Rôle écologique de la sporulation in-planta dans les symbioses actinorhiziennes : cas de la symbiose Alnus - Frankia

Guillaume Schwob

▶ **To cite this version:**

Guillaume Schwob. Rôle écologique de la sporulation in-planta dans les symbioses actinorhiziennes : cas de la symbiose Alnus - Frankia. Ecologie, Environnement. Université de Lyon, 2018. Français. NNT : 2018LYSE1037 . tel-01858126

HAL Id: tel-01858126

https://theses.hal.science/tel-01858126

Submitted on 20 Aug 2018

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.

N° d'ordre NNT : 2018LYSE1037

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N°341
Ecosystèmes Evolution Modélisation Microbiologie (E2M2)

Spécialité de doctorat : Micro-organismes, interaction, infection

Soutenue publiquement le 19/03/2018, par :
Guillaume Pierre Julien Schwob

Rôle écologique de la sporulation *in-planta* dans les symbioses actinorhiziennes : Cas de la symbiose *Alnus* - *Frankia*

Devant le jury composé de :

UROZ Stéphane	Directeur de Recherche, Université de Lorraine	Rapporteur
LATA Jean-Christophe	Maître de Conférences, Sorbonne Université	Rapporteur
CLEMENT Jean-Christophe	Professeur des Universités, Université de Savoie	Examinateur
PIOLA Florence	Maître de Conférences, Université de Lyon	Examinatrice
BROCHIER-ARMANET Céline	Professeure des Universités, Université de Lyon	Examinatrice
FERNANDEZ Maria	Professeure des Universités, Université de Lyon	Directrice
HERRERA-BELAROUSSI Aude	Maître de Conférences, Université de Lyon	Co-directrice

Over every mountain there is a path, although it may not be seen from the valley.

Sur chaque montagne il y a un chemin, bien qu'il ne soit pas toujours visible depuis la vallée.

- Theodore Roethke -

LISTE DES COMPOSANTES

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université	**M. le Professeur Frédéric FLEURY**
Président du Conseil Académique	M. le Professeur Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur Didier REVEL
Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire	M. le Professeur Philippe CHEVALIER
Vice-président de la Commission Recherche	M. Fabrice VALLÉE
Directrice Générale des Services	Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur G.RODE
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON
Faculté d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. X. PERROT
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. F. DE MARCHI
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme C. FELIX
Département GEP	Directeur : M. Hassan HAMMOURI
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Directeur : M. le Professeur J-C PLENET
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. Y.VANPOULLE
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon	Directeur : M. B. GUIDERDONI
Polytech Lyon	Directeur : M. le Professeur E.PERRIN
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. le Professeur C. VITON
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education	Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. N. LEBOISNE

REMERCIEMENTS

On dit que la thèse est avant tout une aventure humaine, celle-ci n'y fait pas exception. Ces trois années de doctorat furent le terreau dans lequel se sont développées de nombreuses expériences humaines. Je souhaiterai exprimer, à travers les lignes qui vont suivre, ma gratitude aux personnes qui en ont été les germes.

Je tiens tout d'abord à remercier Maria Fernandez et Aude Herrera-Belaroussi qui furent pendant ces trois années des directrices de thèse attentives, disponibles et bienveillantes. Vous m'avez énormément appris tant en science que sur l'encadrement, la rédaction, la gestion des relations humaines (c'est le moins qu'on puisse dire). Maria, merci de m'avoir transmis ta fibre pour l'écologie et le terrain. Les (nombreux) échantillonnages dans les montagnes ne sont pas pour rien dans la fascination que j'ai désormais pour ces milieux. J'espère avoir été à la hauteur pour ta dernière aventure d'encadrement de thèse. Aude, merci pour ton écoute et tes encouragements constants, tu as su de nombreuses fois trouver les mots pour gérer mon énergie. Un petit bonheur a fait que tu découvriras la majorité de ce manuscrit après avoir lu ces remerciements, j'espère qu'il te plaira.

Je souhaiterais ensuite adresser mes plus vifs remerciements à chacun des membres de mon jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à l'évaluation de ces travaux de thèse. Merci à MM. Jean-Christophe Lata et Stéphane Uroz d'avoir accepté de relire ce manuscrit et d'en être les rapporteurs. Merci à M. Jean-Christophe Clément, et Mmes Florence Piola et Céline Brochier-Armanet, examinateurs de cette thèse.

J'aimerais remercier l'ensemble de l'équipe 1, Philippe, Pierre (ma bonne fée), Pascale, Nicole, Hasna, pour leur aide, leur disponibilité et leur bonne humeur, ainsi que les deux anciens doctorants de l'équipe, Adrien et Laëtitia, pour m'avoir encadré à mes débuts dans cette thématique de recherche en fin de licence, ainsi que pour leurs nombreux conseils techniques et pour toutes les agréables discussions que nous avons pu avoir ensemble.

Un merci tout particulier à mon copain Guyonnette (Julien de son prénom), qui a veillé à ma santé mentale sur cette fin de thèse. Je ne peux écrire ici tout ce qui fait la richesse de notre amitié. Qu'importe ce que l'avenir nous réserve à tous les deux, quelque chose me dit que des éclats de rire ne seront jamais très loin.

Il me serait impensable de ne pas adresser un merci tout particulier à mes deux amies et collègues, Solène et Aurélie M., pour leur soutien morale et leur bienveillance. Parfois le cœur a besoin de plus de temps pour accepter ce que l'esprit sait déjà. Grâce à vous, ce lapse de temps a été plus doux à vivre.

Je remercie à chacun des membres de la plateforme café pour ces nombreux moments de convivialité, de débat et de franche rigolade qu'on a partagé et qui ont ponctué matinées, pauses déjeuner et après-midis parfois aussi. Me retrouver avec vous autour d'un bon café a toujours eu quelque chose d'apaisant et de réconfortant, particulièrement dans la tourmente de la fin de thèse. Merci à Alessandro, pour m'avoir appris à faire les « pitits montanes » de café, Amélie pour nos échanges très souvent gastronomiques, Thomas et Xavier pour leurs humours et leurs conseils tout au long de cette thèse, et mon copain Jonathan qui j'espère aura finalement compris que le Bourgogne est au-dessus du Côte du Rhône.

Merci aux deux dames de la plateforme PGE, Charlène et Charline pour leur bonne humeur et leur soutien technique, à Elise pour avoir cajoler mes aulnes pendant toutes ces années, à Florence, Pascale, Erik, Anne-Emmanuelle, pour leur aide dans les nombreuses sorties terrain qui ont ponctué cette thèse et à Anne-Marie Domenach pour son expertise sur le 15N.

Un immense merci aux stagiaires que j'ai eu la chance d'encadrer pendant ces années au laboratoire, et sans qui ce travail n'aurait pu être mené à bien. Florian, Guillaume, Lucile, Claire, Julien, Camil et Samuel, L'investissement et l'implication de chacun d'entre vous ont été précieux dans l'avancée de ces travaux de thèse. J'ai pris beaucoup de plaisir à travailler avec vous et je vous souhaite le meilleur dans la suite de vos parcours respectifs.

Mes remerciements vont aussi aux étudiants du laboratoire, de ma promotion et des précédentes, qui ont été, Marie, Yoann S., Antoine, Jordan, Sébastien, Guillaume, Florian, Benjamin, Elodie, Slim, Camille, Quentin, ou sont encore dans l'aventure, Isaline, Thibault, Rosa, Laura, Lise, Yoann B.M., Marine, Samuel B., Jordan, Solène, William, pour tous les moments que nous avons pu partager et pour faire de ce laboratoire un lieu chaleureux et festif.

Merci également à l'ensemble du laboratoire d'Ecologie Microbienne de Lyon. La liste est trop longue, mais que toutes les personnes avec qui j'ai pu interagir depuis mes premiers pas en écologie microbienne se sentent remerciées.

Merci aux ‘’faons musqués’’, compagnons de randonnées réguliers ou ponctuels, du laboratoire ou d’ailleurs (Julien, Aurélie M., Aurélie C., Jordan, Junior, Solène, Bastien et Lise, Florian, Samuel, Louise) avec qui nous avons tombé plusieurs sommets, et échantillonné quelques aulnaies au passage. Ces escapades furent extrêmement ressourçantes et font partie des très beaux souvenirs que je garderai de ces trois années de thèse.

Merci aux copains de l’extérieur, Florian L., Benjamin, Bastien pour nos LANs endiablées, à Marion qui m’a épaulé pendant une partie de cette thèse, à Janelle pour ses encouragements dans la rédaction comme aux ravitos, à mes amis du Kung fu, Pierre, Perrine, Stéphane, Nicolas, Hristina, Fred, Nicolas, Nadia, Thibault, et mes Shifu Daniel et Laëtitia.

Enfin, les mots les plus simples étant les plus fort, je souhaiterais pour clore ce préambule, et non sans une certaine émotion, remercier toute ma famille, mes parents, pour m’avoir toujours soutenu et encouragé dans mon projet d’étude, dans mes choix et dans les périodes les plus basses, sans (trop) tenir rigueur de mes absences ni de mon éloignement. Ce manuscrit vous est dédié.

RESUME

Aujourd'hui encore, l'existence de patrons de distribution chez les micro-organismes est largement débattue. Ils reposeraient sur la capacité des micro-organismes à disperser dans le temps (survie) et dans l'espace (dissémination spatiale), en lien avec des facteurs abiotiques comme les propriétés du sol, le climat, et des interactions biotiques, notamment avec l'hôte dans le cas des symbiontes, mais aussi sur les traits d'histoire de vie propres aux micro-organismes, telle que la capacité à sporuler.

Notre modèle biologique *Frankia* sp. est une actinobactérie sporulante et fixatrice d'azote à la biogéographie complexe, car présentant à la fois la capacité de vivre de façon saprophytique dans le sol, et celle d'établir une symbiose racinaire (nodosité) avec les plantes actinorhiziennes dont les aulnes (*Alnus,* Betulaceae). Deux types de souches de *Frankia* génétiquement différentes ont été décrites dont la distinction phénotypique majeure réside dans la capacité à maintenir (Sp+) ou non (Sp-) leur sporulation *in planta*. Toutes deux forment dans les nodosités des cellules filamenteuses à croissance hyphale et des cellules spécialisées dans la fixation de l'azote atmosphérique (diazovésicules), seule la lignée Sp+ forme des sporanges multiloculaires contenant de très nombreux descendants dormants (spores). Cette sporulation endophytique est à notre connaissance unique dans un contexte symbiotique et son implication dans la biogéographie de *Frankia*, reste peu connue. De précédents travaux ont montré une répartition différente des *Frankia* Sp+ et Sp-, avec d'une part les souches Sp+ retrouvées majoritairement dans les milieux froids associées aux complexes d'espèces *Alnus incana* et *Alnus alnobetula*, et d'autre part les souches Sp- prédominantes en plaine sur l'espèce *Alnus glutinosa*. Cependant, les espèces d'aulne appartenant à des ceintures bioclimatiques différentes, les effets des facteurs hôtes et du climat sont confondants dans la biogéographie des Sp+.

Ces travaux de thèse intègrent à la fois des approches descriptives et expérimentales, sur le terrain et au laboratoire, à travers des analyses de séquences multi-loci (MLSA) et de séquençage haut débit, des mesures d'activités potentielles liées au cycle de l'azote et de l'isotopie ($\delta^{15}N$), afin d'accroître la compréhension du rôle écologique de la sporulation *in planta* de *Frankia.*

Dans un premier temps, nous avons étendu la description de la phylobiogéographie des souches de *Frankia* Sp+ afin de tester la validité du patron de distribution centré sur les milieux froids des zones de haute altitude et de haute latitude. Une phylogénie a été reconstruite à partir des séquences d'un grand nombre de souches de nodosités racinaires provenant des 3 continents de l'hémisphère nord et de 10 espèces d'aulnes différentes. Un intérêt tout particulier a été porté sur les aires géographiques où une plus forte diversité de

Frankia était attendue, dans la zone d'origine de l'aulne (Asie) et ses refuges glaciaires (Corse, Europe Centrale).

Dans un second temps, nous avons étudié l'influence du partenaire végétal dans la distribution observée des *Frankia* Sp+ et l'implication du trait Sp+ dans la capacité d'association à l'hôte. Des croisements expérimentaux ont été réalisés au laboratoire afin de découpler les effets de l'espèce-hôte et du climat, et tester les implications du trait Sp+ en termes d'infectivité, compétitivité et spectre d'hôte.

Enfin, nous avons étudié les conséquences écosystémiques du complexe symbiotique *Alnus*/*Frankia*, au niveau de la diversité microbienne et du fonctionnement du cycle de l'azote, en fonction du phénotype de sporulation des souches associées, et au fur et à mesure de son expansion dans les milieux sub-/alpins. Des analyses pédologiques, en association avec des mesures de nitrification, dénitrification et fixation d'azote, ainsi que des analyses de diversité microbienne (globale et fonctionnelle), ont été réalisées dans différentes aulnaies Sp+, Sp- ou mixte, à différents stades de colonisation de l'aulne.

Dans chacune de ces parties, les champignons ectomycorhiziens de l'aulne ont été considérés afin de comparer les patrons de distribution entre les deux symbiontes et d'évaluer les interactions potentielles avec le génotype Sp+ de *Frankia*.

Les résultats obtenus démontrent une prédominance des souches Sp+ associées aux espèces d'aulne des milieux froids sur les 3 continents de la zone Holarctique, avec une diversité nouvelle dans l'aire d'origine et les zones refuges de l'aulne. L'homogénéité génétique de ces souches est très forte, mais des regroupements espèce-hôte spécifique émergent de la phylogénie. Les croisements effectués révèlent une infectivité et compétitivité plus forte des Sp+ par rapport aux Sp-. De plus, contrairement aux Sp- à spectre d'hôte très large, les Sp+ présentent un spectre limité entraînant des incompatibilités d'association et suggérant une dépendance forte à une espèce-hôte donnée. Pour la première fois les modifications des communautés microbiennes du sol en réponse à l'expansion du complexe symbiotique *Alnus*/*Frankia* ont été démontrées, en lien avec la stimulation du cycle de l'azote dans les milieux sub-/alpins. Les premiers résultats sur l'efficience comparée de la fixation d'azote *in natura* des souches Sp- par rapport aux Sp+ sont présentés. Ils suggèrent une efficience maximale, avec près de 100% de l'azote de l'aulne obtenu par le biais de la fixation, mais aucun patron n'est mis en évidence entre souches Sp+ et Sp- contrairement aux attendus de la littérature, suggérant un effet plus complexe de la saisonnalité, de l'âge de l'arbre et de celui de la nodosité. L'ensemble des résultats obtenus nous permet de mieux appréhender les facteurs guidant la biogéographie de *Frankia* et de discuter de l'évolution de ces patrons de distribution en réponse au réchauffement climatique.

ABSTRACT

Nowadays, the very existence of microbial biogeography is still being debated. It would be based on the ability of microorganisms to disperse across time (survival) and space (spreading), as a function of abiotic factors such as soil properties, climate, and of biotic interactions, in particular with the host in the case of symbionts, but also on life history traits such as the ability to sporulate.

Our biological model *Frankia* sp. is a spore-forming and nitrogen-fixing actinobacterium that has a complex biogeography given its abilities for both saprophytic life and root symbiotic interaction with actinorhizal plants such as alders (*Alnus*, Betulaceae). Two distinct groups of *Frankia* lineages have been described according to a major phenotypic divergence, based on the presence (Sp+) or the absence (Sp-) of spores *in planta*. While these two groups form filamentous active cells with hyphal growth and nitrogen-fixing specialized cells called diazovesicles, only strains from the Sp+ phenotype are able to form multilocular sporangia containing numerous dormant offsprings. To the best of our knowledge, this endophytic sporulation is an original trait in a symbiotic context and very little is known about its incidence in *Frankia* biogeography. Previous works have shown that Sp+ and Sp- strains had different distribution patterns. While Sp+ were predominant in cold environments on *Alnus incana* and *Alnus alnobetula* nodules, Sp- were predominant in lowlands associated with *Alnus glutinosa*. However, given the fact that *Alnus* species belong to different bioclimatic biotopes, the impact of host and climate factors are confounded in the Sp+ strains biogeography.

This work integrates descriptive and experimental approaches on both field and laboratory areas, using multi-locus and high throughput sequence analyses, potential enzyme activities of the nitrogen-cycle and isotopic ($\delta^{15}N$) measurements, in order to improve the understanding of the ecological role of *Frankia in planta* sporulation.

First, we have extended the description of the phylobiogeography of Sp+ *Frankia* strains to validate the previously proposed distribution pattern focused on cold environements at high altitude or high latitude. A phylogeny has been computed using a large number of nodular strains coming from the 3 continents of the Northern Hemisphere and 10 different *Alnus* species. Special attention was paid to geographic areas where a higher diversity was expected, in Asia, the *Alnus* area of origin, and in its glacial refuges (Corsica, Caucasus).

Second, we studied the influence of the host-plant on the distribution of *Fankia* Sp+ and the incidence of Sp+ in the symbiotic interaction. Experimental crosses have been

performed to disentangle host and climate effects and to test the incidence of the Sp+ trait in terms of infectivity, competitiveness and host-range.

Finally, we studied the ecological consequences of the *Alnus*/*Frankia* symbiotic complex, on the microbial diversity and on the nitrogen cycle functionning, with respect to the sporulation of *Frankia* and to the *Alnus* expansion on sub-/alpine grasslands. Soils analyses were performed in association with measures of nitrification and denitrification, as well as global and functional microbial diversity analyses, in Sp+, Sp- or mixed alder stands and at different colonization stages.

In each part of this work, alder ectomycorhizae were analyzed to compare the distribution pattern between the two symbionts and to highlight potential interactions with the Sp+ trait of *Frankia*.

Our results show the dominance of Sp+ strains in nodules of alder species from cold environments over the 3 continents of the Holarctic zone, with original diversity patterns in alder area of origin and in glacial refuges. Even if these strains are genetically homogenous, host-specific clusters were observed in the phylogeny. Crosses revealed that Sp+ strains were more infective and competitive than Sp- strains. Moreover, unlike Sp- strains that harbor a wide host-range, Sp+ strains have a narrower specificity leading to association's incompatibilities and suggesting strong host dependence. For the first time, modifications of microbial communities were revealed in response to the *Alnus*-*Frankia* symbiotic complex colonization and were linked to a stimulation of the nitrogen cycle in the sub-/alpine grasslands. The first comparative results of nitrogen fixation between Sp+ and Sp- strains *in natura* are reported. They suggest a maximal efficiency of fixation, representing almost 100% of the alder nitrogen. However, unlike previous reports in literature, no pattern was observed between Sp+ and Sp- strains, suggesting a complex effect of seasonality, alder age as well as that of nodules. Altogether, the previous results contribute to a better understanding of the *Frankia* biogeography drivers and allow us to discuss the expected evolution of distribution pattern in response to the global warming.

TABLES DES MATIERES

LISTE DES COMPOSANTES 1

REMERCIEMENTS 1

RESUME 5

ABSTRACT 7

TABLES DES MATIERES 9

TABLE DES ILLUSTRATIONS 12

INTRODUCTION GENERALE 15

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE 23

INTRODUCTION 25

1. PARTICULARITES DES ECOSYSTEMES DE MONTAGNE ; FOCUS SUR LE MILIEU SUB-/ALPIN 25

1.1 DEFINITION/REPARTITION/LOCALISATION 25

1.2 GRADIENTS CLIMATIQUES/ABIOTIQUES 26

1.3 GRADIENTS BIOTIQUES 27

1.3.1 DIVERSITE VEGETALE 28

1.3.2 ABONDANCE ET DIVERSITE MICROBIENNE 29

2. LE CYCLE DE L'AZOTE EN MILIEU ALPIN 36

2.1 ENTREES D'AZOTE 37

2.1.1 DEPOSITION 37

2.1.2 MINERALISATION DE L'AZOTE, AMMONIFICATION ET NITRIFICATION 38

2.1.3 PATURAGE 40

2.1.4 FIXATION D'AZOTE 41

2.2 SORTIE D'AZOTE 47

2.2.1 DENITRIFICATION 47

2.2.3 LIXIVIATION 48

3. ECOLOGIE DE LA SYMBIOSE *ALNUS VIRIDIS* ET *FRANKIA* 51

3.1 L'AULNE VERT 51

3.1.1 GENERALITES ET DISTRIBUTION 51

3.1.2 ECOLOGIE D'ALNUS ALNOBETULA 53

3.1.3 SUCCESSION ECOLOGIQUE ET EXPANSION 54

3.1.4 IMPACT SUR LES ECOSYSTEMES DES MILIEUX FROIDS 57
3.2 FRANKIA 62
3.2.1 GENERALITES SUR FRANKIA 62
3.2.2 PHYLOBIOGEOGRAPHIE DES SOUCHES DE FRANKIA INFECTANT L'AULNE 65
3.2.3 DISTINCTIONS DANS L'ECOLOGIE DES FRANKIA SP+ ET SP- INFECTANT L'AULNE 67
3.2.4 VIE DANS LE SOL, PERSISTANCE TEMPORELLE ET DISSEMINATION SPATIALE 69

PARTIE EXPERIMENTALE 71

CHAPITRE I : PHYLOBIOGEOGRAPHIE DES SOUCHES DE FRANKIA SP+ 73

PREAMBULE 74
CHAPITRE I A : LES ESPECES D'AULNE ALPINES ET SUBARCTIQUES ASSOCIEES A DES SOUCHES CLONALES DE *FRANKIA* A TRAVERS LA ZONE HOLARCTIQUE. 79
INTRODUCTION 79
MATERIEL ET METHODES 81
ECHANTILLONNAGE DES NODOSITES 81
DETERMINATION DU PHENOTYPE DE SPORULATION 84
EXTRACTION D'ADN, AMPLIFICATION PAR POLYMERISATION EN CHAINE (PCR) ET SEQUENÇAGE 84
ANALYSE PHYLOGENETIQUE DES SOUCHES DE FRANKIA INFECTANT LES AULNES HOLARCTIQUES 84
ANALYSES STATISTIQUES 85
RESULTATS 85
FREQUENCE DES NODOSITES SP+ SELON LE CONTINENT, L'ESPECE ET LA SOUS-ESPECE DE L'HOTE 85
ANALYSES PHYLOGENETIQUES DES SOUCHES DE FRANKIA INFECTANT LES AULNES HOLARCTIQUES 86
DISCUSSION 88
CHAPITRE I B : PATTERNS OF DIVERSITY, ENDEMISM AND SPECIALIZATION IN THE ROOT SYMBIONT COMMUNITIES OF ALDER SPECIES ON THE ISLAND OF CORSICA 93

CHAPITRE II : ROLE DE L'ESPECE DE LA PLANTE-HOTE 105

105

PRÉAMBULE 106
CHAPITRE II A : *IN-PLANTA* SPORULATION CAPACITY ENHANCES INFECTIVITY AND RHIZOSPHERIC COMPETITIVENESS OF *FRANKIA* STRAINS 109
CHAPITRE II B : INCIDENCE OF *FRANKIA IN-PLANTA* SPORULATION PHENOTYPE ON ALDER-SYMBIONTS INTERACTIONS 117

CHAPITRE III : IMPLICATIONS ECOSYSTEMIQUES DU COMPLEXE SYMBIOTIQUE 155

PRÉAMBULE **157**

CHAPITRE III A : GREEN ALDER (*ALNUS VIRIDIS*) ENCROACHMENT SHAPES MICROBIAL COMMUNITIES IN SUBALPINE SOILS AND IMPACTS ITS BACTERIAL OR FUNGAL SYMBIONTS DIFFERENTLY **163**

CHAPITRE III B : IMPLICATION DU GENOTYPE DE SPORULATION SUR LA FIXATION SYMBIOTIQUE D'AZOTE ET LE FONCTIONNEMENT DES ECOSYSTEMES SUB-/ALPINS **179**

1. INTRODUCTION **179**

2. MATERIEL ET METHODES **180**

3. RESULTATS ET DISCUSSION **186**

3.1 STADE DE L'AULNAIE ET PHENOTYPE DE SPORULATION 186

3.2 IMPACT DU STADE DE COLONISATION SUR LES PROPRIETES DU SOL 188

3.3 DIVERSITE ET ABONDANCE DES COMMUNAUTES 191

3.4 FONCTIONNEMENT DU CYCLE DE L'AZOTE 192

3.5 FIXATION D'AZOTE 194

3.5.1 ACTIVITE DE REDUCTION D'ACETYLENE (ARA) 194

3.5.2 ISOTOPIE NATURELLE ^{15}N 198

4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES **200**

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES **201**

CONCLUSION GENERALE **213**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **215**

ANNEXE **235**

TABLE DES ILLUSTRATIONS

La numérotation des illustrations de la synthèse bibliographie et de la discussion générale est continue, celle des chapitres (avec leurs introductions), articles acceptés ou en cours de soumission sont indépendantes.

Figures

Figure 1	Répartition des zones alpines à l'échelle du globe.	**24**
Figure 2	Principales entrées et sorties d'azote dans les environnements de montagne.	**36**
Figure 3	Répartition mondiale du complexe d'espèce *Alnus viridis*	**52**
Figure 4	Dynamique de l'expansion d'*Alnus viridis* sp. *viridis* sur les pâturages en déprise.	**55**
Figure 5	Effet de l'aulne vert sur la richesse floristique des prairies sub-/alpines.	**58**
Figure 6	Nodosités actinorhiziennes et endosymbiote *Frankia*.	**63**
Figure 7	Représentation schématique des spectres d'hôtes des génotypes Sp+ et Sp- de *Frankia* vis à vis des espèces-hôtes *A. glutinosa, A. incana, A. viridis* (*Alnobetula*).	**202**
Figure I.1	Représentation schématique de la phylogénie des souches de *Frankia* infectant l'aulne (cluster 1).	**75**
Figure I.2	Phylogénie du genre *Alnus* reconstruite par analyse de parsimonie sur les séquences des régions de l'ADN nucléaire ribosomique ITS.	**77**
Figure I.3	Localization of the sampled alder sites around the world.	**82**
Figure I.4	Phylogeny of *Frankia* strains infecting *A. alnobetula*, *A. incana* and *A. matsumurae*, based on *pgk* gene fragment (700 bp) and estimated by maximum likelihood (PhyML).	**87**
Figure II.1	Dispositif expérimental des piégeages croisés en chambre climatique.	**107**
Figure III.1	Schéma conceptuel résumant l'hypothèse de travail de la deuxième partie du chapitre III.	**152**
Figure III.2	Cartographie du plan d'échantillonnage réalisé dans l'aulnaie de Champagny-en-Vanoise.	**154**
Figure III.3	Cartographie du plan d'échantillonnage dans l'aulnaie de la Madeleine.	**176**
Figure III.4	Cartographie du plan d'échantillonnage d'été 2017 sur le site du Lautaret I.	**177**

Figure III.5 Cartographie globale du phénotype de sporulation des nodosités des aulnes du site I du Lautaret. **182**

Figure III.6 Analyse en composantes principales interclasse réalisée sur les données de pédologie des 4 sites d'étude (Mad, Lau 1, Lau 2 et Cf). **184**

Figure III.7 Teneurs en ions ammonium NH_4^+ (A) et ions nitrate NO_3^- (B) dans le sol en fonction du stade écologique de colonisation de l'aulne. **187**

Figure III.8 Activités potentielles de nitrification dans le sol en fonction du stade de colonisation du stade écologique de colonisation de l'aulne (A) et du stade de développement de l'aulnaie (B). **188**

Figure III.9 Mesure des activités de réduction d'acétylène (ARA) en fonction du site et de la saison (A), des sites échantillonnés en automne 2016 et leurs fréquences Sp+ (valeur entre parenthèses) (B), des zones d'échantillonnage d'été 2017 au Lautaret 2 (C). **190**

Figure III.10 Valeurs de δ15N des feuilles prélevées sur du Lautaret 2, en fonction de leurs pourcentages en azote total. **193**

Tableaux

Table I.1 List of sampled alder stands. **83**

Table I.2 Frequencies of spore-positive (Sp+) phenotype according to *Alnus* species (A) and the continent sampled **86**

Table III.1 Récapitulatif des sites et stades de successions écologiques échantillonnés. **176**

Table III.2 Caractéristiques pédologiques des sols. **183**

Table III.3 Quantification dans le sol des gènes *amoA* archéen et bactérien d'oxydation de l'ammonium (AOA et AOB) et des gènes bactériens *nirK* et *nirS* de réduction des nitrites. **185**

INTRODUCTION GENERALE

Les montagnes représentent 25% des surfaces terrestres du globe (Kapos *et al.*, 2000) et abritent un quart de la population mondiale (Meybeck *et al.*, 2001). Ces milieux sont d'une richesse considérable en termes de ressources premières, que les populations locales exploitent notamment pour l'eau, le bois, le minerai, aujourd'hui encore dans le cadre de systèmes de production vivriers et auto-subsistants. Les montagnes représentent également une ressource socio-culturelle importante avec de nombreux terroirs, résultante de l'exploitation de ces territoires sur de longues périodes et la transmission de traits culturels, savoirs et pratiques associés. Les ressources exploitées se sont ainsi diversifiées avec l'évolution des sociétés, passant de ressources minières, nourricières, énergétiques à des ressources patrimoniales, touristiques, sociales et culturelles (Antoine *et al.*, 2011). Les ressources de la montagne feraient ainsi vivre de façon indirecte plus de la moitié de la population mondiale (Beniston, 2006). Depuis la Conférence des Nations Unies sur l'Environnement et le Développement de 1992 (CNUED, Rio de Janeiro), les montagnes sont reconnues comme « des entrepôts de diversité biologique et le foyer d'espèces menacées », et la grande majorité subit des dégradations environnementales importantes (Beniston, 2003).

Les milieux de montagne et la diversité qu'ils abritent sont particulièrement sensibles aux changements climatiques (Grabherr *et al.*, 1995; Theurillat and Guisan, 2001). En réponse à la remontée progressive des ceintures bioclimatiques, une migration des espèces végétales vers le sommet des montagnes est prédite, estimée à un maximum de 4 mètres tous les 10 ans (Pauli *et al.*, 1996). Cette migration pourrait représenter, sous l'hypothèse d'une augmentation de température de 3°C d'ici 2100 (GIEC, 2013), entre 400 à 600 mètres d'élévation (Grabherr *et al.*, 1995). Un des effets les plus marquants et des plus étudiés du réchauffement sur la végétation de montagne est la remontée de la limite des derniers arbres (appelée « treeline ») (Nicolussi *et al.*, 2005; Gehrig-Fasel *et al.*, 2007; Díaz-Varela *et al.*, 2010), avec un record observé de 28 mètres sur une pente des Alpes autrichiennes sur la période de 1954 à 2006 (Wallentin *et al.*, 2008). Les habitats alpins et nivaux se retrouveraient alors à longs termes très réduits entraînant la disparition des espèces spécifiques de ces étages, notamment la flore emblématique des sommets qui représente 4% de la diversité végétale mondiale (Körner, 2003). Une augmentation significative de la richesse spécifique a déjà été observée sur près d'une vingtaine de sommets, du fait de ce phénomène de glissement de la diversité des étages de plus faible altitude. Une fois le sommet atteint, et ne pouvant migrer plus en amont pour trouver les conditions climatiques favorables, ces espèces seraient amenées à disparaître *in fine*. En outre, la plupart des espèces végétales de ces milieux n'ayant pas une vitesse de migration suffisamment rapide pour suivre le déplacement des ceintures bioclimatiques, elles disparaîtraient avant d'avoir atteint l'altitude correspondant à leur biotope (Grabherr *et al.*, 1995). Cette perte pourrait

représenter 60% des espèces végétales d'ici 2080 (Thuiller *et al.*, 2005). La biodiversité des écosystèmes de montagne est également menacée par les activités humaines, notamment le tourisme et les loisirs, ainsi que les activités agro-pastorales. Les activités de tourisme de masse comme les sports d'hiver entraînent le déboisement et l'érosion des sols. Les effets indirects (construction d'hôtels, de résidences secondaires, de routes) modifient le paysage et intensifient le recul des zones de forêts (Hinterstoisser, 1987). Les pratiques agro-pastorales, qui apparurent au début de l'époque romaine dans les Alpes, et qui se renforcèrent jusqu'au milieu du XXème siècle, furent la cause d'un déboisement intense des peuplements ligneux mixtes (*e.g.* bouleaux, sorbiers et érables) afin de permettre le pâturage du bétail dans les prairies, entraînant une perte conséquente de diversité d'essences dans ces régions (David, 2010). Cependant, depuis les dernières décennies, les changements socio-économiques ont conduit à la disparition des exploitations de petites tailles et difficiles d'accès en montagne (Bühlmann *et al.*, 2014), au profit de l'intensification de la production sur les terres plus faciles d'accès en plaine (Fischer *et al.*, 2008). Dans les Alpes Suisses, 43% des exploitations ont disparu entre 1985 et 2009 (Bühlmann *et al.*, 2014). Cette déprise agro-pastorale se traduit par l'abandon de nombreuses prairies sub-/alpines autrefois pâturées.

Dans ce contexte de réchauffement climatique et de déprise agro-pastorale, des espèces végétales arbustives prennent possession des nouvelles aires de vie maintenant accessibles en raison des températures plus favorables, un recul des neiges éternelles et/ou de la disparition de la pression de pâturage (Myers-Smith *et al.*, 2011). Notre modèle d'étude, l'aulne, et plus particulièrement l'espèce *Alnus alnobetula* ssp. *alnobetula* (Ehrh.) K. Koch (ou aulne vert), est un arbuste emblématique des montagnes de l'hémisphère nord. Autrefois utilisé pour la fumaison ou comme bois de chauffage, il connaît depuis la deuxième moitié du XXème siècle une expansion massive à travers les Alpes, et dans d'autres régions froides du globe (toundras de Sibérie ou d'Alaska). Grâce à sa reproduction végétative et son statut d'hôte symbiotique, l'aulne vert concurrence et exclue les autres essences végétales lors de la recolonisation des sols, au statut généralement oligotrophique. L'aulne possède en effet la particularité de former une symbiose multipartite, avec des champignons ectomycorrhiziens et endomycorrhiziens d'une part, lui assurant sa nutrition hydrique et minérale (en particulier phosphatée), et l'actinobactérie fixatrice d'azote *Frankia* d'autre part, lui fournissant de grandes quantités d'azote assimilable. Grâce à ses associations, l'aulne est une plante dite pionnière capable de coloniser des terres dégradées ou qui présentent une faible fertilité, biodiversité et productivité, souvent déficientes en azote (N) et en phosphate (P) (Mejstrik and Benecke, 1969; Diagne *et al.*, 2013). La litière de l'aulne très riche en azote (rapport carbone/azote proche de celui du terreau) et résultant de la sénescence des feuilles à l'automne, permet la régénération d'un sol, ou sa création dans

certains contextes écologiques qui en sont dénués (*e.g.* néosol des moraines glacières). L'aulne est ainsi l'acteur initial de la succession écologique dans ces écosystèmes (*i.e.* succession primaire) et permet l'installation d'autres espèces végétales par la suite (*i.e.* succession secondaire). Par ailleurs, cette entrée massive d'azote a été décrite comme la cause de profondes modifications structurelles et fonctionnelles dans les écosystèmes froids (Anthelme, 2001; Hiltbrunner *et al.*, 2014), notamment au niveau des processus du cycle de l'azote tels que la minéralisation, la nitrification et la dénitrification, en lien encore hypothétique avec l'adaptation des communautés microbiennes responsables de ces activités dans les sols. Au début de ces travaux de thèse, aucune étude ne faisait en effet état de modification de la composition et de la structure des communautés microbiennes en réponse à l'installation de l'aulne.

Les zones de montagne en plus d'être des « points chauds » de diversité, sont également connues pour présenter un nombre important d'espèces endémiques (Körner, 2003), c'est-à-dire uniques et spécifiques à ces habitats. Alors que l'endémicité des animaux et des plantes est bien documentée dans ces zones de haute altitude, on ignore encore dans quelle mesure les communautés microbiennes du sol, et notamment les symbiontes bactériens et fongiques des plantes, suivraient le même patron. Les champignons ectomycorhiziens et les souches de *Frankia* associées à l'aulne ont été décrites comme particulièrement spécifiques du genre *Alnus*, avec à notre connaissance très peu d'exceptions observées *in natura* ou *in vitro* dans les spectres d'hôtes. En effet, les dits spécialistes de l'aulne sont très peu diverses et représentent 2/3 des cortèges associées aux racines d'aulne (Roy *et al.*, 2013b), tandis que les souches de *Frankia* infectant l'aulne constituent une lignée monophylétique avec certaines souches qui présenteraient des spectres d'hôtes restreints à l'échelle de l'espèce d'aulne (Kurdali *et al.*, 1988). Nonobstant la remarquable spécificité de cette symbiose tripartite, peu de travaux ont porté conjointement sur les deux symbiotes microbiens dans le cadre d'études de biogéographie, de diversité ou de spécificité à l'hôte. L'écologie des symbiotes microbiens, en plus d'être liée à celle de leur hôte, repose également sur des traits d'histoire de vie spécifiques leur permettant d'assurer leur survie et leur dispersion en dehors de l'hôte, dans l'environnement du sol.

La capacité d'un organisme à survivre peut être définie comme sa capacité à disperser à travers le temps et l'espace son patrimoine génétique dans un contexte environnemental fluctuant. La reproduction a-/sexuée constitue ainsi une étape cruciale de la vie d'un organisme en lui permettant cette dispersion spatiale et temporelle. Les environnements, dont les variations influent sur le succès reproducteur, représentent une pression qui sélectionne chez les organismes des stratégies adaptatives visant à réduire le risque d'échec de la reproduction. Cela peut notamment s'illustrer par la dormance des

graines chez les plantes ou les phénomènes de diapause chez les insectes et les crustacés (Philippi, 1993; Menu *et al.*, 2000). Chez les micro-organismes, la sporulation a-/sexuée est le mécanisme permettant la production d'un ou plusieurs descendants par reproduction clonale, assurant ainsi une amplification du génotype parental. Ces descendants se présentent sous la forme de spores métaboliquement ralenties et possédant plusieurs enveloppes de protection ce qui permet une meilleure survie dans des contextes environnementaux défavorables (dispersion temporelle). La taille micrométrique de ces spores, et leur grand effectif notamment dans le cas des champignons et des actinobactéries, pourrait permettre une meilleure dissémination (dispersion spatiale). Ainsi, la sporulation asexuée constituerait une réponse adaptative qui serait potentiellement sélectionnée en environnement variable. La symbiose entre les genres *Alnus* et *Frankia*, dite symbiose actinorhizienne, est une association mutualiste facultative qui présente une particularité, à notre connaissance unique, dans les interactions plantes-microorganismes, symbiotiques ou pathogènes. En effet, certaines souches de *Frankia* sont capables de sporuler *in planta,* formant ainsi de nombreux sporanges multilobés à l'intérieur même des cellules de l'hôte (*i.e.* contexte endosymbiotique). Ces travaux de thèse font suite au constat que les espèces d'aulnes présentes dans les milieux montagnards/alpins, respectivement *Alnus incana* (L.) Moench 1974 et *Alnus viridis* (Chaix) DC.,1805, étaient majoritairement associées à des souches de *Frankia* sporulantes *in planta* (*i.e.* Sp+), tandis que les espèces d'aulnes de plaine, notammment *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn, étaient majoritairement associées à des souches non sporulantes *in planta* (*i.e.* Sp-). La sporulation de *Frankia* dans un contexte symbiotique représente un paradoxe écologique, dans la mesure où l'hôte représente une niche favorable à la croissance active et que la nodosité limite la dissémination des spores dans le sol. Par ailleurs, la formation de ces spores, coûteuses d'un point de vue métabolique, se ferait par détournement d'une partie des ressources allouées par la plante-hôte à la fixation, au détriment du rendement symbiotique d'azote fixé (Normand and Lalonde, 1982; Monz and Schwintzer, 1989). Ainsi, les souches de *Frankia* Sp+ auraient, par rapport aux souches Sp-, une efficacité de fixation moindre, se traduisant à l'échelle d'un arbre voir d'une aulnaie, à des niveaux d'entrées d'azote inférieurs. Notre hypothèse de travail est que la sporulation *in planta* confère un avantage adaptatif à *Frankia*, à l'aulne, ou aux deux partenaires symbiotiques dans un environnement dont les variations influent sur le succès reproducteur.

L'objectif général de ce travail de thèse est de contribuer à accroître notre compréhension du rôle écologique, et des implications à l'échelle de l'écosystème, de la sporulation *in planta* de *Frankia* dans le contexte symbiotique avec l'aulne. Le manuscrit est divisé en deux grandes parties. La première est une synthèse bibliographique portant sur les écosystèmes sub-/alpins, leurs fonctionnements illustrés au travers du cycle biogéochimique

de l'azote, et sur le modèle d'étude spécifique de ces milieux (*Alnus viridis* et *Frankia* Sp+). La seconde partie est détaillée en 3 chapitres :

Le **CHAPITRE I** a pour but d'enrichir la description de la phylobiogéographie des souches de *Frankia* Sp+ associées à l'aulne, afin de tester la validité du patron de distribution centrée sur les milieux froids des zones hautes altitudes et/ou latitudes, précédemment décrits au sein de l'équipe (Pozzi *et al.*, 2015). Cette étude portait essentiellement sur les massifs des Alpes Françaises et quelques sites nord-américains. Dans ce travail de thèse, de nouvelles campagnes d'échantillonnages ont été réalisées afin d'élargir notre description aux zones géographiques où la plus grande diversité est attendue, en particulier l'Asie, zone d'origine supposée de l'aulne (Navarro *et al.*, 2003; Chen and Li, 2004), et des zones de refuge post-glaciaires de l'aulne, en Europe centrale ou en Corse par exemple.

Le **CHAPITRE II** vise à comprendre l'influence du partenaire végétal dans la distribution observée des souches de *Frankia* Sp+. Les 3 espèces d'aulnes (*A. glutinosa*, *A. incana* et *A. viridis*) appartenant à des ceintures bioclimatiques distinctes *in natura* (milieux de plaine, montagnard et sub-/alpin respectivement), les effets des facteurs espèce-hôte et climat sont confondus. Des croisements expérimentaux ont été réalisés au laboratoire afin de réévaluer les capacités d'association avec l'hôte des souches Sp+ et Sp- (infectivité, compétitivité et spectre d'hôte), et de découpler les effets de l'espèce-hôte et du climat dans l'association des souches de *Frankia* Sp+ avec les espèces d'aulnes des milieux montagnards et sub-/alpins (*Alnus incana* et *Alnus viridis*).

Le **CHAPITRE III** a pour objectif de décrire les conséquences écosystémiques du complexe symbiotique *Alnus/Frankia*, au niveau de la diversité microbienne et du fonctionnement du cycle de l'azote, en fonction du phénotype de sporulation des souches associées, et au fur et à mesure de son expansion dans les milieux sub-/alpins.

Dans chacun de ces chapitres, un intérêt particulier a également été porté sur les cortèges ectomycorhiziens, en termes de diversité phylogénétique, spécificité à l'hôte et de structures des communautés dans le sol et les racines. Ces différents points ont pu être traités dans le cadre d'une collaboration avec Mélanie Roy du laboratoire Evolution et Diversité Biologique de Toulouse. Cette démarche novatrice vise à mieux comprendre les interactions tripartites *Alnus, Frankia* et champignons ectomycorhiziens spécialistes. Notre réflexion restera cependant largement focalisée sur la symbiose actinorhizienne *Alnus*/*Frankia*.

Par ailleurs, ce manuscrit étant essentiellement basé sur des articles publiés ou en cours de soumission, des informations importantes peuvent apparaître comme redondantes, notamment entre les différentes introductions et discussions. Ces redondances sont assumées comme telles pour une meilleure compréhension du lecteur.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

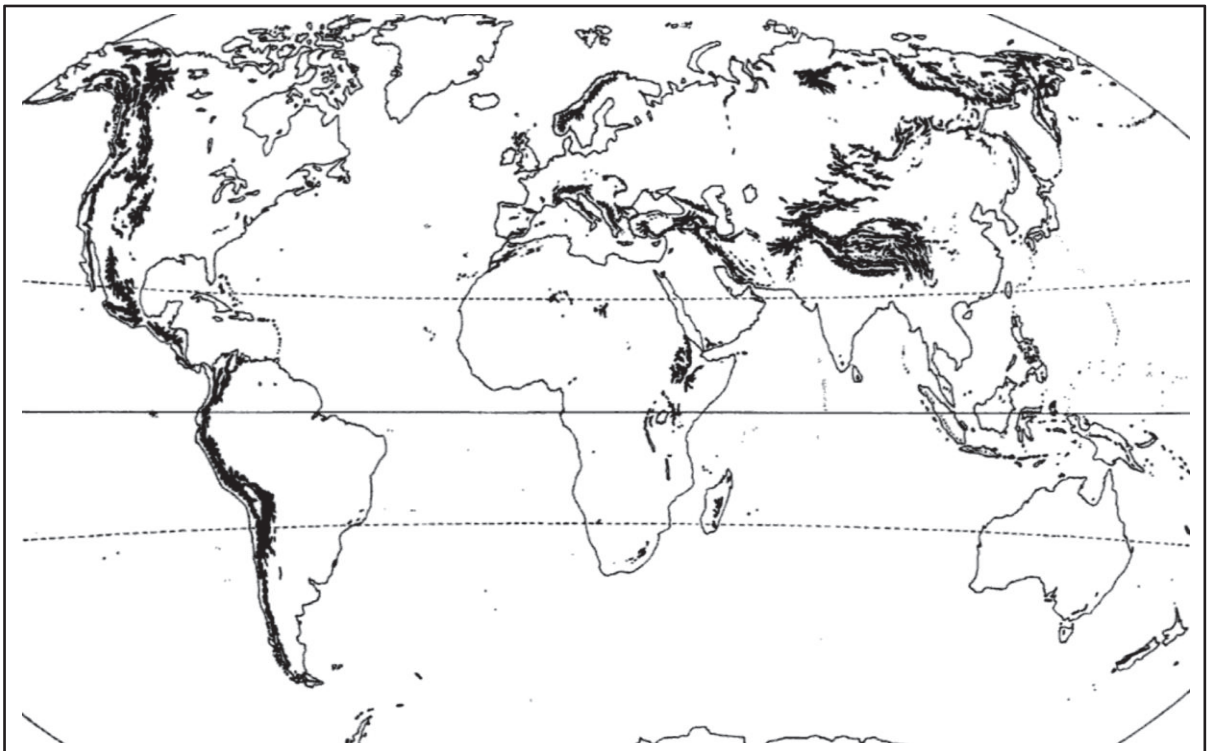


Figure 1. Répartition des zones alpines à l'échelle du globe (d'après Körner, 2003).

Introduction

Bien que notre modèle d'étude *Frankia* Sp+ se retrouve associée de façon prépondérante aux espèces d'aulne *Alnus incana* et *Alnus viridis* (et à leurs sous-espèces respectives), à la fois des milieux boréaux/sub-arctiques et sub-/alpins, notre partie expérimentale s'est portée principalement sur l'espèce *Alnus viridis*, provenant essentiellement de zones géographiques montagneuses, et notamment de l'arc alpin d'Europe de l'Ouest. Aussi, nous suivrons une approche similaire au cours de cette synthèse bibliographique introductive, en la centrant sur les zones de montagnes et sur la sous-espèce d'aulne y étant majoritairement présente ; *Alnus viridis* ssp. *viridis*.

Ainsi, nous décrirons dans un premier temps la richesse en termes de diversités biotique et abiotique, que représentent ces zones d'altitudes. Nous ferons ensuite un point sur le fonctionnement de ces milieux, à travers le cycle biogéochimique de l'azote, élément limitant majeur de ces environnements, en étudiant ses principales sources d'entrée et de sorties. La compréhension des différents processus de transformation de l'azote dans ces milieux apparaît en effet comme primordiale afin de mieux appréhender les conséquences de potentielles perturbations. Les connaissances rassemblées au cours de ces deux parties, nous permettrons d'aborder dans une troisième, l'écologie de la symbiose actinorhizienne *Alnus viridis*/*Frankia*, de la dynamique écologique des deux partenaires jusqu'aux implications du complexe symbiotique global sur les écosystèmes alpins.

1. Particularités des écosystèmes de montagne ; focus sur le milieu sub-/alpin

1.1 Définition/répartition/localisation

Traditionnellement le terme alpin désignait pour les fermiers des Alpes européennes, les zones proches de la *treeline (limite altitudinale des derniers arbres)*, déforestées par l'homme et qui servaient de pâturage estival. Dans la littérature, il est désormais utilisé pour faire référence à l'environnement biotique (composition en espèces) et abiotique (pédologie et climat) situé de part et d'autre de la *treeline*, à une échelle plus large que les Alpes européennes, notamment les montagnes du Japon (Alpes japonaises) (Gansert, 2004), les montagnes africaines (Alpes africaines) (Hedberg and Hedberg, 1979), les montagnes d'Amérique du Nord et les montagnes sub-/tropicales (Körner, 2003). C'est la seule unité de biogéographie qui a une distribution globale sur Terre. L'écosystème alpin est donc réparti entre plusieurs régions montagneuses de latitudes différentes dans le monde (Figure 1) (Grabherr *et al.*, 2010). Il représente approximativement 4 millions de km^2 soit 3% de la surface terrestre (Körner, 1995). De plus, les milieux de hautes latitudes (entre 60° et 70°N) peuvent également être assimilés par certains auteurs comme des zones de type « arctique-alpine » (Chapin and Körner, 2013). La distribution globale des zones alpines est

asymétrique, avec 82% des zones présentes dans l'hémisphère Nord. Les zones alpines arctique-subantarctiques, les zones alpines froides et tempérées, les zones alpines chaudes et tempérées et les zones alpines sub-/tropicales représentent respectivement 23, 32, 29 et 16% de l'aire totale alpine (Chapin and Körner, 2013)

Dans les montagnes des milieux tempérés froids, le milieu alpin se situe entre 2200-2500 m et environ 3000 m. Le milieu subalpin est situé entre la plus haute forêt de l'étage montagnard et les dernies arbres isolés (entre 1600-1900 m et 2200-2500 m d'altitude) (Körner, 2003). Ces limites d'altitude peuvent néanmoins varier localement selon l'exposition de la pente et régionalement selon la latitude du massif. La jonction entre les deux étages est définie comme un écotone, c'est à dire une zone de transition entre l'environnement subalpin et alpin (en anglais « treeline-ecotone »).

1.2 Gradients climatiques/abiotiques

Les écosystèmes de montagne se caractérisent par des changements progressifs de plusieurs variables climatiques en lien avec l'augmentation de l'altitude. Le régime de température est le facteur le plus important dans les climats de montagne et ces variations ont fait l'objet de nombreuses études dans les différents massifs du monde (Barry, 1992). La température diminue en moyenne entre 0,8°C tous les 100 m dans les montagnes insulaires et côtières, et à 0,4°C dans les zones de montagne continentales. Des valeurs extrêmes de 0 ou 1°C pour 100 m, ainsi que des gradients inverses de température par rapport à la vallée, peuvent être observés à certaines périodes de l'année. Par ailleurs, la diminution se fait plus rapidement lors de la saison de croissance dans les montagnes tempérées (Körner, 2003).

Les variations de température entre le jour et la nuit sont également importantes et suivent le même gradient d'altitude. Bien que des valeurs supérieures à 15°C de différence aient pu être relevées localement dans des montagnes de zone tempérée, les valeurs mensuelles moyennes se situent plus autour de 5°C à 3000 m d'altitude. Les précipitations augmentent également avec l'altitude, avec un maximum à altitude moyenne (Körner, 2003). Une étude réalisée dans les Alpes françaises estime entre 20 à 100 mm l'augmentation de la pluviométrie tous les 100 m jusqu'à 2500/3000 m (Chardon, 1989). A partir de cette altitude, cette augmentation peut, soit se poursuivre, généralement dans les montagnes tempérées humides, soit être faible voire nulle, particulièrement dans les montagnes sub-/tropicales (Flohn, 1974; Körner, 2003).

L'augmentation des précipitations orographiques et les températures froides entraînent un gradient nivométrique avec l'altitude, avec une augmentation moyenne de la hauteur annuelle du manteau neigeux de l'ordre de 30 cm tous les 100 m et une augmentation moyenne de sa durée de persistance de 9 à 13 jours tous les 100 m (Chardon, 1989). Entre

1000 et 3000 m, cette couverture neigeuse commence à s'accumuler en moyenne en novembre et fond au printemps ou début de l'été en fonction de type de climat, de la topographie du site et du versant considéré. La couverture nivale joue le rôle de barrière thermique en maintenant les sols à une température proche de 0°C alors que les températures de l'air ambiant peuvent descendre à -15/-20°C. Cline (1995) a suggéré après avoir effectué une analyse des balances énergétiques sur le continuum sol-neige-air, que 30 à 40 cm de neige étaient suffisant pour que température de l'air et température du sol ne se suivent plus au printemps durant la fonte des neiges. Une autre étude a montré qu'une augmentation du manteau neigeux de 10 cm peut entraîner une augmentation de la température moyenne annuelle du sol de 1°C. Ceci explique qu'une épaisse couche de neige déposée de façon précoce (avant les premières gelées d'hiver) augmente le taux d'activité hétérotrophique moyen et joue sur une partie de la variabilité spatio-temporelle des flux d'azote en milieu alpin (Brooks *et al.*, 1996; Brooks and Williams, 1999). Une épaisseur insuffisante du manteau neigeux peut entraîner une augmentation des cycles de gel/dégel des sols ayant pour conséquence une plus forte mortalité racinaire, délétère pour les jeunes arbres notamment à proximité de la *treeline* (Weih and Karlsson, 2002). Un taux de précipitations élevé et la fonte annuelle des neiges assurent une hydrométrie suffisante pour la végétation et les activités microbiennes pendant la majeure partie de l'année. En revanche, si le dépôt neigeux a été insuffisant, ces sols peuvent connaître des conditions de sécheresse importantes en période estivale, aggravées par la structure squelettique du sol, la pente et la forte évapotranspiration caractéristiques de ces milieux (Körner, 2003). Quand le manteau neigeux est insuffisant en hiver, la congélation peut également provoquer un desséchement du sol empêchant tout comme l'air dans le cas d'une sécheresse, la diffusion des substrats dans les porosités des agrégats du sol. Cependant, même dans ce cas des traces d'eau biodisponible ont été retrouvées par -10°C sous forme de film atour de particules de sol permettant un maintien des activités biologiques (Mikan *et al.*, 2002).

Pour finir, du fait de ces gradients climatiques, les périodes de croissance dans les environnements de montagne extra-tropicaux sont plus courtes qu'en plaine (Körner, 2003). Les hivers plus longs avec l'augmentation de l'altitude limitent ainsi la croissance des plantes (Bilbrough *et al.*, 2000). Cette diminution de la période de croissance a été estimée dans les Alpes françaises entre 6 et 9 jours tous les 100 m.

1.3 Gradients biotiques

Les facteurs environnementaux dans les écosystèmes de montagne ont été vus dans la section précédente comme étant sujet à des variations intenses tant à l'échelle temporelle (journalières, saisonnières) qu'à l'échelle spatiale, par leurs changements rapides avec l'altitude et la diversification de micro-habitats. Face à ces contraintes environnementales, la

sphère biotique peut faire face de 3 façons : par évolution phylogénétique (adaptation), par des modifications ontogéniques irréversibles durant la vie d'un individu ou de certains de ces composants, ou par des ajustements réversibles (acclimatation) (Körner, 2003). Des gradients biotiques sont ainsi observés en réponse aux gradients abiotiques environnementaux.

1.3.1 Diversité végétale

La diversité végétale alpine globale diminue de l'équateur aux pôles (Chapin and Körner, 2013). Elle est estimée à 8000 à 10000 espèces, comprenant 600 à 650 espèces endémiques dans les Alpes européennes, soit environ 1/3 de l'ensemble des espèces décrites (Kräuchi *et al.*, 2000; Körner, 2003). Les étages subalpins et alpins sont considérés comme des « points chauds » de biodiversité spécifique végétale (Barthlott *et al.*, 1996; Lomolino, 2001; Körner, 2003), notamment du fait de la coexistence de structures forestières et herbacées de part et d'autre de la *treeline* (Anthelme, 2001).

Plusieurs facteurs expliquent cette forte diversité végétale en montagne. A l'échelle globale et régionale, c'est la diversité des topologies de climat retrouvées sur un même massif. En effet, des types de climat éloignés par des milliers de kilomètres en plaine au niveau de leur latitude peuvent se retrouver condensés sur une même pente de montagne d'une dizaine de kilomètres (altitude). Ce phénomène de compression des zones de vie se traduit par les étagements de végétation observés en montagne, chacune ayant son assemblage d'espèces propres (Körner, 2003). Un autre facteur important est la fragmentation et l'isolement d'habitats en montagne entraînant une diversification (spéciation) forte à l'échelle régionale et/ou locale. Les périodes de glaciation, et les recolonisations qui ont suivi ces périodes, ont conduit à la différenciation de nombreuses niches écologiques différentes. Les massifs montagneux sont en effet souvent comparés à des archipels abritant des espèces de montagne, chaque îlot étant isolé des îlots voisins par un océan représentant les conditions pédoclimatiques de basses altitudes, défavorables à la survie de ces espèces (Körner, 2004). Par ailleurs, les variations d'exposition, du degré de dénivellation, et du relief, combinés avec les variations de roche mère et les différents régimes associés en termes de nutriment et d'eau, résultent localement en une multitude de micro-habitats, chacun ayant une composition caractéristique en végétaux (Anthelme, 2001; Körner, 2004). Le pâturage et les feux peuvent également favoriser localement l'apparition de nouveaux habitats (Romme, 1982; Komac *et al.*, 2015).

Les variations de la diversité spécifique des plantes avec l'altitude peuvent suivre trois patrons : (i) une diminution de la diversité monotone avec l'augmentation de l'altitude, (ii) une diversité forte à basse et moyenne altitude avec une diminution à haute altitude, ou (iii) une distribution gaussienne avec une diversité maximale aux élévations moyennes (Grabherr *et*

al., 1995; Cardelús *et al.*, 2006; Bryant *et al.*, 2008; Fierer *et al.*, 2011). En revanche, les taxa sont plus phylogénétiquement dispersés à hautes altitudes (Bryant *et al.*, 2008). Par ailleurs, la diminution de la diversité n'est pas linéaire, mais par palier de 200 à 400m (Grabherr *et al.*, 1995), reflétant les étagements de végétation caractéristiques. Les zones d'interface entre ces différents étages (*i.e.* zones dites d'« écotone ») présentent généralement une diversité plus forte par amalgame des diversités des deux étages (Kernaghan and Harper, 2001). Plusieurs hypothèses de travail ont été formulées pour expliquer cette diminution de la diversité avec l'altitude, dont certaines rappellent à la diminution bien référencée de la diversité avec l'augmentation de la latitude. La première hypothèse est que les sélections évolutives permettant la survie à haute altitude sont limitées par la quantité de taxa capables de s'adapter. La diminution de la surface du biotope avec l'altitude pourrait également jouer dans ce patron de distribution. En effet, à partir de la *treeline*, le nombre d'espèces de plantes à fleur diminue proportionnellement à la diminution de la surface de vie (Körner, 2000). Par ailleurs, l'isolement d'un massif montagneux par l'absence ou la disparition de corridors de migration peut aboutir à un goulet d'étranglement évolutif limitant la diversité. La diminution de la durée de la saison de croissance avec l'altitude du fait des basses températures pourrait également limiter la possibilité de diversification et d'évolution. En effet, même si les plantes se sont adaptées à ces limites avec des événements de reproduction plus rapides, les micro-organismes qui en plaine connaissent de nombreux cycles reproductif pourraient en avoir bien moins à hautes altitudes, ce qui dans le cas des symbiotes pourrait *in fine* avoir des répercussions sur leur partenaire végétal. Enfin, les événements de glaciation qui ont à plusieurs reprises interrompus temporairement l'histoire évolutive pourraient avoir limité les possibilités de diversification à hautes altitudes (Körner, 2004).

1.3.2 Abondance et diversité microbienne

1.3.2.1 Chez les bactéries

Malgré un nombre d'études grandissant, les patrons de variation de la diversité bactérienne en réponse à l'altitude et/ou aux températures dans les régions de montagne restent encore aujourd'hui peu compris. Différentes études rapportent en effet différents résultats, avec une tendance commune qui est que ce patron ne suit pas ceux traditionnellement observés pour les macro-organismes des régions en question, notamment celui des plantes (diminution monotone ou distribution gaussienne) (Fierer *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2012). En termes d'abondance, une étude récente a montré que l'abondance relative du gène marqueur bactérien (ADNr 16S) augmente avec l'altitude, notamment entre un site subalpin (1724-1737 m) et un site alpin (1965-2000 m) (Siles and Margesin, 2016). Dans cette étude, cette

augmentation était corrélée avec de nombreux facteurs environnementaux notamment l'altitude, la moyenne annuelle de température de l'air et du sol, ainsi que la moyenne annuelle de précipitation. Cette variation d'abondance globale se répercute différemment selon les taxa, avec par exemple une diminution de l'abondance relative en *Alphaproteobacteria* et une augmentation de l'abondance relative en *Actinobacteria*. En terme de diversité, Fierer *et al.* (2011) n'a montré aucune variation significative dans la diversité spécifique des bactéries de trois habitats (sol organique, sol minéral et surface des feuilles), par approche de pyroséquençage sur l'ADNr 16S, le long d'un gradient d'altitude dans les Andes tropicales. Siles and Margesin (2016) ont montré que seul le site de plus basse altitude (545-570 m) présentait une diversité α bactérienne supérieure par rapport aux 3 autres sites (1175-1200 m, 1724-1737 m, 1965-2000 m) dans le Tyrol du Sud (Alpes Italiennes). Une distribution gaussienne avec un maximum de diversité bactérienne totale a été observée par Singh *et al.* (2012) autour de 2500 m au-dessus de la *treeline*, puis une diminution jusqu'à 3700 m (proche du sommet) sur le Mont Fuji (Alpes Japonnaises). Dans cette étude, les auteurs rapportent néanmoins des variations de diversité différentes selon le groupe bactérien considéré. Par exemple, la diversité (exprimée en nombre unité taxonomique opérationnelle, *OTU*) des *Actinobacteria* augmente de façon linéaire et continue avec l'altitude, tandis que celle des *Acidobacteria* diminue de 1000 m jusqu'à 3000 m pour atteindre un plateau. Au contraire, Bryant *et al.* (2008) a observé une diminution de la de la proportion du groupe des *Acidobacteria* avec l'altitude dans l'ouest des Rocheuses (USA).

En terme de composition des communautés bactériennes, plusieurs études font état de variations le long d'un gradient d'altitude (*i.e.* diversité β) (Lipson, 2007; Margesin *et al.*, 2009; Fierer *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2013; Siles and Margesin, 2016). Chaque phylum varie différemment avec l'altitude. Trois phyla sont majoritairement retrouvés dans les approches de séquençage haut débit dans des zones sub-/alpines, par ordre d'abondance : les *Acidobacteria* (30 à 50%), les *Actinobacteria* et les *Proteobacteria* dont les proportions varient en fonction des études (Lipson, 2007; Margesin *et al.*, 2009; Fierer *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2012). La prédominance des *Acidobacteria* pourrait être expliquée par une meilleure tolérance à des pH qui diminuent généralement avec l'altitude, du fait de roches mères parfois acides et de phénomène de lixiviation accru (Lipson, 2007). Les *Acidobacteria* sont aussi adaptés aux sols plus squelettique (*i.e.* moins riches en matière organique et nutriments) tels que les sols sub-/alpins. Smit *et al.* (2001) suggèrent en effet qu'un sol présentant de fortes concentrations en éléments nutritifs disponibles permet une sélection positive des bactéries de type α- et γ-*Proteobacteria*, caractérisées par un fort taux de croissance. En revanche, un sol ayant de faibles teneurs en éléments nutritifs est plus favorable aux bactéries de type *Acidobacteria*, caractérisées par une croissance plus lente,

mais plus compétitives vis-à-vis du substrat.

Les communautés subalpines et alpines ont par ailleurs étaient décrites très différentes en fonction de la saison, avec des variations maximales en été et minimales en hiver (Lipson, 2007). Dans cette étude, deux phyla (*Actinobacteria* et *Verrucomicrobia*) étaient notamment présents dans les sols alpins et absents dans les sols subalpins. Il est proposé que les communautés bactériennes spécifiques dans les sols alpins varient moins au cours des saisons car bien adaptées au froid tout au long de l'année, alors que celles des sols subalpins sont adaptées à un environnement plus variable.

De manière générale, les différences en terme de latitude, géologie et topographie des massifs échantillonnés dans les études citées ici sont très vraisemblablement à l'origine des différences dans les patrons observés (Singh *et al.*, 2012).

1.3.2.2 Chez les champignons

Malgré leur rôle important de décomposeurs dans les écosystèmes, leur relation symbiotique avec de nombreux arbres et leur meilleure adaptabilité supposée aux milieux d'altitude élevée (meilleure tolérance aux valeurs basses de température et de pH), peu d'études ont porté sur les variations des communautés fongiques en termes d'abondance, de richesse spécifique et de composition des communautés en réponse à l'élévation de l'altitude.

En termes d'abondance des champignons totaux, différents schémas de variation ont été observés, témoignant d'une variation non linéaire de l'abondance fongique avec l'altitude. En effet, Siles and Margesin (2016) ont démontré par qPCR spécifique sur un fragment de l'ADNr 18S, une légère augmentation des communautés fongiques avec l'altitude (< 1 log), avec un nombre de copies maximum sur le site de plus haute altitude (1965-2000 m). Cette augmentation est corrélée à l'altitude, les températures moyennes de l'air et du sol, mais pas le pH. Dans les Alpes centrales autrichiennes, une augmentation significative de l'abondance relative des populations fongiques a été également observée avec l'augmentation de l'altitude, par dosage des ergostérols comme proxy de la biomasse fongique et analyse des acides gras phospholipides (Margesin *et al.*, 2009). Une autre étude a en revanche montré une diminution de l'abondance fongique le long d'un gradient d'altitude allant de 3300 à 4500 m sur le plateau Tibétain (Wang *et al.*, 2015b), sans aucune corrélation avec d'autres variables environnementales. Par méthode culturale, le nombre de colonies formant unité (CFU) diminue également avec l'augmentation de l'altitude (Devi *et al.*, 2012). Les champignons décomposeurs sont généralement plus abondants à basses altitudes (Rastin *et al.*, 1990; Osono, 2007; Gómez-Hernández *et al.*, 2012).

La richesse spécifique fongique totale a été très tôt décrite comme négativement corrélée avec l'altitude, avec un changement dans les populations dominantes, en lien avec la perte de diversité du couvert végétal (Alpes autrichiennes) (Schinner and Gstraunthaler, 1981).

Plus récemment, Wang *et al.* (2015a) ont également observé une perte de diversité phylogénétique avec l'altitude sur le Plateau tibétain, avec une richesse spécifique plus faible à moyennes altitudes. La baisse de diversité fongique avec l'altitude a également été observée par méthode culturale (Devi *et al.*, 2012). En revanche dans l'hémisphère sud (forêt de nuage en Argentine), l'élévation ne semble pas se traduire par une baisse de diversité fongique totale (Geml *et al.*, 2014). La littérature semble néanmoins s'accorder sur un modelage de la diversité β fongique avec l'altitude, lié à des préférences de certaines classes fongiques pour certaines zones d'altitude. Ces variations dans la structure des communautés ont été corrélées majoritairement à différentes variables environnementales tels que l'altitude (Geml *et al.*, 2014), le pH (Wang *et al.*, 2015a), le ratio C/N (Siles and Margesin, 2016), la teneur en azote et en matière organique du sol (Geml *et al.*, 2014). Il a été montré que les structures de communautés fongiques étaient par ailleurs très dépendantes de la végétation en surface (Mueller *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015a). Aux vues des ceintures de végétation spécifiques dans chaque zone en montagne, il n'est pas donc pas surprenant d'observer de telles modifications dans la composition des communautés fongiques du sous-sol. Les *Basidiomycota* et les *Ascomycota* sont les deux groupes majoritairement retrouvées dans les études ciblant les environnements d'altitude (Devi *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013; Geml *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015a; Siles and Margesin, 2016). Au sein de ces deux groupes, différentes classes présentent ainsi des variations qui leur sont spécifiques en termes d'abondance relative selon l'altitude, par exemple la classe des *Leotiomycetes (Ascomycota*) qui a été observée comme corrélée positivement à l'altitude (Siles and Margesin, 2016).

Des études se sont intéressées aux champignons symbiotiques dans les environnements d'altitude. Dans le cas des mycorhizes à arbuscules (endomycorhiziens, AM), une diminution du nombre de spores dans le sol, de la colonisation racinaire et de la richesse spécifique est observée avec l'altitude (Wu *et al.*, 2007; Devi *et al.*, 2012; Gai *et al.*, 2012). Certains de ces AM ne sont présents qu'à une certaine altitude ou gamme d'altitude comme les *Scutellospora calospora* uniquement observés entre 2000 m et 2400 m d'altitude dans l'étude de (Gai *et al.*, 2012). Les mêmes facteurs biotiques et abiotiques variant avec l'altitude, et vus précédemment comme modulant les communautés totales, peuvent également expliquer les différences de structures de communauté AM. Par exemple, l'effet des variations dans la composition du couvert végétal en surface a été particulièrement étudié (Klironomos *et al.*, 1993; Bever *et al.*, 2001; Burrows and Pfleger, 2002; Vandenkoornhuyse *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2007).

En ce qui concerne les champignons ectomycorhiziens (ECM), leur richesse spécifique diminue avec l'augmentation de l'altitude, soit de façon monotone (Bahram *et al.*, 2012; Nouhra *et al.*, 2012), soit avec un maximum de richesse à altitude moyenne dans les massifs

à faible latitude (Gómez-Hernández *et al.*, 2012; Geml *et al.*, 2014). La richesse des ECM a été notamment négativement corrélée avec la moyenne annuelle des températures de l'air et du sol (Bahram *et al.*, 2012; Gómez-Hernández *et al.*, 2012), et positivement corrélée avec l'humidité de l'air, la disponibilité en eau du sol (Gómez-Hernández *et al.*, 2012). Certaines espèces d'ECM peuvent être retrouvées à basse et haute altitude suggérant une vaste gamme de températures tolérées (Bahram *et al.*, 2012), tandis que d'autres peuvent présenter des stratégies adaptatives aux basses températures (Tibbett *et al.*, 1998).

Une étude ciblée sur la zone sub-/alpine des Rocheuses canadiennes a montré que la richesse spécifique des ECM du milieu alpin est 5 fois inférieure à celle du milieu subalpin. A l'écotone, l'amalgame entre les deux diversités aboutit à une diversité intermédiaire des deux milieux. La plus forte diversité végétale à cet écotone par rapport aux étages sub-/alpins n'engendre en revanche pas une plus forte diversité spécifique des communautés ectomycorhiziennes (Kernaghan and Harper, 2001). La structure des communautés ECM des deux milieux est également différente. Ces changements dans la diversité selon le gradient d'altitude sont dus à un certain nombre de facteurs abiotiques connus tels que la structure du sol, le pH, la température de l'air et du sol, le taux d'humidité et la concentration en humus (Kernaghan and Harper, 2001). Cependant, en plus de ces facteurs abiotiques, le facteur espèce-hôte peut avoir un rôle prédominant à l'échelle locale dans les variations observées de la composition en ECM (Bahram *et al.*, 2012), tout particulièrement dans le cas de champignons ECM spécialistes (ECM ne pouvant s'associer à des hôtes appartenant à un niveau taxonomique donné comme la famille, le genre ou l'espèce) (Kernaghan and Harper, 2001; Roy *et al.*, 2013a). Par exemple, dans le cas de cortèges ECM spécialistes comme les ECM associés à l'aulne vert (*Alnicola submelinoides*, *Alpova alpestris*, *Cortinarius moseri*, *Lactarius brunneohepaticus*), leur richesse spécifique ne diminue pas avec l'altitude, seule la structure des communautés changent en fonction de l'espèce-hôte présente (Roy *et al.*, 2013b). De plus, la spécificité à l'hôte végétal des ECM diminue avec l'altitude. En effet, une forte spécificité pour les gymnospermes et les angiospermes a été observée dans 60% des espèces collectées dans les forêts subalpines, contre 45% pour les espèces de la zone alpine (Kernaghan and Currah, 1998).

1.3.2.3 Chez les archées

Les *Archaea* sont connues pour être ubiquistes dans les écosystèmes terrestres (Bintrim *et al.*, 1997; Ochsenreiter *et al.*, 2003; Oline *et al.*, 2006) mais jouent un rôle particulièrement important dans les environnements présentant des conditions environnementales classiquement considérées comme défavorables pour les bactéries, notamment les pH et températures basses (Martens-Habbena *et al.*, 2009; Bates *et al.*, 2011; Alves *et al.*, 2013). Leur abondance et leur diversité sont donc attendues comme plus fortes dans les

environnements sub-/alpins en réponse au gradient d'altitude.

Différents patrons de variation d'abondance des *Archaea* ont été décrit en réponse à un gradient d'altitude. Siles and Margesin (2016) n'ont rapporté aucun changement dans l'abondance relative des *Archaea* le long d'un gradient de 545 à 2000 m dans les Alpes Italiennes, et aucune corrélation par rapport aux variables mesurées dans leur étude (*i.e.* C/N, pH, température du sol et de l'air). Un résultat similaire a été obtenu par Wang *et al.* (2015b) le long d'un gradient à plus hautes altitudes dans le Plateau Tibétain (3100 à 4400 m). Au contraire, des études dans les montagnes du Japon sur des gradients de 1000 à 3000 m (Mont Fugi et Mont Norikura), ont montré une distribution gaussienne avec un maximum d'abondance, de richesse spécifique et de diversité à élévations moyennes (≈ 1500 – 2000 m) (Bryant *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2016). Par ailleurs, l'écotone entre la zone subalpine à couvert végétal dense et la zone alpine à couvert végétal plus faible a été décrit comme présentant une diversité plus forte en *Archaea* (Singh *et al.*, 2016). Comme vu précédemment pour les bactéries et les champignons, les classes d'*Archaea* peuvent varier différemment le long d'un gradient d'altitude. Par exemple, l'abondance des *Thermoplasmata* diminue avec l'altitude (1000 – 3000 m) (Singh *et al.*, 2016) alors que celle des *Marine Benthic Group A* (*MGBA*) augmente (3100 m – 4400 m) (Siles and Margesin, 2016).

