O. (2012). Shape of patch edges affects edge permeability for meadow voles. *Ecological Applications*, 22, 1827–1837.
- Newton, A., Gravouil, C., & Fountaine, J. (2010a). Managing the ecology of foliar pathogens: ecological tolerance in crops. *Annals of Applied Biology*, 157, 343–359.
- Newton, A. C., Fitt, B. D. L., Atkins, S. D., Walters, D. R., & Daniell, T. J. (2010b). Pathogenesis, parasitism and mutualism in the trophic space of microbe–plant interactions. *Trends in Microbiology*, 18, 365–373.
- Nguyen, N. H., Song, Z., Bates, S. T., Branco, S., Tedersoo, L., Menke, J., Schilling, J. S., & Kennedy, P. G. (2016). FUNGuild: An open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild. *Fungal Ecology*, 20, 241–248.
- Norros, V., Rannik, Ü., Hussein, T., Petäjä, T., Vesala, T., & Ovaskainen, O. (2014). Do small spores disperse further than large spores? *Ecology*, 95, 1612–1621.
- Ódor, P., Heilmann-Clausen, J., Christensen, M., Aude, E., van Dort, K. W., Piltaver, A., Siller, I., Veerkamp, M. T., Walley, R., Standovár, T., van Hees, A. F. M., Kosec, J., Matočec, N., Kraigher, H., & Grebenc, T. (2006). Diversity of dead wood inhabiting fungi and bryophytes in semi-natural beech forests in Europe. *Biological Conservation*, 131, 58–71.

- Osono, T. (2014). Diversity and Ecology of Endophytic and Epiphytic Fungi of Tree Leaves in Japan: A Review. In V. C. Verma, & A. C. Gange (Eds.), *Advances in Endophytic Research* (pp. 3–26). Springer India.
- Ottesen, A. R., Gorham, S., Pettengill, J. B., Rideout, S., Evans, P., & Brown, E. (2015). The impact of systemic and copper pesticide applications on the phyllosphere microflora of tomatoes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *95*, 1116–1125.
- Pan, Y., Chamecki, M., Isard, S. A., & Nepf, H. M. (2015). Dispersion of particles released at the leading edge of a crop canopy. *Agricultural and Forest Meteorology*, *211–212*, 37–47.
- Peay, K. G., Garbelotto, M., & Bruns, T. D. (2010). Evidence of dispersal limitation in soil microorganisms: Isolation reduces species richness on mycorrhizal tree islands. *Ecology*, *91*, 3631–3640.
- Peršoh, D. (2015). Plant-associated fungal communities in the light of meta’omics. *Fungal Diversity*, *75*, 1–25.
- Pinto, C., Pinho, D., Sousa, S., Pinheiro, M., Egas, C., & C. Gomes, A. (2014). Unravelling the Diversity of Grapevine Microbiome. *PLoS ONE*, *9*, e85622.
- Poudel, R., Jumpponen, A., Schlatter, D. C., Paulitz, T. C., Gardener, B. B. M., Kinkel, L. L., & Garrett, K. A. (2016). Microbiome Networks: A Systems Framework for Identifying Candidate Microbial Assemblages for Disease Management. *Phytopathology*, *106*, 1083–1096.
- Qvit-Raz, N., Jurkevitch, E., & Belkin, S. (2008). Drop-Size Soda Lakes: Transient Microbial Habitats on a Salt-Secreting Desert Tree. *Genetics*, *178*, 1615–1622.
- Redford, A. J., Bowers, R. M., Knight, R., Linhart, Y., & Fierer, N. (2010). The ecology of the phyllosphere: geographic and phylogenetic variability in the distribution of bacteria on tree leaves: Biogeography of phyllosphere bacterial communities. *Environmental Microbiology*, *12*, 2885–2893.
- Rusch, A., Delbac, L., Muneret, L., & Thiéry, D. (2015). Organic farming and host density affect parasitism rates of tortricid moths in vineyards. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, *214*, 46–53.
- Saleem, M. (2015). *Microbiome Community Ecology: Fundamentals and Applications*. Springer.
- Schmale, D. G. I., & Ross, S. D. (2015). Highways in the Sky: Scales of Atmospheric Transport of Plant Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, *53*, 591–611.
- Schultz, C. B., & Crone, E. E. (2001). Edge-Mediated Dispersal Behavior in a Prairie Butterfly. *Ecology*, *82*, 1879–1892.
- Tedersoo, L., Bahram, M., Pölme, S., Kõljalg, U., Yorou, N. S., Wijesundera, R., Ruiz, L. V., Vasco-Palacios, A. M., Thu, P. Q., Suija, A., Smith, M. E., Sharp, C., Saluveer, E., Saitta, A., Rosas, M., Riit, T., Ratkowsky, D., Pritsch, K., Põldmaa, K.,

- Piepenbring, M., Phosri, C., Peterson, M., Parts, K., Pärtel, K., Otsing, E., Nouhra, E., Njouonkou, A. L., Nilsson, R. H., Morgado, L. N., Mayor, J., May, T. W., Majuakim, L., Lodge, D. J., Lee, S. S., Larsson, K.-H., Kohout, P., Hosaka, K., Hiiesalu, I., Henkel, T. W., Harend, H., Guo, L.-d., Greslebin, A., Grelet, G., Geml, J., Gates, G., Dunstan, W., Dunk, C., Drenkhan, R., Dearnaley, J., Kesel, A. D., Dang, T., Chen, X., Buegger, F., Brearley, F. Q., Bonito, G., Anslan, S., Abell, S., & Abarenkov, K. (2014). Global diversity and geography of soil fungi. *Science*, *346*, 1256688.
- Vacher, C., Tamaddon-Nezhad, A., Kamenova, S., Peyrard, N., Moalic, Y., Sabbadin, R., Schwaller, L., Chiquet, J., Smith, M. A., Vallance, J., Fievet, V., Jakuschkin, B., & Bohan, D. A. (2016). Chapter One - Learning Ecological Networks from Next-Generation Sequencing Data. In G. W. a. D. A. Bohan (Ed.), *Advances in Ecological Research* (pp. 1–39). Academic Press volume 54 of *Ecosystem Services: From Biodiversity to Society, Part 2*.
- Vogel, C., Bodenhausen, N., Gruissem, W., & Vorholt, J. A. (2016). The Arabidopsis leaf transcriptome reveals distinct but also overlapping responses to colonization by phyllosphere commensals and pathogen infection with impact on plant health. *New Phytologist*, *212*, 192–207.
- Wratten, S. D., Bowie, M. H., Hickman, J. M., Evans, A. M., Sedcole, J. R., & Tylia-nakis, J. M. (2003). Field boundaries as barriers to movement of hover flies (Diptera: Syrphidae) in cultivated land. *Oecologia*, *134*, 605–611.
- Yamamoto, N., Bibby, K., Qian, J., Hospodsky, D., Rismani-Yazdi, H., Nazaroff, W. W., & Peccia, J. (2012). Particle-size distributions and seasonal diversity of allergenic and pathogenic fungi in outdoor air. *The ISME Journal*, *6*, 1801–1811.
- Yang, B., Raupach, M. R., Shaw, R. H., U, K. T. P., & Morse, A. P. (2006). Large-eddy Simulation of Turbulent Flow Across a Forest Edge. Part I: Flow Statistics. *Boundary-Layer Meteorology*, *120*, 377–412.
- Zheng, D., Chen, J., LeMoine, J. M., & Euskirchen, E. S. (2005). Influences of land-use change and edges on soil respiration in a managed forest landscape, WI, USA. *Forest Ecology and Management*, *215*, 169–182.

Annexes

Annexe A

Pipeline bioinformatique

Ce Pipeline rassemble l'intégralité des étapes suivies afin d'obtenir, à partir de données de séquençage ITS en métagénomique, une table d'OTUs représentant les communautés fongiques ainsi qu'une assignation taxonomique de ces OTUs.

Il requiert l'installation préalable de **python**, **qiime**, **usearch**, **vsearch**, **Funga-ITSextractor**. Ces programmes fonctionnant en lignes de commande sous Linux, des notions de bases en Linux/Unix/bash sont indispensables pour comprendre et adapter les fonctions utilisées. En cas de problème de compatibilité des scripts lors du transfert des fichiers entre Windows et Linux, la commande `dos2unix scriptname.extension` peut-être utilisée.

A.1 Analyses par LGC Genomics

Le séquençage a été réalisé par l'entreprise LGC Genomics <http://www.lgcgroup.com>. La méthode de séquençage utilisée était l'Illumina (MiSeq V3), sur l'amplicon spécifique des champignons ITS1, avec les amorces ITS1f-ITS4r (Gardes & Bruns 1993). Pour les deux premières expérimentations, c'est l'ITS2 que nous avons séquéncé, en utilisant les amorces ITS7f-ITS4r (Ihrmark et al. 2012) : le protocole est alors presque identique (seuls les noms changent).

Une partie du traitement bioinformatique a été réalisée par LGC Genomics. Voici les informations fournies par l'entreprise :

- Demultiplexing of all samples (with Illumina bcl2fastq 1.8.4 software)
 - 1 or 2 mismatches or Ns allowed in the barcode read when the barcode distances between all libraries on the lane allowed for it
- Sorting of reads by amplicon inline barcodes
 - 1 mismatche allowed per barcode
 - barcode sequence was clipped from the sequences after sorting
 - reads with missing barcode, one-sided barcodes or conflicting barcode pairs were discarded
- Clipping of sequencing adapters remnant from all reads
 - reads with final length < 100 bases were discarded
- Primer detection and clipping
 - 3 mismatches were allowed per primer

pairs of primers (Fw-Rev or Rev-Fw) had to be present in the sequence fragments

if primer-dimers were detected, the outer primer copies were clipped from the sequence

the sequence fragments were turned into forward-reverse primer orientation after removing the primer sequences

- Combination of forward and reverse reads (with BBMerge 35.43)
 - the consensus sequence of combinable fragments are named `joined-SR`, un-combinable reads pairs sequences end up in the `R1` and `R2` files
- Creation of FastQC reports for all FASTQ files
- Generation of `read_counts.xlsx`, containing all read counts for all samples at a glance.

Un fichier Excel était fourni, indiquant pour chaque échantillon, le nombre de séquences éliminé à chaque étape. D'après ce fichier, nous avons décidé de nous baser sur les données "combinées" exclusivement (fichiers `joined-SR`, sans prendre en compte les fichiers `R1` et `R2`).

A.2 Préparation des données

Ces données ont par la suite été traitées grâce à divers logiciels, fonctionnant en lignes de commande sous Linux.

Ici, les analyses ont été réalisées sur le serveur de Pierroton baptisé "qiime". L'ensemble du dossier `Combined` a été transféré sur le serveur en utilisant FileZilla.

J'ai commencé par créer un dossier sur le serveur, intitulé ici `seqFC15`. Y placer le dossier `Combined`, ainsi que le dossier `Script_Bioinfo` contenant l'ensemble des scripts qui seront utilisés.

A.2.1 Recherche des fichiers combinés

Les données ayant été démultiplexées, les fichiers qui nous intéressent sont répartis dans plusieurs dossiers compressés (1 par échantillon). La fonction suivante recherche dans le dossier `Combined` les fichiers dont le nom se termine par `joined-SR.fastq.bz2`, et les copie dans un nouveau dossier `1_Joined_data`.

```
mkdir 1_Joined_data
find Combined -name '*joined-SR.fastq.bz2' -exec cp {} 1
_Joined_data/ \;
```

- La fonction `mkdir` permet de créer un dossier, intitulé `1_Joined_data`.
- La fonction `find` sert à rechercher, dans le dossier `Combined`, tous les fichiers dont le nom se termine par `joined-SR.fastq.bz2` (utilisation de l'astérisque `*`).
- On exécute (fonction `exec`) une copie (`cp`) du résultat de `find {}` qui sera placée dans le dossier `1_Joined_data/`. L'anti-slash-point virgule `\;` marque la fin de la commande.

A.2.2 Extraction des données

Pour extraire le contenu de ces fichiers compressés, il faut se placer dans le dossier nouvellement créé, et procéder à l'extraction :

```
cd 1_Joined_data
bunzip2 *.bz2
```

- La fonction `cd` sert à se déplacer, ici dans le dossier `1_Joined_data`.
- La fonction `bunzip2` sert à extraire les fichier `.bz2` (utilisation de `*` pour extraire tous les fichiers).

A.2.3 Conversion fastq en fasta

Les fichiers extraits ici sont au format fastq (les séquences et la qualité de chaque nucléotide sont contenues dans le même fichier). La plupart des fonctions utilisant le format fasta, il est nécessaire de convertir ces fichiers. Il suffit d'exécuter la boucle suivante :

```
for FILE in $(find -name '*fastq' -type f -printf "%P\n")
do
echo $FILE
convert_fastaqual_fastq.py -f ${FILE} -o fasta -c
    fastq_to_fastaqual
done
```

- On lance une boucle `for in do done`
- On enregistre dans la variable `FILE`, tour à tour, les noms de fichiers (`-type f`) se terminant par `fastq` (`-printf "%P\n"` sert à imprimer le nom de fichier suivi d'un retour chariot).
- `echo $FILE` permet d'afficher sur le terminal le nom du fichier qui va être converti.
- la fonction écrite en python `convert_fastaqual_fastq.py` convertit ce fichier (`-f ${FILE}`) depuis fastq en fasta (`-c fastq_to_fastaqual`) et le met dans un dossier intitulé `fasta` (`-o fasta`).

Résultat : On obtient un dossier `fasta`, contenant 1 fichier `fasta` et un fichier `qual` par échantillon.

On va maintenant déplacer tous les fichiers `qual` dans un nouveau dossier appelé `qual` :

```
mkdir qual
find fasta -name '*.qual' -exec mv {} qual \;
```

- La fonction `mv` sert à déplacer les fichiers vers le dossier `qual`.

A.2.4 Insérer le nom de l'échantillon dans l'en tête de chaque séquence

Dans les étapes suivantes, les noms de fichiers vont être modifiés, et ces fichiers seront fusionnés. Pour pouvoir retrouver à quel échantillon appartient chaque séquence,

il est indispensable de rajouter à l'en-tête de chaque séquence le nom de l'échantillon qui lui est associé.

J'ai pour cela créé le programme `add_labels_fasta.sh` en bash, qui récupère le nom de l'échantillon à partir du nom du fichier, et l'ajoute à chacune des en-têtes de séquences du même fichier (voir script).

ATTENTION : les noms de fichiers doivent être de la forme `ITS1F-ITS2R-X-X0_joined-SR.fna` (avec X-X0 variant d'un échantillon à l'autre, et symbolise ici la lettre associée à la plaque, suivie de la lettre et du chiffre correspondant au puits séquencé). Sinon, il est nécessaire d'adapter le programme.

Commencer par copier le programme intitulé `add_labels_fasta.sh` dans le dossier `fasta`. puis l'exécuter :

```
cp ../Scripts_bioinfo/add_labels_fasta.sh fasta/
cd fasta
bash add_labels_fasta.sh
```

Résultat : Un dossier `output` a été créé, contenant une copie des fichiers `fasta`. A chaque en-tête de séquence a été ajouté le nom de l'échantillon, sous la forme `barcodelabel=XX0` (X-X0 variant d'un échantillon à l'autre).

A.3 Extraction de l'ITS1

Afin de ne pas intégrer de biais lors de la clusterisation des OTUs, nous allons extraire l'ITS1 de chacune des séquences. Cela permettra de travailler sur des séquences totalement comparables.

Le programme utilisé pour cette étape s'appelle **FungalITSextractor**. J'ai essayé de le faire fonctionner sur un seul fichier global (après fusion de tous les échantillons en un fichier), cependant la vitesse d'exécution diminue quand le nombre de séquences augmente dans un même fichier (probablement à cause de l'étape d'alignement des séquences). Il est donc plus rapide d'exécuter ce programme sur tous les fichiers séparément plutôt que sur ces fichiers fusionnés en un seul.

A.3.1 Installation de l'ITSextractor

ATTENTION : les `hmmers` doivent nécessairement être installés sur l'ordinateur, et le programme doit pouvoir y accéder (dans un répertoire de la variable environnementale `$PATH`, avec les permissions d'exécution).

Créer un dossier `2_ITS_extraction`, dans lequel on va copier le dossier `FungalITSextractor` (téléchargé à l'adresse suivante : <http://www.emerencia.org/FungalITSextractor.html> et décompressé).

Ces étapes peuvent être réalisées "à la main" ou en utilisant les lignes de commandes suivantes :

```
cd ../../ # Retour au dossier seqFC15
mkdir 2_ITS_extraction
cd 2_ITS_extraction
cp ~/Documents/EXTRACTORS/FungalITSextractor.zip .
unzip FungalITSextractor.zip
rm FungalITSextractor.zip
```

Effacer les fichiers tests présents dans les dossier `indata` et `outdata` :

```
rm FungalITSextractor/indata/indata.fasta
rm -r FungalITSextractor/outdata/2009-11-3-1
```

A.3.2 Importation des données

Copier ensuite le dossier `1_Joined_data/output/` (contenant les fichiers `fasta`, avec les en-têtes de séquences modifiées) dans le dossier `FungalITSextractor/indata/`. Renommer ce dossier `output` en `subdir`. Ces étapes peuvent être exécutées à la main ou en ligne de commande :

```
cp -R '../1_Joined_data/output/' 'FungalITSextractor/indata/'
mv FungalITSextractor/indata/output FungalITSextractor/indata/subdir
```

A.3.3 Execution de l'extracteur d'ITS

Copier le script intitulé `FungalITSextractor_multiple_files.sh` dans le répertoire `FungalITSextractor` et l'exécuter :

```
cp ../Scripts_bioinfo/FungalITSextractor_multiple_files.sh
  FungalITSextractor/
cd FungalITSextractor/
bash FungalITSextractor_multiple_files.sh
```

- Ce script va aller chercher chaque fichier `fasta` dans le dossier `indata/subdir/`, va le copier dans le dossier `indata/`, le renommer `indata.fasta`, et exécuter le `FungalITSextractor` sur ce fichier.
- L'exécution du `FungalITSextractor` peut prendre un certain temps (quelques jours), en fonction du nombre de séquences et de fichiers.

Résultat : Pour chaque échantillon, un dossier (identifié par la date et le numéro d'exécution) a été créé, contenant plusieurs fichiers :

- `Both.fasta` : séquences où sont retrouvés ITS1 et ITS2
- `Both.txt` : nom des séquences où sont retrouvés ITS1 et ITS2
- `ITS1.fasta` : séquences où sont retrouvés l'ITS1
- `ITS2.fasta` : séquences où sont retrouvés l'ITS2
- `NoITS1.fasta` : séquences où l'ITS1 est absent
- `NoITS2.fasta` : séquences où l'ITS2 est absent
- `None.txt` : séquences où aucun ITS n'a été détecté
- `outdata.csv` : détail pour chaque séquence

Cependant, le nom de l'échantillon n'apparaît plus ni sur le nom de dossier, ni sur les noms d'échantillons.

A.3.4 Renommer les dossiers et fichiers de sortie

Afin de renommer chaque dossier et chaque fichier de sortie, j'ai créé une petite fonction bash qui va, pour chaque échantillon, aller chercher le nom de l'échantillon (présent dans le fichier le plus susceptible de ne pas être vide ; ici `ITS1.fasta`), ajouter ce nom à chacun des noms de fichier du dossier (par ex. `ITS1.fasta` devient `AA1_ITS1.fasta`), et renommer le dossier parent avec ce même nom (par ex. `AA1`). Le script permettant cette opération s'appelle `rename_FungalITSextractor_output.sh`, et son contenu doit être modifié en fonction des données.

Le plus prudent est de commencer par copier le dossier `FungalITSextractor/outdata/` dans le dossier `2_ITS_extraction/` (on peut le renommer `output_total`). Ensuite, il faut copier le script dans ce même répertoire `2_ITS_extraction/output_total`, et l'exécuter :

```
cd ../ # Rejoindre le dossier '2_ITS_extraction/'
cp -R FungalITSextractor/outdata/ .
mv outdata/ output_total/ # renommer le dossier
cp ../Scripts_bioinfo/rename_FungalITSextractor_output.sh
  output_total
cd output_total/
bash rename_FungalITSextractor_output.sh
```

Il est possible de compter le nombre de séquences de chacun des fichiers issus du `FungalITSextractor`. J'ai pour cela créé un script qui compte le nombre de séquence de chaque fichier, et ce pour chaque échantillon : `count_seq_FungalITSextractor.sh`. Le copier dans le dossier `output_total`, et l'exécuter :

```
cp ../../Scripts_bioinfo/count_seq_FungalITSextractor.sh .
bash count_seq_FungalITSextractor.sh
```

A.3.5 Concaténer les fichiers fasta en un seul

On va fusionner l'intégralité des fichiers fasta `ITS1.fasta` en un seul. Avant toute chose, vérifier que les en-têtes de chaque séquence contiennent bien le nom de l'échantillon (sous la forme `barcodeLabel=XX0` par ex.).

```
cd .. # se placer dans le dossier '2_ITS_extraction/'
find output_total -name *_ITS1.fasta -type f -exec cat '{}' \
  >ITS1_combined.fasta ";"
```

- le symbole `>` permet d'enregistrer le résultat des fonctions précédentes dans un fichier, ici intitulé `ITS1_combined.fasta`.

Résultat : On obtient un fichier `ITS1_combined.fasta` qui contient toutes les séquences `ITS1` extraites.

Note : Il existe une alternative pour concaténer les fichiers fasta en un seul. QIIME fournit la fonction `add_qiime_labels.py` qui, à partir des fichiers et d'un "mapping file", va ajouter les noms spécifiés dans une colonne du mapping file aux en-tête de chaque séquence, avant de fusionner les fichiers (voir l'aide sur le site de QIIME).

A.4 Clustering des séquences en OTUs

Le clustering (partitionnement en français) permet de partitionner l'ensemble des séquences de tous les échantillons en Unités Taxonomiques Opérationnelles (OTUs).

Plusieurs algorithmes différents permettent de réaliser cette classification : USEARCH, VSEARCH, SWARM, CD-HIT-454, DNAClust, etc.

Chacun de ces algorithmes diffère et rend un résultat différent. Le choix de l'algorithme est fastidieux, mais crucial. Ici, j'ai choisi d'utiliser un des plus simple, basé sur un pourcentage de similarité entre les séquences. Il utilise USEARCH v7, USEARCH v8 et VSEARCH et est une adaptation du pipeline de Balint et al. 2014.

Note : La fonction de déréplication de USEARCH (32-bit) ne fonctionne pas sur de grands jeux de données : j'ai donc utilisé VSEARCH (64-bit, libre) plutôt que d'acheter la licence 64-bit de USEARCH.

Commencer par créer un nouveau dossier pour réaliser l'intégralité de ces fonctions :

```
cd .. # Retour au dossier seqFC15
mkdir 3_Clustering
cd 3_Clustering
```

A.4.1 Déréplication, tri des séquences et élimination des singletons

Afin de diminuer la vitesse de traitement des analyses, on travaille sur un fichier "dérépliqué". Toutes les séquences exactement identiques sont groupées en une seule : tous les doublons sont donc éliminés du jeu de données.

```
vsearch --derep_fulllength ../2_ITS_extraction/
ITS1_combined.fasta --output 1derep.fasta --sizeout --
fasta_width 0 --minuniquesize 2
```

- `--fasta_width 0` : empêche le "wrapping" du fichier fasta de sortie (chaque séquence est sur la même ligne : il n'y a pas de retour à la ligne tous les 80 nucléotides).
- `--minuniquesize 2` : élimine les singletons
- `sizeout` : ajoute l'abondance à chaque séquence

Cette fonction dans VSEARCH permet non seulement de dérépliquer le jeu de données, mais aussi de trier les séquences par abondance décroissante, et d'éliminer les singletons.

A.4.2 Clustering des OTUs

Pour un cluster avec 97% de similarité entre les séquences, en utilisant l'algorithme de USEARCH :

```
usearch8 -cluster_otus 1derep.fasta -otus 3otus.fasta -id
0.97
```


A.4.3 Détection des chimères

L'étape de clustering en OTUs procède à une première détection des chimères, dite "*de novo*". Elle se base sur la probabilité que des fragments d'une même séquence appartiennent à des parents distincts. Une seconde étape de détection des chimères peut-être réalisée en comparant notre jeu de données à une base de données existante (ici, UNITE). Cette base de données peut être téléchargée sur <https://unite.ut.ee/repository.php>. La décompresser, et la placer dans le dossier 3_Clustering :

```
usearch7 -uchime_ref 3otus.fasta -db
uchime_sh_refs_dynamic_develop_985_11.03.2015.ITS1.fasta
-nonchimeras 4nonchimeras_otus.fasta -chimeras
chimeras_otus.fasta -strand plus
```

- `-db` : base de données chimérique (UNITE, spécifique ITS1)
- `-nonchimeras` : fichier contenant les données non-chimériques
- `-chimeras` : fichier contenant les chimères

Résultat : On obtient un fichier `chimeras_otus.fasta` qui contient les séquences chimériques et un fichier `4nonchimeras_otus.fasta` qui contient les séquences non chimériques : c'est ce dernier fichier qui sera utilisé pour créer la table d'OTUs.

A.5 Création de la table d'OTUs

On va maintenant créer la table d'OTUs, c'est à dire une matrice qui indique le nombre de séquences de chaque OTU pour chaque échantillon.

On commence par copier dans le dossier 4_OTU_table le dossier `python_scripts` fourni avec USEARCH v8 :

```
cd .. # Retour au dossier seqFC15
mkdir 4_OTU_table
cd 4_OTU_table
```

La création de la table d'OTUs se fait en trois étapes :

1. changer le nom des OTUs (en `OTU_1`, `OTU_2`, etc.) ;
2. créer un fichier `.uc` où chaque séquence du jeu de donnée (issu de l'extraction de l'ITS) est assigné à une des OTU créé précédemment ;
3. convertir ce fichier `.uc` en table d'OTU au format `.txt`.

```
cd python_scripts

python fasta_number.py ../4nonchimeras_otus.fasta OTU_ >
../5otus_numbered.fasta
usearch8 -usearch_global ../2_ITS_extraction/
ITS1_combined.fasta -db ../5otus_numbered.fasta -strand
plus -id 0.97 -uc ../6readmap.uc
python uc2otutab.py ../6readmap.uc > ../7otu_table.txt
```

La table d'OTUs `7otu_table.txt` peut alors être utilisée pour diverses analyses (sous R, QIIME, MOTHUR, Galaxy, etc.)

A.6 Attribution taxonomique des OTUs

Chaque OTU va maintenant être assignée à un taxon. J'ai pour cela utilisé l'algorithme BLAST, sur la base de données GenBank.

L'attribution taxonomique avec blast se fait simplement en ligne, sur le site https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch.

Cependant, BLAST fournit plusieurs possibilités d'attribution pour chaque OTU, et ne fournit que le nom d'espèce, sans les niveaux taxonomiques intermédiaires. Je vais détailler ici la méthode que j'ai utilisé afin de ne conserver que l'attribution taxonomique la plus probable, et de récupérer ses niveaux taxonomiques intermédiaires, et ce pour chaque OTU.

Commencer par créer un nouveau dossier :

```
cd ../
mkdir 6_Blast
cd 6_Blast
```

Copier dans ce dossier les scripts `companion_script.sh` et `get_ncbi_taxonomy.py`.

A.6.1 Attribution taxonomique sur NCBI

Aller sur le site de l'outil d'alignement de NCBI, blastn(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch) :

- Importer le fichier `5otus_numbered.fasta`.
- Dans les options de recherche, cocher "*Exclude Uncultured/environmental sample sequences*".
- Utiliser l'algorithme "*megablast*".
- Dans les paramètres de l'algorithme, ne prendre qu'un maximum de 10 séquences cibles (*Max target sequences*).

Lancer le blast.

Lorsque l'algorithme a terminé, enregistrer les résultats sous forme de tableau csv (*Download / Hit Table(csv)*). Placer ce fichier dans le dossier `6_blast`.

A.6.2 Conserver les "best blast hits"

Ce fichier contient, pour chaque OTU, entre 0 et 10 séquences assignées. On va commencer par n'en sélectionner qu'une. Pour cela, on choisit de ne conserver que celle ayant le meilleur bit score, puis la plus faible e-value, et enfin le premier de la liste :

```
sort --field-separator=', ' -k1,1 -k12,12nr -k11,11n XXXXXX-
  Alignement-HitTable.csv | sort --field-separator=', ' -u
  -k1,1 --merge > blast_output_filter.txt
```

- `sort` : est une fonction de tri, sur le fichier `XXXXXX-Alignement-HitTable.csv`.
- `--field-separator=', '` : la virgule est utilisée comme séparateur.
- `-k1,1` : on trie d'abord sur la colonne 1 (nom des OTUs) de manière à rassembler les attributions à la même OTU.

- `-k12,12nr` : ensuite, on veut trier les bit score (colonne 12), par ordre descendant (nr).
- `-k11,11n` : puis on trie les e-value (colonne 11), par ordre ascendant (n).
- `| sort --field-separator=',' -u -k1,1 --merge` : sur le nouveau tableau obtenu, on ne garde que la première valeur (-u) de chaque doublon de la première colonne (k1,1) et on assemble ces valeurs entre elles (-merge).
- `> blast_output_filter.txt` : on enregistre le résultat dans ce nouveau fichier.

A.6.3 Récupérer les bases de données ncbi

Afin de récupérer les chemins taxonomiques de ces assignations, il faut commencer par récupérer plusieurs fichiers sur NCBI. Le script `companion_script.sh` permet de télécharger automatiquement la dernière version de ces fichiers. Ce script a été conçu par Frédéric Mahé : <https://www.biostars.org/p/13452/>.

```
bash companion_script.sh
```

Lorsque le téléchargement est terminé, 3 fichiers doivent avoir été récupérés : `names.dmp`, `nodes.dmp` et `gi_taxid_nucl.dmp`.

A.6.4 Récupérer les chemins taxonomiques :

Un premier script a été conçu par Frédéric Mahé en langage bash : <https://www.biostars.org/p/13452/>. Cependant, le temps d'exécution de ce script était excessivement long (plusieurs semaines pour mes données). Jean-Benoist Léger et moi avons adapté cet algorithme en langage python. Ce nouveau script s'intitule `get_ncbi_taxonomy.py`, et ne mets que quelques minutes à quelques heures pour s'exécuter.

```
cut -d "|" -f 2 blast_output_filter.txt | python ./
get_ncbi_taxonomy.py | tee taxo_output.txt
```

- `cut -d "|" -f 2 blast_output_filter.txt` : Sépare le fichier `blast_output_filter` en utilisant le pipe comme séparateur (`-d "|"`), et ne sélectionne (`cut`) que la seconde colonne (`-f 2`).
- `| python ./get_ncbi_taxonomy.py` : exécute le script (`./` indique que le script se trouve dans le dossier actuel).
- `| tee taxo_output.txt` : enregistre dans le fichier indiqué, et affiche en même temps se qu'il enregistre sur la sortie du terminal.

Résultat : On obtient un fichier `taxo_output.txt`, contenant les chemins taxonomiques des "best blast hits" du fichier `blast_output_filter.txt`.

A.6.5 Associer les deux fichiers :

On va maintenant utiliser Excel pour combiner ces deux tableaux et procéder au tri des données :

- Ouvrir un nouveau fichier Excel

- Appeler une nouvelle feuille **blast_taxo** et :
 - importer le fichier **taxo_output.txt**, en utilisant le point-virgule (;) comme séparateur
 - Ajouter une ligne vide au début du tableau
 - Appeler la première colonne **gi** et appliquer un filtre sur l'ensemble du tableau.
- Nommer une nouvelle feuille **blast_filter** et :
 - importer le fichier **blast_output_filter.txt**, en utilisant la virgule comme séparateur.
 - Ajouter les noms de colonne suivants sur la première ligne vide : **query_id; subject_id; percent_identity; alignment_length; mismatches; gap_openings; q_start; q_end; s_start; s_end; e_value; bit_score**
- Nommer une nouvelle feuille **merge** dans laquelle :
 - Faire une copie de la feuille **blast_filter**
 - Déplacer (Clic + Maj) la colonne **subject_id** (B) à la fin du tableau (L).
 - Convertir les données de cette colonne (Données/Convertir), en utilisant le pipe (|) comme séparateur.
 - Supprimer la colonne "L" qui ne doit plus contenir que l'expression "gi", ainsi que toutes les dernières colonnes après la "M". Finalement, on ne doit conserver que la colonne maintenant placée en "L", contenant les valeurs de GI.
 - Appeler cette nouvelle colonne "L" **gi**.
 - Dans la cellule M2, insérer la formule suivante : **=SIERREUR(RECHERCHEV(\$L2;blast_taxo!\$A\$2:\$AE\$4500;COLONNE(A1);FAUX);"NA")**. On doit voir la même valeur de GI apparaître à côté.
 - Utiliser la poignée de recopie de la cellule "M2" pour assigner cette formule aux colonnes suivantes de la ligne "2", jusqu'à voir apparaître des NAs (si ce sont des 0, continuer).
 - Utiliser la poignée de recopie de ce morceau de la ligne 2 (de "M2" jusqu'à la dernière cellule) pour appliquer cette formule sur l'ensemble des lignes du tableau. On doit maintenant voir les chemins taxonomiques apparaître sur toutes les lignes du tableau.
 - Copier toutes ces cellules, et copier uniquement les valeurs.
 - Après avoir vérifié qu'il n'y a pas d'erreur, que les deux colonnes GI sont identiques (possibilité d'utiliser la fonction **=EXACT()**, supprimer la colonne "M" qui contient une copie de ces valeurs de GI.

A.6.6 Aligner les niveaux taxonomiques :

L'étape finale est la plus fastidieuse. Les colonnes contenant les chemins taxonomiques ne sont pas alignées. Certaines assignations sont très précises, alors que d'autres sont très courtes. Il faut donc aligner ce tableau ligne par ligne, de manière à attribuer des colonnes domaine, phylum, classe, ordre, famille, genre et espèce.

Afin d'optimiser cette lourde étape, voici quelques conseils :

- Commencer par séparer chaque groupe d'organismes dans différentes feuilles (ex. Ascomycota, Basidiomycota, other fungi, plants, other organisms).

- Figurer la première ligne
- Jouer avec les options de filtre et de tri (attention cependant à toujours sélectionner l'intégralité du tableau avant de procéder à un tri).
- Ouvrir en parallèle un fichier de même type, déjà trié.
- Déterminer quelles colonnes rassemblent le plus d'éléments d'un même rang taxonomique et nommer ces colonnes en conséquence (class, order, family, genus, species, ssp).
- Colonne par colonne, en commençant par le rang taxo le plus bas, vérifier que toutes les valeurs correspondent bien.

Lorsqu'un "unknown ..." est présent, placer l'identifiant de l'espèce "par ex. endophyte15GY8C125) dans la colonne "species", et remplacer la cellule "unknown..." ainsi que les suivantes laissées vides par des "unk".

Lorsqu'un ... *incertae sedis* est présent, remplacer cette cellule par "NA"

Dans certains cas, les niveaux taxo sont absents, mais un genre et une espèce sont bien identifiés. Dans ce cas, insérer des NA dans les cellules vides (suivent souvent les Incertae Sedis).

- Lorsque c'est terminé, rassembler les différentes feuilles, mais ne conserver que les 7 niveaux taxonomiques les plus complets : kingdom, phylum/division, class, order, family, genus et species.

A.7 Bibliographie et documentation

Cette section contient la bibliographie et la documentation sur laquelle je me suis appuyé pour créer ce pipeline, mais aussi des outils intéressants que j'ai trouvés, testés, mais choisis de ne pas utiliser.