La composition en terme de communautés varie selon la montagne étudiée, ce qui se traduit notamment par des prédominances de phyla différentes. Les deux principalement retrouvés dans ces environnements sont les *Thaumarchaeota* (Siles and Margesin, 2016; Singh *et al.*, 2016) et les *Crenarchaeota* (Wei *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015b). A l'échelle taxonomique de la classe (plus rarement du genre), les différentes études précédemment citées présentent des distinctions notables en terme de composition des communautés, indiquant un effet prédominant des caractéristiques géologiques (*e.g.* roche mère), pédologiques (*e.g.* pH, C/N, ammoniaque/ammonium) et environnementales (*e.g.* précipitations) du massif considéré (Singh *et al.*, 2016).

Un nombre important de publications cible tout particulièrement le groupe fonctionnel des *Archaea* oxydant l'ammonium (*Ammonium Oxydizing Archaea* ou AOA). Ce groupe a été démontré dans de nombreux milieux comme plus abondant que les bactéries oxydant l'ammonium (*Ammonium oxydizing bacteria* ou AOB) (Leininger *et al.*, 2006; Wuchter *et al.*, 2006; Lam *et al.*, 2007; Nicol *et al.*, 2008; Shen *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009; He *et al.*, 2012). Du fait de cette prédominance, il jouerait un rôle clé dans le cycle biogéochimique de l'azote (*i.e.* processus de nitrification vu dans une section ultérieure), notamment dans les milieux froids, acides et pauvres en azote (Cavicchioli, 2006; Martens-Habbena *et al.*, 2009; Bates *et al.*, 2011; Tourna *et al.*, 2011; Verhamme *et al.*, 2011), tels que les environnements alpins et arctiques (Alves *et al.*, 2013; Tai *et al.*, 2014). Plusieurs études réalisées sur des gradients d'altitude différents permettent de bâtir une vision assez large de la distribution des

AOA en milieu de montagne. A l'étage subalpin, en forêt de sapins (environ 3500 m), l'abondance des AOA est supérieure par rapport à celle des AOB, tout particulièrement en période de gel/dégel au printemps (Wang *et al.*, 2012a). De 4000 m jusqu'à 6550 m, l'abondance relative des AOA diminuent de 4 log en moyenne alors que celle des AOB augmente. Entre 5500 et 6550 m, l'abondance des AOB devient alors de 1 à 3 log supérieure par rapport à celle des AOA (Zhang *et al.*, 2009). Yuan *et al.* (2015) nuance cette observation en étudiant plusieurs fractions de sol de profondeur différentes sur le même massif. Les auteurs observent une diminution similaire des AOA dans les 5 premiers centimètres de sol le long d'un gradient de 4400 à 5200 m, mais une abondance constante à 20 cm de profondeur. La diversité a été décrite comme augmentant de façon monotone avec l'altitude tandis que la richesse spécifique reste stable (Zhao *et al.*, 2017).
Avec l'augmentation de l'altitude, Zhao *et al.* (2017) retrouvent majoritairement des phylotypes le plus souvent observés en milieu froid, favorisés par une plus forte disponibilité en eau et nutriment, comme par exemple *Candidatus Nitrososphoaera gargensis* (Zhang *et al.*, 2009). Ces travaux montrent *a contrario* une diminution des phylotypes observés généralement dans les milieux de températures plus chaudes, par inhibition de croissance par les températures. Wang *et al.* (2012a) ont également identifiés différents clusters dont la représentation au niveau de la population globale des AOA était corrélée positivement (cluster 1 et 4) ou négativement à la température (cluster 3), se traduisant par des variations saisonnières de la composition des communautés des AOA à l'étage subalpin.

Nonobstant l'existence de gradients abiotiques intenses, et de plus en plus contraignant pour la vie avec l'augmentation de l'altitude, les environnements de montagne hébergent donc une biodiversité spécifique unique, avec un maximum généralement observé aux altitudes moyennes correspondant à l'étage sub-/alpin.
Cependant dans ces milieux, comme dans la majorité des écosystèmes froids, l'azote reste l'élément limitant majeur (Shaver and Chapin, 1980; Vitousek and Howarth, 1991; Theodose and Bowman, 1997; Jaeger *et al.*, 1999; Nordin *et al.*, 2004). Sa disponibilité dépend très fortement des processus de décomposition de la manière organique et de transformation des composés azotés catalysés par les micro-organismes telle que la nitrification (Canfield *et al.*, 2010; Alves *et al.*, 2013).

2. Le cycle de l'azote en milieu alpin

L'azote est un élément clé qui contrôle la composition en espèce, la diversité, les dynamiques et fonctionnements des écosystèmes terrestres (Vitousek *et al.*, 1997). La compréhension du fonctionnement du cycle de l'azote dans les milieux sub-/alpins a fait l'objet de nombreuses études, notamment du fait de la sensibilité de ces milieux au contexte de réchauffement global actuel et des enjeux en terme de conservation de la biodiversité que cela suppose. Notre propos sera centré sur les entrées et sorties majeures de cet écosystème (Figure 2).

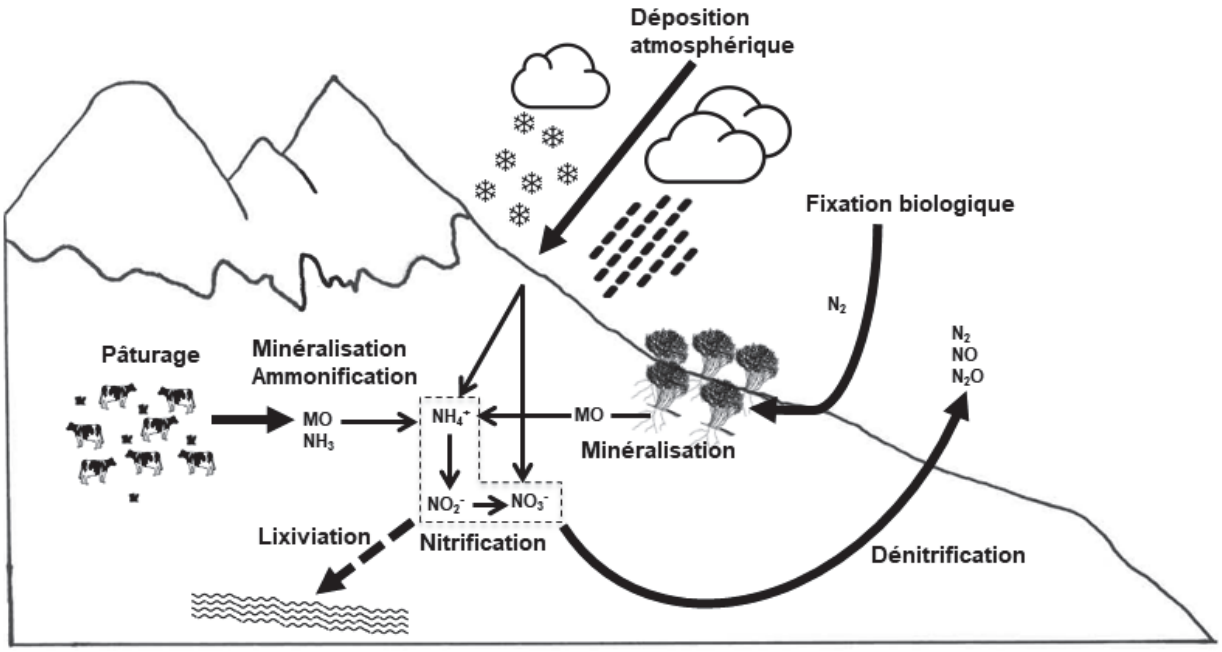


Figure 2. Principales entrées et sorties d'azote dans les environnements de montagne.

Le phénomène de déposition atmosphérique, la fixation biologique d'azote et le pâturage permettent l'entrée d'azote dans l'écosystème de montagne, soit sous la forme de matière organique riche en azote, ou directement sous formes réduites (NH_4^+) ou oxydés (NO_3^-) de l'azote plus labiles. Outre l'assimilation par les organismes vivants, le système subit des pertes d'azote sous forme ionique (NH_4^+, NO_2^-, NO_3^-) par lixiviation par les courants d'eau libre jusque dans les bassins versants et sous forme d'émissions gazeuses (N_2, NO, N_2O). Les micro-organismes du sol sont à la base des processus de transformations des différentes formes de l'azote (minéralisation, ammonification, nitrification et dénitrification.

Production personnelle.

2.1 Entrées d'azote

2.1.1 Déposition

Le manteau neigeux est connu depuis longtemps pour agir comme un réservoir d'azote pour les écosystèmes sub-/alpins (Haselwandter *et al.*, 1983). La neige se charge en effet d'impuretés majoritairement par le phénomène de déposition sèche, c'est à dire l'accumulation d'aérosols, provenant par exemple des activités industrielles, transportés par le vent et piégés dans la structure poreuse du manteau neigeux (Clement *et al.*, 2012). Dans une moindre mesure a lieu également la déposition dite « humide », qui est liée à la dissolution de composés gazeux dans la glace, à l'adsorption de composés organiques semi-volatiles à la surface des cristaux de glace et la capture d'aérosols durant les précipitations (Clement *et al.*, 2012). Ces solutés sont alors libérés dans les sols sub-/alpins lors de la fonte des neiges au printemps, sous la forme d'une impulsion d'ions, sans subir de transformation ou immobilisation. Le facteur de concentration de ces ions par rapport à leur concentration dans le manteau varie de 4 à 1, au fur et à mesure de la fonte (Bilbrough *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 2009).

Il a été montré que l'accumulation de NO_3^- et NH_4^+ par déposition sèche a lieu de février à mai, avec des valeurs maximales atteintes juste avant le début de la saison de croissance mi-juin. L'entrée d'azote dans le sol a lieu avec les premières fontes en avril et atteint son maximum à la fin du printemps/début de l'été (Bowman, 1992). Cette déposition d'azote atmosphérique (déposition sec et humide) dépend de l'épaisseur du manteau neigeux et de la redistribution horizontale de la neige liée au vent. Ce phénomène de déposition d'azote contribue en grande partie aux entrées d'azote dans ces milieux fournissant aux plantes et aux micro-organismes des composés azotés très tôt dans la saison de croissance. En effet, l'entrée d'azote résultant de la fonte des neiges peut atteindre des valeurs maximales de 606 mg par m^2 et par an, comme mesurée dans des névés de la réserve Niwot Ridge (Colorado, USA), soit plus de la moitié des entrées d'azote atmosphérique annuelles du site (Bowman, 1992). Une étude plus récente de Williams *et al.* (2009) dans cette même réserve a montré des stocks d'azote inorganique pouvant atteindre les 2 kg par hectare. Des taux similaires ont été enregistrés ces dernières décennies dans le nord de l'Europe, avec des valeurs de déposition entre 5 et 60 kg d'azote inorganique par hectare et par an (Clement *et al.*, 2012; Hiltbrunner *et al.*, 2014).

Les écosystèmes sub-/alpins étant généralement caractérisés par des sols pauvres en nutriments (Körner, 2004; Seastedt *et al.*, 2004), cette entrée d'azote par déposition peut augmenter de façon non négligeable la disponibilité en nutriments azotés modifiant ainsi les activités de minéralisation (ammonification) et nitrification en aval dans le cycle de l'azote (Hagedorn *et al.*, 2003). Ainsi, l'azote provenant du manteau neigeux annuel peut

représenter jusqu'à 30% de l'azote minéralisé à partir de la matière organique du sol durant la saison de croissance (Bowman, 1992; Fisk and Schmidt, 1995). Les activités humaines grandissantes (agriculture, industrie, transport et urbanisation) sont à l'origine d'émissions de plus en plus importantes dans l'atmosphère de composés azotés oxydés (NO_x) et réduits (NH_3). Depuis les révolutions industrielles et agricoles du début du XIX^{e} siècle, les émissions de ces composés ont ainsi quadruplé, passant de 35 à 124 Tg (1 Tg = 10^{12} g) d'azote par an et entraînant des taux de déposition 4 fois plus importants, notamment en Europe du Nord et Amérique du Nord (Holland *et al.*, 1999; Fowler *et al.*, 2005). Cette déposition accrue menace désormais les *hotspots* de diversité végétales tels que les écosystèmes de montagne (Holland *et al.*, 1999). En effet, des diminutions de la diversité végétale sont classiquement observées en réponse à l'augmentation de l'azote disponible, car favorisant les plantes nitrophiles à croissance rapide au détriment des plantes adaptées à des sols oligo- et mésotrophiques, et par les effets secondaires de cet apport d'azote plus important (*i.e.* acidification des sols, plus forte appétence des herbivores, sensibilité accrue au gel et aux pathogènes) (Bobbink *et al.*, 1998; Phoenix *et al.*, 2006). Le phénomène de déposition serait de nos jours le 3ème facteur responsable de la perte de biodiversité dans les écosystèmes après l'exploitation des sols et le changement climatique (Sala *et al.*, 2000).

2.1.2 Minéralisation de l'azote, ammonification et nitrification

La minéralisation est le processus de dégradation de la matière organique en composés minéraux via la microfaune, les champignons et les bactéries du sol. La minéralisation de l'azote organique, ou ammonification, résulte dans la libération d'ions ammonium (NH_4^+) ou d'ammoniac (NH_3) sous l'action de micro-organismes hétérotrophiques non spécifiques en conditions anaérobiques (McNeill and Unkovich, 2007). L'ammonium peut ensuite être oxydé en nitrite (NO_2^-) puis en nitrate (NO_3^-) par le processus de nitrification, à un taux classiquement régulé par la disponibilité en NH_4^+ ainsi que par un panel de facteurs édaphiques du sol tels que le pH, l'humidité, l'aération et la température.

Les taux de décomposition et de transformation de l'azote dans les sols étant étroitement liés au facteur température (Nadelhoffer *et al.*, 1991; Melillo *et al.*, 2002), les basses températures des milieux sub-/alpins ralentissent les processus enzymatiques (Schinner, 1982) ce qui diminue les taux de minéralisation de l'azote et les quantités d'azote biodisponible (Sveinbjörnsson *et al.*, 1995; Lipson and Monson, 1998; Jacot *et al.*, 2000b; Lipson *et al.*, 2000; Huber *et al.*, 2007; Lipson, 2007). Ainsi, la translocation d'échantillons de sol d'une aire alpine vers une aire subalpine (différence d'environ 3°C) entraîne une augmentation marquée du taux de minéralisation de l'azote et de nitrification (Makarov *et al.*, 2003). *De facto*, bien que les réserves en azote total du sol puissent être importantes en milieux sub-/alpins, les teneurs en azote biodisponible (*i.e.* azote minéralisé) restent

extrêmement faibles et limitent les processus de nitrification et dénitrification, en aval dans le cycle biogéochimique de l'azote (Makarov *et al.*, 2003; Huber *et al.*, 2007), et *de facto* les productions primaires dans ces environnements (Bowman *et al.*, 1993). D'autres facteurs que la température et la disponibilité en substrat ont été décrits en milieu de montagne comme régulant les processus de minéralisation, notamment la disponibilité en eau du sol (Fisk and Schmidt, 1995; Zhang *et al.*, 2012), expliquant plus de 90% de la variance observée sur les mesures de minéralisation en laboratoire (Goncalves and Carlyle, 1994). Powers (1990) a ainsi trouvé des taux de minéralisation variant de façon non linéaires le long d'un gradient d'altitude, parce que limités à basses altitudes par une disponibilité en eau trop faible et à haute altitude par des températures trop basses. Les taux de minéralisation varient donc avec les saisons dans les sols alpins. Jaeger *et al.* (1999) ont observé dans une prairie alpine humide (3525 m), une augmentation progressive à partir de la fonte des neiges en juin jusqu'à un maximum mi-août, pour ensuite redescendre de moitié jusqu'à la mi-septembre.

Après la température et la disponibilité en eau, la qualité de la matière organique du sol (*i.e.* ratio carbone/azote ou C/N) est également un facteur déterminant des taux de minéralisation et nitrification. Plusieurs études démontrent une corrélation curviligne négative entre le C/N et le taux de minéralisation, avec des taux maximales pour des C/N autour de 8 et minimales pour des C/N supérieurs à 30 (Frankenberger and Abdelmagid, 1985; Powers, 1990). En outre, lorsque les températures sont plus douces à la saison de croissance (0 – 10°C), le C/N devient le facteur limitant prédominant des processus de minéralisation des sols des écosystèmes froids (Flanagan, 1986; Nadelhoffer *et al.*, 1991). La valeur de ce ratio dépend directement du couvert végétal en surface. Ollinger *et al.* (2002) ont comparé les valeurs de C/N de la matière organique sous 30 forêts d'une dizaine d'essences différentes dans la *White Mountain National Forest* (New Hampshire, USA) et mis en évidence une corrélation linéaire positive entre le C/N et le rapport foliaire lignine/azote des arbres. Dans les contextes écologiques de recolonisation des pâturages subalpins abandonnés (présenté ultérieurement section 3.1.2), les petites espèces ligneuses et buissonnantes (*e.g. Arctostaphylos uva-ursi*, *Vaccinium myrtillus*, …) contiennent de petites quantités d'azote pour de grande quantités de lignine et polyphénols résultant ainsi dans une litière organique de faible qualité (*i.e.* C/N élevé) (Bahn *et al.*, 1999) et des taux de minéralisation plus bas dans ces prairies (Zeller *et al.*, 2000).

Par ailleurs, les plantes des milieux alpins sont connues pour synthétiser des composés phénoliques (*e.g.* tanins) pour se protéger de l'irradiation solaire plus importante en altitude (Caldwell, 1981). Une fois dans la litière du sol, s'ils sont de poids moléculaire faible (*i.e* solubles), ces composés peuvent servir de source de carbone relativement facile à métaboliser pour les micro-organismes (Schmidt *et al.*, 2000; Bowman *et al.*, 2004). En

revanche, les composés phénoliques à haut poids moléculaire, résistants à la minéralisation, pourraient inhiber les activités microbiennes de dégradation de la matière organique (Bradley *et al.*, 2000; Souto *et al.*, 2000), notamment par chélation des exo-enzymes dans le sol (Fierer *et al.*, 2001).

Une minéralisation ralentie en altitude (Lipson and Monson, 1998; Lipson *et al.*, 2000; Margesin *et al.*, 2003; Lipson, 2007; Margesin *et al.*, 2009) entraîne une importante accumulation de matière organique dans la litière du sol (Zhang *et al.*, 2012). De manière générale, la formation et le type d'humus dépendent de la couverture végétale, des caractères physico-chimiques du sol, souvent acide, et du climat. Dans les milieux froids (altitudes et/ou latitudes élevées), la litière qui persiste généralement plus longtemps subit une humification partielle aboutissant à la formation de mor (humus brut) (Glaser *et al.*, 2000). Ces nutriments non-minéralisés ne sont pas utilisables par les micro-organismes et les végétaux, ce qui contribue à des taux d'azote et de carbone biodisponibles faibles (Makarov *et al.*, 2003).

Comme pour la minéralisation, le processus de nitrification dans les sols a été montré comme dépendant de l'altitude. Zhang *et al.* (2012) ont mesuré des taux de nitrification moyens de 8,9 et 5,3 mg d'azote par kg de sol en 60 jours sur des sols d'altitudes respectives de 3000 et 4000 m. De plus, ces taux étaient deux fois supérieurs sur le versant sud (plus sec, plus chaud) par rapport au versant nord (plus frais, plus humide) montrant l'importance du microclimat et de la topographie locale sur ce processus.

Alors que le mécanisme de minéralisation de l'azote est la source d'entrée prédominante dans les milieux de basse altitude par rapport à la déposition d'azote, il contribue dans une moindre mesure au budget azoté dans les milieux de plus haute altitude atteignant des rendements comparables à ceux de la déposition et des fixations symbiotiques réunies (Rehder and Schäfer, 1978).

2.1.3 Pâturage

Les activités de pâturages sont présentes dans toutes les chaînes de montagne du globe et ont fait l'objet de nombreuses études pour comprendre leurs impacts sur le fonctionnement des écosystèmes alpins, notamment dans les Rocheuses (Binkley, 2003), les Andes (Buttolph and Coppock, 2004), les Alpes Scandinaves (Virtanen *et al.*, 2008), les Alpes européennes (Mayer *et al.*, 2009) et dans la chaîne de l'Himalaya (Gao *et al.*, 2008). Au niveau du cycle de l'azote, le pâturage peut être favorable ou défavorable au *turnover* de l'azote dans les milieux d'altitude, en particulier selon l'intensité de pâturage (densité du troupeau) et le comportement de pâturage (*i.e.* sélection des plantes à forte teneur en azote) (Gao *et al.*, 2008).

Un pâturage modéré et sans préférence pour les plantes broutées favorise le cycle de l'azote

de deux façons. Tout d'abord en changeant la qualité des tissus et leur potentiel de décomposition (effets indirects), ce qui se traduit par une diminution du C/N des racines et de la litière des plantes (Seastedt, 1985; Merrill *et al.*, 1994; Sirotnak and Huntly, 2000; Johnson and Matchett, 2001; Gao *et al.*, 2008). Les déjections des troupeaux sont par ailleurs très riches en azote, elles contiendraient encore 80% de l'azote ingéré en premier lieu (Holland *et al.*, 1992). Le pâturage permet donc de redistribuer les formes moins facilement métabolisables de l'azote (litière) sous forme de composés plus labiles par leurs urines et fèces (effets directs), diminuant ainsi le C/N de la matière organique du sol (Day and Detling, 1990; Holland *et al.*, 1992; Pastor *et al.*, 1993; Frank and Evans, 1997; Gao *et al.*, 2008). Enfin, le piétinement par le troupeau retourne la surface du sol et enlève des végétaux, empêchant ainsi l'accumulation de litière et favorisant la minéralisation de la matière organique (Knapp and Seastedt, 1986; Abdel-Magid *et al.*, 1987; Tardiff and Stanford, 1998). Cette diminution du C/N entraîne généralement une augmentation substantielle de la minéralisation (Frank and Groffman, 1998; Zacheis *et al.*, 2002), en diminuant la demande en azote des micro-organismes pour la décomposition (*i.e.* immobilisation) (Holland and Detling, 1990; Holland *et al.*, 1992). Johnson and Matchett (2001) ont en effet rapporté des augmentations du taux de minéralisation de 87 à 617% selon l'année. En réponse à cette plus forte disponibilité en azote minéral dans le sol, les processus de nitrification et dénitrification (Holland *et al.*, 1992; Luo *et al.*, 1999; Johnson and Matchett, 2001; Le Roux *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 2008), ainsi que les émissions de N_2O (Gao *et al.*, 2008), sont plus importants.

Le pâturage peut également réduire le cycle de l'azote du fait de la sélection par les brouteurs des plantes à forte teneur en azote. Une dominance de plante à haut C/N s'installe alors, ce qui réduit les processus de minéralisation de la matière organique du sol (Gao *et al.*, 2008). De plus, une disponibilité réduite en azote dans le sol favorise les espèces pauvres en azote, car étant plus compétitrices en conditions oligotrophiques (Green and Detling, 2000; Olofsson *et al.*, 2001).

2.1.4 Fixation d'azote

Comme vu précédemment, les zones alpines sont caractérisées par des températures froides, des périodes de croissance courtes et des valeurs de pH du sol acide limitant ainsi la décomposition de la matière organique et les processus de transformation de l'azote (Jacot *et al.*, 1998). Ces zones sont donc habituellement caractérisées par une faible disponibilité en azote (Körner, 2004; Seastedt *et al.*, 2004). Par ailleurs, l'histoire des activités anthropiques dans ces régions (agropastoralisme) a également contribué au statut oligotrophique de ces sols (Robson *et al.*, 2007; Clement *et al.*, 2012). Ce déficit en nutriments favorise la mise en place et la persistance de symbioses fixatrices d'azote dans

ces milieux (Jacot *et al.*, 2000b; Sheffer *et al.*, 2015).

La fixation biologique de l'azote atmosphérique par les plantes en symbiose avec des bactéries au niveau de leurs racines est une source majeure d'azote dans les écosystèmes. La fixation correspond à la réduction du N_2 atmosphérique en ammonium (NH_4^+) par l'activité de l'enzyme nitrogénase, chez les bactéries et les *Archaea*. Une estimation globale d'environ 195 teragrammes par an a été faite de l'entrée d'azote par la fixation d'azote biologique dans les écosystèmes terrestres (Cleveland *et al.*, 1999). Elle peut être mise en œuvre dans un contexte de vie saprophytique, ou symbiotique avec des hôtes végétales phylogénétiquement très différents (Vitousek *et al.*, 2013). Cette activité a été décrite notamment dans les biomes froids tels que les forêts boréales et subalpines (Markham, 2009; Mitchell and Ruess, 2009b; Chaia and Myrold, 2010), les toundras arctiques (Alexander *et al.*, 1978) et les prairies alpines (Holzmann and Haselwandter, 1988; Bowman *et al.*, 1996; Jacot *et al.*, 2000b), où elle représenterait un total moyen dans ces milieux de 16 kg par hectare et par an, soit 10 Tg par an équivalent à 5% de la fixation mondiale (Cleveland *et al.*, 1999). La fixation libre représenterait en moyenne 30% de la fixation totale dans les milieux froids et serait essentiellement assurée par les cyanobactéries des lacs alpins ou terrestres, en association facultative avec les mousses et les lichens (Vitousek *et al.*, 2013). Nous n'aborderons dans ce travail que la fixation symbiotique d'azote car prédominante dans les milieux sub-/alpins par rapport à la fixation libre (Wojciechowski and Heimbrook, 1984). En plus de la symbiose fabacées-rhizobiacées bien décrite dans l'ensemble des écosystèmes terrestres, d'autres associations symbiotiques fixatrices d'azote à importance non négligeable dans le cycle biogéochimique de l'azote sont présentes et ont été étudiées en milieu alpin, comme la symbiose actinorhizienne avec les genres *Dryas* et *Alnus*.

<u>Encadré</u> : Méthodes de mesures de la fixation biologique de l'azote

Deux méthodes sont très largement utilisées dans la littérature pour évaluer les capacités de fixation biologique de l'azote des organismes.

Le test de réduction de l'acétylène (ou « *Acetylene Reduction Activity* » en anglais, ARA) est une méthode rapide, simple à mettre en œuvre et très précise permettant de mesurer l'activité de l'enzyme nitrogénase de nodosités racinaires de légumineuses ou actinorhiziens (Hardy *et al.*, 1968). Ce test repose sur l'affinité préférentielle de la nitrogénase pour l'acétylène par rapport à l'azote (Dilworth, 1966). Ainsi, en mettant une nodosité sous atmosphère enrichie en l'acétylène, l'acétylène sera réduit en éthylène. Des prélèvements de l'atmosphère sont effectués à pas de temps réguliers et pour chacun la quantité d'éthylène produit est quantifiée par chromatographie en phase gazeuse. Ces différents prélèvements sont généralement réalisés dans une fenêtre de 30 à 60 min afin d'éviter les biais liés au

changement de produit final (éthylène au lieu de l'ammonium) ou à l'épuisement des réserves carbonées dans la nodosité (Minchin *et al.*, 1983). La cinétique réalisée permet alors de quantifier la capacité de fixation d'azote, généralement exprimée en microgramme de C_2H_4 produit par gramme de nodosité et par heure. Cette méthode a néanmoins 2 limites majeures. La première est le facteur de conversion entre la réduction du C_2H_2 et celle du N_2. Ce facteur, en théorie de 3, est dans les faits très variable, rendant ainsi cette mesure que potentielle. La deuxième limite repose sur la difficulté à rapporter cette mesure d'éthylène réduit par une ou plusieurs nodosités à la quantité d'azote fixée à l'échelle d'une plante (notamment ligneuse) ou d'un écosystème, sur une saison de croissance entière.

La deuxième méthode est une technique de dilution isotopique basée sur l'abondance naturelle de l'isotope ^{15}N. Elle permet de calculer la proportion d'azote provenant de l'atmosphère dans un échantillon. Alors que l'atmosphère a une abondance quasiment constante de ^{15}N de 0,3663% (Junk and Svec, 1958; Mariotti, 1983), des variations de cette abondance ont été démontrées dans différents matériaux biologiques, notamment le sol, qui a en moyenne une abondance en ^{15}N 9,2% plus importante que celle de l'atmosphère (Shearer *et al.*, 1978). Les abondances en ^{15}N des plantes non fixatrices qui tirent leur azote du sol sont donc proches de celles du sol, et les abondances en ^{15}N des plantes fixatrices se rapprochent de celles de l'atmosphère (Delwiche and Steyn, 1970; Heisey *et al.*, 1980; Virginia and Delwiche, 1982; Shearer and Kohl, 1986). Après avoir quantifié avec un analyseur élémentaire couplé à un spectromètre de masse de rapport isotopique (AE-SMRI), le ratio ^{15}N et ^{14}N d'un échantillon de plante, la valeur de $\delta^{15}N$ est calculée à partir de la formule suivante :

$\delta^{15}N = [(R_{sample}/R_{standard}) - 1] * 1000$, avec R, le rapport $^{15}N/^{14}N$.

Cette valeur doit également être obtenue pour une plante dite de référence (plante non fixatrice, phylogénétiquement proche de la plante d'intérêt) et ainsi que pour la plante d'intérêt ayant poussée sur un milieu ne contenant pas d'azote.

A partir de ces valeurs, la proportion d'azote provenant de l'atmosphère pour une plante peut être calculée avec la formule suivante :

pNdfa = ($\delta^{15}N$ référence - $\delta^{15}N$ plante fixatrice) / ($\delta^{15}N$ référence - $\delta^{15}N$ plante fixatrice sur milieu sans azote).

2.1.4.1 Symbiose Rhizobia-légumineuses (fabacées)

La fixation symbiotique par les légumineuses et leur contribution au budget azoté a été étudiée dans les milieux alpins de différentes régions de l'hémisphère nord (Johnson and Rumbaugh, 1986; Halvorson *et al.*, 1992; Jacot *et al.*, 2000b).

Des études ont estimé par méthode de dilution de l'isotope ^{15}N (Encadré n°1) que les légumineuses d'altitude des Alpes (9 espèces différentes) acquièrent entre 59% jusqu'à plus

de 90% de leur azote grâce à la fixation symbiotique selon l'espèce. Les auteurs ont par ailleurs observé que la spécificité des rhizobia d'altitude élevée pour les légumineuses d'altitude était plus forte qu'avec les légumineuses généralement trouvées en plaine, laissant supposer une bonne adaptation du complexe symbiotique aux conditions pédoclimatiques des Alpes (Jacot *et al.*, 2000b; Jacot *et al.*, 2005).

Une autre étude, menée cette fois dans les montagnes du Colorado à plus de 3000m d'altitude a montré, avec la même méthode, que 3 espèces de trèfles (*Trifolium dasyphyllum, T. nanum, T. parryi*) se procuraient entre 70% à 100% de leur azote via la fixation d'azote atmosphérique. Les mesures de réduction d'acétylène (ARA) sont également utilisées dans la littérature pour mettre en évidence des activités de fixation en milieu alpin (Encadré n°1). Johnson and Rumbaugh (1986) ont mesuré avec cette méthode la fixation de différentes espèces appartenant à 3 genres (*Lupinus*, *Trifolium*, *Astragalus)* sur des sites allant de 2700 à 3300 m d'altitude dans un massif à l'ouest des Etat-Unis. Ils ont obtenus des valeurs allant de 25,8 µmol par gramme de nodosité par heure pour *Lupinus caudatus*, jusqu'à 101 µmol d'éthylène g^{-1} h^{-1} pour *Astragalus alpinus*. A titre de comparaison, des valeurs de fixation entre 22 et 25 µmol g^{-1} h^{-1} ont été relevées chez 3 espèces *Lupinus luteus*, *L. angustifolius* et *L. cosentinii* en plaine (Trinick *et al.*, 1976), ce qui semble indiquer que les espèces fixatrices d'altitude auraient une efficience similaire à celle de leurs homologues de plaine.

Selon la composition du couvert végétal en espèce de légumineuse, des variations conséquentes de l'entrée annuelle d'azote ont été observées. En effet, Bowman *et al.* (1996) rapportent des valeurs de 127 mg par m^2 par an en prairie alpine humide, contre 810 mg par m^2 par an en toundra alpine, deux milieux présentant des espèces de *Trifolium* différentes. L'importance de la fixation symbiotique d'azote via les légumineuses dans les milieux alpins est comparable à celle du phénomène de déposition d'azote atmosphérique. Sievering *et al.* (1992) ont en effet évalué à 490 mg d'azote par m^2 par an le rendement de la fixation symbiotique pour 300-500 mg d'azote par m^2 par an pour la déposition atmosphérique, sur un même site d'altitude dans le Niwot Ridge. Il est alors intéressant de constater que le bilan d'entrée de la fixation/déposition, contrairement aux milieux de plaine où il y est bien inférieur, atteint dans les sols alpins des valeurs similaires à celle du taux de minéralisation net de l'azote (Rehder and Schäfer, 1978; Fisk and Schmidt, 1995; Jacot *et al.*, 2000b).

L'efficacité de la fixation de l'azote chez les légumineuses est sensible à certains facteurs abiotiques. La transplantation de légumineuses de prairie alpine en chambre climatique régulée à 22°C augmente les taux de fixation (Bowman *et al.*, 1996), témoignant ainsi d'un effet température de l'activité de fixation. L'activité de fixation des micro-organismes fixateurs dans les milieux arctiques a été décrite par ARA comme minimale entre 0 et 5°C, et maximale entre 15 et 20°C (Jordan *et al.*, 1978). Goodman (1988) observe également pour une même espèce de légumineuse (*Lolium perenne* L.) une fixation d'azote 4 fois moins

importante entre deux sites ayant environ 400 m d'altitude de différence, probablement dû à une saison de croissance plus longue. Des variations jour/nuit et saisonnières de l'activité de fixation ont été mises en évidence par ARA chez *Lupinus lepidus* sur le Mont St Helen (Washington, USA) avec (i) des taux d'éthylène plus bas la nuit, (ii) des taux haut en juin, (iii) des taux très bas en août correspondant à la période la plus chaude et sèche de la saison, et (iv) une résilience partielle de l'activité de la nitrogénase en septembre avec le retour des précipitations (Halvorson *et al.*, 1992). De telles variations journalières (Lawrie, 1981; Denison and Sinclair, 1985) et saisonnières (Hardy *et al.*, 1968; Lawrie, 1981; Kerle, 1985; Sprent, 1987) ont été démontrées par ailleurs sur d'autres légumineuses et dans d'autres localisations. Dans leur étude, Halvorson *et al.* (1992) ont également observé des taux d'azote fixé plus hauts sur les sites perturbés pauvres en azote indiquant un rétrocontrôle de l'activité de la nitrogénase en fonction de la disponibilité en azote dans le sol. Ce mécanisme de rétrocontrôle a par ailleurs été démontré génétiquement (pour une revue du mécanisme, voir Dixon and Kahn (2004)). Enfin, en mesurant les activités ARA de diverses espèces fixatrices réparties sur différents sites le long d'un gradient d'humidité, Wojciechowski and Heimbrook (1984) ont constaté une forte corrélation positive entre l'activité de fixation et l'humidité.

Avec l'augmentation de l'altitude, la contribution relative de la symbiose fixatrice d'azote par les légumineuses diminue tandis que celle des cyanobactéries, libres ou en symbiose avec des lichens, augmente. Ce changement est directement dû à une diminution de la proportion en légumineuses à plus haute altitude, probablement du fait d'une compétitivité réduite par des quantités d'azote disponibles moins limitantes en regard de la demande globale de l'écosystème (Jacot *et al.*, 2000b). Cette baisse de compétitivité des plantes fixatrices par rapport aux plantes non fixatrices a été démontrée par ailleurs dans d'autres milieux contenant des quantités d'azote suffisantes à la croissance végétale (Thomas and Harrison, 1987; Hebeisen *et al.*, 1997). Une condition physiologique inadaptée aux températures plus basses et/ou l'absence de souches *Rhizobia* compatibles à plus hautes altitudes pourraient également expliquer cette diminution de la contribution de la fixation légumineuse (Jacot *et al.*, 2000b). A très hautes altitudes (étage nival), les légumineuses sont en outre absentes (Körner, 2003). Dans les prairies des Alpes, Jacot *et al.* (2000a) ont ainsi observé que la contribution de la fixation d'azote symbiotique à l'entrée d'azote global diminue de 16% à l'étage montagnard à 9% à l'étage alpin du fait de cette abondance moindre (pas du fait d'une baisse d'activité).

2.1.4.2 Symbiose actinorhizienne

La symbiose actinorhizienne contribuerait à 25% de la fixation d'azote terrestre globale (Dixon and Wheeler, 1986). Les plantes actinorhiziennes jouent un rôle majeur de par leur

caractère de plantes pionnières et facilitatrices dans les écosystèmes pauvres en azote, notamment alpins bien qu'ayant faits l'objet de très peu d'études dans ces milieux-là. Deux genres végétaux sont principalement impliqués ; *Alnus* (*Betulaceae*) et certaines espèces de *Dryas* (*Rosaceae*) (Körner, 2004), en symbiose avec l'actinobactérie fixatrice d'azote *Frankia*. La littérature de la fixation actinorhizienne des milieux froids se concentre essentiellement sur le genre *Alnus* dans les zones sub-arctiques/boréales, dans des contextes de succession écologique. En termes d'entrée d'azote, cette symbiose avec les sous-espèces *Alnus viridis ssp. fruticosa* et *Alnus crispa* (espèce *Alnus viridis*) est connue pour jouer un rôle majeur dans le budget azoté des forêts boréales d'Alaska en climat subarctique continental (Rhoades *et al.*, 2001; Anderson *et al.*, 2004). Cet apport en azote a été estimé à 2,5-6,6 kg par hectare et par an pour *A. fruticosa* dans la forêt expérimentale de Bonanza Creek (65°N). Une augmentation des entrées d'azote directement liée à l'augmentation de la densité de peuplement a été par ailleurs démontrée dans cette étude. Ainsi, des mesures d'ARA sur *Alnus viridis ssp. crispa* affichaient des valeurs allant de 7 à 16 µmol de C_2H_4 par gramme de nodosité et par heure, selon le stade de succession (Anderson *et al.*, 2004). En conditions naturelles, aucune boucle de rétroaction ne semble avoir lieu sur les taux d'azote fixés en présence de grandes quantités d'azote disponible dans le sol (Menge *et al.*, 2009; Vitousek *et al.*, 2013). Une étude *in vitro* basée sur des cultures hydroponiques a montré que la croissance des nodosités de plants d'*Alnus viridis* était inversement corrélée à l'ajout de nitrate (Benecke, 1970). Cependant, les quantités d'azote utilisées dépassent les concentrations d'azote observées en milieu naturel. Les mesures de fixation par ARA sur les nodosités indiquent une augmentation progressive de l'activité de fin mai jusqu'à un maximum en fin juillet quand les températures sont maximales (Mitchell and Ruess, 2009b). Aucune donnée n'est disponible sur de possibles variations jour/nuit de la fixation sur cette espèce d'aulne.

Des saisonnalités comparables ont été observées chez deux autres espèces de zones climatiques plus douces d'Amérique du Nord, *i.e. Alnus tenuifolia* et *Alnus rubra*, ainsi qu'un maintien de cette activité de fixation même après la sénescence des feuilles (Tripp *et al.*, 1979; Uliassi and Ruess, 2002). Cette azote fixé est transmis dans le sol par la sécrétion d'exsudats azotés via les racines et les nodosités, ainsi que par la dégradation de la litière riche en azote résultant de la sénescence des feuilles d'aulne, constituant un apport en azote organique qui, une fois minéralisée, permet la nutrition des plantes sous le couvert de l'aulne (Binkley *et al.*, 1985; Wurtz, 1995; Vogel and Gower, 1998; Sharma *et al.*, 2002; Sharma *et al.*, 2009). La signature $\delta^{15}N$ des plantes pourtant non fixatrices, telle que *Dryas integrifolia*, comparable à celle de l'aulne témoigne de ce lien entre la fixation d'azote et la nutrition azotée (Rhoades *et al.*, 2001).

Malgré le statut emblématique de l'aulne vert (*Alnobetula* ou *Alnus viridis ssp. viridis*) dans les environnements alpins de l'hémisphère nord (Anthelme, 2001; Anthelme *et al.*, 2007) et sa large contribution au budget azoté de ces milieux de par son rôle de plante pionnière (Bühlmann *et al.*, 2014; Bühlmann *et al.*, 2016), une seule étude relativement ancienne a porté sur la fixation d'azote *in situ* de l'aulne vert (Benecke, 1970). Cette étude s'est basée sur des mesures de fixation de nodosités racinaires prélevées *in situ* sur des plants d'aulne vert préalablement établis 5 ans auparavant. Les nodosités une fois excisées ont été placées sous atmosphère enrichie en azote^{15}N. Après dosage de l'azote ^{15}N par spectrométrie de masse, l'auteur rapporte un optimum de température de 20°C pour la fixation, ainsi que des taux d'azote fixé supérieurs à 1300 m (≈ 16.6 µg N / gramme sec / heure) par rapport à 40 m d'altitude (≈ 6.2 µg N / gramme sec / heure) possiblement du fait d'une teneur en azote moindre dans les sols de hautes altitudes par rapport aux sols de plaine. La contribution de la fixation symbiotique à la nutrition azotée totale de l'aulne vert a par ailleurs été estimée à 98%, 32% et 17% pour respectivement 5, 50 et 100 ppm d'azote dans l'environnement de la plante.

De manière générale, l'apport d'azote dans les écosystèmes par la litière riche en azote des plantes fixatrices (Richard, 1967; Jacot *et al.*, 2000b, a; Sharma *et al.*, 2009) est très souvent associé à une augmentation des taux de nitrification, dénitrification (Pastor and Binkley, 1998; Kielland *et al.*, 2006), à des modifications des caractéristiques physicochimiques (*e.g.* acidification, appauvrissement en phosphore) des sols (Rhoades *et al.*, 2001; Mitchell and Ruess, 2009a), et *de facto* à des changements dans la composition des communautés biotiques (Halvorson *et al.*, 1992; Jacot *et al.*, 2005; Soudzilovskaia *et al.*, 2012; Bühlmann *et al.*, 2014). Ces impacts globaux sur les écosystèmes froids seront détaillés dans une section ultérieure centrée sur la symbiose actinorhizienne *Alnus-Frankia* (3.1.2).

2.2 Sortie d'azote

2.2.1 Dénitrification

La dénitrification est une respiration alternative ayant lieu en condition d'anaérobie qui permet de substituer à l'oxygène des formes oxydées de l'azote comme accepteur terminal d'électrons (Zumft, 1997). Lors de la dénitrification, l'azote subit une suite de réductions par différentes enzymes pour aboutir à la formation du diazote, libéré dans l'atmosphère (Zumft, 1997). Ce processus est par ailleurs la source majeure de N_2O dans les écosystèmes terrestres (Williams *et al.*, 1992). De par son rôle de gaz à effet de serre puissant (298 fois supérieure à une masse de CO_2 équivalente) (Forster *et al.*, 2007), les études de la dénitrification dans les écosystèmes sont pour la plupart centrées sur les émissions de N_2O, afin d'en comprendre les origines et d'en estimer les quantités. La dénitrification est

classiquement limitée en plaine par la disponibilité en substrat (NO_3^-), les basses températures et l'humidité du sol (Granli, 1994; Granli and Bockman, 1994; Elmi *et al.*, 2003). Une étude en zone alpine (Plateau tibétain, 3500m) montre que le taux de dénitrification augmente rapidement de juin à juillet avec un maximum de 0,65 mg d'azote par kilo de sol et par jour, pour un flux de N_2O mesuré à environ 100 µg par kg de sol par jour, et diminue ensuite jusqu'en septembre. Ces taux ont été corrélés à la quantité de NO_3^- disponible dans les sols (Gao *et al.*, 2008). Des sites riches en nutriments et de plus basse altitude (2000m) dans les Alpes Suisses ont montré des flux bien supérieurs pouvant atteindre 1,7 à 1,9 mg de N-N_2O par m² et par jour (Schürmann *et al.*, 2002).

La forte disponibilité en substrat liée à la pulsation de nitrate à la fonte des neiges au début du printemps est supposée contrebalancer l'inhibition enzymatique par les faibles températures. En ce sens, les flux de N_2O de sol saturé à 0°C ne sont pas significativement différents de ceux d'un sol saturé à 5 et 10°C. Des émissions de N_2O à faibles températures (-4°C) ont de plus été décrites (Hixson *et al.*, 1988; Malhi *et al.*, 1990; Struwe and Kjøller, 1990), supposant un maintien de l'activité de dénitrification en hiver sous le manteau neigeux isolant de l'air ambiant et entraînant une déplétion en O_2, dans des films d'eau non gelé du sol (Teepe *et al.*, 2001), et sans compétition avec les plantes en dormance (Schürmann *et al.*, 2002). Un flux de N_2O a lieu ainsi très tôt au printemps lors de la fonte des neiges, par libération physique du N_2O piégé jusqu'à lors par le gel et dans le manteau neigeux (Mosier *et al.*, 1993; Wagner-Riddle and Thurtell, 1998; Teepe *et al.*, 2001). L'eau de la fonte des neiges, en plus d'être riche en nutriments, crée également par saturation du sol des conditions d'anaérobie favorables à la dénitrification (Nyborg *et al.*, 1997).

Les pertes d'azote sous forme de N_2O du fait de la dénitrification peuvent représenter 30 à 50% du nitrate apporté par la fonte du manteau neigeux (Brooks *et al.*, 1996). En utilisant le ratio précédemment calculé dans la littérature de 9 N_2 pour 1 N_2O (Ryden *et al.*, 1979), des auteurs ont estimé que les pertes d'azote pendant l'hiver et le printemps pourraient être égales aux entrées liées à la déposition atmosphérique et pourraient représenter 50% des pertes annuelles sur le site du Niwot Ridge (3500 m) (Brooks *et al.*, 1996).

2.2.3 Lixiviation

De par des sols souvent peu développés, des apports d'azote par déposition de plus en plus important et de forts mouvements d'eau libre par les torrents et la fonte des neiges annuelles, les environnements de montagne sont particulièrement soumis à des pertes d'azote par lixiviation. Ces pertes sont principalement de l'azote inorganique (74 à 92% de l'azote), sous la forme dominante NO_3^- (Campbell *et al.*, 1995; Campbell *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 2001; Hood *et al.*, 2003). La forme NH_4^+ serait moins présente du fait d'une plus forte nitrification ou sorption dans le sol (Hood *et al.*, 2003).

Le paysage influe sur les concentrations en nitrate dans les courants d'eau libre. En effet, Hood *et al.* (2003) ont montré des taux en nitrate plus important dans les torrents des sites alpins peu végétalisés, à roche mère affleurant et à sol peu structuré, qui retiennent par conséquent très peu l'azote. Les pertes sont en revanche plus faibles dans les forêts subalpines à sols plus structurés, sauf si elles sont en aval d'un courant d'eau passant en zone alpine qui approvisionne en nitrate.

Les auteurs ont par ailleurs corrélé la qualité de la matière organique (C/N) aux teneurs en nitrate des courants d'eau. Des valeurs de C/N basses sont associées à des concentrations fortes en nitrate, probablement en lien avec l'augmentation de la nitrification dans les sols à C/N en dessous de 25 (Gundersen *et al.*, 1998). En dessous de la *treeline*, les C/N plus hauts sont associés à des concentrations plus faibles en nitrate dans les courants d'eau libre. Un modèle a été établi par Kopacek *et al.* (2005) prenant en compte le C/N, les taux de précipitation et de déposition ainsi que les propriétés physiques du sol, permettant d'expliquer 80% de la variance observée dans la concentration en nitrate dans 31 lacs alpins.

L'épaisseur et la dynamique du manteau neigeux influent également sur ces pertes par lixiviation. Le maximum annuel de lixiviation de NO_3^- a lieu à la fonte des neiges, par la libération de l'azote accumulé dans le manteau neigeux par déposition, et peut atteindre localement des valeurs de 60 µeq L^{-1} (soit environ 840 µg par litre) en toundra alpine. Le minimum a lieu en période de croissance, avec des valeurs en dessous du seuil de détection (Brooks *et al.*, 1998; Brooks and Williams, 1999). Les sols des zones n'ayant pas de couverture nivale restent gelés tout l'hiver, l'activité de minéralisation y est donc faible/nulle et la lixiviation d'azote forte *de facto*. De même, les sols des zones ayant une couverture nivale forte voir permanente certaines années ont très peu de production primaire à la saison de croissance (i.e. peu de substrats carbonés) et présentent donc un fort taux de lixiviation du NO3- stocké dans la neige.

Les environnements de montagne hébergent différentes espèces clé de voûte (Smith and Foggin, 1999; Smith-Mckenna *et al.*, 2013). Une espèce clé de voûte est une espèce dont l'abondance et l'activité déterminent l'intégrité d'un écosystème et sa stabilité, c'est à dire sa persistance inchangée au cours du temps (Paine, 1969; Mills *et al.*, 1993). Retirer une espèce clé de voûte d'un écosystème entraîne la disparition de certaines espèces, remplacées par de nouvelles et cet effet sur les communautés peut être direct ou indirect (Strauss, 1991; Bond, 1994; Lawton, 1994). Différents types d'espèce clé de voûte ont été décrits dans la littérature (Bond, 1994), notamment les espèces dites compétitrices et celles dites « system processors », c'est à dire qui hébergent un processus contribuant au fonctionnement de l'écosystème. Dans le cas des plantes compétitrices, il peut s'agir

d'arbustes à croissance rapide qui excluent rapidement les plantules des autres espèces ligneuses, notamment dans un contexte de succession écologique faisant suite à une perturbation. Dans le cas des espèces « system processors », il peut s'agir de plantes hébergeant par exemple un processus de fixation symbiotique d'azote. Vitousek and Walker (1989) ont mis en évidence des changements du milieu (*i.e.* pédologie, communautés végétales) en réponse à l'invasion d'un arbuste actinorhizien *Myrica faya* dans les champs de lave à Hawaï. L'entrée d'azote sur un site très colonisé par cette plante a été estimée à 18 kg par hectare et par an, alors que la somme cumulée des entrées originellement présentes sur ce site s'élève à moins de 4 kg par hectare et par an. Même s'il est difficile de distinguer l'effet compétiteur (exclusion compétitive des autres espèces) de l'effet fixation d'azote (changement des propriétés du sol), des modifications dans le cycle des nutriments et sur quelques espèces du milieu semblent bien attribuables à l'apport d'azote presque 4 fois supérieurs (Vitousek and Walker, 1989; Mueller-Dombois and Whiteaker, 1990). Du fait du brusques changement d'utilisation des sols (recul du permafrost, déprise agropastorale) et des conditions d'oligotrophie généralement observées, les environnements froids sont connus comme étant sensibles aux phénomènes d'invasion d'espèces natives ou non natives, notamment fixatrices d'azote (Hiltbrunner *et al.*, 2014). Parmi elles, l'espèce arbustive *Alnus viridis* (Chaix) DC. (1805) (ou aulne vert) a été particulièrement étudiée et son expansion décrite dans plusieurs régions du globe comme au nord de l'Alaska (Sturm *et al.*, 2001; Tape *et al.*, 2006; Myers-Smith *et al.*, 2011), l'ouest du Canada Arctique (Hudson and Henry, 2009; Hill and Henry, 2011), en Sibérie (Frost and Epstein, 2014) ainsi que dans les Alpes européennes (Anthelme, 2001; Anthelme *et al.*, 2002; Anthelme *et al.*, 2003; Anthelme *et al.*, 2007; Bühlmann *et al.*, 2013; Bühlmann *et al.*, 2014; Bühlmann *et al.*, 2016; Bühlmann *et al.*, 2017). L'aulne vert, présentant à la fois un statut compétiteur de par sa croissance rapide, et « system processor » de par sa fixation symbiotique d'azote, est une espèce clé de voûte des milieux de haute altitude/latitude (Anthelme, 2001).

3. Ecologie de la symbiose *Alnus viridis* et *Frankia*

Alnus est un genre ligneux anémophile de la famille des *Betulaceae*, distribué dans l'hémisphère nord et jusque dans les Andes de l'hémisphère sud (Ren *et al.*, 2010). Il est caractérisé par des inflorescences de type strobile, et sa capacité d'établir une relation symbiotique avec l'actinobactérie fixatrice d'azote *Frankia* (Benson and Silvester, 1993). Cette symbiose se caractérise par la formation sur l'aulne de nodosités racinaires pérennes, et à ce jour toutes les espèces d'aulnes étudiées sont nodulées. L'aulne pousse au sein d'habitats très variés comme les moraines glacières, les dunes de sable, les zones humides (marais, tourbières), les sols volcaniques, les zones ripariennes, les zones de glissement de terrain et les forêts d'altitude (Benson and Dawson, 2007).

Par analyse phylogénétique (région intergénique entre séquences ribosomiques 18S et le 5.8S), son aire géographique d'origine a été située dans le nord-est de l'Asie (Chen and Li, 2004). Un fort endémisme et le plus grand nombre d'espèce d'aulne sont observés dans cette région (Murai, 1964). Le plus vieux fossile de pollen assigné à l'aulne a par ailleurs été retrouvé au Japon et daté de la fin du Crétacé (83-85 millions d'années) (Miki, 1977). Le genre *Alnus* regroupe 29-35 espèces différentes, avec 9 espèces américaines, 4 à 5 espèces européennes et 18-23 espèces asiatiques (Murai, 1964; Furlow, 1979; Chen, 1994; Govaerts and Frodin, 1998). Ces espèces se répartissent dans trois sous-genres : *Alnus, Clethropsis* et *Alnobetula* (Chen and Li, 2004). Ce dernier, notamment représenté par l'espèce *Alnus viridis* (Chaix) DC. (1805) aussi nommé *Alnus alnobetula* ssp. *alnobetula* (Ehrh.) K. Koch, serait le plus proche de la forme ancestrale des aulnes (Navarro *et al.*, 2003) et est retrouvé exclusivement dans les milieux froids de la zone Holarctique (Benson and Dawson, 2007).

3.1 L'aulne vert

3.1.1 Généralités et distribution

L'aulne vert est une espèce ligneuse à port arbustif. Différentes sous-espèces d'*Alnus viridis* ont été décrites, toutes distribuées dans les zones froides de l'hémisphère nord, dont les 3 plus étudiées sont : *Alnus viridis* ssp. *viridis* dans les zones de haute altitude, *Alnus fruticosa* et *Alnus crispa* dans les zones de haute latitude (Figure 3).

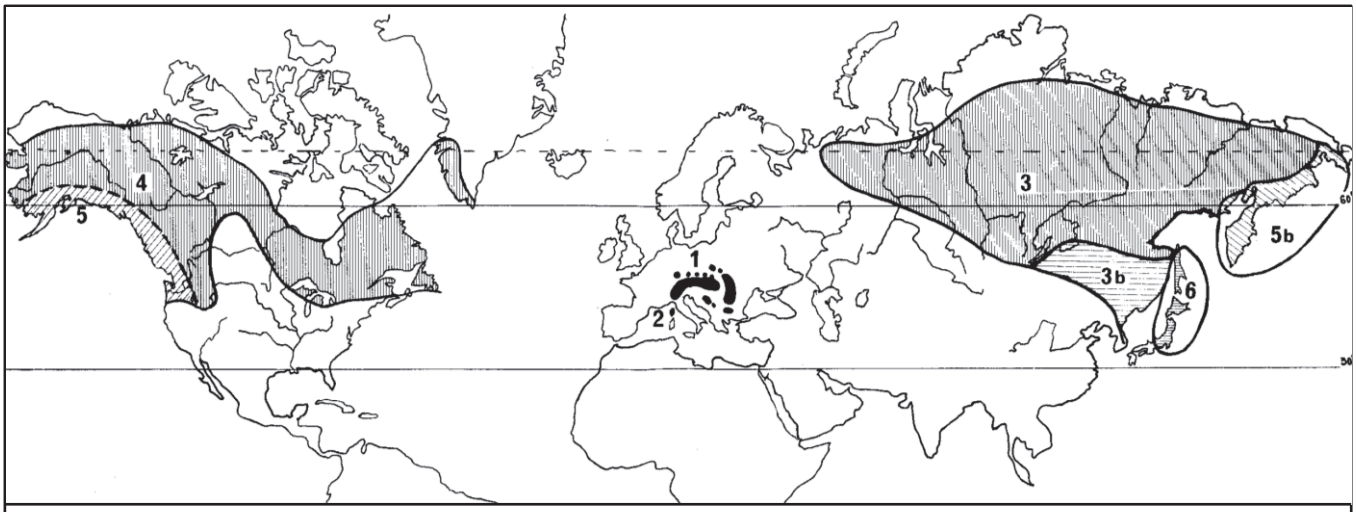


Figure 3. Répartition mondiale du complexe d'espèce *Alnus viridis* (d'après la thèse de L. Richard, 1966).

1 : *Alnus viridis ssp. viridis* (Chaix) – Alpes, Carpates, Forêt Noire

2 : *Alnus suaveolens* (Requien) – Corse

3 : *Alnus fruticosa* (Rupr.) – Asie du Nord-Est.

3b : *Alnus fruticosa* forme *mandshurica* (Callier) – Mandchourie

4 : *Alnus crispa* (Ait) – Amérique du Nord

5 : *Alnus sinuata* (Rydberg) – Côtes du Pacifique de l'Amérique du Nord

5b : *Alnus sinuata* forme *kamsatschatica* (Callier) - Kamstsacha

6 : *Alnus maximowiczii* (Callier) - Japon

L'*Alnus viridis* ssp. *viridis* est observé dans tout l'arc pré-/alpin européen, dans le massif des Carpates et dans le massif de la Forêt-Noire en Allemagne. L'*Alnus suaveolens* est une espèce endémique des montagnes de Corse. *Alnus fruticosa* est observé dans la zone asiatique. Sa répartition débute dans l'Oural du nord, et elle remonte jusqu'au 72ème parallèle dans la toundra de Sibérie centrale. Sa limite sud correspond au 48ème parallèle dans les Mont Altaï où il se développe à des altitudes subalpines. Un variant, *Alnus fruticosa mandshurica*, est présent dans la région de la Manchourie à l'est de la Chine. La distribution de l'*Alnus crispa* débute à l'extrême ouest de l'Alaska autour du 70ème parallèle et dans les montagnes du nord de la Californie (Rocheuses), passe par la région de la baie d'Hudson et des grands lacs et se termine au-delà du cercle arctique, sur les côtés sud-ouest du Groënland. L'*Alnus sinuata*, une sous-espèce d'*Alnus crispa*, se retrouve sur la côte nord-ouest des États-Unis et dans la région du Kamtchatkat (Russie). L'*Alnus maximowiczii* est une espèce endémique de l'archipel japonais. Il s'implante dans les zones humides ou en bord de rivière dans l'extrême nord du Japon et en montagne (1500-2500 m) dans les provinces à latitudes plus basses (*e.g.* Honshu, Kanto, Hokuriku).

3.1.2 Ecologie d'Alnus alnobetula

En conditions naturelles, l'aulne vert alpin est confiné sur les versants nord présentant une humidité suffisante en été, dans les ravines humides, les bords de torrent et les corridors d'avalanche (Richard, 1967; Hiltbrunner *et al.*, 2014). Les limites altitudinales se situent autour de 1100-1200 m pour peu que les conditions d'hygrométrie soient suffisantes, jusqu'à la « *treeline »* (Körner, 2012). Un optimum est généralement observé entre 1600 et 1900 m, avec les aulnaies les plus luxuriantes et continues le long de l'étage subalpin (Richard, 1967). Ces aulnaies vertes affectionnent peu les milieux stagnants, elles se développent généralement sur des sols peu développés et drainants du fait de la forte inclinaison de pente (Anthelme, 2001). En moyenne, la période de croissance de l'aulne vert n'excède pas 3 mois. D'après la littérature, l'aulne vert ne présente pas d'adaptation particulière pour faire face aux températures froides et à la sécheresse des milieux alpins. Ainsi sa répartition est fortement contrainte par des températures globalement basses. Celles-ci permettent de (i) limiter l'évapotranspiration, (ii) l'accumulation d'un manteau neigeux assurant un apport hydrique suffisant à la période de croissance, et (iii) une isolation contre le gel en hiver (Richard, 1967). Cela explique qu'il est rarement retrouvé au-delà de l'écotone sub-/alpin. En revanche, son port avec des troncs courbés vers l'amont et l'élasticité de son bois lui permet de résister aux avalanches relativement courantes du fait de la pente accentuée de ses zones de développement (Anthelme, 2001). Le succès reproductif de l'aulne vert dans ces milieux repose notamment sur un fort pouvoir de dissémination de ses akènes via divers agent (synthétisé dans Richard, 1967), une reproduction clonale par la formation de stolons permettant une régénération interne de l'aulnaie (Anthelme *et al.*, 2002), et une symbiose tripartite (endo/ectomycorhizienne et actinorhizienne) lui permettant une croissance rapide sur des zones perturbées défavorables pour les autres ligneux de montagne (Bühlmann *et al.*, 2014). Grâce à sa fixation d'azote atmosphérique, les feuilles d'aulne sont riches en azote, notamment celles de l'aulne vert présentant des taux 3 fois supérieur en moyenne à celles des autres espèces retrouvées en étage sub-/alpin (Richard, 1967; Huss-Danell, 1986; Chauvet, 1987; Taylor *et al.*, 1989). De par sa forte teneur azotée, la litière qui résulte de la décomposition des feuilles est connue pour modifier les propriétés physico-chimique du sol, et par voie de conséquence la diversité végétale puis animale, jusqu'à affecter le fonctionnement global des écosystèmes des milieux froids (Bühlmann *et al.*, 2014; Hiltbrunner *et al.*, 2014). Ces conséquences seront décrites dans une section ultérieure (*cf* 3.1.4 Impact de l'expansion de l'aulne vert).

3.1.3 Succession écologique et expansion

A haute altitude, dans les Alpes européennes, l'aulne vert (*i.e. Alnus alnobetula* ssp. *alnobetula*) se retrouve sous 3 différents stades écologiques de succession organisés généralement en aulnaies étendues et continues à la base de l'étage subalpin, en arbres isolés et de taille inférieure à l'écotone sub-/alpin et sous forme d'arbustes rabougris au début de l'étage alpin (Anthelme *et al.*, 2002). Cette succession écologique a été amorcée avec les bouleversements sociaux économiques de la fin du XXème siècle qui ont entraîné un changement du type et d'intensité des activités humaines dans l'arc alpin, et qui se sont traduits par une forte déprise agro-pastorale (Anthelme, 2001; Didier, 2001; Bühlmann *et al.*, 2017). En effet, les frontières des aulnaies étaient autrefois contraintes par les pressions de pâturage et la coupe pour l'utilisation comme bois de chauffage et de fumaison (Richard, 1967), mais l'abandon progressif des pratiques agro-pastorales au profit des activités industrielles et touristiques libère le front des aulnaies de la pression anthropique et entraîne un reboisement progressif par l'aulne des zones subalpines anciennement exploitées (Anthelme, 2001; Anthelme *et al.*, 2002). Entre 1980 et 2000, 33% des exploitations agricoles ont disparu, soit 4329 km^2 (-7,6%) de terre agropastorale abandonnée dans l'arc alpin (Streifeneder *et al.*, 2007; Ruffini *et al.*, 2009), entraînant une forte diminution des aires sub-/alpines de pâturage estivale. En Suisse par exemple, cela représente une diminution de près de 372 km^2 entre 1985 et 2009 soit 34,5% des aires de pâturage sub-/alpines (Schubarth and Weibel, 2013) (Hunziker *et al.*, 2017). Dans un même temps, l'expansion de structure végétale arbustive (essentiellement de l'aulne vert) a été décrite, notamment dans les Alpes Suisses avec une augmentation de 113 km^2 (+21%) entre 1983/85 et 2009/13 (Hunziker *et al.*, 2017). La surface recouverte par l'aulne vert était estimée à 50 000 ha en 2004/2006 d'après l'Agence Nationale des Forêts Suisse (Bühlmann *et al.*, 2014; Bühlmann *et al.*, 2016). La même expansion a été observée dans les Alpes françaises (Bartoli, 1966; Anthelme *et al.*, 2001; Didier, 2001; Anthelme *et al.*, 2002), bien qu'ayant fait l'objet de moins de relevés ces 30 dernières années. A la fin des années 90, l'aulne vert représentait 7% de la surface du Parc National de la Vanoise et doit représenter plusieurs dizaines de milliers d'hectares sur les départements de l'Isère, la Savoie et la Haute-Savoie (Anthelme, 2001).

Cette expansion s'effectue à partir de l'aulnaie dite primaire (dense, avec une canopée fermée) vers l'aval ou l'amont selon la localisation de l'ancien pâturage. Un stade transitoire dit d'aulnaie secondaire ou « mosaïque » est observé, avec la formation de bosquets épars d'aulnes qui se multiplient et s'épaississent jusqu'à occupation totale du milieu (canopée fermée) (Anthelme *et al.*, 2003), supplantant les tapis de petits arbustes du premier stade de succession, constitués principalement des genres *Vaccinium, Rhododendron* et *Calluna* (Bühlmann *et al.*, 2014; Bühlmann *et al.*, 2016) (Figure 4). Il est à noter que plusieurs études essentiellement centrées dans les Alpes Italiennes ont révélé par ailleurs un déclin conséquent de certaines aulnaies vertes (Pisetta *et al.*, 2012). Les causes de ce déclin seraient une attaque fongique (*Cryptodiaporthe oxystoma*) couplée à des modifications climatiques locales délétères telle qu'une réduction de l'épaisseur du manteau neigeux (Pisetta *et al.*, 2012). Néanmoins, ce phénomène ne semble pas être généralisable à l'ensemble de l'arc alpin ni contrebalancer la dynamique d'expansion actuelle.

Dans les environnements froids de hautes latitudes (60° / 70° N), une succession écologique impliquant une autre espèce d'aulne vert (*Alnus viridis* ssp. *sinuata*) a été bien décrite au sud-est de l'Alaska, dans le parc national de Glacier Bay. Cette succession fait suite au retrait rapide du glacier (0,4 km / an en moyenne) sur les 3 derniers siècles qui expose de vastes étendues de tillite glaciaire à la colonisation par les plantes (Cooper, 1923; Cooper, 1937; Goldthwait *et al.*, 1966). Différents stades de succession sont observés, chacun avec son couvert végétal spécifique (Chapin *et al.*, 1994). L'aulne vert intervient généralement à la moitié de la succession en excluant les *Dryas* et les *Epilobium*, deux groupes de plantes qui interviennent aux premiers stades de la succession, par l'ombrage et des effets physiques (enfouissement) et allopathiques de sa litière sur les germinations. Contrairement au milieu sub-/alpin, le stade aulnaie est la plupart du temps transitoire, remplacé en fin de succession par les *Picea* dont il facilite l'installation. Il existe néanmoins différents patrons de succession, variant en termes de composition en espèces et de durée des différents stades, et fonction de la première espèce ligneuse qui s'installe. Une population d'aulne peut aussi se maintenir si la colonisation s'est faite de façon précoce et atteint un stade de dominance avant l'arrivée de nouvelles espèces (Fastie, 1995). Sur le continent européen, le recul du permafrost sibérien et le changement de régime de température entraînent également une expansion d'*Alnus viridis* ssp. *fruticosa*, allant de 5 à 26% sur 5 écotones forêt-toundra (Frost and Epstein, 2014).

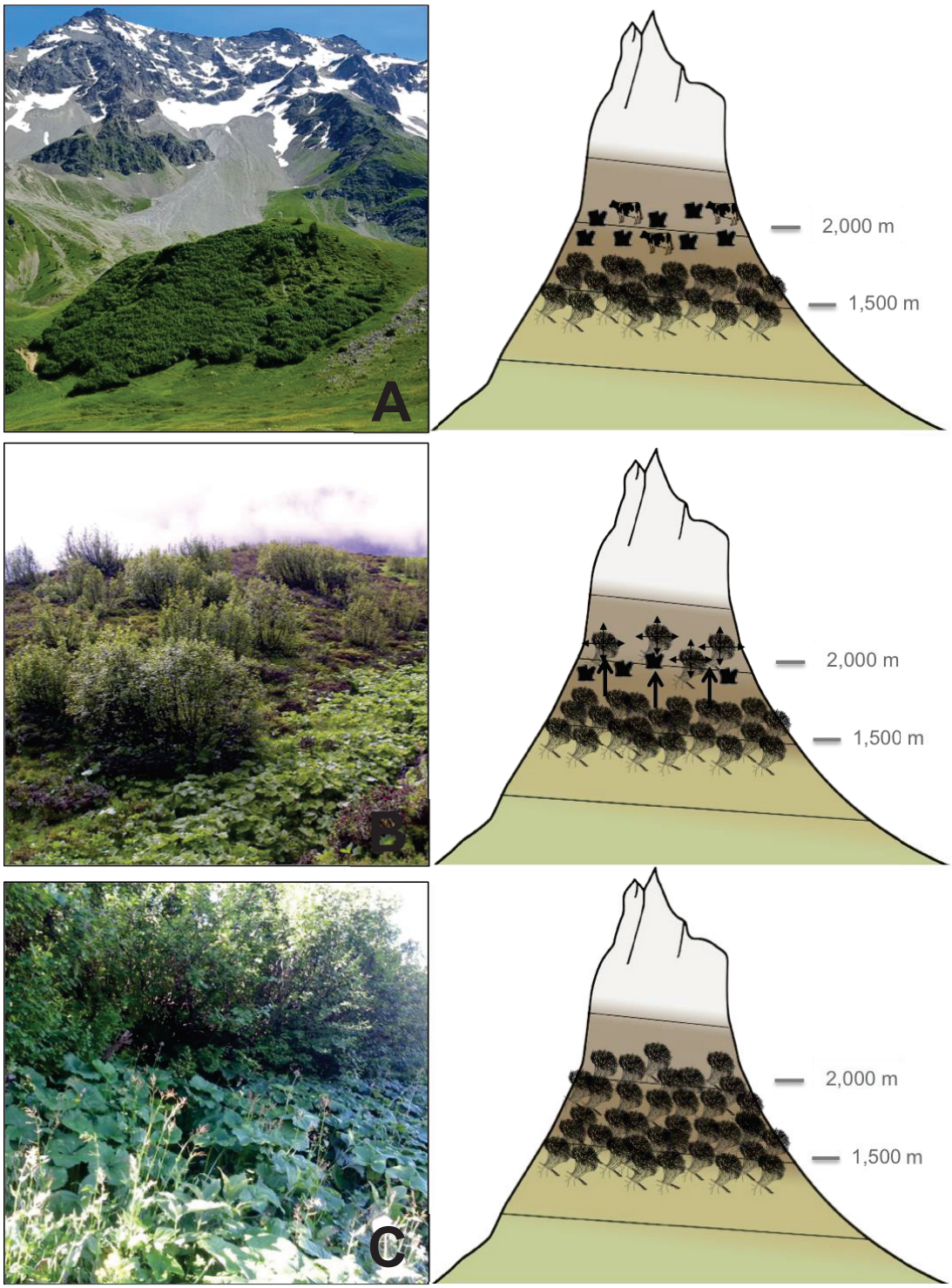


Figure 4. Dynamique de l'expansion d'*Alnus viridis* ssp. *viridis* sur les pâturages en déprise.

Photos personnelles réalisées au Col du Lautaret (Savoie, France). **(A)** Aulnaie primaire dont l'expansion est contenue par la pression de pâturage, permettant ainsi le maintien d'une prairie subalpine à forte richesse spécifique. **(B)** Bosquets éparses d'aulne vert en formation remplaçant progressivement la végétation de la prairie. Apparition aux abords des bosquets d'une végétation nitrophile spécifique et de faible diversité (mégaphorbiaie). **(C)** Fermeture de la canopée et disparition complète de la végétation d'origine.

3.1.4 Impact sur les écosystèmes des milieux froids

3.1.4.1 Modification des biodiversités végétales et animales

L'expansion de l'aulne vert, de par son caractère monopolistique (*i.e.* une espèce native qui colonise des zones de prairie en réponse à des changements environnementaux et qui génère un couvert dense empêchant la coexistence avec d'autres espèces) (Tilman and Pacala, 1993; Anthelme *et al.*, 2003), entraîne de profondes modifications de la biodiversité des prairies sub-/alpines de par l'uniformisation progressive du milieu (Niedrist *et al.*, 2009; Bühlmann *et al.*, 2014). La grande diversité floristique des prairies alpines laisse en effet place à une aulnaie monotone et continue. Ce mécanisme est bien connu dans le cas des forêts denses décidues (Escaravage *et al.*, 1996; Grimmond *et al.*, 2000). Cette baisse de diversité a par ailleurs été montrée comme plus forte sur les versants nord favorables à l'aulne, par rapport aux versants ouest défavorables à l'aulne et où la recolonisation des pâturages abandonnés se fait par d'autres espèces ligneuses (*Picea abies* et *Larix decidua*) (Freléchoux *et al.*, 2007). Les variations de biodiversité en lien avec l'avancée de la colonisation par l'aulne ont été particulièrement étudiées dans les Alpes Françaises. Anthelme *et al.* (2003) ont montré qu'aux premiers stades de colonisation (*i.e.* aulnaie secondaire recouvrant environ 25% de la prairie), une richesse spécifique plus importante était observée. Cette augmentation de diversité résulte de la coexistence temporaire d'une zone de prairie avec de nouveaux micro-habitats, créés localement par les aulnes mosaïques, et présentant de nouvelles conditions d'ombrage, d'humidité, de litière et de température. Les genres généralement retrouvés sous le couvert de ces aulnes sont *Adenostyles*, *Cicerbita, Rumex*, *Achillea* et *Thalictrum* (Bühlmann *et al.*, 2014) formant un couvert végétal spécifique et bien moins diversifié appelé mégaphorbiaie (Anthelme, 2001) (Figure 5). Au-delà de 25-30% de recouvrement, la richesse diminue progressivement avec l'expansion de l'aulne, jusqu'à fermeture de la canopée (Anthelme *et al.*, 2003; Koch *et al.*, 2015). Une couverture en aulnes de l'ordre de 50% entraîne une perte de moitié de la diversité initiale de la prairie alpine (Anthelme, 2001). Par ailleurs, sous la canopée des vieilles aulnaies vertes (centenaires), aucune autre espèce végétale n'est généralement présente, notamment du fait de l'enchevêtrement très dense de troncs et de racines d'aulnes (observations personnelles). Cette diminution de diversité végétale a été corrélée à une diminution de la biomasse et de la composition en arthropodes à la surface du sol, notamment trois ordres *Hymenoptera*, *Orthoptera* et *Coleoptera* (Anthelme, 2001; Koch *et al.*, 2015). Enfin, l'expansion de l'aulne menace également la diversité ornithologique de ces environnements, notamment le Tétras lyre, qui peine à nidifier dans les couverts d'aulne dense et à nourrir sa progéniture du fait de la diminution des populations d'arthopodes (Anthelme *et al.*, 2001).

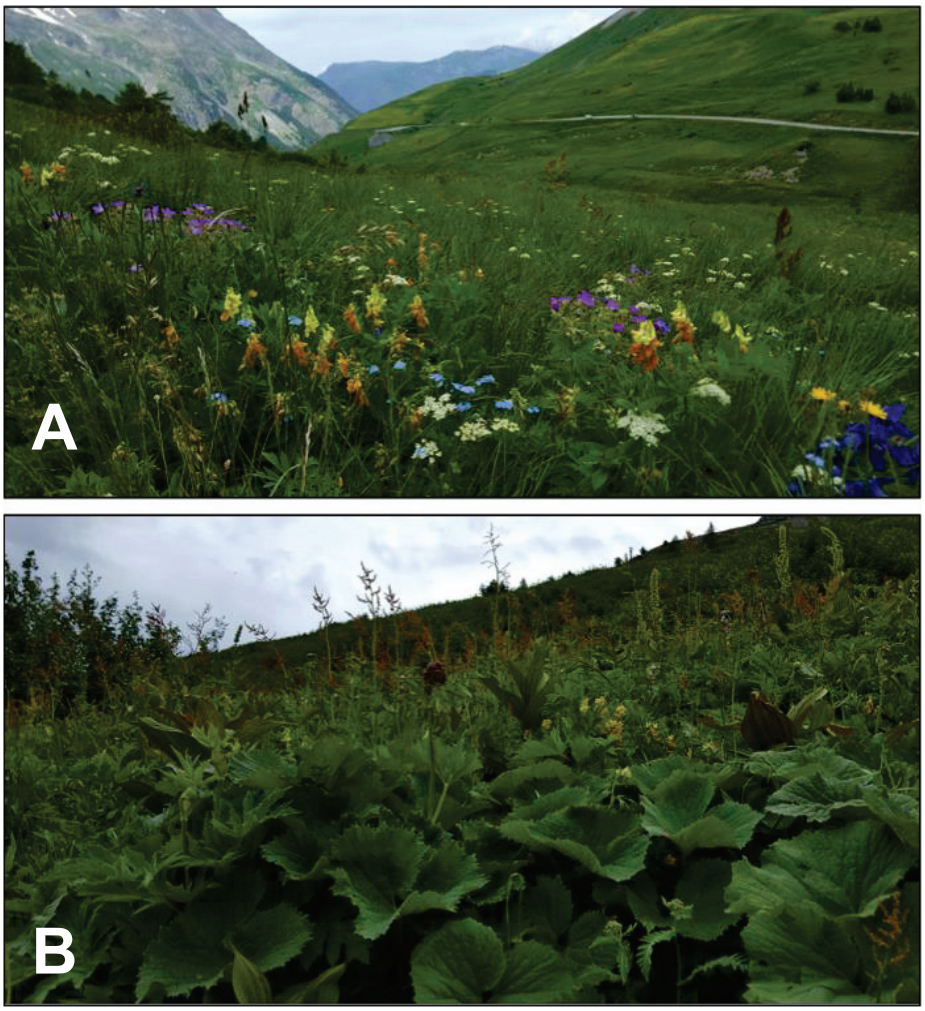


Figure 5. Effet de l'aulne vert sur la richesse floristique des prairies sub-/alpines.
Photos G. Schwob, prises au col du Lautaret (Savoie, France). Remplacement de la riche diversité floristique des prairies sub-/alpines **(A)** par la mégaphorbiaie **(B)** majoritairement composé du genre *Adenostyle*, en réponse à la colonisation de l'aulne vert et des modifications des propriétés pédologiques du sol associées.

3.1.4.2 Modifications du cycle de l'azote

En plus des effets sur la biodiversité, l'expansion de l'aulne modifie les propriétés du sol et les processus liés au cycle biogéochimique de l'azote du fait de sa litière enrichie par la fixation symbiotique. Une accumulation d'azote total est en effet observée sous une aulnaie de haute latitude et de haute altitude, contrastant avec la faible disponibilité et qualité (rapport C/N élevé) des nutriments rencontrés aux premiers stades de la colonisation (Rhoades *et al.*, 2001; Bühlmann *et al.*, 2014). La plus forte disponibilité en matière organique et sa meilleure qualité (rapport C/N bas) permet de limiter les carences en nutriments durant la période hivernale, ainsi qu'une augmentation des processus de

minéralisation et des stocks d'azote minéral dans le sol (Hart *et al.*, 1997; Kielland *et al.*, 2006; Mitchell and Ruess, 2009a; Hiltbrunner *et al.*, 2014). De plus, la concentration 5 à 25 fois supérieure en NO_3^- sous aulnaie par rapport aux pâturages adjacents indique une activité de nitrification également supérieure (Bühlmann *et al.*, 2016). Cet enrichissement très fort en azote minéral peut conduire à la saturation en azote du milieu (*i.e.* excès par rapport à la demande biotique et capacité de stockage en azote du sol) (Aber *et al.*, 1989) et ainsi conduire à des pertes importantes par lixiviation et/ou dénitrification. Par exemple, Bühlmann *et al.* (2016) ont montré des pertes en azote 10 fois supérieures sous aulnaie (1,76 g NO_3^--N par m²) par rapport aux pâturages (0,18 g NO_3^--N par m²), pertes se faisant à plus de 70% sous forme de nitrate et sur la période de juin à octobre. Cet excès en nitrate se retrouve ensuite dans les ruisseaux et bassins versants à proximité des aulnaies après des événements de précipitations en fin de saison de croissance (Bühlmann *et al.*, 2014; Bühlmann *et al.*, 2016; Mueller *et al.*, 2016).

En plus des pertes par lixiviation, ces fortes concentrations en nitrate favoriseraient les processus de dénitrification partielle ou totale entraînant des sorties d'azote gazeux (NO, N_2O et N_2) (Neff *et al.*, 1994). De telles pertes ont été décrites dans les écosystèmes fortement enrichis en azote, par exemple dans le cas de l'utilisation d'intrants dans les prairies (Abbasi and Adams, 2000; Dambreville *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2012), ou en réponse à l'invasion par une légumineuse fixatrice d'azote (Hickman *et al.*, 2010). Les aulnaies ont également été étudiées à ce titre. Mogge *et al.* (1998) ont rapporté dans une aulnaie de plaine au nord de l'Allemagne (*Alnus glutinosa*) des émissions moyennes variant de 0,8-7,3 kg de N-N_2O par ha et par an, soit plus de 12 fois les émissions d'une forêt de hêtres. D'autres études au sud de l'Allemagne et en Suisse rapportent des valeurs comparables (0,5-4,0 kg N-N_2O par ha et par an) (Eickenscheidt *et al.*, 2014; Bühlmann *et al.*, 2017). Dans une aulnaie blanche d'Estonie (*Alnus incana*), les émissions ont été évaluées à 73,8 kg N-N_2 par ha et par an, contre 0,05 kg N-N_2O par ha et par an (Uri *et al.*, 2011). Sous aulnaie verte alpine en Suisse, Bühlmann *et al.* (2014) font état de mesures d'émissions de N_2O de l'ordre de 4 kg par ha et par saison de croissance (juin-octobre), soit 35 fois plus que les émissions des pâturages adjacents sur la même période (données non publiées). Une étude plus récente des mêmes auteurs montre des valeurs de 4,2 kg N-N_2O par ha et par saison à altitude moyenne (1700 m), et de 1,2 kg N-N_2O à par ha et par saison à haute altitude (1900 m) (Bühlmann *et al.*, 2017). Des taux de fixation d'azote différent entre les deux aulnaies ont été supposés comme à l'origine des différences d'émissions de N_2O. Schürmann *et al.* (2002) ont mesuré à l'année sous une autre aulnaie verte à une même altitude (1960 m) des émissions comparables (0,9-1,2 kg N-N_2O par ha). De manière générale, les émissions de N_2O sous aulnaie alpine sont fortes en période de croissance (courant août), et fin mai, à la fonte des neiges. Ces émissions précoces à la fonte des neiges sont le résultat d'une activité

de dénitrification amplifiée par le redoux, la forte humidité et l'accès aux substrats azotés de la déposition atmosphérique, mais également de la libération du N_2O accumulé dans le sol pendant l'hiver du fait de l'activité de dénitrification faible mais maintenue sous le manteau neigeux (Schürmann *et al.*, 2002). De plus, un couvert nival insuffisant peut entraîner un gel des sols ce qui détruit une partie de la biomasse microbienne libérant ainsi des nutriments pour les communautés microbiennes survivantes (Schimel and Clein, 1996; Jaeger *et al.*, 1999), notamment dénitrifiantes, et sans compétition avec les plantes en surface en dormance à cette période de l'année (Schürmann *et al.*, 2002; Bühlmann *et al.*, 2017). La part de la perte d'azote ayant lieu par dénitrification complète (N_2) et celle ayant lieu par dénitrification partielle (NO, N_2O) restent cependant inconnues sous aulnaie verte.

3.1.4.3 Modifications des propriétés du sol

L'installation de l'aulne et sa persistance à long terme modifient profondément les propriétés physico-chimiques du sol. Les processus de nitrification et d'assimilation de l'ammonium par les plantes libèrent des protons dans le sol, ce qui diminue de façon significative le pH du sol sous aulnaie par rapport aux prairies sub-/alpines, 1 point en moyenne sur les 10 premiers centimètres de sol (Podrázský and Ulbrichova, 2003; Caviezel *et al.*, 2014) (Podrazsky *et al.* 2003, Caviezel *et al.* 2014. En outre, cette acidification est accentuée par la perte de cations du au processus de lixiviation du nitrate (Blume *et al.*, 2010). Les vieilles aulnaies peuvent ainsi atteindre des valeurs de pH très acide (pH ≈ 3).

Avec l'établissement de l'aulnaie, et au fur et à mesure de son vieillissement, la quantité de litière au sol augmente, ce qui accroît progressivement la quantité de matière organique particulaire et la quantité de carbone organique. Cet apport augmente la structure du sol, et diminue *de facto* sa densité (Caviezel *et al.*, 2014; Hunziker *et al.*, 2017). D'autres études dans des contextes de succession écologique en prairie subalpine mettant en œuvre des espèces fixatrices (*e.g.* la légumineuse *Cytisus balansae*) ou non fixatrices (genre *Pinus*) montrent au contraire des valeurs de carbone organique du sol inchangées ou diminuées au cours du temps (Montané *et al.*, 2007; Risch *et al.*, 2008). Ces pertes seraient liées à une diminution substantielle de la quantité d'azote par une litière à haut C/N et des phénomènes de lixiviation (Alberti *et al.*, 2011). Sous l'aulnaie, les conditions de forte humidité, faible température (différence de 7°C par rapport à l'air ambiant), avec une litière à faible C/N expliqueraient cette accumulation (Richard, 1967; Hunziker *et al.*, 2017). Enfin, un enrichissement en potassium est observé dans l'horizon du sol sous aulnaie. C'est le phénomène de remontée des minéraux, décrit par Richard (1967). L'aulne puise grâce à son système racinaire des minéraux qu'il concentre dans ses feuilles, enrichissant alors le sol lors de leur dégradation en fin de période de croissance.

Les fortes activités de fixation d'azote, bien que soulageant l'écosystème d'une limitation en azote, sont à l'origine d'une déplétion en phosphore dans le sol (Körner, 2003; Mitchell and Ruess, 2009a). Les plantes fixatrices d'azote sont également connues pour avoir une demande plus forte en phosphore par rapport aux plantes non-fixatrices (Ingestad, 1981; Sprent, 1987), notamment pour le développement des nodosités et l'activité de la nitrogénase (Huss-Danell, 1997; Vitousek *et al.*, 2002). Elles sont aussi responsables d'un « *turnover »* plus important du cycle du phosphore par des activités de phosphatases dans le sol plus élevées (Giardina *et al.*, 1995; Zou *et al.*, 1995). Les litières des légumineuses et actinorhiziennes sont ainsi décrites comme limitantes en phosphore, par rapport aux quantités d'azote apportées (Mitchell and Ruess, 2009a; Montané *et al.*, 2010). Plusieurs études ont montré une réponse positive au niveau de la nodulation, de la croissance des plantes et de la fixation chez des espèces légumineuses et actinorhiziennes en réponse à un apport de phosphore (Sanginga *et al.*, 1989; Ekblad and Huss - Danell, 1995; Uliassi *et al.*, 2000; Uliassi and Ruess, 2002). Par exemple, le phosphore limite la formation de nodosités chez *Alnus tenuifolia* dans une succession forestière en Alaska (Uliassi and Ruess, 2002). Les auteurs ont rapporté une augmentation de la fixation d'azote de 140±41 kg par ha et par an en réponse à l'apport de 215 kg de phosphore par ha sur 2 ans. Le seuil limitant la décomposition pour la valeur du ratio N sur P serait 15 (Prescott, 2005), tandis que Wall (2000) ont montré en culture hydroponique que l'apport d'une quantité d'azote entraînant un ratio N/P supérieur à 7 a un effet inhibiteur sur la nodulation chez *Alnus incana* ssp. *incana*. En conditions naturelles, le phosphore a été montré comme limitant pour l'activité de fixation chez *Alnus rugosa* sur une courte période à la fin de la saison de croissance (Gökkaya *et al.*, 2006). Aucune étude à ce jour n'a porté spécifiquement sur la litière d'*Alnus viridis* ssp. *viridis* en condition sub-/alpine, mais une carence en phosphore similaire à celle observée par Mitchell and Ruess (2009a) sous une aulnaie boréale à *Alnus viridis* ssp. *fruticosa* est attendue. Dans ce contexte de carence en phosphore, l'association d'*Alnus viridis* avec des champignons ectomycorhiziens apparaît comme essentielle pour assurer sa nutrition minérale en particulier en phosphate (Yamanaka *et al.*, 2003). La mycorhization des racines d'*Alnus viridis* permet une absorption du phosphate 5 fois plus rapide que des racines non-ectomycorhizées (Mejstrik and Benecke, 1969).

3.1.4.4 Persistance et blocage de la succession

En qualité de plante pionnière, l'aulne vert était supposé occuper les paysages suba-/alpins pour un temps transitoire, de plus ou moins un demi-siècle, ce qui correspond à sa durée de vie, et comme observé dans certains contextes de successions à haute latitude (*cf* section 3.1.2) (Hiltbrunner *et al.*, 2014). La littérature et les archives locales font pourtant état d'aulnaies pluri-centenaires, comme par exemple l'aulnaie de la vallée de l'Urseren en

Suisse décrite depuis 1748 (Hiltbrunner *et al.*, 2014), ou l'aulnaie de Champagny dans le Parc de la Vanoise des Alpes Françaises, supposée âgée de 400 ans (communication personnelle). Plusieurs facteurs sont à l'origine de ce blocage de la succession écologique. La canopée très dense de l'aulnaie verte prive fortement le sous-bois en lumière limitant la germination d'autres ligneux qui pourrait remplacer l'aulne, comme l'épicéa (Walker and Del Moral, 2003; Uesaka and Tsuyuzaki, 2005; Hiltbrunner *et al.*, 2014). Par ailleurs, à la fin de la saison de croissance, les grandes quantités de litière d'aulne peuvent, en plus de l'effet allopathique sur la germination, ensevelir les jeunes plantules se développant sous la canopée de l'aulnaie (Chapin *et al.*, 1994; Fastie, 1995; Hunziker *et al.*, 2017). Une ouverture locale dans le couvert de l'aulnaie par dépérissement d'un ou plusieurs individus est très rapidement refermée par reproduction clonale à partir des troncs adjacents et la mégaphorbiaie maintient durant ce lapse de temps une inhibition par ombrage et une occupation physique du sol (Hiltbrunner *et al.*, 2014). Enfin, dans ces sols de haute altitude, les grandes quantités d'azote introduite par la litière des aulnes permettraient le maintien de cette mégaphorbiaie sur plusieurs décennies (Körner, 2003; Gerzabek *et al.*, 2004; Bühlmann *et al.*, 2014; Hiltbrunner *et al.*, 2014). Cet excès d'azote dans les sols pourrait également être délétère pour les jeunes germinations des autres ligneux (Aber *et al.*, 1989).

A la suite de ces considérations, un volet reste cependant non abordé dans la littérature; celui des variations des biodiversités microbiennes spécifiques et fonctionnelles des milieux sub-/alpins en réponse à l'expansion du complexe symbiotique *Alnus*/*Frankia*. Par leur rôle de décomposeurs de la matière organique, les micro-organismes sont à la base du cycle biogéochimique de l'azote (McGrady-Steed *et al.*, 1997) et sont en grande partie responsables des modifications des propriétés du sol en réponse à l'expansion de l'aulne. Or, au début de ce travail de thèse, aucune étude n'avait été réalisée sur l'impact de l'aulne vert en termes d'écologie microbienne des sols de prairie sub-/alpines, ni sur les conséquences de son expansion sur la distribution et la diversité de ces partenaires symbiotiques bactériens et fongiques.

3.2 Frankia

3.2.1 Généralités sur Frankia

Frankia est une actinobactérie filamenteuse Gram positive et fixatrice d'azote. Sa première observation remonte à 1888 par Brunchorst et sa classification au sein des *Actinobacteria* fait suite aux travaux de Krebber en 1938 (Quispel, 1990). Ce genre est capable de former une symbiose avec 280 espèces végétales hôtes appartenant à 25 genres (23-29 selon la classification), parmi 8 familles de plantes angiospermes, regroupées sous le terme de

« plantes actinorhiziennes » (Wall, 2000; Wheeler *et al.*, 2008). Cette association durable se traduit par la formation de nodosités pérennes généralement racinaires d'origine végétale, qui hébergent les cellules bactériennes endosymbiotiques. Cette symbiose est classiquement décrite comme une association mutualiste à bénéfices réciproques pour les deux partenaires.

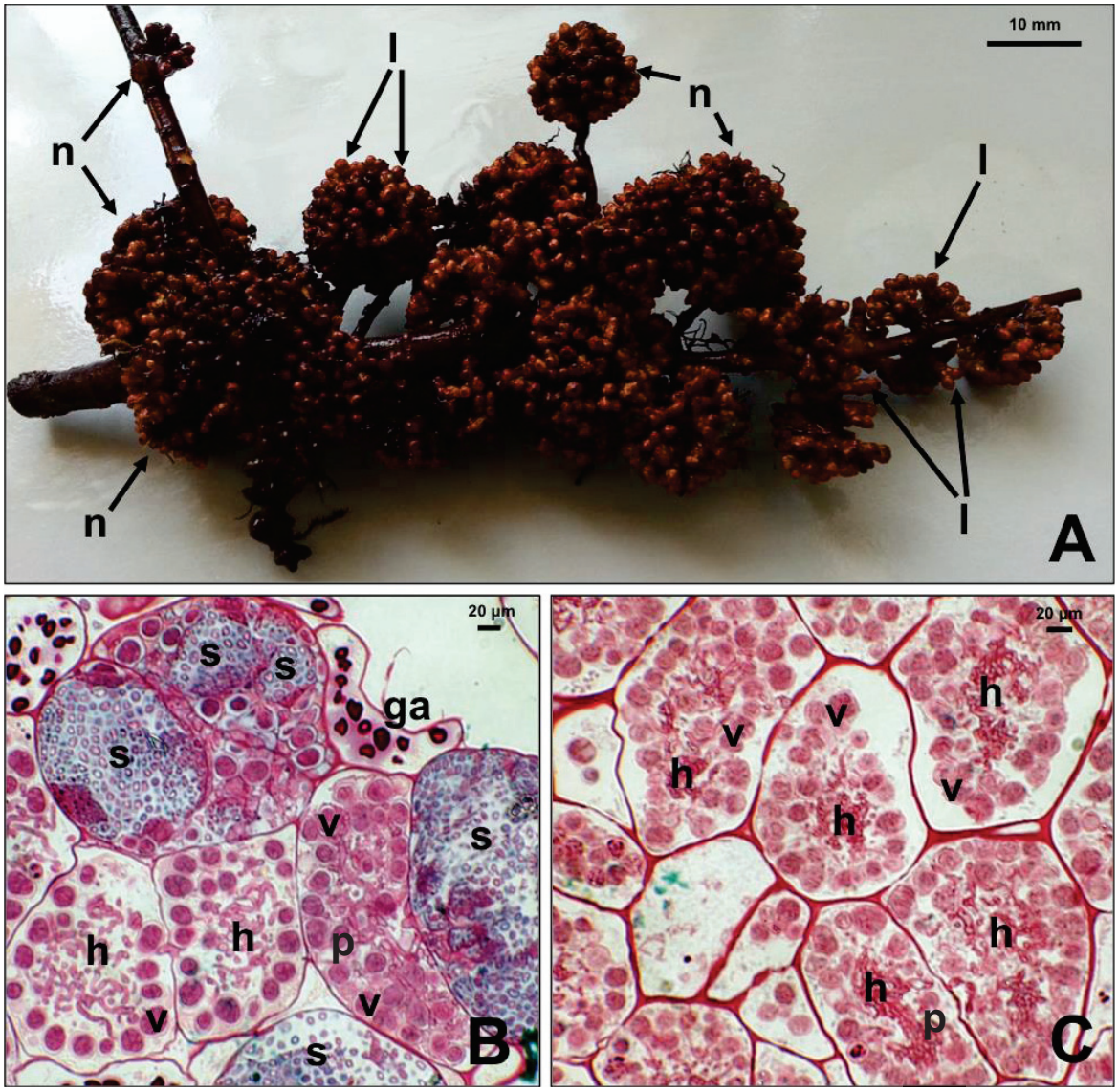


Figure 6. Nodosités actinorhiziennes et endosymbiote *Frankia.*

(A) Racine d'*Alnus glutinosa* portant de nombreuses nodosités (n), elles-mêmes composées de nombreux lobes (l). Les photos (B) et (C) représentent des coupes transversales semi-fines de nodosités racinaires d'*A. glutinosa*. Observations au microscope optique à transmission après double coloration Schiff-Vert-de-Malachite. (B) Nodosité Sp+. Les cellules végétales sont colonisées par une souche de *Frankia* qui forme des hyphes (h), des diazovésicules (v) et des spores (en bleues). (C) Nodosité Sp-. Seules les hyphes et les diazovésicules (en rouge) sont visibles. p, paroi des cellules végétales.

Photos microscopie A.C Pozzi. Photo macroscopie G. Schwob.

Dans la nodosité racinaire (Figure 6A), *Frankia* réduit le diazote atmosphérique sous forme de composés azotés organiques (NH_4^+ ou acide aminé) qui sont fournis à la plante, en échange de quoi la bactérie utilise les photosynthétats de la plante-hôte pour sa propre croissance (formation d'hyphes) et pour le processus enzymatique de fixation d'azote très coûteux en énergie (formation de diazovésicules). Toutes les souches du genre *Frankia* ne sont pas symbiotiques au sens strict (symbiose dite « facultative »), *Frankia* présente également la capacité de vivre de façon saprophytique (*i.e.* libre dans le sol) (Huss-Danell, 1997). Bien qu'étant ubiquiste même sur des sites dépourvus de l'hôte (Valdés, 2007; Samant *et al.*, 2016), certaines souches de *Frankia* spécifiques pourraient être plus abondantes en présence de leurs hôtes par rapport aux aires géographiques où les hôtes sont absents (Soltis *et al.*, 1995; Jeong and Myrold, 2001; Benson and Dawson, 2007), ce qui suggère différents niveaux de dépendance à l'hôte selon les souches de *Frankia.* Aucune donnée n'est à ce jour disponible sur comment *Frankia* vit à l'état libre dans le sol (Holman and Schwintzer, 1987). Certaines preuves indirectes nous amènent à penser que *Frankia* serait capable de vie saprophytique (Schwintzer, 1990). Des populations de *Frankia* vivant à l'état libre pourraient être également importantes au niveau des racines de plantes non-actinorhiziennes (Maunuksela *et al.*, 1999). Il n'y a cependant aucune donnée à ce jour nous permettant de conclure sur (i) une fixation libre de *Frankia* dans le sol rhizosphérique de manière associative en bénéficiant des exsudats racinaires de la plante à la façon d'autres genres bactériens fixateurs et non symbiotiques (*e.g. Azospirillum*), (ii) une quelconque spécificité dans la colonisation rhizosphérique, et (iii) si la fixation libre de *Frankia* a une contribution significative dans les entrées d'azote des écosystèmes (Wall, 2000).

Certaines souches de *Frankia* présentent la particularité de sporuler *in planta*, formant ainsi des sporanges à l'intérieur des cellules végétales. C'est à notre connaissance, le seul cas de sporulation endophyte parmi les micro-organismes associés aux plantes. On distingue donc deux phénotypes parmi les nodosités, le phénotype « spore-positif » (Sp+) qui contient dans les cellules végétales des nodosités de nombreux sporanges multilobés et le phénotype « spore-négatif » (Sp-) qui ne contient pas ou peu de sporanges (Schwintzer, 1990) (Figure 6B-C). La première observation de ces spores *in planta* a été faite par van Dijk and Merkus (1976), dans des nodosités racinaires d'aulne glutineux (*Alnus glutinosa*). Le phénotype Sp+ a depuis été décrit chez 9 genres de plantes actinorhiziennes sur les 25 connus (Torrey, 1987; Schwintzer, 1990): *Alnus* (*A. glutinosa*, *A. rubra*, *A. viridis*, *A. incana* et *A. cordata*), *Comptonia* (*C. peregrina*), *Myrica* (*M. cerifera* et *M. gale*), *Ceanothus* (*C. velutinus*), *Eleagnus* (*E. umbellata*), *Hippophae* (*H. rhamnoïdes*), *Casuarina* (*C. cunninghamiana*, *C. equisetifolia*, *C. glauca*, *C. obesa*), *Purshia* (*P. tridentata*) et *Dryas* (*D. drummondii*).

3.2.2 Phylobiogéographie des souches de Frankia infectant l'aulne

3.2.2.1 Phylogénie et facteurs biogéographiques confondants

Les souches de *Frankia* associées à l'aulne sur lesquelles porte ces travaux de thèse se regroupent phylogénétiquement au sein d'un même cluster (cluster I), avec les souches associées aux *Myricaceae* et aux *Casuarinaceae* (Soltis *et al.*, 1995; Huss-Danell, 1997; Benson and Clawson, 2000). Une phylogénie des souches de *Frankia* infectant l'aulne a récemment été reconstruite par Pozzi *et al.* (2015) par une approche MLSA (Multilocus sequence analysis) sur 3 gènes de ménage (*pgk*, *dnaA* et *ftsZ*). Cette étude a montré que les souches de *Frankia* Sp+ associées à l'aulne étaient, au sein du cluster I, phylogénétiquement divergentes des souches Sp-. Les auteurs ont en outre montré une occurrence deux fois plus importante des *Frankia* Sp+ dans les zones de latitude ou altitude élevées, associées aux espèces *Alnus incana* (*Alnus incana* ssp. *incana* et *Alnus incana* ssp. *tenuifolia*) et *Alnus viridis* (*Alnus viridis* ssp. *viridis*, *Alnus viridis* ssp. *crispa*, *Alnus viridis* ssp. *suaveolens*), par rapport aux milieux de plaine de plus basse latitude, dans lesquels des souches Sp- étaient prédominantes et associées à l'espèce *Alnus glutinosa*. Les aulnes des régions de l'Alaska, du Québec, des Alpes Françaises, des montagnes de Corse présentent principalement des souches de *Frankia* Sp+ dans leurs nodosités et ces souches sont phylogénétiquement très proches voir clonales (Pozzi *et al.*, 2015; Pozzi *et al.*, accepted 2018).

Dans leur étude, Pozzi *et al.* (2015) montrent également que les souches de *Frankia* se regroupent en clades d'une même espèce d'aulne d'origine (clade 1a à *Alnus viridis*, clade 1b à *Alnus incana*, clade 5 à *Alnus glutinosa*) suggérant que le facteur espèce-hôte est un facteur explicatif de la phylogénie et qu'une co-spéciation avec leur hôte pourrait avoir eu lieu dans l'histoire évolutive des souches Sp+. Aucune congruence phylogénétique entre cette phylogénie et la phylogénie de l'aulne ne supporte cependant cette hypothèse (Navarro *et al.*, 2003; Chen and Li, 2004; Ren *et al.*, 2010). Il est à noter que dans cette étude, les facteurs espèce-hôte et climat sont confondants. En effet, les différentes espèces d'aulne sont distribuées selon un gradient d'altitude se traduisant par des habitats différents en termes de température, de précipitation et d'ensoleillement. Ainsi, la prédominance des souches Sp+ dans les milieux froids (sub-/alpin, subarctique) peut être due à une sélection par les conditions pédoclimatiques et/ou par l'hôte *Alnus viridis*.

3.2.2.2. Déterminismes abiotiques environnementaux

Très peu d'études se sont intéressées par ailleurs aux déterminismes environnementaux de la sporulation de *Frankia* et aux causes expliquant la biogéographie des souches Sp+. L'hypothèse émise quant à la biogéographie des Sp+ est que la capacité de sporulation *in*

planta constituerait une adaptation aux milieux froids (Kurdali *et al.*, 1989; Pozzi *et al.*, 2015). Les spores des souches Sp+, résistantes et au métabolisme ralenti, permettraient une meilleure survie face aux conditions pédoclimatiques de ces milieux (ampltitudes thermiques importantes, cycles de gel/dégel, exondation, etc…) par rapport aux souches Sp- à croissance saprophytique. Par ailleurs, la dissémination des spores dans le sol sous l'effet des mouvements d'eau libre (*i.e.* fonte des neiges) est supposée plus efficace que la dispersion des structures hyphales. A ce jour, une seule étude sur l'hôte actinorhizien *Myrica gale* a pris en compte deux variables bioclimatiques (nombre moyen de jours de gel par an, durée de la saison de croissance) et une variable géographique (altitude du site) pour tenter de les corréler à la présence de nodosités Sp+ (Kashanski and Schwintzer, 1987).

Quelques facteurs pédologiques ont été corrélés dans la littérature à la prévalence des souches Sp+. Holman and Schwintzer (1987) ont montré par un échantillonnage de nodosités sur 29 sites à *Alnus incana* ssp. *rugosa*, que les nodosités Sp+ sont majoritairement retrouvées sur les sites à pH inférieur à 4 et sur lesquels l'hôte persiste durablement. Un effet pH similaire a été observé par Markham and Chanway (1996) sur les nodosités d'*Alnus rubra*, ainsi qu'une légère contribution de la quantité d'azote total (36,4%) et de phosphore (28,5%) du sol dans la variance de la fréquence Sp+ observée. Kashanski and Schwintzer (1987) ont observé, en plus de l'effet du pH, une corrélation positive entre l'occurrence de nodosités Sp+ et la quantité de matière organique dans le sol. Ces corrélations à faibles coefficients de détermination restent de fait très hypothétiques et n'ont été observées que sur un petit nombre d'espèces d'aulne et de sites étudiés.

3.2.2.3 Déterminisme de l'espèce plante-hôte

Bien que les souches de *Frankia* infectant l'aulne aient été décrites pour avoir un spectre d'infection assez large au sein de leur cluster (*i.e.* cluster I) car étant capables de s'associer avec les genres *Myrica* et *Comptonia* (Baker, 1987), il semblerait que cette observation ne soit pas généralisable aux souches Sp+. En effet, certaines souches Sp+ présentent un spectre d'hôte limité : par exemple, les souches Sp+ infectant *Alnus incana* forment des nodosités efficientes sur *Alnus incana* (fixatrices d'azote), non-efficientes (non fixatrices) sur *Alnus glutinosa*, une espèce-hôte pourtant génétiquement proche, et ne forment aucune nodosité sur *Alnus nitida* (Weber *et al.*, 1987; Kurdali *et al.*, 1988; van Dijk *et al.*, 1988; Kurdali *et al.*, 1989). Au contraire, les souches Sp+ infectant l'*Alnus glutinosa* infectent également l'*Alnus incana* et forment des nodosités efficientes (fixatrices d'azote) (Cotin-Galvan *et al.*, 2015). De même, les souches Sp+ d'*Alnus rubra* sont capables d'infecter l'*Alnus crispa* et l'*Alnus rugosa*, et les souches Sp+ d'*A. rugosa* sont capables d'infecter l'*A. rubra* et l'*A. crispa*, avec cependant des différences significatives dans le nombre de nodosités formées et l'efficience de fixation (Markham, 2008). Contrairement aux souches

Sp+, les souches Sp- infectant l'*Alnus glutinosa, A. incana* et *A. viridis* ne présentent pas, aux vues de leur niveau d'infectivité, de spécificité différente vis-à-vis des hôtes *A. glutinosa* et *A. incana* (Cotin-Galvan *et al.*, 2015). Ainsi, les souches Sp+ et les souches Sp- présentent des spécificités différentes à leurs hôtes, supposant un effet plante-hôte différent sur leur distribution respective.

3.2.3 Distinctions dans l'écologie des Frankia Sp+ et Sp- infectant l'aulne

Le genre *Alnus* est, avec *Myrica* sp., le genre le plus étudié en ce qui concerne la sporulation *in planta* de *Frankia* (Tjepkema *et al.*, 1986; Pozzi *et al.*, 2015).

3.2.3.1 Fixation

La capacité de *Frankia* à fixer le diazote atmosphérique en symbiose pourrait être impactée par la présence ou l'absence de spores. La formation de sporanges qui utilise une partie des photosynthétats de la plante et qui limite la place pour les diazovésicules dans la cellule, pourrait être corrélée à une diminution de l'activité de la nitrogénase localement dans la nodosité racinaire. Les premières mesures d'activité réductrice de l'acétylène entre des plants d'aulne infectés par une souche Sp+ et une souche Sp- concluent que la sporulation n'influence pas le niveau d'activité de la nitrogénase (Akkermans and van Dijk, 1976; van Dijk, 1978). Cependant, d'autres études *in vitro* ont montré par la suite une diminution de l'activité réductrice de l'acétylène dans les nodosités Sp+ de plants d'*Alnus* (Hall *et al.*, 1979; Maynard, 1980; Normand and Lalonde, 1982; Burggraaf and Shipton, 1983; Schwintzer, 1990) et de *Comptonia* et *Myrica* (Vandenbosch and Torrey, 1984; Monz and Schwintzer, 1989). Une étude de terrain sur *Alnus rubra* a également suggéré que les nodosités Sp+ seraient moins efficientes pour la fixation d'azote (Malcolm *et al.*, 1985). La plupart des études comparant la physiologie des nodosités Sp+ et Sp- tendent donc à montrer que les nodosités Sp- ont une activité nitrogénase supérieure à celle des nodosités Sp+ et que les souches Sp- supportent ainsi mieux la croissance de la plante hôte en milieu dépourvu d'azote (Vandenbosch and Torrey, 1984; Monz and Schwintzer, 1989). Ces conclusions restent cependant à nuancer selon le substrat sur lequel se développent les plantes nodulées. Kurdali *et al.* (1990) ont en effet montré une activité nitrogénase plus forte dans les nodosités Sp+ que dans les nodosités Sp- lorsque les plantes poussent en hydroponie, alors que l'inverse est mesuré quand elles poussent sur du sol. Ceci suggère que certains facteurs liés au sol pourraient affecter l'efficience de la fixation des différentes souches de *Frankia* et que des mesures directes sur des nodosités de terrain dans différents contextes environnementaux sont à préconiser. Enfin, par des mesures de respiration, le coût énergétique mis en jeu lors de la fixation d'azote a été rapporté comme plus faible dans les nodosités Sp- que dans les nodosités Sp+ (Schwintzer, 1990). Les nodosités racinaires Sp+

sur *Myrica gale* et *Comptonia peregrina* ont en effet un taux de respiration plus élevé par unité d'activité de nitrogénase que dans les nodosités Sp- (Normand and Lalonde, 1982; Vandenbosch and Torrey, 1984; Monz and Schwintzer, 1989). Les plantes présentant des nodosités Sp+ subiraient ainsi un coût énergétique lié à la fixation plus important que les nodosités Sp-. Elles investiraient donc plus de biomasse carbonée dans les nodosités Sp+ pour compenser partiellement la plus faible activité nitrogénase des nodosités Sp+ (Monz and Schwintzer, 1989).

3.2.3.2 Infectivité et compétitivité

A la sénescence des nodosités racinaires, les spores représenterait un grand nombre de particules infectieuses permettant une infectivité et une compétitivité accrue des souches Sp+ en se dispersant l'environnement sol (Markham, 2008). En effet, il a été montré à ce titre que les spores provoquent par contact la déformation du poil racinaire chez *Alnus*, première étape de l'association symbiotique (Mansour *et al.*, 1990), et qu'un composé racinaire de la plante-hôte peut stimuler la germination de spores de *Frankia* en hyphes, qui peuvent à leur tour induire de nouvelles infections (Tzean, 1989; Zimpfer *et al.*, 2002; Krumholz *et al.*, 2003). Plusieurs études *in vitro* ont comparé l'infectivité de biomasses identiques de nodosités broyées Sp+ et Sp- sur le genre *Alnus*. Toutes rapportent que le broyat Sp+ forme un nombre de nodosités 100 à 2000 fois plus important que le broyat Sp-, concluant ainsi sur une infectivité 100 à 2000 fois supérieures des souches de nodosités Sp+ par rapport aux souches de nodosités Sp- (van Dijk, 1978; Houwers and Akkermans, 1981; Torrey, 1987; Quispel, 1990; Cotin-Galvan *et al.*, 2015). Outre la différence en termes de quantités de particules, nous pouvons faire l'hypothèse que la qualité des propagules des Sp+ est également supérieures à celle des propagules des Sp- (Pozzi *et al.*, 2015). Par exemple, les spores de *Frankia* Sp+ pourraient avoir un pouvoir infectieux plus important par rapport aux structures hyphales et vésicules qui constituent les nodosités des souches Sp-. Aucune étude qualitative de l'infectivité des différentes propagules des souches Sp+ et Sp- (article, vésicule, spore) n'a été réalisée à ce jour. Cependant, des spores isolées d'une culture de *Frankia* Sp- ont été montrées plus infectieuses que les hyphes (Burleigh and Torrey, 1990).

Peu de données dans la littérature abordent la compétitivité des souches Sp+ et Sp- vis à vis d'une plante-hôte. Kurdali *et al.* (1990) a rapporté une plus forte compétitivité d'une souche Sp+ indigène du sol par rapport à une souche Sp- introduite dans ce même sol. Ces observations sont à nuancer du fait de la présence dans le sol d'un certain nombre facteurs pouvant potentiellement inhiber la souche Sp- introduite. Une étude plus récente de Cotin-Galvan *et al.* (2015) a comparé la compétitivité *in vitro* de deux souches Sp+ et deux souches Sp- pour l'infection d'*Alnus glutinosa*, avec des co-inoculations de différents ratios

de biomasses en nodosités Sp+ et Sp-. Quel que soit la souche Sp- et le ratio, les souches Sp+ ont été retrouvées dans 98% des nodosités formées traduisant une compétitivité notablement supérieures des souches des nodosités Sp+.

3.2.4 Vie dans le sol, persistance temporelle et dissémination spatiale

Comme énoncé précédemment (*cf* section 3.2.1), certaines souches de *Frankia* seraient capables de vie saprophytes dans les sols, sans partenaire symbiotique végétal. Les souches provenant de nodosités de *Frankia* Sp- pouvant être cultivées *in* vitro dans des milieux de composition simple (Van Dijk, 1984; Weber, 1986; Holman and Schwintzer, 1987; Schwintzer, 1989), l'hypothèse est que ces souches vivant à l'état libre seraient Sp-. Des particules infectieuses de *Frankia* ont ainsi été mises en évidences dans des sols où une plante-hôte n'a jamais été présente ou n'y pousse plus de longue date (Baker and Schwintzer, 1990). Ces souches présentes dans de nombreux sols même en l'absence d'hôte compatible seraient donc Sp- (Maunuksela *et al.*, 1999), et elles seraient à l'origine des premières associations symbiotiques à l'arrivée d'une plante-hôte, notamment sur des sites perturbés (Van Dijk, 1984; Holman and Schwintzer, 1987; Schwintzer, 1989). Ces particules infectieuses pourraient être des articles ou des spores qui survivent dans le sol, sans croissance saprophytique.

Contrairement aux souches Sp-, il n'y a aucune preuve de vie saprophytique des souches Sp+, qui restent à ce jour non cultivées et difficilement isolables (Normand and Lalonde, 1982). Les souches Sp+ persisteraient à l'échelle d'un site donné exclusivement dans les nodosités des plante-hôtes, dans lesquelles elles formeraient de nombreuses spores (Houwers and Akkermans, 1981; Van Dijk, 1984; van Dijk *et al.*, 1988). A la sénescence de la nodosité, les spores seraient libérées dans l'environnement sol et capables de disperser, de germer et ré-infecter les racines des hôtes alentours (van Dijk, 1978; Houwers and Akkermans, 1981; Schwintzer, 1990). La littérature ne fait état d'aucune preuve de croissance de souches Sp+ dans le sol. Ainsi, la persistance de souches Sp+ serait donc conditionnée par la présence continue d'un hôte compatible (Weber, 1986; Schwintzer, 1990). L'absence d'isolement et de culture pure *in vitro* de *Frankia* Sp+, alors que de nombreux isolats de souches Sp- sont disponibles par ailleurs, laisse supposer que ces souches Sp+ auraient une plus forte dépendance à l'hôte et auraient évolué vers une symbiose obligatoire (Schwintzer and Tjepkema, 1990). De plus, la faible variabilité génétique des souches Sp+ dans les nodosités racinaires à l'échelle d'une aulnaie, leur regroupement phylogénétique en fonction de l'espèce-hôte sur laquelle les nodosités ont été prélevées (Pozzi *et al.*, 2015) et leur spécificité d'hôte plus restreinte (*cf* section 3.2.2., déterminisme de l'espèce plante-hôte) appuieraient en faveur de l'hypothèse du « symbiote obligatoire ».

Sous cette hypothèse, le stade de développement dans la plante-hôte serait la seule phase de croissance active du cycle de vie de *Frankia* Sp+. Ainsi, la phase en dehors des cellules de l'hôte représenterait pour ces souches un stade critique en termes de disséminations et survie, pour lequel la formation de spores serait une adaptation écologique majeure. Les spores de *Frankia* sont zoochores, hydrochores (Chaia *et al.*, 2005) et vraisemblablement anémochore (Dawson, 2007). Cependant, aucune étude n'a à ce jour comparé le potentiel de dissémination des propagules infectieuses de *Frankia* Sp+ et Sp- dans le sol, afin d'établir si la formation de spores permet une meilleure dispersion spatiale notamment dans les sols des zones boréales et sub-/alpines où les *Frankia* Sp+ sont prédominantes. Peu d'étude ont porté sur les capacités de résistance des spores de *Frankia* Sp+. Elles ont été démontrées résistantes à la dessiccation. Des préparations de spores séchées peuvent survivre et rester infectieuses (Rodriguez-Barrueco, 1968; Burleigh and Torrey, 1990; Tortosa and Cusato, 1991). L'existence de propagules résistance de *Frankia* avec une certaine capacité de survie à long-terme, a été supposée après l'observation d'une nodulation significative chez des aulnes inoculés avec des sédiments prélevés à 40m de profondeur et âgés de 50 ans (Huss-Danell *et al.*, 1997; Chaia *et al.*, 2005). La résistance des spores de *Frankia* Sp+ aux fortes amplitudes thermiques et aux cycles de gel/dégel, caractéristiques des milieux boréaux et sub-/alpins n'a pas été testé à ce jour.

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE I : PHYLOBIOGEOGRAPHIE DES SOUCHES DE FRANKIA SP+

Préambule

Alors que la biogéographie des macro-organismes existe depuis la fin du 18ème siècle, avec la publication d'un essai sur la géographie du vivant par Georges-Louis Leclerc de Buffon, les premières études des patrons de distribution spatiale des micro-organismes ne sont apparues que plus récemment, notamment avec la célèbre hypothèse de Martinus Beijerinck et Lourens Baas Becking (1934) « Everything is everywhere, but the environment select » (« Tout est partout mais l'environnement sélectionne »). L'hypothèse était basée sur le fait que la petite taille et la capacité à former des stades dormants (spores) chez les procaryotes, faciliterait leur dispersion spatiale par l'air, la poussière et les animaux migrateurs, et permettrait leur survie temporelle dans des conditions environnementales défavorables. Les micro-organismes ont en effet tendances à avoir des aires de répartition plus larges du fait notamment de leur âge phylogénétique plus ancien (temps de dispersion plus long), d'une meilleure efficacité de dissémination et de persistance, et d'un taux de spéciation allopatrique et d'extinction plus bas, que ceux des macro-organismes (Fenchel, 1993). Des preuves s'accumulent de nos jours sur l'existence de patrons de biogéographie et de phylogéographie chez les micro-organismes, allant d'aires de distribution très larges à des aires de distribution endémique limitées à certains environnements marins et terrestres comme notamment chez les protistes (Foissner, 2006; Fontaneto, 2011).

Nonobstant les controverses actuelles sur l'existence de tel patron, la biogéographie des micro-organismes saprophytiques est supposée reposer sur les limites de dispersion dans le temps (survie) et l'espace (dissémination spatiale) (Higgins and Kennedy, 2012). Ces limites de dispersion peuvent être dues aux facteurs environnementaux tels que le pH, le climat ou l'altitude, et aux traits d'histoire de vie des micro-organismes, notamment la capacité à sporuler, qui peuvent être sélectionnés dans certains contextes environnementaux et ainsi expliquer la distribution observée. Par ailleurs, dans le cas des micro-organismes symbiotiques, le facteur « hôte » est également à considérer (Higgins and Kennedy, 2012). *Frankia* est une actinobactérie filamenteuse tellurique capable à la fois de vie libre dans le sol, et d'établir avec les plantes dites actinorhiziennes une symbiose mutualiste facultative fixatrice d'azote. Du fait de ces deux types de mode de vie, la biogéographie de *Frankia* est supposée résulter de facteurs liés et non liés à l'hôte végétal. Ce genre a été décrit comme ubiquiste même dans les sols dépourvus d'hôte actinorhizien, mais plus abondant sur les sols présentant un hôte (Jeong and Myrold, 2001; Benson and Dawson, 2007; Welsh *et al.*, 2009). Au sein du genre *Frankia*, certaines souches présentent la particularité de sporuler *in planta* et sont désignées comme des souches spore-positives (Sp+) (Torrey, 1987). Parmi les plantes actinorhiziennes, le genre *Alnus* présente parmi les hautes fréquences de souches Sp+ dans ses nodosités et a été le plus étudié à ce titre

(Pozzi, 2014). La phylobiogéographie générale des souches de *Frankia* infectant l'aulne a précédemment été démontrée comme principalement liée à la phylogénie et la géographie de l'hôte par rapport aux variables environnementales comme la température, le régime de précipitation ou les déterminants pédologiques (Põlme *et al.*, 2013; Põlme *et al.*, 2014). Cependant dans ces études, l'identité Sp+ ou Sp- des souches dans les nodosités n'a pas été considérées. Dans le cadre d'une étude plus récente, basée sur un large échantillonnage de nodosités racinaires d'aulne, les souches de *Frankia* Sp+ ont été montrées comme phylogénétiquement différentes des souches de *Frankia* Sp- et plus fréquemment associées aux espèce-hôtes *Alnus incana* et *Alnus viridis* dans les zones de hautes altitudes (Alpes françaises) et de hautes latitudes (Alaska, Québec). A l'inverse, les souches de *Frankia* Sp- ont été majoritairement retrouvées en plaine, associées à l'espèce-hôte *Alnus glutinosa*. Dans la phylogénie reconstruite par les auteurs, les souches se regroupent en effet selon l'hôte duquel proviennent les nodosités et le type de climat (tempéré, alpin/boréal) (Figure I.1). Ainsi, les Sp+ issues *d'Alnus incana* et *d'Alnus viridis* de sites éloignées de plusieurs milliers de kilomètres se regroupent pour former 2 clades distincts et spécifiques à chacune des deux espèces d'aulne (respectivement clade 1a et 1b).

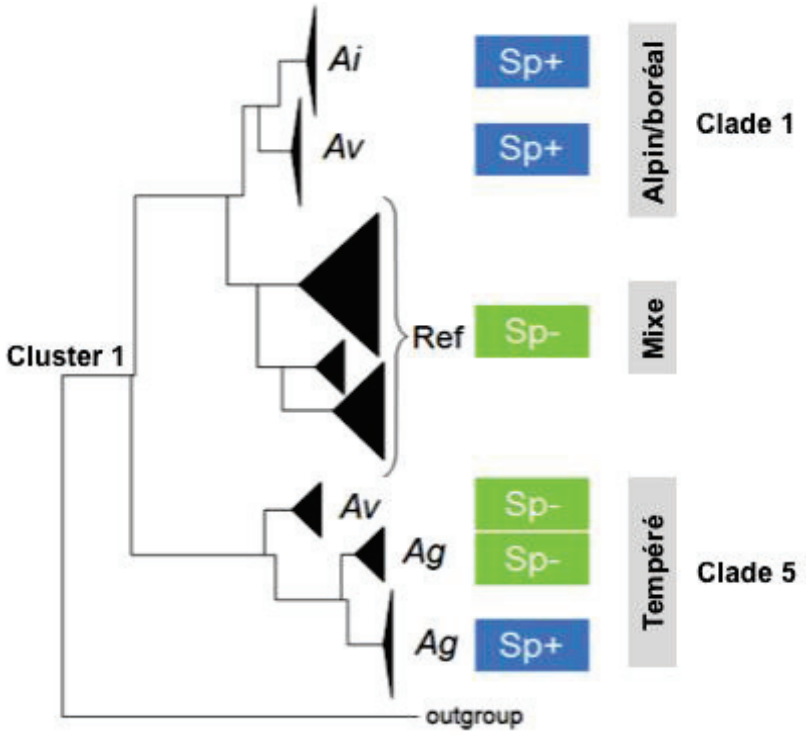
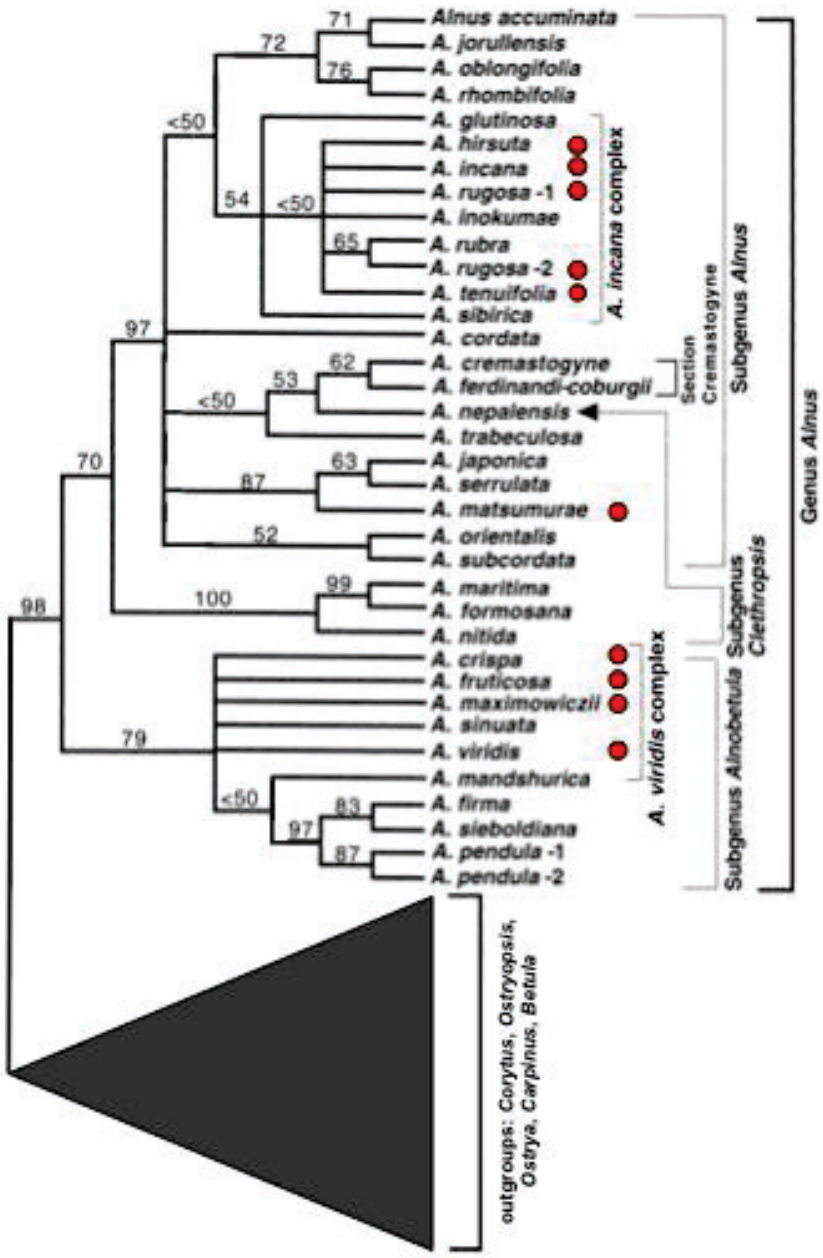


Figure I.1. Représentation schématique de la phylogénie des souches de *Frankia* infectant l'aulne (cluster 1), d'après Pozzi et al. (2015).

Les souches se regroupent en fonction de leur phénotype de sporulation (Sp+ en bleu, Sp- en vert), de l'espèce-hôte (*Alnus glutinosa Ag*, *Alnus incana Ai*, *Alnus viridis Av*) et le climat (alpin/boréal, mixe, tempéré).

A la suite de cette étude, nous faisons l'hypothèse que la capacité de sporulation *in planta* influence la biogéographie et l'écologie des souches de *Frankia* Sp+, en favorisant leur sélection dans des contextes environnementaux supposés défavorables aux souches Sp-. Dans la première partie de ce chapitre, nous nous proposons d'étendre la description de la phylobiogéographie des souches de *Fankia* Sp+ à d'autres sites présentant les espèces *Alnus incana* et *Alnus viridis* (et sous-espèces associées) (Figure I.2) sous climat montagnard/alpin ou boréal, afin de confirmer le patron précédemment observé (Figure I.1). Dans ce but, de nouveaux sites ont été échantillonnés dans les Alpes françaises et en Alaska. Une plus grande diversité est attendue dans la zone d'origine du genre *Alnus*, l'Asie (Navarro *et al.*, 2003; Chen and Li, 2004), où la plus grande diversité d'espèces d'aulne (18-23 espèces) laisse supposer une plus grande diversité de souches de *Frankia* associées. Notre étude a ainsi inclus 2 sites au Japon. Une diversité de souches toute particulière est attendue dans cette région, de par son caractère insulaire propice à l'endémisme.

Ces travaux seront présentés sous la forme d'un article en préparation, rédigé en français (figures en anglais). Des analyses bio-informatiques supplémentaires seront à venir sur ces données. Une soumission dans le journal Applied and Environmental Microbiology est visée.



<u>Figure I.2</u>. Phylogénie du genre *Alnus* reconstruite par analyse de parsimonie sur les séquences des régions de l'ADN nucléaire ribosomique ITS (figure modifiée d'après Chen et Li, 2004). Les points rouges correspondent aux espèces étudiées dans le chapitre. Une 10ème espèce, non présente dans la phylogénie de Chen et Li, *Alnus alnobetula* ssp. *suaveolens*, et appartenant au complexe *A. viridis* a également été échantillonnée.

Certaines zones de montagne peuvent cumuler des particularités historiques et géographiques les rendant particulièrement intéressantes pour étudier des questions de diversité et de spécialisation des symbiotes de l'aulne. C'est notamment le cas de la Corse dans le bassin méditerranéen. De par son insularité et la diversité de zones bioclimatiques présentes, la Corse est particulièrement connue pour la richesse et l'endémicité des plantes

et animaux présents. La localisation de l'île et sa topographie complexe en a fait un refuge glaciaire durant les glaciations successives du Quaternaire (Taberlet, 1998). Dans la deuxième partie de ce chapitre, nous avons cherché à savoir si les communautés symbiotiques associées à l'aulne présentent une endémicité et une plus forte richesse en Corse par rapport aux zones continentales du bassin méditerranéen, et dans quelles mesures les patrons de biogéographies de *Frankia* et des champignons ectomycorhiziens spécifiques de l'aulne présentent des similitudes. Pour ce faire, des co-échantillonnages de nodosités racinaires et d'ectomycorhizes d'aulne ont été réalisés sur un total de 70 sites de prélèvement en Corse, en France et en Italie, dans le cadre d'un projet EC2CO MicrobiEn porté par le Dr. Mélanie Roy.

Ces travaux sont acceptés pour publication (décembre 2017) dans la revue New Phytologist. La signature dans ce papier s'est justifiée par la participation à l'obtention des données de séquences de *Frankia* de Corse et leur analyse préliminaire en phylogénie.

CHAPITRE I A : Les espèces d'aulne alpines et subarctiques associées à des souches clonales de *Frankia* à travers la zone Holarctique.

Introduction

Dans l'hémisphère nord, les zones montagneuses d'altitude élevée, et les plaines subarctiques à latitude élevée présentent une convergence de régime climatique, notamment du fait de l'angle faible des radiations solaires atteignant ces surfaces terrestres (Kottek *et al.*, 2006; Danby and Hik, 2007; Peel *et al.*, 2007). Ce climat subarctique (aussi appelé climat subalpin ou boréal) est ainsi fragmenté à travers la zone Holarctique du globe, se retrouvant entre les latitudes 50° et 70°N et dans les régions montagneuses autour de 1450 à 2100 m d'altitude. Il se caractérise par des hivers longs et froids, des étés courts et doux (entre 1 et 3 mois), avec des variations extrêmes de températures saisonnières et des variations journalières d'au minimum 10°C (Körner, 2003; Kottek *et al.*, 2006). Les températures en dessous de zéro 5 à 7 mois dans l'année limitent la disponibilité en nutriments dans les sols, du fait du ralentissement des processus de décomposition et de minéralisation (Lipson and Monson, 1998; Lipson, 2007). Dans ces contextes écologiques froids et oligotrophiques, les plantes ont développé un panel de traits d'histoire de vie pour survivre à ces stress environnementaux (Callaghan *et al.*, 2004; Grime, 2006; Cerabolini *et al.*, 2010), avec un degré de plasticité phénotypique pouvant être observé à l'échelle d'une espèce, comme chez *Alnus rubra* Bong. (Porter *et al.*, 2013), ceci expliquant le niveau de spécialisation élevé qui y est observé (Körner, 2003). Cette spécialisation se retrouve également dans les communautés microbiennes saprophytiques de ces environnements, à travers des adaptations structurelles et fonctionnelles leur permettant de se développer nonobstant le gel, les rendements enzymatiques réduits, les pH et la salinité généralement extrême dans ces sols (Margesin and Miteva, 2011). Ces milieux aux conditions abiotiques défavorables sont connus pour favoriser la mise en place d'interactions biotiques mutualistes (Cavieres *et al.*, 2014), par exemple de type facilitation entre espèces végétales (Callaway *et al.*, 2002), ou encore symbiotique entre plantes et bactéries fixatrices d'azote (Hiltbrunner *et al.*, 2014). Le degré de spécialisation des micro-organismes symbiotiques des plantes à l'environnement extérieur, en dehors de l'hôte, reste cependant peu étudié.

Les aulnes (*Alnus* spp., *Betulaceae*) sont des espèces ligneuses clés de voûte qui occupent de larges parts des régions de hautes altitudes et hautes latitudes sous climat subarctique (Anderson *et al.*, 2013; Porter *et al.*, 2013; Bühlmann *et al.*, 2014). Le genre *Alnus* comprend trois sous-genres *Alnus*, *Clethropsis* et *Alnobetula*, distribués à travers ses 29 à 35 espèces sous toutes les latitudes des trois continents de la zone holarctique (Chen and Li, 2004; Ren *et al.*, 2010; Heuvel, 2011), avec 9 espèces en Amérique, 4 à 5 espèces

en Europe et 18 à 23 espèces en Asie (Murai, 1964; Furlow, 1979; Chen, 1994; Govaerts and Frodin, 1998). Le fort endémisme et la plus grande diversité d'espèces semble indiquer que l'Asie serait l'aire géographique d'origine de l'aulne (Murai, 1964; Chen and Li, 2004). En plus de cette distribution longitudinale, les espèces s'étagent également selon un gradient d'altitude et de latitude. En effet, certaines espèces appartenant notamment aux complexes *Alnus incana* (sous-genre *Alnus*) et *Alnus viridis* (sous-genre *Alnobetula*) sont inféodées aux milieux de montagne et boréaux, généralement dans des contextes pionniers comme les moraines glacières, les couloirs d'avalanche, les pâturages subalpins en déprise ou d'ancienne merzlota. Depuis le début du siècle dernier, en réponse au réchauffement climatique et aux changements des pratiques agro-pastorales, les aulnaies holarctiques connaissent une expansion altitudinale et latitudinale progressive de leur zone de distribution (Sturm *et al.*, 2001; Anthelme *et al.*, 2002; Tape *et al.*, 2006; Bühlmann *et al.*, 2014) induisant des problématiques écosystémiques majeures (Myers-Smith *et al.*, 2011; Hiltbrunner *et al.*, 2014).

Le succès écologique de l'aulne dans ces milieux oligotrophiques repose sur ses associations symbiotiques multipartites (plante-bactéries-champignons mycorhiziens) et en particulier sur sa capacité à s'associer symbiotiquement avec l'actinobactérie fixatrice d'azote *Frankia*. Cette association se traduit par la formation de nodosités racinaires pérennes qui assurent à l'aulne sa nutrition azotée en échange de composés carbonés issus de sa photosynthèse (Dawson, 2007). *Frankia* est capable de se disperser et développer dans la plupart des sols même en absence d'hôte (plantes dites actinorhiziennes), témoignant ainsi de sa capacité de vie endosymbiotique et saprophytique (Benson and Silvester, 1993; Benson and Dawson, 2007). Très peu de données sont disponibles à l'heure actuelle sur l'écologie, la diversité et la biogéographie de *Frankia* car peu de souches sont isolées et cultivées, la grande majorité d'entre-elles étant résistantes à la culture. De plus, *Frankia* présente une morphologie filamenteuse multicellulaire avec une vitesse de croissance faible *in vitro* et nous ne disposons pas à l'heure actuelle de marqueur génétique spécifique permettant d'étudier directement les communautés saprophytiques de *Frankia* dans les sols (Rodriguez *et al.*, 2016), où elles s'y trouvent par ailleurs en faible abondance relative (Samant *et al.*, 2012). Face à ces difficultés, la plupart des études se sont appuyées sur des échantillonnages de nodosités racinaires d'aulne. Par ailleurs, deux types de souches de *Frankia* avec des écologies et biogéographies différentes sont distinguées selon leur capacité à sporuler *in planta ;* les souches dites spore-positives (Sp+) qui produisent de nombreux sporanges à l'intérieur des cellules de l'hôte et les souches dites spore-négatives (Sp-) qui ne sporulent pas dans les nodosités (van Dijk, 1978). Une étude récente basée des nodosités racinaires d'aulnes a montré que les espèces *A. incana* ssp. *tenuifolia*, *Alnus alnobetula* ssp. *crispa* et *Alnus alnobetula* ssp. *fruticosa* d'une part, et les espèces *Alnus*

incana ssp. *incana* et *Alnus alnobetula* ssp. *alnobetula* d'autre part, retrouvées respectivement en Amérique du Nord et dans les Alpes françaises, sont majoritairement associées à des souches de *Frankia* Sp+. Dans cette même étude, il a été montré sur 27 sites essentiellement en France que contrairement à *A. alnobetula* ssp. *alnobetula*, l'espèce de plaine *A. glutinosa* est majoritairement associée à des souches Sp- (Pozzi *et al.*, 2015). Face à ces observations, l'hypothèse d'une meilleure adaptation des souches Sp+ par rapport aux souches Sp- dans les environnements froids d'altitude/latitude élevée a été proposée. Des études ont montré un effet de l'altitude sur les communautés de *Frankia* associées à l'aulne, mais aucune n'a pris en compte le phénotype de sporulation (Igual *et al.*, 2006; Khan *et al.*, 2007). Le phénotype de sporulation *in planta* a été démontré comme le facteur structurant majeur de la phylogénie et de la diversité de *Frankia*, devant les facteurs espèces-hôtes et site géographique (Pozzi *et al.*, 2015). La prise en compte et le diagnostic de ce phénotype est ainsi essentiel à la compréhension de la biogéographie des souches de *Frankia*. Par ailleurs, la phylogéographie de l'hôte *Alnus* a été démontrée comme étant un facteur explicatif de la structure des communautés de *Frankia* dans les nodosités (Põlme *et al.*, 2014). Ainsi, l'histoire glaciaire et post-glaciaire qui a fait varier les patrons de distribution altitudinaux et latitudinaux d'*A. incana* et *A. alnobetula* devrait avoir impacté la distribution des souches de *Frankia* associées.

L'objectif de cette étude a été d'étendre la description de la distribution des souches de *Frankia* associées aux espèces des complexes *Alnus incana* et *Alnus viridis* inféodées aux milieux de montagne et boréaux à (i) de nouveaux sites de latitude élevée (Alaska) et d'altitude élevée (Alpes françaises, Carpathes), (ii) une nouvelle aire géographique, l'Asie, zone d'origine de l'aulne où la diversité des souches de *Frankia* associées est attendue plus forte, (iii) à 5 autres espèces retrouvées en climat subarctique et encore non-étudiées du point de vue de leur phénotype de sporulation ; *Alnus incana* ssp. *hirsuta*, *Alnus incana* ssp. *rugosa*, *Alnus alnobetula* ssp. *maximoviczii*, *Alnus alnobetula* ssp. *suaveolens* et *Alnus matsumurae*.

Une approche de phylobiogéographie a été utilisée pour tenter d'expliquer le succès évolutif des souches de *Frankia* Sp+ dans les environnements froids de l'hémisphère nord, en identifiant les facteurs potentiels à l'origine de cette distribution.

Matériel et méthodes

Echantillonnage des nodosités

Les nodosités ont été prélevées entre août 2008 et août 2016, dans 63 sites d'aulnaies, dont 14 en Amérique du Nord, 45 en Europe et 2 en Asie (Figure I.3), sur un total de 9 sous-espèces d'*Alnus* : *Alnus incana* ssp. *incana* (L.) Moench (AII), *Alnus incana* ssp. *hirsuta*

(Spach) Rupr (AIH), *Alnus incana* ssp. *rugosa* (Du Roi) R.T. Clausen (AIR), *Alnus incana* ssp. *tenuifolia* (Nutt.) Breitung (AIT), *Alnus alnobetula* ssp. *alnobetula* (Ehrh.) K. Koch (AAA), *Alnus alnobetula* ssp. *fruticosa* (Rupr) Raus (AAF), *Alnus alnobetula* ssp. *maximoviczii* (Callier) D. Löve (AAM), *Alnus alnobetula* ssp. *suaveolens* (Req.) Lambinon & Kerguélen (AAS), *Alnus alnobetula* ssp. *crispa* (Alton) Raus (AAC) et *Alnus matsumurae* Callier (AMT) (Tableau I.1).

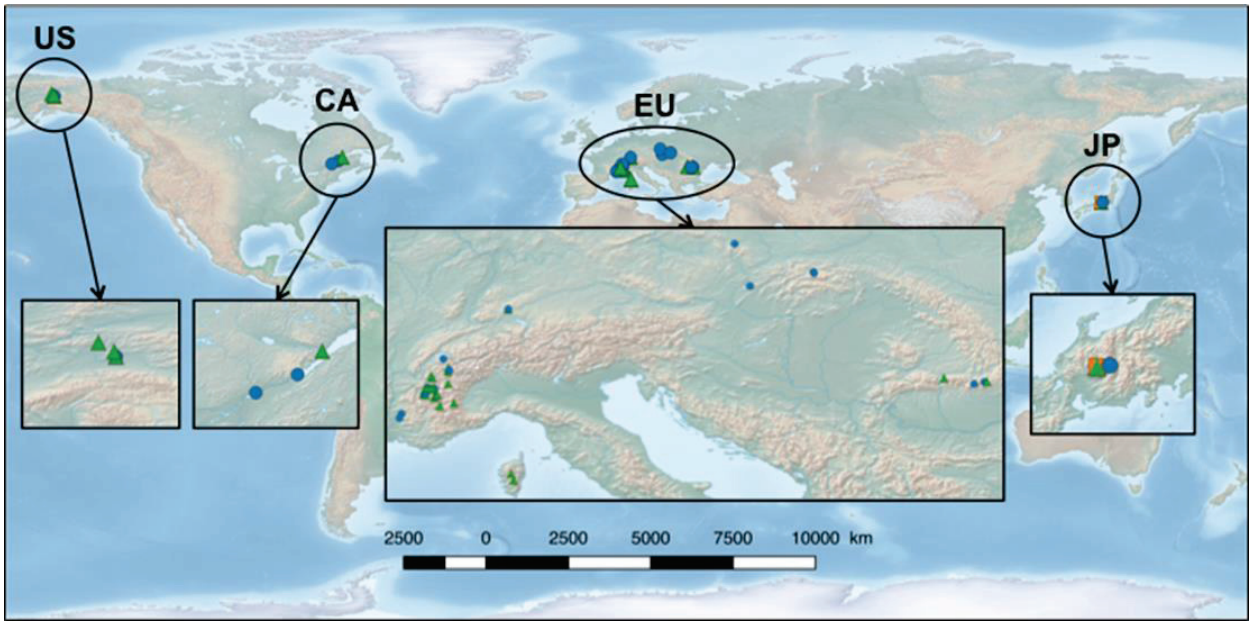


Figure I.3. Localization of the sampled alder sites around the world.

US, The United States of America; CA, Canada, EU, Europe; JP, Japan. Green triangles, blue circles and orange square correspond to *Alnus viridis*, *Alnus incana* and *Alnus matsumurae* alder stands, respectively.

Les nodosités ont été lavées à l'eau distillée stérile, gardées quelques jours à +4°C avant analyse, puis congelées à -20°C. Pour chacune, deux lobes adjacents ont été prélevés, l'un pour la détermination du phénotype de sporulation, l'autre pour le génotypage de la souche de *Frankia*.

Table I.1. List of sampled alder stands.

Site No.	*Alnus* species	Site (County)	Country	Phenotype
1	*Alnus alnobetula* ssp. *alnobetula*	Bionnassay (74)	FR	+
2		Champagny (73)	FR	+
3		Ciucas	RO	+/-
4		Le Corbier (73)	FR	+/-
5		Col de Croix de Fer *	FR	+/-
6		Embrun (05)	FR	+/-
7		Făgăraș	RO	+
8		Fond-de-France, Site 2 (38) *	FR	+/-
9		Lac d'Anterne (74)	FR	+
10		Lac Fourchu (38)	FR	+/-
11		Col du Lautaret, Site 1 and 2 (05) *	FR	+/-
12		Col de la Madeleine (05) *	FR	+
13		Mont d'Arménaz (73)	FR	+/-
14		Mont Saint Mury (38) *	FR	+/-
15		Mont Trélod (73) *	FR	-
16		Muchia Serbotei	RO	+
17		Ornon, Site 2 *	FR	+/-
18		Queyras (05) *	FR	+/-
19		Les 7 Laux (38) *	FR	+
20		La Toussuire (73) *	FR	+
21		Vallée des Merveilles (06)	FR	+/-
22		Vallée des Villards, Site 3 (73)	FR	+/-
23		Bärental	DE	+/-
24	*Alnus alnobetula ssp. crispa*	Abitibi Témiscamingue	CA	+/-
25		Elliot Highway Brunner (Alaska) *	US	-
26		Murphy Dome (Alaska) *	US	nd
27		Tadoussac	CA	-
28	*Alnus alnobetula ssp. fruticosa*	Alaska 1A *	US	+
29		Alaska 1BS *	US	+-/
30		Alaska 2A *	US	+/-
31		Alaska 3A *	US	+/-
32		Alaska 4B *	US	+
33		Alaska UP4A *	US	+
34	*Alnus alnobetula* ssp. m*aximoviczii*	Tanohara *	JP	+
35	*Alnus alnobetula ssp. suaveolens*	Bastelica, Val d'Ese (20) *	FR	+
36		Restonica (20) *	FR	+
37	*Alnus incana ssp. hirsuta*	Yanagase *	JP	+/-
38	*Alnus incana ssp. tenuifolia*	Alaska 1B *	US	-
39		Alaska BP *	US	+/-
40		Alaska 4B *	US	-
41	*Alnus incana* ssp. *incana*	Allemont (38)	FR	+
42		Articol (38)	FR	-
43		Bärental	DE	-
44		Chea	RO	+/-
45		Fond-de-France, Site 1 (38) *	FR	+/-
46		Gelon, Bourget-en-Huile (73)	FR	-
47		Gévoudaz (73)	FR	+
48		Koniowska	PL	+
49		La Bérarde (38)	FR	+
50		La Pallud (38)	FR	+
51		Les Bossons (74)	FR	+
52		Nyons (26)	FR	-
53		Ornon, Site 1 *	FR	+
54		Paute (38)	FR	+
55		Suchov	CZ	+/-
56		Sumava	CZ	+/-
57		Vaison-la-Romaine (84) *	FR	+/-
58		Vallée d'Aulps (74)	FR	+
59		Vallée des Villards, Site 1 and 2 (73)	FR	+/-
60		Valley Cerbuli	RO	+
61		Witów	PL	+
62	*Alnus incana* ssp. *rugosa*	Saint Tite des Caps	CA	+
63		Trois-Rivières, Québec	CA	+
64	*Alnus matsumurae*	Tanohara *	JP	+/-

(*) new or supplemented sites in regards to Pozzi et al. study (2015).
Occurrence of nodule phenotype: +: spore-positive (Sp+), -: Spore-negative (Sp-), +/-: co-occurrence of Sp+ and Sp- nodules. FR : France, RO : Romania, US : United States, JP : Japan, DE : Germany, PL : Poland, CZ : Czech Republic, CA : Canada.