Amorces

Gardes, M., Bruns, T.D., 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2, 113–118. doi:10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x

Ihrmark, K., Bödeker, I.T.M., Cruz-Martinez, K., Friberg, H., Kubartova, A., Schenck, J., Strid, Y., Stenlid, J., Brandström-Durling, M., Clemmensen, K.E., Lindahl, B.D., 2012. New primers to amplify the fungal ITS2 region – evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. *FEMS Microbiology Ecology* 82, 666–677. doi:10.1111/j.1574-6941.2012.01437.x

Pipelines

Bálint, M., Schmidt, P.-A., Sharma, R., Thines, M., Schmitt, I., 2014. An Illumina metabarcoding pipeline for fungi. *Ecol Evol* n/a–n/a. doi:10.1002/ece3.1107

Processing Illumina Data : Preparing raw Illumina data for use with QIIME - http://qiime.org/1.6.0/tutorials/processing_illumina_data.html

UPARSE pipeline : http://drive5.com/usearch/manual/uparse_pipeline.html

QIIME - Illumina Overview Tutorial : http://nbviewer.ipynb.org/github/biocore/qiime/blob/1.9.0/examples/ipynb/illumina_overview_tutorial.ipynb

Extraction de l'ITS

FungalITSextractor : <http://www.emerencia.org/FungalITSextractor.html>

Nilsson, R.H., Veldre, V., Hartmann, M., Unterseher, M., Amend, A., Bergsten, J., Kristiansson, E., Ryberg, M., Jumpponen, A., Abarenkov, K., 2010. An open source software package for automated extraction of ITS1 and ITS2 from fungal ITS sequences for use in high-throughput community assays and molecular ecology. *Fungal Ecology* 3, 284–287. doi:10.1016/j.funeco.2010.05.002

Vextractor and other tools : <http://www.microbiome.ch/web/Tools.html>

OTU clustering

USEARCH : Edgar, R.C., 2013. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature Methods* 10, 996–998. doi:10.1038/nmeth.2604

USEARCH manual v8 : <http://drive5.com/usearch/manual/>

VSEARCH : VSEARCH github : <https://github.com/torognes/vsearch>

SWARM : Mahé, F., Rognes, T., Quince, C., de Vargas, C., Dunthorn, M., 2014. Swarm: robust and fast clustering method for amplicon-based studies. *PeerJ* 2, e593. doi:10.7717/peerj.593

SWARM github : <https://github.com/torognes/swarm>

Working with several samples : <https://github.com/torognes/swarm/wiki/Working%20with%20several%20samples>

QIIME : Rideout, J.R., He, Y., Navas-Molina, J.A., Walters, W.A., Ursell, L.K., Gibbons, S.M., Chase, J., McDonald, D., Gonzalez, A., Robbins-Pianka, A., Clemente, J.C., Gilbert, J.A., Huse, S.M., Zhou, H.-W., Knight, R., Caporaso, J.G., 2014. Sub-sampled open-reference clustering creates consistent, comprehensive OTU definitions and scales to billions of sequences. *PeerJ* 2, e545. doi:10.7717/peerj.545

Fungal ITS QIIME analysis tutorial : <http://nbviewer.ipynb.org/github/biocore/qiime/blob/1.9.0/examples/ipynb/Fungal-ITS-analysis.ipynb>

OTU picking strategies in QIIME : http://qiime.org/tutorials/otu_picking.html

Mothur : <http://www.mothur.org/wiki/Cluster>

Using mothur to cluster sequences : http://www.google.fr/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=4&ved=0CD0QFjAD&url=http%3A%2F%2Fcgibin.uconn.edu%2Fwp-content%2Fuploads%2F2010%2F08%2Fmothur_tutorial.pdf

2Fuploads%2Fsites%2F255%2F2013%2F10%2Fclustering-sequences-with-mothur.doc&ei=unsrVaDNF834av7TgcgD&usg=AFQjCNGRx8PsAVC0Gck20po896uwxZGcxg&sig2=0_7xv00KE1gGY8Ii8Ibvm=bv.90491159,d.d2s&cad=rja

Others :

DNACLUST : <http://dnaclust.sourceforge.net/>

crunchclust : <https://code.google.com/p/crunchclust/>

sumatra : <http://metabarcoding.org/sumatra>

Taxonomic assignation

Abarenkov, K., Henrik Nilsson, R., Larsson, K.-H., Alexander, I.J., Eberhardt, U., Erland, S., Høiland, K., Kjølner, R., Larsson, E., Pennanen, T., Sen, R., Taylor, A.F.S., Tedersoo, L., Ursing, B.M., Vrålstad, T., Liimatainen, K., Peintner, U., Kõljalg, U., 2010. The UNITE database for molecular identification of fungi – recent updates and future perspectives. *New Phytologist* 186, 281–285. doi:10.1111/j.1469-8137.2009.03160.x

UNITE downloads : <https://unite.ut.ee/>

QIIME assign_taxonomy.py function : (http://qiime.org/scripts/assign_taxonomy.html)

LCAClassifier : <http://apps.cbu.uib.no/crest/lcaclassify>

A.8 Scripts BASH

A.8.1 add_labels_fasta.sh

Script permettant l'ajout du nom de chaque échantillon au début de l'étiquette de chaque séquence, et ce pour chaque fichier du dossier "fasta".

- Tous les fichiers fasta à modifier doivent être dans un dossier 'fasta'
- Chaque fichier doit être de la forme ITS7F-ITS4R-X-X0_joined-SR.fna (X-X0 étant spécifique à chaque fichier). Si ce n'est pas le cas, la définition de la variable "LABEL" doit être modifiée.

```
#!/bin/sh
mkdir output
# Boucle pour tous les fichiers du dossier fasta :
for FILE in $(find fasta -type f -printf "%P\n"); do
    echo $FILE
    # Créer une variable LABEL contenant l'étiquette :
    LABEL=$(echo $FILE | cut -d'-' -f3,4 | cut -d'_' -f1 |
        sed 's/-//')
    # Ajouter l'étiquette à l'en-tête de chaque séquence,
    # précédé de "barcodelabel="
    sed '/>/c\>'barcodelabel=${LABEL}'' < fasta/$FILE >
        output/$FILE
    echo $LABEL
done
```

A.8.2 FungalITSextractor_multiple_files.sh

Script exécutant automatiquement le FungalITSextractor pour chaque fichier fasta d'un dossier. Script réalisé avec l'aide de Jean-Paul Soularue.

```
#!/bin/sh
expected_input="indata.fasta" #Nom du fichier d'entrée
perl_script_name="FungalITSextractor.pl"

# Boucle pour chaque fichier dans indata/subdir/ terminant
# par .fna :
for fichier in $(find indata/subdir -name '*.fna' -type f -
    prune); do
    echo $fichier
    #Copier le fichier dans indata et le renommer :
    cp $fichier ./indata/$expected_input
    # Exécuter le script sur le fichier :
    perl $perl_script_name
done
```


A.8.3 rename_FungalITSextractor_output_FC15.sh

Script utilisé à la sortie du FungalITSextractor pour de multiples fichiers extrait. Il renomme chaque dossier de sortie avec le nom d'échantillon. Il rajoute ensuite ce nom d'échantillon en préfixe de chaque nom de fichier. Le FungalITSextractor étant long à tourner, mieux vaut exécuter ce script sur une copie des fichiers.

```
#!/bin/sh

for folder in $(find -type d -printf "%P\n"); do
    echo $folder # renvoie le contenu de la variable folder

    # Si l'étiquettes du barcode est courte (barcodelabel=XX00
    # par ex.), se baser sur le fichier indata :
    #newname="$(sed -n 1p $folder/outdata.csv | sed 's/_
    #.*//' | cut -d' ' -f4)"
    # Si l'étiquettes du barcode est longue (barcodelabel=
    # PlateXX00 par ex.), se baser sur le fichier fasta le
    # plus susceptible de ne pas être vide (ici ITS1) :
    newname="$(sed -n 1p $folder/ITS1.fasta | cut -d'=' -f2
    | sed s/^Plate//)"
    echo $newname # renvoie le contenu de la variable
    newname

    #-----
    for filename in $(find $folder -type f -printf "%P\n");
    do # boucler sur chaque fichier dans chaque dossier
        successif
        echo $filename # renvoie le nom du fichier concerné
        mv "$folder/$filename" "$folder/${newname}
        _$filename"; #renommer ce fichier avec le
        contenu de la variable newname
    done
    #-----
    mv $folder "$newname" #renomme le dossier entier avec
    le contenu de la variable newname
done
```

A.8.4 count_seq_FungalITSextractor.sh

Script servant à compter le nombre de séquences de chaque fichier issu du FungalITSextractor. Il doit être après que les dossiers ont été renommés avec le nom d'échantillon. Ce fichier peut ensuite être importé dans libreCalc ou excel. Le séparateur est la virgule.

```
#!/bin/sh

echo NAME,ITS1,ITS2,BOTH,NOITS1,NOITS2,NONE >
counts_ITSextractor.txt #Crée la ligne d'en-têtes dans
le fichier counts_ITSextractor.txt

for folder in $(find -type d -printf "%P\n"); do #Boucler
sur chaque dossier renommé issu de FungalITSextractor
ITS1="$(grep -c "^>" $folder/*_ITS1.fasta)" # Créé une
variable contenant le nombre de séquences dans le
fichier ITS1.fasta (on ne compte que le nombre de
ligne commençant par un ">").
ITS2="$(grep -c "^>" $folder/*_ITS2.fasta)" #idem pour
ITS2
BOTH="$(grep -c "^>" $folder/*_Both.fasta)"
NOITS1="$(grep -c "^>" $folder/*_NoITS1.fasta)"
NOITS2="$(grep -c "^>" $folder/*_NoITS2.fasta)"
NONE="$(awk 'END{print NR}' $folder/*_None.txt)" #idem,
mais comme il n'y a jamais de séquences incluses
dans ce fichier, il faut compter le nombre de ligne.
Lorsque le fichier est vide, il doit renvoyer "0" (
d'où l'utilisation de "awk").
newline="$folder,$ITS1,$ITS2,$BOTH,$NOITS1,$NOITS2,
$NONE" # Concaténation de toutes les variables, sé
parées par des virgules.
echo $newline
echo $newline >>counts_ITSextractor.txt # ajouter la
nouvelle ligne au fichier counts_ITSextractor.txt
(">>" ajoute une ligne au fichier au lieu de le
remplacer).

done
```

A.8.5 companion_script

Télécharge les bases de données taxonomiques de NCBI, ainsi que l'assignation taxonomique des GenBank ID. Script réalisé par Frédéric Mahé.

```
#!/bin/bash

## Variables
NCBI="ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pub/taxonomy/"
TAXDUMP="taxdump.tar.gz"
TAXID="gi_taxid_nucl.dmp.gz"
NAMES="names.dmp"
NODES="nodes.dmp"
DMP=$(echo {citations,division,gencode,merged,delnodes}.dmp
)
USELESS_FILES="${TAXDUMP} ${DMP} gc.prt readme.txt"

## Download taxdump
rm -rf ${USELESS_FILES} "${NODES}" "${NAMES}"
wget "${NCBI}${TAXDUMP}" && \
    tar zxvf "${TAXDUMP}" && \
    rm -rf ${USELESS_FILES}

## Limit search space to scientific names
grep "scientific name" "${NAMES}" > "${NAMES/.dmp/_reduced.dmp}" && \
    rm -f "${NAMES}" && \
    mv "${NAMES/.dmp/_reduced.dmp}" "${NAMES}"

## Download gi_taxid_nucl
rm -f "${TAXID/.gz/*}"
wget "${NCBI}${TAXID}" && \
    gunzip "${TAXID}"

exit 0
```

A.8.6 get_ncbi_taxonomy.py

A partir des GenBank ID (GI), récupère les assignations taxonomiques ainsi que les différents niveaux taxonomiques depuis les bases de données de NCBI. Ce script a été transcrit en python avec l'aide de Jean-Benoist Léger, à partir d'un script bash créé par Frédéric Mahé.

```
#!/usr/bin/python

import re
import sys

# loading names dict from file
fnames = open('names.dmp')
names = {}
while True:
    theline = fnames.readline()
    if theline == '':
        break
    a = re.match('([^\t]+)\t\\|\\t([^\t]+)\t', theline)
    if a:
        names[int(a.groups()[0])] = a.groups()[1]
fnames.close()

# loading nodes dict from file
fnodes = open('nodes.dmp')
nodes = {}
while True:
    theline = fnodes.readline()
    if theline == '':
        break
    a = re.match('([^\t]+)\t\\|\\t([^\t]+)\t', theline)
    if a:
        nodes[int(a.groups()[0])] = int(a.groups()[1])
fnodes.close()

# loading wanted GIs list from stdin
GIs = []
while True:
    theline = sys.stdin.readline()
    if theline == '':
        break
    a = re.match('([^\#].*)\n', theline)
    if a:
        GI = int(a.groups()[0])
        GIs.append(GI)
sGIs = set(GIs) # using GIs set for testing membership

# loading GI->taxid map from file
```

```
# only keeping GI which appears in set of wanted GIs
ftaxid = open('gi_taxid_nucl.dmp')
taxid = {}
while True:
    theline = ftaxid.readline()
    if theline == '':
        break
    a = theline.split('\t')
    if len(a)>1:
        gi = int(a[0])
        tid = int(a[1])
        if gi in sGIs:
            taxid[gi] = tid
ftaxid.close()

# for all wanted GIs retrieve taxonomy
for GI in GIs:
    tid = taxid[GI]
    taxo = ''
    while tid != 1:
        name = names[tid]
        parent = nodes[tid]
        taxo = name + ';' + taxo
        tid = parent
    print '%u;%s' % (GI, taxo)
```

Annexe B

Deciphering the Pathobiome: Intra- and Interkingdom Interactions Involving the Pathogen *Erysiphe alphitoides*

Deciphering the Pathobiome: Intra- and Interkingdom Interactions Involving the Pathogen *Erysiphe alphitoides*

Boris Jakuschkin¹, Virgil Fievet¹, Loïc Schwaller², Thomas Fort¹,
Cécile Robin¹, and Corinne Vacher¹

¹BIOGECO, UMR 1202, INRA, Université de Bordeaux, F-33615 Pessac, France

²UMR 518 MIA, INRA, AgroParisTech, F-75005 Paris, France

Article published in *Microbial Ecology*
(November 2016, Volume 72, Issue 4, pp 870–880).

Available online at:

<http://link.springer.com/article/10.1007/s00248-016-0777-x>

Abstract

Plant-inhabiting microorganisms interact directly with each other, forming complex microbial interaction networks. These interactions can either prevent or facilitate the establishment of new microbial species, such as a pathogen infecting the plant. Here, our aim was to identify the most likely interactions between *Erysiphe alphitoides*, the causal agent of oak powdery mildew, and other foliar microorganisms of pedunculate oak (*Quercus robur* L.). We combined metabarcoding techniques and a Bayesian method of network inference to decipher these interactions. Our results indicate that infection with *E. alphitoides* is accompanied by significant changes in the composition of the foliar fungal and bacterial communities. They also highlight 13 fungal operational taxonomic units (OTUs) and 13 bacterial OTUs likely to interact directly with *E. alphitoides*. Half of these OTUs, including the fungal endophytes *Mycosphaerella punctiformis* and *Monochaetia kansensis*, could be antagonists of *E. alphitoides* according to the inferred microbial network. Further studies will be required to validate these potential interactions experimentally. Overall, we showed that a combination of metabarcoding and network inference, by highlighting potential antagonists of pathogen species, could potentially improve the biological control of plant diseases.

Keywords: Plant microbiota, Plant-pathogen interaction, Pathobiome, Microbial network, Network inference, Disease resistance, Biocontrol, Powdery mildew.

Annexe C

**Plant communication with
associated microbiota in the
spermosphere, rhizosphere and
phyllosphere**

Plant communication with associated microbiota in the spermosphere, rhizosphere and phyllosphere

Philippe Lemanceau¹, Mathieu Barret², Sylvie Mazurier¹, Samuel Mondy¹, Barbara Pivato¹, Thomas Fort³, Corinne Vacher³

1. Agroécologie, AgroSup Dijon, INRA, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-21000 Dijon, France
2. IRHS, INRA Site d'Angers Beaucouzé, F-49071 Beaucouzé cedex 01, France
3. BIOGECO, INRA, Univ. Bordeaux, F-33615 Pessac, France

Correspondence

Philippe Lemanceau

UMR 1347 Agroécologie, 17 rue Sully, BP 86510, 21065 Dijon cedex, France

Tel. +33 3 80 69 30 56

Fax +33 3 80 69 32 24

e-mail: philippe.lemanceau@dijon.inra.fr

Introduction

In contrast with animals which have developed the ability to escape biotic and abiotic stresses, plants cannot move and have therefore evolved strategies to cope with them. These strategies rely in large part on the plant associated microbiota. Long standing co-evolution process has indeed led to reciprocal beneficial interactions between plants and microorganisms. The first evidence for such association dates back to 400 million years ago with the discovery of fossils of plant-fungus associations, including arbuscular mycorrhiza ancestors (Redecker et al., 2000). These associated microorganisms are heterotrophs or even biotrophs and are supported by the primary production of host-plant photosynthesis. In turn, they contribute to the nutrition and health of the host-plant. The stability of the association depends on the benefits generated for each partner.

Plants are surrounded with microorganisms whose abundance is promoted by the release of plant organic compounds and the presence of niches favorable to microbial development and activities. These microorganisms thrive in three main plant compartments, i.e. spermosphere, rhizosphere and phyllosphere, which are interconnected. They are recruited from the environment (soil, atmosphere) and from the mother plant via the seed. Plants indeed modulate the composition and activities of the hosted microbial populations through complex communication trackways relying on trophic interactions and/or molecular signalization. The tuning of these interactions by the plant favors beneficial microbial populations and activities while depressing deleterious ones.

The close connection of microorganisms with plants, and more generally with eukaryotes, has recently led to the emergence of the holobiont concept, defined as the host plus all of its associated microbes (Theis et al., 2016; Vandenkoornhuyse et al., 2015). The study of the holobiont has been recently boosted by the development of molecular tools allowing us to characterize the taxonomic and functional diversity of microbial communities, but also their location and interaction with the host at the molecular and cellular levels.

Below we review current knowledge of the plant communication with associated microorganisms in the spermosphere, rhizosphere and phyllosphere, and of plant and microbial traits involved.

Possible prospects of application of this knowledge for monitoring plant-microbe interactions in agroecological systems are further discussed.