Détermination du phénotype de sporulation

Des coupes successives ont été réalisées à main levée sur un lobe de nodosité et colorées au bleu de lactophénol (réactif RAL®, Martillac, France), 1 à 3 minutes à température ambiante. Les coupes ont été ensuite observées par microscopie optique avec un Nikon OptiPhot2 (Nikon Instruments, Amsterdam, the Netherlands). Au-dessus d'un sporange pour 50 cellules infectées, la nodosité a été considérée comme Sp+ (Schwintzer, 1990).

Extraction d'ADN, amplification par polymérisation en chaîne (PCR) et séquençage

Les lobes ont été stérilisés 4 à 5 min dans une solution d'hypochlorite de calcium 3% et pelées pour éviter toutes contaminations par des souches de *Frankia* en surface. L'ADN génomique total a été extrait de chaque lobe selon le protocole précédemment décrit (Huguet *et al.*, 2001). 2 µL de chacun des ADN extraits a été utilisé comme matrice pour amplifier par PCR un fragment du gène de ménage pgk, dans un mix contenant 1X de tampon PCR, 0.5 µM de chaque amorce *pgk*-forward et *pgk*-reverse (Pozzi *et al.*, 2015), 2 mM de $MgCl_2$, 10% de diméthylsulphoxyde (vol/vol), 0.4 U Taq DNA polymérase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) et de l'eau stérile Miniversol®. Les conditions d'amplification ont été les suivantes : dénaturation initiale 10 min à 94°C, suivie de 30 cycles de 1 min à 94°C – 1 min à 62°C – 1 min à 72°C, puis une élongation finale de 10 min à 72°C. Les produits PCR ont été séquencés en simple brin par Biofidal-DTAMB (Villeurbanne, France), avec un séquenceur d'ADN automatisé ABI Prism (Applied Biosystems, Foster City, CA, EU) avec les mêmes amorces que celles utilisées pour l'étape de PCR.
Les séquences *pgk* des souches de nodosités sont accessibles dans Genbank® sous les numéros d'accession suivants : KJ503888-KJ503947, KJ503999-KJ504102, JN685084-JN685140, LT599837-LT600328.
Les séquences *pgk* de *Blastococcus aggregatus*, *Geodermatophilus obscurus*, *Modestobacter marinus*, *Salinispora arenicola* et *Stackebrandtia nassauensis* ont été ajoutées comme groupes externes (Wu *et al.*, 2009; Sen *et al.*, 2014).

Analyse phylogénétique des souches de Frankia infectant les aulnes holarctiques

La qualité des séquences a été vérifiée et les cadres de lecture corrigées manuellement avec le logiciel 4PEAKS v. 1.7.2 (Griekspoor and Groothuis, 2005). Les séquences acides aminés ont été alignées avec MUSCLE (v. 3.8.31) (Edgar, 2004) implémenté dans SEAVIEW (v.4.5.2) (Gouy *et al.*, 2010), avec les paramètres par défaut. La phylogénie de *Frankia* a été reconstruite par Maximum de Vraisemblance avec PhyML 3.0 (Guindon *et al.*, 2010) avec un modèle GTR+G+I, et l'option ''Nearest-Neighbor-Interchange'' (NNI)» pour le choix de la topologie. Un support non-paramétrique de branche a été calculé par le test statistique SH-like aLRT, implémenté dans PhyML (Guindon *et al.*, 2010). Les branches

ayant un support statistique inférieur à 0,75 ont été enlevées de la topologie. Les distances patristiques ont été calculées deux à deux avec le logiciel R (v. 3.3.3) (Team, 2012) à partir de la phylogénie obtenue et avec la fonction *cophenetic.phylo* dans *ape (Paradis, 2011)*, puis représentées graphiquement pour définir le seuil de coupure à 0,05 de distance phylogénétique. Un regroupement hiérarchisé a été réalisé avec les fonctions *hclust* et *cutree* pour définir les unités taxonomiques opérationnelles (OTUs).

Analyses statistiques

Les intervalles de confiance des fréquences Sp+ observées ont été estimés avec la fonction *binom.test* implémentée dans le logiciel R.

Résultats

Fréquence des nodosités Sp+ selon le continent, l'espèce et la sous-espèce de l'hôte

Un total de 388 nodosités a été phénotypé sur 63 sites à travers les 3 continents de la zone Holarctique (Tableau 2A et 2B). Parmi elles, 248 ont été diagnostiquées Sp+ (63%), avec des variations selon l'espèce-hôte et le continent d'origine. Comme sur les espèces précédemment étudiées (AAA, AAC, AAF, AII, AIT), des nodosités Sp+ ont été observées sur les nouvelles sous-espèces de cette étude, avec des occurrences de 100%, 100%, 27%, 100% et 86% pour AAM, AAS, AIH, AIR et AMT respectivement (Tableau I.2 A). Toutes espèces confondues, les occurrences de nodosités Sp+ différentes ont été de 63% en Europe, 59% en Amérique du Nord et 85% au Japon (Tableau I.2 B). En Europe, la même fréquence Sp+ est observée entre les complexes d'espèces *A. alnobetula* et *A. incana*, présentant respectivement 63% et 64% de nodosités Sp+. A contrario, de larges différences sont relevées dans les zones américaines et asiatiques, avec 69% et 22% de Sp+ pour *A. alnobetula* et *A. incana* en Amérique du Nord, et 100%, 27% et 86% de Sp+ pour *A. alnobetula*, *A. incana* et *A. matsumurae* respectivement, au Japon.

Table I.2. Frequencies of spore-positive (Sp+) phenotype according to *Alnus* species (A) and the continent sampled.

A

Species	Subspecies	Sp+ frequency	CI 95%
Alnobetula	AAA	62	[55 ; 100]
	AAC	33	[10 ; 100]
	AAF	81	[65 ; 100]
	AAM	100	[81 ; 100]
	AAS	100	[65 ; 100]
	all subspecies	**66**	**[61 ; 100]**
Incana	AIH	27	[8 ; 100]
	AII	64	[55 ; 100]
	AIR	100	[47 ; 100]
	AIT	32	[15 ; 100]
	all subspecies	**58**	**[50 ; 100]**
Matsumurae	AMT	86	[61 ; 100]

B

Continent	Species	Sp+ frequency	CI 95%	Number of sampled sites	% Sp+ sites
Europa	*alnobetula*	63	[57 ; 100]	25	96
	incana	64	[55 ; 100]	21	81
	all species	**63**	**[59 ; 100]**	44	89
Northern America	*alnobetula*	69	[55 ; 100]	10	70
	incana	26	[12 ; 100]	5	60
	all subspecies	**59**	**[48 ; 100]**	15	67
Eastern Asia	*alnobetula*	100	[81 ; 100]	1	100
	incana	27	[8 ; 100]	1	100
	matsumurae	86	[61 ; 100]	1	100
	all subspecies	**85**	**[72 ; 100]**	2	100

Sp+ frequency are calculated from the number of Sp+ nodules per sub-/species.

CI 95% : confidence interval computed at a 5% risk. % Sp+ sites : percentage of sites where Sp+ nodules were found.

Analyses phylogénétiques des souches de Frankia infectant les aulnes holarctiques

Les séquences de *Frankia* sur le gène *pgk* ont été obtenues pour les 388 nodosités. Les groupes monophylétiques précédemment décrits par Pozzi *et al.* (2015) sont bien supportés statistiquement, et reflètent le phénotype de sporulation des souches d'une part, et leur espèce-hôte d'origine d'autre part (*i.e.* clades 1a, 1b, 1c, 2, 3 et 4) (Figure I.4).

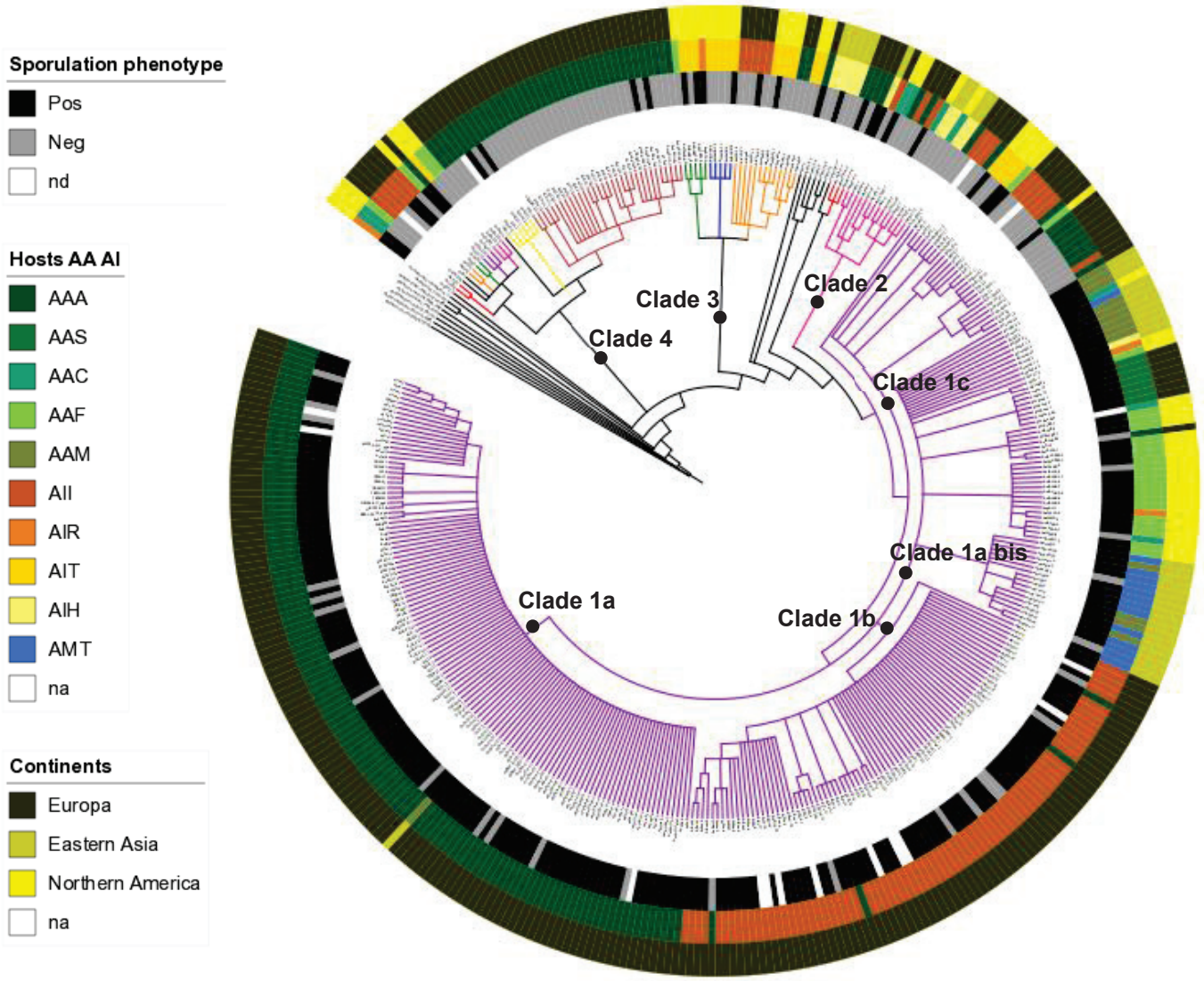


Figure I.4. Phylogeny of *Frankia* strains infecting *A. alnobetula*, *A. incana* and *A. matsumurae*, based on *pgk* gene fragment (700 bp) and estimated by maximum likelihood (PhyML).

Statistic support of the nodes was estimated by aLRT SH-like method. Branches supported less than 0.75 were erased from the topology. The different colors of the branches stand for the OTUs delineated at 0.05 dissimilarity threshold.

Parmi les souches Sp+, 91% sont regroupées dans un seul clade (clade #1), pouvant lui-même être subdivisé entre 4 sous-clades. Le clade 1a et 1b regroupent les souches Sp+ provenant des sous-espèces AAA et AII d'Europe. Le clade 1c regroupe des souches Sp+ et Sp- provenant d'Amérique du Nord et d'Europe, sur 4 sous-espèces (AAA, AAF, AII, AIT). Un nouveau clade 1a bis regroupe les souches Sp+ d'AAF d'Amérique du Nord, ainsi que la plupart des souches d'AMT et quelques-unes d'AAM provenant d'Asie. La grande majorité des souches Sp- est regroupée à la base de la phylogénie, dans le clade 4 contenant moins de 20% de Sp+ et qui regroupe les souches provenant d'Amérique du Nord et d'Europe à travers 6 sous-espèces d'aulne. Les souches de *Frankia* Sp- asiatiques provenant d'AIH se positionnent à la base du clade 1, sans former de regroupement monophylétique.
Le regroupement des souches au seuil de coupure de 0.05 de distance phylogénétique a permis la délimitation de 24 OTUs à travers les 388 souches de l'arbre (Figure I.4). L'OTU 1 correspond à l'ensemble du clade 1 (violet), il regroupe plus de 74% des souches de la phylogénie, majoritairement de phénotype Sp+ (84% Sp+). Cet OTU est retrouvé sur les 10 hôtes de l'étude, à travers les 3 continents. L'OTU 2 correspond au clade 2 (fushia), il regroupe 14 souches dont 10 Sp-, échantillonnées sur 4 espèce-hôtes différentes, également dans les 3 aires géographiques. Les 87 souches restantes, majoritairement Sp- (23% Sp+) forment les 22 OTUs restants. La plupart de ces OTUs regroupent des souches provenant d'une même espèce-hôte et/ou origine géographique.

Discussion

Dans cette étude, nous avons cherché à étendre la description de la biogéographie des souches de *Frankia* à deux aires encore peu et pas étudiées pour leurs souches Sp+, respectivement l'Amérique du Nord et le Japon. La plupart des études précédentes de la biogéographie des souches de *Frankia* associées aux aulnes étaient basées sur le gène *nifH*. Ce gène, outre sa difficulté d'amplification (succès autour de 50%) (Põlme *et al.*, 2014), est sujet à de nombreux transfert horizontaux et ne permet pas de différencier les souches de *Frankia* selon leur phénotype de sporulation (données personnelles). Dans notre étude, nous avons utilisé le marqueur *pgk* pour caractériser génétiquement les souches de nodosités et reconstruire une phylogénie par maximum de vraisemblance. Ce marqueur a été précédemment décrit comme suffisamment résolutif pour une discrimination intra-spécifique des souches de *Frankia,* en fonction de leur phénotype de sporulation (Sp+ et Sp-), et pour apporter un signal phylogénétique robuste, congruent avec celui obtenu par une approche multi-loci basée sur 5 gènes de ménage (Pozzi *et al.*, 2015; Pozzi *et al.*, accepted 2018).

Un trait d'histoire de vie hérité de l'histoire évolutive qui impacte la capacité des espèces à persister au sein de communautés dans un environnement donné, influence la

structure phylogénétique de la communauté (Graham *et al.*, 2009). La rudesse des conditions de vie en zone de haute altitude/latitude représente un filtre environnemental pour les espèces, qui se traduit au niveau de la phylogénie par un regroupement des espèces provenant de ces milieux, notamment décrits chez les insectes (Pellissier *et al.*, 2013), les oiseaux (Graham *et al.*, 2009) et les micro-organismes (Bryant *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2012b), mais encore non observé à ce jour chez les micro-organismes symbiotiques. Les montagnes japonaises (« Japan Alps ») et la zone sub-boréale nord-américaine présentent un régime climatique comparable à celui des massifs européens (Alpes et Carpathes) permettant la présence de différentes sous-espèces d'aulnes *A. incana* et *A. alnobetula* inféodées aux milieux froids.

Suite aux travaux de Pozzi *et al.* (2015), il a été suggéré une fréquence élevée de souches de *Frankia* Sp+ sur les différentes espèces d'aulne dans les régions froides des 3 continents de la zone Holarctique. Comme attendu, plus de 80% de ces aulnaies échantillonnées en Europe, Amérique du Nord et Japon présentaient des nodosités Sp+, à des fréquences notablement variables selon l'espèce-hôte considérée. En Europe, nous confirmons la prédisposition de l'espèce *A. alnobetula* (AAA, AAS), et *A. incana* (AII) dans une moindre mesure, à s'associer avec des souches Sp+, avec comme conséquence directe la très grande rareté chez ces espèces des aulnaies majoritairement associées à des souches Sp-. Sur un seul site d'Europe à AAA (Mont Trélod), des nodosités exclusivement Sp- ont été retrouvées, mais probablement du fait que les individus prélevés étaient de jeunes arbrisseaux isolés en bord de l'aulnaie principale. De tels individus ont été constatés comme plus souvent associés à des souches Sp- au cours de nos campagnes d'échantillonnages (données personnelles). En Amérique du Nord, des fréquences comparables sont observées sur les espèces *A. alnobetula* et *A. incana* avec cependant de fortes différences entre les différentes sous-espèces associées. En effet, AAC et AIT présentent des fréquences Sp+ deux fois inférieures à celles de AAF et AIR. Au Japon, les espèces AAM et AMT sont également très largement associées à des souches Sp+, tandis que l'espèce AHI présente moins de 30% de nodosités Sp+. Cependant, ces tendances à de faibles proportions de Sp+ sur ces 3 sous-espèces sont basées sur un échantillonnage faible (< 5 sites et < 20 nodosités ici). Si ces tendances se confirmaient sur un plus grand nombre de nodosités et de sites, elles pourraient indiquer une prédisposition évolutive de ces espèces à s'associer préférentiellement à des souches de *Frankia* Sp- ou à des conditions environnementales locales limitant la persistance ou l'infection des souches de *Frankia* Sp+ (Markham, 2008).

Malgré l'éloignement géographique de plusieurs milliers de kilomètres entre les sites étudiés et des sous-espèces différentes, les souches de *Frankia* Sp+ analysées appartiennent en grande majorité au clade 1, qui correspond à un unique OTU au seuil de coupure 0.05. Le clade 1 a été précédemment décrit pour contenir en majorité des souches

d'Europe (Pozzi *et al.*, 2015). Bien que plusieurs sous-clades puissent être différenciés au sein du clade 1, la diversité reste faible, et à l'intérieur de chaque sous-clade une clonalité forte est observée entre les souches. Par exemple, les souches appartenant au sous-clade 1a ne présentent aucune diversité au niveau de leur séquence *pgk*. Cette faible diversité pourrait être le résultat d'une convergence adaptative expliquée par le filtre de l'environnement (climat). En effet, grâce à la formation des spores, les souches de *Frankia* Sp+ sont supposées avoir une meilleure résistance au froid et/ou aux périodes de gel/dégel une fois libérées dans le sol à la sénescence de la nodosité, leur permettant une meilleure survie et une meilleure réassociation à l'hôte dans des conditions où les souches Sp- ne persisteraient pas. Nous avons observé en ce sens au laboratoire que des broyats de nodosités Sp+, contrairement aux broyats Sp-, restaient infectieux après une congélation prolongée à -20°C (data not shown). Les souches Sp+ seraient alors prédominantes dans les sols des environnements subarctiques. Toutefois, la présence de souches Sp+ sur des espèces comme *A. glutinosa,* espèce de plaine donc non soumise aux conditions extrêmes des climats de type alpin laisse à penser que la sporulation *in planta* peut constituer une adaptation à une variété de stress environnementaux et/ou biotiques.

La faible diversité des souches du clade 1 malgré leur large distribution géographique (Japon, Alpes, Québec, Alaska) pourrait également être liée à une pression de sélection de l'espèce-hôte. Les espèces du complexe *A. viridis* au sein du groupe monophylétique *Alnobetula* présentent une très faible diversité génétique (Chen and Li, 2004; Gryta *et al.*, 2017) qui peut s'expliquer chez certaines de ces espèces, notamment AAA, par une reproduction majoritairement clonale qui génère une faible diversité intra-espèce (Anthelme *et al.*, 2007). Ainsi, la faible diversité des souches de *Frankia* pourrait être une conséquence de la faible diversité génétique des espèces hôtes du complexe *A. viridis.*

Le positionnement des souches du Japon dans l'arbre phylogénétique, notamment la divergence entre les souches Sp+ et Sp- d'Asie, confirme le rôle du phénotype de sporulation précédemment observé sur la phylogénie de *Frankia* (Pozzi *et al.*, 2015). L'aire d'origine exacte de l'aulne reste inconnue à ce jour mais a été estimée quelque part entre la zone subtropicale du sud-ouest de l'Asie (Tahktajan, 1969) et la zone tempérée du Japon (Murai, 1964). Une plus grande diversité d'espèce d'aulne est observée dans l'aire asiatique avec 18 à 23 espèces, contre 13 à 14 dans l'ensemble du reste du monde. A ce titre une diversité nouvelle de souches de *Frankia* associées était attendue, par rapport aux aires européennes et américaines. Les souches de *Frankia* Sp+ obtenues à partir des nodosités des espèces AAM et AMT sont regroupées dans la phylogénie au sein d'un sous-clade déjà existant du clade 1a bis (Pozzi *et al.*, accepted 2017; Pozzi *et al.*, accepted 2018), contenant les souches Sp+ de *Frankia* associées à l'espèce AAF d'Amérique du Nord. Cette proximité phylogénétique avec les souches Sp+ d'Amérique du Nord pourrait s'expliquer par l'histoire

phylogéographique de ces espèces qui auraient migré d'Asie avec leur cortège symbiotique et colonisé l'Amérique de l'Ouest par l'isthme de Bering (Chen and Li, 2004). Des souches de *Frankia* Sp+ associées à l'espèce AAS endémique de Corse sont également présentes dans ce sous-clade 1a bis. La Corse étant connue pour être une zone refuge de l'aulne (Taberlet, 1998; Pozzi *et al.*, accepted 2017) (deuxième partie de ce chapitre), ces souches se rapprocheraient le plus de la diversité originelle asiatique ayant colonisée l'Europe par l'isthme Atlantique Nord et qui a survécu aux différentes glaciations du Quaternaire contrairement aux souches continentales. Ce regroupement est cohérent avec les résultats obtenus par Põlme *et al.* (2014), qui a observé des structures de communautés de *Frankia* du Japon plus proches de celles d'Amérique du Nord que de celles d'Europe, et avec la phylogénie de l'aulne de Chen and Li (2004) dans laquelle les espèces nord-américaines et asiatiques sont entremêlées ce qui suggère plusieurs événements de dispersion de l'aulne depuis l'Asie.

L'espèce japonaise AMT bien que n'appartenant pas aux complexes *A. incana* et *A. viridis* partage le même contexte subarctique et est majoritairement associée à des souches de *Frankia* Sp+, appartenant au même clade 1 que les espèces européennes et nord-américaines. Ce résultat confirme l'absence de congruence entre les phylogénies de l'hôte *Alnus* et de son symbiote *Frankia* (Navarro *et al.*, 2003; Chen and Li, 2004; Ren *et al.*, 2010; Pozzi *et al.*, 2015).

La difficulté à isoler et cultiver les souches Sp+ signe d'une possible dépendance métabolique à l'hôte, ainsi qu'une co-adaptation entre l'hôte et son symbiote déduite de la phylogénie ont amené à suggérer que les souches de *Frankia* Sp+ seraient des symbiotes obligatoires (Pozzi *et al.*, 2015). Dans notre étude, nous retrouvons ce signal de spécificité avec les mêmes regroupements (sous-clade 1a et 1b) des souches de *Frankia* Sp+ en fonction de l'espèce-hôte d'origine. Les souches provenant des zones géographiques nouvelles (Asie et Amérique du Nord), tendent à former des sous-regroupements spécifiques aux 4 espèces AAF, AAS, AMT et AAM au sein du sous-clade 1a bis.

La base de la phylogénie correspond principalement aux souches Sp-, ce qui pourrait indiquer une spéciation plus ancienne de ces souches dans l'histoire évolutive de *Frankia* et/ou une accumulation de mutations plus rapide chez les souches Sp+. Pour l'heure, la plupart des études de la phylogénie de *Frankia* se basent sur un nombre de gène limité (Mirza *et al.*, 2009; Põlme *et al.*, 2014; Pozzi *et al.*, 2015). L'obtention des génomes de souches Sp+ permettrait d'infirmer leur statut de symbiote obligatoire. Des tailles de génome plus petites sont attendues du fait de la suppression de voies métaboliques redondantes et/ou inutiles dans un contexte de vie symbiotique. Un biais d'acide aminés en faveur de A+T, ainsi qu'un ratio dN/dS supérieur seraient à l'échelle du génome entier des preuves robustes du caractère symbiotique obligatoire des souches Sp+.

Les regroupements hôte-spécifique observés dans la phylogénie et le potentiel caractère de symbiote obligatoire supposent un spectre d'hôte étroit des souches Sp+ du clade 1. Si les études précédentes semblent montrer un spectre d'hôte restreint des souches Sp+ associées à des espèces *A. incana* (AII et AIR), avec une infectivité et une efficacité de fixation limitée/nulle sur les espèces *Alnus glutinosa* et AAC (Weber *et al.*, 1987; Kurdali *et al.*, 1988; van Dijk *et al.*, 1988; Kurdali *et al.*, 1989), aucune n'a à ce jour porté sur les spectres d'hôte des souches Sp+ associées au complexe d'espèces *A. alnobetula*. Les souches Sp- auraient au contraire un spectre d'hôte plus permissif car moins impactées par un changement d'hôte (Markham, 2008). Cependant, aucun typage génétique des souches inoculées n'a été réalisé dans ces études, aussi leurs appartenances aux clades de la phylogénie de *Frankia* est inconnue, ce qui rend la définition de groupe de spécificité hasardeuse. Des expérimentations supplémentaires en conditions contrôlées sont nécessaires afin de tester les croisements sous-espèce d'aulnes *A. incana* et *A. alnobetula*, et différentes souches de *Frankia* Sp+ et Sp- génotypées et retrouvées en conditions naturelles dans les nodosités de ces différentes sous-espèces.

Ces premiers résultats font partie d'un travail plus complexe pour lequel des analyses complémentaires seront réalisées, afin d'évaluer la contribution relative des facteurs génétique des hôtes, climats, localisation géographique sur la distribution et la diversité des souches *Frankia* Sp+ et Sp- des espèces d'aulnes subarctiques. Une approche de régression multiple sur des matrices de distance (MRM) sera utilisée, avec une matrice correspondant pour chacun de nos paramètres (Lichstein, 2007). Ces travaux sont en préparation pour publication en collaboration avec le Pr. Roger W. Ruess de l'Institut de Biologie Arctique d'Alaska aux États-Unis, et le Dr. Hiroyuki Tobita de l'Institut de recherche en Foresterie et Produits forestiers de Tsukuba au Japon.

New Phytologist UNCORRECTED PROOF Research

Patterns of diversity, endemism and specialization in the root symbiont communities of alder species on the island of Corsica

Adrien C. Pozzi[1,2]*, Mélanie Roy[3]*, Mélissande Nagati[3], Guillaume Schwob[1], Sophie Manzi[3], Monique Gardes[3], Pierre-Arthur Moreau[4] and Maria P. Fernandez[1]

[1]Laboratoire d'Ecologie Microbienne, CNRS, INRA, VetAgro Sup, UCBL, Université de Lyon, Villeurbanne 69622, France; [2]Biométrie et Biologie Evolutive, CNRS, INRIA, VetAgro Sup, HCL, UCBL, Université de Lyon, Villeurbanne 69622, France; [3]Laboratoire Evolution et Diversité Biologique, UMR5174, Université Paul Sabatier – CNRS, 118 route de Narbonne, Toulouse Cedex F-31062, France; [4]Laboratoire IMPECS EA 4483, Fac. Pharma. Lille, Université de Lille, Lille F-59000, France

Authors for correspondence:
Adrien C. Pozzi
Tel: +33 472 448 200
Email: adrien.c.pozzi@gmail.com

Mélanie Roy
Tel: +33 561 556 420
Email: melanie.roy@univ-tlse3.fr

Received: *17 June 2017*
Accepted: *7 December 2017*

New Phytologist (2018)
doi: 10.1111/nph.14996

Key words: *Alnus* (alders), community ecology, Corsica, diversity, ectomycorrhiza (EM), endemism, *Frankia*, specialization.

Summary

• We investigated whether the diversity, endemicity and specificity of alder symbionts could be changed by isolation in a Mediterranean glacial refugium. We studied both ectomycorrhizal (EM) fungi and nitrogen-fixing actinobacteria associated with alders, and compared their communities in Corsica and on the European continent.

• Nodules and root tips were sampled on the three alder species present in Corsica and continental France and Italy. Phylogenies based on internal transcribed spacer (ITS) and a multilocus sequence analysis approach were used to characterize fungal and *Frankia* species, respectively. Patterns of diversity, endemism and specialization were compared between hosts and regions for each symbiont community.

• In Corsica, communities were not generally richer than on the mainland. The species richness per site depended mainly on host identity: *Alnus glutinosa* and *Alnus cordata* hosted richer *Frankia* and EM communities, respectively. Half of the *Frankia* species were endemic to Corsica against only 4% of EM species.

• Corsica is not a hotspot of diversity for all alder symbionts but sustains an increased frequency of poor-dispersers such as hypogeous fungi. Generalist EM fungi and host-dependent profusely sporulating (Sp+) *Frankia* were abundantly associated with Corsican *A. cordata*, a pattern related to a more thermophilic and xerophylic climate and to the co-occurrence with

Introduction

Alders are involved in a tripartite symbiosis with ectomycorrhizal (EM) fungi and nitrogen-fixing actinobacteria belonging to the genus *Frankia*. Compared to other trees, alders associate with few EM genera, some of them being strictly or mainly specific (Molina, 1981; Kennedy *et al.*, 2015). Similarly, alders associate with a specific clade of *Frankia* whose strains are shared with a limited number of other actinorhizal host plants (Normand *et al.*, 1996; Dawson, 2007). Among alders, the two subgenera *Alnus* and *Alnobetula* associate mainly with distinct EM (Rochet *et al.*, 2011; Roy *et al.*, 2013) and *Frankia* species (Pozzi *et al.*, 2015; Cotin-Galvan *et al.*, 2016). Few EM or *Frankia* species associate strictly with a single alder species and rather the host species influences the composition of its symbiont community (Lipus & Kennedy, 2011; Põlme *et al.*, 2013; Roy *et al.*, 2013). The reasons behind alder specificity have been intensely studied and tested, especially for EM fungi. Studies on European alders have demonstrated that the specificity pattern resulted from several events of host-tracking and host shifts (Rochet *et al.*, 2011). Other studies also demonstrated that alder phylogeny was strongly correlated with EM and *Frankia* community structures at a global scale (Põlme *et al.*, 2013, 2014). Apart from the host plant, other factors such as soil parameters, altitude and climate may also select adapted symbionts and explain some of alder's specificity. For instance, EM associated with alders are able to grow in high nitrate and low pH conditions, while other EM fungi show limited growth in these conditions (Huggins *et al.*, 2014). Soil type, acidity and moisture also shape part of *Frankia* diversity (Schwintzer, 1990; Markham & Chanway, 1998). Finally, co-migration or co-invasion events have probably maintained this specificity, as suggested for EM fungi in North America and New Zealand, and for *Frankia* globally (Kennedy *et al.*, 2011; Põlme *et al.*, 2014; Bogar *et al.*, 2015).

Several exceptions to the specificity pattern between alders and their symbionts have been identified in recent years. Alders can also associate with very generalist EM taxa that are often scarce but always present (Roy *et al.*, 2013), such as *Cenococcum geophilum* (Põlme *et al.*, 2013; Roy *et al.*, 2017). The study of co-occurring seedlings of *Alnus rhombifolia* and

*These authors contributed equally to this work.

© 2018 The Authors
New Phytologist © 2018 New Phytologist Trust

Betula occidentalis also revealed a few shared EM fungi, including *Alnicola* sp., and a significant effect of neighboring plants (Bogar & Kennedy, 2013). Similarly, the study of isolated *A. glutinosa* subsp. *barbata* populations in Georgia, a Tertiary and glacial refugium, revealed nonspecific species of *Inocybe* and *Tuber* spp. (Roy *et al.*, 2017). However, the detection of EM taxa shared with other host species remains rare, and is mainly limited to cases where alders are isolated or planted outside of their natural distribution range. These observations suggest that isolation or colonization of a new habitat may relax alder specificity and select new associations. Compared with EM fungi, no generalist *Frankia* has been described so far, as *Frankia* taxa associated with alders have never been detected on other host trees in the wild. The number of genera of actinorhizal plants able to associate with *Frankia* is also far lower and less diverse than genera of host plants associated with EM fungi. Thus, the co-occurrence of alders with another actinorhizal host is limited, although host-shifts of *Alnus*-infective *Frankia* have been described experimentally (Bosco *et al.*, 1992; Lumini *et al.*, 1996). As a consequence, isolated alder stands do not recruit generalist *Frankia* strains, as shown in Mexico and Georgia, where unique *Frankia* species have been detected (Higgins & Kennedy, 2012; Roy *et al.*, 2017). Moreover, *Frankia* sequences from Georgia were phylogenetically distant from other *Frankia* sampled worldwide. These observations suggest that refugia, or at least isolated populations, might host endemic *Frankia* species and show a strong biogeographic pattern of distribution, as shown for bacteria specialized toward a specific niche (Angel *et al.*, 2010; Brown *et al.*, 2012). Conversely, EM fungal species have a broader distribution, with only a few exceptions reported for Corsica (Rochet *et al.*, 2011).

The biogeographic pattern of symbiotic fungi and bacteria may also depend on their biology. Indeed, the ability to migrate with or without the host is impacted by life-history traits, particularly dispersal and host-dependency. Sporulation is a major component of microbe dispersal (Huang & Hull, 2017). Both EM fungi and *Frankia* are able to sporulate, yet with major differences. Among EM fungi, hypogeous taxa such as *Alpova* or *Melanogaster* sp. can be dispersed by small mammals and are less likely to migrate than wind-dispersed epigeous fungi. Because actinorhizal nodules closely resemble hypogeous structures, *Frankia* would also have more limited dispersal abilities as compared to epigeous fungi. Among *Frankia,* dispersal may also depend on contrasting sporulation traits. Indeed, some strains sporulate profusely within nodular cells (Sp+), while other strains do not (Sp−). Host-dependency also differs: EM fungi and Sp+ *Frankia* are considered to be obligate symbionts, while Sp− *Frankia* strains can be cultured and live as saprobes in soil (Schwintzer, 1990; Pozzi *et al.*, 2015; Cotin-Galvan *et al.*, 2016). These life history traits could lead to distinct symbiont distributions and impact alder symbiont communities, particularly where alders have been isolated, such as in glacial refugia or on islands.

In Europe, pollen records and phylogeographic studies have revealed several southern glacial refugia for alders, such as the Iberian peninsula, the Apennine mountains, Corsica (an island), North Africa, and the Balkan and Anatolian Peninsulas (King & Ferris, 1998; Douda *et al.*, 2014; Havrdová *et al.*, 2015; Mandák *et al.*, 2016), together with a few northern refugia (Douda *et al.*, 2014; Mandák *et al.*, 2016). Corsica was isolated from the continent (*c.* 80 km) 20–23 Ma (Blondel & Aronson, 1999) and is known as a hotspot of plant diversity and endemism (Médail & Quezel, 1997), where boreo-arctic plants took refuge from the Tertiary glaciations and now co-occur with Mediterranean and temperate elements (Jeanmonod & Gamisans, 2007). Three alder species are present in Corsica and show distinct degrees of isolation from the mainland. *Alnus cordata* (Loisel.) Duby is native both to Corsica and southern Italy, where it grows from 150 to 2000 m (Gamisans, 1999). *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn is a widespread Eurasian species and has colonized Corsican riparian forests, marshes and peat bogs from sea level up to 1300 m (Gamisans, 1999). *Alnus glutinosa* and *A. cordata* can co-occur and their distribution ranges partly overlap. Finally, the subalpine shrub *Alnus alnobetula* subsp. *suaveolens* (Req.) Lambinon & Kerguélen is endemic to Corsica, and diverged from the continental alpine subspecies *A. alnobetula* subsp. *alnobetula* (Ehrh.) K. Koch *c.* 1.1 Ma (Rochet *et al.*, 2011). These features invite study of alder symbiont communities in Corsica, and we investigate if they are particularly diverse and possibly endemic, and if host shifts could have occurred between the three alder species. No reports are available for *Frankia*. Previous studies on EM fungi of alder that partly investigated Corsican populations revealed only two endemic EM species, *Alpova corsicus* and *Melanogaster rivularis*, and highlighted the heterogeneity of EM communities and the abundance of generalist taxa such as ascomycetes on *A. cordata* roots (Moreau *et al.*, 2011; Roy *et al.*, 2013). In Corsica, *A. cordata* forms very typical mixed woods with *Castanea sativa* at mid-altitudes (Gamisans, 1999), while it forms rather monodominant stands along the Italian coast (Ducci & Tani, 2009). While mixed woods may affect the symbiont communities of alders in Corsica, no particular link was detected between *C. sativa* and *A. cordata* EM communities, probably due to the limited number of sites investigated (Taudiere *et al.*, 2015). This study also suggested the possible sharing of EM fungi between the three alder hosts. However, this situation was not compared with the mainland.

The aim of this study was to investigate the diversity, endemism and specialization patterns of alder symbionts in Corsica. We sampled both *Frankia* and EM fungi on the three alder species and compared Corsican communities with communities sampled from the continent, in France and Italy. To discuss species distributions for the two symbionts, we chose the same evolutionary species concept and used the most appropriate, yet different, molecular markers to delineate species for each symbiont. We hypothesized that alder symbiont communities in Corsica might be more species-rich and include more endemics, and that co-occurring alder or other host tree species may favor symbiont sharing. These questions will be discussed in the context of host history and current distribution, and of symbiont life history traits.

© 2018 The Authors
New Phytologist © 2018 New Phytologist Trust

Materials and Methods

Sampled sites

Seventy sampling sites were investigated on Corsica and in continental France and Italy, from lowland to subalpine habitats (Fig. 1; Supporting Information Table S1). Sampling was carried out in November 2011 in Corsica and in May 2012 in Italy. Data from sites previously studied were included as the sampling protocol was identical (Roy *et al.*, 2013; Pozzi *et al.*, 2015). At each site, one or two species of alder were present, either monodominant or scattered in mixed forests. Relevant climatic data were retrieved from the Worldclim database (http://www.worldclim.org) using the raster package in R (Hijmans & van Etten, 2012).

Symbiont and soil sampling

For each site, four to six trees – separated from each other by at least 10 m – were sampled from two opposing sampling points. Approximately 50 cm of roots harboring both EM root tips and nodules were collected per tree. For the most recent sampling sites (Table S2) a soil core of 3 cm diameter and 10 cm depth was driven into the soil close to the tree roots. Roots, nodules and soils were kept at 4°C until processing in the lab. Soils from the same sampling site were pooled, sifted at 2 mm and dried at 60°C before physiochemical analysis. Soil analyses were provided by ECOLAB (Toulouse, France) or retrieved from previous studies (Rochet *et al.*, 2011; Roy *et al.*, 2013). Approximately 16 EM root tips and four nodule lobes per tree were preserved, as previously described (Roy *et al.*, 2013; Pozzi *et al.*, 2015).

Molecular biology and sequencing of symbionts

For fungi, DNA extraction was performed on each EM root tip using Promega's Wizard genomic DNA purification kit, following the manufacturer's instructions. The fungal internal transcribed spacer (ITS) region was amplified as in Rochet *et al.* (2011). Putative new symbionts for alders were confirmed by sequencing the plant ITS to check the host identity. Sequencing of the amplification product was done by MilleGen (Labège, France). Sequences were checked and cleaned using Geneious 6.1.8 (Kearse *et al.*, 2012). All new fungal sequences produced in this study were deposited with GenBank under accession numbers KU924024–KU925159 and KY131803 (Table S3). For *Frankia*, DNA extraction was performed on each lobe individually, as previously described (Pozzi *et al.*, 2015). For the three housekeeping genes, *pgk*, *dnaA* and *ftsZ*, portions were amplified and sequenced with specific primers following Pozzi *et al.* (2015). Sequencing of the amplification product was done by Biofidal-DTAMB (Villeurbanne, France). Sequence quality was verified using 4Peaks v.1.7.2 (Griekspoor & Groothuis, 2007). All *Frankia* sequences were deposited with EMBL under accession numbers LT555594–LT555681 (*dnaA*), LT555682–LT555771 (*ftsZ*) and LT555772–LT555865 (*pgk*).

Identification of symbionts

We chose the same evolutionary species concept for both symbionts where species are sequence-based monophyletic clades of strains sharing a common ancestor. The molecular markers used to call operational taxonomic units (OTUs) were chosen based on their accuracy, reliability and appropriateness for each symbiont and were thus different. Yet, all the OTUs were delineated at the same taxonomic rank – namely species – enabling a valid comparison between EM and *Frankia* species. Sequences were assigned to a Linnaean name after phylogenetic analyses. They were designated by an arbitrary numbering system when several unnamed species were characterized in the same genus, particularly within the genus *Frankia* for which only a small portion of the existing genomospecies has been named.

For fungi, using BLAST on GenBank and UNITE, it was possible to assign sequences to putative genera and to UNITE species hypotheses (Table S3). The closest sequences (97–100% identical) and some more distant sequences (with a reliable Linnaean name) were used for the alignment. *Alnicola badiofusca* and *A. umbrina*, two species supported by morphology and ecology but not differentiated by ITS (Moreau *et al.*, 2013), were treated as a species complex and discarded from the analyses. Alignments were made using MAFFT (Katoh & Standley, 2013). Phylogenies of each EM genus were constructed using maximum likelihood analysis under a GTR+G model of evolution in RAxML (Stamatakis *et al.*, 2008). The robustness of phylogenies was tested by rapid bootstrapping (1000 pseudoreplicates) on the CIPRES Science Gateway (Miller *et al.*, 2010). We compared the ITS sequences with data obtained from sporocarps and the phylogenies developed for several genera associated with alders (Rochet *et al.*, 2011), as recommended to delineate accurate fungal species (Taylor *et al.*, 2000) corresponding to unified species (De Queiroz, 2007). For *Tomentella* spp., sequences associated with a Linnean name were often missing, and OTUs were delineated as monophyletic clusters of sequences, supported by a > 80% bootstrap value and sharing ITS sequences of > 97% similarity.

For *Frankia*, we used multilocus sequence analysis (MLSA) widely recommended to delineate prokaryotic species (Gevers *et al.*, 2005). Housekeeping genes were chosen as, for *Frankia*, they better correlate with phylogenetic and whole-genome data (Sen *et al.*, 2014; A. C. Pozzi *et al.*, unpublished). Amino acid sequences of the three loci were aligned separately with MUSCLE v.3.8.31 (Edgar, 2004) and concatenated as nucleotide sequences in SEAVIEW v.4.4.2 (Gouy *et al.*, 2010) for a subset of 94 nodules including 15 reference strains. The Bayesian inference of phylogeny was computed as in Pozzi *et al.* (2015) on the CIPRES Science Gateway (Miller *et al.*, 2010). OTU delineation was based on an enlarged dataset (one to three loci for 224 root nodules, Table S4) and a similar phylogenetic analysis, enabling a comparison of new sequences with lineages described worldwide (Pozzi *et al.*, 2015). We computed a histogram of pairwise phylogenetic distances (Fig. S1) and determined the threshold of 0.05 substitutions per site as the best barcode gap value (Kekkonen & Hebert, 2014) to delimit OTUs corresponding to unified species

© 2018 The Authors
New Phytologist © 2018 New Phytologist Trust

(De Queiroz, 2007). An OTU cladogram was also constructed from the phylogenetic distances.

Detection of spatial autocorrelation and geographic structure

To test whether symbiotic communities were spatially structured, a multivariate spatial autocorrelation test was performed (spdep package; Smouse & Peakall, 1999). Isolation by distance was tested through correlation between geographic distances (calculated from GPS coordinates; see Fig. 1 and Table S1) and Bray–Curtis distances through a Mantel test (Mantel, 1967).

Host and regional effects on alpha, beta and gamma diversities

For all diversity indices, we tested the influence of (1) host identity, with two factors: host subgenus and host species nested in subgenus, and (2) region, with two factors: Continent vs Corsica as the first regional level, and the difference between France and Italy nested in Continent as a second regional level. To compare the gamma (total) diversity between host and regions, species accumulation curves were computed. To estimate alpha diversity, species richness (number of species per site) and Shannon diversity indices were computed (diversity function of the Vegan package in R; Dixon, 2003). The species richness was square-root-

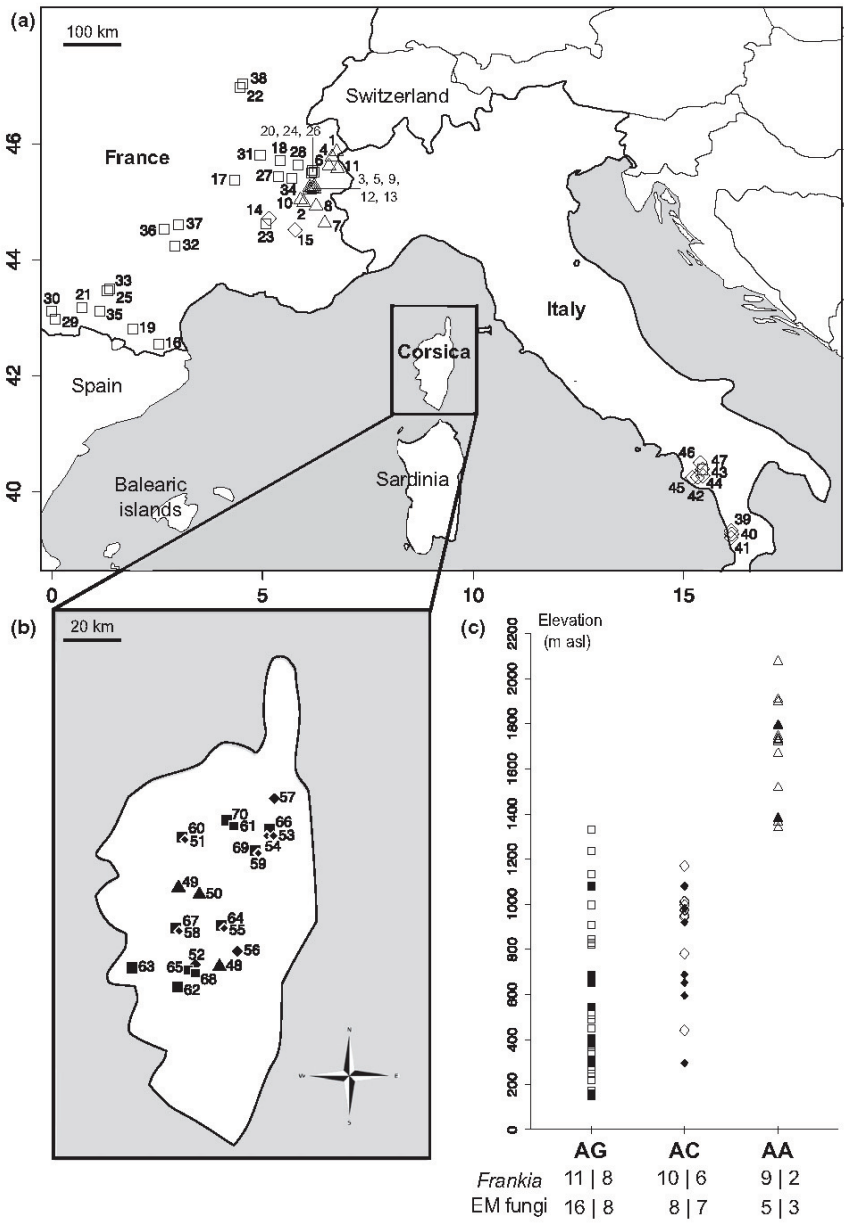


Fig. 1 Map of sampled populations. (a) Continental alder populations sampled in France and Italy. (b) Alder populations sampled in Corsica. (c) Elevation of sampled population (in metres above sea level (m asl)) for the three sampled alder species and number of sampled populations per symbiont (Continent|Corsica). (a–c) Open symbols, Continental populations; closed symbols, Corsican populations. Alder species: *Alnus glutinosa* (AG, squares); *A. cordata* (AC, diamonds); *A. alnobetula* (AA, triangles). EM fungi, ectomycorrhizal fungi. Population numbers refer to Supporting Information Tables S1 and S2.

© 2018 The Authors
New Phytologist © 2018 New Phytologist Trust

transformed to meet the assumption of homoscedasticity. An analysis of variance (ANOVA) was used to test the effect of all factors on alpha diversity indices (Table 1). To estimate beta diversity (dissimilarity between communities), Bray–Curtis distances were calculated per site (Bray & Curtis, 1957). Variance analysis of beta diversity was performed through a multivariate permutation test (Adonis, Vegan package in R; Table 2). A subsequent test was performed to check if beta diversity variance was homogeneous between hosts or regions (betadisper test followed by an ANOVA). The effect of host species and regional factors on site ordination was illustrated using nonmetric multidimensional scaling (NMDS, meta-MDS function, vegan package). The correlation between NMDS, host and regional factors as well as geographic and climatic variables was tested through a permutation analysis (envfit function, Vegan package in R). Only significant factors or variables ($P > 0.05$) were represented.

Species distribution and detection of symbiont endemism and specificity

To illustrate the distribution of shared symbiont species between regions and hosts in our dataset, and detect putative endemic or specific species, the abundance of *Frankia* and EM fungi was calculated per region (Corsica vs Continent) and per host species to build a Venn diagram and hierarchical clustering, ranked by Bray–Curtis distances (Bray & Curtis, 1957).

Phylogenetic approaches and taxonomic knowledge helped to detect true endemics and determine the specificity level of each symbiont species. Classes of specialization were established as follows: (I) species-specialist: 100% of the species records found with a single *Alnus* species (*A. alnobetula*, *A. cordata* or *A. glutinosa*); (II) subgenus-specialist: 100% of the records found within the subgenus *Alnus* (i.e. *A. cordata* and *A. glutinosa* in our dataset, and mainly *A. incana* (L.) Moench in additional data); (III) alder-specialist: 100% of the records found with *Alnus* spp. with the exclusion of other trees and environmental samples without alders; (IV) generalist: at least one reliable record of species not related to alders; and (V) undetermined. Classes I, II and III were common to EM fungi and *Frankia*, the others only to fungi. To compare the respective specificity patterns of EM fungi and *Frankia*, the species abundance matrix was recoded with the five classes of specialization for a restricted number of sites where both symbionts were sampled (Table S5). Site ordination (NMDS) and correlation between NMDS, host and regional factors as well as geographic and climatic variables were tested as described above. Four soil variables were also tested (KCl pH, %N, %C and C : N ratio).

Distribution of short-distance dispersal symbionts

The effects of short-distance dispersal of Sp+ *Frankia* and hypogeous fungi were tested between Corsica and the Continent. For *Frankia*, the *in planta* sporulation phenotype was determined microscopically on stained nodule sections (Pozzi *et al.*, 2015). A nodule was considered Sp+ when at least one sporangium was observed out of 50 infected plant cells (Schwintzer, 1990). The proportion of Sp+ nodules was calculated per host and per

Table 1 ANOVA on alpha-diversity indices

Symbiont	Diversity index		df	Sum of squares	*F*-statistics	*P*-value	Significance
EM	Species richness (square root)	Host subgenus	1	0.148	0.297	0.589109	ns
		Host species	1	0.523	1.046	0.312620	ns
		Region, level 1	1	1.747	3.496	0.069050	ns
		Region, level 2	1	6.448	12.904	0.000907	***
		Residuals	39	19.488			
	Shannon	Host subgenus	1	0.0331	0.656	0.4230	ns
		Host species	1	0.0386	0.764	0.3875	ns
		Region, level 1	1	0.1717	3.401	0.0728	.
		Region, level 2	1	1.3532	26.806	7.14e-6	***
		Residuals	39	1.9688			
Frankia	Species richness (square root)	Host subgenus	1	0.488	2.956	0.0937	.
		Host species	1	0.086	0.519	0.4757	ns
		Region, level 1	1	0.178	1.080	0.3053	ns
		Region, level 2	1	0.641	3.881	0.0562	.
		Residuals	38	6.275			
	Shannon	Host subgenus	1	0.653	2.939	0.0946	.
		Host species	1	0.000	0.000	0.99446	ns
		Region, level 1	1	0.095	0.429	0.5167	ns
		Region, level 2	1	1.255	5.652	0.0226	*
		Residuals	38	8.436			

Analysis of variance (ANOVA) was performed on the extrapolated species richness and Shannon index of each symbiont species pool. Symbiont (species|populations): ectomycorrhiza (EM) alone (110|44), *Frankia* alone (22|43). For EM and *Frankia,* two (nos. 43 and 59) and four (nos. 14, 15, 24 and 47) outlier populations were removed, respectively. df, degrees of freedom. Bioregion factor is nested: region level 2 (Corsica, France, Italy) into region level 1 (island, continental). Host factor is nested: host species (*Alnus alnobetula*, *A. cordata*, *A. glutinosa*) into host subgenus (*Alnobetula*, *Alnus*). Significance: ns, not significant; ., $P < 0.1$; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

© 2018 The Authors
New Phytologist © 2018 New Phytologist Trust

Table 2 Multivariate permutation test on ectomycorrhizal (EM) and *Frankia* community dissimilarities (beta-diversity)

Symbiont	Factor tested	df	Sum of squares	*F*-statistic	R^2	*P*-value	Significance
EM	Host subgenus	1	1.1119	3.4300	0.07055	0.001	***
	Host species	1	1.1409	3.5195	0.07239	0.001	***
	Region, level 1	1	0.3573	1.1024	0.02267	0.331	ns
	Region, level 2	1	0.5083	1.5682	0.03225	0.053	.
	Residuals	39	12.6423		0.80214		
Frankia	Host subgenus	1	3.3736	13.5854	0.21078	0.001	***
	Host species	1	1.8202	7.3301	0.11373	0.001	***
	Region, level 1	1	0.6829	2.7499	0.04267	0.016	*
	Region, level 2	1	0.6920	2.7867	0.04324	0.011	*
	Residuals	38	9.4362		0.58958		

Multivariate permutation test was performed on dissimilarities of Bray–Curtis distance matrices for each of the symbiont communities. Symbiont (species|populations): ectomycorrhiza alone (110|44), *Frankia* alone (22|43). Symbiont: for EM and *Frankia*, two (nos. 43 and 59) and four (nos. 14, 15, 24 and 47) outlier populations were removed, respectively. df, degrees of freedom. Host factor is nested: host species (*Alnus alnobetula, A. cordata, A. glutinosa*) into host subgenus (*Alnobetula, Alnus*). Region factor is nested: region level 2 (Corsica, France, Italy) into region level 1 (island, continental). *P*-values assess the overall significance of all terms together. Significance: ns, not significant; ., $P<0.1$; *, $P<0.05$; **, $P<0.01$; ***, $P<0.001$.

region. The equality of proportions was tested using a two-sample test with continuity correction (t.test function, stat package in R). We also tested the correlation between the proportion of Sp+ nodules and *Frankia* alpha diversity by a linear model and a Spearman rank-order correlation test (cor.test function, stat package in R). For EM fungi, we estimated the frequency of sequences identified as hypogeous fungi. The effect of host and region on their frequency at each site was tested by an ANOVA and completed with a Mann–Whitney test for pairwise differences, both computed in R.

Results

Molecular biology and sequencing of symbionts

For this study, 1139 EM root tips were collected in Corsica and 769 in Italy, of which 595 and 115 produced an EM sequence, respectively. In Italy, 45% of root tips were colonized by several fungi or were difficult to amplify and 33% of amplicons produced poor quality sequences. Sequences attributed to nonalder roots, that is 30 sequences belonging to Helotiales, Amanitaceae, Sebacinaceae, Boletaceae, Cantharellaceae and a Pezizales, as well as sequences attributed to alders but considered as endophytic rather than EM (Tedersoo *et al.*, 2009), that is 17 Helotiales, were discarded from the dataset. Our final dataset included 1343 EM and 224 *Frankia* sequences (Tables S3, S4).

Identification of EM symbionts

For fungi, 110 species were recognized (mean 99.1% similarity for the best BLAST, Table S3). The genera *Tomentella* and *Alnicola* were the most diverse (23 and 12 species, respectively), and the most abundant (351 and 186 sequences, respectively). Thirty-four species were not yet recorded on alders and half of them could not be named with certainty at the species level. In the genus *Lactarius*, the species identified as *L. lepidotus* (a specialist of *A. alnobetula* subsp. *alnobetula*) needed re-evaluation, as all sequences were clustered in two well-supported lineages (arbitrarily named '*L. lepidotus* 1' and '*L. lepidotus* 2'), both distinct from the two sister species *L. lilacinus* and *L. cuspidatoaurantiacus* (Fig. 2).

Identification of *Frankia* symbionts

For *Frankia*, a single concatenation of up to 2040 nucleotide positions was aligned and used to infer the phylogeny (Fig. 3b). The phylogenetic tree topology was highly supported by posterior probabilities. All Corsican symbionts belonged to the monophyletic lineage of *Alnus*-infective *Frankia* and grouped into five divergent clades (1, 5–8), of which three clades (6, 7 and 8) have not been described before. Clade 6 and subclade 8b were strictly Corsican. Strains associated with Corsican *A. alnobetula* subsp. *suaveolens* clustered in a monophyletic lineage (1a-AAS) close to two sister clades associated with the other subspecies, either *alnobetula* in Europe (1a-AAA) or *fruticosa* and *crispa* in North America (1a-AAF/AAC). Strains isolated from *A. cordata* were often shared between Corsica and Italy, except subclade 8b. For *A. glutinosa*, only clade 6 was endemic to Corsica. Twenty-four species were delineated among 224 sequences, 11 were singletons and three – 03, 20 and 23 – grouped together in *c.* 2/3 of the sequences (Fig. 3a). All the OTUs had species rank, as deduced from the reference strain positions in the phylogeny (Fig. 3b). As alder-infective *Frankia* species are mostly unnamed, the same is true for their phylogenetic clades and OTUs.

Autocorrelation test between sites and geographical structure

For EM fungi, the autocorrelation test was not significant (P= 8e-04) and the spatial weight was not included in further analyses. For 70 out of 73 species (37 singletons were removed), the distribution was not spatially aggregated and the Geary–

© 2018 The Authors
New Phytologist © 2018 New Phytologist Trust

COLOR

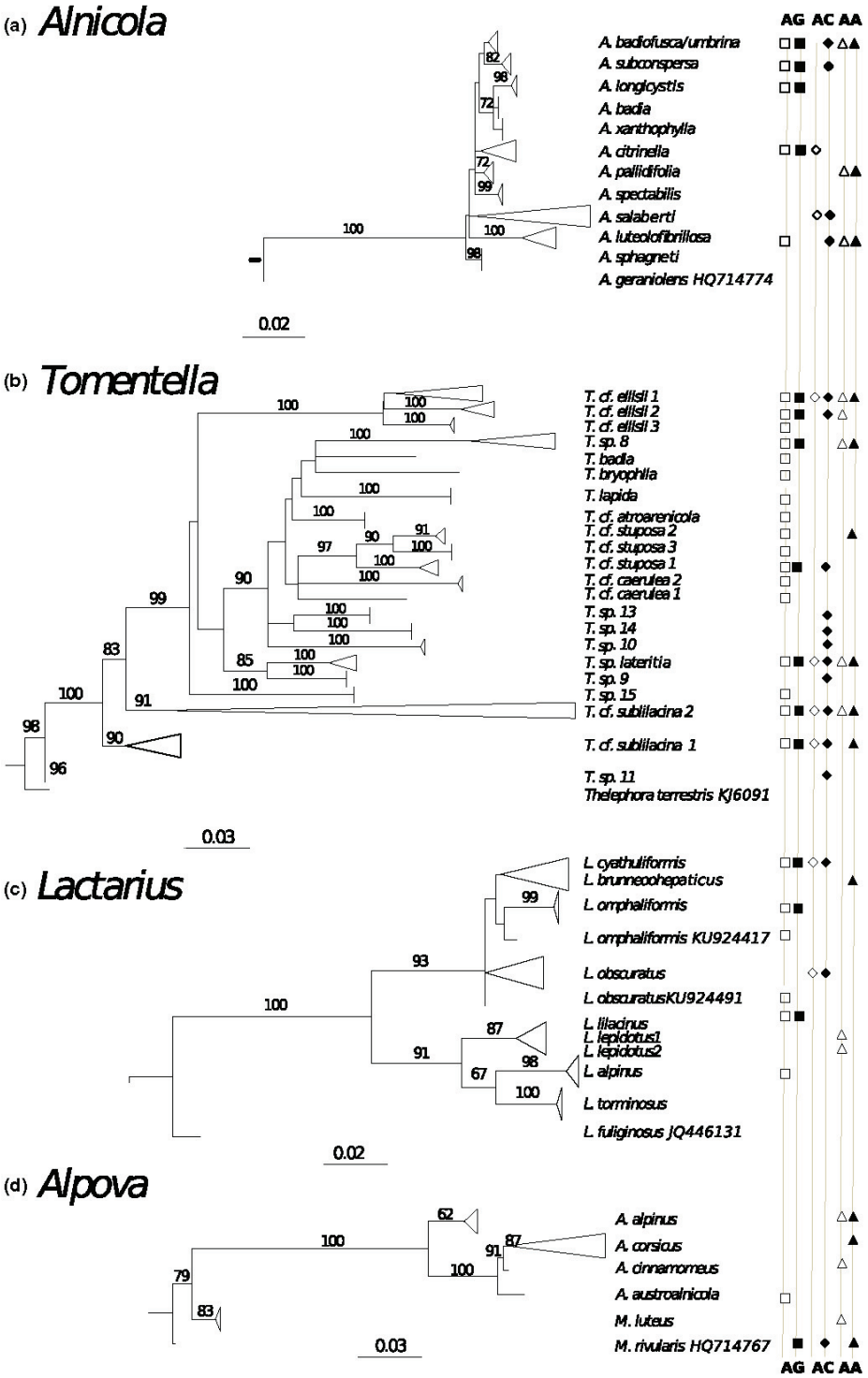


Fig. 2 Ectomycorrhizal (EM) fungi phylogenies. Phylogenies of EM genera associated with alders, based on the fungal internal transcribed spacer (ITS) regions and estimated using maximum likelihood: (a) genus *Alnicola*, (b) genus *Lactarius*, (c) genus *Alpova*, (d) genus *Tomentella*. (a–d) Strain origin (host plant): *Alnus glutinosa* nodules (AG, squares), *A. alnobetula* nodules (AA, triangles), *A. cordata* (AC, diamonds). Strain origin (region): continental France and Italy (open symbols) or Corsica (closed symbols). Node reliability was assessed using rapid bootstrapping (1000 pseudoreplicates). The scale represents the average number of substitutions per nucleotide.

© 2018 The Authors
New Phytologist © 2018 New Phytologist Trust

New Phytologist

Fig. 3 *Frankia* operational taxonomic unit (OTU) cladogram and multilocus sequence analysis (MLSA) phylogeny. (a) Cladogram of *Frankia* molecular taxonomic units (OTUs) calculated from the hierarchical clustering of *dnaA*, *ftsZ* and/or *pgk* marker alignment distances at the 0.05 threshold. Branch lengths are proportional to alignment distances and the angle sector of an OTU is proportional to its abundance. OTUs reported outside of the circle were singletons. (b) MLSA phylogeny of *Alnus*-infective *Frankia* based on concatenated sequences of *dnaA, ftsZ and pgk* markers and estimated by Bayesian inference. Strain origin (host plant): *Alnus glutinosa* nodules (squares), *A. incana* nodules (circles), *A. alnobetula* nodules (triangles), *A. cordata* (diamonds), reference strains (stars). Strain origin (region): continental France and Italy (open symbols) or Corsica (closed symbols). Phenotype of *in-planta* sporulation: spore-positive (+), spore-negative (−). Clades 6–8 are defined in the present study; clades 1–5 were defined in a previous study (Pozzi *et al.*, 2015). G1–G4, genomospecies of *Frankia* cluster 1 (Fernandez *et al.*, 1989). Clusters 1–4, as defined in Normand *et al.* (1996). Node reliability was assessed using posterior probabilities. The scale represents the average number of substitutions per nucleotide.

© 2018 The Authors
New Phytologist © 2018 New Phytologist Trust

Moran test was only significant ($P < 0.05$) for three species, *Alnicola salabertii*, *Lactarius obscuratus* and *Russula* sp. 2. No correlation was detected between geographic distance and beta diversity for EM (Mantel test, $r = 0.06$, $P = 0.12$). The *Frankia* dataset was not spatially autocorrelated, based on a multivariate randomization test ($P = 0.0905$). At the species level, only OTUs 3, 4 and 23 showed a spatially aggregated distribution (Geary–Moran test, $P < 0.05$). However, beta diversity and geographic distance were correlated (Mantel test, $r = 0.11$, $P = 0.02$).

Host and regional effects on gamma, alpha and beta diversities

Accumulation curves of *Frankia* reached a saturation plateau, while EM fungi did not (Fig. S2a). In Corsica, more EM species were associated with *A. cordata* compared to continental communities (Fig. S2b), the opposite pattern being observed for EM communities associated with *A. glutinosa*, while *A. alnobetula* subsp. *suaveolens* and subsp. *alnobetula* species accumulation curves did not differ and were instead influenced by sampling size. Overall, we did not detect a significant difference between Corsica and the Continent, nor a significant host effect on EM species richness and alpha diversity (Shannon index, Table 1). At the site level, EM species richness was not significantly higher in Corsica, and only Italian communities were less diverse and less species-rich. For *Frankia*, accumulation curves per host and per region followed a different trend compared to EM fungi. More species were associated with *A. glutinosa* in Corsica compared to the Continent and the opposite pattern was observed for *A. cordata* (Fig. S2c). Compared to these two host species, *A. alnobetula* subsp. *alnobetula* hosted fewer species than other alders on the Continent, and too few sites were investigated for *A. alnobetula* subsp. *suaveolens* to compare its accumulation curve. At the site level, *Frankia* communities hosted significantly more species in France compared to Italy (Table 1). The Shannon diversity index followed the same pattern as EM fungi, and only Italian communities were less diverse.

Beta diversity was not significantly different between EM communities in Corsica and the Continent, but slightly distinct when comparing Corsica, Italy and continental France (Tables 2, S6). Differences between communities were partly explained by the host subgenus (7%) and host species (7%) factors, yet 80% of the variation remained unexplained (Table 2). Communities associated with *A. cordata* were particularly distinct between Corsica and Italy (Fig. 4a). For *Frankia*, 4% of the beta diversity variation was explained by a Corsica vs Continent difference, 4% by the difference between Italy and France, 11% by the host species and 21% by the subgenus. In all, 41% of beta diversity variation was explained by these factors (Table 2). The strongest differences illustrated by the NMDS were between *A. cordata* communities in Italy and Corsica, and between *A. alnobetula* subspecies and the two other alder species (Fig. 4c). Subsequent tests confirmed that *A. alnobetula* hosted less variable communities than other hosts (ANOVA on betadisper test, $P = 0.047$ and 0.008699 for EM fungi and *Frankia*, respectively) and that communities were as variable in Corsica as on the continent (ANOVA on betadisper test on region level 1, $P = 0.897$ and 0.8518 for EM and *Frankia*, respectively).

Climatic variables had different effects on EM fungi and *Frankia* communities, the NMDS structure being significantly correlated with twice as many variables for *Frankia* than for EM (Table S6; Fig. 4b,d). The effects of longitude and elevation were significant for EM and *Frankia*, and latitude for EM only (Table S6). For *Frankia*, bioclimatic and geographic variables were correlated with the host subgenus and species factors (Fig. 4d). Soil variables were not included, due to the lack of data available for several sites (Table S2).

Species distribution and detection of endemism and specificity

For fungi, 37 out of 110 species were restricted to Corsica – of which 12 were observed only once – and six were unique to Italy. For *A. cordata*, 33 of 44 species were exclusive to Corsica (Fig. 5). Two of these (*Clavulina* sp. 1 and *Russula* sp. 7) can be considered as potential endemics of Corsica as they have never been found before. For *A. alnobetula* subsp. *suaveolens*, six out of 17 species were restricted to Corsica (Fig. 5). Two hypogeous species, already described in Corsica, *Alpova corsicus* and *Melanogaster rivularis*, were true endemics. For *A. glutinosa*, only seven out of 24 species were restricted to Corsica in our dataset but they were mostly unnamed and therefore their endemism remains to be proved. For *Frankia*, four species were restricted to continental France, three to Italy and 10 were endemic to Corsica, of which seven were observed only once (Table S4). *A. glutinosa* hosted all the endemic *Frankia* species and shared three species with *A. cordata*, while *A. alnobetula* subsp. *suaveolens* did not host any endemic species (Fig. 5). Hierarchical clustering showed that the distribution of EM fungi and *Frankia* species was explained first by host and then by region.

The specialization class of each species is reported in Tables S3 and S4 for EM fungi and *Frankia*, respectively. Over the whole dataset, 20% of EM species were quoted as undetermined and 35% as generalists. All *Frankia* species were strictly associated with alders, and not considered as generalists – a term applied here only to fungi. Eight per cent of *Frankia* and 15% of EM species were alder-specialists, 25% of *Frankia* and 17% of EM species were subgenus *Alnus*-specialists, 42% of *Frankia* and 2% of EM species were *A. glutinosa*-specialists, 16% of *Frankia* and 4% of EM species were *A. cordata*-specialists and 8% of *Frankia* and 7% of EM species were *A. alnobetula*-specialists. Over the sites studied, the positions of specificity class factors were similar for both symbionts except for alder-specialists (Fig. 4e). Communities associated with *A. glutinosa* in Corsica did not appear more specialized than those on the Continent. By contrast, both *Frankia* and EM specificity was reduced in Corsica compared to Italy (Fig. 4e). The higher proportion of symbionts specific to the *Alnus* subgenus was significantly correlated with several bioclimatic variables related to warmer and dryer conditions.

© 2018 The Authors
New Phytologist © 2018 New Phytologist Trust

New Phytologist

COLOR

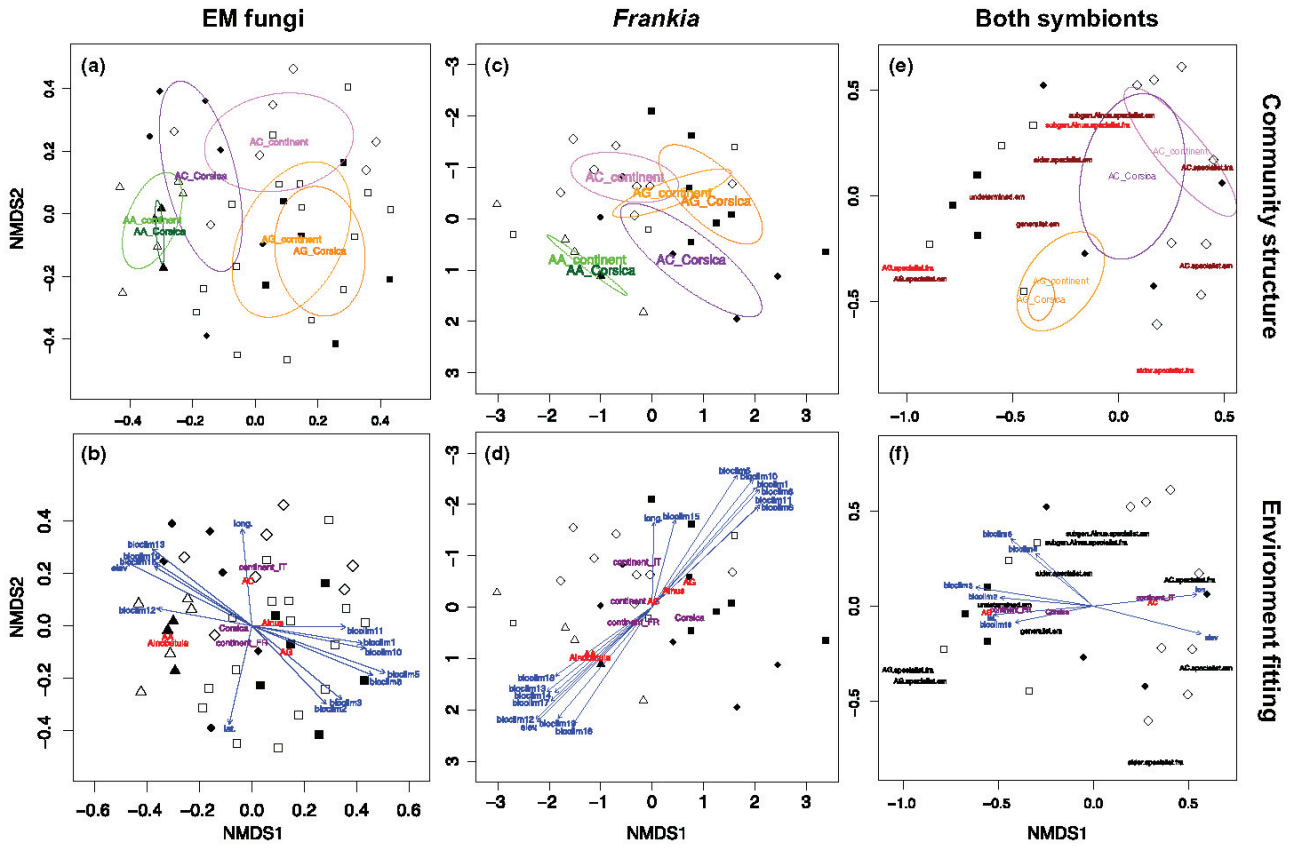


Fig. 4 Community structures and environment fitting for ectomycorrhizal (EM) fungi and *Frankia*. Community structure of (a) EM fungi, (c) *Frankia* and (e) both symbionts. Fitting of environmental variables and factors for (b) EM fungi, (d) *Frankia* and (f) both symbionts. (a, c, e) The effect of alder host species (*Alnus alnobetula*, AA; *A. cordata*, AC; *A. glutinosa*, AG) and regions (Corsica vs Continent) on site ordination is illustrated by nonmetric multidimensional scaling (NMDS). For (a) EM fungi and (c) *Frankia*, two (nos. 43 and 59) and four (nos. 14, 15, 24 and 47) outlying populations were removed, respectively; for (e) both symbionts, only alder populations in common were included except three *Alnus alnobetula* populations that were discarded. (b, d, f) The correlation between NMDS, host and regional factors as well as geographic and climatic variables was tested through a permutation analysis (envfit function). (f) Four soil variables were also tested. Only significant factors ($P > 0.05$) are represented (see Table S6 for details).

None of the soil variables tested was significant (Fig. 4f; Table S6).

Distribution of short-distance dispersal symbionts

Spore-positive (Sp+) *Frankia* were identified in all regions and host species. In Corsica and on the Continent, *Frankia* nodules were 100% Sp+ vs 69.2% for *A. alnobetula*, 12.8% Sp+ vs 45.7% for *A. glutinosa*, and 86.1% Sp+ vs 35.3% for *A.* cordata, respectively. These proportions were significantly different between Corsica and the Continent (two-sample test with continuity correction, all $P < 0.01$). Species richness was partly explained by the Sp+ frequency (linear model, $P < 0.1$; adjusted $R^2 = 25–50\%$ according to the regression method) and these two parameters were negatively correlated (Spearman rank-order correlation, $P < 0.01$; $\rho = -0.90$).

Seven genera of hypogeous fungi were detected: *Alpova*, *Hydnobolites*, *Melanogaster*, *Octaviania*, *Pachyphlodes* and *Tuber* spp. The frequency of the hypogeous fungi group (based on the number of sequences) was higher in Corsica than on the Continent (ANOVA, $P = 0.03$). However, the predominance of hypogeous fungi in Corsica, as compared to Italy, was significant for *A. cordata* (Mann–Whitney test on hypogeous frequency, $P = 0.02$, Fig. S3), but not for the two other alder species (Mann–Whitney tests on hypogeous frequency, $P = 0.62$ for both). Of interest, *Cenococcum geophilum*, a common and widespread ascomycete that does not produce fruiting bodies, was found only twice in Corsica.

Discussion

Based on classical hypotheses on islands and ice-age refugia, we expected to detect higher alpha and gamma diversity of symbiont communities on Corsican alders, and following recent studies on alders, we also expected more endemic species of *Frankia*. Interestingly, Corsica harbours a high level of diversity in some cases, but the patterns of distribution were far more complex than assumed. This was because

© 2018 The Authors
New Phytologist © 2018 New Phytologist Trust

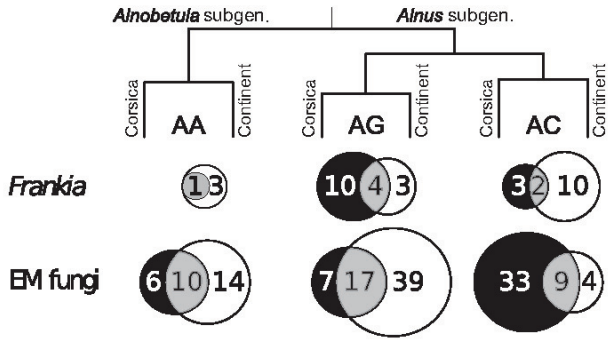


Fig. 5 Distribution of ectomycorrhizal (EM) fungi and *Frankia* species among regions and hosts. The clustering was based on community similarity (Bray–Curtis distance). The Venn diagrams show, for each symbiont and each host, the number of species in Corsica and on the Continent, as well as the number of species shared between the two regions. Hosts, *Alnus alnobetula* (AA), *A. cordata* (AC), *A. glutinosa* (AG).

geographic isolation had a different effect on each symbiont community, which in turn also depended on the host species. This suggests that the theory of island biogeography may not apply in every case.

Diversity of symbiont communities

Corsican *Frankia* communities were more diverse on *A. glutinosa*, as previously reported on *A. glutinosa* subsp. *barbata* from the Colchis region , another glacial and Tertiary refugium for alders (Roy *et al.*, 2017). Despite a similar sampling effort in Corsica, the number of *Frankia* species on *A. cordata* was three times lower than on *A. glutinosa*. This difference can be partly explained by the sporulation phenotype. Most strains isolated from *A. glutinosa* in Corsica were Sp− while most strains from *A. cordata* were Sp+, confirming that the percentage of Sp+ nodules on alder stands negatively correlates with *Frankia* diversity at a regional scale, as already shown in Europe and North America (Pozzi *et al.*, 2015). As Sp+ strains are highly host-dependent and produce a huge number of clonal offspring, they would invade the roots locally (Cotin-Galvan *et al.*, 2016) and could prevent hosts from associating with other *Frankia* strains, creating a bottleneck effect in *Frankia* diversity. Conversely, Corsican EM communities were richer on *A. cordata,* while it was not the case in a previous study (Roy *et al.*, 2013). The number of EM species on *A. cordata* was twice that on *A. glutinosa*. This difference was due to an increased recruitment of generalist EM fungi rather than a recruitment of unique alder specialist EM fungi by *A. cordata,* a situation which would be easily achieved in Corsica where the ecological range of *A. cordata* includes mixed forests. In summary, communities were distinct between regions, and shaped by their geographic position, confirming that the spatial structure of alder symbiont communities could be relatively strong at the regional scale, as previously demonstrated for EM (Peay *et al.*, 2007, 2010) and for both symbionts, especially in refugia (Roy *et al.*, 2017). However, regional differences were not necessarily explained by the recruitment of endemic symbionts.

EM and *Frankia* endemism

While 37 EM species were detected only in Corsica, only four can be considered to be true endemics after database queries: the two hypogeous fungi *Alpova corsicus* and *Melanogaster rivularis* (Moreau *et al.*, 2011), one unidentified *Russula* and one *Clavulina* species – '*Clavulina* sp. 1', specific to *A. cordata*. Interestingly, these last two species are epigeous (our unpublished observations for *Clavulina* sp. 1) and supposedly wind-dispersed, but they have not been found associated with *A. cordata* on the continent. They were not found in native stands in Calabria either, unlike the most common *A. cordata*-specialist, *Alnicola salabertii*, which is present wherever its host can be found (Moreau & Garcia, 2005). The remaining 33 EM species were generalist fungi previously recorded outside of Corsica, such as *Amanita rubescens* or *Russula delica*. These data confirm that alder stands in Corsica host no more than a few endemic EM species (Taudiere *et al.*, 2015). Similarly, a study on polypores in Corsica also failed to detect endemic taxa (Nemergut *et al.*, 2001). According to a review on EM fungi, isolation by distance was only detected for wind-dispersed populations separated by thousands of kilometres (Douhan *et al.*, 2011). All these observations suggest that geographic distance and time of separation between Corsica and the European continent were not sufficient to induce speciation for EM fungi, with the exception of a few hypogeous species which might be paleoendemics rather than allospeciated (Moreau *et al.*, 2011).

As *Frankia* may be more dispersal-limited than EM fungi, we expected unique *Frankia* species and richer communities in Corsica. Indeed, 50% of the recovered *Frankia* species have never been recorded on the continent or in previous samples (Pozzi *et al.*, 2015; Roy *et al.*, 2017) and were therefore considered to be endemic to the island. Surprisingly, the more widespread was the alder species, the more endemic *Frankia* it hosted in Corsica: *A. glutinosa* hosted more endemic species than *A. cordata*, while the strictly Corsican *A. alnobetula* subsp. *suaveolens* hosted no endemic species (Fig. 5). However, although all *A. alnobetula* strains constituted a unique species (clade 1a) in the phylogeny (Fig. 3), Corsican strains clustered together (clade 1a AAS), suggesting the existence of an endemic lineage at a taxonomic rank lower than species. The divergence between Corsican and continental *A. alnobetula* populations only 1.1 Ma (Rochet *et al.*, 2011) was probably not sufficient to allow speciation of *Frankia* and detection of endemic species. At the opposite end of the spectrum, the oldest divergence in *Frankia* phylogeny corresponded to clade 8. This group is entirely associated with *A. cordata*, a species that diverged from other alders 22.9 Ma (Rochet *et al.*, 2011). The position of Italian strains in this clade suggests a later colonization from Corsica, possibly across the terrestrial bridge connecting Corsica to Italy during the Messinian crisis 5 Ma (Clauzon *et al.*, 1996). This past exchange between Corsica and Italy may explain the current reduced endemism

© 2018 The Authors
New Phytologist © 2018 New Phytologist Trust

found on *A. cordata* in Corsica. For *A. glutinosa*, the presence of numerous endemic species of *Frankia* found in Corsica confirms the pattern recently described in another Tertiary and glacial refugium, the Colchis region (Roy *et al.*, 2017). However, for Corsica, *A. cordata* and *A. glutinosa* occur sympatrically at mid-altitudes, where they could hybridize (Lhote, 1985; King & Ferris, 2000; Gryta *et al.*, 2017), explaining why endemic strains can be shared between the two hosts.

Patterns of specialization

In Corsica, the co-occurrence of three alder species and the growth of *A. cordata* in mixed woods represent a rare situation for EM fungi, as alders generally contribute little to networks (Kennedy *et al.*, 2015; Taudiere *et al.*, 2015). We indeed detected shared symbionts in Corsica, but also on the continent and not necessarily at the scale of alder stands. Interestingly, we detected *Frankia* species shared between *A. glutinosa* and *A. cordata* both in Corsica and on the continent (for instance, OTU 20). This pattern of *Frankia* co-occurrence was relatively rare, as 66% of *Frankia* species are only associated with a single alder species in our dataset. This was considerably more than the 13% for EM fungi. Only 8% of *Frankia* species were found to be associated with the three studied alder species, compared to 17% in EM fungi. Thus, *Frankia* species appeared to be more host-specific than EM species. Among EM fungi, 10 species belonging to the genera *Alnicola*, *Lactarius* and *Tomentella* were shared between alder species both on the continent and in Corsica. Only two EM species were shared only in Corsica, *Cenococcum geophilum* – a generalist – and *Pachyphlodes* sp. Therefore, the distribution of alders in Corsica might not promote recent host shifts or sharing, in line with observations on the continent. The analysis of EM specificity confirmed that *A. cordata* hosted 'more generalist' communities in Corsica, compared with pure *A. cordata* stands like those in Italy. Although the sequencing rate was lower on Italian populations than in Corsica, the species accumulation curve of *A. cordata* in Italy was saturated, suggesting that sampling bias may not explain the difference in specificity. We did not detect a correlation between community specialization and any soil variable tested in our study, consistent with the literature (Põlme *et al.*, 2011; Rochet *et al.*, 2011). Our results suggest rather that a warmer and drier climate correlates with less specialized, more generalist symbiont communities. Numerous ascomycetes were isolated from *A. subcordata* (C.A.Mey) Regel in Iran (Põlme *et al.*, 2013) and *A. glutinosa* subsp. *barbata* (C.A.Mey) Yalt. in Georgia (Roy *et al.*, 2017). These two alder species are Tertiary relics of the Hyrcanian forest and the Colchis region, and colonize relatively dry and warm habitats, like *A. cordata* in Corsica. Interestingly, Corsican *A. cordata* hosted more ascomycetes and hypogeous taxa than in Italian populations or other hosts. Hypogeous taxa are also supposedly well adapted to drought (Richard *et al.*, 2011; Herzog *et al.*, 2013) and are abundant in Mediterranean or dry habitats (for a review see Zambonelli *et al.*, 2014). Sequences of *Tuber* sp. were detected on these three alder species, and also on *A. glutinosa* introduced to New Zealand (Bogar & Kennedy, 2013; Bogar *et al.*, 2015). None of these sequences is identical and their detection on a few sites suggests local recruitment rather than true specialization on alders.

Conclusion

Study of the *Frankia*–EM–alder symbiosis in Corsica is an interesting model, permitting finer analysis at the community level. We detected a high level of endemism for *Frankia* but not for EM fungi. Our results also revealed that symbionts which are host-specialists or poor dispersers have distinct biogeographic patterns. Yet, it is difficult to fully understand the biogeography of this tripartite symbiosis at a regional scale, perhaps because several dispersal events contributed to the colonization of Corsica and because gene flow with populations on the continent remains important at least for epigeous fungi. While Corsica is well known as a hotspot of plant diversity, comparison with Italy clearly showed that other alder stands can also host diverse *Frankia*. Finally, specificity patterns of both symbionts followed a common trend and did not increase particularly in Corsica, suggesting that specificity rarely varies at these geographic and temporal scales. Only *A. cordata* clearly associated with more generalist EM fungi and more host-dependent Sp+ *Frankia*, which raises new questions about the ecology of this peculiar host.

Acknowledgements

We thank Jean Alessandri (Société Mycologique d'Ajaccio), Laëtitia Hugot (Conservatoire Botanique de Corse), Marc-André Selosse (MHNH, Paris), Sonia Ravera (Orto Botanico di Roma), Alessandro Bellino and Domenico Puntillo for their help with sampling in Corsica or Italy. We also thank Ian Dickie, Peter Kennedy and two anonymous reviewers for their useful comments that helped to improve this paper, and Benjamin Durrington and Alain Roy for editing the text. M.R. was funded by an EC2CO MicrobiEn grant, and A.C.P. by an MHER doctoral fellowship.

Author contributions

All authors contributed to this work. A.C.P., M.R., P-A.M., M.G. and M.P.F. designed the research and collected new samples in Corsica. A.C.P., M.N., G.S. and S.M. performed the laboratory work. A.C.P., M.R. and M.N. analyzed the data. A.C.P., M.R., P-A.M. and M.P.F. interpreted the data and wrote the manuscript. A.C.P. and M.R. contributed equally to this work.

ORCID

Adrien C. Pozzi http://orcid.org/0000-0001-6765-4293

References

Angel R, Soares MIM, Ungar ED, Gillor O. 2010. Biogeography of soil archaea and bacteria along a steep precipitation gradient. *The ISME Journal* **4**: 553–563.

© 2018 The Authors
New Phytologist © 2018 New Phytologist Trust

CHAPITRE II : ROLE DE L'ESPECE DE LA PLANTE-HOTE

Préambule

A la suite du premier chapitre, un patron de distribution des souches de *Frankia* Sp+ centré sur les milieux sub-/alpins et boréaux a été démontré le long d'un transect d'échantillons allant des forêts boréales d'Alaska jusqu'au montagnes du Japon, en passant par l'Arc alpin Européen, la Corse et les massifs de l'ouest de l'Europe (Carpates, Oural). Dans ce deuxième chapitre, nous nous proposons de creuser les déterminants de la biogéographie observée des souches de *Frankia* Sp+.

La sporulation conférerait un avantage écologique quand, à la sénescence des nodosités racinaires, les spores sont libérées dans le sol, permettant alors une meilleure chance de réassociation à l'hôte par un nombre de propagules infectantes plus importantes. Ainsi, la première partie de ce deuxième chapitre aura pour but de confirmer l'avantage de la sporulation *in planta* de *Frankia* en termes d'infectivité et de compétitivité pour l'infection racinaire, ainsi que ses implications en termes de spécialisation vis à vis de l'espèce de la plante-hôte. Dans un premiers temps, 15 souches de *Frankia* Sp+ et Sp- sous la forme de broyats de nodosités racinaires provenant de 3 espèces d'aulnes (*A.* glutinosa, *A.* incana, *A.* viridis) ont été inoculées sur des plantules d'*Ag* et d'*Ai* afin de tester les spectres d'hôtes de chacune. Dans un second temps, des inocula ont été créés à partir de mélanges de broyats de nodosités Sp+ et Sp- dans différents ratios, et ont été inoculées sur des plantules d'*Ag* et d'*Ai* pour tester la compétitivité des souches Sp+.

Ces expérimentations, pour lesquelles il nous a été possible de participer à l'obtention des résultats, ont fait l'objet d'une publication dans la revue Microbes and Environments (Cotin-Galvan *et al.* 2015, décembre 2015 volume 31).

Comme nous l'avons soulevé dans le 1er chapitre, et du fait de l'étagement des espèces d'aulnes *in natura* selon un gradient d'altitude/latitude, les facteurs espèce-hôtes et climat sont confondants du fait du non-recouvrement des aires de distribution des espèces d'aulnes (Dai *et al.*, 2005), ne nous permettant ainsi pas de conclure sur un effet de l'un, de l'autre ou des deux facteurs dans la biogéographie des souches de *Frankia* Sp+. Dans la deuxième partie de ce second chapitre, l'objectif est donc de découpler les effets climat et espèce-hôte en réalisant des expérimentations croisées en chambre climatique au laboratoire, permettant de standardiser les paramètres climatologiques. La question posée est de savoir si les espèces *Ai* et *Av* sont majoritairement associées à des souches Sp+ parce que seules des souches Sp+ sont présentes dans les biotopes de ces deux espèces – ce qui témoignerait d'un effet prédominant du facteur pédoclimatique – ou si ces deux espèces hôtes sélectionnent préférentiellement des souches Sp+ pour former une symbiose, dans un contexte écologique mixte (Sp+ et Sp-) – ce qui révélerait alors d'un effet prédominant de l'espèce-hôte.

Pour répondre à ces questions, il était nécessaire de travailler directement à partir de sols et de leurs communautés microbiennes complexes, les broyats de nodosités n'amenant souvent qu'un inoculum mono-souche. Ces sols ont été prélevés sous 6 aulnaies différentes : 2 aulnaies pour chaque espèce-hôte, l'une majoritairement Sp+ et l'autre majoritairement Sp-. Sur ces 6 sols, des graines de chacune des 3 espèces *Ag*, *Ai* et *Av* ont été mises à germer séparément, en chambre climatique à luminosité, température et humidité ambiante régulée afin de standardiser l'effet « climat » (Figure II.1).

<u>Figure II.1</u> Dispositif expérimental des piégeages croisés en chambre climatique.

De jeunes plantules de 3 espèces d'aulnes (*A. glutinosa, A. incana* et *A. viridis*) ont été placées sur 6 sols d'aulnaie différents – 3 sols d'aulnaie Sp- à *Ag*, *Ai* et *Av* et 3 sols d'aulnaie Sp+ à *Ag*, *Ai* et *Av*.

Après 6 mois de croissance, les plantules ont été sacrifiées, et les nodosités présentes dénombrées, phénotypées pour en déterminer le type de sporulation (Sp+ ou Sp-) et génotypées afin de comparer les spectres d'association de chacun des 3 hôtes.

Ces résultats ont fait l'objet d'une publication, actuellement en cours de préparation pour une soumission dans la revue Applied and Environmental Microbiology.

Microbes Environ. Vol. 31, No. 1, 11-18, 2016
https://www.jstage.jst.go.jp/browse/jsme2 doi:10.1264/jsme2.ME15090

In-planta Sporulation Capacity Enhances Infectivity and Rhizospheric Competitiveness of *Frankia* Strains

Laetitia Cotin-Galvan[1,2], Adrien C. Pozzi[1,2], Guillaume Schwob[1,2], Pascale Fournier[2], Maria P. Fernandez[1,2], and Aude Herrera-Belaroussi[1,2]*

[1]*PRES Université de Lyon, F-69361, Lyon, France and Université Lyon 1, F-69622, Villeurbanne, France; and* [2]*CNRS, UMR 5557, Ecologie Microbienne, Villeurbanne, F-69622, France*

(Received June 12, 2015—Accepted November 16, 2015—Published online December 26, 2015)

Frankia Sp+ strains maintain their ability to sporulate in symbiosis with actinorhizal plants, producing abundant sporangia inside host plant cells, in contrast to Sp– strains, which are unable to perform *in-planta* sporulation. We herein examined the role of *in-planta* sporulation in *Frankia* infectivity and competitiveness for root infection. Fifteen strains belonging to different Sp+ and Sp– phylogenetic lineages were inoculated on seedlings of *Alnus glutinosa* (Ag) and *A. incana* (Ai). Strain competitiveness was investigated by performing Sp–/Sp+ co-inoculations. Plant inoculations were standardized using crushed nodules obtained under laboratory-controlled conditions (same plant species, age, and environmental factors). Specific oligonucleotide primers were developed to identify *Frankia* Sp+ and/or Sp– strains in the resulting nodules. Single inoculation experiments showed that (i) infectivity by Sp+ strains was significantly greater than that by Sp– strains, (ii) genetically divergent Sp+ strains exhibited different infective abilities, and (iii) Sp+ and Sp– strains showed different host preferences according to the origin (host species) of the inocula. Co-inoculations of Sp+ and Sp– strains revealed the greater competitiveness of Sp+ strains (98.3 to 100% of Sp+ nodules, with up to 15.6% nodules containing both Sp+ and Sp– strains). The results of the present study highlight differences in Sp+/Sp– strain ecological behaviors and provide new insights to strengthen the obligate symbiont hypothesis for Sp+ strains.

Key words: *In-planta* sporulation, *Frankia*, competitiveness, infectivity, host-range, actinorhizal symbiosis

Frankia is a soil filamentous actinobacterium that is capable of forming N_2-fixing symbiotic root nodules on a diverse array of actinorhizal plants. Hyphae, diazovesicles (specialized cells for N_2 fixation under aerobic conditions), and multilocular sporangia are the typical cell morphological features of *Frankia* grown in cultures (4, 28). Unlike hyphae and diazovesicles, sporangia are not constantly observed *in-planta*. Two types of nodules have been identified: Sp+ nodules, hosting abundant sporangia inside plant cells, and sporangia-free Sp– nodules (43). Sp+ nodules have been detected in 9 out of 23 actinorhizal plant genera, and at a high frequency in the genus *Alnus* (37). Historically, *in-planta* sporulation is considered to be a genetically stable characteristic (44), suggesting the existence of two types of *Frankia* strains (Sp+ *vs* Sp–). However, the inability to isolate strains from Sp+ nodules, despite numerous attempts, has limited their study.

To the best of our knowledge, Sp+ *Frankia* strains represent a unique model of endophytic symbionts with the ability to sporulate inside host cells. When sporulation occurs during plant infection, for example in the case of pathogenic fungi, spores are only produced on the surface of infected or necrotic tissues (40) and never inside living plant cells. Spores are dormant cells generally described as an optional adaptive strategy permitting spatial and temporal escape from local conditions that are unfavorable to growth (7, 25). In a symbiotic context, the ecological advantage of *in-planta* sporulation may be linked to the fate of numerous spores produced within Sp+ nodules once released into the soil. After nodule decay, spores provide abundant infective propagules, thereby increasing Sp+ strain infectivity and competitiveness in the soil environment (32). A limited number of studies, using host plant inoculations, have analyzed the behaviors of Sp+ and Sp– strains in the rhizosphere or during root infection, and suggested the higher infectivity of Sp+ (2, 13, 46). Sp+ *Frankia* strains may also differ in their host specificity (17, 23) and competitiveness for nodulation in co-inoculation assays (18).

However, these findings have been biased by the heterogeneity of the material used as inocula. Due to the non-cultivability of Sp+ strains, Sp– cultured cells have often been used as opposed to Sp+ crushed nodules in inoculation experiments, even though the phenolic compounds and tannins contained in nodule tissues are known to have an impact on symbiotic associations (20, 31). Furthermore, most of these studies were limited to Sp+ nodules from only one host origin (except in the large study by Markham *et al.* [23]) and, at that time, information was not available on the genetic diversity of Sp+ strains. A recent study conducted on *Alnus* field nodules from diverse geographical origins revealed at least two divergent lineages among Sp+ strains according to the host plant species: *A. incana* and *A. viridis* strains were grouped into clade 1 (1a and 1b, respectively), whereas *A. glutinosa* Sp+ strains were grouped into clade 5 (32). This genetic diversity suggests diversity in strain life history traits and, thus, is considered to have an impact on the ecological behavior of Sp+ strains. In addition, in the absence of molecular tools available to discriminate between Sp+ and Sp–, strain identification was based on microscopic observations of spores from hand-cut nodule sections. However, it was not

* Corresponding author. E-mail: aude.herrera-belaroussi@univ-lyon1.fr; Tel: +33–472–448–200; Fax: +33–426–234–468.

possible to rule out false Sp– identification due to delays in the expression of the Sp+ phenotype, and the co-occurrence of both types of strains in the same nodule may have been missed in co-inoculation experiments (3).

Therefore, the aim of the present study was to re-examine the role of *Frankia in-planta* sporulation in (i) the infectivity and host range of *Frankia* strains and (ii) their competitiveness for root infection. Fifteen nodule sources of Sp+ and Sp– *Frankia* strains from three different *Alnus* species (*A. glutinosa*, *A. incana*, and *A. viridis*) were used, including representative strains from the different Sp+ phylogenetic lineages recently described (32). Sp+ and Sp– inocula were tested on *A. glutinosa* and *A. incana* host seedlings, and the resulting nodules were characterized at the molecular level using Sp+ and Sp– strain-specific oligonucleotide primers.

Materials and Methods

Plant culture

A. glutinosa and *A. incana* seeds from Lyon (Rhône, France) and Fond de France (Isère, France), respectively, were surface-sterilized by agitation for 30 min in absolute alcohol followed by 30 min in $Ca(ClO)_2$ 3% (w/v) with 50 µL L^{-1} of Tween 20, and then rinsed three times in sterile water. Seeds were then incubated at room temperature on Fåhraeus medium (8) agar (10 g L^{-1}) for germination. After 15 d, seedlings were transplanted into hydroponic pouches (8) containing 30 mL of Fåhraeus medium with 5 mM NH_4Cl and incubated in a growth chamber (16-h d with 22°C day/18°C night temperatures).

Selection of Sp+ and Sp– Frankia *strains from field nodules*

Since no pure-cultured Sp+ *Frankia* have been obtained to date, all *Frankia* strains were obtained from field nodules, including Sp– nodules, in order to ensure similar inoculation conditions for both types of strains. Nodules containing either Sp+ or Sp– *Frankia* were collected between September and October 2012 from different sites (previously described by Pozzi *et al.* [32]) and 3 different *Alnus* species: *A. glutinosa* (L.) Gaertn, *A. incana* (L.) Moench, and *A. alnobetula* (Ehrh.) K. Koch, hereafter referred to as *A. viridis* (Chaix) DC (Ag, Ai, and Av, respectively) (Table 1).

The nodule sporulation phenotype was determined (from at least one lobe) by microscopic observations of nodule hand sections stained with Lactophenol Blue (Réactifs RAL, Martillac, France), as previously described (32). Nodules were considered to have the Sp+ phenotype when more than one sporangium was observed in more than 50 infected plant cells. Otherwise, nodules were considered to have the Sp– phenotype. After surface sterilization of the nodules in calcium hypochlorite 3% (w/v) and peeling, nodular DNA was extracted and endophytic *Frankia* were genetically characterized by *pgk* and *dnaA* gene partial amplifications with specific primers (Table 2). Each PCR reaction contained in a final volume of 50 µL: 2 µL of DNA (0.1 µg mL^{-1}), 1× PCR buffer, 0.2 mM of each dNTP, 2 mM $MgCl_2$, 0.5 mM of each primer, 10% DMSO v/v, 16 µg of bovine serum albumin, and 2U Taq DNA polymerase (Invitrogen, Oxon, United Kingdom). The amplification conditions used were: initial denaturation at 94°C for 5 min, and 30 cycles including denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 62°C for 1 min, and elongation at 72°C for 1 min. A final 10-min extension step was performed at 72°C. PCR products were purified using a MiniElute PCR purification Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) before sequencing (Biofidal, Villeurbanne, France) with an ABI 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). The resulting sequence alignments and pairwise-distance matrix calculations were performed using BioEdit software (version 7.2.2.). At least 5 lobes were genetically characterized for each nodule. Nodules for which all tested lobes resulted in *pgk* and *dnaA* sequences with more than 99.9% similarity were considered to contain a single *Frankia* strain. All nodules used as inocula in subsequent experiments met this criterion (data not shown). Seven Sp+ strains and 8 Sp– strains were used. Among the Sp+ strains, the two clades previously described (32) were represented with 2 Ag strains belonging to clade 5, and 2 Ai and 3 Av strains belonging to clade 1 (Table 1).

Plant inoculation and growth assessments

Two distinct experiments were carried out in order to compare Sp+ and Sp– strain infectivity (experiment A) and competitiveness (experiment B).

Experiment A (Sp+/Sp– infectivity):

Two-month-old seedlings were transferred to nitrogen-free medium 24 h before inoculation. Each Sp+ and Sp– *Frankia* strain was inoculated on 17–42 seedlings per condition (Table 1) (total of 760 Ag and Ai seedlings), using a suspension of crushed nodules freshly collected in the field and stored at 4°C for a few days. The inocula density was used as described by Périnet *et al.* (29), with 2 g of nodules per one thousand seedlings. This relatively low density was selected in order to avoid the saturation of root infection sites, thereby allowing different nodulation rates to be highlighted. In each strain, field nodules were washed in 3% $Ca(ClO)_2$ (w/v) with Tween

Table 1. Sp+ and Sp– field nodules used as inocula

Nodule phenotype[1]	*Alnus* species	Site designation[2]	Nodule acronym	No. of inoculated seedlings[3]	
				A. glutinosa	*A. incana*
Sp+	*A. glutinosa*	Thury	AgTyI.5	40	25
		Le Tremblay, Le-Bourget-du-Lac	AgTrS1	40	25
	A. incana	Ornon	AiOR8	40	24
		Allemont	AiAll	42	27
	A. viridis	La Bérarde	AvBI.5	40	25
		Col de la Croix de Fer	AvCf11.1	23	27
		La Toussuire	AvTol.2	40	27
Sp–	*A. glutinosa*	Arandon	AgARaG1	25	25
		Le Blanchet, Bourget-en-Huile	AgLB4.3	26	25
		Le Grand-Lemps	AgGL1	22	NT
	A. incana	Fond-de-France	AiFF2.1	25	24
		Le Blanchet, Bourget-en-Huile	AiGBh	17	NT
	A. viridis	Col de la Croix de Fer	AvCf3	22	NT
		Col de la Croix de Fer	AvCf13.1	26	24
		Fond-de-France	AvFF1.1	28	26

[1] Sp+ and Sp– = *in-planta* sporulating and non-sporulating phenotypes, respectively.
[2] All sites from Pozzi *et al.* (32).
[3] NT = non-tested conditions.

20 (50 µL mL^{-1}), rinsed in sterile water, and then crushed with 3% (w/v) polyvinylpyrrolidone (PVP). Nodule suspensions were filtered through a 100-µm mesh filter (17). Plant roots were inoculated with 3 mL of crushed nodule suspensions directly in the hydroponic pouches and the seedlings were then incubated in a plant growth chamber for 5 months. Fåhraeus medium (8) was added weekly. In each plant, the total number of nodules was monitored every 2 weeks, and plant growth was followed by measuring the longest root and stem height.

Experiment B (Sp+/Sp– competitiveness):

Competitiveness experiments focused on Ag infective strains. The two Ag Sp+ strains, AgTrS1 and AgTyI.5, obtained from field nodules (Table 1) were confronted with two *in-vitro* cultured Sp– strains, ACN14a (28) and Mg60Ag2 (9). These two Sp– strains were selected because of (i) their genetic divergence with Ag Sp+ strains, allowing the design of specific oligonucleotides, and (ii) their different infectivities, with ACN14a being less infective than Mg60Ag2 on Ag. In order to standardize inocula for the competitiveness experiments (same age and plant origin of the crushed nodules), each of the four strains was inoculated on Ag seedlings grown in pouches. After approximately 4 months, the nodules produced were harvested and used to prepare crushed nodule suspensions. Four distinct Sp+/Sp– mixtures (AgTrS1/ACN14a, AgTrS1/Mg60Ag2, AgTyI.5/ACN14a, and AgTyI.5/Mg60Ag2) with 3 different ratios (v/v) were prepared: 15/85, 50/50, and 85/15 (percentage of Sp+/Sp– inocula in the final volume), leading to 12 distinct conditions. A total of 15–16 plants per condition were inoculated using the previously described protocol. Four additional conditions based on single strain inoculations were included as controls. After 5 months in a growth chamber (the same conditions as those described for Experiment A), nodules were recorded and plant growth assessed as described above.

Genotypic identification of Frankia *strains present in nodules of inoculated plants*

Experiment A (Sp+/Sp– infectivity):

Five months after inoculation, at least 2 nodules per plant were phenotyped and genotyped using *pgk* and *dnaA* gene sequencing, as previously described, in order to ensure that the *Frankia* strains in the inocula were the same as those found in nodules.

Experiment B (Sp+/Sp– competitiveness):

Under each condition, at least 30 nodules randomly sampled from all plants were surface-sterilized and their DNA extracted as previously described (32). The following Sp+ and Sp– primers specific for *dnaA* were used: *F3 Sp+* and *R2 Sp+* primers for Sp+ strains, *F3 Sp–* and *R2 Sp–* primers for the ACN14a strain, and F2 and R2 primers for the Mg60Ag2 strain (Table 2). Nodular DNA was PCR amplified with Sp+ and Sp—specific primers as described above. Amplicons were characterized by 2% w/v agarose gel electrophoresis.

Statistical analyses

Statistical analyses were carried out using R software v. 3.0.1 (41).

Experiment A (Sp+/Sp– infectivity):

Chi-squared statistics with one degree of freedom were used to compare nodulated plant proportions, in order to test the effects of the strain-sporulating phenotype and host plant origin on the ability to infect Ag and Ai seedlings. The effects of possible interactions between these factors (in addition to the factor "species of inoculated seedlings") on strain infectivity were tested with a Generalized Linear Model (GLM) on nodulated plant proportion data.

An ANOVA (Analysis Of Variance) followed by post hoc analyses (Tukey's Honestly Significant Difference-HSD-tests) were used to test the effects of the strain phenotype and host plant origin on strain nodulation rates by comparing the log nodule number data (for normalized distribution) of infected plants.

Root length and stem height data were summed to calculate the "growth index" (cm) of nodulated plants. Since "growth index" data were not normally distributed, the effects of the strain-sporulating phenotype on plant development (growth index) was tested using Wilcoxon rank sum statistical tests.

Experiment B (Sp+/Sp– competitiveness):

Plant nodule numbers and growth indices were compared between the different conditions of co-inoculations and Sp+ controls (single Sp+ strain inoculations) in order to test the effects of the mixed strain co-inoculation on nodulation rate and plant development. An ANOVA followed by post hoc analyses (Tukey's Honestly Significant Difference-HSD-tests) were used to compare the log nodule number data (for normalized distribution) of infected plants. Since growth index data were not normally distributed, Wilcoxon rank sum statistical tests were used.

Results

Infectivity of Sp+ and Sp– Frankia *strains and plant growth*

Seven Sp+ strains and 8 Sp– strains were inoculated on 456 Ag and 304 Ai seedlings. Three inocula never nodulated under the tested conditions (AvTol.2, AiGBh, and AvFF1.1). In all infective inocula, the first nodules appeared 2 weeks after inoculation and presented at least 3 lobes 60 days after inoculation. Phenotypic and genotypic characterizations always confirmed the presence of the *Frankia* strain used as the initial inoculum.

The percentage of nodulated seedlings was significantly higher for Sp+ strains than for Sp– strains, on both Ag and Ai inoculated hosts (Fig. 1A). In total, 46.8% and 13.6% of Ag (Chi^2 test, p-value=$3.170e^{-7}$) and 60.6% and 10.5% of Ai (Chi^2 test, p-value=$1.350e^{-13}$) were infected by Sp+ and Sp–

Table 2. List of PCR primers used for *Frankia* strain genotyping

Gene	Primer name[1]	Sequence (5'→3')	Tm (°C)
Field nodule identification (infectivity experiments)			
dnaA	dnAfdT7F	TAATACGACTCACTATAGGGGAGGARTTCACCAACGACTTCAT	62
	dnArvT3R	ATTAACCCTCACTAAAGGGACRGAAGTGCTGGCCGATCTT	
pgk	pgkFwdT3	ATTAACCCTCACTAAAGGGATGAGGACGATCGACGACCTGC	62
	pgkRevT7	TAATACGACTCACTATAGGGCGCSAGGAAGGTGAAGCACAT	
Sp+/Sp– discrimination in nodules (co-inoculation experiments)			
dnaA	F2 Sp–	CCATGGAGACGCCGAAGTAC (*1341*)[2]	65
	F3 Sp–	CGTCCGGGATCAGGTCG (*1275*)	64–65
	R2 Sp–	CATCGCGATCCTGTCGAAGAAG (*1059*)	65
	F3 Sp+	GCGTCAGGGATCAGGTCA (*1275*)	64
	R2 Sp+	CATCGCGATCCTGTCGAAAAAA (*1059*)	64

[1] "fd", "Fwd", or "F" in the name indicate forward primers and "rv", "Rev", or "R" indicate reverse primers.
[2] Position on the *dnaA* sequence of the ACN14a strain (GenBank accession NC_008278).

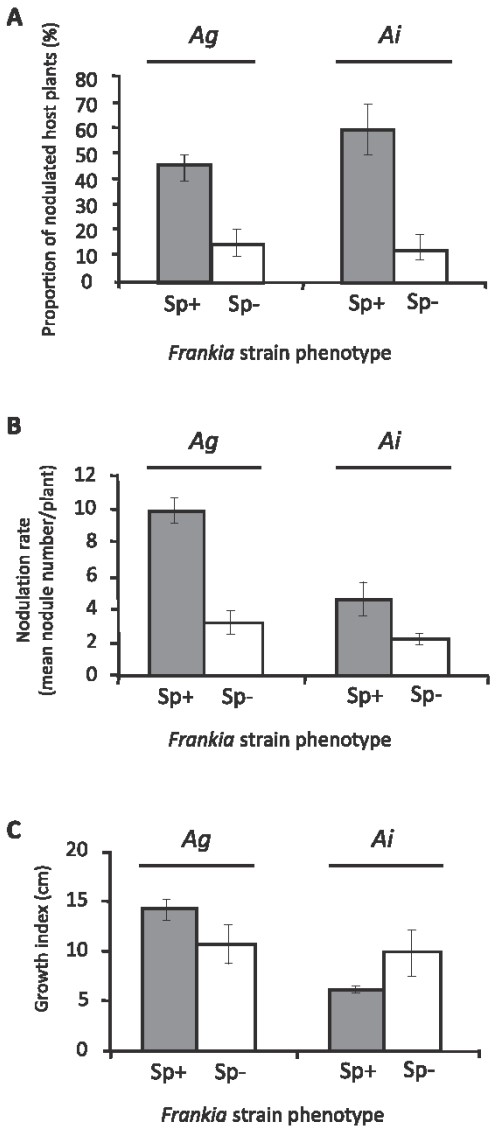


Fig. 1. Effects of the *Frankia* strain-sporulating phenotype (Sp+ or Sp–) on the ability to infect *A. glutinosa* (Ag) and *A. incana* (Ai) seedlings (A), their nodulation rate (B), and plant growth (C) with "Growth index" (cm) corresponding to the sum between the root length and stem height data. Fig. B and C only include nodulated plants.
Error bars indicate 95% confidence intervals (CI) computed with the modified Wald method (1) (A) or standard deviations (B and C).

strains, respectively. The nodulation rate (mean nodule number per plant) similarly varied between Sp+ and Sp– strains (Fig. 1B). Sp+ strains produced significantly more nodules than Sp– strains on Ag seedlings (9.9±0.8 vs 3.2±0.9 nodules per plant, respectively, ANOVA, p-value=1.450e^{-6}) and Ai seedlings (4.6±0.8 vs 2.2±0.3 nodules per plant, respectively, ANOVA, p-value=3.360e^{-3}). Av strains presented different behaviors according to the inoculated host plant species (Table 3). While Av strains followed the general scheme on Ai (higher proportion of nodulated seedlings for Sp+ than for Sp– strains), they were weakly infective on Ag, irrespective of their phenotype (less than 6% of nodulated plants).

Multifactorial statistical analyses showed the significant effects of the interactions between strain phenotype, strain origin, and inoculated host species on strain infectivity expressed as the number of nodulated seedlings (GLM, p-value=0.007) and nodule number per plant (ANOVA, p-value=0.007).

The Sp+ strains chosen belonged to two divergent phylogenetic clades correlated to the host plant species: clade 1 (Ai and Av strains) and clade 5 (Ag strains) (Table 1) (32). The infectivity of clade 5 strains was significantly greater than that of clade 1 strains with a higher proportion of nodulated seedlings (91.5% vs 36.2% respectively, Chi^2 test, p-value= 2.200e^{-16}) and higher nodulation rate (10.7±0.8 vs 4.1±0.3 nodules per plant, respectively, ANOVA, p-value =1.060e^{-13}).

As expected, Sp+ strains induced a lower plant index on Ai seedlings than Sp– strains (6.1 cm±0.3 and 9.9 cm±2.2, respectively—Wilcoxon rank sum tests, W=981, p-value= 0.024) (Fig. 1C). Conversely, no significant difference was observed on Ag seedlings (14.2 cm±0.9 and 10.7 cm±1.7, respectively—Wilcoxon rank sum tests, W=1309.5, p-value= 0.134). Depending on the strain origin (Ag, Ai, or Av nodules), Sp+ and Sp– inocula had different impacts on plant growth (Table 3): Ag Sp+ strains induced significantly more growth on Ag seedlings (Pairwise Wilcoxon rank sum test, p-value=6.800e^{-4}) than on Ai seedlings (Pairwise Wilcoxon rank sum test, p-value>0.05). Ai Sp+ strains induced significantly less growth on Ai seedlings than Ai Sp– strains (Pairwise Wilcoxon rank sum test, p-value=1.910e^{-2}), and similar results were observed on Ag seedlings (Pairwise Wilcoxon rank sum test, p-value>0.05).

Host compatibility of Sp+ and Sp– Frankia *strains*

Identical host compatibility was observed for Sp+ and Sp– strains, with both being able to infect Ag and Ai seedlings (Table 3). Among the Sp+ strains tested, host preferences were observed according to their genotype. Clade 5 Sp+ strains infected significantly more Ag than Ai seedlings (96.3% vs

Table 3. Sp+ and Sp– strain infectivities on *Alnus glutinosa* and *A. incana* seedlings.

Inoculated strains		% of nodulated plants[1]		Nodule mean number per plant[2]		Plant growth index (cm)[2]	
Phenotype	Original *Alnus* species	*A. glutinosa*	*A. incana*	*A. glutinosa*	*A. incana*	*A. glutinosa*	*A. incana*
Sp+	*A. glutinosa*	96.3 (80)	84.0 (50)	13.7±0.8	5.2±0.5	18.7±1.1	6.3±0.6
	A. incana	52.4 (82)	82.4 (51)	7.0±0.0	4.9±0.4	6.6±0.4	4.5±0.3
	A. viridis	3.9 (103)	31.6 (79)	2.3±0.6	3.3±0.7	10.8±3.3	8.4±0.5
Sp–	*A. glutinosa*	27.4 (73)	16.0 (50)	3.0±0.9	1.9±0.4	8.1±1.2	6.8±1.2
	A. incana	4.8 (42)	16.7 (24)	4.1±0.5	3.0±1.2	30.7±1.7	17.5±5.2
	A. viridis	5.3 (76)	2.0 (50)	1.5±0.5	1.0 (1 plant)	13.7±4.9	5.0 (1 plant)

[1] (n) number of inoculated seedlings.
[2] only nodulated plants are included.

84.0%, respectively—Chi² test, *p*-value=0.034), whereas clade 1 Sp+ strains infected significantly more Ai than Ag seedlings (51.5% vs 25.4%, respectively—Chi² test, *p*-value=3.61e^{-6}). In contrast, none of the Sp– strains showed significant differences in infected plant proportions between Ag and Ai seedlings (Chi² test, *p*-value>0.05), although the same results were observed (different host preferences of Ag, Ai, and Av Sp– strains).

Competitiveness of Sp+ and Sp– co-inoculated Frankia *strains*

Two Sp+ strains (AgTyI.5 and AgTrS1) and two Sp– strains (ACN14a and Mg60Ag2) were used to assess their competitiveness for Ag infection under co-inoculation conditions. Under single inoculation conditions (control plants), the Sp– strain Mg60Ag2 (9.8±1.4 nodules per plant) and the two Sp+ strains had similar nodulation rates (Tukey's HSD tests, *p*-value>0.05). As expected, the ACN14a strain induced significantly fewer nodules than the 3 other strains (3.5±0.9 versus 10.7±0.9 nodules per plant, Tukey's HSD tests, *p*-value<0.05).

The *Frankia* strain(s) present in nodules were identified using *dnaA* sequences. Irrespective of the strain used and the Sp+/Sp– ratio in the inocula, Sp+ strains were present in 98.3 to 100% of the nodules (Table 4). Under 5 of the tested conditions, Sp+ strains were found to co-exist with the Sp– strain in the same nodule (3.3 to 15.8% of the nodules). Sp– strains never recovered alone, with the exception of the 15/85 AgTyI.5/Mg60Ag2 inoculum, in which 1.7% of the nodules were Sp–. ACN14a, the low infective Sp– strain, was totally absent (100% of Sp+ nodules) in 5 out of the 6 co-inoculation tested conditions.

In both Sp+ strains tested, the number of nodules per plant slightly decreased with lower proportions in the inocula (Table 4). However, only the AgTyI.5/ACN14a co-inoculation with the ratio 15/85 was significantly different from the control (the AgTyI.5 single inoculation) (Tukey's HSD test, *p*-value=4.464e^{-3}).

No significant effect of the Sp+/Sp– co-inoculation was noted on plant growth, except for the 15/85 AgTyI.5/ACN14a and 100% ACN14a inocula (Sp– control plants), in which growth was significantly less than that in Sp+ control plants (Wilcoxon rank sum tests, *p*-value<0.05) (Fig. 2).

Table 4. Competitiveness of co-inoculated Sp+ and Sp– strains on *Alnus glutinosa* host plants.

Inoculated strains		Sp+ / Sp– ratio	Nb nodule per plant	Nodule proportions (%)[1]		
Sp+	Sp–			Sp+	Sp–	Sp+/Sp–
AgTyI.5	None (Sp+ control)	100/0	10.0±1.3	100.0	0.0	0.0
	Mg60Ag2	85/15	8.2±1.0	96.7	0.0	3.3
		50/50	6.9±1.0	84.2	0.0	15.8
		15/85	5.9±0.6	98.3	1.7	0.0
	ACN14a	85/15	7.5±1.9	100.0	0.0	0.0
		50/50	7.4±2.2	96.6	0.0	3.4
		15/85	4.3*±0.8	100.0	0.0	0.0
AgTrS1	None (Sp+ control)	100/0	12.3±2.1	100.0	0.0	0.0
	Mg60Ag2	85/15	10.2±1.3	96.7	0.0	3.3
		50/50	8.9±1.9	100.0	0.0	0.0
		15/85	6.7±1.1	96.7	0.0	3.3
	ACN14a	85/15	12.5±1.9	100.0	0.0	0.0
		50/50	9.0±1.8	100.0	0.0	0.0
		15/85	6.2±1.2	100.0	0.0	0.0

[1] Sp+: % of nodules with strain AgTyI.5 or AgTrS1; Sp–: % of nodules with strain Mg60Ag2 or ACN14a; Sp+/Sp–: both Sp+ and Sp– co-existing strains.
* Significantly different from the corresponding Sp+ control plants (without Sp– co-inoculation, grey lines), using Tukey's HSD tests (*p-value*<0.05).

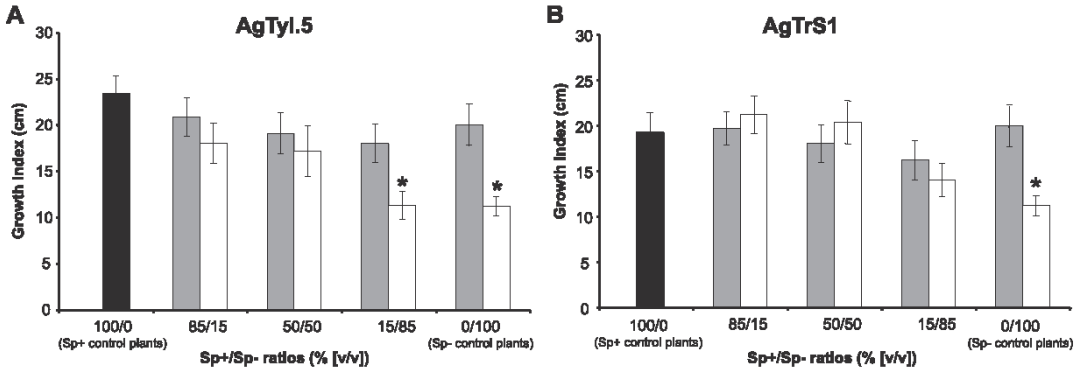


Fig. 2. Effects of Sp+/Sp– *Frankia* strain co-inoculation on plant development. Two Sp+ strains were tested: AgTyI.5 (A) and AgTrS1 (B), in co-inoculations with two Sp– strains (Mg60Ag2 = grey bars and ACN14a = white bars). "Growth index" (cm) was the sum between the root length and stem height data. Error bars indicate 95% confidence intervals (CI). Stars indicate significant differences from the Sp+ control plants tested with Wilcoxon rank sum statistical tests (*p*-value<0.05).

Discussion

Sp+ *Frankia* strains represent a unique model of *in-planta* sporulation. Since bacterial sporulation commonly occurs in order to ensure survival under unfavorable growth conditions, its expression is paradoxical in a symbiotic context in which the nodule supplies a highly favorable ecological niche to the bacteria. Therefore, the role of the numerous spores produced in plant tissues is questionable. They may have an important ecological function in nodule decay, allowing new root infections once released into the rhizosphere. Decaying nodules may provide a source of infective particles depending on the survival and dispersal abilities of the bacteria released in the soil, as well as their competitiveness with other symbiotic strains. We herein attempted to examine Sp+ and Sp– strain behaviors in the rhizosphere by comparing their infectivity and competitiveness under co-inoculation conditions. In order to reflect the fate of decayed nodules in soil, exclusively crushed nodules were used as inocula. Since a large part of the released particles may be carried deep into the soil, with only small amounts reaching the roots, low density inocula were used.

Our results showed that Sp+ strains had (i) greater infectivity on Ag and Ai species (larger proportion of nodulated seedlings and higher nodulation rate—Fig. 1A and B) and (ii) better competitiveness than Sp– strains (Table 4). These two ecological traits are linked because the specific infectivities of two different strains are expected to condition the relative number of nodules they produce when simultaneously inoculated (26). The difference in infectivity and competitiveness between Sp+ and Sp– nodules may have been due to the higher number of infective particles released by Sp+ nodules. While one Sp– nodule releases only hyphae and vesicles in soils, one Sp+ nodule has the ability to also release a large number of spores. Based on microscopic observations of one thousand Sp+ nodule sections, we estimated that between 10^7 and 10^8 spores were released from 1 g of nodules (data not shown). The capacity of these spores to become infective propagules is supported by (i) their ability to germinate and form hyphae when transferred to fresh growth medium (16, 42), and (ii) the durability of nodulation capacity of old inocula (likely due to spore survival during culture senescence) (19). Moreover, isolated spores from cultured *Frankia* were shown to develop higher infectivity than hyphae (5). Spores released by Sp+ nodule tissues may completely invade the vicinity of the roots. Germination may occur in the soil in response to root secondary compounds, producing infective hyphae that may, in turn, induce new infections (16, 22, 42, 49). Alternatively, spores may also directly attach to the roots, as described for many species of sporulating biotrophic fungal pathogens (21, 48). The capacity of spores to rapidly saturate the root system, a limited resource, and, thus, deprive the Sp– strain of available infection sites, may result in competitive exclusion (10, 34) and the elimination of Sp– strains. Our results suggest that this occurs for low infectivity Sp– strains (*e.g.* ACN14a) (Table 4). Furthermore, the exclusion of Sp– strains by Sp+ strains may be the result of antagonistic interactions between both types of strains. *Actinobacteria* are known for their capacity to synthesize antibiotics and diverse secondary metabolites involved in antagonistic interactions with other microorganisms. Both competition types (competition for host infection sites or direct antagonism) have previously been described within symbiotic microbial populations (6, 14, 15, 26), and the combination of both cannot be excluded between Sp+ and Sp– strains. However, the non-cultivability of Sp+ strains renders these competition hypotheses hard to test in the case of actinorhizal symbioses.

The infectivity and competitiveness of rhizospheric bacteria may be modulated by the host plant. In the present study, no significant differences were observed in host compatibility between Sp+ and Sp– strains. Despite important variations in strain infectivity according to the inoculated plant species, both types of strains had the ability to infect Ag and Ai species. However, unlike Sp– strains, Sp+ *Frankia* strains showed differences in their ability to infect both host species. The infectivity of clade 5 (Ag) strains on Ag seedlings was significantly greater than that of clade 1 (Ai and Av) strains, whereas the infectivity of clade 1 strains was significantly greater on Ai seedlings than on Ag seedlings, confirming preliminary results (47) (Table 3). Therefore, Sp+ strains had better compatibility than Sp– strains when inoculated on their original host species, suggesting closer symbiotic relationships. Based on this hypothesis, some *Alnus* species may preferentially select Sp+ genotypes, as suggested by the higher occurrence of Sp+ strains in Av and Ai alder stands than in Ag alder stands (32). Symbiotic host plants are able to select their microbial partner; defense mechanisms are used during infection to regulate the root infection rate by a given strain (24, 27, 33). In the case of actinorhizal plants, the differential expression of such mechanisms has been reported based on metabolomic or transcriptomic approaches during the early infection steps, depending on the compatibility of the strains (11, 30, 31). Therefore, strain infectivity and competitiveness depend not only on the strain phenotype, but also additional factors, such as host-symbiont specificity, which strongly influence the success of infection.

The significant differences observed in infectivity and competitiveness between Sp+ and Sp– strains may have an impact on plant growth. Previous studies reported that Sp+ strains were less effective (plant dry matter, total N, and/or N-fixed) than Sp– strains (17, 38). By coincidence, both studies mainly based their conclusions on Ai Sp+ nodules and Sp– isolates from various hosts as inocula, tested on Ai host plants. Our results with Ai strains confirmed this conclusion (Fig. 1C). However, by testing different Sp+ and Sp– nodule origins from 3 different *Alnus* species, we unexpectedly found that Sp+ strains showed higher effectivity than Sp– (*e.g.* Ag strains on Ag seedlings). Thus, Sp+ and Sp– strains display different host specificities, which impacts not only on their infectivity and competitiveness for root infection, but also their effectivity. Moreover, by including nodules from several geographical origins, we noted a potential site effect on strain behavior (data not shown). Therefore, the hypothesis of Sp+ strains having lower efficiency cannot be fully verified unless numerous host and geographical origins are tested.

Our co-inoculation experiments demonstrated for the first time, using DNA-based genotype characterization, that two distinct *Frankia* strains inhabit the same nodular lobe (up to 15% of Sp+/Sp– co-inoculations—Table 4). Previous studies

reported the presence of different *Frankia* strains in a single *Alnus* nodule (3, 39). The co-existence of both Sp+ and Sp– strains within a unique lobe may explain Sp– strain isolation from Sp+ typed nodules. Repeated culturing attempts from Sp+ nodules mostly failed, but led, in rare cases, to the isolation of *Frankia* strains. However, these cultures never differentiated *in-planta* sporangia when inoculated on different host species, and were, thus, considered to be Sp– strains (4, 35, 36). Although our protocol aimed at eliminating nodule surface contaminations, we cannot exclude the possibility that some external *Frankia* cells or their DNA remained and were amplified. Sp+ and Sp– strain localization and their relative proportions inside the nodule warrant further investigations. Additional molecular experiments based on *in-situ* hybridization from nodule sections and quantitative-PCR will shed light on those recurrent questions.

In conclusion, we herein confirmed the higher infectivity and competitiveness of Sp+ strains than Sp– strains as well as their higher host specificity. Moreover, these traits were differentially expressed depending on the phylogenetic clades that the Sp+ strains belong to. These results, associated with the non-cultivability of Sp+ strains, suggest they are dependent on the host plant for a large part of their life cycle and support the obligate symbiont scenario previously discussed (32, 37). Their higher infectivity and competitiveness may explain why they have been found to be highly invasive in the field (5, 32, 37, 45). The frequency at which Sp+ strains is detected is higher in old alder stands (12, 46), suggesting they may represent the final stage in the succession of *Frankia* populations (32). To date, *Frankia* spore persistence in the soil still remains uncharacterized, and further investigations on Sp+ strain detection directly from soil samples are needed in order to shed light on fundamental issues regarding their fitness during their saprophytic life or their fate in soils devoid of host plants.

Acknowledgements

The authors are grateful to the greenhouse platform (Lyon University). We thank the IBIO platform (UMR-CNRS 5557) and Sébastien Devillard for advice on statistical analyses. The authors also thank Elise Simonazzi and Nelly Queruel for their help with experimental assays. Laetitia Cotin-Galvan and Adrien Pozzi were granted a doctoral fellowship by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR; France) through the doctoral school Évolution, Écosystèmes, Microbiologie, Modélisation (ED341 E2M2; Lyon, France).

References

1. Agresti, A., and B.A. Coull. 1998. Approximate is better than exact for interval estimation of binomial proportions. Am. J. Stat. 52:119–126.
2. Akkermans, A., and C. van Dijk. 1976. The Formation and Nitrogen-fixing Activity of the Root Nodules of *Alnus glutinosa* Under Field Conditions, p. 511–520. *In* E.b.P. Nutman (ed.), Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants. Cambridge University Press, London.
3. Benson, D., and D. Hanna. 1983. *Frankia* diversity in an alder stand as estimated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of whole-cell proteins. Can. J. Bot. 61:2919–2923.
4. Burgraaf, A.J.P., A. Quispel, T. Tak, and J. Valstar. 1981. Methods of isolation and cultivation of *Frankia* species from actinorhizas. Plant Soil 61:157–168.
5. Burleigh, S., and J. Torrey. 1990. Effectiveness of different *Frankia* cell types as inocula for the actinorhizal plant *Casuarina*. Appl. Environ. Microbiol. 56:2565–2567.
6. Dowling, D.N., and W.J. Broughton. 1986. Competition for nodulation of legumes. An. Rev. Microbiol. 40:131–157.
7. Dworkin, J., and I. Shah. 2010. Exit from dormancy in microbial organisms. Nat. Rev. Microbiol. 8:890–896.
8. Fåhraeus, G. 1957. The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. J. Gen. Microbiol. 16:374–381.
9. Fernandez, M., H. Meugnier, P. Grimont, and R. Bardin. 1989. Deoxyribonucleic acid relatedness among members of the genus *Frankia*. Int. J. Syst. Bacteriol. 39:424–429.
10. Hibbing, M., C. Fuqua, M. Parsek, and S. Peterson. 2010. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. Rev. Microbiol. 8:15–25.
11. Hocher, V., N. Alloisio, F. Auguy, *et al.* 2011. Transcriptomics of actinorhizal symbioses reveals homologs of the whole common symbiotic signaling cascade. Plant Physiol. 156:700–711.
12. Holman, R., and C. Schwintzer. 1987. Distribution of spore-positive and spore-negative nodules of *Alnus incana* ssp. *rugosa* in Maine, USA. Plant Soil 104:103–111.
13. Houwers, A., and A. Akkermans. 1981. Influence of inoculation on yield of *Alnus glutinosa* in the Netherlands. Plant Soil 61:189–202.
14. Josephson, K., and I. Pepper. 1984. Competitiveness and effectiveness of strains of *Rhizobium phaseoli* isolated from the Sonoran desert. Soil Biol. Biochem. 16:651–655.
15. Koppenhöfer, A., H. Kaya, S. Shanmugam, and G. Wood. 1995. Interspecific Competition between Steinernematid Nematodes within an Insect Host. J. Invertebr. Pathol. 66:99–103.
16. Krumholz, G.D., M.S. Chval, M.J. McBride, and L.S. Tisa. 2003. Germination and physiological properties of *Frankia* spores. Plant Soil 254:57–67.
17. Kurdali, F., A. Domenach, M. Fernandez, A. Capellano, and A. Moiroud. 1988. Compatibility of *Frankia* spore positive and spore negative inocula with *Alnus glutinosa* and *Alnus incana*. Soil Sci. Plant Nutr. 34:451–459.
18. Kurdali, F., G. Rinaudo, A. Moiroud, and A. Domenach. 1990. Competition for nodulation and $^{15}N_2$-fixation between a Sp^+ and a Sp^- *Frankia* strain from *Alnus incana*. Soil Biol. Biochem. 22:57–64.
19. Lalonde, M., and H. Calvert. 1979. Production of *Frankia* hyphae and spores as an infective inoculant for *Alnus* species, p. 95–110. *In* J.C. Gordon, C.T. Wheeler and D.A. Perry (ed.), Symbiotic Nitrogen Fixation in the Management of Temperate Forests. Oregon State University, Forest Research Laboratory, Corvallis, OR.
20. Laplaze, L., H. Gherbi, T. Frutz, K. Pawlowski, C. Franche, J.J. Macheix, F. Auguy, D. Bogusz, and E. Duhoux. 1999. Flavan-containing cells delimit *Frankia*-infected compartments in *Casuarina glauca* nodules. Plant Physiol. 121:113–122.
21. Lazniewska, J., V. Macioszek, and A. Kononowicz. 2012. Plant-fungus interface: The role of surface structures in plant resistance and susceptibility to pathogenic fungi. Physiol. Mol. Plant Pathol. 78:24e30.
22. Mansour, S., A. Dewedar, and J. Torrey. 1990. Isolation, culture, and behavior of *Frankia* strain HFPCgI4 from root nodules of *Casuarina glauca*. Bot. Gaz 151:490–496.
23. Markham, J.H. 2008. Variability of nitrogen-fixing *Frankia* on *Alnus* species. Botany 86:501–510.
24. Maunoury, N., M. Redondo-Nieto, M. Bourcy, *et al.* 2010. Differentiation of symbiotic cells and endosymbionts in *Medicago truncatula* nodulation are coupled to two transcriptome-switches. PLoS One 5:e9519.
25. Nicholson, W.L., N. Munakata, G. Horneck, H.J. Melosh, and P. Setlow. 2000. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64: 548–572.
26. Nicol, H., and H. Thornton. 1941. Competition between related strains of nodule bacteria and its influence on infection of the legume host. Proc. R. Soc. 130:32–59.
27. Niehaus, K., D. Kapp, and A. Puhler. 1993. Plant defence and delayed infection of alfalfa pseudonodules induced by an exopolysaccharide (EPS I)-deficient *Rhizobium meliloti* mutant? Planta 190:415–425.
28. Normand, P., and M. Lalonde. 1982. Evaluation of *Frankia* strains isolated from provenances of two *Alnus* species. Can. J. Microbiol. 28:1133–1142.

29. Périnet, P., J. Brouillette, J. Fortin, and M. Lalonde. 1985. Large scale inoculations of actinorhizal plants with *Frankia*. Plant Soil 87:175–183.
30. Popovici, J., G. Comte, E. Bagnarol, N. Alloisio, P. Fournier, F. Bellvert, C. Bertrand, and M.P. Fernandez. 2010. Differential effects of rare specific flavonoids on compatible and incompatible strains in the *Myrica gale-Frankia* actinorhizal symbiosis. Appl. Env. Microbiol. 76:2451–2460.
31. Popovici, J., V. Walker, C. Bertrand, F. Bellvert, M.P. Fernandez, and G. Comte. 2011. Strain specificity in the Myricaceae-*Frankia* symbiosis is correlated to plant root phenolics. Funct. Plant Biol. 38:682–689.
32. Pozzi, A.C., H. Bautista-Guerrero, I. Nouioui, L. Cotin-Galvan, R. Pépin, P. Fournier, F. Menu, M.P. Fernandez, and A. Herrera-Belaroussi. 2014. *In-planta* sporulation phenotype: a major life-history trait to understand the evolution of *Alnus*-infective *Frankia* strains. Env. Microbiol. doi: 10.1111/1462-2920.12644.
33. Pucciariello, C., G. Innocenti, W. Van de Velde, *et al.* 2009. (Homo) glutathione depletion modulates host gene expression during the symbiotic interaction between *Medicago truncatula* and *Sinorhizobium meliloti*. Plant Physiol. 151:1186–1196.
34. Pulliam, H. 2000. On the relationship between niche and distribution. Ecol. Lett. 3:349–361.
35. Quispel, A., and T. Tak. 1978. Studies on the growth of the endophyte of *Alnus glutinosa* (L.) Vill. in nutrient solutions. New Phytol. 81:587–600.
36. Racette, S., J.G. Torrey, and R.H. Berg. 1991. Sporulation in root nodules of actinorhizal plants inoculated with pure cultured strains of *Frankia*. Can. J. Bot. 69:1471–1476.
37. Schwintzer, C. 1990. Spore-positive and spore-negative nodules, p. 177–193. *In* J.T. CR Schwintzer (ed.), The Biology of *Frankia* and Actinorhizal Plants. Academic Press, New York.
38. Sellstedt, A., A. Ahlqvist, and K. Huss-Danell. 1986. Nitrogen fixation and biomass production in symbioses between *Alnus incana* and *Frankia* strains with different nitrogen metabolism. Physiol. Plant. 66:99–107.
39. Simonet, P., M. Bosco, C. Chapelon, A. Moiroud, and P. Normand. 1994. Molecular characterization of *Frankia* microsymbionts from spore-positive and spore-negative nodules in a natural alder stand. Appl. Environ. Microbiol. 60:1335–1341.
40. Solomon, P.S., K.-C. Tan, and R.P. Oliver. 2005. Mannitol 1-phosphate metabolism is required for sporulation *in-planta* of the wheat pathogen *Stagonospora nodorum*. MPMI 18:110–115.
41. Team, R.D.C. 2005. R: A language and environment for statistical computing. R foundation for Statistical Computing. R foundation for Statistical Computing.
42. Tzean, S., and J. Torrey. 1989. Spore germination and the life cycle of *Frankia in-vitro*. Can. J. Microbiol. 35:801–806.
43. van Dijk, C., and E. Merkus. 1976. A microscopical study of the development of a spore-like stage in the life cycle of the root nodule endophyte of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. New Phytol. 77:73–91.
44. van Dijk, C. 1978. Spore formation and endophyte diversity in root nodules of *Alnus glutinosa* (L.) Vill. New Phytol. 81:601–615.
45. van Dijk, C. 1979. Endophyte distribution in the soil, p. 84–94. *In* J.C. Gordon, C.T. Wheeler, D.A. Perry (ed.), Symbiotic nitrogen fixation in the management of temperate forests. Oregon State University, Forest Research Laboratory, Corvallis, OR.
46. van Dijk, C. 1984. Ecological aspects of spore formation in *Frankia-Alnus* symbiosis. *In* Ecological aspects of spore formation in *Frankia-Alnus* symbiosis (Thesis), University of Leiden, The Netherlands.
47. Weber, A., E.-L. Nurmiaho-Lassila, and V. Sundman. 1987. Features of the intrageneric *Alnus-Frankia* specificity. Physiol. Plant. 70:289–296.
48. Zelinger, E., C. Hawes, S. Gurr, and F. Dewey. 2006. Attachment and adhesion of conidia of *Stagonospora nodorum* to natural and artificial surfaces. Physiol. Mol. Plant Pathol. 68:209–215.
49. Zimpfer, J.F., B. McCarty, C.M. Kaelke, L. Mulongwe, J.M. Igual, C.A. Smyth, and J.O. Dawson. 2002. *Casuarina cunninghamiana* cladode extracts increase the *Frankia* infectious capacity of a tropical soil. Symbiosis 33:73–90.

Chapitre II B : Incidence of *Frankia in-planta* sporulation phenotype on alder-symbionts interactions

In-planta sporulation mediates host-partner interactions in the alder-*Frankia*-ectomycorrhizae tripartite symbiosis

Schwob G.[1]#, Roy M.[2], Pozzi C. A.[1,3], Herrera-Belaroussi A.[1] and Fernandez M.P.[1]

[1] Laboratoire d'Écologie Microbienne, UMR 5557, CNRS, INRA, VetAgro Sup, Université Lyon 1, Université de Lyon, F-69622, Villeurbanne cedex, France.

[2] Laboratoire Évolution et Diversité Biologique, UMR 5174, UPS, CNRS, ENFA, IRD, Université Paul Sabatier, 118 route de Narbonne, F-31062, Toulouse cedex, France.

[3] Biométrie et Biologie Evolutive, UMR 5558, CNRS, INRIA, VetAgro Sup, HCL, Université Lyon 1, Université de Lyon, F-69622, Villeurbanne cedex, France.

Running title: *In planta* sporulation and alder symbiotic interactions

#Corresponding author:

Schwob Guillaume

Ecologie Microbienne Lyon
UMR CNRS 5557 / UMR INRA 1418
Université Claude Bernard Lyon I
Bât. Mendel, 4ème étage
43, Boulevard du 11 Novembre 1918
69622 VILLEURBANNE CEDEX

E-mail: guillaume_schwob@hotmail.fr, Tel: (33) 472 448 506 ; Fax: (33) 426 234 468

Abstract

Frankia is involved in tripartite symbiosis, notably with the *Alnus* genus and ectomycorrhizal fungi. Two types of *Frankia* strains can be distinguished based on their ability to sporulate *in planta.* Spore-positive (Sp+) strains are predominant on *Alnus incana* (*Ai*) and *Alnus viridis* (*Av*) in highlands, while spore-negative (Sp-) strains are mainly associated with *Alnus glutinosa* (*Ag*) in lowlands. Here, we investigated whether the Sp+ predominance is due to host selection of certain *Frankia* genotypes from soil communities or the result of the ecological history of the alder stand soil, and the effect of the sporulation genotype on the ECM communities. Trapping experiments were conducted using *Ag*, *Ai* and *Av* plantlets on 6 soils, differing in the alder species and the proportion of Sp+ strains present in the field. We found that while the 3 Alnus species (Ag, Ai, Av) successfully formed nodules on Sp- soils, nodulation was mostly impeded on Sp+ soils when the trapping-species was different from the one present on the field. Ai and Av were able to associate equally with Sp+ and Sp- in the greenhouse provided these strains are present in the rhizosphere. Additionally, no host shift was observed for *Alnus*-specific ECM, and the sporulation genotype of *Frankia* defined the ECM communities on the host roots. The symbiotic association is likely determined by the host-range, the soil history and the type of *in planta Frankia* sporulation. These results provide an insight into the biogeographical drivers of alder symbionts in the Holarctic region.

Importance

Most *Frankia*-actinorhizal plant symbioses are capable of high rates of nitrogen fixation comparable to those found on legumes. Yet our understanding of the ecology and distribution of *Frankia* is still very limited. Several studies have focused on the distribution patterns of *Frankia*, demonstrating a combination of host and pedoclimatic parameters in their biogeography. However, very few have considered the *in planta* sporulation form of the strain, although it is a unique feature among all symbiotic plant-associated microbes. Compared with Sp- *Frankia* strains, Sp+ are likely obligate symbionts, highly dependent on the presence of a compatible host-species and with lower efficiency in nitrogen fixation.

Understanding the biogeographical drivers of Sp+ *Frankia* strains might help to elucidate the ecological role of *in planta* sporulation, and the extent to which this trait mediates host-partner interactions in the alder-*Frankia*-ECM fungi symbiosis.

Keywords

Frankia – Actinorhizal symbiosis – *In planta* sporulation – *Alnus* – Host specificity — Ectomycorrhizae

Introduction

Detection of microbial biogeographical patterns is limited by the amazingly high microbial diversity in most environments (particularly soils and sediment), the clonal reproduction and the long distance dispersal of many microorganisms. Although the existence of microbial biogeography has been widely debated (1, 2), it is now more fully documented (1, 3, 4) and the last decade has illustrated the effect of abiotic environmental factors, such as soil characteristics, climate and biotic interactions, on the worldwide distribution of microbes (5, 6). Theoretically, the biogeography of microbes depends not only on environmental factors (climate, soil chemistry and structure, biotic interactions) but also on individual microorganism features (life history traits), enabling or limiting their dispersal in time (survival) and in space (colonization). The role of the host species on the biogeography of symbiotic microorganisms has been intensively studied and has often confirmed co-dispersal patterns (7, 8), particularly for associations with a high level of specialization between the host and its symbionts. The impact of the symbiont's life history traits has been investigated far less, except for species of mycorrhizal fungi with different mechanisms of spore dispersion. While wind-dispersed fungi showed no differentiation between populations on a continental scale (9-11), hypogenous fungi, that are dispersed mostly by small mammals, showed strong differentiation on a regional scale (9). In comparison, communities of bacteria are determined more by abiotic parameters than by geographical distance itself (3), as the more abundant taxa are often widespread (12).

Alders (*Alnus* sp., Betulaceae family) are involved in tripartite symbioses with ectomycorrhizal (ECM) fungi and nitrogen-fixing actinobacteria belonging to the *Frankia* genus. Alders are associated with specific *Frankia* actinobacteria (13, 14) and a few specific ECM fungi (15, 16). For instance, the two subgenera of *Alnus* (subgenus *Alnus* and *Alnobetula*) share a few fungi and *Frankia*, and associate mostly with distinct symbionts (17, 18) that are not shared with non-alder host trees. This specificity has been confirmed on a worldwide scale, as the biogeography of ECM fungi and *Frankia* is mainly explained by their host biogeography and by abiotic factors, such as elevation or organic matter content (19-

21). The life history traits of *Frankia* strains could also explain their high specificity and biogeography. In a similar way to ECM fungi, spore dispersion probably differs among *Frankia* strains. On the one hand, some saprophytic strains only sporulate when cultured *in vitro* and probably in soils, but never in the nodules (Sp- strains). On the other hand, uncultured strains, supposedly obligate symbionts, sporulate profusely within the host root nodules (Sp+). These two sporulation phenotypes are, with few exceptions, genetically and phylogenetically distinct yet they can occur at the same site or colonize the same host species (22, 23). The huge number of spores produced by Sp+ *Frankia* strains may enhance both their survival and dispersion capacity and could, therefore, explain their higher infectivity and competitiveness on host plant roots, compared to Sp- strains (24). In addition, spore production may compete with nitrogen fixation by using part of the plant's investment (photosynthesis products and energy) in the nodules and by occupying the infected cells with spores instead of diazovesicules (the specialized cells where nitrogen fixation occurs), thus limiting the benefits for the plant (22). Overall, these studies have led to the assumption that the ability to sporulate *in planta* is an important life trait in *Frankia* (24, 25) and that the production of abundant asexual spores, with a higher potential for propagation (26) and for resistance to unfavourable conditions (27), may play an important role in *Frankia* fitness and biogeography.