1. Plant communication with associated microorganisms in the spermosphere

1.1. Acquisition of the seed microbiota

Seeds, defined here as sexually derived structures of spermatophytes, are not only decisive for transmission of genetic material from one plant generation to another but are also strongly linked to the vertical transmission of multiple microorganisms ranging from plant-growth promoting agents to plant pathogens (Truyens et al., 2015). These microorganisms are associated with different seed compartments such as the embryo (e.g. the embryonic axis and the cotyledons), the storage tissues (e.g. endosperm and/or perisperm) and the seed coat, representing distinct micro-habitats. The colonization of these micro-habitats is strongly dependent of the seed transmission pathway employed by microorganisms. To date, three main seed transmission pathways have been documented: (i) the internal pathway, in which microorganisms colonize developing seeds via the xylem or nonvascular tissue of the mother plant; (ii) the floral pathway that represents microbial colonization of developing seeds through the stigma; and (iii) the external pathway, which corresponds to colonization of mature seeds via contact of the seed with microorganisms located on fruits or threshing residues (Maude, 1996). Microorganisms transmitted by the internal and floral pathways are usually found in all seed compartments, while those transmitted through the external pathway are almost exclusively associated with the seed coat (Singh & Mathur, 2004). As the external pathway is more permissive than the internal or floral pathway, microbial communities associated with the seed coat are usually more diverse than those associated with the endosperm or the embryo (Barret et al., 2016).

1.2. Dynamics of the seed microbiota during germination

Seed-associated microorganisms may either act as ephemeral colonizers of the seed habitat (seed-borne microorganisms) or persist during the different plant developmental stages (seed-transmitted microorganisms). With the exception of microorganisms located within the embryo, the persistence of microbial-plant interactions is strongly dependent of the outcome of inter-microbial competition occurring in the area of soil under the influence of germinating seeds (ranging from seed imbibition to radicle protrusion). This area of “elevated microbial activity around a germinating seed” has been coined spermosphere (Verona, 1958) in analogy to the rhizosphere. During seed imbibition, multiple compounds such as carbohydrates, fatty acids, organic acids and amino acids are released to the surrounding soil (Nelson, 2004; Schiltz et al., 2015). The nature and quantity of these exudates are linked to the plant species but also to abiotic factors such as soil type and temperature (Nelson, 2004; Schiltz et al., 2015). The release of these organic compounds into the soil creates a zone densely populated with microorganisms that compete for resources and space. To protect itself against the myriad of microorganisms in its vicinity, seeds release antimicrobial compounds during the germination process such as flavonoids and peptides modulating microbial growth (Terras et al., 1995; Scarafoni et al., 2013).

Given the high competition for resources and space occurring within the spermosphere, only microorganisms with specific traits succeed in colonizing germinating seeds. The first set of traits important for successful spermosphere competence is related to trophic interactions. A prompt consumption of resources represents a major competitive advantage and explains why copiotrophic microorganisms are usually enriched during germination and seedling emergence (Barret et al.,

2015). Chemotaxis-based motility towards seed exudates such as amino acids and organics acids has also been reported for multiple spermosphere bacterial taxa including *Bacillus*, *Pseudomonas* and *Rhizobium* (Gamliel & Katan, 1992; Zheng & Sinclair, 1996). In addition to chemotactic ability microbial populations with a versatile metabolic potential are favored in the spermosphere. For instance, proteomics data suggest that transport and biosynthesis of 15 different amino acids are required for an optimal growth of *Salmonella enterica* on alfalfa seedling exudates (Kwan et al., 2015). Moreover, carbohydrate catabolism is decisive for successful bacterial colonization as illustrated by the impaired proliferation of *Enterobacter cloacae* in the spermosphere of various plant species after mutation of the phosphofructokinase gene (*pfkA*) (Roberts et al., 2000).

Attachment to seeds represents another crucial trait for spermosphere colonization by commensal (Deflaun et al., 1994; Espinosa-Urgel et al., 2000) and pathogenic (Darsonval et al., 2009) bacteria. The attachment can be either mediated by flagellin (Deflaun et al., 1994), or by secreted bacterial adhesins (Espinosa-Urgel et al., 2000; Darsonval et al., 2009). Since these adhesins are involved in biofilm formation and are regulated by quorum-sensing (QS), transition from planktonic to sessile phenotype appears to be necessary for spermosphere colonization. This has been illustrated in several reports showing that seed colonizers, such as *Pseudomonas putida* or *Acidovorax citrulli*, require QS and biofilm formation for seed to seedlings transmission (Espinosa-Urgel & Ramos, 2004; Johnson & Walcott, 2013; Tian et al., 2015). Biofilm formation could also account for the microbial resistance to various antimicrobial compounds produced by the plant during germination or by microbial competitors. Quorum-sensing is also involved in the production of a number of antimicrobial compounds such as phenazines or 2,4-diacetylphloroglucinol (Nelson, 2004) and in the release of bacterial toxins through the Type VI secretion system (Tian et al., 2015).

Microorganisms associated with seeds represent the first populations to colonize seedlings and ultimately roots.

2. Plant communication with associated microorganisms in the rhizosphere

2.1. Evidence for the rhizosphere effect

2.1.1. Description of the rhizosphere effect

Roots are indeed densely colonized at their surface by a myriad of microorganisms as the result of major release of organic compounds by the plant (i.e. rhizodeposits) which may represent as much as 5-21% of all fixed carbon (Bais et al., 2006). Rhizodeposits include a wide variety of substances originating from sloughed-off root cells and tissues, mucilages, volatiles, and soluble lysates and exudates that are released from damaged and intact cells, respectively (Baetz & Martinoia, 2014; Curl & Truelove, 1986; Dakora & Phillips, 2002; Uren, 2001; Van Dam & Bouwmeester, 2016). The corresponding massive transfer of nutrients in the zone of soil surrounding roots, while soils are, mostly mesotrophic/oligotrophic, induces a major impact on soil microbial communities, which are mostly heterotrophic. This zone of soil, termed rhizosphere (Hiltner, 1904), encompasses together plant roots (including endophytic microorganisms) plus environment surrounding or attached to and influenced by the roots (Hartmann et al., 2008). Rhizodeposits promote the abundance and activities of microorganisms in the rhizosphere by providing nutrient sources that support their growth, persistence and physiology (Figure 1). However, not all the populations of the soil community are favored in the rhizosphere, as indicated by a lower biodiversity in the rhizosphere than in the corresponding bulk soil (García-Salamanca et al., 2013; Lemanceau et al., 1995; Marilley et al., 1998; Semenov et al., 1999). Only the most competitive populations develop

in the rhizosphere. Microbial competitiveness is greatly related to their carbon and energetic metabolism (Latour et al., 2003); the populations having the enzymatic activities enabling to value the organic compounds from the rhizodeposits are favored in the rhizosphere. Similarly, the most competitive populations of pseudomonads, a major beneficial group for the plants (Lemanceau, 1992), share the ability to use efficiently two different types of electron acceptors (iron and nitrogen oxides) (Ghirardi et al., 2012). Besides their carbon and energetic metabolism, they also share the ability to produce antibiotic compounds and N-acylhomoserine lactones (N-AHSL) mediating QS (Ghirardi et al., 2012). This is in agreement with the higher frequency of N-AHSL-producer pseudomonads in the rhizosphere than in bulk soil (Elasri et al., 2001). Preferential associations between plants and microorganisms are indeed not only regulated via trophic interactions but also via molecular signalization (i) from the plant, with the most documented Nod factors involved in the establishment of nitrogen fixing symbiosis (see chapter 8), (ii) among microorganisms, with as example, the density regulation of bacterial activities and phenotypes (i.e. quorum sensing) (Fuqua et al., 2001), (iii) through the so-called quorum quenching, an interference of the plant with this microbial communication (Grandclément et al., 2016).

Plant communication leading to modifications of microbial diversity and activities in the soil surrounding roots and within roots (endophytes), collectively part of the so-called rhizosphere effect, will be reviewed herein.

2.1.2. *Impact of the plant on the rhizosphere effect*

As expected from variations of rhizodeposits released by the host-plant, microbial communities and populations significantly vary among plant species (Bulgarelli et al., 2015; Grayston et al., 1998; Latour et al., 1996; Pivato et al., 2007) and even genotypes of the same plant species (Inceoglu et al., 2010; Zancarini et al., 2013). They also differ between root zones (Baudoin et al., 2002; Liljeroth et al., 1991; Marschner et al., 2011; Yang & Crowley, 2000) and during plant development (Chaparro et al., 2013; De-la-Pena et al., 2010; Mougel et al., 2006). The specificity of the rhizosphere effect remains strongly impacted by the soil communities and even physico-chemical properties. Indeed, plants recruit populations from the soil reservoir which composition is likely to vary according to the soil type (Ranjard et al., 2013). Latour et al. (1999) have shown that the rhizosphere effect of a given host-plant may vary from one soil type to the other, even when the sterilized soils were inoculated with the same pseudomonad community.

2.1.3. *Impact of plant-fungal associations (symbiotic and pathogens) on the rhizosphere effect*

Most of the plants from terrestrial ecosystems establish symbiotic associations with mycorrhizal fungi (for a review, see Smith & Read, 2008, see also chapter 8). These associations are widespread and ancient, suggesting that they have evolved together with soilborne bacterial communities. This has been illustrated by the identification of bacterial groups (*Comamonadaceae*, *Oxalobacteraceae*) preferentially associated with mycorrhizal roots of *Medicago truncatula* (Offre et al., 2007; 2008; Pivato et al., 2009). In turn, bacteria preferentially associated with arbuscular-but also ecto-mycorrhiza (Frey et al., 1997) were showed to promote fungal symbioses (Frey-Klett et al., 2007; Pivato et al., 2009). These bacteria were named Mycorrhiza Helper Bacteria (MHB – Garbaye, 1994). These synergistic bacteria-mycorrhiza associations promote plant growth (Cusano et al., 2011; Gamalero et al., 2004; Pivato et al., 2009; Viollet et al., 2016). Plant roots are not only colonized by symbiotic fungi but may also be by pathogens which impact bacterial communities. A nice illustration is the take-all decline process during which wheat roots infected with the phytopathogenic fungus *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* select specific populations of

fluorescent pseudomonads producing the 2,4-diacetylphloroglucinol antibiotic that inhibit the pathogen and therefore suppress the corresponding disease (Raaijmakers et al., 1997; 1998)

2.1.4. Core microbiome and metagenomic approaches to the rhizosphere

Because of the importance of the associated microbiota, in terms of abundance, diversity and beneficial effects for the host-plant, plants can no longer be considered as standalone entities and a more holistic perception is needed (Hacquart & Schadt, 2015; Thies et al., 2016; Vandenkoornhuyse et al., 2015). Plant fitness indeed results not only from plant traits but also from those of associated microorganisms, which with their plant host collectively form the holobiont. The core microbiome is defined as microbial phylotypes that are universally associated with a plant genotype or a plant species (Lundberg et al., 2012). For instance, Lundberg et al. (2012) identified a consistent presence of OTUs affiliated to *Streptomycetaceae* (Actinobacteria) in the *Arabidopsis thaliana* root endophytic compartment. However, composition of soil communities may to some extent impact the taxonomic composition of the core microbiome, as showed with *A. thaliana* (Bulgarelli et al., 2012; Lundberg et al., 2012). Therefore, a functional definition of the core microbiome has recently been proposed (Lakshmanan et al., 2014). It can be delineated using either a targeted approach (e.g. selection of antibiotic producers distributed in different genomic background of fluorescent pseudomonads according to the soils, see above) or an untargeted approach based on metagenomic or metatranscriptomic analyses to identify microbial functions (Mendes et al., 2011). The core microbiome is then defined by the shared microbial functions distributed in different microbial taxa.

2.2. Plant traits involved in the rhizosphere effect

Considering the importance of the rhizosphere effect for plant growth and health (Philippot et al., 2013), there is a major effort made by the scientific community in identifying plant traits involved in the selection of specific microbial populations and activities in order to ultimately monitor them through plant breeding. Among these traits a special attention is given to trophic- and signal-mediated communications between plant roots and microorganisms.

2.2.1. Trophic-mediated communication

Carbon forms present in rhizodeposits are essential for plant-microbe trophic interactions. Chemically recalcitrant to degradation, polymeric carbon forms like cellulose or lignin and more labile sugars are present in the rhizosphere in different proportions; different chemical forms can be present and differ with plant genotypes and environmental factors (Nguyen, 2003; Neumann et al., 2014). Soil microbial taxa respond differently to various carbon sources (Elhorst and Kuske, 2012; Goldfarb et al., 2011; Shi et al., 2011). Only few soil bacterial taxa, such as Burkholderiales and Pseudomonales, are favored by both labile and chemically recalcitrant substrates (Goldfarb et al., 2011). These groups appear to be commonly associated with plants (e.g. Bakker et al., 2013; Bodenhausen et al., 2013; Mendes et al., 2013), suggesting that the presence of both chemically recalcitrant polymeric carbon forms and more labile sugars in the plant rhizosphere would favor these bacterial groups. The types of sugar molecules released by the plant may also impact the microbial diversity. Even if fluorescent pseudomonads are known for their ability to use a wide range of sugars, there is a high metabolism diversity among these populations. As examples, only some of these pseudomonad populations are able to use trehalose (Latour & Lemanceau, 1997; Raaijmakers et al., 2001) and as a result are favored in the tomato rhizosphere (Latour et al., 1996) expected to produce the corresponding sugar; furthermore trehalose users were indeed shown to be efficient root colonizers of tomato rhizosphere (Ghirardi et al., 2012). Amino acids are the second most abundant class of compounds released in the rhizosphere behind sugars. They impact

rhizosphere microorganisms both as nutrient sources and signal molecules modulating microbial activities such as biofilm formation (Moe, 2013). The most important trophic source for its impact on microbial communities seem to be the organic acids (Shi et al., 2011). Phenolic compounds may also impact the composition of the rhizosphere microbiota by either promoting or depressing a range of microbial taxa according to the chemical fraction tested. (Badri et al., 2013). The interaction between plants and the pathogen *Agrobacterium* spp. represents a well-documented trophic-mediated communication. These pathogenic bacteria induce crown gall tumors induced after transfer and insertion of bacterial genes (T-DNA) into plant genome (Platt et al., 2014). As a result tumor cells produce xenotopic compounds (opines), usually not found in non-infected plant cells, that favor specific microorganisms able to use opines in the infected plant rhizosphere. These low molecular weight molecules (e.g. ordinary secondary amine derivatives derived from the condensation of amino acid and sugar) provide both C and N to these microorganisms. T-DNA found in the genome of tobacco ancestors that probably results from ancient bacterial transfer encodes synthesis of protein involved in opine production (Chen et al., 2016).

Plants not only impact rhizosphere microbiota via the release of nutrient but also via scavenging nutrients. As an example, the hyperaccumulation of iron by a transgenic tobacco deregulated in the ferritin synthesis led both to a depletion of that element in the rhizosphere and to the selection of pseudomonads populations highly competitive for this element thanks to the synthesis of specific sidérophores (Robin et al., 2006; 2007).

2.2.2. Signaling-mediated communication

Plant molecules, even present in small amount, such as hormones and hormone-like compounds, impact the composition of rhizosphere microbiome, microbial activities, and behavior. Some phytochemicals can indeed be key signals in well-known molecular communication described in symbiotic or parasitic interactions such as flavonoids involved in the establishment of the nitrogen-fixing symbiosis between legumes and rhizobia (see chapter 8), and strigolactones essential in mycorrhizal symbiosis (see chapter 8). Phytoalexins and plant phenolics such as acetosyringone are also known to be involved in parasitic interactions between plants and phytopathogenic bacteria (Ahuja et al., 2012; Baker et al., 2005; Jeandret et al., 2013; Subramoni et al., 2014)

Plants may also interfere with the QS pathway among bacteria by degrading acylhomoserine lactones (AHL) via lactonase synthesis that consequently disturb the QS resulting in a pathogenicity decrease of phytopathogenic bacteria (Kalia, 2013). Phytohormones, such as auxin or cytokinins, ethylene, gibberellins are involved in the regulation of parasitic and symbiotic plant-microbial interactions (Foo et al., 2013, 2016; Großkinsky et al., 2011; Miri et al., 2016; Ng et al., 2015). Hormones involved in plant immunity also shape the rhizosphere microbiome. A key hormone mediating plant defense reactions, salicylic acid (SA), impacts the root microbiome of *A. thaliana*, and the enrichment of specific taxa was further ascribed to their ability to use SA (Lebeis et al., 2015). Organic acids, such as citric acid and/or malic acid, also act as signals by inducing bacterial chemotaxis towards plants as showed with various species of Plant-Growth Promoting Rhizobacteria (Ling et al., 2011; Rudrappa et al., 2008; de Weert et al., 2002; Zhang et al., 2014, see also chapter 6). Organic acids also promote biofilm formation and therefore root colonization (Rudrappa et al., 2008; Zhang et al., 2014). Biofilm formation is indeed known to favor root bacterial colonization by creating an ecological niche that protect bacteria against biotic and abiotic stresses (Bogino et al., 2013). The production of QS molecules is also required for the production of mature biofilm and consequently modulation of QS signaling may affect the ability to this production. Finally, these acids but also phenolics regulate expression of bacterial genes such as

those encoding synthesis of antibiotics active against fungal phytopathogens (Pérez-Jaramillo et al., 2015).

Other plant compounds may interfere with microbial activities central for soil functioning. As an example, plants may inhibit nitrification (Biological inhibition of nitrification, BNI) via suppressors consisting in non-esterified fatty acids, corresponding methyl esters, and a cyclic diterpene (Philippot & Hallin, 2011; Skiba et al., 2011; Subbaroa et al., 2009, 2012). These plant compounds inhibit nitrification by suppressing microbial enzymatic pathways which catalyse the essential reactions of ammonia oxidation (Subbaroa et al., 2012).

2.3. Microbial traits favored in the rhizosphere

As indicated above, elements or molecules, released or scavenged by plants, impact microbial communities in the rhizosphere. Microbial populations favored by the plant exhibit the ability to (i) feed on specific nutrients and/or signal molecules released by the plant, (ii) adapt to deprivation of nutrients scavenged by the plants, (iii) respond by positive chemotaxis, (iv) establish biofilms. Many studies relied on colonization studies of introduced strains (Pérez-Jaramillo et al., 2015). As an example, Ghirardi et al. (2012) compared the colonization of tomato rhizosphere in a natural soil of a collection of *Pseudomonas* strains representative of a wide diversity (plants, soils). These best colonizers share in common their ability to use a wide range of organic compounds, supporting the results of Goldfarb et al. (2011) following a community approach. These efficient colonizers were also able to efficiently use iron and nitrogen oxides as electron acceptors (Ghirardi et al., 2012); this efficiency was related to the synthesis of specific siderophores and of nitrogen oxide reductases, respectively. These results confirmed the importance of the ability to adapt to iron starvation shown by Robin et al. (2007) and are in agreement with reported increased level of denitrification rates in the rhizosphere (Philippot et al., 2013).