The abundance of Sp+ strains varies among *Alnus* species and stands. Indeed some sites are exclusively nodulated by Sp+ or Sp- strains while at other sites both types co-occur in variable proportions (28). Recent studies on European alder species demonstrated that Sp+ are dominant on *A. viridis* (*Av*) (or *A. alnobetula)* and *A. incana* (*Ai*) and are far less abundant on *A. glutinosa* (*Ag*) (21). Moreover, Sp+ strains from high altitude alder stands were genetically very close to strains from boreal stands (high latitude) for a given *Alnus* taxon, suggesting that climate could be a driving factor in their distribution. However, since these three *Alnus* species are staggered according to altitude in subalpine, montane and lowland areas (for *Av*, *Ai* and *Ag* respectively), the question remains whether the distribution of Sp+

strains reflects high dependency on the host (specificity) or selection by the environmental conditions prevalent at the different elevations of its host.

The phylogenetic clustering of Sp+ strains isolated from different host species (21), and their limited host range deduced from cross-inoculation experiments (24, 25, 28, 29), suggest a stronger specificity of Sp+ strains to their host-plant. Compatible interactions between *Alnus* species and their specific *Frankia* strains may also affect their interaction with ECM fungi. Indeed, root nodule formation often precedes specific ECM association and several studies have demonstrated that nodulation efficiency affects ECM diversity (16, 30, 31). As a consequence, and given that Sp+ and Sp- *Frankia* strains differ in their infectivity (24), their nitrogen fixation activity (25) and their secondary metabolites profiles (32), *in planta* sporulation of *Frankia* may lead to marked differences in the ECM community structures of alders.

To clarify the ecological role of the *Frankia in planta* sporulation phenotype, and to explore its consequences on host-symbiont interactions, we decided to study (1) whether the dominance of the Sp+ phenotype in *Ai* and *Av* stands in highlands can be explained by a preferential selection by the host (*Ai* and *Av* specificity) or by the environmental conditions; (2) whether soil ecological history (*Frankia* genotype and presence over time of a given *Alnus* species) shapes soil symbiont communities; and (3) whether the *Frankia* sporulation phenotype could affect ECM communities associated with alder roots. For this purpose, a full factorial plant trapping experiment was performed with three *Alnus* species, used as traps, on six soils that differed as regards the alder species present (*A. glutinosa*, *A. incana* or *A. viridis*) and the frequency of the Sp+ *Frankia* phenotype (high *vs.* low) in the field. *Frankia* and ECM fungi from seedling roots were identified and community assemblages were compared in the different conditions. Furthermore, trapped *Frankia* and ECM were compared with the pool of *Frankia* and ECM sequenced from each native soil.

Material and methods

Sites and sampling

Six alder stands were selected, in the French alpine region, to include three *Alnus* species (*A. glutinosa, Ag; A. incana, Ai; A. viridis, Av*) and the two *Frankia* sporulation phenotypes (Sp+ and Sp-), resulting in 6 distinct ecoregions. These sites included two lowland *Ag* stands, 'Le Blanchet' (LB) and 'Le Tremblay' (TR), two montane *Ai* stands, 'Fond-de-France' (FF) and 'Ornon site 1' (OR), and two subalpine *Av* stands, 'Croix-de-Fer' (XF) and 'Ornon site 2' (ORV). LB, FF, and XF alder stands had been previously identified as "Sp- sites" (sites harbouring predominantly Sp- nodules), while TR, OR and ORV were identified as "Sp+ sites" (21). For each site, soil samples were collected at 3 different points, 50 meters apart, sieved at 4 mm and mixed to form a composite soil sample. Three subsamples of 0.5 g, from each composite sample, were frozen for subsequent genomic analyses. About 30 root nodules were also collected per site from at least 5 alders.

Plant growth and trapping experiments

Seeds from the three *Alnus* species (*Ag* from Grand Lemps, Rhône-Alpes; *Ai* and *Av* from Vanoise National Park, France) were sterilized for 30 seconds in absolute ethanol and then rehydrated, for 48h at +4°C, under magnetic stirring in sterile water. Plantlets were germinated and grown on the same soil, in a greenhouse, under the following conditions: 16 hours of daylight, at 10k luxs, 22°C, 60% humidity, and 8 hours of dark, at 18°C, 75% humidity. Soil combinations were tested with a full factorial design (Table 1).

Table 1. Factorial plan and condition names

		Soils (indigenous host)[b]		
		Ag	*Ai*	*Av*
Soils (dominant *Frankia*)[a]	**Sp+**	TR*	OR*	ORV*
	Sp-	LB*	FF*	XF*

a, *In-planta* sporulation phenotype: Spore-positive (Sp+) and Spore-negative (Sp-).

b, Indigenous host species: *Alnus glutinosa* (*Ag*), *Alnus incana* (*Ai*), *Alnus viridis* (*Av*).

* For each condition, the same 3 trapping plant species (*Ag*, *Ai* and *Av*) were used.

Each combination was used in trap plant experiments with 36 plantlets of each of the 3 host-species (*Ag, Ai, Av)*. Plants were watered twice a week with sterile deionized water and plant positions within the climatic chamber were randomized weekly. After at least 4 months of growth, plants were harvested. Nodules collected from roots were numbered and used for *Frankia* phenotypic and genotypic analyses. Circa 50 root tips per seedling were sampled randomly and used for ECM fungi genotypic characterization.

Sporulation phenotype determination of nodules

The nodule sporulation phenotype was determined by microscopic observation of hand-cut sections of healthy nodules stained with Lactophenol Blue (Réactifs RAL, Martillac, France), as previously described (21). The lactophenol blue stain discriminates between spores (refringent and non-stained) from hyphae and those from diazovesicles (stained deep blue). Nodules were considered to be Sp+ phenotype when more than one sporangium was observed out of 50 infected plant cells, and Sp- for the others. The proportion of Sp+ was estimated for each trapping condition.

DNA extraction from nodules and pgk gene sequencing

Genotyping consisted of targeting a partial sequence (695 pb) of the housekeeping gene *pgk* coding the phosphoglycerate kinase. Total nodular DNA was extracted from root nodules from the field and from trapping experiments, using the method previously described (21). For each nodule, amplification was performed with a nucleic acids solution using the specific primers and protocol previously described (21). PCR products were single-strand sequenced by Biofidal-DTAMB (Villeurbanne, France) with the same set of primers.

Frankia genetic diversity analyses in the field and trapped nodules

Pgk sequences were checked, trimmed and manually corrected using 4Peaks v.1.7.2 (33). Sequences were confirmed as belonging to *Frankia* using BLASTN searches against the National Center for Biotechnology Information (NCBI) databases (34) and aligned using the

Muscle v.3.8.31 package (35) in SEAVIEW v.4.4.2. The distance matrices were calculated using the DNADIST program. OTUs matrices were computed from the alignment in MOTHUR v.1.31.2 (36) with the furthest neighbour clustering and using 0.0049 as the maximum pairwise distance between sequences from an identical OTU. Accumulation curves of *Frankia* richness were computed from the matrices using the iNEXT package in R v. 3.0.1. (37), at a 95% confidence interval.

Phylogenetic analyses were performed from our aligned nucleotide sequences and pooled with sequences previously submitted (21), using maximum likelihood method in the software PhyML (33) with a GTR + G4 model and the NNI + SPR option for topology exploration. Topologies were rooted with *Frankia pgk* sequences that did not belong to the *Alnus* infective cluster 1 (outgroup). The branch robustness of ML trees was estimated by the approximate likelihood ratio test (aLRT) using the non-parametric Shimodaira-Hasegawa like branch test (38), implemented in SEAVIEW v.4.4.2. Clades were delineated on the basis of the strain habitat (host-plant and/or site) and the *in planta* sporulation phenotype, as previously proposed (21), and using the same numbering (23).

nifH metabarcoding analyses from soils and trapped nodules

A metabarcoding approach was used to assess the *nifH* bacterial community structure from soils and nodules. Soil DNA was extracted from 0.5 g of defrosted soil samples using the PowerSoil DNA kit (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. DNA was also extracted from all the nodules from 3 trapping plants per condition, with the same protocol as previously described (39). IGK3/DVV primers (40) were used at 1 mM each, in a PCR reaction mix containing 2 µL template DNA, 12.5 µL of Amplitaq Gold 360® Master Mix (Thermofisher Scientific) and sterile Miniversol water® (qs 25 µL). Soil and nodule amplicons were pooled and used as a template for a single run of Illumina® Miseq sequencing, using the Bioscientific PCR free kit. Sequencing was conducted using the paired-end sequencing technology (2x250 bp) at the Genotoul GIS facility, Toulouse, France.

NifH reads were processed using the open-source software MOTHUR (v.1.38.0) (36), following the method previously described (41). When the reads had been processed and the OTUs had been delimited at a 97% dissimilarity threshold, the first 250 most abundant OTUs were screened against the nucleotide database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI), using the BLAST® blastn tool to identify *Frankia* OTUs.

Global and ectomycorrhizal fungi diversities in soils and on plantlets roots

Root apices were harvested with sterile tweezers and stored in CTAB Buffer until DNA extraction. DNA extraction was performed as previously described (18). The ITS1 was chosen as a barcode and amplified, both on root apex extracts and on soil DNA, as previously described (41). All ITS1 amplicons were pooled and sequenced on a single run of Illumina® Miseq sequencing. Sequences analysis, according to G. Schwob et al. (41), enabled us to attribute sequences to seedlings or to soil samples, to group sequences in OTUs at a 97% threshold, and to assign sequences to fungal taxa based on a comparison with Genbank sequences using ecotag in the OBITools package (42). To determine the specificity of the ECM symbionts, sequences belonging to *Alnicola, Alpova, Lactarius, Melanogaster, Paxillus,* and *Russula* were aligned with the previously published sequences of specific species associated with alders (17, 18). The alignments, handled with MAFFT (43), were restricted to the ITS1 region. These included reference sequences and all sequences attributed to a given genus. These alignments allowed sequences to be grouped based on their shared single nucleotide polymorphism and these groups could be identified up to species level. Sequence assignation enabled us to subset ECM OTUs for further analysis. Accumulation curves of ECM OTUs richness were computed from the matrices using an iNEXT package in R v. 3.0.1., at a 95% confidence interval.

Communities and statistical analysis

95% confidence intervals of Sp+ frequencies were estimated using the normal approximation of the binomial distribution with the function *binom.test* implemented in R software (44).

Comparisons of Sp+ frequencies on trapping plants, versus those in the field, were performed using the same function. Fungal and ECM OTUs richness was computed for each seedling and soil sample using the ade4 package (45). Differences between ecoregions (indigenous host * dominant *Frankia* phenotype), and the effect of trapping host or indigenous host, were tested on plantlet samples using ANOVA. The Bray-Curtis distance matrices between communities, sampled on seedlings or in the soil, were computed for each gene using the Vegan package (46). Bray-Curtis matrices were used to perform Non-Metrical Multidimensional Scaling (NMDS) with the *metaMDS* function available in the Vegan package (46). The effect of the indigenous host-species on fungal, ectomycorrhizal and *Frankia* communities in soils was tested through a Permanova (Permutational multivariate analysis of variance), using the *adonis* function in the Vegan package. Likewise, the effect of the trapping host-species, the dominant spore phenotype and the indigenous host-species were tested on fungal, ECM and *Frankia* communities on trapping-plantlets. The order in the models was permuted to determine which factor could best explain the variations and, finally, the model with the least residuals was chosen.

Accession numbers

All *Frankia pgk* sequences were previously deposited with EMBL (https://www.ebi.ac.uk/ena), under accession numbers LT599837-LT600328 and PRJEB26794. Fastq files were deposited with EMBL under project PRJEB26577, accession number ERS2462111 and under project PRJEB18608 accession, number ERS1473494, for bacteria and fungi respectively.

Results

Trapping plant nodulation and Frankia Sp+ frequencies

A total of 236 nodules from the 6 distinct alder stands were successfully phenotyped. Very rare nodules with suspicious sporangia-like structures were discarded. In the field, Sp+ nodule frequencies observed for each stand agreed with our expectations and previous observations (Figure 1).

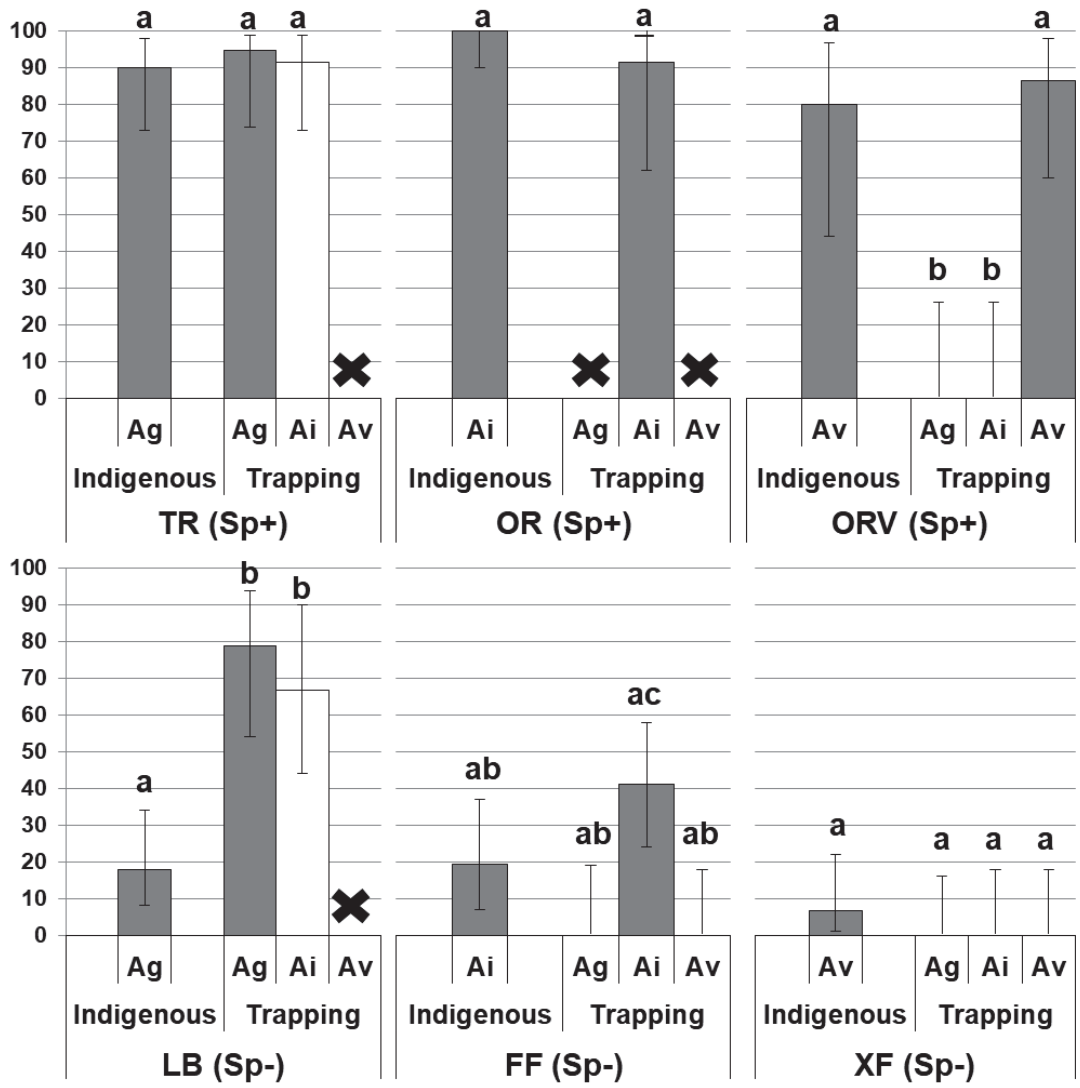


Figure 1. Histograms of Spore-positive percentages among indigenous host species nodules compared to trapping plant species nodules.

Percentages were calculated using the estimation of the binomial law. Error bars correspond to 95% confidence intervals. Black crosses indicate an absence of nodules on the plantlets. Panels correspond to the combinations of indigenous host species (*A. glutinosa*, *Ag*; *A. incana*, *Ai*; *A. viridis, Av*) and of Spore-positive (Sp+) or Spore-negative (Sp-) soils. Lowercase letters indicate results obtained by the binomial law test.

The three “Sp+ sites” (TR, OR and ORV) and the three “Sp- sites” (LB, FF and XF) harboured more than 80% and less than 20% of Sp+ phenotype nodules, respectively. In trapping assays, the three “Sp+ sites” produced high Sp+ nodules frequencies when the same species present in the field was used as a trapping species, with TR, OR and ORV harbouring 94.7, 91.7 and 86.7% of Sp+ nodules on *Ag*, *Ai* and *Av* plantlets, respectively (Figure 1) The three “Sp- sites” harboured different Sp+ frequencies in the trapping experiment compared to the field (Figure 1). Higher Sp+ frequencies were observed on LB and FF soils when trapped with *Ag* and *Ai,* respectively, compared with the field (78.9% and 41.2%, compared with 17.9% and 19.4%), (Figure 1). For XF soil, the rare Sp+ nodules present in the field were not recovered from any *Av* plantlets (6.7% versus 0%), (Figure 1).

When an alder species other than the indigenous one was used for trapping assays, contrasting results were obtained. *Ag* plantlets trapped only Sp- strains from FF (*Ai* Sp- soil), XF (*Av* Sp- soil) and ORV (*Av* Sp+ soil), with an average nodule number of 8.3, 5.9 and 2.1 per plant, respectively (Table 2).

Table 2. Average number of nodules per trapping plant and standard deviation, for each of the plant-trapping assays.

Predominant phenotype	Alder stand (indigenous species)	Trapping species		
		Ag	*Ai*	*Av*
Sp+	TR (*Ag*)	3.2 ± 0.4	3.0 ± 0.5	0
	OR (*Ai*)	0	3.7 ± 1.2	0
	ORV (*Av*)	2.1 ± 0.3	2.1 ± 0.3	3.5 ± 0.9
Sp-	LB (*Ag*)	10.9 ± 1.0	10.8 ± 2.4	0
	FF (*Ai*)	8.3 ± 0.8	9.4 ± 1.8	6.2 ± 1.4
	XF (*Av*)	5.9 ± 0.8	5.3 ± 0.6	11.3 ± 1.4

Spore-positive (Sp+) and Spore-negative (Sp-) are the predominant types of *Frankia* strains observed in the field nodules from the 6 alder stand soils used for the trapping. Average values and standard deviations of the nodule numbers per plant are reported for each of the three trapping-species (*Alnus glutinosa, Ag*; *Alnus incana*, *Ai*; *Alnus viridis*, *Av)*.

On OR (*Ai* Sp+ soil), *Ag* plantlets formed only prenodules whose small size and early stage of development precluded any phenotype diagnostic. *Ai* plantlets produced an average of 3.0 and 10.8 nodules per plant, of which 91.7 and 66.7% were Sp+ nodules, on TR and LB soils both coming from *Ag* alder stands in the field. Exclusively Sp- strains were trapped on ORV and XF soils, both corresponding to *Av* alder stands in the field, forming 3.5 and 11.3 nodules per plant, respectively (Table 2). *Av* plantlets formed an average of 6.2 nodules per plant on FF soil, all of them being Sp-. On the three other non-*Av* soils (TR, LB, OR), *Av* plantlets did not form nodules and most individuals died after a few weeks.

Frankia genetic diversity in nodules

DNA extractions and *pgk* gene fragment (695 bp) amplifications were successfully conducted for 88 and 207 nodules from the field and from the greenhouse trapping-plants, respectively. None of the rarefaction curves obtained from *pgk* sequences of field and trapped nodules reached saturation (Figure 2).

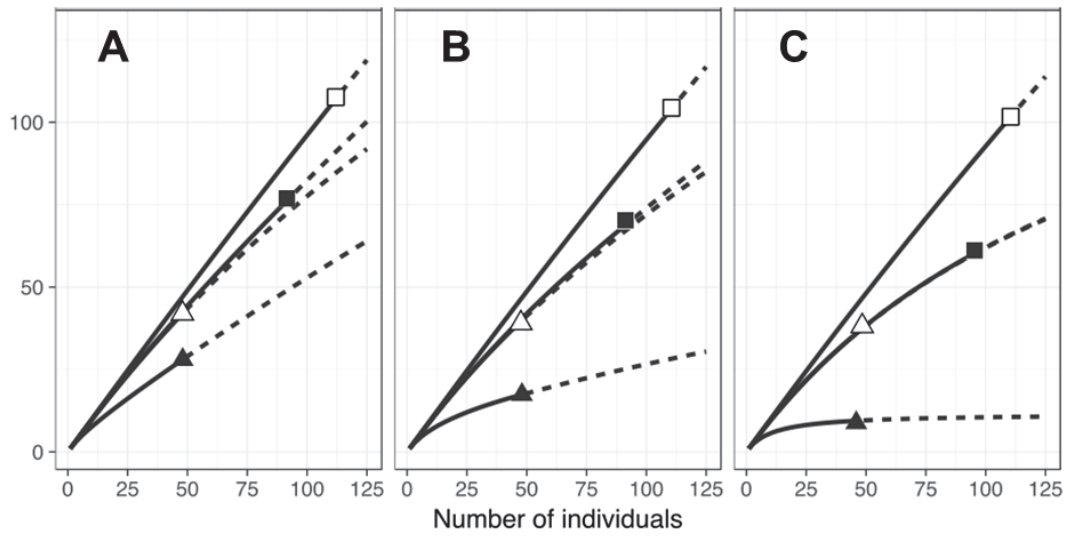


Figure 2. Accumulation curves of *Frankia* (A) richness, (B) diversity (Shannon index) and (C) equitability (Simpson index), estimated from *pgk* sequences at the same sequence threshold.

Spore-positive, Sp+ (filled symbols) and Spore-negative, Sp- (empty symbols) Frankia from indigenous host plants (squares) or trapping plants (triangles). Interpolation (continuous line), extrapolation (dashed line).

The richness of *Frankia* strains was higher in the trapped nodules compared to field nodules (85.9 against 68 OTUs, respectively; data not shown), regardless of the Sp+ or Sp- phenotype. *Frankia* Sp+ strains always harboured a lower level of richness than *Frankia* Sp- strains, in both field nodules and trapped nodules (28 versus 42 OTUs in field nodules, respectively, and 39.8 versus 45.9 OTUs in trapped nodules, respectively).

The phylogenetic analysis revealed that all *pgk* sequences of the trapped *Frankia* strains could be grouped into three previously described clades (1, 4 and 5) (Figure 3). Three sub-clades contained narrow-range strains (1a, 1b, and 5c trapped only by *Av*, *Ai* and *Ag,* respectively) and two sub-clades contained large-range strains (4a, 4b, and 4c trapped by the three alder species used). Sub-clade 5a contained middle-range strains (trapped by *Ag* and *Ai,* but not *Av*). All Sp+ strains trapped on *Av* Sp+ soil (ORV) belonged to clade 1a, while all Sp+ strains trapped on both *Ai* soils OR and FF were grouped into clade 1b. Clade 4 contained all Sp- *Frankia* strains trapped with the three trapping species on *Ai* and *Av* soils (FF, XF, ORV), creating three sub-clades (labelled a, b and d). Subclades 4d and 4b contained all Sp- strains trapped on ORV, subclades 4b and 4a contained all Sp- strains trapped on XF soil, and subclade 4a contained all Sp- strains trapped on FF soil. Sp+ and Sp- strains trapped with *Ag* and *Ai* host species from both *Ag* soils, TR and LB, were grouped in clade 5. No strain of this clade 5 was trapped by the *Av* host species.

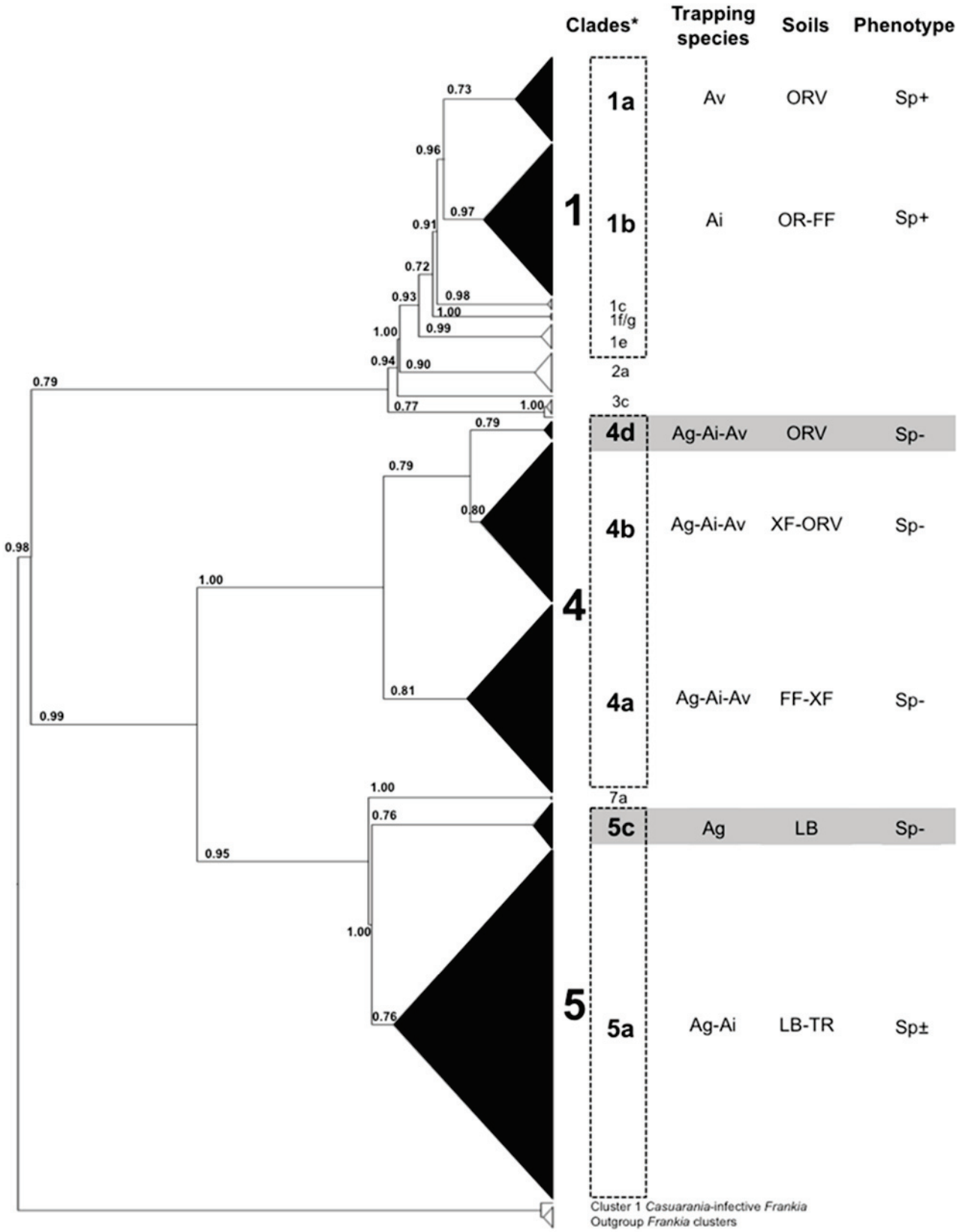


Figure 3. Positions of trapped *Frankia* strains in the *pgk* phylogenetic tree of *Alnus*-infective (Cluster 1) *Frankia*. The phylogeny was estimated by Maximum Likelihood (PhyML). Statistical support of the nodes was estimated by the aLRT SH-like method. Clades were annotated according to Pozzi *et al.* (41) and gray zones correspond to the 2 new sub-clades identified in the present study. Sub-clades in black are those that contain *Frankia* strains from our trapping assays. The clades 1, 4 and 5 correspond to the OTU 1, 4 and 5 (at the 0.05 threshold) in the present study.

Frankia community structure in soils and nodules resulting from trapping

From the 1 310,346 reads obtained in the *nifH* run, 222,678 soil reads and 336,655 nodule reads were considered to be of good quality, with an average of 12,371 and 11,222 reads per sample, respectively. Sequences clustered at 97% threshold into 163,020 soil reads and 199,432 nodule reads. For each sample, the first 250 *Frankia* OTUs at a 0.03 dissimilarity threshold, each containing a minimum of 200 sequences, were delineated. On average, 10,720 and 266 *Frankia* sequences per sample were obtained for the nodules and the soils, respectively. *Frankia* OTU composition was compared between soils and trapped nodules. For all the sites studied, the most highly represented *Frankia* OTU in trapping nodules was not the most abundant in the soil (Supp data S1). The dominant OTUs in nodules represent between 3.9 and 18.5% of relative abundance, depending on the soil. The predominant OTUs in each soil grouped together in a single clade, while predominant OTUs in nodules formed two distinct clades (data not shown).

To compare *Frankia* OTU composition in the different soils and in trapped nodules, a Non-metric Multi-dimensional Scaling (NMDS) was used. *Frankia* OTU compositions in soils were always significantly different from trapped nodules (Figure 4 A-B, F=14.1, R^2=0.23, *p*=0.001). While indigenous soil communities showed no differences, whichever indigenous alder species was present, the indigenous host-species had a strong effect on OTUs composition in trapped nodules, regardless of the trap-plant species (Figure 4A, F=9.72, R^2=0.41, *p*=0.001). The trap-plant species alone had no statistically significant structuring effect (Figure 4B, F=1.61, R^2=0.10, *p*=0.091). However, there was an interaction between the indigenous species and the trap-plant species that explained the *Frankia* OTU compositions in trapped nodules (F=7.88, R^2=0.71, *p*=0.001).

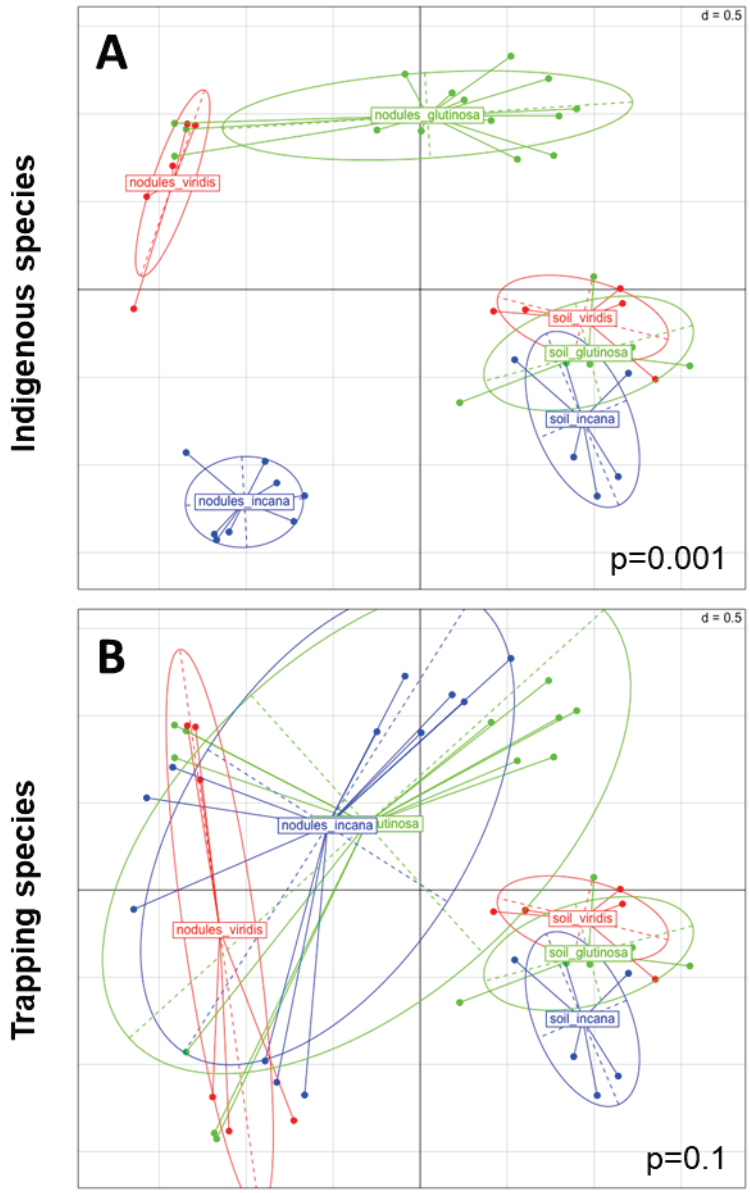


Figure 4. Effect of (A) the indigenous species and (B) the trapping species on *Frankia* community structure in soils and in the trapped nodules, illustrated by non-metric multidimensional scaling (NMDS).

NMDS was performed on *Frankia* OTU matrices computed from *nifH* sequences. Colors refer to the alder species, both in the field and in the trapping experiment. P-values (p) of permutational multivariate analysis of variance (adonis function) are given for both factors tested (A and B). Ellipses are graphical overviews.

Fungal and ectomycorrhizal diversity in soils and on plantlet roots

After removing singletons and putative chimeras, 302,972 sequences could be assigned to fungi, of which 30,503 (circa 10%) could be attributed to ECM taxa and 17,114 could be assigned to ten specific ECM species (Supp data S2). Species accumulation curves revealed that plantlets always associated with fewer fungi, compared to the soil samples. Considering ECM fungi, all trapping conditions led to a successful growth of ECM fungi on alder roots, and each alder species trapped more fungal and ECM OTUs than on its own soil (Supp data S3). The distribution of the six specific ECM OTUs detected corresponded to their specificity pattern and no host shifts were detected. However, the identification of three *Alnicola* OTUs and 65 *Tomentella* sp. was not precise enough to investigate their specificity pattern and detect possible host shifts (Supp data S3).

In the soil, fungal and ECM species richness was not shaped by the same parameters. The sporulation phenotype present in the field had an effect on the number of different fungal species but not on that of ECM (Supp data S4). The variations in ECM species richness could be explained, instead, by the ecoregion (Supp data S4). The species richness measured on plantlets followed a different pattern, as the number of both fungal and ECM species was determined first by the indigenous host and, to a lesser extent for the ECM community only, by the trapping host and the ecoregion (Supp data S4). The soil community structure of the fungal and ECM community was shaped primarily by the indigenous host, and then by the ecoregion and the sporulation phenotype present in the field. On plantlets, the fungal and ECM communities were shaped first by the indigenous alder species, then by the ecoregion, the trapping sporulation phenotype, the field sporulation phenotype and, to a lesser extent, by the trapping host (Supp data S4). To summarize, species richness and community structure of all fungi and ECM fungi were mostly shaped by the indigenous host but also, partly, by the sporulation phenotype and its interaction with the indigenous host (ecoregion).

Discussion

Frankia diversity and distribution

The trapping assays revealed a greater richness of *Frankia* species than previously described in the field, particularly for trapped Sp+ strains where the number was about two thirds higher when both the indigenous alder species and an exogenous species were used for trapping. Enhancement of the Sp+ strain populations might be due to soil sampling and homogenization. Soil structure plays a major role in retaining microbial biomass and nutrients and in protecting microorganisms from microbivory (47). Sieving and mixing damages the aggregates, leading to a reduction in pore space and, consequently, an effect on the biomass and function of soil microbial populations (48). For instance, soil sieving impacted soil fungi communities and reduced the infectivity of arbuscular mycorrhizal fungi (49, 50). Similarly, in our trapping trials, *Frankia* structures (hyphae, sporangia and diazovesicles) might have been impacted by the soil preparation. It is possible that strains or spores previously inaccessible to the root could be released from aggregates or sporangia, thus increasing both the number and diversity of potentially infective *Frankia* compared with the field conditions.

The age and phenology of the host plant could also influence the *Frankia* community structure (51). Genetic diversity of *Frankia* may decrease as the alder stand gets older as a consequence of the selective pressure by the host to maintain the most beneficial genotypes (52, 53). However, the potential stock of *Frankia* genotypes may persist in the soil for a while, as either saprophytic or dormant propagules, constituting inocula for primary infections on young plantlets. Plantlets used for trapping and adult alders might also display major differences in their root exudate quality and quantity, thus influencing the recruitment of soil microbial communities in the rhizosphere, as previously described (54, 55). Indeed, young plants often exude substantially higher quantities of organic substances than mature individuals, in particular phenolic compounds known to play a defensive role in plant-microorganism interactions (56, 57). For instance, Age-Related Resistance (ARR) has been

linked with the production of defence compounds (58, 59) that might affect alder symbiotic interactions.

All trapped strain sequences were grouped into the previously described clades, sometimes constituting new sub-clades (4d and 5c) that have never been sampled during previous field studies at the same soil collection sites (21, 23). The seven sub-clades identified differed in their host specificity (*i.e.* narrow/middle/large-range) and the sporulation phenotype of the strains. No other clear indication of phylogenetic clustering (trapping-species or ecoregion) emerged from our results. The predominance of Sp+ *Frankia* strains in high altitude zones, associated with *Ai* and *Av,* was thought to be a result of host species selection and/or climatic factors associated with the habitat (21). Here, we reveal that all the strains trapped from alpine soils belonged to either clade 1 (all Sp+ strains) or 4 (all Sp- strains) and none to clade 5, whichever trapping species was used. Thus, *Ai* and *Av* hosts did not actively select Sp+ strains over Sp- strains. In greenhouse conditions, *Ai* and *Av* are able to form nodules with the strains present, whatever their sporulation phenotype, but with the sole condition that they belong to clade 1 or 4. For instance, despite the high specificity between clade 1a Sp+ strains and *Av* hosts, *Av* plantlets still trap clade 4 Sp- strains. However, in the field very few *Av* stands had a low Sp+ frequency (25, 60), suggesting that alpine habitats may promote Sp+ strains over Sp- strains and that the prevalence of Sp+ strains observed in the nodules of alpine alders would be the result of their higher density in the soils. Sp+ *Frankia* strains have also been described as being about 100 to 2000 times more infective than Sp- strains (21, 61-63). In fact, due to the huge number of potentially infective spores released by a single sporangia, the density of infective propagules in a given nodule biomass used for inoculation is far higher in the case of Sp+ strains.

Changes in Sp+ frequencies in trapping trials vs in the field

Soils collected from a Sp- alder stand (LB and FF) revealed surprisingly higher Sp+ frequencies in the laboratory when their original alder species (*Ag* and *Ai* respectively) was used for trapping. This result could be explained either by the under-estimation of the proportion of Sp+ in the field or by the experimental conditions. Although the Sp+ proportions in the field have been confirmed by various research studies (data not shown), the under-estimation of the relative number of Sp+ nodules cannot be excluded, particularly in certain circumstances like early seasonal sampling or young nodules that could favour a false negative characterization of the nodule phenotype. In addition, none of the available tools permit the identification of *Frankia* Sp+ and Sp- directly from soil communities, so the proportion of infective Sp+ propagules in the soil sampling spots is not known and could be higher than the proportion determined from the nodules. There is currently no available data to explain a difference in sensitivity of the young plantlets towards Sp+ symbionts, although recent studies on the production of defensin-like peptides by *Alnus* (64) and the detection of plant defence compounds differentially produced in Sp+ and Sp- nodules (32) are both promising lines of research.

This increased proportion of Sp+ on trapping plants, compared to field conditions, was not observed in *Av* Sp- soil (XF). Both plant and bacterial traits provide an explanation for this result. Phylogenetic studies showed that *Av* Sp+ strains are grouped in a unique clade, genetically divergent from *Ai* and *Ag* Sp+ strains, and they represent a new species (21, 65). Within this species, *Frankia* strains would be better adapted to the alpine climate than *Av* Sp- strains, notably through a higher resistance of spores towards freezing/thaw cycles or other environmental variabilities (21). According to this hypothesis, the greenhouse conditions, warmer than in the field, would preferentially elicit Sp- strains and would not be suitable for *Av* Sp+ strains. The *Av* host plant is also adapted to alpine conditions. As observed with other alpine plants, the warmer greenhouse temperature may have a quantitative and qualitative impact on *Av* root exudates (66), probably implicating molecules involved in symbiotic signalization.

Compatibility patterns between soils and trapping species

Different patterns of compatibility were found between soils and trapping plants depending on the alder species and the proportion of Sp+ nodules present in the field (Figure 5).

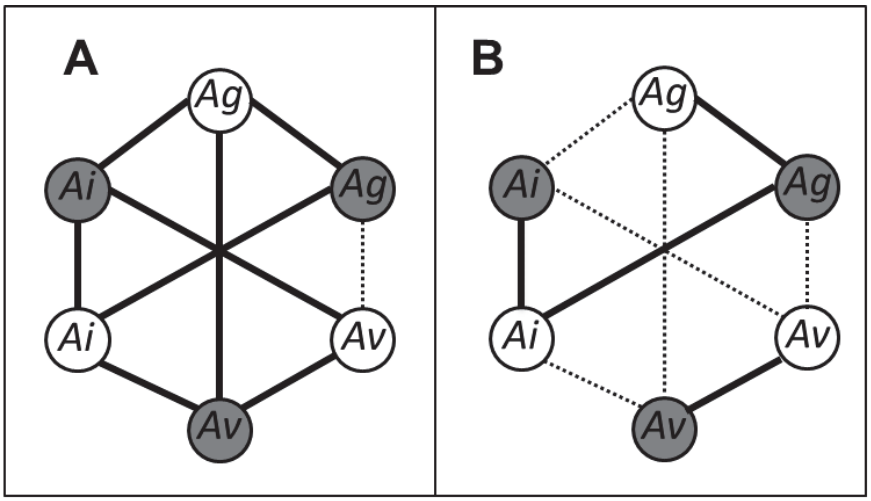


Figure 5. Compatibility patterns between the plant trapping species and the (A) Spore-negative and (B) Spore-positive soils used in the assays.

The compatibility between the 3 trapping species, (white) *Alnus glutinosa* (*Ag*), *Alnus incana* (*Ai*) and *Alnus viridis* (*Av*) and the 6 alder stand soils (grey), differing in the indigenous host species (*Ag*, *Ai* or *Av*), is symbolized by a continuous line (presence of compatible strains and formation of mature nodules). The incompatibility is symbolized by a dotted line (impeded prenodules and no compatible strain trapped).

Frankia strains isolated from alders were long thought to belong to a unique host specificity group, *i.e.* a group of strains sharing the same compatible hosts, in this case plant species that belong to *Alnus* genus and Myricaceae (67-70). While this « *Alnus*-Myricaceae specificity group » concept was confirmed for most *Alnus*-cultured strains, cross-inoculation experiments, using crushed nodules as inocula, suggested that Sp+ strains had a narrower host-range compared with Sp- strains (24, 25, 28, 29, 71). However, the use of crushed nodules may have three major side effects. First, the presence of plant secondary metabolites could prevent root-*Frankia* recognition and association (14). Second, the inocula concentration used is generally much higher than the natural *Frankia* concentration in the field (41, 72). Finally, due to the dominance of one strain in the nodules, only a few strains

were tested and this was not representive of the diversity of *Frankia* communities in soils (73), thus giving a simplistic version of the *Alnus*-*Frankia* compatibility patterns compared with the trapping experiments.

Our results mirrored the narrower host range of Sp+ strains previously described since most incompatibility patterns concerned Sp+ soils (Figure 5). Indeed, Sp+ *Ai* soils and Sp+ *Av* soils never led to compatible associations when alder species other than the indigeneous field species (*Ai* and *Av* respectively) were used for trapping (Figure 5B). In all these cases, the nodules obtained were absent or very small (impeded prenodules) and not functional (absence of diazovesicles). Moreover, our results corroborate the lack of compatibility between *Ai* Sp+ strains and *Ag* hosts, previously described using crushed nodule inocula (24, 25). This incompatibility is even more marked in our soil trapping experiment (no nodules formed), compared to the crushed nodule inoculations (less infectivity). The high *Frankia* density in crushed nodule inoculations could force the occurrence of some symbiotic associations never observed in the field, thus indicating an artificially broad host range (24). This result suggests that although *Ai* Sp+ strains are genetically capable (symbiotic signalization is not lacking) of infecting *Ag* roots they actually display low infectivity on this host species.

Equally, several results suggest very narrow specificity patterns between the *Av* host and its associated *Frankia* strains, and especially for the Sp+ strains: (1) the absence of nodulation of *Av* plantlets on *Ag* soils, suggesting a total incompatibility between *Av* and clade 5 strains whatever their sporulation phenotype (Figure 3); (2) the absence of nodulation of *Av* plantlets on *Ai* Sp+ soil, although strains from sub-clade 1b (all *Ai* Sp+ strains) and sub-clade 1a (*Av* Sp+ strains) are genetically close (Figure 3); and (3) the strict specificity of *Av* Sp+ strains from sub-clade 1a that were exclusively trapped by *Av* plantlets. This result is consistent with previous studies (21, 23) where Sp+ strains, from clade 1a, were described as a monophyletic group considered to be highly specific to their host.

The colonization of a new environment by non-indigenous nitrogen-fixing plants (as shown with a cross trap-plant experiment) often leads to the establishment of novel associations

through the recruitment of cosmopolitan strains, implying the presence of compatible low specificity strains in the soil (74-76). In the light of our results, the cosmopolitan status of *Frankia* strains in alder stand soils mainly depends on their Sp+ or Sp- identity. In contrast to earlier hypotheses (77, 78), our findings suggest that specificity within a particular set of mutualists may result in a failure of some alder species to colonize new habitats.

Impact of alder stands soil history and Frankia sporulation phenotype on symbiont diversity

The NGS approach, targeting both bacterial and fungal symbionts, was used to determine the extent to which soil communities are shaped by the host-species in the field, to explain the symbiotic associations observed on the trapping-plants, and to test the potential impact of the *in planta* sporulation of *Frankia* on root ECM fungi.

Although soil *Frankia* communities were the same among the three alder species in the field, differences in *Frankia* communities in trapped nodules were observed according to the field host-species. These data indicate that, in agreement with a previous study (79), host-species in the field determined the nodule-forming populations of *Frankia*. Nodule formation has been shown not to be a function of *Frankia* population abundance (80). Similarly in this study, the sequences of trapped *Frankia* strains harboured relatively low abundances compared to soil-dwelling *Frankia* strains, possibly indicating that our metabarcoding approach did not allow for the detection of differences among soil *Frankia* communities beneath the different alder species.

The use of NGS on alder roots revealed mostly ECM fungi, however sequences were too short to allow a deeper investigation of fungi specificity. By searching for single nucleotide polymorphism, we did identify some of the *Alnus* symbionts and, interestingly, all the associations observed in the experiment were congruent with the current information about *Alnus* specificity (17). Here, more ECM fungi were observed on plantlets than in their own soil probably because, in addition to specialist ECM fungi, general ones were also recruited. This pattern is often observed on *Alnus* in new environments, as recently shown in the case of invasion in New Zealand (77) and in the case of isolation in Corsica (65). In these studies,

generalist fungi never dominate *Alnus* roots and we observed the same pattern in our study, as *Tomentella* and *Alnicola* represented the more abundant genus for the three hosts.

In the context of the numerous studies and reviews on *Alnus*-ECM specificity, our results highlight the importance of the indigenous host and, therefore, the soil history on specificity, and we have also shown that the three hosts can grow and develop ECM on other soils. Interestingly, *Ai* grew well on both its own soil and on *Ag* ones, a characteristic that might be correlated with its ability to grow in a wide altitudinal range. As for *Frankia*, the indigenous host always had a stronger effect than the trapping host on the fungal and ECM community and diversity. This effect is probably due to two major factors: the soil chemistry, when it is particularly distinct between the sites and the hosts (18), and the spore bank.

We investigated the influence of *Frankia* sporulation phenotype, both predicted from the ecoregion (the soil and the indigenous host present) and as observed on the trapping plantlets. We detected a significant effect of the sporulation phenotype (both predicted and observed) on the ECM community structure but not on ECM species diversity, suggesting that the abundance may change but not the identity of the fungi. This effect of the sporulation phenotype was often stronger than the trapping host effect, suggesting that the specificity could result from a strong interaction between the host and its diverse symbionts. Several clues suggest an intimate relationship between *Frankia* and ECM fungi (16), and plant investment to nodules and mycorrhizae might depend on their co-occurrence on the host. Here, we did not measure plant investment, but we observed that ECM communities are partly determined by *Frankia* and its phenotype of *in planta* sporulation, even on young plantlets. The underlying mechanism still needs to be deciphered. As the profuse sporulation of *Frankia* within the nodules would require sizeable amounts of carbon (spore coat layers), nitrogen (DNA bases for genome copy) and possibly phosphorus (DNA bases and replication enzymes) from the host plant, we could hypothesize that the sporulation phenotype of *Frankia* may modify the level of these elements in the host-plant to such an extent that it might mediate host-partner interactions, and even partner-partner interactions, through the host, particularly when these partners are also involved in the C:N:P economy of the

symbiotic system. More work is needed to clearly understand the effects of the *Frankia* sporulation phenotype on alder tripartite symbiosis.

To conclude, we have shown that the alder species and the *Frankia* sporulation phenotype present in the field shape the soil symbiont communities. As a consequence, non-indigenous species may not find compatible symbionts and could fail in colonizing new habitats. Although alder species did not associate preferentially with a given sporulation phenotype of *Frankia*, Sp+ and Sp- strains show different host dependency and harbour different root ECM communities. These observations suggest that the tripartite symbiosis, *Alnus*-*Frankia*-ECM fungi, is under the control of complex recognition signals and each symbiont may have a direct influence on the physiology and ecology of the other two. Future studies should investigate the global *Alnus* microbiome to acquire a better understanding of the ecology and evolution of actinorhizal symbiosis.

Acknowledgments

The authors are grateful to Elise Lacroix from the Greenhouses and Climatic Chambers Platform, for nursing our alder plantlets throughout the study. We also thank Florian Vautrin, Guillaume Laliberté, Lucile Daniel, Claire Bellehumeur and Samuel Jean for their precise technical assistance. G. Schwob was granted a doctoral fellowship by the Ministry of Higher Education and Research (France). The sequencing was funded by a regional project ARC and the French Laboratory of Excellence project "TULIP" (ANR-10-LABX-41 ; ANR-11-IDEX-0002-02).

References

1. Martiny JBH, Bohannan BJ, Brown JH, Colwell RK, Fuhrman JA, Green JL, Horner-Devine MC, Kane M, Krumins JA, Kuske CR. 2006. Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. Nature Reviews Microbiology 4:102-112.
2. Ramette A, Tiedje JM. 2007. Multiscale responses of microbial life to spatial distance and environmental heterogeneity in a patchy ecosystem. Proceedings of the National Academy of Sciences 104:2761-2766.
3. Fierer N, Jackson RB. 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. Proc Natl Acad Sci U S A 103:626-31.

4. Hanson CA, Fuhrman JA, Horner-Devine MC, Martiny JB. 2012. Beyond biogeographic patterns: processes shaping the microbial landscape. Nat Rev Microbiol 10:497-506.
5. Tedersoo L, Bahram M, Põlme S, Kõljalg U, Yorou NS, Wijesundera R, Ruiz LV, Vasco-Palacios AM, Thu PQ, Suija A. 2014. Global diversity and geography of soil fungi. science 346:1256688.
6. King AJ, Freeman KR, McCormick KF, Lynch RC, Lozupone C, Knight R, Schmidt SK. 2010. Biogeography and habitat modelling of high-alpine bacteria. Nature communications 1:53.
7. Higgins LM, Kennedy PG. 2012. Symbiotic Frankia bacteria in Alnus forests in Mexico and the United States of America: is geographic location a good predictor of assemblage structure? Botany 90:423-431.
8. Moodly S. 2009. Adaptation of existing methods of genotyping platelet polymorphisms associated with cerebrovascular disease for use within the routine laboratory setting and determining the relative frequency in a cohort of stroke patients.
9. Douhan GW, Vincenot L, Gryta H, Selosse M-A. 2011. Population genetics of ectomycorrhizal fungi: from current knowledge to emerging directions. Fungal Biology 115:569-597.
10. Vincenot L, Nara K, Sthultz C, Labbe J, DUBOIS MP, Tedersoo L, Martin F, SELOSSE MA. 2012. Extensive gene flow over Europe and possible speciation over Eurasia in the ectomycorrhizal basidiomycete Laccaria amethystina complex. Molecular Ecology 21:281-299.
11. Roy M, Dubois M-P, Proffit M, Vincenot L, Desmarais E, Selosse M-A. 2008. Evidence from population genetics that the ectomycorrhizal basidiomycete Laccaria amethystina is an actual multihost symbiont. Molecular Ecology 17:2825-2838.
12. Nemergut DR, Costello EK, Hamady M, Lozupone C, Jiang L, Schmidt SK, Fierer N, Townsend AR, Cleveland CC, Stanish L, Knight R. 2011. Global patterns in the biogeography of bacterial taxa. Environ Microbiol 13:135-44.
13. Huguet V, Batzli JM, Zimpfer JF, Normand P, Dawson JO, Fernandez MP. 2001. Diversity and Specificity of Frankia Strains in Nodules of Sympatric Myrica gale, Alnus incana, andShepherdia canadensis Determined by rrsGene Polymorphism. Applied and environmental microbiology 67:2116-2122.
14. Torrey JG. 1990. Cross-inoculation groups within Frankia and host-endosymbiont associations. The biology of Frankia and actinorhizal plants:83-106.
15. Molina R. 1981. Ectomycorrhizal specificity in the genus *Alnus*. Canadian Journal of Botany 59:325-334.
16. Kennedy PG, Walker JKM, Bogar LM. 2015. Interspecific Mycorrhizal Networks and Non-networking Hosts: Exploring the Ecology of the Host Genus Alnus. 224:227-254.
17. Rochet J, Gardes M, Moreau P-A, Manzi S. 2011. Comparative phylogenies and host specialization in the alder ectomycorrhizal fungi Alnicola, Alpova and Lactarius (Basidiomycota) in Europe. BMC evolutionary Biology 11:40.
18. Roy M, Rochet J, Manzi S, Jargeat P, Gryta H, Moreau PA, Gardes M. 2013. What determines Alnus - associated ectomycorrhizal community diversity and specificity? A comparison of host and habitat effects at a regional scale. New Phytologist 198:1228-1238.
19. Põlme S, Bahram M, Koljalg U, Tedersoo L. 2014. Global biogeography of Alnus-associated Frankia actinobacteria. New Phytol 204:979-88.
20. Põlme S, Bahram M, Yamanaka T, Nara K, Dai YC, Grebenc T, Kraigher H, Toivonen M, Wang PH, Matsuda Y. 2013. Biogeography of ectomycorrhizal fungi associated with alders (Alnus spp.) in relation to biotic and abiotic variables at the global scale. New Phytologist 198:1239-1249.
21. Pozzi AC, Bautista - Guerrero HH, Nouioui I, Cotin - Galvan L, Pepin R, Fournier P, Menu F, Fernandez MP, Herrera - Belaroussi A. 2015. In - planta sporulation phenotype: a

major life history trait to understand the evolution of Alnus - infective Frankia strains. Environmental microbiology 17:3125-3138.
22. Torrey JG. 1987. Endophyte sporulation in root nodules of actinorhizal plants. Physiologia Plantarum 70:279-288.
23. Pozzi AC, Bautista-Guerrero HH, Abby SS, Herrera-Belaroussi A, Abrouk D, Normand P, Menu F, Fernandez MP. accepted 2018. Robust Frankia phylogeny, species delineation and intraspecies diversity based on MLSA and a simplified protocol adapted to intensive field sampling. Systematic and Applied Microbiology.
24. Cotin-Galvan L, C. Pozzi A, Schwob G, Fournier P, P. Fernandez M, Herrera-Belaroussi A. 2015. *In-planta* Sporulation Capacity Enhances Infectivity and Rhizospheric Competitiveness of *Frankia* Strains. Microbes and environments doi:10.1264/jsme2.ME15090.
25. Kurdali F, Domenach A-M, Fernandez MDLP, Capellano A, Moiroud A. 1988. Compatibility of Frankiae spore positive and spore negative inocula with Alnus glutinosa and Alnus incana. Soil Science and Plant Nutrition 34:451-459.
26. Sache I. 1997. Effect of density and age of lesions on sporulation capacity and infection efficiency in wheat leaf rust (Puccinia recondita f. sp. tritici). Plant Pathology 46:581-589.
27. Dworkin J, Shah IM. 2010. Exit from dormancy in microbial organisms. Nat Rev Microbiol 8:890-6.
28. Schwintzer CR. 1990. Spore-positive and spore-negative nodules. The biology of Frankia and actinorhizal plants:177-193.
29. Markham JH. 2008. Variability of nitrogen-fixing Frankia on Alnus species. Botany 86:501-510.
30. Miller SL, Koo C, Molina R. 1992. Early colonization of red alder and Douglas fir by ectomycorrhizal fungi and Frankia in soils from the Oregon coast range. Mycorrhiza 2:53-61.
31. Yamanaka T, Li C-Y, Bormann BT, Okabe H. 2003. Tripartite associations in an alder: effects of Frankia and Alpova diplophloeus on the growth, nitrogen fixation and mineral acquisition of Alnus tenuifolia. Plant and Soil 254:179-186.
32. Hay A-E, Boubakri H, Buonomo A, Rey M, Meiffren G, Cotin-Galvan L, Comte G, Herrera-Belaroussi A. 2017. Control of Endophytic Frankia Sporulation by Alnus Nodule Metabolites. Molecular Plant-Microbe Interactions 30:205-214.
33. Griekspoor A, Groothuis T. 2005. 4Peaks: a program that helps molecular biologists to visualize and edit their DNA sequence files v1. 7.
34. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. Journal of molecular biology 215:403-410.
35. Edgar RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic acids research 32:1792-1797.
36. Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ. 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. Applied and environmental microbiology 75:7537-7541.
37. Hsieh T, Ma K, Chao A. 2016. iNEXT: an R package for rarefaction and extrapolation of species diversity (Hill numbers). Methods in Ecology and Evolution 7:1451-1456.
38. Guindon S, Dufayard J-F, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. Systematic biology 59:307-321.
39. Rouvier C, Prin Y, Reddell P, Normand P, Simonet P. 1996. Genetic diversity among Frankia strains nodulating members of the family Casuarinaceae in Australia revealed by PCR and restriction fragment length polymorphism analysis with crushed root nodules. Applied and environmental microbiology 62:979-985.
40. Gaby JC, Buckley DH. 2012. A comprehensive evaluation of PCR primers to amplify the nifH gene of nitrogenase. PLoS One 7:e42149.

41. Schwob G, Roy M, Manzi S, Pommier T, Fernandez M. 2017. Green alder (Alnus viridis) encroachment shapes microbial communities in subalpine soils and impacts its bacterial or fungal symbionts differently. Environmental Microbiology.
42. Boyer F, Mercier C, Bonin A, Le Bras Y, Taberlet P, Coissac E. 2016. obitools: a unix - inspired software package for DNA metabarcoding. Molecular ecology resources 16:176-182.
43. Katoh K, Asimenos G, Toh H. 2009. Multiple alignment of DNA sequences with MAFFT. Bioinformatics for DNA sequence analysis:39-64.
44. Team R. 2012. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2012. ISBN 3-900051-07-0.
45. Chessel D, Dufour A-B, Dray S. 2009. Analysis of Ecological Data: Exploratory and Euclidean methods in Environmental sciences. Version 14-14 2 October 2010; 1: 4 11.
46. Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, O'Hara R, Simpson GL, Solymos P, Stevens MHH, Wagner H. 2011. Vegan: Community ecology package, 2011. R package version:1.17-8.
47. Wardle D. 1992. A comparative assessment of factors which influence microbial biomass carbon and nitrogen levels in soil. Biological reviews 67:321-358.
48. Zabinski CA, Gannon JE. 1997. Effects of recreational impacts on soil microbial communities. Environmental Management 21:233-238.
49. Jasper D, Abbott L, Robson A. 1991. The effect of soil disturbance on vesicular—arbuscular mycorrhizal fungi in soils from different vegetation types. New Phytologist 118:471-476.
50. Petersen SO, Klug MJ. 1994. Effects of sieving, storage, and incubation temperature on the phospholipid fatty acid profile of a soil microbial community. Applied and environmental microbiology 60:2421-2430.
51. Kennedy PG, Weber MG, Bluhm AA. 2010. *Frankia* bacteria in *Alnus rubra* forests: genetic diversity and determinants of assemblage structure. Plant and soil 335:479-492.
52. Kiers ET, Rousseau RA, West SA, Denison RF. 2003. Host sanctions and the legume–rhizobium mutualism. Nature 425:78-81.
53. West SA, Kiers ET, Simms EL, Denison RF. 2002. Sanctions and mutualism stability: why do rhizobia fix nitrogen? Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences 269:685-694.
54. Micallef SA, Shiaris MP, Colón-Carmona A. 2009. Influence of Arabidopsis thaliana accessions on rhizobacterial communities and natural variation in root exudates. Journal of experimental botany 60:1729-1742.
55. Moore BD, Andrew RL, Kulheim C, Foley WJ. 2014. Explaining intraspecific diversity in plant secondary metabolites in an ecological context. New Phytol 201:733-50.
56. Achakzai AKK, Achakzai P, Masood A, Kayani SA, Tareen RB. 2009. Response of plant parts and age on the distribution of secondary metabolites on plants found in Quetta. Pak J Bot 41:2129-2135.
57. Gransee A, Wittenmayer L. 2000. Qualitative and quantitative analysis of water - soluble root exudates in relation to plant species and development. Journal of plant nutrition and soil science 163:381-385.
58. Carella P, Wilson DC, Cameron RK. 2015. Some things get better with age: differences in salicylic acid accumulation and defense signaling in young and mature Arabidopsis. Frontiers in plant science 5:775.
59. Kus JV, Zaton K, Sarkar R, Cameron RK. 2002. Age-related resistance in Arabidopsis is a developmentally regulated defense response to Pseudomonas syringae. The Plant Cell 14:479-490.
60. Daniere C, Capellano A, Moiroud A. 1986. Dynamique de l'azote dans un peuplement naturel d'Alnus incana (L.) Moench. Acta oecologica Oecologia plantarum 7:165-175.

61. van Dijk C, Simmer A, Weber A. 1988. Host range differentiation of spore - positive and spore - negative strain types of Frankia in stands of Alnus glutinosa and Alnus incana in Finland. Physiologia Plantarum 72:349-358.
62. Houwers A, Akkermans A. 1981. Influence of inoculation on yield of Alnus glutinosa in the Netherlands. Plant and Soil 61:189-202.
63. Quispel A. 1990. Discoveries, discussions, and trends in research on actinorhizal root nodule symbioses before 1978. The biology of *Frankia* and actinorhizal plants:15-33.
64. Carro L, Pujic P, Alloisio N, Fournier P, Boubakri H, Hay AE, Poly F, François P, Hocher V, Mergaert P. 2015. Alnus peptides modify membrane porosity and induce the release of nitrogen-rich metabolites from nitrogen-fixing Frankia. The ISME journal.
65. Pozzi AC, Roy Me, Nagati Me, Schwob G, Manzi S, Gardes M, Moreau P-A, Fernandez MP. 2018. Patterns of diversity, endemism and specialization in the root symbiont communities of alder species on the island of Corsica. New Phytologist.
66. Hansen AH, Jonasson S, Michelsen A, Julkunen-Tiitto R. 2006. Long-term experimental warming, shading and nutrient addition affect the concentration of phenolic compounds in arctic-alpine deciduous and evergreen dwarf shrubs. Oecologia 147:1-11.
67. Baker DD. 1987. Relationships among pure cultured strains of Frankia based on host specificity. Physiologia Plantarum 70:245-248.
68. Normand P, Orso S, Cournoyer B, Jeannin P, Chapelon C, Dawson J, Evtushenko L, Misra AK. 1996. Molecular phylogeny of the genus Frankia and related genera and emendation of the family Frankiaceae. International journal of systematic bacteriology 46:1-9.
69. Dawson J. 2007. Ecology of actinorhizal plants, p 199-234. *In* Pawlowski K, Newton W (ed), Nitrogen-fixing actinorhizal symbioses. Springer Netherlands.
70. Chanway CP, Turkington R, Holl F. 1991. Ecological implications of specificity between plants and rhizosphere micro-organisms, p 121-169, Advances in ecological research, vol 21. Elsevier.
71. Weber A, Nurmiaho - Lassila EL, Sundman V. 1987. Features of the intrageneric Alnus - Frankia specificity. Physiologia Plantarum 70:289-296.
72. Samant SS, Dawson JO, Hahn D. 2015. Growth responses of indigenous Frankia populations to edaphic factors in actinorhizal rhizospheres. Syst Appl Microbiol 38:501-5.
73. Mirza BS, Welsh A, Rasul G, Rieder JP, Paschke MW, Hahn D. 2009. Variation in Frankia populations of the Elaeagnus host infection group in nodules of six host plant species after inoculation with soil. Microb Ecol 58:384-93.
74. Moora M, Berger S, Davison J, Öpik M, Bommarco R, Bruelheide H, Kühn I, Kunin WE, Metsis M, Rortais A. 2011. Alien plants associate with widespread generalist arbuscular mycorrhizal fungal taxa: evidence from a continental - scale study using massively parallel 454 sequencing. Journal of Biogeography 38:1305-1317.
75. Lafay B, Burdon JJ. 2006. Molecular diversity of rhizobia nodulating the invasive legume Cytisus scoparius in Australia. Journal of applied microbiology 100:1228-1238.
76. Parker MA, Malek W, Parker IM. 2006. Growth of an invasive legume is symbiont limited in newly occupied habitats. Diversity and Distributions 12:563-571.
77. Bogar LM, Dickie IA, Kennedy PG, Richardson DM. 2015. Testing the co-invasion hypothesis: ectomycorrhizal fungal communities on *Alnus glutinosa* and *Salix fragilis* in New Zealand. Diversity and Distributions 21:268-278.
78. Pringle A, Bever JD, Gardes M, Parrent JL, Rillig MC, Klironomos JN. 2009. Mycorrhizal symbioses and plant invasions. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics 40:699-715.
79. Anderson MD, Ruess RW, Myrold DD, Taylor DL. 2009. Host species and habitat affect nodulation by specific Frankia genotypes in two species of Alnus in interior Alaska. Oecologia 160:619-30.
80. Tekaya SB, Guerra T, Rodriguez D, Dawson JO, Hahn D. 2018. *Frankia* Diversity in Host Plant Root Nodules Is Independent of Abundance or Relative Diversity of *Frankia*

Populations in Corresponding Rhizosphere Soils. Applied and Environmental Microbiology 84:e02248-17.

-

Figures and tables

Figure 1. Histograms of Spore-positive percentages among indigenous host species nodules compared to trapping plant species nodules.

Percentages were calculated using the estimation of the binomial law. Error bars correspond to 95% confidence intervals. Black crosses indicate an absence of nodules on the plantlets. Panels correspond to the combinations of indigenous host species (*A. glutinosa*, *Ag*; *A. incana*, *Ai*; *A. viridis, Av*) and of Spore-positive (Sp+) or Spore-negative (Sp-) soils. Lowercase letters indicate results obtained by the binomial law test.

Table 1. Factorial plan and condition names

a, *In-planta* sporulation phenotype: Spore-positive (Sp+) and Spore-negative (Sp-).

b, Indigenous host species: *Alnus glutinosa* (*Ag*), *Alnus incana* (*Ai*), *Alnus viridis* (*Av*).

* For each condition, the 3 same trapping plant species (*Ag*, *Ai* and *Av*) were used.

Table 2. Average number of nodules per trapping plant and standard deviation, for each of plant-trapping assays.

Spore-positive (Sp+) and Spore-negative (Sp-) are the predominant types of *Frankia* strains observed in the field nodules from the 6 alder stand soils used for the trapping. Average values and standard deviations of the nodule numbers per plant are reported for each of the three trapping-species (*Alnus glutinosa, Ag*; *Alnus incana*, *Ai*; *Alnus viridis*, *Av)*.

Figure 2. Accumulation curves of *Frankia* (A) richness, (B) diversity (Shannon index) and (C) equitability (Simpson index), estimated from *pgk* sequences at unique sequence threshold.

Spore-positive, Sp+ (filled symbols) and Spore-negative, Sp- (empty symbols) *Frankia* from indigenous host plant (squares) or trapping plants (triangles). Interpolation (continuous line), extrapolation (dashed line).

Figure 3. Positions of trapped *Frankia* strains in the *pgk* phylogenetic tree of *Alnus*-infective (Cluster 1) *Frankia.*

The phylogeny was estimated by Maximum Likelihood (PhyML). Statistic support of the nodes was estimated by aLRT SH-like method. Clades were annoted according to Pozzi *et al.* (41) and gray zones correspond to the 2 new sub-clades identified in the present study. Sub-clades in black are those that contain *Frankia* strains from our trapping assays. The clades 1, 4 and 5 correspond to the OTU 1, 4 and 5 (at the 0.05 threshold) in the present study.

Figure 4. Effect of (A) the indigenous species and (B) the trapping species on *Frankia* community structure in soils and in the trapped nodules, illustrated by non-metric multidimensional scaling (NMDS).

NMDS were performed on *Frankia* OTU matrices computed from *nifH* sequences. Colors refer to the alder species, both on the field and in the trapping experiment. P-values (p) of permutational multivariate analysis of variance (adonis function) are given for both factors tested (A and B). Ellipses are graphical overviews.

Figure 5. Compatibility patterns between the plant trapping species and the (A) Spore-negative and (B) Spore-positive soils used in the assays.

The compatibility between the 3 trapping species (white) *Alnus glutinosa* (*Ag*), *Alnus incana* (*Ai*) and *Alnus viridis* (*Av*), and the 6 alder stand soils (grey square) differing in the indigenous host species (*Ag*, *Ai* or *Av*) is symbolized by a continuous line (presence of compatible strains and formation of mature nodules). The incompatibility is symbolized by a dotted gray line (impeded prenodules and no compatible strain trapped).

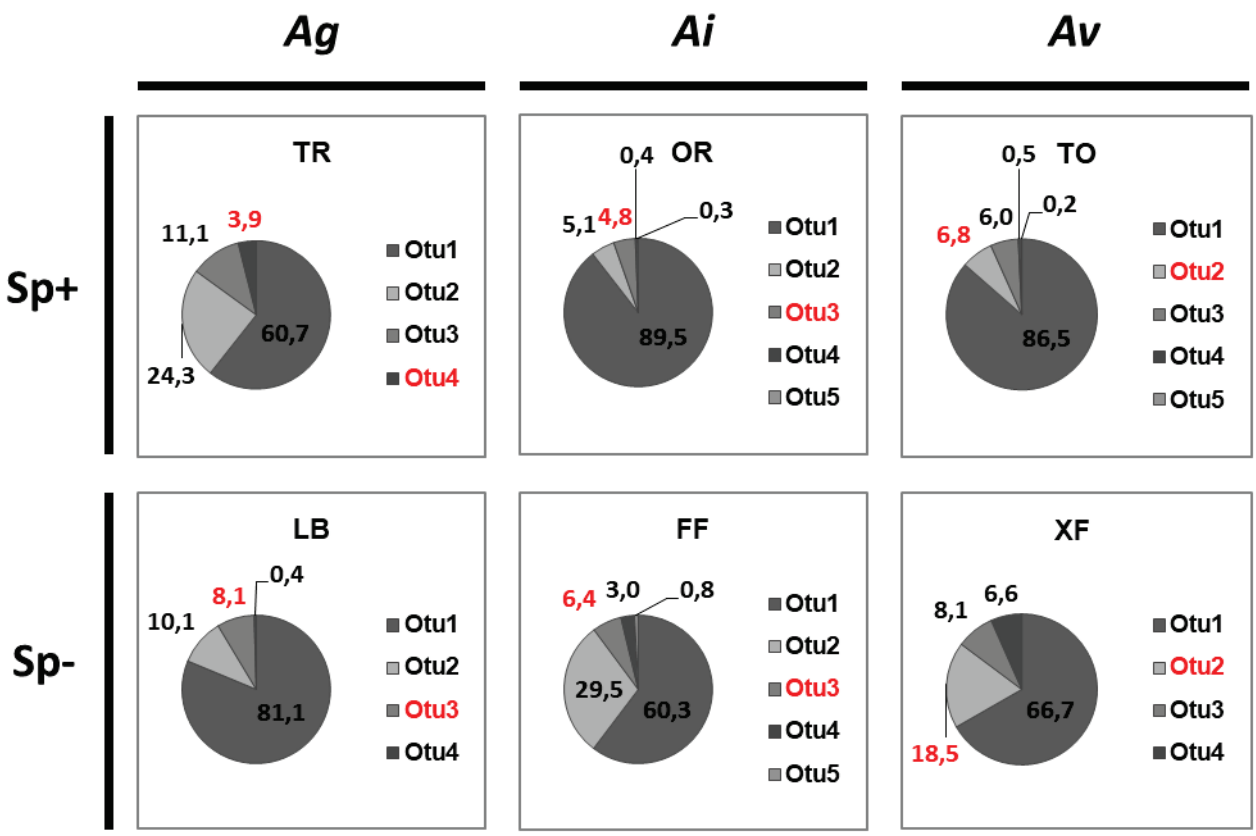
Supplementary data S1. *Frankia* OTUs composition of soils based on *nifH* metabarcoding approach.

In red : most represented OTU of *Frankia* in plant trapped nodules

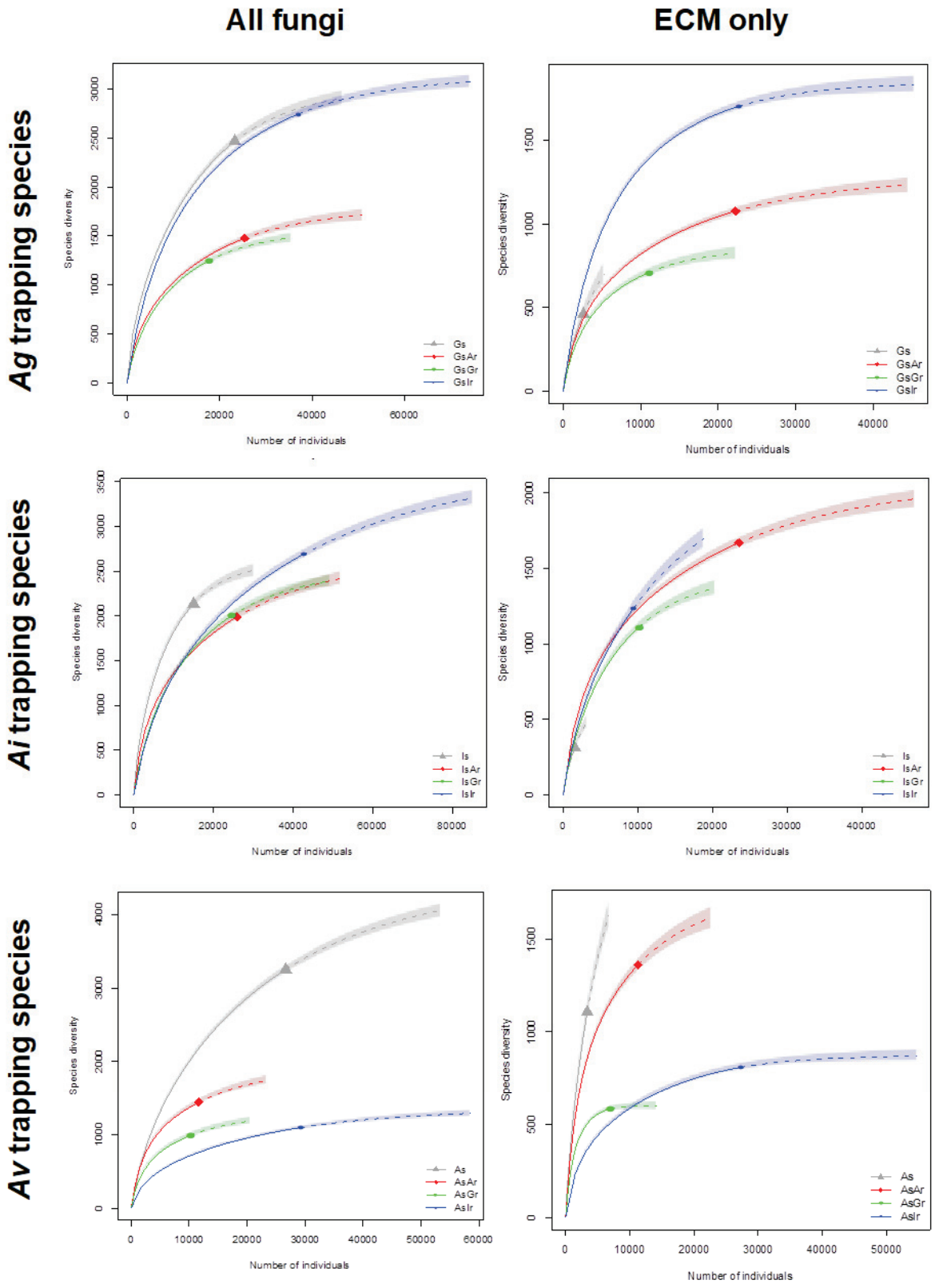
Supplementary data S2. ITS1 sequences assignment to ECM families.

Supplementary data S3. Accumulation curves of fungal (left) and ECM (right) species richness measured on plantlets (colored curves) compared to soil community (in grey), with extrapolation calculated from Hill numbers of richness (q=0). Each graph illustrates for a trapping host-species, the difference between the accumulation curves on its own soil or on other soils.

Supplementary data S4. Outputs of Anova and Permanova tests on all fungal and ectomycorrhizal diversity and community structures.



<u>Supplementary data S1</u>. *Frankia* OTU composition of soils based on *nifH* metabarcoding approach. In red : most highly represented OTUs of *Frankia* in plant trapped nodules



Supplementary data S3. Accumulation curves of fungal (left) and ECM (right) species richness measured on plantlets (colored curves) compared to soil community (in grey), with extrapolation calculated from Hill numbers of richness (q=0). Each graph illustrates, for each trapping host-species, the difference between the accumulation curve on its own soil and those on other soils.

Supplementary data S2. ITS1 sequences assignment to ECM families.

Family	number of OTUs	*Ag* soil	*Ai* soil	*Av* soil	*Ag* root	*Ai* root	*Av* root	Specificity toward *Alnus* sub.
Not_assigned_to_ecm	2003	20552	13260	23194	76489	89780	49194	Not investigated
Alnicola badia/umbrina	1	490	285	590	5864	1390	17	Cannot assess host specificity
Thelephoraceae sp.	65	1013	590	1526	2081	1945	1176	Not specific
Alnicola luteolofibrillosa	1	362	150	75	5480	1549	27	Cannot assess host specificity
AMF	102	276	586	212	374	289	61	Not specific
Russula sp.	4	0	0	467	88	111	69	Not specific
Alnicola subconspersa	1	154	0	0	151	307	1	*Alnus* subgenus
Boletales	7	243	128	110	52	52	26	Not specific
Cortinarius sp.	20	1	160	80	195	97	70	Not specific
Sebacinaceae	19	8	63	307	19	22	16	Not specific
Tarzetta sp.	2	1	0	0	91	136	78	Not specific
Alnicola sp.	1	250	0	0	1	2	3	Not specific
Lactarius lepidotus	1	0	0	180	0	0	0	*Alnobetula* subgenus
Ceratobasidiaceae	8	14	51	72	3	3	7	Not specific
Paxillus filamentosus	1	0	80	0	1	0	0	specific in experiment
Atheliaceae	3	8	4	32	3	3	4	not specific
Lactarius obscuratus	1	30	0	0	0	0	0	*Alnus* subgenus
Laccaria sp.	1	5	0	0	3	1	2	Not specific
Lactarius torminosus	1	0	0	7	0	0	0	Not specific
Alnicola longicystis	1	0	4	0	1	0	0	*Alnus* subgenus
Amanita sp.	1	2	0	0	1	1	0	Not specific
Tricholoma sp.	1	0	0	4	0	0	0	Not specific
Lactarius sp.	1	0	4	0	0	0	0	Not specific
Alnicola citrinella/pallidifolia	1	0	0	2	0	0	0	Cannot assess host specificity
Alnicola xanthophylla	1	0	0	0	0	2	0	*Alnus* subgenus
Lactarius brunneohepaticus	1	0	0	2	0	0	0	*Alnobetula* subgenus

Supplementary data S4. Outputs of Anova and Permanova tests on all fungal and ectomycorrhizal diversity and community structures.

Species diversity		Soil					Seedlings				
All fungi		**Df**	**Sum of Sq**	**Mean of Sq**	**F**	**Pr(>F)**	**Df**	**Sum of Sq**	**Mean of Sq**	**F**	**Pr(>F)**
	trapping host						2	149491	74746	2.937	0.0679
	sporulation	1	845867	845867	18.692	**0.00099**	1	2052	2052	0.081	0.7784
	indigenous host	2	321809	160905	3.556	0.06128	2	818351	409176	16.075	**1.62e-05**
	sporulation observed						3	34181	11394	0.351	0.789
	IH*SP (ecoregion)	2	459166	229583	5.073	0.02531					
	residuals	12	543028	45252			31	789063	25454		
ECM fungi	trapping host						2	259541	129771	5.159	**0.01164**
	sporulation	1	612	612	0.328	0.5771	1	3181	3181	0.126	0.72453
	indigenous host	2	108926	54463	29.207	**2.45e-05**	2	514178	257089	10.220	**0.00039**
	sporulation observed						3	81475	27158	0.897	0.45315
	IH*SP (ecoregion)	2	20289	10145	5.440	**0.0208**	2	241508	120754	4.800	**0.01527**
	residuals	12	22377	1865			31	779826	25156		

Community structure		Df	SumsOfSqs	MeanSqs	F. model	R2	Pr(>F)	Df	SumsOfSqs	MeanSqs	F. model	R2	Pr(>F)
All fungi	trapping host							2	1.4424	0.72120	2.5192	0.07203	**0.001**
	sporulation	1	0.9061	0.90609	3.8235	0.11970	**0.001**	1	1.3287	1.32869	4.6412	0.06635	**0.001**
	indigenous host	2	2.0702	1.03510	4.3679	0.27350	**0.001**	2	2.7458	1.37289	4.7956	0.13711	**0.001**
	sporulation observed							3	1.7634	0.58781	1.7755	0.08806	**0.001**
	IH*SP (ecoregion)	2	1.7494	0.87469	3.6910	0.23111	**0.001**	2	2.4521	1.22605	4.2826	0.12245	**0.001**
	residuals	12	2.8437	0.23698		0.37569		31	8.8748	0.28628		0.44317	
ECM fungi	trapping host							2	1.3518	0.67592	2.6271	0.06755	**0.001**
	sporulation	1	0.8636	0.86358	3.3566	0.11781	**0.001**	1	1.6266	1.62661	6.3222	0.08128	**0.001**
	indigenous host	2	1.9201	0.96005	3.7316	0.26195	**0.001**	2	3.0146	1.50728	5.8584	0.15064	**0.001**
	sporulation observed							3	1.9227	0.64089	2.1284	0.09608	**0.001**
	IH*SP (ecoregion)	2	1.4591	0.72956	2.8357	0.19906	**0.001**	2	2.8584	1.42918	5.5549	0.14284	**0.001**
	residuals	12	3.0873	0.25728		0.42118		31	7.9758	0.25728		0.39857	

CHAPITRE III : IMPLICATIONS ECOSYSTEMIQUES DU COMPLEXE SYMBIOTIQUE

Préambule

Les microorganismes procaryotes étant à la base des cycles biogéochimiques (carbone, azote) et en interaction constante avec les macroorganismes, ils jouent un rôle essentiel dans les écosystèmes terrestres et aquatiques (McGrady-Steed *et al.*, 1997; Bell *et al.*, 2005). Ainsi, la compréhension du fonctionnement d'un écosystème ne peut se faire sans prendre en considération la composante microbienne du sol. Nous avons vu dans la synthèse bibliographique que le complexe symbiotique *Alnus viridis* / *Frankia* connaissait une expansion notable dans les milieux sub-/alpins et boréaux de l'hémisphère nord, catalysée par le changement des pratiques agropastorales et le réchauffement global. Cette expansion a été décrite comme la cause de profondes modifications des milieux alpins en termes de paysage, de pédologie, de diversité animale et végétale et du cycle de l'azote (décrites dans la partie de synthèse bibliographique). Les enjeux peuvent même aller jusqu'à des questions d'ordre sanitaires par l'accumulation du nitrate dans les eaux de torrents ou de lacs d'altitude, ou encore économiques par la fermeture du milieu diminuant l'attrait touristique pour les zones envahies (Bühlmann *et al.*, 2014). L'aulne vert est considéré à ce titre comme une espèce clé de voûte de ces écosystèmes. Les effets sur la pédologie et le cycle de l'azote de l'expansion de l'aulne suggèrent une possible modification de la composante microbienne des sols.

Cependant, à ce jour, aucune étude ne s'est intéressée aux modifications de la composition des communautés microbiennes totales ou fonctionnelles, ni à la distribution ou la structure des communautés symbiotiques, dans les sols de prairie sub-/alpins, en réponse à la colonisation par l'aulne vert. Ces points font l'objet de la première partie de ce chapitre.

Un trait génétiquement déterminé qui a un effet important sur la fitness d'une espèce clé de voûte d'un écosystème peut avoir un impact important sur les communautés et sur l'écosystème tout entier (Whitham *et al.*, 2006). A ce titre, nous faisons l'hypothèse dans la seconde partie de ce chapitre que la sporulation *in planta* de *Frankia* pourrait avoir un impact plus ou moins direct sur le fonctionnement global de ces écosystèmes alpins, à travers son hôte, au niveau du cycle biogéochimique de l'azote et de la structure des communautés fonctionnelles associées. En effet, les souches de *Frankia* Sp+ sont suspectées d'avoir un rendement symbiotique moindre par rapport aux Sp-, de par le détournement d'une partie des ressources allouées par la plante pour la fixation, au profit de la sporogénèse (Normand and Lalonde, 1982; Schwintzer, 1990). Dans ce contexte, l'hypothèse est que les aulnaies vertes dites Sp+ (forte prédominance de nodosités Sp+) seraient associées à une entrée d'azote moindre dans l'écosystème par rapport aux aulnaies vertes dites Sp- (forte prédominance de nodosités Sp-), se traduisant par une moindre accumulation de nitrate dans les sols.

Les pertes d'azote par dénitrification seraient donc limitées ainsi que l'émission de gaz à effet de serre qui en résulterait (Figure III.1).

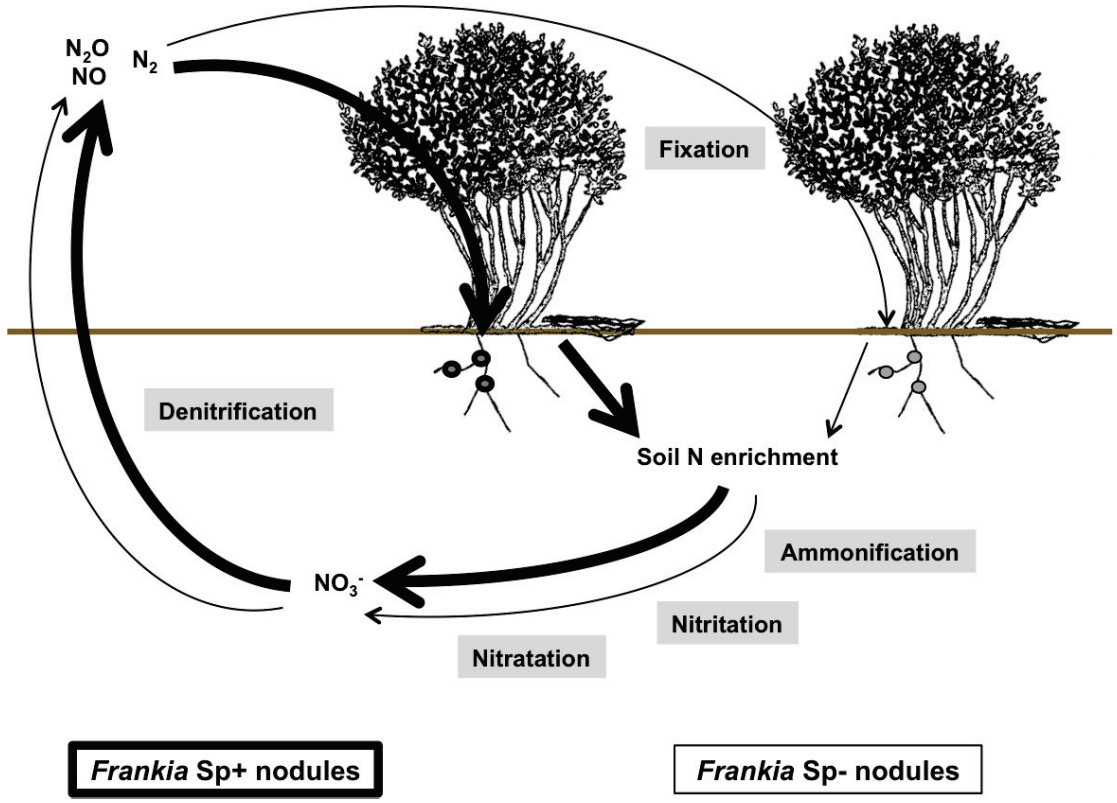


Figure III.1. Schéma conceptuel résumant l'hypothèse de travail de la deuxième partie du chapitre III. Les nodosités Sp- seraient responsables d'une entrée d'azote plus importante dans les écosystèmes à travers une litière plus riche en azote (trait épais) par rapport à l'entrée d'azote liée aux nodosités Sp+ (trait fin). Les processus du cycle de l'azote faisant suite à la décomposition de cette litière seraient ainsi plus importants dans le cas d'une aulnaie Sp-, conduisant à une émission plus forte de gaz à effet de serre dans l'atmosphère.

Ce chapitre est structuré en deux parties.

La première partie (Chapitre 3A) correspond à une étude financée par la région Rhône-Alpes (Communautés de Recherche Académique, ARC) et s'est focalisée sur 2 sites différents dans une aulnaie identifiée comme exclusivement Sp+, dans le parc national de la Vanoise (Savoie, France). Cette aulnaie est considérée comme l'une des plus étendues et des plus vieilles d'Europe (environ 400 ans d'après les archives locales). Dans cette partie, nous faisons l'hypothèse que les modifications des propriétés du sol en réponse à l'expansion progressive de l'aulne impactent les communautés globales bactériennes et fongiques en termes de composition et de structure, ainsi que les communautés bactériennes fonctionnelles responsables des processus du cycle de l'azote et leurs niveaux d'activité. Notre seconde hypothèse est que la distribution des symbiotes (*Frankia* et

champignons ectomycorhiziens) dans les sols est également impactée par l'expansion de leur hôte.

Après avoir confirmé le statut « Sp+ » de cette aulnaie, l'objectif a été donc de comparer les effets de la colonisation de l'aulne vert sur les prairies subalpines au niveau de (i) la composition microbienne globale, (ii) la distribution et la quantification des *Frankia* et des champignons ectomycorhiziens spécifiques de l'aulne, dans le sol et associés aux racines, et (iii) des modifications fonctionnelles du cycle de l'azote (nitrification, dénitrification). Pour répondre à cet objectif, trois stades de colonisation sont comparés, la prairie (absence de l'aulne), le stade mosaïque où la progression récente de l'aulne se manifeste par des arbres isolés ou de petits bosquets de quelques individus éparpillés dans la prairie, et la forêt dense où la couverture de l'aulne est totale et l'installation ancienne (Figure III.2). Des analyses phénotypiques et génotypiques de nodosités racinaires ont permis de déterminer la fréquence Sp+ de chaque stade de colonisation, ainsi que de l'aulnaie en général. Des analyses pédologiques, de méta-diversité microbiennes et des mesures d'activités potentielles de nitrification et dénitrification, ont été réalisées sur des échantillons de sols sub-/alpins prélevés le long d'un gradient de colonisation de l'aulne. Une approche de metabarcoding a été utilisée pour les analyses de méta-diversité. Au niveau fonctionnel, pour cette première étude, le focus a été mis sur les communautés oxydant l'ammonium (passage du NH_4^+ en NO_2^-) et sur les communautés fixatrices d'azote dont *Frankia* fait partie. Des mesures d'activités potentielles de nitrification et dénitrification ont été mesurées en parallèle.

Les résultats de ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans la revue *Environmental Microbiology* (Schwob *et al.* 2017).

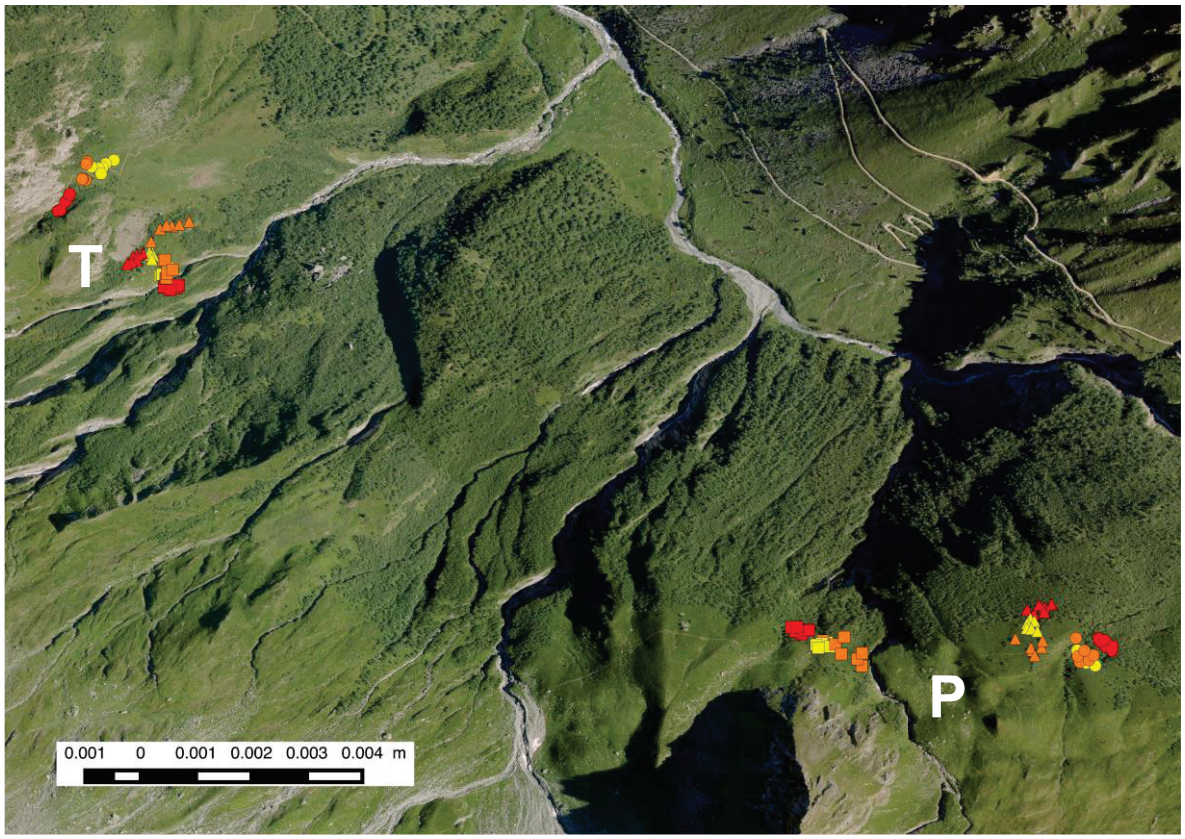


Figure III.2. Cartographie du plan d'échantillonnage réalisé dans l'aulnaie de Champagny-en-Vanoise.

2 sites différents ont été étudiés (Les Platières noté T et Plan du près noté P). 3 blocs expérimentaux ont été dessinés sur chaque site. Les carrés, les triangles, les ronds correspondent respectivement au numéro des blocs (1, 2 et 3). Les couleurs jaune, orange et rouge représentent respectivement les stades prairie, aulnaie mosaïque et aulnaie dense.

La seconde partie de ce chapitre (Chapitre 3B) correspond à une étude financée sur par le programme national interdisciplinaire du CNRS, Ecosphère Continentale et Côtière (EC2CO). Ce projet fait suite aux premiers résultats obtenus dans l'aulnaie en Vanoise. **Nous avons voulu savoir dans quelle mesure les patrons observés dans cette unique aulnaie Sp+ étaient reproductibles dans des aulnaies, localisées dans d'autres massifs des Alpes, et dans quelle mesure le phénotype de sporulation des souches de *Frankia* associées (Sp+ ou Sp-) pouvaient influencer ces patrons de fonctionnement de ces écosystèmes.** Pour répondre à cet objectif, 3 nouvelles aulnaies supplémentaires ont été échantillonnées selon un plan d'échantillonnage analogue à celui utilisée précédemment en Vanoise. Des analyses globalement similaires ont été effectuées en termes de pédologie, méta-diversité et mesures d'activités. Bien que les données de méta-diversité ont été obtenues, elles n'ont pu être analysées dans le cadre de cette thèse, d'où leur absence dans ce manuscrit.

Très peu d'aulnaies vertes ont été référencées comme présentant des souches Sp-

dans leurs nodosités et aucune comme exclusivement Sp-. Des échantillonnages exploratoires ont donc été réalisés au début de ce projet afin de trouver une aulnaie de préférence exclusivement Sp-.

Pour répondre au second objectif, nous nous sommes proposés de comparer les niveaux de fixation symbiotique d'azote *in situ* entre une aulnaie Sp+ et une aulnaie Sp- d'une part, et à travers un gradient d'occurrence de nodosités Sp+ au sein d'une même aulnaie d'autre part. De telles mesures *in natura* sont, à notre connaissance, inédites dans des aulnaies vertes des Alpes.

Ce projet étant encore en cours, les données (en particulier de métagénomique) sont toujours en cours d'acquisition et les premiers résultats n'ont pas encore fait l'objet d'une valorisation sous forme d'article. Ces résultats préliminaires seront présentés dans la deuxième partie de ce chapitre, en français, dans un format plus souple.

environmental microbiology

Environmental Microbiology (2017) **00**(00), 00–00 doi:10.1111/1462-2920.13818

Green alder (*Alnus viridis*) encroachment shapes microbial communities in subalpine soils and impacts its bacterial or fungal symbionts differently

G. Schwob,[1]* M. Roy,[2] S. Manzi,[2] T. Pommier[1] and M. P. Fernandez[1]

[1]*CNRS, UMR 5557, INRA, UMR 1418, Laboratoire d'Ecologie Microbienne, Université de Lyon, Université Lyon1, 43, Boulevard du 11 novembre 1918, Villeurbanne Cedex 69622, France.*

[2]*Laboratoire Evolution et Diversité Biologique, UMR 5174 UPS CNRS ENFA IRD, Toulouse, France.*

Summary

Since the mid-twentieth century, subalpine grasslands undergo a progressive encroachment by *Alnus viridis* shrubs. Thanks to its rapid vegetative reproduction, its nitrogen fixing symbiosis with *Frankia* and its ectomycorrhizal cohorts, green alders are vigorous colonizers that quickly form mosaic of alder patches that evolves into a close canopy shrub community. To better understand how alder encroachment might influence microbial communities in this successional sequence, symbiont distribution, microbial richness and community structure in both soils and nodules were analyzed at three successional stages: grassland, mosaic and forest. Soil analyses were performed in association with measures of nitrification and denitrification, as well as DNA metabarcoding of three bacterial genes (*16S rDNA*, *nifH* and *amoA*) and one fungal gene (ITS1). Our results show that (i) *A. viridis* encroachment is associated with soil microbial community changes that are in turn, linked to certain soil properties (i.e., pH, C/N ratio and organic matter content), (ii) both taxonomic and N related functional gene structures of bacteria are modified by alder encroachment and (iii) the distribution in soils of its bacterial symbionts (*Frankia*) is apparently weakly influenced by alder establishment while *Alnus*-specific ectomyccorrhizae increase with the increase in alder shrub density.

Received 12 January, 2017; revised 1 June, 2017; accepted 6 June, 2017. *For correspondence. E-mail guillaume_schwob@hotmail.fr; Tel. (+33) 472 448 506; Fax (+33) 426 234 468.

© 2017 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd

Introduction

Loss of species diversity is a major driver of ecosystem changes. This loss of critical biodiversity could increase ecosystem degradation as global change, and its indirect consequences such as nutrient pollution, acidification or elevation of CO_2 levels, accelerates (Didham *et al.*, 2005; Hooper *et al.*, 2012). Subalpine and alpine belts are considered to be plant biodiversity hotspots (Lomolino, 2001; Körner, 2003). Global alpine plant diversity is estimated to be 8000–10,000 species including 600–650 endemic species in the European Alps, representing about 1/3 of the European flora (Kräuchi *et al.*, 2000; Körner, 2012). However, this diversity is threatened by global warming that reduces favorable habitats area (Theurillat and Guisan, 2001; Körner, 2003; Orsenigo *et al.*, 2014) and favors invasive behaviors of some non-native plant species and range expansion of some native plant species (Diez *et al.*, 2012; Alexander *et al.*, 2016).

The green alder, *Alnus viridis* (AV), is an early successional species that grows frequently at the alpine treeline in the northern hemisphere (> 2000 m) and at high latitude areas, harboring growth rates about two to three times greater than other woody species (Bühlmann *et al.*, 2014). In the European Alps, the decline of agropastoralism in recent decades has led to the abandonment of remote pastures and initiated a shift in vegetation composition. On these open fields with reduced pastoral pressure and poor soils, AV outcompetes other tree species and leads to a substantial increase in alder colonization at and above the recent treeline (Bühlmann *et al.*, 2014). In the Swiss Central Alps, green alder colonization was shown to increase by 56% from 1986 to 2005 (Hiltbrunner *et al.*, 2014). AV expansion has also been described for various cold biomes in Alaska, Siberia and NW Canada (Anthelme *et al.*, 2003; Beck *et al.*, 2011; Frost and Epstein, 2014). As a pioneer species in many ecological contexts, alder is typically transitional and paves the way to other tree species in successional processes (Chapin *et al.*, 1994; Fastie, 1995). However, in the Alps, alder stand is often not temporary and may persist for centuries (Hiltbrunner *et al.*, 2014). Indeed, due to the long residence time of N in soils at such elevation, the dense and lush herbfield (so-called

'megaphorbia') beneath alder is believed to persist inhibiting other tree seedlings (Anthelme *et al.*, 2003; Bühlmann *et al.*, 2014).

Green alder plays a pivotal role in ecosystem functioning. Indeed, impenetrable AV thickets provide massive N input in soil (Bühlmann *et al.*, 2016) linked to (i) consequent nitrate leaching and pollution of streamlets and groundwater (Bühlmann *et al.*, 2014), (ii) greenhouse gas emissions (N_2O, NO) (Hiltbrunner *et al.*, 2014), (iii) soil acidification (Podrázský and Ulbrichova, 2003; Caviezel *et al.*, 2014) and (iv) diminution of C/N ratio which are supposed to diminish N mineralization and N_2 fixation rates (Hiltbrunner *et al.*, 2014).

While the impact of AV encroachment on aboveground plant and animal diversity in the European Alps is well documented (Anthelme *et al.*, 2001; Anthelme *et al.*, 2003), there are currently no data available to help explain the effects of AV on belowground diversity and functioning in these subalpine ecosystems.

Besides its clonal growth via stolons, green alder expansion in harsh environments is enhanced by its capacity to establish tripartite symbiosis with the N_2-fixing actinobacteria *Frankia*, (Dawson, 2007) and *Alnus*-specific ectomycorrhizal fungi (EM) (Chatarpaul *et al.*, 1989). The distribution of symbiotic microbes remains difficult to investigate in soils and has more frequently been investigated on root nodules endophytes, confirming that host presence had a major effect on symbionts community structure and distribution (Higgins and Kennedy, 2012). Some studies have concluded that host species does not determine overall *Frankia* abundance in soil (Samant *et al.*, 2016), while other studies suggest that specific *Frankia* can be more abundant in soil where their host-plant was present (Jeong and Myrold, 2001). These studies suggest that there is variable host dependency of symbiotic *Frankia* strains. Moreover, the capacity of *Frankiae* to disperse and survive in soils could depend on its capacity to sporulate (Cotin-Galvan *et al.*, 2015). Two phenotypes of *Frankia* strains are distinguished based on the ability to form abundant spores in root-nodule cells: spore-positive (Sp+) which are likely obligate symbionts and spore-negative (Sp–) more adapted to saprophytic life. The high occurrence of Sp+ *Frankia* strains in alpine AV stands has led to the hypothesis that Sp+ phenotype could be an adaptation to extreme environments (Kurdali *et al.*, 1989; Pozzi *et al.*, 2015). With respect to EM, about 2/3 of EM fungi associated with alder roots are specific to *Alnus* genus (Roy *et al.*, 2013), and their distribution may be tightly linked to their host. However, AV still associate with generalist fungi, and this ability may favor its rapid expansion (Bogar *et al.*, 2015). Several studies have suggested that aboveground–belowground relationships are stronger for fungi compared to bacteria because the latter are supposed less dependent for survival on the plant hosts (Gao *et al.*, 2013; Prober *et al.*, 2015). However, the case of symbiotic bacteria highly dependent on their host such as Sp+ *Frankia* strains has not been investigated (Pozzi *et al.*, 2015; Cotin-Galvan *et al.*, 2015).

We studied changes in (i) total soil microbial diversity (ii) *Frankia* and EM fungi diversity and abundance including *Frankia* sporulation phenotype and (iii) functional modifications of N cycle, associated with AV cover. Three colonization stages – grassland, patchy mosaic and forest – were studied at a local scale in the largest and one of the oldest AV stands of the French Alps. The two sites studied differed by their recent history and anthropization. We hypothesized that (i) alder encroachment, which causes a decrease of aboveground diversity, is associated with a decrease in belowground diversity, (ii) with their high dependency on host plant presence, *Frankia* and EM fungi (particularly specialist mycorrhizal fungi) diversity is correlated with alder density and (iii) the nitrogen input resulting from AV root and litter turnover nitrification and denitrification processes. Microbial diversity was assessed using high-throughput sequencing on three bacterial genes and one fungal gene, and nitrification and denitrification were estimated using mesocosm enzyme assays.

Results

Sites and soil properties

The two sites studied, labelled P and T, were less than 1 km distant with site P closer to the village and subject to higher anthropic pressure, and site T in the core of Vanoise National Park (Fig 1). Soil analyses are reported in Table 1. Compared to site P, site T had higher values of C/N ratios ($F = 30.8$, $p = 4.4 \times 10^{-5}$), total carbon (Ctot) ($F = 13.6$, $p = 2.0 \times 10^{-3}$) and soil organic matter (OM) ($F = 23.7$, $p = 2.0 \times 10^{-4}$). All pH values were more alkaline at site P ($F = 46.6$, $p = 4.1^{e} - 6$). Total nitrogen (Ntot) content was marginally higher at site T than at site P ($F = 3.14$, $p < 0.09$). Inorganic nitrogen (Nin) and inorganic carbon (Cin) content were not significantly different between the two sites (respectively, $p = 0.2$ and $p = 0.9$).

Although marginally significant (Permanova; $p = 0.076$), the PCA based on soil properties of site T suggested statistical variation among the three successional stages along axes 1 (45.8%) and 2 (24.5%), associated mostly with C/N ratio and pH variation (data not shown). Forest and grassland soils were the most different with the lowest values of C/N ratio and pH occurring in soils at the forest stage and the highest values in soils at the grassland stage (Table 1) (respectively $F = 19.7$, $p = 0.004$ and $p = 0.002$, $F = 16,0$). No soil structuration features were observed at site P among the three colonization stages ($p = 0.1$).

© 2017 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd,

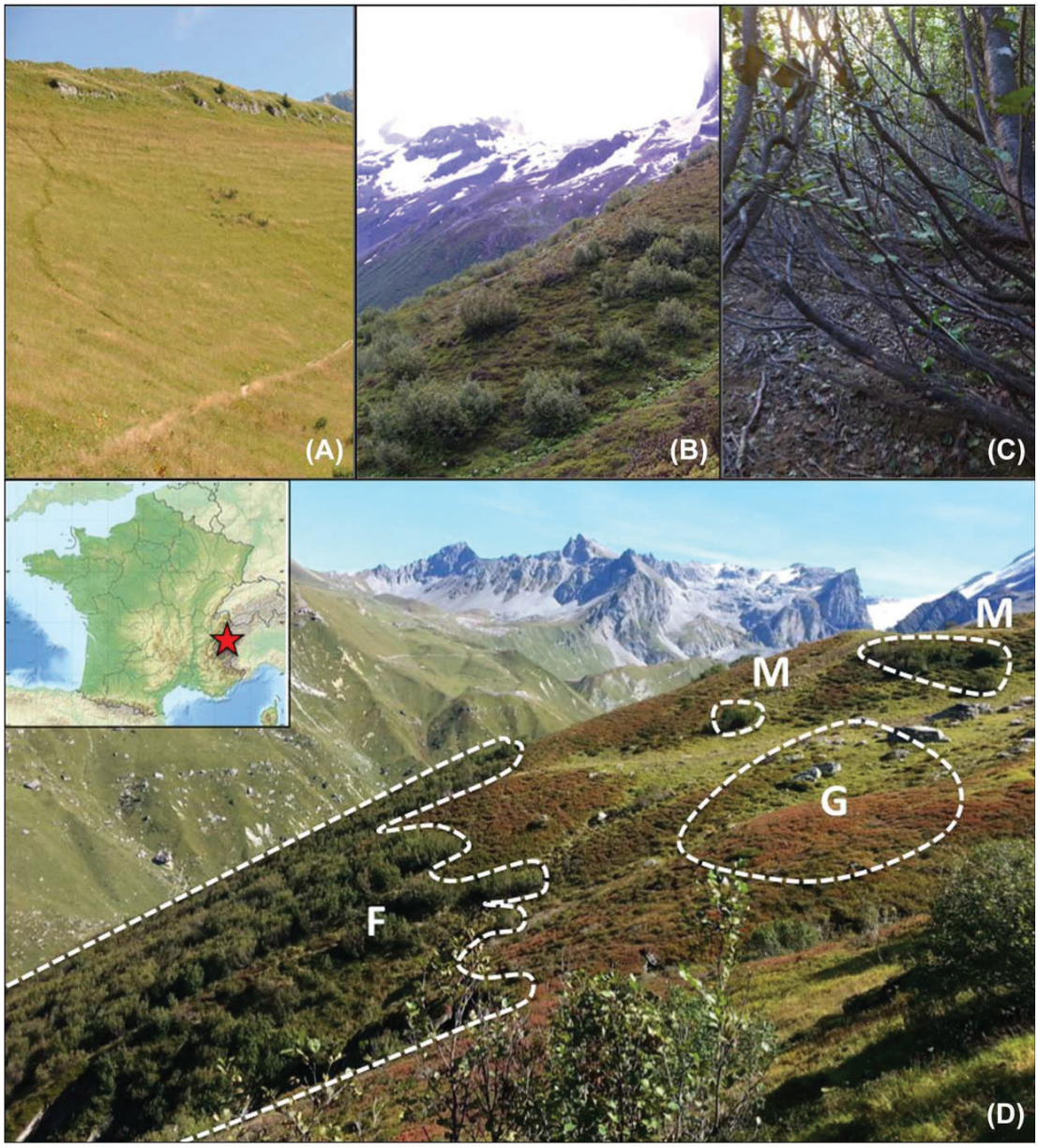


Fig. 1. Topology of the sites: (A) grassland stage (meadow with alpine herbaceous plants and grasses with no alder), (B) mosaic stage (patchy green alder interspaced by alpine grassland), (C) underbrush of a forest stage (dense alder stand) and (D) overview of the three successional stages of alder expansion. F, forest stage; M, mosaic stage; G, grassland stage; the red star marks the location in France of the Vanoise national park.

Richness, diversity and composition of bacterial communities

Total and functional bacterial communities were evaluated in soils and nodules by metabarcoding. Three genetic markers were used to target global (*16S rDNA*) or N cycle functional communities (*amoA* and *nifH*).

From the total of 923,048 reads obtained, 266,002 *16S rDNA*, 91,458 *amoA* and 484,104 *nifH* reads were considered to be of good quality, respectively with average of 11,342, 3827 and 15,571 reads per sample. Sequences clustered at 97% similarity (Pester *et al.*, 2012) into 4499 soil and 418 nodule *16S rDNA* OTUs, 4180 soil *amoA* OTUs and 1166 soil and 80 nodule *nifH* OTUs. The

© 2017 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd,

Table 1. Soil characteristics.

Site	Stage	pH	OM (%)	Ntot (%)	Ctot (%)	C/N	Nin (%)	Cin (%)
P	Forest	5.08 ± 0.24	13.4 ± 1.48	0.38 ± 0.08	4.80 ± 1.05	12.7 ± 0.25	0.00 ± 0.00	0.03 ± 0.02
	Mosaic	6.05 ± 0.43	13.7 ± 0.86	0.52 ± 0.12	6.19 ± 1.32	1l.9 ± 1.00	0.00 ± 0.00	0.07 ± 0.06
	Grassland	6.35 ± 0.18	17.2 ± 2.42	0.52 ± 0.05	6.92 ± 0.92	13.3 ± 0.40	0.01 ± 0.01	0.09 ± 0.02
T	Forest	3.57 ± 0.06	24.2 ± 0.70	0.70 ± 0.08	9.71 ± 1.06	14.83 ± 0.88	0.01 ± 0.01	0.06 ± 0.01
	Mosaic	4.18 ± 0.16	19.11 ± 3.82	0.59 ± 0.22	9.60 ± 3.67	16.07 ± 0.29	0.00 ± 0.00	0.03 ± 0.01
	Grassland	4.36 ± 0.12	23.92 ± 1.31	0.56 ± 0.04	10.49 ± 0.55	18.70 ± 0.49	0.02 ± 0.00	0.07 ± 0.03

Average values and standard deviations of pH, organic matter content (OM), total nitrogen content (Ntot), total carbon content (Ctot), carbon/nitrogen ratio (C/N), total inorganic nitrogen content (Nin) and total inorganic carbon content (Cin).

rarefaction curves of single soil and nodule samples did not reach saturation (data not shown). In contrast, saturation was almost reached when the three samples coming from a same site and the same successional stage were pooled (Supporting information 1).

Richness and diversity (Shannon and Simpson indexes) on *16S rDNA* sequences were significantly higher at site P than at site T (Table 3, ANOVA, respectively $p = 1.31 \times 10^{-8}$, $p = 1.69 \times 10^{-5}$ and $p = 4.44 \times 10^{-8}$), and as expected, significantly higher in soil than in nodules on *16S rDNA* sequences (Table 2, ANOVA, $p < 3.10^{-6}$) and *nifH* (ANOVA, $p < 2.10^{-14}$).

Whatever the marker, no difference in bacterial richness and diversity was observed between successional stages at site P (Table 3). At site T, only *amoA* sequences showed differences in diversity according to the successional stage (Table 3).

OTU composition at a 0.03 dissimilarity threshold was compared between successional stages using Non-metric Multi-Dimensional Scaling (NMDS) and Heatmap representations. The two sites harbored significantly different bacterial community structures on each of the three genes used (*16S rDNA*, PERMANOVA, $F = 13.07$, $R^2 = 0.48$, $p = 0.001$; *amoA*, PERMANOVA, $F = 5.13$, $R^2 = 0.21$, $p = 0.001$; *nifH*, PERMANOVA, $F = 7.35$, $R^2 = 0.29$, $p = 0.001$, confirmed by post hoc tests on NMDS axis, Table S7) (Figs 2 and 3), while community structures among the three blocks of a same site were not significantly different (*16S rDNA*, PERMANOVA, $F = 3.06$, $R^2 = 0.63$, $p = 0.81$; *amoA*, PERMANOVA, $F = 1.32$, $R^2 = 0.36$, $p = 0.92$; *nifH*, PERMANOVA, $F = 1.88$, $R^2 = 0.44$, $p = 0.89$).

Whatever the marker, pH (envfit test, $p = 0.001$), C/N ratio (envfit test, $p < 0.007$) and OM content (envfit test, $p < 0.01$) were the three main pedological factors explaining the difference between the two sites.

Only site T harbored specific bacterial community structures on *16S rDNA* (PERMANOVA, $F = 1.8$, $R^2 = 0.42$, $p = 0.005$), *amoA* (PERMANOVA, $F = 5.13$, $R^2 = 0.21$, $p = 0.003$) and *nifH* genes (PERMANOVA, $F = 2.16$, $R^2 = 0.42$, $p = 0.007$) (Fig. 4). Post hoc tests on NMDS axis confirmed that mosaic and forest stages on one hand, and forest and grassland stages on the other harbored significantly different bacterial community structures (*16S rDNA* and *nifH*, post hoc tests, Table S7) while mosaic and grassland ones were similar (*16S rDNA* and *nifH*, post hoc tests, Table S7). Shifts in functional bacterial community structures (i.e., ammonia oxidizers and N_2 fixers) were reflected by changes in dominant OTUs as illustrated in the heatmaps (Fig. 2). Whatever the genetic marker considered, site P communities were evidently not shaped by the successional stages (PERMANOVA, $F = 0.97$, $R^2 = 0.24$, $p = 0.5$).

Diversity and composition of fungal communities

The ITS1 run produced 178,057 sequences that belonged to 16,266 distinct sequences and clustered in 2824 OTUs. Richness was significantly higher in soil than in root (Table 2, ANOVA, $p = 6.78 \times 10^{-5}$) and roots and soil had very distinct communities (PERMANOVA, $F = 4.7$, $R^2 = 0.12$, $p = 0.001$, confirmed by post hoc tests on NMDS axis, Table S7). Only site P harbored differences in richness and Shannon index of soil fungi according to the successional stage (Table 3, respectively, ANOVA, $p = 0.001$ and $p = 0.02$). Fungal community compositions were significantly different between the two sites and among the successional stages (ITS1, PERMANOVA, $p < 0.01$ in all cases confirmed by post hoc tests on NMDS axis, Table S7) (Fig. 3). On both sites, fungal communities from mosaic and forest stages were similar (ITS1, post hoc tests, Table S7), and grassland and mosaic were always statistically different (post hoc test, Table S7). As for bacteria, pH (envfit test, $p < 0.005$), C/N ratio (envfit test, $p = 0.001$) and OM content

Table 2. Alpha microbial diversity in soil, nodule and root samples.

Gene	Sample	Richness	Shannon index	Simpson index
16S rDNA	soil	503.2 ± 23	5.8 ± 0.08	0.99 ± 0.001
	nodule	56.5 ± 4.55	1.5 ± 0.07	0.62 ± 0.02
nifH	soil	263.4 ± 12.6	4.5 ± 0.11	0.97 ± 0.005
	nodule	22.6 ± 2.04	0.3 ± 0.05	0.09 ± 0.02
ITS1	soil	1398.4 ± 78.3	5.43 ± 0.1	0.98 ± 0.004
	root	905.7 ± 91.9	5.64 ± 0.2	0.98 ± 0.003

Average values and standard deviations for each type of sample are shown.

© 2017 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd,

Table 3. Alpha diversity of soil samples.

Site	Gene	Richness			Shannon index			Simpson index		
		Grassland	Mosaic	Forest	Grassland	Mosaic	Forest	Grassland	Mosaic	Forest
P	*16S rDNA*	580.70 ± 25.50	590.70 ± 10.50	604.70 ± 32.70	6.00 ± 0.11	6.04 ± 0.04	6.13 ± 0.08	0.99 ± 0.00	0.99 ± 0.00	0.99 ± 0.00
	amoA	183.33 ± 153.70	434.67 ± 228.72	609.33 ± 269.08	3.98 ± 0.62	4.20 ± 0.43	4.75 ± 0.41	0.95 ± 0.02	0.94 ± 0.01	0.96 ± 0.01
	nifH	256.00 ± 46.52	289.67 ± 34.61	308.00 ± 24.66	4.67 ± 0.24	4.85 ± 0.26	4.82 ± 0.26	0.98 ± 0.00	0.98 ± 0.00	0.98 ± 0.00
	ITS1	959.70 ± 68.00	1319.30 ± 32.60	1557.00 ± 106.10	5.10 ± 0.17	5.40 ± 0.31	6.10 ± 0.07	0.97 ± 0.00	0.97 ± 0.02	0.99 ± 0.00
T	*16S rDNA*	437.33 ± 17.62	425.67 ± 50.52	380.00 ± 22.52	5.55 ± 0.03	5.49 ± 0.20	5.38 ± 0.11	0.99 ± 0.00	0.99 ± 0.00	0.99 ± 0.00
	amoA	789.00 ± 697.51	327.33 ± 129.97	934.33 ± 172.96	2.47 ± 0.73	4.33 ± 0.47	4.10 ± 0.08	0.71 ± 0.13	0.94 ± 0.02	0.88 ± 0.02
	nifH	225.00 ± 21.12	291.33 ± 28.78	210.67 ± 32.87	4.03 ± 0.29	4.79 ± 0.20	4.12 ± 0.27	0.94 ± 0.02	0.98 ± 0.00	0.95 ± 0.02
	ITS1	1360.30 ± 146.2	1614.30 ± 330.7	1580.00 ± 305.10	5.05 ± 0.28	5.53 ± 0.12	5.45 ± 0.14	0.97 ± 0.01	0.98 ± 0.00	0.98 ± 0.00

Average values and standard deviations of each alder successional stage for the study sites are shown.

(envfit test, $p < 0.05$) might be causative factors for community structure differences.

Comparison with the UNITE database permitted us to assign more sequences to EM taxa than Genbank (5369 distinct sequences assigned to EM fungi *vs.* 3701 with Genbank) and identify 195 EM OTUs. Sequences were not long enough to allow species-level identifications. For example *Lactarius* specifically associated with alders were not distinct from other *Lactarius* sequences. Overall, EM fungi represented 8.5% of reads among soil samples and 73% among root sequences (Supporting information 6). Clustering permitted us to group these sequences into 194 OTUs, which is extremely low for a metabarcoding dataset but may well represent the low diversity of alder EM fungi communities. Compared to previous studies on alders, most lineages were detected, especially *Thelephoraceae* and *Alnicola* genus, but the *Alpova* genus was still particularly rare (Supporting information 2).

Compared to the total fungal community, EM species richness was apparently again not influenced by the site (ANOVA, $p = 0.08$) but rather influenced by the source of the soil sample (soil *vs.* roots, ANOVA, $p = 0.001$) and by the successional stage (ANOVA, $p = 0.0001$). EM communities obtained from root samples were richer in the forest than in the intermediate mosaic successional stage, but this trend was not confirmed in bulk soil samples, and only grassland communities were poorer in EM species which only occur on woody plants (Table S7). Communities were not different between sites, and rather distinct between roots and soil, and between successional stages (ITS1 EM, PERMANOVA confirmed by post hoc tests, Table S7). Forest stages of the two sites were similar and so were mosaic stages (post hoc tests, Table S7). Again, differences between mosaic and grassland stages were significant, at both sites (post hoc tests, Table S7). Such differences in community structure are correlated with changes in *Alnicola* and *Russulaceae* distribution (envfit test, $p < 0.01$, Fig. 3 and Supporting information 2).

Soil N functioning and link between symbionts and host

Enzyme activities. Nitrification enzyme assay (NEA) and denitrification enzyme assay (DEA) were performed on soil samples. No matter the stage, NEA activity was about 3.5× higher at site P than at site T (Kruskal–Wallis, $p = 0.02$). Nitrification was significantly correlated with ecological plant succession at site T, with higher levels for soils of the forest compared with mosaic and grassland stages, but not at site P (Kruskal–Wallis, $p = 0.027$ and $p = 0.25$, respectively) (Supporting information 3). Soil pH values and nitrification activity levels were significantly correlated at site T ($R^2 = 0.80$, $p < 0.0008$). The more acidic the soil, the

© 2017 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd,

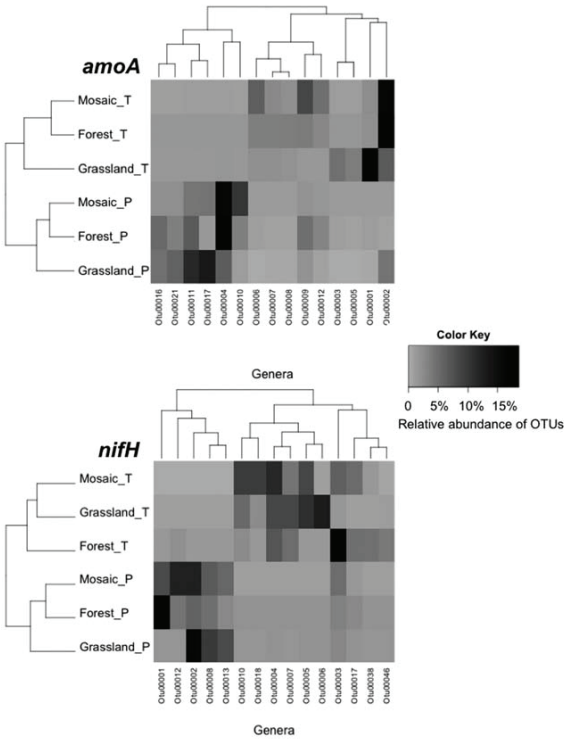


Fig. 2. Heatmaps of the first 15 most abundant OTUs obtained from *amoA* and *nifH* sequences at 3% threshold cutoff in the three successional stages of the two sites.

lower the nitrification activity was. Denitrification activities did not vary significantly between sites and among successional stages (Kruskal–Wallis, $p = 0.2$ and $p = 0.28$, respectively) (Supporting information 3).

Symbionts detection and quantification. When targeting *16S rDNA* genes, sequences belonging to *Frankia* were detected in soils under all three successional stages of the two sites but not in every sample (no detection in 6 out of 18 soil samples, regardless of the ecological stage of succession and the number of sequences). The total number of sequences was positively correlated with the number of sequences showing similarity with *Frankia* spp. (data not shown, $R^2 = 0.75$, $p = 3.1 \times 10^{-6}$). When targeting *nifH* genes, sequences with similarity to *Frankia* spp. were detected in 17 out of 18 soil samples of the three successional stages. No correlation was observed between the total numbers of *nifH* sequences and *Frankia* sequences (data not shown).

Semiquantitative analysis based on the number of *16S rDNA* or *nifH* reads from metabarcoding data did not reveal any site or stage effect on *Frankia* abundances (ANOVA1, $p = 0.27$ and $p = 0.08$, respectively); and as expected, *Frankia 16S rDNA* and *nifH* sequences were 100 times more abundant in nodules than soil samples (Supporting information 6). Rarefaction curves of *Frankia* OTUs reached saturation in soil with four OTUs, and nodule samples with three OTUs, at 305 *nifH* sequences analysed (data not shown). Among these four OTUs, three were present in soil and nodules, one was present only in soil. Diversity of *Frankia* was significantly higher in soil than in nodule (ANOVA1, $p = 0.005$) but did not vary according to the alder successional stage (ANOVA1, $p = 0.5$).

Using the absolute quantification with a qPCR approach, *Frankia nifH* copy numbers were significantly different between soil samples from the two sites (ANOVA, $F = 7.5$, p-value < 0.02), with a higher density of copy at site T than at site P (Supporting information 5a). No statistically significant difference was observed between the successional stages at site P (ANOVA, $F = 1.92$, p-value $= 0.23$, data not shown). *Frankia nifH* copy numbers varied significantly for site T among grassland, mosaic and forest successional stages (ANOVA, $F = 22.0$, p-value < 0.002, Supporting information 5).

Frankia *in planta sporulation.* No matter the site or the successional stage (forest and mosaic), every phenotyped nodule harbored highly clonal Sp+ strains that belonged to the clade 1a previously described to be comprised of exclusively Sp+ *Frankia* strains associated with *A. viridis* hosts and its subspecies (Pozzi *et al.*, 2015).

Discussion

Soils properties and site effect

Different sites with the same vegetation cover tend to harbor similar soil characteristics and convergent microbial properties (Steinauer *et al.*, 2016), and alder establishment is associated with soil acidification and C/N ratio diminution (Bühlmann *et al.*, 2014; Hiltbrunner *et al.*, 2014; Bühlmann *et al.*, 2016). Being geographically close (< 1 km) on the same geological substrate, and undergoing the same ecological succession process, the two sites studied were expected to be similar with respect to their overall physical and chemical characteristics. Within a site, no heterogeneity was found (no block effect). However, the two sites differed in their soil characteristics and AV presence was not a strong predictor of the differences observed. The stronger site effect might be explained by differences in elevation and in *Alnus* stand age linked to recent history/anthropization. Site T being located 200 m higher than site P, has a cooler annual mean temperature of 1.2°C. At local scale, soil temperature is one of the most important drivers of soil dynamics and properties, lower temperatures being associated with slower rates of soil organic matter mineralization and nitrification. Consequently, organic carbon and nitrogen may accumulate (Zhou *et al.*, 2014), as

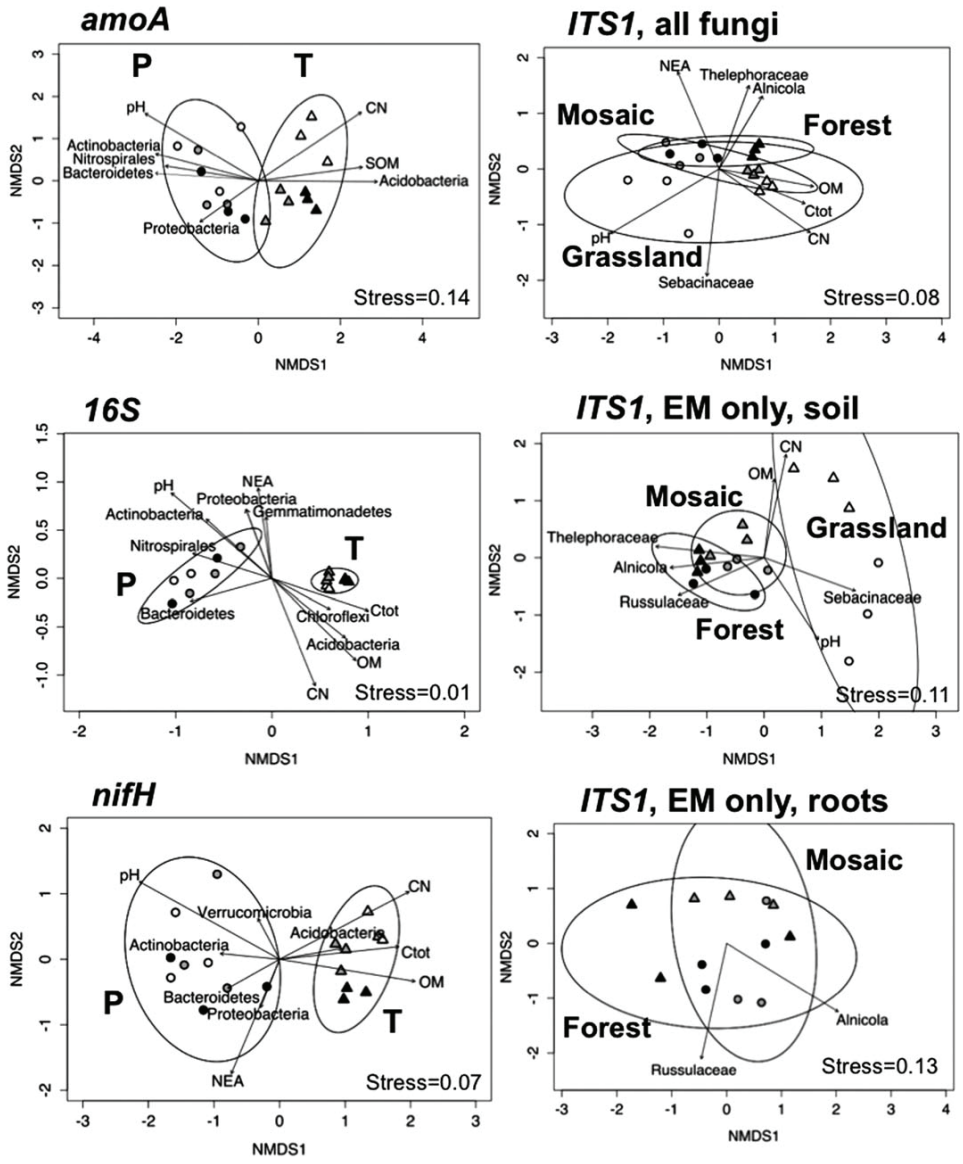


Fig. 3. Nonmetric multidimensional scaling of microbial communities structures based on OTU matrix computed from bacterial (*amoA*, *16S*, and *nifH*) and fungal (ITS1) sequences. Circles and triangles correspond respectively to site P and site T. Black, grey and white plots correspond respectively to forest, mosaic and grassland successional stages. Black arrows represent environmental factors and taxonomic group variations significantly correlated with communities' structure distribution.

observed at site T where OM content was almost double and C/N ratio four points higher than in site P. Due to its multistemmed trunk and its clonal reproduction via stolons, evaluation of AV individual age by dendrography is irrelevant (Wiedmer and Senn-Irlet, 2006) but regional archives estimated the age of the alder stand to be about 400 years. However, site P being closer to the village (about 1 km), and more accessible than site T, was subject to higher anthropic pressure including wood cut for heat, grazing and mowing according to local residents and observations. As expected, the less disturbed site (T) accumulated globally more litter and had the higher OM content. It also had lower soil pH (Caviezel *et al.*, 2014). We can hypothesize that overall soil physical and chemical differences might be due to the age ecological history and agropastoral history. These factors may obscure the differences we assigned to current alder successional stages.

© 2017 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd,

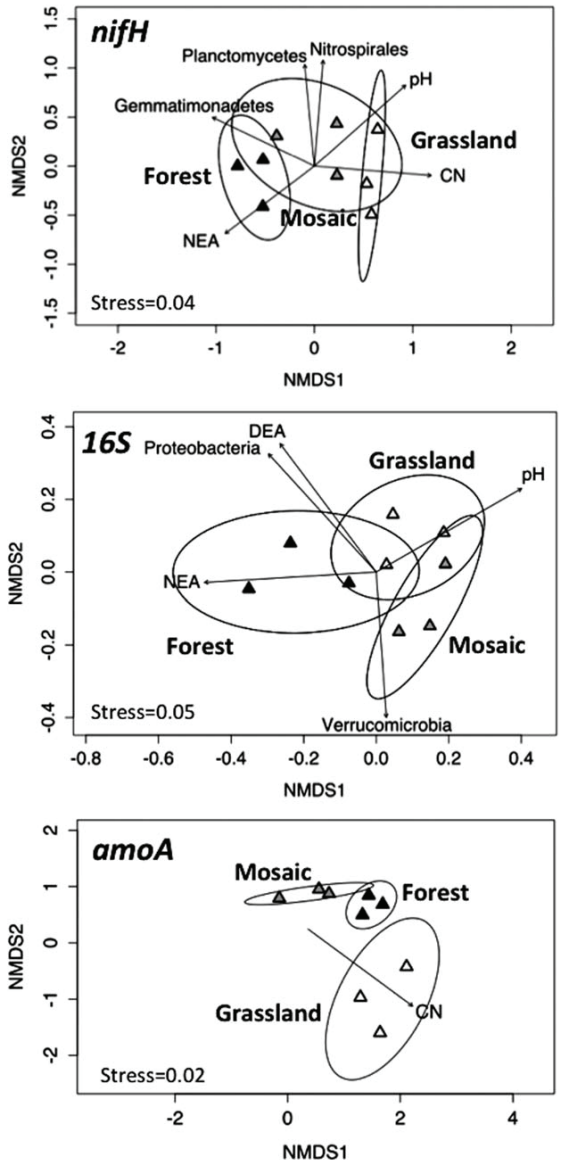


Fig. 4. Nonmetric multidimensional scaling based on OTUs matrix computed from bacterial genetic markers (*amoA*, *16S*, and *nifH*) at site T. Black, grey and white plots correspond respectively to forest, mosaic and grassland successional stages. Black arrows represent factors variation significantly correlated with communities' structures distribution.

Alder effect on microbial richness and diversity

We rejected our first hypothesis that the lower plant diversity linked to alder encroachment would induce a lower soil microbial diversity. To the contrary, ITS1 at site P and *amoA* at site T showed a negative relationship between alder density and microbial richness and diversity, but this pattern was not observed on both sites. This trend, detected for the fungal community, including saprobes confirmed Sampò *et al.* (1997) study based on a fruiting-body survey (Sampò *et al.*, 1997; Senn-Irlet *et al.*, 2012). Their results showed that young alder stands hosted twice the saprophytic fungi species than older stands. Recent metabarcoding studies have also revealed a high diversity of fungi in alpine grasslands, with 998 OTUs assigned to known fungi, which were mainly saprobes (Pellissier *et al.*, 2014). In contrast, other factors had a significant effect on diversity distribution. For example, bacterial richness/diversity values (*16S rDNA* marker) and pH were positively correlated (data not shown). Even if pH and other soil factors such as organic matter quantity and quality are often confounded (supported here by a relationship between pH and OM content), pH remains the main driver of bacterial diversity (Fierer and Jackson, 2006; Rousk *et al.*, 2010; Siles and Margesin, 2016). We also observed strong differences between sites, and site P hosted more species compared with site T (Table 3). We assume that perturbations visible at site P, such as grazing and mowing contribute to increase belowground diversity (Milchunas and Lauenroth, 1993; Fierer, 2008). In this study, we did not include an *Archaea* marker gene. Due to the important role of *Archaea* in N-cycling (Bates *et al.*, 2011) and the link between *Archaea* community structure and soil N availability (Shi *et al.*, 2016), it is possible that this group could respond more to alder encroachment than bacteria and fungi.

Changes in microbial community structures

Bacterial community structure differed between sites and among the alder successional stages at site T. Whatever the marker considered, pH, C/N ratio and OM content were the three main soil factors likely to explain the difference between the two sites. These results are consistent with numerous previous studies where pH has been shown to be the main driver of microbial community structure (Fierer and Jackson, 2006) since it interacts directly or indirectly with other individual soil variables such as enzymes activities, salinity or soil moisture (Lauber *et al.*, 2009). In our study, pH was negatively correlated with the relative abundance of *Acidobacteria* and C/N ratio while positively correlated with the relative abundance of *Actinobacteria* as previously observed (Kim *et al.*, 2014). At site T, the alder cover and its associated soil properties might have shaped overall (*16S rDNA* gene) and N-related (*nifH* and *amoA* genes) bacterial community structures. However, the lack of a statistically significant difference in bacterial community structure at site P suggests that bacterial communities are driven mainly by factors other than the presence and density of alder.

A distinct pattern was observed for fungi, whose communities were influenced by sites, successional stages

and distinct between soil and root samples. We observed a clear difference between grasslands on one hand, and alder mosaic and forest on the other. Under alders, the low C/N of litter resulting from N_2 fixation may decrease soil C/N ratio quickly and amplify the difference with grasslands having a higher C/N and OM content. Indeed, fungal communities were also influenced by changes in soil C/N and OM, which is consistent with many studies on fungal diversity (for meta-analyses, see Tedersoo *et al.*, 2014; Siles and Margesin, 2016). Considering the EM communities, the difference between successional stages was still supported, but not the difference between sites, probably because EM communities associated with alders are less variable. Soil and roots also hosted more similar EM communities, confirming that alder symbionts dominate the soil under their host. Again, C/N shaped EM community structure, as shown by numerous studies on alders but also on other plants (Lilleskov *et al.*, 2002; Cox *et al.*, 2010; Kjoller *et al.*, 2012). Finally, EM community structure was highly correlated with pH variation, as previously demonstrated *in natura* (Polme *et al.*, 2014) and *in vitro* (Huggins *et al.*, 2014).

Alder effects on symbiotic partner communities

To date, there is no *Frankia*-specific primer allowing a direct (*i.e.*, not nested PCR) metabarcoding approach to estimate total diversity of this genus (Rodriguez *et al.*, 2016). The *16S rDNA* primers failed to detect *Frankia* in one third of the samples while *Frankia* were detected in almost all samples based on *nifH* primers. The two *nifH* primers (IGK3 and DVV) bind, respectively, 100% and 98% of known *Frankia* sequences in the database and amplify well on soil samples (Gaby and Buckley, 2012). We confirmed that they allowed a reasonable and representative detection of *Frankia*, and *nifH* rarefaction curves suggested that *Frankia*'s diversity was correctly assessed, although only 305 *Frankia* sequences (four OTUs at 3% threshold) were detected. More specific markers will be required to perform a deep survey of *Frankia* diversity. Our results from *Frankia* absolute quantification are consistent with previous estimations and confirm the relatively low *Frankia* abundance in soils representing less than 0.1% cells of the bacterial community (Samant *et al.*, 2015).

We confirmed our second hypothesis that *Frankia* abundance is higher under alder (mosaic and forest stage soils) compared to grassland, even if the differences remain small (< 1log). As *Frankia* strains typed in nodules were exclusively Sp+ and thus refractory to *in vitro* culture (Pozzi *et al.*, 2015) their survival out of the alder rhizosphere (grassland soil) was not expected. Our results suggest that Sp+ *Frankia* strains are able to persist perhaps as dormant spores even in the absence of a compatible host and that *Frankia* populations in nodules (Sp+) might not be representative of *Frankia* populations in soils that would more-certainly be Sp–. However, our metabarcoding approach does not allow the distinction of Sp+ from Sp– *Frankia* strains. As Sp+ *Frankia* strains are dominant in nodules from alpine and boreal AV stands (*circa* 90% in the French Alps), it has been suggested that this symbiosis type is an adaptation to cold biomes (Pozzi *et al.*, 2015). From a long-term perspective, warming conditions could lead to an increased proportion of Sp– strains. *Frankia* Sp– strains are supposedly more efficient in nitrogen fixation than Sp+ strains (Kurdali *et al.*, 1990) and they might increase N input into soil compared with Sp+ strains. Thus soil properties, microbial community composition and N cycle would be impacted significantly, with unknown impacts on ecosystem structure and function.

For fungi, genera commonly associated with alders, like *Alnicola* and *Melanogaster*, were detected and the total EM community was similar to that observed on root tips in the Alps (Roy *et al.*, 2013\), except that twenty times more OTUs were detected. Future studies on alders could use metabarcoding techniques, keeping in mind that species richness might still be over-estimated (Tedersoo *et al.*, 2014) and that ITS1 is not sufficient to identify species, especially within the genus *Alnicola*. It seems like alder presence but not its density influenced EM fungi communities, as mosaic and forests communities were similar on both sites. The absence of *Alnicola* or *Alpova*/*Melanogaster* sequences in the grassland might be explained by their high dependency and specificity toward alders. Therefore, EM fungi may not be crucial in enabling their host expansion into grassland, while Sp+ *Frankia* strains could associate with young AV at early stages of colonization. These results fit Miller *et al.* (1992) and Yamanaka *et al.* (2003) conclusions that *Frankia* association with alder roots precede specific EM association and thus that EM colonization is dependent on the presence of *Frankia*.

Consequences of green alder expansion on ecosystem functioning

Alder species are catalyzers of nitrogen turnover in ecosystems due to the huge soil enrichment through the senescence and decomposition of N rich litter and roots leading to soil nitrophilization (Huss-Danell, 1997; Uri *et al.*, 2003).

Our third hypothesis was that green alder expansion on abandoned and depleted pasture soil accelerates processes linked to the nitrogen cycle, specifically nitrification and denitrification. We confirmed our hypothesis with regards to nitrification. Indeed, at site T, potential nitrification activity increased proportionately with AV density despite the associated decrease of soil pH, which reached values as low as 3.57 in forest soil. Mildly alkaline soil pH

© 2017 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd,

favors the relative abundance and functionality of ammonia-oxidizing bacteria (AOB) (Bru *et al.*, 2011), with the highest nitrifying activity occurring at pH 8.0–9.0 (Bertrand, 2009; Subbarao *et al.*, 2012). Thus, the soil acidity measured under the forest successional stage should result in a drop of NO_3^- and NO_2^- production even if ammonium is not limiting. However, besides bacterial nitrifiers – the only group studied here – other nitrifying taxa like *Archaea* may play an important role particularly in extreme environments and acidic soils (Bates *et al.*, 2011). Surveys along a pH gradient showed that as pH decreased, the detection of *amoA* gene copies and transcripts decreased for bacterial communities and increased for archaeal communities (Leininger *et al.*, 2006; Nicol *et al.*, 2008). Moreover, cold and acid environments are described as more favorable (higher abundances) to fungi than bacteria (Margesin *et al.*, 2009; Fierer *et al.*, 2011). In this context, perhaps heterotrophic nitrification by acid-tolerant fungi using N compounds other than NH_4^+, may contribute in large part to the activity measured in our study (Pedersen *et al.*, 1999; Islam *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2014).

The enhancement of potential nitrification measured at site T under alder cover, and the resulting release of NO_3^- substrate, was not linked to an increase in potential denitrification activity, regardless of site or successional stage. This result was not expected since green alder stands had been reported to emit 35 times more nitrous oxide than adjacent grassland (Hiltbrunner *et al.*, 2014). The wide distribution of the anaerobic nitrate respiration capacity in bacterial taxa (Tiedje, 1988) and our method that measures potential activity and not actual activity could explain similar estimated levels of denitrification activity, despite marked soil differences among the three successional stages. Moreover, soil microbial production of nitrous oxide possibly occurs in ecosystems via nitrification (ammonia oxidation) and nitrate dissimilation (denitrification and nitrate ammonification) (Baggs *et al.*, 2010). Thus anammox bacteria and/or denitrifrying nitrifiers rather than denitrifiers may be involved.

Conclusions and perspectives

Our study suggests that the highly-invasive potential of green alder shrub not only impacts plant and, thereby associated animal diversity but also apparently induces subsequent changes to soil characteristics and soil microbial communities. Soil acidification and organic matter enhancement resulting from AV encroachment seem to shape the entire microbial community as well as N-cycle associated soil microbes. AV encroachment is linked to acceleration of nitrogen turnover, as reflected by nitrification enzyme rate increases. With decreased agropastoral use of subalpine areas, expansion of green alder is favored. In turn, higher temperatures with global change are expected to accelerate N cycle and N_2 fixation processes resulting in higher emissions of greenhouse gases that in turn may contribute to further global warming as well as increasing soil N fertility, thereby influencing further plant successional patterns and AV upward displacement in mountains (Hiltbrunner *et al.*, 2014; Orsenigo *et al.*, 2014). Further studies of C and N cycles will be necessary to better understand the consequences of green alder expansion and migration with global climate change. Further work should include an assessment of the function of *Archaea* communities in alpine regions, as well as determinations of *in situ* ecosystem denitrification and N_2 fixation rates in order to better understand the reaction to global warming and change in ecosystem properties of widespread, ecologically important stands of green alder and similar alder species together with the diversity, specificity and traits of associated symbionts.

Experimental procedures

Experimental design and sampling

In October 2014, we sampled two different sites on the same slope in the national park of the Vanoise, Savoie, France. The mean elevations were 2000 m above sea level a.s.l. for site P (45°26′17″N; 6°46′40″E) and 2200 m a.s.l. for site T (45°25′53″N; 6°47′37″E) (Fig. 1). Both sites had soils that were dystric cambisols (FAO, 1998), with gneiss and micaschist. Site P was less than 1 km away to the village of 'Le Laisonnay d'En Bas' and 200 m lower than site T which was 1 km deeper and away from the village in the 'Tarentaise' valley with less anthropic pressure evidences. These two sites were about 1 km apart and also differed in the topographic orientation of colonization. Colonization by AV was downslope for site P and upslope for site T, determined by the alder density gradient. Climatic data were collected from worldclim database (http://www.worldclim.org) by raster package in R (Hijmans and van Etten, 2012). At each site, three experimental blocks were established systematically. Each block harbored the three representative vegetation stages: grasslands, patchy mosaics and forests or shrubs with complete canopy cover. Grassland was composed exclusively of alpine herbaceous plants and grasses, with no alder. Mosaics were characterized by patchy AV individuals and small patches interspersed within alpine grasslands. Forests featured high density AV shrubs occupying at least 80% of the area with essentially complete canopy cover by alder thicket (Anthelme *et al.*, 2003).