Taken together these studies underline the importance of the carbon and energetic metabolism in the adaptation of soilborne bacteria in the rhizosphere (Latour & Lemanceau, 1997) which is in agreement with the properties of that specific environment: (i) increased availability and forms in organic compounds (electron donors) and (ii) decreased availability of oxygen and ferric iron as electron acceptors (Robin et al., 2008; Philippot et al., 2013).

Knowledge of plant-microbiota communication in the rhizosphere mostly relies on targeted studies using specific bacterial strains and considering specific traits hypothesized to play a major role. Over the last decade, progress in molecular methodologies has allowed the analysis of changes in microbial communities (Maron et al., 2007) associated with different rhizosphere conditions (e.g. plant genotype, mycorrhizal root or not). Overall, these studies pinpointed taxa that are favored or depressed in different environments (recently reviewed in Lakshmanan et al., 2014) without information on possible bacterial traits involved in the community shift with some exceptions such as the recent report of Lebeis et al. (2015) showing the enhancement of populations using SA. Reciprocally, plant traits accounting for community changes upon variations of the rhizosphere environment are rarely understood. As an example, rationale for the increased occurrence of pseudomonads harboring type three secretion systems (T3SS) in the rhizosphere (Mazurier et al., 2004) as related to mycorrhization (Viollet et al., 2011) is not understood despite the beneficial effect of these bacterial populations on the fungal symbiosis and plant growth (Viollet et al., 2016).

2.4. Prospects for monitoring rhizosphere microbiota via the host-plant

Demonstration that the composition and activities of the microbial communities in the rhizosphere are regulated by the host-plant through communication processes opens stimulating prospect for monitoring rhizosphere microbiota in order to promote populations the most favorable for plant growth and health. This relies on the knowledge of plant traits involved in the corresponding communication as described in sections 2.2 and 2.3. Knowledge of these traits may result from targeted or untargeted approaches.

2.4.1 Targeted approaches

These approaches consist in engineering root exudation (Ryan et al., 2009; Savka et al., 2002) to make the host-plant releasing molecules either interfering with bacterial signaling and resulting activities, or promoting specific beneficial microbial populations.

Interference with bacterial signaling. Manipulating plants to express AHL-lactonase lead to a decreased pathogenicity of phytopathogenic bacteria requiring QS to express their virulence. This interference of the host plant with bacterial communication therefore decreases disease severity (Helman & Chernin, 2015; Kalia, 2013).

Promotion of specific populations. *Agrobacterium*-plant interaction represent a well-studied manipulation of the host-plant by the bacteria to make it produce compounds (opines) that favor specific bacterial populations. This manipulation relies on the transfer of bacterial T-DNA to induce opine synthesis by the modified host-plant giving to the pathogenic bacteria a competitive advantage with the creation of a specific niche (Dessaux et al., 1998). The “Opine concept” proposed by these authors stipulates that opines favor the pathogen growth with strain specific pattern as these molecules differ upon *Agrobacteria* strain and more specifically upon the nature of bacterial carrying Tumor-inducing plasmid (pTi) transferred in the host-plant. In order to discriminate the specific role of various opines on microbiota, a range of transgenic plants producing these different opines was generated by transfer to the plant of T-DNA from *Agrobacterium* and opine-degrading populations were characterized (Oger et al., 1997), with different soils and plant species (Mansouri et al., 2002). An increasing opine carbon bias was tested in artificial exudation systems (with artificial root exudate with increasing amount of octopine) and genetically modified plant rhizospheres that exuded octopine (Mondy et al., 2014). *Ensifer* and *Pseudomonas* spp. were significantly promoted in soil amended with these artificial exudates and in the rhizosphere of octopine-producers transgenic lines. However, the density of *Pseudomonas* was increased as a response to carbon supplementation while that of *Ensifer* only correlated with octopine concentrations suggesting two opposed colonization strategies for rhizosphere bacteria. *Pseudomonas* would be representative of bacteria using the copiotrophic strategy and *Ensifer* of bacteria using the oligotrophic one. Moreover 16S metabarcoding analysis showed that *Ensifer* became dominant in soil supplemented with the highest amount of octopine, indicating a strong reshape of bacterial community in response to octopine supply.

These two examples represent nice proofs of concept of the possibility to monitor microbial populations and activities via the host-plant (i.e. engineering the rhizosphere, Dessaux et al., 2016).

2.4.2 Untargeted approaches

In their pioneer study, Smith et al. (1999) evidenced that ability of inbred lines of tomato to promote the survival of biocontrol bacterial strain and their efficiency to suppress damping-off induced by *Pythium* differed, suggesting that plant traits may influence survival and activities of beneficial bacterial strains. More recently, plant quantitative loci from *A. thaliana* involved in the plant effect on beneficial effects (root architecture and shoot growth) of a PGPR bacterial strain,

Pseudomonas simiae WCS417r, were identified by comparing the response of 302 *Arabidopsis* accession to the bacterial effects (Wintermans et al., 2016). Several of the underlying candidate genes described by the authors have been implicated in important plant growth-related processes.

Attempts are also being made to identify plant traits that select beneficial microbial populations from soilborne communities and/or functional microbial genes encoding beneficial activities by comparing the rhizosphere metagenome associated to plant genotypes chosen for their genetic distances and/or for their ecophysiological dissimilarities (Lambers et al., 2009; Moreau et al., 2015; Zancarini et al., 2013). Root traits mediating plant nutrition appear to be involved in plant-microbial community interaction, as supported by (i) the significant differences of bacterial communities in the rhizosphere of plants with ecophysiological profiles corresponding to different nutritional strategies (Zancarini et al., 2013), and (ii) the promotion of nitrate-reducing microbial community in the rhizosphere of plants with a slow nitrogen uptake rate (Moreau et al., 2015).

3. Plant communication with associated microorganisms in the phyllosphere

The above-ground parts of plants also sustain an active microbial life (Vorholt, 2012). These microbial communities, which are at the interface between the plant and the surrounding atmosphere, have not fully been integrated into the global change research agenda yet, although they can mediate plant responses to climate change (Vacher et al., 2016). The phyllosphere can be considered as the above-ground homolog of the rhizosphere. It can be defined as "*the microenvironment extending from the leaf surface outward to the outer edge of the boundary layer surrounding the leaf and inward into the leaf tissues*" (Morris, 2002). According to this definition, the phyllosphere microbiota comprises all microorganisms living on the lower and upper leaf surface (i.e. leaf epiphytes), and inside the leaf tissues (i.e. leaf endophytes). The phyllosphere microbiota is composed of bacteria, fungi, oomycetes and, less frequently, archaea and nematodes (Lindow & Brandl, 2003; Vorholt, 2012). These microorganisms interact with the host plant (Baker et al., 2010; Melotto et al., 2008) and with each other (Agler et al., 2016; Jakuschkin et al., 2016; Kemen, 2014). They also interact with viruses, such as mycoviruses (Marzano & Domier, 2015) and bacteriophages (Koskella, 2013; Koskella & Parr, 2015), and with herbivorous arthropods (Crawford et al., 2010; Humphrey et al., 2014).

3.1. Acquisition of the phyllosphere microbiota by the plant

The colonization of the phyllosphere by microorganisms starts at seedling emergence, and starts over every year at leaf flush in the case of perennial plant species. Most phyllosphere microorganisms are acquired horizontally, from the environment. Some of them can also be transmitted vertically, from maternal plants onto offspring via seeds (Figure 1).

3.1.1. Horizontal transmission

Phyllosphere microorganisms can originate from various environmental sources, including soil and litter of the germination environment (Barret et al., 2015; Copeland et al., 2015) and bioaerosols (Bulgarelli et al., 2013) (Figure 1). Bioaerosols themselves originate from various sources, including aquatic environments, soil, animals (Bulgarelli et al., 2013) and of course neighboring plants (Wilson et al. 2014). Raindrops, irrigation water (Morris, 2002) and leaf-dwelling insects (Osono, 2014) can also bring some microorganisms onto plant leaves. In the case of perennial plants, the phyllosphere can also be colonized at bud burst by the microorganisms associated to the perennial organs of the plant, such as twigs (Osono, 2014).

3.1.2. Vertical transmission

In addition, some phyllosphere microorganisms are transmitted from maternal plants onto offspring via seeds (Figure 1). The transmission can occur via the seed tissues or the exterior of seed coats. Some beneficial bacteria inoculated on maize seeds have for instance been retrieved from leaves, after having colonized the rhizosphere, the roots and the stems (Figure 1), and have been shown to significantly increase maize tolerance to drought (Naveed et al. 2014). Such vertical transmission is also common in the endophytic fungal species protecting plants against herbivory (Hodgson et al., 2014; Rodriguez et al., 2009). Some species of *Epichloë*, for instance, are transmitted via the seeds of temperate grasses. The mycelium first colonizes the stems, rhizomes and leaf tissues of the mother plant. It may also be present on the leaf surface. Then it colonizes the inflorescence, grows into ovules and colonizes the embryo within the seed (Rodriguez et al., 2009). Some foliar endophytes of forbs have also been found in and on pollen grains, suggesting that the transmission to seeds can also occur via the pollen tube (Hodgson et al., 2014).

3.2. Evidence for the phyllosphere effect

Phyllosphere microbial communities are significantly different from airborne microbial communities, although they are in direct contact with the atmosphere surrounding the plant (Vokou et al., 2012). Each leaf indeed creates a specific environment in which only some microorganisms can thrive (Vacher et al., 2016; Vorholt, 2012). This selective effect of leaves on microbial communities can be termed the phyllosphere effect, by analogy to the rhizosphere effect (See section 2.2).

3.2.1. Differentiation between foliar, airborne and soil microbial communities

A first line of evidence of the phyllosphere effect comes from the seasonal dynamics of phyllosphere microbial communities. At the beginning of the vegetative season, phyllosphere microbial communities are strongly influenced by the communities of surrounding environmental sources (soil and air, in particular). Then, they gradually acquire a higher proportion of leaf-specific taxa (Copeland et al., 2015; Maignien et al., 2014). The environmental source influencing the initial assemblage depends on the plant growing conditions. For instance, Maignien et al. (2014) found that phyllosphere microbial communities of *Arabidopsis thaliana* plants growing in sterile soil initially mirrored airborne communities. In contrast, Copeland et al. (2015) showed that phyllosphere microbial communities of several annual crop species growing in field conditions were initially influenced by soil microbial communities. In both cases, phyllosphere microbial communities subsequently differentiated from those of environmental sources, indicating that the leaf selects for specific microbial species.

3.2.2. Variations in phyllosphere microbial communities among plant species and genotypes

A second line of evidence of the phyllosphere effect comes from the influence of the host plant genotype on phyllosphere microbial communities. Plant species growing in the same location, and therefore submitted to the same inoculum, develop distinct phyllosphere microbial communities (Arfi et al. 2012; Dees et al. 2015; Inácio et al., 2010; Kembel and Mueller, 2014; Kembel et al., 2014; Kim et al., 2012; Laforest-Lapointe et al., 2016; Lambais et al., 2014; Redford et al., 2010; Sapkota et al., 2015). Similarly, within the same plant species, the composition of phyllosphere microbial communities differs among plant genotypes growing in the same location (Bálint et al., 2013; Bálint-Kurti et al., 2010; Bodenhausen et al., 2014; Cordier et al., 2012; Horton et al., 2014; Hunter et al., 2010, 2015). These variations in phyllosphere microbial communities among plant

species and genotypes can be explained by variations in foliar functional traits among plant genotypes; each plant species or genotype has its own foliar features, which selects for specific foliar microbial communities.

3.3. Functional traits and signaling molecules underlying the phyllosphere effect

Phyllosphere microbial communities differ from soil and airborne microbial communities, and among plant species and genotypes, because the plant host exerts a selective pressure on microbial communities (Vacher et al., 2016). This selective pressure (i.e. the phyllosphere effect) depends both on plant and microbial traits. The plant traits define the features of the microbial habitat, whereas the microbial traits underlie the ability of microorganisms to thrive in that habitat.

3.3.1. Plant traits shaping phyllosphere microbial communities

- *Leaf anatomy and chemistry.* At the beginning of the vegetative season, many microbial cells and spores reach the leaf via airborne dispersal. Only microorganisms able to attach to the leaf cuticle then have a chance to survive and multiply in the phyllosphere. The structure and composition of the cuticle is thus expected to have a major influence on phyllosphere microbial communities. Mutant lines of *A. thaliana* were used to test this hypothesis; the results confirmed the significant effect of cuticular chemistry on the composition of phyllosphere bacterial communities (Bodenhausen et al., 2014; Reisberg et al., 2013). Several other foliar morphological traits have been studied (Hunter et al., 2010; Yadav et al., 2005), but surprisingly they have little influence on phyllosphere microbial communities. For instance, the presence of trichomes does not influence the composition and diversity of phyllosphere bacterial communities (Reisberg et al., 2012), whereas leaf size does not influence the richness of phyllosphere fungal communities (Kinkel et al., 1987). Artificial leaf surfaces, that mimic the leaf surface topography down to the nanometer resolution, constitute a promising tool for better understanding the selective pressures exerted by leaf anatomy on phyllosphere microbial communities (Doan & Leveau, 2015).

- *Leaf primary metabolism.* Among the microorganisms able to attach to the leaf cuticle, only those able to use the nutrients available in the phyllosphere have a chance to thrive and reproduce. These nutrients include the carbohydrates produced by photosynthesis and exported to the leaf surface through leaching and guttation, and some volatile organic compounds such as the methanol emitted during leaf growth (Vacher et al., 2016). The nature and abundance of the foliar nutrients is expected to have a major influence on phyllosphere microbial communities. Accordingly, several studies showed that the leaf nitrogen content, which is related to the maximum photosynthetic rate (Cornelissen et al., 2003), correlates with the structure of phyllosphere microbial communities across plant species (Kembel & Mueller, 2014; Kembel et al., 2014; Laforest-Lapointe et al., 2016). In addition, the higher abundance and activity of the genus *Methylobacterium* in the phyllosphere than in the rhizosphere indicates that the foliar production of methanol shapes the composition of phyllosphere bacterial communities (Iguchi et al., 2015; Knief et al., 2012).

- *Leaf secondary metabolism.* Finally, only the microorganisms able to cope with the harsh microclimate of the leaf surface and with the foliar defenses can thrive and reproduce in the phyllosphere. The genetic and molecular pathways involved in the foliar recognition of pathogens, the foliar production of antimicrobial compounds, the regulation of stomatal aperture and the maintenance of cell wall integrity are expected to have a major influence on phyllosphere microbial communities. Accordingly, Horton et al. (2014) showed that plant loci responsible for defense and cell wall integrity are the main drivers of both phyllosphere fungal and bacterial communities in *A. thaliana*. For instance, a locus involved in the production of callose, a polysaccharide used by the

plant for sealing wounds during fungal infection, was found to drive variations in phyllosphere fungal communities (Horton et al., 2014). The structure of phyllosphere microbial communities is also controlled by the production of ethylene (ET) and GABA, two signaling molecules known for mediating the interactions between plants and a variety of organisms (Balint-Kurti et al., 2010; Bodenhausen et al., 2014). Recently, Vogel et al. (2016) showed that the protective ability of some phyllosphere commensals against foliar pathogens is related to the induction of defense-related genes. The colonization of *A. thaliana* by the commensal *Sphingomonas melonis*, which confers protection against the pathogen *Pseudomonas syringae* (Innerebner et al. 2011), changed the expression of almost 400 plant genes, including genes encoding pathogenesis-related (PR) proteins and antimicrobial proteins. Among them were genes involved in the salicylic acid (SA)- and ET-dependent defense-signaling pathways. Interestingly, Vogel et al. (2016) showed that *A. thaliana* mutants impaired in the recognition of microbe-associated molecular patterns (MAMPs) were less protected by the commensal strain, indicating that the protective ability of *Sphingomonas melonis* depends on its molecular recognition by the plant. Other commensals did not trigger the same changes in the leaf transcriptome, suggesting that the structure of phyllosphere microbial communities and their impact on plant performance are regulated by fine-tune molecular interactions between the leaf and its microbiota.

3.3.2. Microbial adaptations to the phyllosphere

Microbial adaptations to the phyllosphere have been extensively reviewed elsewhere (Vacher et al., 2016; Vorholt, 2012; Whipps et al., 2008). They include microbial traits favoring (i) adhesion to the leaf cuticle, (ii) nutrient acquisition, and (iii) tolerance to biotic and abiotic stresses. The production of hygroscopic biosurfactants, for instance, benefits phyllosphere bacteria by increasing cuticle permeability, thus increasing the diffusion of nutrients to the leaf surface (Burch et al., 2014; Schreiber et al., 2005). Some phyllosphere bacteria also produce multiple transporters, such as TonB-dependent transporters, to scavenge carbohydrates at low concentrations (Delmotte et al., 2009). The discovery of microbial rhodopsins in the phyllosphere suggests that some phyllosphere microorganisms have alternatively evolved a phototrophic lifestyle to cope with the scarcity of nutrients on the leaf surface (Atamna-Ismaeel et al., 2012). In addition, many microorganisms have evolved the ability to enter into the apoplast, which is richer in nutrients than the leaf surface. Some strains of the pathogenic bacteria *Pseudomonas syringae*, for instance, synthesize phytotoxins regulating stomatal aperture. Stomata close upon molecular recognition of the pathogen by the guard cells but the phytotoxins re-open them, thus allowing the pathogen to colonize the apoplast (Baker et al., 2010; Melotto et al., 2008). Again, these findings show that the phyllosphere microbiota is shaped by the molecular communication between the plant and the microorganisms. Future research needs to better decipher these molecular interactions and to investigate whether the plant can control them to adjust its phyllosphere microbiota to environmental conditions (Vandenkoornhuyse et al., 2015).

Conclusions and prospects

Plants are surrounded by microorganisms at the seed, root and shoot levels. There is a continuum between these three compartments: (i) microorganisms in the spermosphere originate both from the flowers and the soilborne microbial community, (ii) microorganisms in the rhizosphere originate both from seedborne and soilborne microbial community, (iii) microorganisms in the phyllosphere

partly originate from the soil and the rhizosphere, as suggested by the overlap between phyllosphere and rhizosphere microbial communities (Bai et al., 2015; Bodenhausen et al., 2013), and from airborne communities (Figure 1). The recruitment of microbial communities in these different spheres (i.e. spermosphere, rhizosphere, phyllosphere) relies on a subtle communication network between plant and microorganisms. This communication plays a major role in the plant selection of specific microbial populations and there is growing evidence that the host plant is able to disturb communications among microorganisms to its advantage. There is also increasing awareness that the plant is not an autonomous entity and that it depends on microorganisms, at least some of them, for its growth, nutrition and health (Partida-Martínez et al., 2011; Vandenkoornhuysen et al., 2015). According to this new vision, the biomolecular network formed by the plant and associated microorganisms, termed the holobiont, has been proposed to be a unit of selection in evolution (Bordenstein & Theis, 2015; Zilber-Rosenberg & Rosenberg, 2008).

The properties of these spheres differ significantly, especially in their trophic state. Indeed while the spermosphere and rhizosphere are habitats with relatively abundant nutrients, the phyllosphere is a low-nutrient habitat. Therefore selection of microbial populations in the spermosphere and rhizosphere relies mostly on efficient resources uses, while selection of population in the phyllosphere is dependent on attachment and adaptation to biotic and abiotic stresses. In all cases, molecular signalization plays a major role in the plant selection of microbial populations. The stability of plant-microbe associations requires reciprocal benefices for the partners, the plant providing niches and nutrients to the microorganisms, mostly heterotrophic, and in return microorganisms, at least some of them, enhancing plant growth, nutrition and health. The association of all these bionts (plant and microorganisms) has been proposed to be called holobiont, this holobiont leading to a so-called extended phenotype since plant growth and development are significantly impacted by the associated microbiota (Partida-Martínez et al., 2011). According to this new vision, the biomolecular network formed by the plant and its microorganisms, i.e. holobiont, can be considered as a unit of selection in evolution (Bordenstein & Theis, 2015; Zilber-Rosenberg & Rosenberg, 2008). This network relies on molecular signalization mediated by phytochemicals, some of them being known but probably many remaining to be identified. Progress in metabolomics is expected to allow us to discover new signal molecules and to better detangle the complex communication between plants and associated microorganisms (van Dam & Bouwmeester, 2016).

Development of molecular approaches relying on nucleic acids extraction and analysis has also boosted research on plant-microbe interactions and open stimulating prospects in agroecology. Research on plant-microbe association as a whole (holobiont) is expected to give more insight to the impact of rhizosphere communities on those of the phyllosphere and reciprocally, with potential applications in plant health management (Lemanceau et al., 2009). A better knowledge of plant traits involved in the selection of beneficial microbial populations and its application to plant breeding is expected to allow us to decrease synthetic inputs by growing cultivars better valuing environmental biotic resources (Wissuwa et al., 2009). This represents a major paradigm change since over the last decades agriculture has relied less on biodiversity and more on inputs (Philippot et al., 2013). Moreover, during that period, plant breeding may have led to the counterselection of plant traits involved in the selection of beneficial microbial populations (Bulgarelli et al., 2015; Pérez Jaramillo et al., 2016; Schmidt et al., 2016; Wissuwa et al., 2009). Future research in plant breeding will have to reverse this trend, by fully taking the plant microbiota into account, and this will require a better knowledge of the communication network between plants and associated microorganisms.

References

- Agler, M. T., Ruhe, J., Kroll, S., Morhenn, C., Kim, S.-T., Weigel, D., & Kemen, E. M. (2016). Microbial hub taxa link host and abiotic factors to plant microbiome variation. *PLoS Biology*, 14, e1002352. doi:10.1371/journal.pbio.1002352
- Ahuja, I., Kissen, R., & Bones, A. M. (2012). Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends in Plant Science*, 17, 73–90.
- Arfi, Y., Buée, M., Marchand, C., Levasseur, A., & Record, E. (2012). Multiple markers pyrosequencing reveals highly diverse and host-specific fungal communities on the mangrove trees *Avicennia marina* and *Rhizophora stylosa*. *FEMS Microbiology Ecology*, 79, 433–444.
- Atamna-Ismaeel, N., Finkel, O. M., Glaser, F., Sharon, I., Schneider, R., Post, A. F., Spudich, J. L., von Mering, C., Vorholt, J. A., Iluz, D., Béjà, O., & Belkin, S. (2012). Microbial rhodopsins on leaf surfaces of terrestrial plants. *Environmental Microbiology*, 14, 140–146.
- Badri, D. V., Chaparro, J. M., Zhang, R., Shen, Q., & Vivanco, J. M. (2013). Application of natural blends of phytochemicals derived from the root exudates of *Arabidopsis* to the soil reveal that phenolic-related compounds predominantly modulate the soil microbiome. *The Journal of Biological Chemistry*, 288, 4502–4512.
- Baetz, U., & Martinoia, E. (2014). Root exudates: the hidden part of plant defense. *Trends in Plant Science*, 19, 90–98.
- Bai, Y., Müller, D. B., Srinivas, G., Garrido-Oter, R., Potthoff, E., Rott, M., Dombrowski, N., Münch, P. C., Spaepen, S., Remus-Emsermann, M., Hüttel, B., McHardy, A. C., Vorholt, J. A., & Schulze-Lefert, P. (2015). Functional overlap of the *Arabidopsis* leaf and root microbiota. *Nature*, 528, 364–369.
- Bais, H., Weir, T., Perry, L., Gilroy, S., & Vivanco, J. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 233–266.
- Baker, C. J., Mock, N. M., Whitaker, B. D., Roberts, D. P., Rice, C. P., Deahl, K. L., & Aver'yanov, A. A. (2005). Involvement of acetosyringone in plant-pathogen recognition. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 4, 130–136.
- Baker, C. M., Chitrakar, R., Obulareddy, N., Panchal, S., Williams, P., & Melotto, M. (2010). Molecular battles between plant and pathogenic bacteria in the phyllosphere. *Brazilian Journal Of Medical and Biological Research*, 43, 698–704.
- Bakker, P. A. H. M., Berendsen, R. L., Doornbos, R. F., Wittermans, P. C. A., & Pieterse, C. M. J. (2013). The rhizosphere revisited: root microbiomics. *Frontiers in Plant Science*, 4, 165. <http://doi.org/10.3389/fpls.2013.00165>
- Bálint, M., Tiffin, P., Hallström, B., O'Hara, R. B., Olson, M. S., Fankhauser, J. D., Piepenbring, M., & Schmitt, I. (2013). Host genotype shapes the foliar fungal microbiome of balsam poplar (*Populus balsamifera*). *PLoS One*, 8, e53987. doi:10.1371/journal.pone.0053987
- Balint-Kurti, P., Simmons, S. J., Blum, J. E., Ballaré, C. L., & Stapleton, A. E. (2010). Maize leaf epiphytic bacteria diversity patterns are genetically correlated with resistance to fungal pathogen infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23, 473–84.
- Barret, M., Briand, M., Bonneau, S., Préveaux, A., Valière, S., Bouchez, O., Hunault, G., Simoneau, P., & Jacques, M.-A. (2015). Emergence shapes the structure of the seed-microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 1257–1266.
- Barret, M., Guimbaud, J.-F., Darrasse, A., & Jacques, M.-A. (2016). Plant microbiota affects seed transmission of phytopathogenic microorganisms. *Molecular Plant Pathology*, 17, 791–795.
- Baudoin, E., Benizri, E., Guckert, A. (2002). Impact of growth stages on the bacterial community structure along maize roots by metabolic and genetic fingerprinting. *Applied Soil Ecology*, 19, 135–145.
- Bodenhausen, N., Horton, M. W., & Bergelson, J. (2013). Bacterial communities associated with the leaves and the roots of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* 8(2), e56329. doi:10.1371/journal.pone.0056329
- Bodenhausen, N., Bortfeld-Miller, M., Ackermann, M., & Vorholt, J. A. (2014). A synthetic community approach reveals plant genotypes affecting the phyllosphere microbiota. *PLoS Genetics*, 10, e1004283. doi:10.1371/journal.pgen.1004283.
- Bogino, P. C., de las Mercedes Oliva, L., Sorroche, F.G., & Giordano, W. (2013). The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 15838–15859.
- Bordenstein, S.R., & Theis, K.R. (2015). Host biology in light of the microbiome: Ten principles of holobionts and hologenomes. *PLoS Biology*, 13, 1–23.
- Bulgarelli, D., Rott, M., Schlaeppi, K., van Themaat, E. V. L., Ahmadinejad, N., Assenza, F., Rauf, V., Huettel, B., Reinhardt, R., Schmelzer, E., Peplies, J., Gloeckner, F. O., Amann, R., Eickhorst, T., & Schulze-Lefert, P. (2012). Revealing structure and assembly cues for *Arabidopsis* root-inhabiting bacterial microbiota. *Nature*, 488, 91–95.
- Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., Ver Loren van Themaat, E., & Schulze-Lefert, P. (2013). Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual Reviews of Plant Biology*, 64, 807–38.
- Bulgarelli, D., Garrido-Oter, R., Münch, P. C., Weiman, A., Dröge, J., Pan, Y., McHardy, A. C., & Schulze-Lefert, P. (2015). Structure and function of the bacterial root microbiota in wild and domesticated barley. *Cell Host & Microbe*, 17, 392–403.

- Burch, A. Y., Zeisler, V., Yokota, K., Schreiber, L., & Lindow, S. E. (2014). The hygroscopic biosurfactant syringafactin produced by *Pseudomonas syringae* enhances fitness on leaf surfaces during fluctuating humidity. *Environmental Microbiology*, 16, 2086–2098.
- Chaparro, J. M., Badri, D. V., Bakker, M. G., Sugiyama, A., Manter, D. K., & Vivanco, J. M. (2013). Root exudation of phytochemicals in *Arabidopsis* follows specific patterns that are developmentally programmed and correlate with soil microbial functions. *PLoS One*, 8, e55731.
- Chen, K., de Borne F. D., Julio E., Obszynski J., Pale P., & Otten L. (2016). Root-specific expression of opine genes and opine accumulation in some cultivars of the naturally occurring genetically modified organism *Nicotiana tabacum*. *The Plant Journal*, doi: 10.1111/tbj.13196.
- Copeland, J. K., Yuan, L., Layeghifard, M., Wang, P. W., & Guttman, D. S. (2015). Seasonal community succession of the phyllosphere microbiome. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28, 274–285.
- Cordier, T., Robin, C., Capdevielle, X., Desprez-Loustau, M.-L., & Vacher, C. (2012). Spatial variability of phyllosphere fungal assemblages: genetic distance predominates over geographic distance in a European beech stand (*Fagus sylvatica*). *Fungal Ecology*, 5, 509–520.
- Cornelissen, J. H. C., Lavorel, S., Garnier, E., Díaz, S., Buchmann, N., Gurvich, D. E., Reich, P.B., ter Steege, H., Morgan, H. D., van der Heijden, M. G. A., Pausas, J. G., & Poorter, H. (2003). A handbook of protocols for standardised and easy measurement of plant functional traits worldwide. *Australian Journal of Botany*, 51, 335–380.
- Crawford, K. M., Land, J. M., & Rudgers, J. A. (2010). Fungal endophytes of native grasses decrease insect herbivore preference and performance. *Oecologia*, 164, 431–444.
- Curl, E. A., & Truelove, B. (1986). "The Rhizosphere". (Advanced Series in Agricultural Sciences, Vol. 15). Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York-Tokyo.
- Cusano, A. M., Burlinson, P., Deveau, A., Vion, P., Uroz, S., Preston, G. M., & Frey-Klett, P. (2011). *Pseudomonas fluorescens* BBc6R8 type III secretion mutants no longer promote ectomycorrhizal symbiosis. *Environmental Microbiology Reports*, 3, 203–210.
- Dakora, F. D., & Phillips, D. A. (2002). Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant and Soil*, 245, 35–47.
- Darrasse, A., Darsonval, A., Boureau, T., Brisset, M.-N., Durand, K., & Jacques, M.-A. (2010). Transmission of plant-pathogenic bacteria by nonhost seeds without induction of an associated defense reaction at emergence. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 6787–6796.
- Darsonval, A., Darrasse, A., Durand, K., Bureau, C., Cesbron, S., & Jacques, M.-A. (2009). Adhesion and fitness in the bean phyllosphere and transmission to seed of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22, 747–757.
- Dees, M. W., Lysøe, E., Nordskog, B. & Brurberg, M. B. (2015). Bacterial communities associated with surfaces of leafy greens: shift in composition and decrease in richness over time. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 1530–1539.
- Deflaun, M. F., Marshall, B. M., Kulle, E. P., & Levy, S. B. (1994). Tn5 insertion mutants of *Pseudomonas fluorescens* defective in adhesion to soil and seeds. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 2637–2642.
- De-la-Pena, C., Badri, D. V., Lei, Z., Watson, B. S., Brandao, M. M., Silva-Filho, M. C., Sumner, L. W., & Vivanco, J. M. (2010). Root secretion of defense-related proteins is development-dependent and correlated with flowering time. *The Journal of Biological Chemistry*, 285, 30654–30665.
- Delmotte, N., Knief, C., Chaffron, S., Innerebner, G., Roschitzki, B., et al. (2009). Community proteogenomics reveals insights into the physiology of phyllosphere bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 106, 16428–16433.
- Dessaux, Y., Grandclément, C., & Faure, D. (2016). Engineering the rhizosphere. *Trends in Plant Science*, 21, 266–78.
- Dessaux, Y., Petit, A., Farrand, S. K., & Murphy P. J. (1998) Opines and opine-like molecules involved in plant–Rhizobiaceae interactions. In "The Rhizobiaceae" (H.P. Spaink et al., eds), pp. 173–197, Springer, The Netherlands.
- de Weert, S., Vermeiren, H., Mulders, I. H., Kuiper, I., Hendrickx, N., Bloemberg, G. V., Vanderleyden, J., de Mot R., & Lugtenberg, B. J. (2002). Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15, 1173–1180.
- Doan, H. K., & Leveau, J. H. J. (2015). Artificial surfaces in phyllosphere microbiology, *Phytopathology*, 105, 1036–1042.
- Eichorst, S. A. & Kuske, C. R. (2012). Identification of cellulose-responsive bacterial and fungal communities in geographically and edaphically different soils by using stable isotope probing. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 2316–2327.
- Elasri, M., Delorme, S., Lemanceau, P., Stewart, G., Laue, B., Glickmann, E., Oger, P. M., Dessaux, Y. (2001). Acyl-homoserine lactone production is more common amongst plant-associated than soil-borne *Pseudomonas* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 1198–1209.
- Espinosa-Urgel, M., Salido, A., & Ramos, J. L. (2000). Genetic analysis of functions involved in adhesion of

- Pseudomonas putida* to seeds. *Journal of Bacteriology*, 182, 2363–2369.
- Espinosa-Urgel, M., & Ramos, J. L. (2004). Cell density-dependent gene contributes to efficient seed colonization by *Pseudomonas putida* KT2440. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 5190–5198.
- Frey, P., Frey-Klett, P., Garbaye, J., Berge, O. & Heulin, T. (1997). Metabolic and genotypic fingerprinting of fluorescent pseudomonads associated with the Douglas fir *Laccaria bicolor* mycorrhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 1852–1860.
- Frey-Klett, P., Garbaye, J., & Tarkka, M. (2007) The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytologist*, 176, 22–36.
- Foo, E., Ross, J. J., Jones, W. T., & Reid, J. B. (2013). Plant hormones in arbuscular mycorrhizal symbioses: an emerging role for gibberellins. *Annals of Botany*, 111, 769–779.
- Foo, E., McAdam, E. L., Weller, J. L., & Reid, J. B. (2016). Interactions between ethylene, gibberellins, and brassinosteroids in the development of rhizobial and mycorrhizal symbioses of pea. *Journal of Experimental Botany*, online, doi: 10.1093/jxb/erw047
- Fuqua, C., Parsek, M. R., & Greenberg, E. P. (2001). Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annual Review of Genetetics*, 35, 439–468.
- Gamalero, E., Trotta, A., Massa, N., Copetta, A., Martinotti, M. G., & Berta G. (2004). Impact of two fluorescent pseudomonads and an arbuscular mycorrhizal fungus on tomato plant growth, root architecture and P acquisition. *Mycorrhiza*, 14, 185–192.
- Gamliel, A., & Katan, J. (1992). Chemotaxis of fluorescent pseudomonads towards seed exudates and germinating seeds in solarized soil. *Phytopathology*, 82, 320–327.
- Garbaye, J. (1994). Mycorrhiza helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*, 128, 197–210.
- García-Salamanca, A., Molina-Henares, M. A., van Dillewijn, P., Solano, J., Pizarro-Tobías, P., Roca, A., ..., Ramos, J. L. (2013). Bacterial diversity in the rhizosphere of maize and the surrounding carbonate-rich bulk soil. *Microbial Biotechnology*, 6, 36–44.
- Ghirardi, S., Dessaint, F., Mazurier, S., Corberand, T., Raaijmakers, J. M., Meyer, J.-M., Dessaux, Y., & Lemanceau, P. (2012). Identification of traits shared by rhizosphere-competent strains of fluorescent pseudomonads. *Microbial Ecology*, 64, 725–737.
- Goldfarb, K. C., Karaoz, U., Hanson C. A., Santee, C. A., Bradford, M. A., Treseder, K. K., Wallenstein, M. D., & Brodie, E. L. (2011). Differential growth responses of soil bacterial taxa to carbon substrates of varying chemical recalcitrance. *Frontiers in Microbiology*, 2, 94. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2011.00094>.
- Grandclément, C., Tannières, M., Moréra, S., Dessaux, Y., & Faure, D. (2016). Quorum quenching: role in nature and applied developments. *FEMS Microbiology Reviews*, 40, 86–116.
- Grayston, S. J., Wang, S., Campbell, C. D., & Edwards, A. C. (1998). Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 30, 369–378.
- Großkinsky, D. K., Naseem, M., Abdelmohsen, U. R., Plickert, N., Engelke, T., Griebel, T., ... Roitsch, T. (2011). Cytokinins mediate resistance against *Pseudomonas syringae* in tobacco through increased antimicrobial phytoalexin synthesis independent of salicylic acid signaling. *Plant Physiology*, 157, 815–830.
- Hacquard S, & Schadt CW. (2015). Towards a holistic understanding of the beneficial interactions across the *Populus* microbiome. *New Phytologist*, 205, 1424–1430.
- Hartmann, A., Rothballer, M. & Schmid, M. (2008). Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant and Soil*, 312, 7.
- Helman, Y., & Chernin, L. (2015). Silencing the mob: disrupting quorum sensing as a means to fight plant disease. *Molecular Plant Pathology*, 16, 316–329.
- Hiltner, L. (1904). Über neuere erfahrungen und probleme auf dem gebiete der bodenbakteriologie unter besonderden berucksichtigung und Brache. *Arbeiten der Deutschen Landwirtschaftlichen Gesellschaft*, 98, 59–78.
- Hodgson, S., de Cates, C., Hodgson, J., Morley, N. J., Sutton, B. C., & Gange, A. C. (2014). Vertical transmission of fungal endophytes is widespread in forbs. *Ecology and Evolution*, 4, 1199–1208.
- Horton, M. W., Bodenhausen, N., Beilsmith, K., Meng, D., Muegge, B. D., Subramanian, S., Vetter, M. M., Vilhjálmsson, B. J., Nordborg, M., Gordon, J. I., & Bergelson, J. (2014). Genome-wide association study of *Arabidopsis thaliana* leaf microbial community. *Nature Communications*, 5, 5320. doi:10.1038/ncomm
- Humphrey, P. T., Nguyen, T. T., Villalobos, M. M., & Whiteman, N. K. (2014). Diversity and abundance of phyllosphere bacteria are linked to insect herbivory. *Molecular Ecology*, 23, 1497–515.
- Hunter, P. J., Hand, P., Pink, D., Whipps, J. M., & Bending, G. D. (2010). Both leaf properties and microbe-microbe interactions influence within-species variation in bacterial population diversity and structure in the lettuce (*Lactuca species*) phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 8117–8125.
- Hunter, P. J., Pink, D. A. C., & Bending, G. D. (2015). Cultivar-level genotype differences influence diversity and composition of lettuce (*Lactuca* sp.) phyllosphere fungal communities. *Fungal Ecology*, 17, 183–186.
- Iguchi, H., Yurimoto, H., & Sakai, Y. (2015). Interactions of methylotrophs with plants and other heterotrophic bacteria. *Microorganisms*, 3, 137–151.
- Inácio, J., Ludwig, W., Spencer-Martins, I., & Fonseca, A. (2010). Assessment of phylloplane yeasts on selected

- Mediterranean plants by FISH with group- and species-specific oligonucleotide probes. *FEMS Microbiology Ecology*, 71, 61–72.
- Inceoglu, O., Falcao Salles, J., van Overbeek, L., & van Elsas, J. D. (2010) Effect of plant genotype and growth stage on the Betaproteobacterial communities associated with different potato cultivars in two fields. *Applied and Environmental Microbiology*, 11, 3675–3684.
- Innerebner, G., Knief, C., & Vorholt, J. A. (2011). Protection of *Arabidopsis thaliana* against leaf-pathogenic *Pseudomonas syringae* by *Sphingomonas* strains in a controlled model system. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 3202–3210.
- Jakuschkin, B., Fievet, V., Schwaller, L., Ouadah, S., Robin, S., Robin, C., & Vacher, C. (2016). Deciphering the pathobiome: intra-and inter-kingdom interactions involving the pathogen *Erysiphe alphitoides*. *Microbial Ecology*, online. doi:DOI 10.1007/s00248-016-0777-x.
- Jeandet, P., Clément, C., Courrot, E., & Cordelier, S. (2013). Modulation of phytoalexin biosynthesis in engineered plants for disease resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 14136–14170.
- Johnson, K. L., & Walcott, R. R. (2013). Quorum sensing contributes to seed-to-seedling transmission of *Acidovorax citrulli* on watermelon. *Journal of Phytopathology*, 161, 562–573.
- Kalia, V.C. (2013). Quorum sensing inhibitors: An overview. *Biotechnology Advances*, 31, 224–245.
- Kembel, S. W., Connor, T. K. O., Arnold, H. K., Hubbell, S. P., & Wright, S. J. (2014). Relationships between phyllosphere bacterial communities and plant functional traits in a neotropical forest. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111, 13715–13720.
- Kembel, S. W., & Mueller, R. C. (2014). Plant traits and taxonomy drive host associations in tropical phyllosphere fungal communities. *Botany*, 92, 303–311.
- Kemen, E. (2014). Microbe-microbe interactions determine oomycete and fungal host colonization. *Current Opinion in Plant Biology*, 20, 75–81.
- Kim, M., Singh, D., Lai-hoe, A., Chun, J., & Adams, J. M. (2012). Distinctive phyllosphere bacterial communities in tropical trees. *Microbial Ecology*, 63, 674–681.
- Kinkel, L. L., Andrews, J. H., Berbee, F. M., & Nordheim, E. V. (1987). Leaves as islands for microbes. *Oecologia*, 71, 405–408.
- Knief, C., Delmotte, N., Chaffron, S., Stark, M., Innerebner, G., Wassmann, R., von Mering, C., & Vorholt, J. A., (2012). Metaproteogenomic analysis of microbial communities in the phyllosphere and rhizosphere of rice. *ISME Journal*, 6, 1378–1390.
- Koskella, B. (2013). Phage-mediated selection on microbiota of a long-lived host. *Current Biology*, 23, 1256–1260.
- Koskella, B., & Parr, N. (2015). The evolution of bacterial resistance against bacteriophages in the horse chestnut phyllosphere is general across both space and time. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B*, 370, 20140297. doi:10.1098/rstb.2014.0297.
- Kwan, G., Pisithkul, T., Amador-Noguez, D., & Barak, J. (2015). De novo amino acid biosynthesis contributes to *Salmonella enterica* growth in alfalfa seedling exudates. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 861–873.
- Laforest-Lapointe, I., Messier, C., & Kembel, S. W. (2016). Host species identity, site and time drive temperate tree phyllosphere bacterial community structure. *Microbiome*, 4, 27. doi:10.1186/s40168-016-0174-1
- Lambais, M. R., Lucheta, A. R., & Crowley, D. E. (2014). Bacterial community assemblages associated with the phyllosphere, dermosphere, and rhizosphere of tree species of the Atlantic forest are host taxon dependent. *Microbial Ecology*, 68, 567–74.
- Lambers, H., Mougél, C., Jaillard, B., & Hinsinger, P. (2009). Plant-microbe-soil interactions in the rhizosphere: an evolutionary perspective. *Plant and Soil*, 321, 83–115.
- Lakshmanan, V., Selvaraj, G., & Bais, H. P. (2014) Functional soil microbiome: belowground solutions to an aboveground problem. *Plant Physiology*, 166, 689-700.
- Latour, X., Corberand, T., Laguerre, G., Allard, F., & Lemanceau, P. (1996). The composition of fluorescent pseudomonad population associated with roots is influenced by plant and soil type. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 2449–2556.
- Latour X., & Lemanceau P. (1997) Carbon and energy metabolism of oxidase-positive saprophytic fluorescent *Pseudomonas* spp. *Agronomie*, 17, 427–443.
- Latour, X., Philippot, L., Corberand, T., & Lemanceau, P. (1999). The establishment of an introduced community of fluorescent pseudomonads is affected both by the soil-type and the rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*, 30, 163–170.
- Latour, X., Delorme, S., Mirleau P., & Lemanceau, P. (2003). Identification of traits implicated in the rhizosphere competence of fluorescent pseudomonads: description of a strategy based on population and model strain studies. *Agronomie*, 23, 397–405.
- Lebeis, S. L., Paredes, S. H., Lundberg, D. S., Breakfield, N., Gehring, J., McDonald, M., Malfatti, S., Glavina del Rio, T., Jones, C. D., Tringe, S. G., & Dangel, J. L. (2015). Salicylic acid modulates colonization of the root microbiome by specific bacterial taxa. *Science*, 349:860–864.
- Lemanceau, P. (1992). Effets bénéfiques de rhizobactéries sur les plantes : exemple des *Pseudomonas* spp. fluorescents.

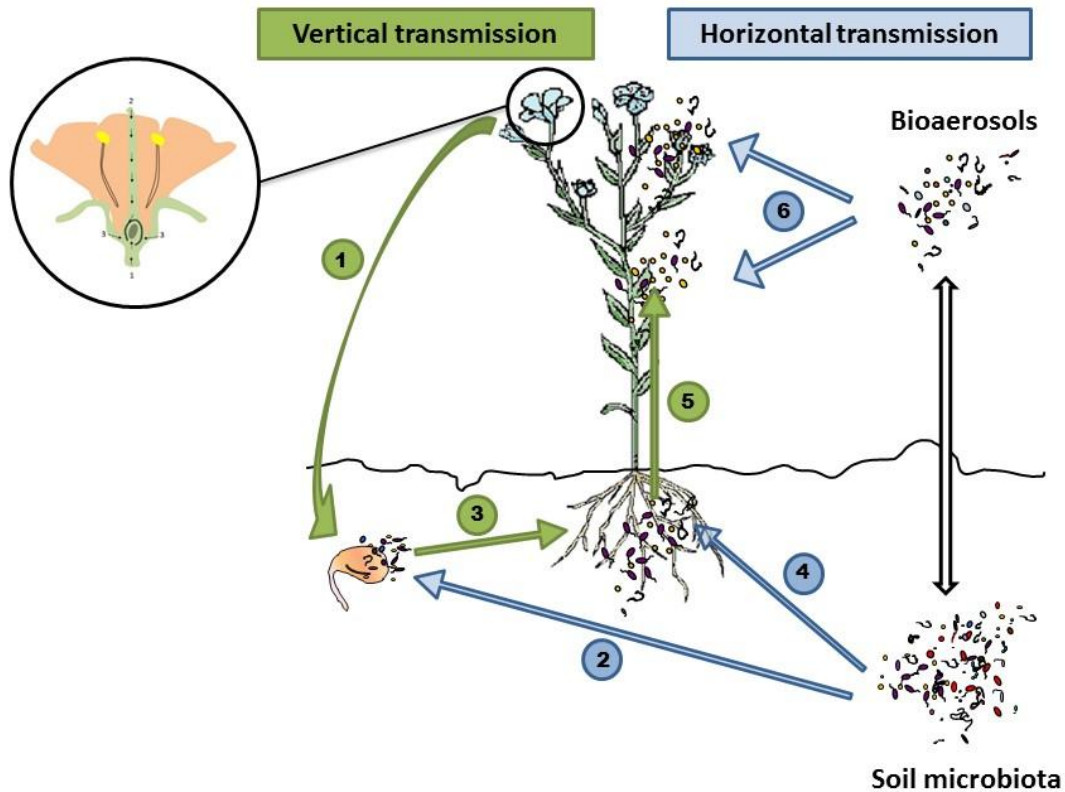
- Agronomie*, 12, 413–437.
- Lemanceau, P., Corberand, T., Gardan, L., Latour, X., Laguerre, G., Boeufgras, J.-M., Alabouvette, C. (1995). Effect of two plant species, flax (*Linum usitatissimum* L.) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), on the diversity of soilborne populations of fluorescent pseudomonads. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 1004–1012.
- Lemanceau, P., Expert, D., Gaymard, F., Bakker, P.A.H.M., & Briat J.-F. (2009). Role of iron in plant-microbe interactions. *Advances in Botanical Research*, 51, 491–549.
- Liljeroth, E., Burgers, S. L. G. E., van Veen, J. A. (1991). Changes in bacterial populations along roots of wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Biology and Fertility of Soils*, 10, 276–280.
- Lindow, S. E., & Brandl, M. T. (2003). Microbiology of the phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 1875–1883.
- Ling, N., Raza, W., Ma, J., Huang, Q., & Shen, Q. (2011). Identification and role of organic acids in watermelon root exudates for recruiting *Paenibacillus polymyxa* SQR-21 in the rhizosphere. *European Journal of Soil Biology*, 47, 374–379.
- Lundberg, D. S., Lebeis, S. L., Paredes, S. H., Yourstone, S., Gehring, J., Malfatti, S., Tremblay, J., Engelbrektson, A., Kunin, V., Rio, T. G. D., Edgar, R. C., Eickhorst, T., Ley, R. E., Hugenholtz, P., Tringe S. G., & Dangel, J. L. (2012). Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature*, 488, 86–90.
- Maignien, L., DeForce, E. A., Chafee, M.E., Eren, A. M., & Simmons, S. L. (2014). Ecological succession and stochastic variation in the assembly of *Arabidopsis thaliana* phyllosphere communities. *MBio*, 5, e00682–13. doi:10.1128/mBio.00682-13
- Mansouri, H., Petit, A., Oger, P., & Dessaux, Y. (2002). Engineered rhizosphere: the trophic bias generated by opine-producing plants is independent of the opine type, the soil origin, and the plant species. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 2562–2566.
- Marilley, L., Vogt, G., Blanc, M., & Aragno, M. (1998). Bacterial diversity in the bulk soil and rhizosphere fractions of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* as revealed by PCR restriction analysis of 16S rDNA. *Plant and Soil*, 198, 219–224.
- Maron, P.-A., Ranjard, L., Mougél, C., & Lemanceau, P. (2007). Metaproteomics: a new approach for studying functional microbial ecology. *Microbial Ecology*, 53, 486–493.
- Marschner, P., Crowley, D., Rengel, Z. (2011). Rhizosphere interactions between microorganisms and plants govern iron and phosphorus acquisition along the root axis – model and research methods. *Soil Biology & Biochemistry* 43, 883–894.
- Marzano, S.-Y. L., & Domier, L. (2015). Novel mycoviruses discovered from metatranscriptomics survey of soybean phyllosphere phytobiomes. *Virus Research*, 213, 332–342.
- Maude, R. B. (1996). "Seedborne diseases and their control: Principles and practice". CAB International, Wallingford, Oxon, U.K.
- Mazurier, S., Lemunier, M., Siblot, S., Mougél, C., & Lemanceau, P. (2004). Distribution and diversity of type III secretion system-like genes in saprophytic and phytopathogenic fluorescent pseudomonads. *FEMS Microbiology Ecology*, 49, 455–467.
- Melotto, M., Underwood, W., & He, S. Y. (2008). Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 46, 101–122.
- Mendes, R., Kruijt, M., de Bruijn, I., Dekkers, E., van der Voort, M., Schneider, J. H., Piceno, Y. M., DeSantis, T. Z., Andersen, G. L., Bakker, P. A. H. M., & Raaijmakers, J. M. (2011). Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science*, 332, 1097–1100.
- Mendes, R., Garbeva, P., & Raaijmakers, J. M. (2013). The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 37, 634–663.
- Miri, M., Janakirama, P., Held, M., Ross, L., & Szczygłowski, K. (2016) Into the root: how cytokinin controls rhizobial infection. *Trends in Plant Science*, 21, 178–86.
- Moe, L. A. (2013). Amino acids in the rhizosphere: from plants to microbes. *American Journal of Botany*, 100, 1692–1705.
- Mondy, S., Lenglet, A., Beury-Cirou, A., Libanga, C., Ratet, P., Faure, D., and Dessaux, Y. (2014). An increasing opine carbon bias in artificial exudation systems and genetically modified plant rhizospheres leads to an increasing reshaping of bacterial populations. *Molecular Ecology*, 23, 4846–4861.
- Moreau, D., Pivato, B., Bru, D., Busset, H., Deau, F., Faivre, C., Matejcek, A., Stbik, F., Philippot L., & Mougél, C. (2015). Plant traits related to nitrogen uptake influence plant-microbe competition. *Ecology*, 96, 2300–2310.
- Morris, C. E. (2002) Phyllosphere. eLS. 26. doi:10.1007/978-81-322-1575-2
- Mougél, C., Offre, P., Ranjard, L., Corberand, T., Gamalero, E., Robin, C., & Lemanceau, P. (2006) Dynamic of the genetic structure of bacterial and fungal communities at different developmental stages of *Medicago truncatula* Gaertn. cv. Jemalong line J5. *New Phytologist*, 170, 165–175.
- Naveed, M., Mitter, B., Reichenauer, T. G., Wieczorek, K. & Sessitsch, A. (2014). Increased drought stress resilience of maize through endophytic colonization by *Burkholderia phytofirmans* PsJN and *Enterobacter* sp. FD17. *Environmental Experimental Botany*, 97, 30–39.

- Nelson, E. B. (2004). Microbial dynamics and interactions in the spermosphere. *Annual Review of Phytopathology*, 42, 271-309.
- Neumann, G., Bott, S., Ohler, M., Mock, H.-P., Lippmann, R., Grosch, R., & Smalla, K. (2014). Root exudation and root development of lettuce (*Lactuca sativa* L. cv. Tizian) as affected by different soils. *Frontiers in Microbiology*, 5, 2. doi:10.3389/fmicb.2014.00002
- Ng, J. L. P., Perrine-Walker, F., Wasson, A. P., & Mathesius, U. (2015). The Control of Auxin Transport in Parasitic and Symbiotic Root-Microbe Interactions. *Plants*, 4, 606-643.
- Nguyen, C. (2003). Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls. *Agronomie*, 23, 375-396.
- Offre, P., Pivato, B., Siblot, S., Gamalero, E., Corberand, T., Lemanceau, P., & Mougel, C. (2007) Identification of bacterial groups preferentially associated with mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 913-921.
- Offre, P., Pivato, B., Mazurier, S., Siblot, S., Berta, G., Lemanceau, P., & Mougel, C. (2008) Microdiversity of Burkholderiales associated with mycorrhizal and non-mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *FEMS Microbiology Ecology*, 65, 180-192.
- Oger, P., Petit, A., & Dessaux, Y. (1997) Genetically engineered plants producing opines alter their biological environment. *Nature Biotechnology*, 15, 369-372
- Osono, T. (2014). Diversity and ecology of endophytic and epiphytic fungi of tree leaves in Japan: A Review. In V.C. Verma & A.C. Gange (Eds.), *Advances in Endophytic Research*, pp. 3-26. Springer India, New Delhi.
- Partida-Martínez, L. P., & Heil, M. (2011). The Microbe-Free Plant: Fact or Artifact? *Frontiers in Plant Science*, 2, 100. <http://doi.org/10.3389/fpls.2011.00100>
- Pérez-Jaramillo, J.E., Mendes, R., & Raaijmakers, J.M. (2016). Impact of plant domestication on rhizosphere microbiome assembly and functions. *Plant Molecular Biology*, 90, 635-644.
- Philippot, L. & Hallin, S. (2011). Towards food, feed and energy crops mitigating climate change. *Trends in Plant Science*, 16, 476-480.
- Philippot, L., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P., & van der Putten W. H. (2013). Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*, 11:789-799.
- Pivato, B., Mazurier, S., Lemanceau, P., Siblot, S., Berta, G., Mougel, C., & van Tuinen, D. (2007) *Medicago* species affect the community composition of arbuscular mycorrhizal fungi associated with roots. *New Phytologist*, 176, 197-210.
- Pivato, B., Offre, P., Marchelli, S., Barbonaglia, B., Mougel, C., Lemanceau, P., & Berta, G. (2009). Bacterial effects on arbuscular mycorrhizal fungi and mycorrhiza development as influenced by the bacteria, fungi, and host plant. *Mycorrhiza*, 19, 81-90.
- Platt, T.G., Morton, E.R., Barton, I.S., Bever, J.D., & Fuqua, C. (2014). Ecological dynamics and complex interactions of *Agrobacterium* megaplasmids. *Frontiers in Plant Sciences*, 14, 635. doi: 10.3389/fpls.2014.00635
- Quesada-Moraga, E., López-Díaz, C. & Landa, B. B. (2014). The hidden habit of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: first demonstration of vertical plant transmission. *PLoS ONE*, 9(2), e89278.
- Raaijmakers, J. M., Weller, D. M., & Thomashow, L. S. (1997). Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 881-887.
- Raaijmakers, J. M., & Weller, D. M. (1998). Natural plant protection by 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* spp. in take-all decline soils. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11, 144-152.
- Raaijmakers, J. M., & Weller, D. M. (2001). Exploiting genotypic diversity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* spp.: characterization of superior root-colonizing *P. fluorescens* strain Q8r1-96. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 2545-2554.
- Ranjard, L., Dequiedt, S., Chemidlin Prévost-Bouré, N., Thioulouse, J., Saby, N. P. A., Lelievre, M., Maron, P. A., Morin, F. E. R., Bispo, A., Jolivet, C., Arrouays, D., & Lemanceau P. (2013). Turnover of soil bacterial diversity driven by wide-scale environmental heterogeneity. *Nature Communications*, 4, 1434.
- Redecker, D., Kodner, R., & Graham, L. E. (2000). Glomalean fungi from the Ordovician. *Science*, 289, 1920-1921.
- Redford, A. J., Bowers, R. M., Knight, R., Linhart, Y., & Fierer, N. (2010). The ecology of the phyllosphere: geographic and phylogenetic variability in the distribution of bacteria on tree leaves. *Environmental Microbiology*, 12, 2885-2893.
- Reisberg, E. E., Hildebrandt, U., Riederer, M., & Hentschel, U. (2012). Phyllosphere bacterial communities of trichome-bearing and trichomeless *Arabidopsis thaliana* leaves. *Antonie Van Leeuwenhoek* 101, 551-560.
- Reisberg, E. E., Hildebrandt, U., Riederer, M., & Hentschel, U. (2013). Distinct phyllosphere bacterial communities on *Arabidopsis* wax mutant leaves. *PLoS One*, 8, e78613. doi:10.1371/journal.pone.0078613
- Robin, A., Mazurier, S., Mougel, C., Vansuyt, G., Corberand, T., Meyer, J.-M., & Lemanceau, P. (2007). Diversity of root-associated fluorescent pseudomonads as affected by ferritin over-expression in tobacco. *Environmental Microbiology*, 9,1724-1737.
- Robin, A., Mougel, C., Siblot, S., Vansuyt, G., Mazurier, S., & Lemanceau, P. (2006). Effect of ferritin over-expression in tobacco on the structure of bacterial and pseudomonad communities associated with the roots. *FEMS Microbiology Ecology*, 58, 492-502.

- Robin, A., Vansuyt, G., Hinsinger, P., Meyer, J.-M., Briat, J.-F., & Lemanceau, P. (2008). Iron dynamics in the rhizosphere: consequences for plant health and nutrition. *Advances in Agronomy*, 99, 183-225.
- Roberts, D. P., Dery, P. D., Yucel, I., & Buyer, J. S. (2000). Importance of *pfkA* for rapid growth of *Enterobacter cloacae* during colonization of crop seeds. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 87-91.
- Rodriguez, R. J., White, J. F., Arnold, A. E., & Redman, R. S. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, 182, 314-30.
- Rudrappa, T., Czymmek, K. J., Paré, P.W., & Bais, H. P. (2008). Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. *Plant Physiology*, 148, 1547-1556.
- Ryan, P. R., Dessaux, Y., Thomashow, L. S., & Weller, D. M. (2009) Rhizosphere engineering and management for sustainable agriculture. *Plant and Soil*, 321, 363-383.
- Sapkota, R., Knorr, K., Jørgensen, L. N., O'Hanlon, K. A., & Nicolaisen, M. (2015). Host genotype is an important determinant of the cereal phyllosphere mycobiome. *New Phytologist*, 207, 1134-1144.
- Savka, M. A., Dessaux, Y., Oger, P., & Rossbach, S. (2002). Engineering bacterial competitiveness and persistence in the phytosphere. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15, 866-874.
- Scarafoni, A., Ronchi, A., Prinsi, B., Espen, L., Assante, G., Venturini, G., & Duranti, M. (2013). The proteome of exudates from germinating *Lupinus albus* seeds is secreted through a selective dual-step process and contains proteins involved in plant defence. *Febs Journal*, 280, 1443-1459.
- Schiltz, S., Gaillard, I., Pawlicki-Jullian, N., Thiombiano, B., Mesnard, F., & Gontier, E. (2015). A review: what is the spermosphere and how can it be studied? *Journal of Applied Microbiology*, 119, 1467-1481.
- Schreiber, L., Krimm, U., Knoll, D., Sayed, M., Auling, G., & Kroppenstedt, R. M. (2005). Plant-microbe interactions: Identification of epiphytic bacteria and their ability to alter leaf surface permeability. *New Phytologist*, 166, 589-594.
- Shi, S., Richardson, A. E., O'Callaghan, M., DeAngelis, K. M., Jones, E. E., Stewart, A., Firestone, M. K., & Condon, L. M. (2011). Effects of selected root exudate components on soil bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 77, 600-610.
- Singh, D., & Mathur, S. B. (2004). Location of fungal hyphae in seeds. In "Histopathology of Seed-Borne Infections". (D. Singh and S. B. Mathur, eds.), pp. 101-168. CRC Press, Boca Raton, FL., USA.
- Skiba, M. W., George, T. S., Baggs, E. M., & Daniell, T. J. (2011). Plant influence on nitrification. *Biochemical Society Transactions*, 39, 851-856.
- Smith K. P., Handelsman, J., & Goodman, R. M. (1999). Genetic basis in plants for interactions with disease-suppressive bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 96, 4786-4790.
- Smith, S. E., & Read, D. (2008). "Mycorrhizal Symbiosis" (Third edition). Academic Press. New York.
- Subbarao, G.V., Kishii, M., Nakahara, K., Ishikawa, T., Ban, T., Tsujimoto, H., George, T. S., Berry, W.L., Hash, C.T., & Ito, O. (2009). Biological nitrification inhibition (BNI)—is there potential for genetic interventions in the *Triticeae*? *Breeding Science*, 59, 529-545.
- Subbarao, G. V., Sahrawat, K. L., Nakahara, K., Rao, I. M., Ishitani, M., Hash C. T., Kishii, M., Bonnett, D. G., Berry, W. L., & Lata, J. C. (2012). A paradigm shift towards low-nitrifying production systems: the role of biological nitrification inhibition (BNI). *Annals of Botany*, 112, 297-316.
- Subramoni, S., Nathoo, N., Klimov, E., & Yuan, Z.-C. (2014). *Agrobacterium tumefaciens* responses to plant-derived signaling molecules. *Frontiers in Plant Science*, 5, 322. <http://doi.org/10.3389/fpls.2014.00322>
- Terras, F. R. G., Eggermont, K., Kovaleva, V., Raikhel, N. V., Osborn, R. W., Kester, A. et al. (1995). Small cysteine-rich antifungal proteins from radish - their role in host-defense. *Plant Cell*, 7, 573-588.
- Theis, K. R., Dheilly, N. M., Klassen, J. L., Brucker, R. M., Baines, J. F., Bosch, T. C. G., Cryan, J.F., Gilbert, S. F., Goodnight, C. J., Lloyd, E. A., Sapp, J., Vandenkoornhuys, P., Zilber-Rosenberg, I., Rosenberg, E., & Bordenstein, S. R. (2016). Getting the hologenome concept right: an eco-evolutionary framework for hosts and their microbiomes. *MSystems* 1: e00028-16
- Tian, Y., Zhao, Y., Wu, X., Liu, F., Hu, B., & Walcott, R. R. (2015). The type VI protein secretion system contributes to biofilm formation and seed-to-seedling transmission of *Acidovorax citrulli* on melon. *Molecular Plant Pathology*, 16, 38-47.
- Truyens, S., Weyens, N., Cuypers, A., & Vangronsveld, J. (2015). Bacterial seed endophytes: genera, vertical transmission and interaction with plants. *Environmental Microbiology Reports*, 7, 40-50.
- Uren N.C. (2001). Types, amounts and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil-grown plants. In 'The rhizosphere. Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface' (R. Pinton, Z. Varanini and P. Nannipieri P., eds.), pp. 19-40. Marcel Dekker, New York, USA.
- Vacher, C., Hampe, A., Porté, A. J., Sauer, U., Compant, S., & Morris, C. E. (2016). The phyllosphere: microbial jungle at the plant-climate interface. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, 47, 1-24.
- van Dam, N. M., & Bouwmeester, H. J. (2016). Metabolomics in the rhizosphere: tapping into belowground chemical communication. *Trends in Plant Science*, 21, 256-265.
- Vandenkoornhuys, P., Quaiser, A., Duhamel, M., Le Van, A., & Dufresne, A. (2015). The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytologist*, 206, 1196-1206.
- Verona, O. (1958). La spermosphère. *Annales de l'Institut Pasteur*, 95, 795-798.

- Viollet, A., Corberand, T., Mougél, C., Robin, A., Lemanceau, P. & Mazurier, S. (2011). Fluorescent pseudomonads harboring type III secretion genes are enriched in the mycorrhizosphere of *Medicago truncatula*. *FEMS Microbiology Ecology*, 75, 457-467.
- Viollet, A., Pivato, B., Mougél, C., Cleyet-Marel, J.-C., Gubry-Rangin, C., Lemanceau, P. & Mazurier, S. (2016). *Pseudomonas fluorescens* C7R12 type III secretion system impacts mycorrhization of *Medicago truncatula* and associated microbial communities. *Mycorrhiza*, on line, doi:10.1007/s00572-016-0730-3.
- Vogel, C., Bodenhausen, N., Gruissem, W., Vorholt, J. A. (2016). The Arabidopsis leaf transcriptome reveals distinct but also overlapping responses to colonization by phyllosphere commensals and pathogen infection with impact on plant health. *New Phytologist*, online. Vokou, D., Vareli, K., Zarali, E., Karamanoli, K., Constantinidou, H.-I. A., Monokrousos, N., Halley, J. M., & Sainis, I. (2012). Exploring biodiversity in the bacterial community of the Mediterranean phyllosphere and its relationship with airborne bacteria, *Microbial Ecology*, 64, 714–724.
- Vorholt, J. A. (2012). Microbial life in the phyllosphere. *Nature Reviews Microbiology*, 10, 828–40. doi:10.1038/nrmicro2910
- Whipps, J. M., Hand, P., Pink, D. & Bending, G. D. (2008). Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype, *Journal of Applied Microbiology*, 105, 1744–1755.
- Wilson, H. E., Carroll, G.C., Roy, B.A., & Blaisdell G.K. (2014). Tall fescue is a potential spillover reservoir host for *Alternaria* species, *Mycologia*, 106, 22–31.
- Wintermans, P. C. A., Bakker, P. A. H. M., & Pieterse, C. M. J. (2016). Natural genetic variation in Arabidopsis for responsiveness to plant growth-promoting rhizobacteria. *Plant Molecular Biology*, 90, 623–634.
- Wissuwa, M., Mazzola, M., & Picard, C. (2009). Novel approaches in plant breeding for rhizosphere-related traits. *Plant and Soil*, 321, 409–430.
- Yadav, R. K. P., Karamanoli, K. & Vokou D. (2005). Bacterial colonization of the phyllosphere of mediterranean perennial species as influenced by leaf structural and chemical Features. *Microb. Ecol.*, 50(2), 185–196.
- Yang, C.H., & Crowley, D.E. (2000). Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 345–351.
- Zancarini, A., Mougél, C., Terrat, S., Salon, C., & Munier-Jolain, N. (2013). Combining ecophysiological and microbial ecological approaches to study the relationship between *Medicago truncatula* genotypes and their associated rhizosphere bacterial communities. *Plant and Soil*, 365, 183-199.
- Zilber-Rosenberg, I., & Rosenberg, E. (2008). Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiology Reviews*, 32, 723–35.
- Zhang, N., Wang, D., Liu, Y., Li, S., Shen, Q., & Zhang, R. (2014). Effects of different plant root exudates and their organic acid components on chemotaxis, biofilm formation and colonization by beneficial rhizosphere-associated bacterial strains. *Plant and Soil*, 374, 689-700.
- Zheng, X. Y., & Sinclair, J. B. (1996). Chemotactic response of *Bacillus megaterium* strain B153-2-2 to soybean root and seed exudates. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 48, 21-35.

Figure 1. Schematic diagram representing the sources of microorganisms associated with the different plant compartments (spermosphere, rhizosphere and phyllosphere) and the continuum between them. Microorganisms in the spermosphere are recruited from flowers fruits and seeds (1) through internal, floral or external pathway (adapted from Maude, 1996), and from soilborne communities (2) via trophic and signal communication; microorganisms in the rhizosphere are recruited from the spermosphere (3), and from soilborne communities via trophic and signal communication (4); microorganisms of the phyllosphere originate from the seed and rhizosphere (3, 5), but mostly from airborne communities upon their ability to adhesion to the plant surface and to resist to biotic and abiotic stresses (6).



J'aime les citations. Quand elles sont réussies, elles peuvent en dire bien plus qu'un livre : chacune devient une philosophie ou un monde en soi. Souvent, elles en disent très long sur la vanité des choses et des gens.

Franz-Olivier Giesbert
Dictionnaire d'anti-citations

Effet du paysage sur la structure des communautés fongiques foliaires.

Résumé : Les feuilles hébergent une grande diversité de micro-organismes. Parmi les facteurs responsables de la structuration des communautés microbiennes foliaires, l'effet du processus de dispersion reste peu étudié. Les structures paysagères telles que les lisières ou l'hétérogénéité du paysage influencent la migration et la dispersion de nombreuses espèces de macro-organismes, mais l'effet de tels facteurs sur la composition des communautés microbiennes foliaires n'a jamais été testé.

Nous faisons l'hypothèse que les parcelles forestières sont une source de champignons foliaires pour les vignes adjacentes. Nous avons comparé les communautés fongique foliaires et aériennes de la vigne et des forêts adjacentes au cours d'une saison de végétation, testé l'effet d'une lisière forestière sur ces communautés et évalué l'effet de la composition du paysage sur ces communautés. Les communautés fongiques ont été caractérisées par métabarcoding.

Les communautés fongiques foliaires viticoles et forestières divergent au cours de la saison. Ni la distance à la lisière, ni la proportion de forêt dans le paysage n'affectent les communautés foliaires de la vigne, mais les communautés aériennes diffèrent en fonction de la distance à la lisière forestière. Ces résultats suggèrent que la dispersion ne joue qu'un rôle mineur dans la structure des communautés fongiques foliaires. De nombreuses pressions de sélection telles que les pratiques agricoles semblent en revanche avoir un effet fort sur ces communautés. Des études supplémentaires sont nécessaires pour vérifier la contribution relative de ces pressions de sélection, ainsi que le potentiel service de régulation fourni aux cultures par la forêt.

Mots clés : Bioaérosols, Dispersion, Écologie microbienne, Lisières, Métabarcoding, Mosaïque paysagère, Phyllosphère, Sélection.

Effect of the landscape on foliar fungal community structure.

Abstract: Plant leaves host a large diversity of microorganisms. Among the factors shaping foliar microbial community structure, the effect of the dispersal process remain understudied. Landscape elements, such as edges or landscape heterogeneity, influence migration and dispersal of many macro-organism species. However, the effect of such factors on foliar microbial communities has never been studied.

We hypothesized that forests are a source of foliar fungi for adjacent vineyards. We compared foliar and airborne fungal communities in vineyard and adjacent forests along a vegetative season, we examined the effect of a forest edge on these communities in a vineyard, and we assessed the effect of landscape composition on these communities. Fungal communities were characterized with a metabarcoding method.

Foliar fungal communities in vineyards and forests diverge over the course of the vegetative season. Neither the distance to the edge nor the proportion of forest in the landscape affect foliar fungal communities in vineyards, while airborne communities change with the distance to the forest edge. These results suggest that dispersal is not dominant in shaping foliar fungal communities. Instead, many selective pressures such as agricultural practices seem to shape strongly these communities. Further investigations are required in order to estimate the relative contribution of those processes, and the potential ecosystem service provided by the forest to crops.

Keywords: Bioaerosols, Dispersal, Edges, Landscape mosaic, Metabarcoding, Microbial ecology, Phyllosphere, Selection

UMR 1202 BioGeCo

INRA - Campus Forêt-Bois de Cestas-Pierroton, 69 route d'Arcachon, 33610 Cestas, France