Eighteen composite samples (from six soil cores of 0–10 cm depth without the upper organic layer) were randomly taken under the three stages within each block of the two sites, with each block covering a surface area of approximately 50 m × 50 m. Moist soil samples were sieved (2 mm) in the field and kept at 4°C for subsequent analyses. In the lab, each sample was split into three equal parts, one for chemical analyses, one for N enzyme function assays and one stored at −20°C for molecular analyses.

At each mosaic and forest stages, root nodules and fine roots (*circa* 25 cm in length) were sampled from six alder

© 2017 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd,

trees, at least 5 m apart from one another. Nodules were preserved in soil at 4°C and stored in the lab at −20°C. Twelve composite samples were formed from defrosted, washed and surface sterilized nodules. After max 8 h, EM root tips were cleaned with tap water and observed under a 20× dissecting microscope. Ectomycorrhizae were individually collected (*circa* 50 EM structures per tree) and then stored in a single CTAB buffer. Standard soil chemical analyses (pH, total N and C contents, inorganic C and N contents, carbon/nitrogen ratio and organic matter contents) were conducted in the Alpine Ecology Lab (UMR UJF/CNRS 5553) in Grenoble.

Nitrifying and Denitrifying Enzyme Activities (NEA and DEA) were measured as described in Dassonville *et al.* (2011) and Patra *et al.* (2005) respectively. Briefly, about 1 g of fresh soil was dried at 120°C overnight to assess humidity. Subsamples of fresh soil equivalent to 3 g dry soil were then incubated with 6 ml of a solution of $(NH_4)_2SO_4$ (50 μg $N–NH_4^+$ g^{-1} dry soil) to assess NEA. Distilled water was added to each sample to achieve 24 ml of total liquid volume in flasks. The flasks were sealed with Parafilm® and incubated at 28°C under constant agitation (180 rpm). Aliquots of 1.5 ml of soil slurry were regularly sampled after 2, 4, 6, 8 and 10 h of incubation, filtered to less than 0.2 μm size and stored in vials at −20°C until measurement of NO_3^- concentrations using an ion chromatograp (DX120; Dionex, Salt Lake City, USA) equipped with a 4 mm × 250 mm column (IonPac AS9 HC). NEA was expressed as μg $N–NO_3^-$ h^{-1} g^{-1} dry soil. To measure DEA, distilled water (1 ml) containing KNO_3 (50 μg $N–NO_3^-$ g^{-1} dry soil), glucose (500 μg C–glucose g^{-1} dry soil) and glutamic acid (500 μg C–glutamic acid g^{-1} dry soil) were added to fresh soil (10 g equivalent dry soil) placed in a 150 ml plasma flask. The flasks were sealed with rubber stoppers and the atmosphere was replaced by 90% helium to ensure anaerobic conditions and 10% C_2H_2 was added to inhibit N_2O reductase activity. Flasks were then incubated at 28°C for 6 h. After 2 h of incubation, gas samples were analyzed every hour for the remaining 5 h incubation to measure N_2O concentration using a gas chromatograph (Micro GC R3000; SRA Instrument, Marcy L'Etoile, France). DEA was expressed as μg $N–N_2O$ h^{-1} g^{-1} dry soil.

Sporulation phenotype determination

Nodule sporulation phenotype was determined either on fresh or on defrosted nodules by microscopic observation of hand sections stained with Lactophenol Blue (Réactifs RAL, Martillac, France), as previously described in Pozzi *et al.* (2015). The lactophenol blue stain discriminates spores (refringent and nonstained) from hyphae and diazovesicles (stained deep blue). Above one sporangium observed over 50 infected plant cells, Sp+ phenotype was given to nodule. Otherwise nodule was identified as Sp− phenotype.

DNA extraction, quantification, amplification and metabarcoding

Soil DNA was extracted from 0.5 g of defrosted soil samples using the PowerSoil DNA kit (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, CA, USA) performed according to the manufacturer's protocol. Total nodular DNA was extracted using the method described by Huguet *et al.* (2001). Ectomycorrhizal structures were rinsed with sterile water to remove CTAB buffer and DNA was extracted using the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's protocol. Extracted DNA was used as a template for PCR amplification, together with negative controls (sterile water used for extraction and PCR).

Three different bacterial genes, 16S rRNA, *nifH* (for N_2 fixers), and *amoA* (for bacterial ammonium oxidiziers), respectively, and one fungal gene, ITS1 were studied. The primers used targeted partial sequences of these genes: bakt_341F/Bakt_805R (V3–V4 region of 16S rRNA), IGK3/DVV (*nifH*) and amoa-1F/amoa-2R (Supporting information 3). To amplify the ITS1 region, the forward primer ITS5 was used (White *et al.*, 1990) together with (CAAGAGATCCGTTGTTGAAA GTK) as a reverse primer. Forward and reverse primers of each marker were tagged with a combination of two different eight-nucleotide labels (designated as 'tag') in order to assign sequence reads to the relevant sample (Binladen *et al.*, 2007; Valentini *et al.*, 2009).

For each marker, the PCR mix reaction contained: 2 μl template DNA, 1 mM of each primer, 12.5 μl of Amplitaq Gold 360® Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA) and sterile Miniversol water® (qs 25 μl). The reaction conditions were initial denaturation of 5 min at 95°C, between 25 and 40 cycles of denaturation for 1 min, annealing of 1 min at specific primers temperature (Supporting information 4) and extension of 1 min at 72°C. Final extension step was performed at 72°C for 10 min. PCR products were checked for quality on an electrophoresis gel. Bacterial and fungal amplicons were pooled in two composite samples and were used as template for a single run of Illumina® MiSeq sequencing, using the Bioscientific PCR free kit. Sequencing was conducted using the paired-end sequencing technology (2 × 250 bp) with the chemistry V2 at Genotoul GIS facility (Toulouse, France).

Sequencing-data processing and analysis

Bacterial PCR amplicon sequencing data was processed using the open-source software MOTHUR (v.1.38.0) (Schloss *et al.*, 2009). Initially, 3′ and 5′ reads were paired and trimmed according to their length and quality using standard filtering tools in the Mothur package. Two errors on primer sequence and no error on barcode sequence were allowed. Short sequences (< 398bp for 16S rDNA, < 311bp for nifH and < 300bp for amoA) were discarded and chimeric sequences were removed using UCHIME implemented in MOTHUR and manual analysis (Edgar *et al.*, 2011). Corrected sequences were clustered into operational taxonomic units (OTUs) at 97% (Kim *et al.*, 2014). Singleton reads assigned to OTUs were removed from the analysis if they were not shared between at least two different samples. Subsampling was performed to normalize number of reads between samples. Read assignment into the taxonomic, and *amoA* and *nifH* clusters was performed using specific databases, respectively, SILVA database (release 119) (Quast *et al.*, 2013), and 8225 sequences of *amoA* AOB and 9250 sequences of *nifH*, both assembled from FUNGENE functional gene repository (Cole *et al.*, 2014).

© 2017 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd,

EM fungal sequences analysis employed the OBItools package (Boyer *et al.*, 2016) as described in Zinger and Philippe (2016). First, paired-end assembly, read assignment to samples and read dereplication were performed. Low-quality sequences, shorter than expected, containing ambiguous nucleotides, displaying low score paired-end alignments or corresponding to singletons were excluded from the analysis. Pairwise distances between the remaining sequences were computed with the Sumatra software (Mercier *et al.*, 2013) using the raw number of mismatches as a measure of sequence dissimilarity. The resulting dissimilarity matrix was inverse-transformed and converted into a similarity matrix. The similarity matrix was used to form Operational Taxonomic Units (OTUs) using Infomap clustering algorithm (Rosvall and Bergstrom, 2008). Read abundances were summed for sequences belonging to the same OTU, resulting in a matrix reporting OTU abundance value for each sample. Sequences amplified in the blank control were removed from the matrix. Fungal OTUs were assigned to a taxonomic level using the ecotag function (Boyer *et al.*, 2016) and both GENBANK and UNITE databases (Kõljalg *et al.*, 2005). Ecotag enabled us to attribute assignation based on similarity and phylogeny. By computing a distance tree, and a clustering approach, the node grouping closest relatives of a given sequence is used to identify sequence. Some sequences are therefore identified at a broad taxonomic level (family) while others can be attributed to species. Considering that EM life cycles and ecological functions are generally conserved at the genus or family level (Tedersoo and Smith, 2013) and based on our knowledge of *Alnus*-associated EM fungi, a matrix including only putative EM OTUs was build.

Fastq files were deposited at EMBL European Nucleotide Archive (www.ebi.ac.uk/ena/) under project accession number PRJEB18608, respectively, ERS1473496 and ERS1473494 for bacterial and fungal sample accessions.

Quantification of Frankia

All *nifH* OTU sequences were screened against the nucleotide database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) using BLAST® blastn tool to identify *Frankia* OTUs and semiquantify *Frankia* density from the number of reads per sample for each of these identified OTUs. The number of *Frankia* reads between successional stages and site were compared using Kruskal–Wallis one-way nonparametric analysis test, at a significance level of 0.05. The absolute density of *Frankia* in each soil samples was measured by real-time quantitative PCR specifically targeting a partial sequence of the *nifH* gene of *Frankia* using nifHf1/nifHr168 primers (Samant *et al.*, 2012). qPCR quantification was performed for each DNA sample once in a total volume of 20 µl containing 10 µl of SYBR Green PCR master mix, including HotStar Taq™ DNA polymerase, Quanti Tec SYBR Green PCR Buffer, dNTP mix with dUTP, SYBR Green I, ROX and 5 mM $MgCl_2$ (QuantiTect™ SYBR® Green PCR Kit; QIAGEN, France), 0.4 µl of each primer (final concentration at 0.2 µM each), 5 µL of template in a LightCycler® 480 Instrument II (Roche Diagnostic, Meylan, France) using an initial denaturation at 95°C for 15 min, and 45 cycles of denaturation at 95°C, annealing at 64°C and extension at 72°C each for 30 s. The amplification was followed by a melting curve analysis. Standard curves were generated from cloned *nifH* gene fragments of strain ACN14a (606 bp in pGEM-Teasy; Promega, Madison, WI, USA) using a dilution series (10^7–10^1 molecules). Differences of *nifH* copy numbers per gram of dry soil were compared between successional stages using one-way ANOVA after confirming normality (Shapiro test) and homoscedasticity (Bartlett test) of data at 95% confidence.

Microbial community diversity and structure

Rarefaction curves, richness and diversity indices (Simpson and Shannon) were calculated using Mothur and R for each sample for fungi and bacteria, and relying on the three bacterial genes. Bray–Curtis dissimilarities were calculated for all samples for each gene. Bray–Curtis matrices were used to perform NMDS with the metaMDS function, available in the Vegan package (Oksanen *et al.*, 2011) of R software (Team, 2012) associated with Permanova (Permutational multivariate analysis of variance) using the *adonis* function to explore the difference in community structure in the different successional stages. Differences between groups were tested on each NMDS axis through a Tuckey post hoc test. To complete NMDS observations, envfit function implemented in the Vegan package was used to test correlations between previous ordination and soil properties, N cycle-linked activities and bacterial taxa relative abundances, at a significance level of 0.05. To identify which OTUs were specific to a given successional stage, heatmaps were produced using the Vegan package based on Bray–Curtis matrices for each gene, and focusing OTUs from ranks 1 to 15.

Statistical analysis of functional data

Principal components analysis (PCA) was performed to assess successional stage differences in soil properties using the R package FactorMiner 1.29. Nitrification and denitrification enzyme activities were compared using Kruskal–Wallis one-way non-parametric analysis test, at a significance level of 0.05.

Acknowledgements

G. Schwob is granted a doctoral fellowship by the Ministry of Higher Education and Research (MESR, France). This work was funded by a grant from the Rhône-Alpes Region – ARC Environnement. Microbial measurements were performed at the AME platform (Microbial Ecology UMR5557 CNRS – UMR1418 INRA, Lyon), soil analyses at the Alpine Ecology Laboratory (UMR UJF/CNRS 5553), quantitative PCR at the DTAMB platform (IFR41, University Lyon 1) and bioinformatics analyses at the Ibio platform (Microbial Ecology UMR5557 CNRS – UMR1418 INRA, Lyon). The authors are extremely grateful to Jeffrey O. Dawson for carefully editing the manuscript and Alexandre Garnier for sharing his knowledge of the Vanoise National Park (Savoie, France). We also thank Franck Poly for his help in samplings and Guillaume Laliberté, Claire Bellehumeur and Jonathan Gervaix for the technical assistance.

© 2017 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd,

References

Alexander, J.M., Lembrechts, J.J., Cavieres, L.A., Daehler, C., Haider, S., Kueffer, C., *et al.* (2016) Plant invasions into mountains and alpine ecosystems: current status and future challenges. *Alpine botany* **126:** 89–103.

Anthelme, F., Grossi, J.-L., Brun, J.-J., and Didier, L. (2001) Consequences of green alder expansion on vegetation changes and arthropod communities removal in the northern French Alps. *For Ecol Manage* **145:** 57–65.

Anthelme, F., Michalet, R., Barbaro, L., and Brun, J.-J. (2003) Environmental and spatial influences of shrub cover (*Alnus viridis* DC.) on vegetation diversity at the upper treeline in the inner western Alps. *Arctic Antarctic Alpine Res* **35:** 48–55.

Baggs, E.M., Streminska, M., Barrett, G., and Morley, N. (2010) Nitrous oxide production in soil: Microbial source partitioning to inform management options for mitigation. In *Proceedings of the 19th World Congress of Soil Science: Soil Solutions for a Changing World, Brisbane, Australia, 1–6 August 2010 Congress Symposium 4: Greenhouse Gases from Soils*. International Union of Soil Sciences (IUSS), c/o Institut für Bodenforschung, Universität für Bodenkultur, pp. 191–194.

Bates, S.T., Berg-Lyons, D., Caporaso, J.G., Walters, W.A., Knight, R., and Fierer, N. (2011) Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. *ISME J* **5:** 908–917.

Beck, P.S.A., Horning, N., Goetz, S.J., Loranty, M.M., and Tape, K.D. (2011) Shrub cover on the north slope of Alaska: a circa 2000 baseline map. *Arctic Antarctic Alpine Res* **43:** 355–363.

Bertrand, J.-C. (2009) *Ecologie microbienne: microbiologie des milieux naturels et anthropisés*: Presses universitaires de Pau et des Pays de l'Adour.

Binladen, J., Gilbert, M.T.P., Bollback, J.P., Panitz, F., Bendixen, C., Nielsen, R., and Willerslev, E. (2007) The use of coded PCR primers enables high-throughput sequencing of multiple homolog amplification products by 454 parallel sequencing. *PLoS ONE* **2:** e197.

Bogar, L.M., Dickie, I.A., Kennedy, P.G., and Richardson, D.M. (2015) Testing the co-invasion hypothesis: ectomycorrhizal fungal communities on *Alnus glutinosa* and *Salix fragilis* in New Zealand. *Divers Distrib* **21:** 268–278.

Boyer, F., Mercier, C., Bonin, A., Le Bras, Y., Taberlet, P., and Coissac, E. (2016) obitools: a unix-inspired software package for DNA metabarcoding. *Mol Ecol Resources* **16:** 176–182.

Bru, D., Ramette, A., Saby, N.P., Dequiedt, S., Ranjard, L., Jolivet, C., *et al.* (2011) Determinants of the distribution of nitrogen-cycling microbial communities at the landscape scale. *ISME J* **5:** 532–542.

Bühlmann, T., Hiltbrunner, E., and Körner, C. (2014) *Alnus viridis* expansion contributes to excess reactive nitrogen release, reduces biodiversity and constrains forest succession in the Alps. *Alpine Bot* **124:** 187–191.

Bühlmann, T., Körner, C., and Hiltbrunner, E. (2016) Shrub expansion of *Alnus viridis* drives former montane grassland into nitrogen saturation. *Ecosystems* 1–18.

Caviezel, C., Hunziker, M., Schaffner, M., and Kuhn, N.J. (2014) Soil–vegetation interaction on slopes with bush encroachment in the central Alps – adapting slope stability measurements to shifting process domains. *Earth Surface Process Landforms* **39:** 509–521.

Chapin, F.S., Walker, L.R., Fastie, C.L., and Sharman, L.C. (1994) Mechanisms of primary succession following deglaciation at Glacier Bay, Alaska. *Ecol Monogr* **64:** 149–175.

Chatarpaul, L., Chakravarty, P., and Subramaniam, P. (1989) Studies in tetrapartite symbioses. *Plant Soil* **118:** 145–150.

Cole, J.R., Wang, Q., Fish, J.A., Chai, B., McGarrell, D.M., Sun, Y., *et al.* (2014) Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* **42:** D633–D642.

Cotin-Galvan, L., C., Pozzi, A., Schwob, G., Fournier, P., P., Fernandez, M., and Herrera-Belaroussi, A. (2015) *In-planta* sporulation capacity enhances infectivity and rhizospheric competitiveness of *Frankia* strains. *Microb Environ.*

Cox, F., Barsoum, N., Lilleskov, E.A., and Bidartondo, M.I. (2010) Nitrogen availability is a primary determinant of conifer mycorrhizas across complex environmental gradients. *Ecol Lett* **13:** 1103–1113.

Dassonville, N., Guillaumaud, N., Piola, F., Meerts, P., and Poly, F. (2011) Niche construction by the invasive Asian knotweeds (species complex Fallopia): impact on activity, abundance and community structure of denitrifiers and nitrifiers. *Biol Invas* **13:** 1115–1133.

Dawson, J. (2007) Ecology of actinorhizal plants. In *Nitrogen-Fixing Actinorhizal Symbioses*. Pawlowski, K., and Newton, W. (eds): Springer Netherlands, pp. 199–234.

Didham, R.K., Tylianakis, J.M., Hutchison, M.A., Ewers, R.M., and Gemmell, N.J. (2005) Are invasive species the drivers of ecological change? *Trends Ecol Evol* **20:** 470–474.

Diez, J.M., D'antonio, C.M., Dukes, J.S., Grosholz, E.D., Olden, J.D., Sorte, C.J.B., *et al.* (2012) Will extreme climatic events facilitate biological invasions? *Front Ecol Environ* **10:** 249–257.

Edgar, R.C., Haas, B.J., Clemente, J.C., Quince, C., and Knight, R. (2011) UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* **27:** 2194–2200.

Fastie, C.L. (1995) Causes and ecosystem consequences of multiple pathways of primary succession at Glacier Bay, Alaska. *Ecology* **76:** 1899–1916.

Fierer, N. (2008) Microbial biogeography: patterns in microbial diversity across space and time. In *Accessing uncultivated microorganisms*: Zengler, K. (ed). ASM Press, Washington, DC: American Society of Microbiology, pp. 95–115.

Fierer, N., and Jackson, R.B. (2006) The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proc Natl Acad Sci USA* **103:** 626–631.

Fierer, N., McCain, C.M., Meir, P., Zimmermann, M., Rapp, J.M., Silman, M.R., and Knight, R. (2011) Microbes do not follow the elevational diversity patterns of plants and animals. *Ecology* **92:** 797–804.

Frost, G.V., and Epstein, H.E. (2014) Tall shrub and tree expansion in Siberian tundra ecotones since the 1960s. *Glob Chang Biol* **20:** 1264–1277.

Gaby, J.C., and Buckley, D.H. (2012) A comprehensive evaluation of PCR primers to amplify the nifH gene of nitrogenase. *PLoS ONE* **7:** e42149.

© 2017 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd,

Gao, C., Shi, N.-N., Liu, Y.-X., Peay, K.G., Zheng, Y., Ding, Q., *et al.* (2013) Host plant genus-level diversity is the best predictor of ectomycorrhizal fungal diversity in a Chinese subtropical forest. *Molecular Ecology* **22:** 3403–3414.

Higgins, L.M., and Kennedy, P.G. (2012) Symbiotic *Frankia* bacteria in Alnus forests in Mexico and the United States of America: is geographic location a good predictor of assemblage structure? *Botany* **90:** 423–431.

Hijmans, R.J., and van Etten, J. (2012) *raster: Geographic Analysis and Modeling with Raster Data. R Package Version 2.0–12*. Vienna: R Found Stat Comput. http://CRAN.R-project.org/package=raster.

Hiltbrunner, E., Aerts, R., Buhlmann, T., Huss-Danell, K., Magnusson, B., Myrold, D.D., *et al.* (2014) Ecological consequences of the expansion of N(2)-fixing plants in cold biomes. *Oecologia* **176:** 11–24.

Hooper, D.U., Adair, E.C., Cardinale, B.J., Byrnes, J.E., Hungate, B.A., Matulich, K.L., *et al.* (2012) A global synthesis reveals biodiversity loss as a major driver of ecosystem change. *Nature* **486:** 105–108.

Huggins, J.A., Talbot, J., Gardes, M., and Kennedy, P.G. (2014) Unlocking environmental keys to host specificity: differential tolerance of acidity and nitrate by *Alnus*-associated ectomycorrhizal fungi. *Fung Ecol* **12:** 52–61.

Huguet, V., Batzli, J.M., Zimpfer, J.F., Normand, P., Dawson, J.O., and Fernandez, M.P. (2001) Diversity and specificity of *Frankia* strains in nodules of sympatric *Myrica gale*, *Alnus incana*, and *Shepherdia canadensis* determined by rrsGene polymorphism. *Appl Environmen Microbiol* **67:** 2116–2122.

Huss-Danell, K. (1997) Actinorhizal symbioses and their N2 fixation. *New Phytol* **136:** 375–405.

Islam, A., Chen, D., and White, R. (2007) Heterotrophic and autotrophic nitrification in two acid pasture soils. *Soil Biol Biochem* **39:** 972–975.

Jeong, S.-C., and Myrold, D.D. (2001) Population size and diversity of *Frankia* in soils of *Ceanothus velutinus* and Douglas-fir stands. *Soil Biol Biochem* **33:** 931–941.

Kim, H.M., Jung, J.Y., Yergeau, E., Hwang, C.Y., Hinzman, L., Nam, S., *et al.* (2014) Bacterial community structure and soil properties of a subarctic tundra soil in Council, Alaska. *FEMS Microbiol Ecol* **89:** 465–475.

Kjoller, R., Nilsson, L.O., Hansen, K., Schmidt, I.K., Vesterdal, L., and Gundersen, P. (2012) Dramatic changes in ectomycorrhizal community composition, root tip abundance and mycelial production along a stand-scale nitrogen deposition gradient. *New Phytol* **194:** 278–286.

Kõljalg, U., Larsson, K.H., Abarenkov, K., Nilsson, R.H., Alexander, I.J., Eberhardt, U., *et al.* (2005) UNITE: a database providing web-based methods for the molecular identification of ectomycorrhizal fungi. *New Phytol* **166:** 1063–1068.

Körner, C. (2003) *Alpine Plant Life: Functional Plant Ecology of High moutain ecosystems; with 47 Tables*. Springer.

Körner, C. (2012) *Alpine Treelines: Functional Ecology of the Global High Elevation Tree Limits*. Springer Basel: Springer Science & Business Media.

Kräuchi, N., Brang, P., and Schönenberger, W. (2000) Forests of mountainous regions: gaps in knowledge and research needs. *For Ecol Manage* **132:** 73–82.

Kurdali, F., Capellano, A., Moiroud, A., and Domenach, A. (1989) Study of the contribution of the shoot and/or root of *Alnus* sp. in the compatibility between the host and a Sp+ *Frankia* strain using a grafting technique. *Plant Soil* **113:** 101–109.

Kurdali, F., Rinaudo, G., Moiroud, A., and Domenach, A. (1990) Competition for nodulation and 15N2-fixation between a Sp+ and a Sp– *Frankia* strain in *Alnus incana*. *Soil Biol Biochem* **22:** 57–64.

Lauber, C.L., Hamady, M., Knight, R., and Fierer, N. (2009) Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Appl Environ Microbiol* **75:** 5111–5120.

Leininger, S., Urich, T., Schloter, M., Schwark, L., Qi, J., Nicol, G., *et al.* (2006) Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature* **442:** 806–809.

Lilleskov, E.A., Fahey, T.J., Horton, T.R., and Lovett, G.M. (2002) Belowground ectomycorrhizal fungal community change over a nitrogen deposition gradient in Alaska. *Ecology* **83:** 104–115.

Lomolino, M. (2001) Elevation gradients of species-density: historical and prospective views. *Glob Ecol Biogeogr* **10:** 3–13.

Margesin, R., Jud, M., Tscherko, D., and Schinner, F. (2009) Microbial communities and activities in alpine and subalpine soils. *FEMS Microbiol Ecol* **67:** 208–218.

Mercier, C., Boyer, F., Bonin, A., and Coissac, E. (2013) SUMATRA and SUMACLUST: fast and exact comparison and clustering of sequences. *Programs Abstr SeqBio* 27–29.

Milchunas, D.G., and Lauenroth, W.K. (1993) Quantitative effects of grazing on vegetation and soils over a global range of environments. *Ecol Monogr* **63:** 327–366.

Miller, S.L., Koo, C., and Molina, R. (1992) Early colonization of red alder and Douglas fir by ectomycorrhizal fungi and *Frankia* in soils from the Oregon coast range. *Mycorrhiza* **2:** 53–61.

Nicol, G.W., Leininger, S., Schleper, C., and Prosser, J.I. (2008) The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. *Environ Microbiol* **10:** 2966–2978.

Oksanen, J., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., O'hara, R., Simpson, G.L., *et al.* (2011) *Vegan: Community Ecology Package, 2011. R package version: 1.17–18*.

Orsenigo, S., Mondoni, A., Rossi, G., and Abeli, T. (2014) Some like it hot and some like it cold, but not too much: plant responses to climate extremes. *Plant Ecol* **215:** 677–688.

Patra, A., Abbadie, L., Clays-Josserand, A., Degrange, V., Grayston, S., Loiseau, P., *et al.* (2005) Effects of grazing on microbial functional groups involved in soil N dynamics. *Ecol Monogr* **75:** 65–80.

Pedersen, H., Dunkin, K.A., and Firestone, M.K. (1999) The relative importance of autotrophic and heterotrophic nitrification in a conifer forest soil as measured by15N tracer and pool dilution techniques. *Biogeochemistry* **44:** 135–150.

Pellissier, L., Niculita-Hirzel, H., Dubuis, A., Pagni, M., Guex, N., Ndiribe, C., *et al.* (2014) Soil fungal communities of grasslands are environmentally structured at a regional scale in the Alps. *Mol Ecol* **23:** 4274–4290.

© 2017 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd,

Pester, M., Rattei, T., Flechl, S., Grongroft, A., Richter, A., Overmann, J., *et al.* (2012) amoA-based consensus phylogeny of ammonia-oxidizing archaea and deep sequencing of amoA genes from soils of four different geographic regions. *Environ Microbiol* **14:** 525–539.

Podrázský, V., and Ulbrichova, I. (2003) Soil chemistry changes in green alder [*Alnus alnobetula* (Ehrh.) C. Koch] stands in mountain areas. *J For Sci* **49:** 104–107.

Polme, S., Bahram, M., Koljalg, U., and Tedersoo, L. (2014) Global biogeography of *Alnus*-associated *Frankia* actinobacteria. *New Phytol* **204:** 979–988.

Pozzi, A.C., Bautista-Guerrero, H.H., Nouioui, I., Cotin-Galvan, L., Pepin, R., Fournier, P., *et al.* (2015) In-planta sporulation phenotype: a major life history trait to understand the evolution of *Alnus*-infective *Frankia* strains. *Environ Microbiol* **17:** 3125–3138.

Prober, S.M., Leff, J.W., Bates, S.T., Borer, E.T., Firn, J., Harpole, W.S., *et al.* (2015) Plant diversity predicts beta but not alpha diversity of soil microbes across grasslands worldwide. *Ecol Lett* **18:** 85–95.

Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., *et al.* (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* **41:** D590–D596.

Rodriguez, D., Guerra, T.M., Forstner, M.R., and Hahn, D. (2016) Diversity of *Frankia* in soil assessed by Illumina sequencing of nifH gene fragments. *Syst Appl Microbiol* **39:** 391–397.

Rosvall, M., and Bergstrom, C.T. (2008) Maps of random walks on complex networks reveal community structure. *Proc Natl Acad Sci USA* **105:** 1118–1123.

Rousk, J., Baath, E., Brookes, P.C., Lauber, C.L., Lozupone, C., Caporaso, J.G., *et al.* (2010) Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *ISME J* **4:** 1340–1351.

Roy, M., Rochet, J., Manzi, S., Jargeat, P., Gryta, H., Moreau, P.A., and Gardes, M.. (2013) What determines Alnus-associated ectomycorrhizal community diversity and specificity? A comparison of host and habitat effects at a regional scale. *New Phytol* **198:** 1228–1238.

Samant, S., Huo, T., Dawson, J.O., and Hahn, D. (2016) Abundance and relative distribution of *Frankia* host infection groups under actinorhizal *Alnus glutinosa* and non-actinorhizal *Betula nigra* trees. *Microb Ecol.* **71:** 473–481.

Samant, S., Sha, Q., Iyer, A., Dhabekar, P., and Hahn, D. (2012) Quantification of *Frankia* in soils using SYBR Green based qPCR. *Syst Appl Microbiol* **35:** 191–197.

Samant, S.S., Dawson, J.O., and Hahn, D. (2015) Growth responses of indigenous *Frankia* populations to edaphic factors in actinorhizal rhizospheres. *Syst Appl Microbiol* **38:** 501–505.

Sampò, S., Bergero, R., Buffa, G., and Luppi-Mosca, A.M. (1997) Soil fungal communities in a young and an old *Alnus viridis* coenosis. *Mycologia* 837–845.

Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., *et al.* (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* **75:** 7537–7541.

Senn-Irlet, B., Mürner, R., Martini, E., Küffer, N., De Marchi, R., and Bieri, G. (2012) Saprobic fungi on wood and litter of *Alnus alnobetula* in the Swiss Alps. *Mycotaxon* **102:** 506.

Shi, Y., Adams, J.M., Ni, Y., Yang, T., Jing, X., Chen, L., *et al.* (2016) The biogeography of soil archaeal communities on the eastern Tibetan Plateau. *Sci Rep* **6:** 38893.

Siles, J.A., and Margesin, R. (2016) Abundance and diversity of bacterial, archaeal, and fungal communities along an altitudinal gradient in alpine forest soils: what are the driving factors? *Microb Ecol* **72:** 207–220.

Steinauer, K., Jensen, B., Strecker, T., de Luca, E., Scheu, S., and Eisenhauer, N. (2016) Convergence of soil microbial properties after plant colonization of an experimental plant diversity gradient. *BMC Ecol* **16:** 19.

Subbarao, G.V., Sahrawat, K.L., Nakahara, K., Ishikawa, T., Kishii, M., Rao, I.M., *et al.* (2012) Biological nitrification inhibition – a novel strategy to regulate nitrification in agricultural systems. *Adv Agron* **114:** 249–302.

Team, R.C. (2012) *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. ISBN: 3–900051-07–0.

Tedersoo, L., and Smith, M.E. (2013) Lineages of ectomycorrhizal fungi revisited: foraging strategies and novel lineages revealed by sequences from belowground. *Fung Biol Rev* **27:** 83–99.

Tedersoo, L., Bahram, M., Põlme, S., Kõljalg, U., Yorou, N.S., Wijesundera, R., *et al.* (2014) Global diversity and geography of soil fungi. *Science* **346:** 1256688.

Theurillat, J.-P., and Guisan, A. (2001) Potential impact of climate change on vegetation in the European Alps: a review. *Clim Chang* **50:** 77–109.

Tiedje, J.M. (1988) Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. *Biol Anaerob Microorg* **717:** 179–244.

Uri, V., Lõhmus, K., and Tullus, H. (2003) Annual net nitrogen mineralization in a grey alder (*Alnus incana* (L.) moench) plantation on abandoned agricultural land. *For Ecol Manage* **184:** 167–176.

Valentini, A., Pompanon, F., and Taberlet, P. (2009) DNA barcoding for ecologists. *Trends Ecol Evol* **24:** 110–117.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., and White, T.J. (eds). New York: Academic Press, Inc. Vol. 18, pp. 315–322.

Wiedmer, E., and Senn-Irlet, B. (2006) Biomass and primary productivity of an *Alnus viridis* stand – a case study from the Schächental valley, Switzerland. *Bot Helv* **116:** 55–64.

Yamanaka, T., Li, C.-Y., Bormann, B.T., and Okabe, H. (2003) Tripartite associations in an alder: effects of *Frankia* and *Alpova diplophloeus* on the growth, nitrogen fixation and mineral acquisition of *Alnus tenuifolia*. *Plant Soil* **254:** 179–186.

Zhou, Y., Clark, M., Su, J., and Xiao, C. (2014) Litter decomposition and soil microbial community composition in three Korean pine (*Pinus koraiensis*) forests along an altitudinal gradient. *Plant Soil* **386:** 171–183.

Zhu, T., Meng, T., Zhang, J., Zhong, W., Müller, C., and Cai, Z. (2014) Fungi-dominant heterotrophic nitrification in a subtropical forest soil of China. *J Soils Sedim* **15:** 705–709.

© 2017 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd,

Zinger, L., and Philippe, H. (2016) Coalescing molecular evolution and DNA barcoding. *Mol Ecol* **25:** 1908–1910.

Supporting information

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

Supporting information 1. Bacterial accumulation curves.

Supporting information 2. Proportion of sequences amplified assigned to EM family or genera (a) based on all sequences and habitats, (b) from roots only, depending on habitat, and (c) from soil only and depending on habitat.

Supporting information 3. Average values of nitrification enzyme assay (NEA) (top) and denitrification enzyme assay (DEA) (bottom) in the soil of the three successional stages at the two sites.

Supporting information 4. Bacterial primers used for metabarcoding approach.

Supporting information 5. Quantification of *Frankia nifH*.

Supporting information 6. Semiquantitative abundance estimates of *Frankia* and *Alnus*-specific ectomycorrhizal fungi sequences in soil and associated with the host.

Supporting information 7. Outputs of Permanova and Tuckey post hoc tests on microbial community structures.

© 2017 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd,

Chapitre III B : Implication du génotype de sporulation sur la fixation symbiotique d'azote et le fonctionnement des écosystèmes sub-/alpins

1. Introduction

Dans la première partie de ce chapitre, nous avons montré que l'expansion de l'aulne vert sur les anciens pâturages subalpins est associée (1) à des changements de la pédologie des sols (*e.g.* acidification), (2) à des modifications de la structure des communautés bactériennes (oxydant l'ammonium et fixant l'azote), et fongiques, et (3) à une activité potentielle de nitrification plus importante (Schwob *et al.*, 2017). La diversité microbienne globale, contrairement à la diversité végétale, entomologique et ornithologique, n'était pas impactée négativement par l'expansion de l'aulnaie. Les conséquences de l'expansion des aulnes verts sur les sols semblent cependant très dépendantes du site (*e.g.* historique du sol, perturbation anthropique), avec une réponse du sol en fonction du stade de colonisation de l'aulne (prairie, mosaïque, dense) sur l'un des sites d'étude, et une absence d'effet de la colonisation sur le deuxième. Dans cette étude, les aulnes présentaient exclusivement des nodosités Sp+ quel que soit le site et le stade de colonisation échantillonné, or le phénotype de sporulation de *Frankia* pourrait également moduler les effets de l'expansion de l'aulne vert sur les sols subalpins.

En effet, la grande quantité de sporanges formés dans les nodosités par les souches Sp+ pourrait se faire sporulent au détriment énergétique et spatial des diazovésicules, avec comme conséquence des taux d'azote atmosphérique fixé plus faible à l'échelle de la nodosité, de l'aulne et de l'aulnaie. Les quantités d'azote transféré dans le sol, par exsudation des racines, ainsi que par la litière des feuilles pourraient alors être inférieures sous un aulne à nodosités Sp+ par rapport à un aulne à nodosités Sp-, et la plus faible disponibilité en azote dans le sol pourraient impacter des processus du cycle de l'azote comme la nitrification et la dénitrification. Comme vue dans la partie bibliographique, les nodosités Sp+ auraient une efficience de fixation moindre comparées aux nodosités Sp-, dans les études *in vitro* (Hall *et al.*, 1979; Maynard, 1980; Normand and Lalonde, 1982; Burggraaf and Shipton, 1983; Schwintzer, 1990), ou en conditions semi-naturelles (*i.e.* plantules en culture dans leur sol d'origine sous conditions de serre) (Kurdali *et al.*, 1990). Dans cette dernière étude, les auteurs démontrent que l'activité fixatrice d'une souche Sp- est plus importante que celle de la souche Sp+ quand les plants d'aulne sont dans leur sol d'origine, mais l'inverse est observé quand les plants se développent en milieu de croissance artificiel. Le contexte pédologique semble donc être un facteur clé de l'efficience de la fixation des différentes souches de *Frankia*. A ce jour, aucune étude n'a cependant comparé

les activités de fixation de nodosités Sp+ et Sp- d'aulnes directement sur le terrain, et *a fortiori* sur des aulnes verts.

Plusieurs études ont suggéré que le phénotype Sp- de *Frankia* était prédominant sur la plupart des genres actinorhiziens dont l'aulne, et que les aulnaies exclusivement Sp+ étaient rares, exceptées dans l'espèce *Alnus incana* sp. *incana* (Daniere *et al.*, 1986; Weber, 1986; Holman and Schwintzer, 1987; Kashanski and Schwintzer, 1987). Plus récemment, les travaux de Pozzi *et al.* (2015) sur un large échantillonnage de nodosités provenant d'Europe et d'Amérique du Nord, ont montré que les espèces *Alnus incana, Alnus viridis,* et leurs sous-espèces respectives associées, étaient majoritairement associées à des souches de *Frankia* Sp+. Les aulnaies blanches et vertes exclusivement Sp- se sont donc avérées être plutôt rares, notamment dans les Alpes françaises d'où proviennent la plupart des échantillons. Par ailleurs, ce statut Sp- d'une aulnaie pourrait être transitoire et restreint aux premiers stades de développement d'une aulnaie, c'est à dire au moment de la colonisation d'un site par les premiers aulnes généralement en situation de plantes pionnières (Schwintzer, 1990).

Les objectifs de cette partie ont été (1) de tester dans quelle mesure le patron de réponse précédemment observé dans l'aulnaie de la Vanoise se vérifie, en particulier selon le statut Sp+ ou Sp- et selon leur stade de développement (pionnière, en expansion ou climacique), et (2) d'approfondir nos connaissances sur le fonctionnement du cycle de l'azote dans les aulnaies subalpines. Pour cela, des mesures supplémentaires ont été réalisées comme des mesures de fixation d'azote, et la quantification par qPCR des populations nitrificantes et dénitrifiantes en incluant les communautés d'archées nitrifiantes, non prises en compte dans notre étude précédente.

2. Matériel et méthodes

Sites et échantillonnage

Quatre aulnaies vertes ont été échantillonnées en octobre 2016. Trois sites étaient localisés à proximité du Col du Lautaret (45°02'07''N; 6°24'20''E, Massif des Ecrins, Hautes-Alpes, France) : Madeleine (Mad), site I Lautaret (Lau1) et site II Lautaret (Lau2). Un site était localisé au col de la Croix de Fer (45°13'40''N; 6°12'13''E, Massif des Grandes Rousses, Savoie, France) et annoté Cf. Ces sites présentaient un sol de type lithosols et ont été choisis afin d'avoir dans le plan expérimental deux aulnaies Sp+ et deux aulnaies mixtes (Tableau III.1).

Les sites ont tout d'abord fait l'objet d'un pré-échantillonnage exploratoire sur 10 à 30 arbres par site, afin de déterminer le phénotype de sporulation des souches de *Frankia* majoritairement associées aux arbres et de cartographier les zones des aulnaies majoritairement Sp+ et celles majoritairement Sp-.

Trois blocs expérimentaux d'environ 50m x 50m, ont été déterminés sur chaque site, chaque bloc contenant 2 ou 3 stages écologiques de colonisation de l'aulne (Tableau III.1), comme précédemment décrits dans la première partie de ce chapitre. Vingt-sept échantillons composites de sol ont été formés, chacun provenant de 6 carottes de sol (0-10 cm de profondeur après l'horizon organique) prélevées aléatoirement sous chacun des 3 stades écologiques de colonisation, dans chaque bloc et sur les 4 sites (exemple du site de la Madeleine, Figure III.3).

Une deuxième campagne d'échantillonnage centrée cette fois sur le site Lau1 a été réalisée en juillet 2017 (Figure III.4). Un point de prélèvement correspond à un aulne sur lequel a été échantillonné 2 nodosités racinaires, des feuilles (procédure détaillée plus loin), 1 carotte de sol à la base des troncs (même procédure que précédemment). Dans la mesure du possible, les feuilles d'une plante de référence non fixatrice située à proximité de l'aulne échantillonné ont été également prélevées. Les carottes ont été mélangées à l'échelle du bloc pour former 16 échantillons composites de sol.

Tableau III.1. Récapitulatif des sites et stades de successions écologiques échantillonnés. Le stade transitoire d'aulnaie mosaïque était absent dans l'aulnaie de la Madeleine. Les aulnaies de la Croix de Fer et du site II du Lautaret, plus jeunes, ne présentaient pas encore de stade d'aulnaie dense.

			Stade écologique échantillonné		
		Phénotype	Prairie	Mosaïque	Dense
Lautaret	Madeleine	Sp+	x		x
	Site I	Sp+	x	x	x
	Site II	Mixte	x	x	
	Croix de Fer	Mixte	x	x	

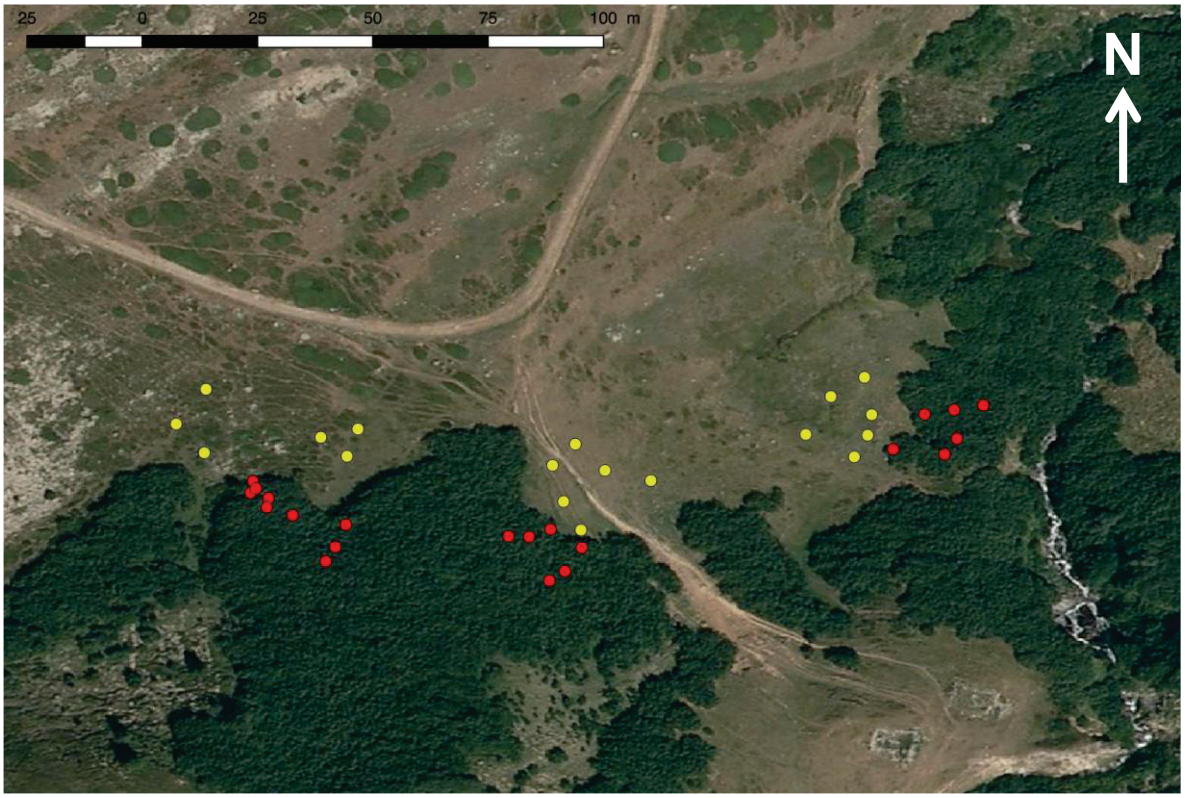


Figure III.3. Cartographie du plan d'échantillonnage dans l'aulnaie de la Madeleine. Les points en rouge correspondent aux prélèvements de sol dans la zone dense et vieille de l'aulnaie, et ceux en jaune correspondent à ceux effectués la prairie adjacente dépourvue d'aulne.

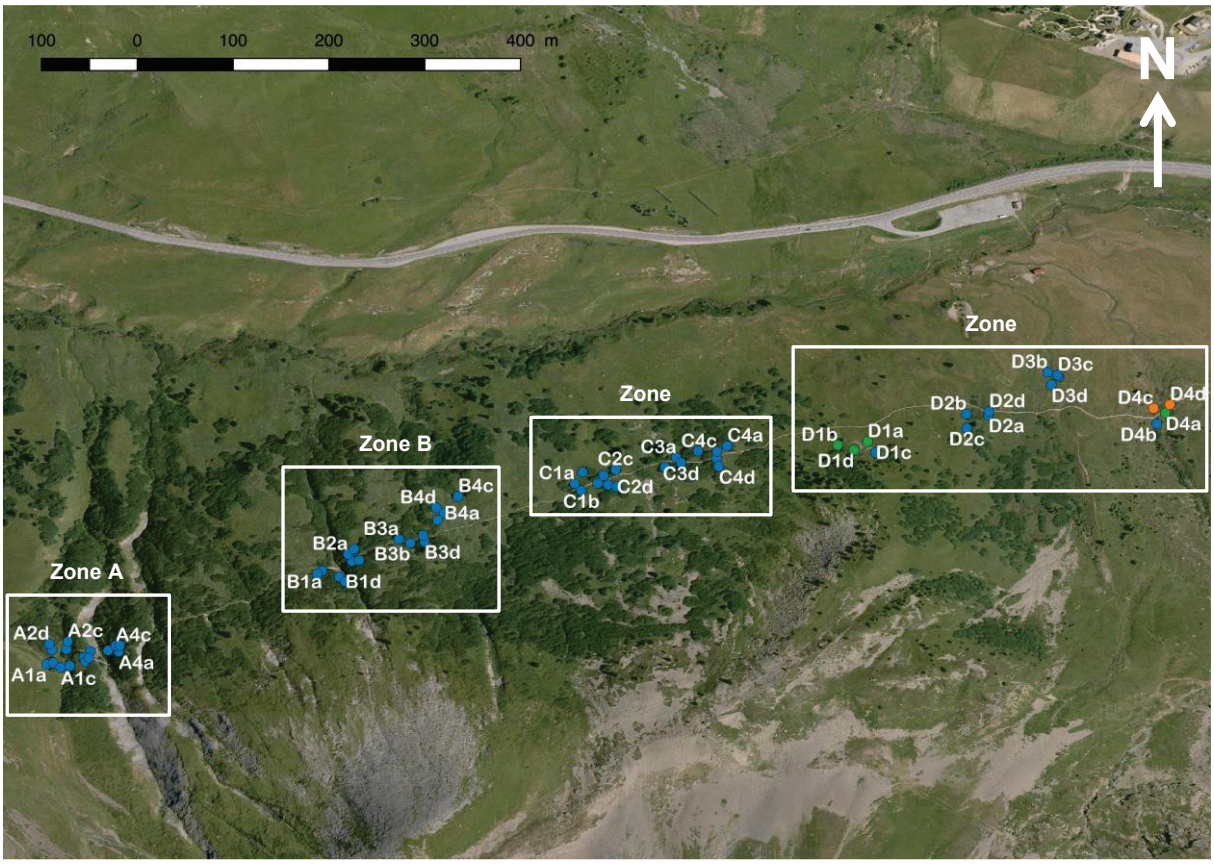


Figure III.4. Cartographie du plan d'échantillonnage d'été 2017 sur le site du Lautaret I. L'aulnaie a été découpée en 4 zones à densité d'aulne croissante, de la zone A à la zone D. Du fait de la plus faible densité observée sur la zone D, les prélèvements sont plus dispersés. Quatre blocs ont été dessinés par zone et numérotés de 1 à 4. Quatre arbres numérotés a, b, c, d ont été échantillonnés dans chaque bloc, et 2 nodosités par arbre ont été prélevées. Tous les points de prélèvements figurent sur la carte sous la forme de rond. Par soucis de lisibilité de la carte, toutes les étiquettes de ces points de prélèvements ne sont en revanche pas affichées. La couleur bleue des ronds indique des nodosités phénotypées Sp+, la couleur verte des nodosités phénotypées Sp- et la couleur orange un mélange de nodosités Sp+ et Sp-.

Tous les échantillons de sol ont été tamisés à 2 mm sur le terrain et conservés à +4°C pour analyses ultérieures. De retour au laboratoire, chaque échantillon a été divisé en 3 portions, une pour des analyses pédologiques (Laboratoire CESAR, Ceyzeriat, France et Institut des Sciences Analytiques, UMR 5280, Lyon, France), une pour des mesures d'activités enzymatiques (Plateforme AME, Laboratoire d'Ecologie Microbienne, Lyon, France), et une dernière congelée à -20°C pour des analyses moléculaires et élémentaires d'isotope (^{15}N).

Les mesures potentielles d'activité de nitrification et dénitrification (NEA et DEA) ont été mesurées comme décrit par Dassonville *et al.* (2011) et Patra *et al.* (2005) respectivement, selon le protocole précédemment détaillé dans la première partie de ce chapitre (Schwob *et al.*, 2017). Sur chacun des 43 échantillons de sol des deux campagnes,

l'ammonium et le nitrate ont été extraits avec une solution de chlorure de calcium (10 mM), 12 ml de $CaCl_2$ étant ajouté à 3 g équivalent sol sec. Le sol a été agité à 140 rpm pendant 2 h à 10°C. Les suspensions ont été filtrées et conservées à -20°C avant les mesures de la quantité de NH_4^+ par chromatographie ionique (Thermo Scientific™ Dionex™ ICS-900 passeur AS, France).

Mesure de la fixation symbiotique d'azote

Mesures d'ARA : L'activité de fixation symbiotique d'azote des nodosités racinaires a été mesurée directement sur le terrain par le test de réduction d'acétylène (ARA, *Acetylene Reduction Assay*) à l'automne 2016 et l'été 2017. Durant la campagne d'octobre 2016 quinze mesures au total ont été réalisées sur les sites de la Madeleine, du Lautaret et de la Croix de Fer. Pour chacune d'elle des nodosités provenant de 3 arbres différents dans une aire de 10 m de diamètre maximum, ont été rassemblées dans un flacon plasma de 150 mL. Durant la campagne de juillet 2017, l'effort a porté sur le site Laul qui présentait un gradient depuis le stade pionnier jusqu'au stade forêt dense et où un mélange d'arbres Sp+ et Sp- avaient été détecté. Quatre zones (A, B, C et D) ont été définies avec quatre blocs dans chaque zone (1, 2, 3 et 4) (Figure III.4). Dans chaque bloc, 4 arbres ont été prélevés à raison de deux nodosités par arbre pour un total de 8 nodosités. Chacun de ces 16 lots de 8 nodosités a été placé dans un flacon plasma. Six échantillons supplémentaires ont été réalisés au Col de la Croix de Fer fin juillet 2017. Chaque échantillon était composé de 2 nodosités provenant de 3 arbres différents dans une zone de 10 m de diamètre maximum.

Pour les mesures d'ARA, de l'acétylène est rajouté dans les flacons à raison de 10% du volume total, ce qui assure la saturation du système enzymatique de la nitrogénase. Afin de réaliser une cinétique sur 1H, un aliquot de 3 mL est prélevé toutes les 15 min du flacon plasma. Les échantillons sont stockés dans des tubes VENOJECT® préalablement passés sous vide puis saturés en diazote. Les tubes sont ramenés au laboratoire et stockés à 4°C jusqu'à analyse et leur contenu en éthylène est analysé par chromatographie en phase gazeuse (Girdel 30). Les mesures d'activité ont été exprimées en µg de C_2H_4 produit par heure, et par gramme de nodosité sèche, après séchage des nodosités 48h à 60°C.

Mesures de $\delta^{15}N$: Contrairement à la mesure d'ARA qui est une mesure ponctuelle et potentielle, la mesure du $\delta^{15}N$ permet une estimation de la fixation d'azote globale de la plante et à l'échelle d'une saison de végétation. Des feuilles, provenant de différents individus d'aulne vert et de plantes ligneuses non fixatrices (plantes de référence), ont été prélevées. Afin d'obtenir un signal isotopique représentatif de la plante, les feuilles prélevées proviennent des 4 points cardinaux d'une plante et à différentes hauteurs du sol (Domenach *et al.*, 1989). Les feuilles ont été ensuite séchées à 60°C pendant 48h avant d'être réduites

en poudre homogène par broyage mécanique à billes d'acier (Mixer Mill MM 200 Retsch®) 30 secondes à puissance maximale. Le dosage de l'azote ^{14}N et ^{15}N a été réalisée sur 1,5 mg de masse sèche de feuilles par analyseur élémentaire (AE, Thermo Flash EA1112) à combustion-pyrolyse couplée à un spectromètre de masse de rapports isotopiques (SMRI, Thermo Delta V Plus). Un étalon de contrôle certifié (USGS 40, $\delta^{15}N$: -4.40%) a été passé toutes les 10 mesures. Ces analyses ont été réalisées dans le cadre d'une collaboration avec l'Institut des Sciences Analytiques UMR 5280 (ISA) de Lyon.

Une mesure de $\delta^{15}N$ de la matière organique du sol a également été réalisée sur 3 mg de chacun des 16 échantillons composites de sol de la campagne d'été 2017, après décongélation, séchage à 60°C pendant 72h et tamisage à 1mm.

Détermination du phénotype de sporulation

La proportion de nodosités Sp+ et Sp- a été estimée sur un sous-échantillonnage des nodosités pour les mesures d'automne, et sur l'intégralité des nodosités pour les mesures d'été. Le phénotype de sporulation des nodosités racinaires prélevées a été déterminé par observation au microscope optique de coupes histologiques de nodosités, colorées au bleu de Lactophénol, comme précédemment décrit dans Pozzi *et al.* (2015).

Afin d'éviter les faux-négatifs dus à la non-expression de la sporulation à un moment donné dans des conditions données, pour chaque nodosité phénotypée Sp-, une confirmation a été réalisée par génotypage sur le gène *pgk,* selon la procédure décrite notamment dans le chapitre I de ce manuscrit.

Extraction ADN, amplification et metabarcoding

L'extraction de l'ADN génomique des échantillons de sol, l'amplification des gènes bactériens ADNr 16S et *nifH*, et le séquençage haut-débit Illumina® Miseq ont été réalisés selon les mêmes procédures décrites dans la première partie du chapitre (Schwob *et al.*, 2017). Les fichiers de résultats de séquençage sont en cours de traitement bioinformatique.

Quantification des groupes fonctionnels

Les mélanges réactionnels utilisés pour la quantification par qPCR des micro-organismes nitrifiants (bactéries et archées oxydant d'ammonium) et des dénitrifiants sont ceux décrits dans Attard *et al.* (2011) et Le Roux *et al.* (2013). Pour chaque gène, des dilutions en série des extraits d'ADN génomique de sol ont été testées afin d'éviter des inhibitions des PCR. Pour chaque échantillon, une dilution optimale de 1:64 a été utilisée, pour 2 µL de matrice d'amplification. Des dilutions en série du plasmide allant de 10^1 à 10^7 copies de gène par µL et contenant respectivement les différents gènes ont été utilisés comme standard. Les amplifications PCR ont débuté par une activation initiale de l'enzyme à 95°C pendant 10 min

(*nirK*, *nirS*, *amoA* (AOA), *amoB* (AOB)). Afin de confirmer la spécificité après chaque PCR, une courbe de fusion et une migration sur gel d'agarose 2% marqué au bromure d'éthidium (BET) ont été effectués pour valider la taille du fragment amplifié. Les efficacités (Eff) des amplifications ont été calculées à partir de la courbe standard avec la formule Eff = $[10^{(-1/slope)}-1]*100$ % et les valeurs suivantes ont été obtenues : *amoA* – AOB 93-95%, *amoA* – AOA 91-98%, *nirS* 99-100%, *nirK* 94-99%.

Analyses statistiques

Des analyses en composantes principales ont été réalisées sur les données de pédologie des différents stades de succession écologique de l'aulne, avec le package FactorMiner 1.29 dans le logiciel R (version 3.3.2). La significativité des différences observées entre les différents stades de succession écologique de l'aulne a été testée par des analyses multivariées permutatives de variance (PERMANOVA) sur la matrice des propriétés du sol, avec la fonction *adonis* du package Vegan 2.4-2. Les tests de corrélations ont été réalisés avec le package Stats et la fonction *cor.test*, en utilisant le coefficient de corrélation de Pearson ou Spearman selon la normalité des données. Les comparaisons de variables ont été effectuées soit par le test de student et ANOVA, soit par les tests de Wilcoxon et de Kruskal-Wallis, selon les conditions de normalité et d'homoscédasticité des données.

3. Résultats et discussion

3.1 Stade de l'aulnaie et phénotype de sporulation

Dans l'aulnaie Mad, sur 49 nodosités analysées et réparties sur 15 arbres différents, 97% ont été phénotypées comme Sp+, soit une seule nodosité Sp-. L'aulnaie Cf était précédemment connue pour abriter des nodosités majoritairement Sp-, avec seulement 2 nodosités Sp- sur 30 nodosités analysées sur au moins 25 arbres différents, soit 6.7% de Sp+. Dans le cadre de cette campagne, la fréquence Sp+ calculée sur 36 nouvelles nodosités a été de 8.9%.

Les deux sites de l'aulnaie du Lautaret (Lau1 et Lau2) n'avaient encore jamais été diagnostiqués de manière rigoureuse. Le site Lau 1 correspond à la zone de l'aulnaie du Lautaret la plus éloignée et la plus vieille par rapport à la station alpine du col et le site Lau2 à la zone jeune en expansion. Sur le site Lau1, 89 nodosités récoltées sur 19 arbres différents ont donné une fréquence de 87,6%. Sur le site Lau2, 189 nodosités récoltées sur au moins 64 arbres différents ont donné une fréquence Sp+ de 77,8%.

Les quatre aulnaies choisies pour notre étude présentaient des stades de développement très divers. Comparée aux trois autres, l'aulnaie Mad est celle dont le stade de développement est le plus avancé, avec une canopée totalement close, constituée de

vieux arbres de taille importante (3-4 mètres), réunis en souches comportant un nombre élevé de troncs (souvent autour de 10). A l'inverse, l'aulnaie de la Croix de Fer est une aulnaie encore jeune, essentiellement au stade mosaïque, avec des arbres de plus petites tailles et un nombre de souche par individu plus faible. Il n'y a pas de zone d'aulnaie dense à proprement parler, un début de fermeture de la mosaïque est observé au niveau de quelques îlots. La fréquence Sp+ de l'aulnaie Mad et la faible fréquence Sp+ de l'aulnaie Cf (uniquement quelques nodosités Sp+ dans les îlots plus denses), vont dans le même sens que les études précédentes en montrant 100% de souches Sp- sur des sites récemment ouverts à la colonisation (Holman and Schwintzer, 1987), contrairement aux milieux colonisés de longue date présentant une forte fréquence Sp+ (Weber, 1986). Nos résultats appuient donc l'hypothèse selon laquelle la fréquence Sp+ augmenterait avec l'âge de l'aulnaie. Cette distribution serait en lien avec le caractère saprophytique des souches Sp-, qui leur permettrait de croître dans un sol en l'absence de plante-hôte, tandis que les souches Sp+, de par leur statut de symbiote obligatoire, seraient dépendantes de la présence d'un hôte compatible pour se maintenir à l'échelle d'un site (Pozzi, 2014). La présence constante de l'hôte pendant de longues périodes (jusqu'à 400 ans dans l'aulnaie de Champagny en Vanoise) favoriserait l'installation et le développement des communautés Sp+. Lors de sa dégénérescence une nodosité Sp+ relarguerait dans la rhizosphère de l'aulne un nombre élevé de particules infectieuses, les spores (Cotin-Galvan), qui augmenteraient d'une part la dispersion spatiale de la souche et, d'autre part sa capacité de résistance dans le sol en attendant l'infection d'une nouvelle racine compatible.

Le site Lau1 présente un stade de développement et une fréquence Sp+ dans les nodosités relativement similaires à l'aulnaie de la Madeleine. Contrairement au site Mad, l'absence de pâturage dans certaines zones *a priori* moins accessibles de l'aulnaie a permis la progression de cette dernière comme le montre la présence de bosquets en mosaïques en bordure de la forêt dense. Les quelques nodosités Sp- ont été retrouvées sur ces individus formant cette mosaïque.

Le site Lau2 étant un amalgame de zones denses à l'ouest de l'aulnaie et de zones mosaïques en expansion à l'est, une fréquence Sp+ plus faible y était attendue, avec un gradient d'ouest en est lié à la densité de l'aulnaie. Notre échantillonnage a bien révélé la présence de quelques bosquets d'aulnes présentant des nodosités Sp-, et regroupés dans la zone D à l'est du site, mais avec un schéma de distribution plus complexe qu'initialement attendu. En effet, même de très jeunes aulnes pionniers localisés à l'extrême Est de l'aulnaie et attendus Sp- présentaient en fait des nodosités Sp+ (Figure III.5). En l'état, notre échantillonnage n'a pas permis d'obtenir le gradient attendu avec seulement 2 points (*i.e.* deux flacons de mesure ARA) contenant des nodosités Sp- à hauteur de 50 et 75%, pour 14 contenant 100% de nodosités Sp+. Cet échantillonnage ne permettant pas une analyse

statistique solide, des prélèvements de nodosités supplémentaires selon des transects nord/sud seraient maintenant nécessaires pour compléter la compréhension de la distribution des nodosités Sp- sur ce site et pouvoir conclure sur la différence éventuelle de fixation entre Sp+ et Sp- sur ce site.

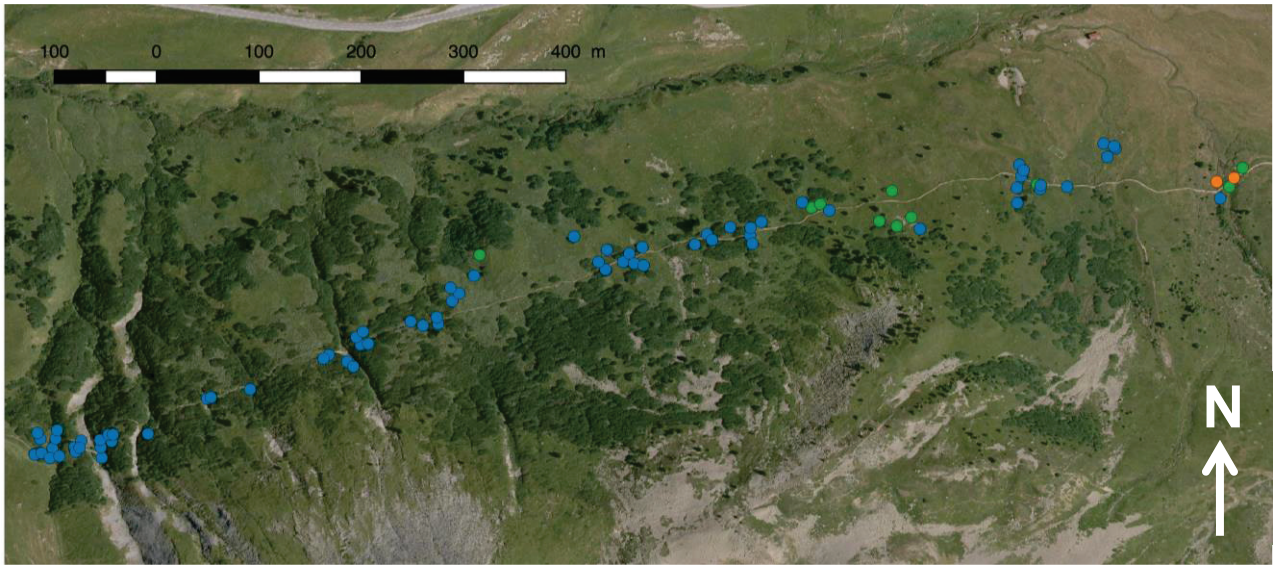


Figure III.5. Cartographie globale du phénotype de sporulation des nodosités des aulnes du site I du Lautaret.

Sont respectivement représentés en bleu, vert et orange, les arbres présentant des nodosités Sp+, Sp- ou mixte. Cette carte regroupe les prélèvements effectués dans le cadre de la campagne d'échantillonnage exploratoire de juin 2016, et des deux campagnes qui ont suivies en automne 2016 et été 2017.

3.2 Impact du stade de colonisation sur les propriétés du sol

Les résultats des analyses de sol sont présentés dans le tableau III.2. Une analyse en composante principale a été effectuée sur les caractéristiques pédologiques mesurées entre les 4 sites échantillonnés et les différents stades écologiques de colonisation de l'aulne (prairie, mosaïque et dense). Le site de Cf présente une pédologie marginalement différente des 3 autres (PERMANOVA, F=2.48, R^2=0.24, p=0.07). Trois variables du sol semblent expliquer cette structure, le rapport C/N, et la teneur en phosphore et la teneur en potassium. La taille de notre échantillonnage ne permet cependant pas de conclure à une différence significative de la teneur en phosphore et en potassium en fonction du site et ou de la présence de l'aulne. En revanche, le rapport C/N est significativement supérieur sur le site Cf par rapport au site Mad (Wilcoxon, p=0.005). Le développement de l'aulne est connu pour abaisser le rapport C/N du sol de part un enrichissement massif constant avec une litière riche en azote (Hiltbrunner *et al.*, 2014; Schwob *et al.*, 2017). Par ailleurs, le processus de fixation biologique d'azote étant très gourmand en phosphore (Sprent, 1987), une limitation en phosphore a pu être observée dans les sols sous aulnaie (Uliassi and Ruess, 2002;

Gökkaya *et al.*, 2006). Ainsi, cette aulnaie de Cf étant plus jeune et dans un stade de développement plus précoce que les 3 autres, ceci expliquerait un C/N plus haut et une disponibilité en phosphore dans le sol plus importante.

Tableau III.2. Caractéristiques pédologiques des sols.

Les valeurs moyennes et les écart-types sont présentés pour le pH (eau et KCl), la matière organique (MO), le carbone total (C), l'azote total (N), le rapport carbone/azote (CN), la capacité d'échange cationique (CEC), le calcium (Ca), le potassium (K), le magnésium (Mg) et le phosphore (P).

Site	Stade	pH (eau)	pH (KCl)	MO (g.kg^{-1})	C (g.kg-1)	N (g.kg-1)	CN	CEC (méq.kg^{-1})	Ca (g.kg-1)	K (g.kg-1)	Mg (g.kg-1)	P (g.kg-1)
Lau 1	Dense	6.16 ± 1.56	5.68 ± 1.72	86.64 ± 14.32	50.37 ± 8.32	4.69 ± 0.72	10.67 ± 0.58	149.87 ± 28.78	4.68 ± 3.41	0.07 ± 0.01	0.11 ± 0.02	0.02 ± 0.01
	Mosaïque	5.88 ± 0.23	5.38 ± 0.38	107.32 ± 32.73	62.39 ± 19.03	5.56 ± 1.46	11.33 ± 0.58	170.99 ± 28.40	3.94 ± 0.37	0.10 ± 0.04	0.15 ± 0.06	0.02 ± 0.02
	Prairie	5.24 ± 0.09	4.32 ± 0.19	96.24 ± 14.09	55.95 ± 8.19	5.10 ± 0.62	11.00 ± 2.00	161.51 ± 22.90	2.21 ± 0.46	0.10 ± 0.01	0.19 ± 0.04	0.01 ± 0.01
Lau 2	Mosaïque	5.12 ± 0.13	4.26 ± 0.11	113.96 ± 60.85	66.26 ± 35.38	5.35 ± 2.58	12.33 ± 2.08	176.32 ± 58.92	1.85 ± 0.82	0.16 ± 0.11	0.23 ± 0.16	0.03 ± 0.01
	Prairie	5.08 ± 0.33	4.25 ± 0.40	125.18 ± 37.58	72.78 ± 21.85	5.95 ± 0.84	12 + 2.00	185.58 ± 36.25	1.87 ± 0.78	0.13 ± 0.06	0.22 ± 0.12	0.01 ± 0.01
Mad	Dense	4.52 ± 0.23	3.78 ± 0.11	74.87 ± 11.86	43.53 ± 6.90	4.20 ± 0.70	10.33 ± 0.58	141.11 ± 24.61	1.04 ± 0.45	0.28 ± 0.37	0.08 ± 0.01	0.02 ± 0.01
	Prairie	5.61 ± 0.84	4.82 ± 1.05	86.93 ± 20.63	50.54 ± 12.00	5.03 ± 0.79	10.00 ± 1.73	152.26 ± 22.31	2.78 ± 2.18	0.08 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.02 ± 0.02
Cf	Mosaïque	4.80 ± 0.18	3.89 ± 0.15	97.11 ± 15.57	56.46 ± 9.05	3.79 ± 0.70	15.00 ± 1.00	175.05 ± 1.56	0.76 ± 0.24	0.11 ± 0.03	0.13 ± 0.04	0.04 ± 0.03
	Prairie	4.74 ± 0.15	3.82 ± 0.15	117.09 ± 13.79	68.08 ± 8.02	4.53 ± 0.85	15.00 ± 1.00	178.39 ± 11.83	0.65 ± 0.30	0.13 ± 0.03	0.14 ± 0.03	0.05 ± 0.04

Contrairement à ce qui était attendu, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les différents stades écologiques de colonisation de l'aulne au sein d'un site ou tous sites confondus (PERMANOVA, F=2.35, R^2=0.16, p=0.11), et quel que soit le phénotype de sporulation majoritairement présent dans les nodosités (PERMANOVA, F=2.35, R^2=0.16, p=0.11) (Figure III.6). Plusieurs hypothèses, comme l'histoire agropastorale et écologique du sol, pourraient expliquer l'absence de patron pédologique en réponse à l'expansion de l'aulne (précédemment détaillées Schwob *et al.* (2017)).

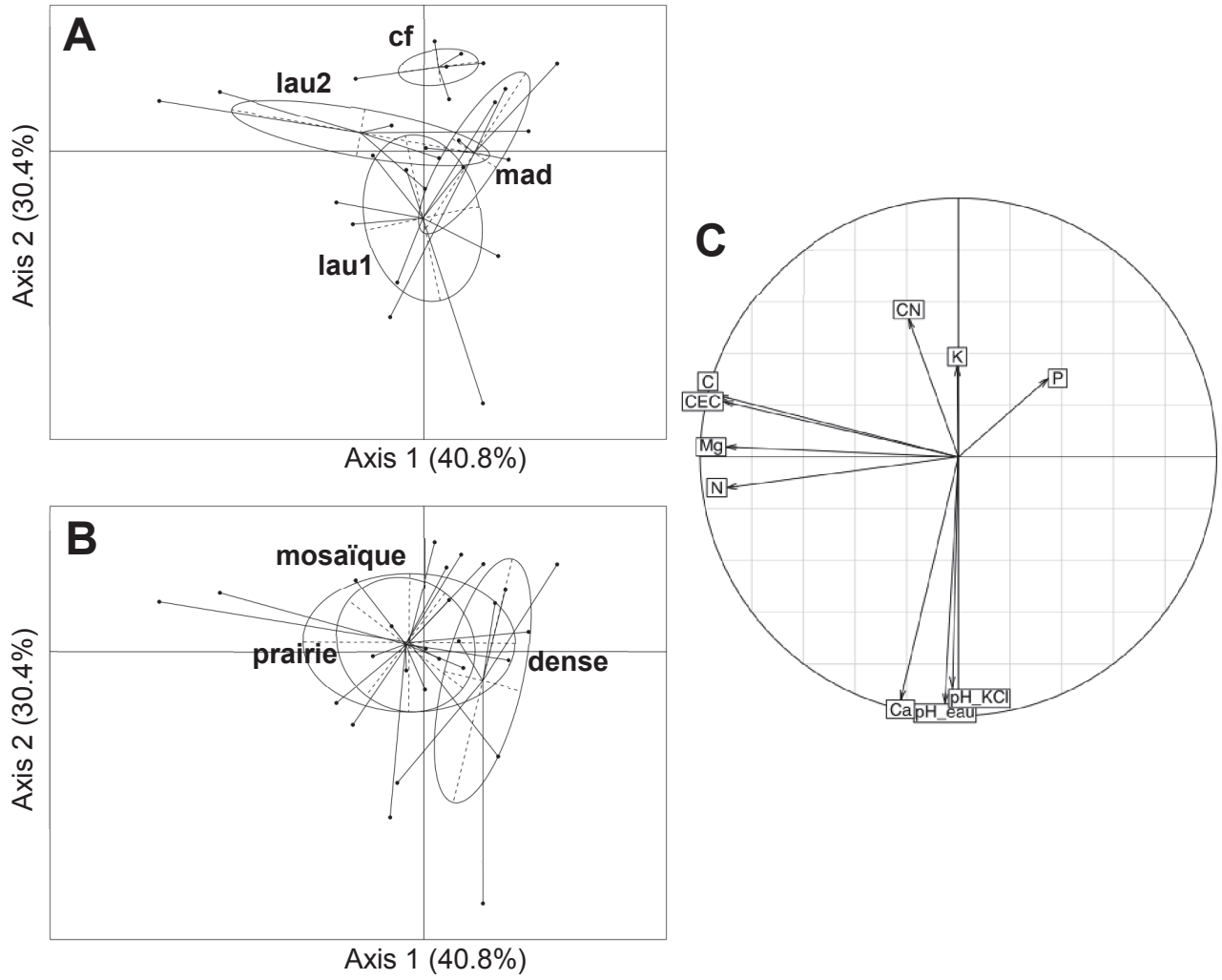


Figure III.6. Analyse en composantes principales interclasse réalisée sur les données de pédologie des 4 sites d'étude (Mad, Lau 1, Lau 2, Cf). Les données sont regroupées en fonction du site (A) et du stage écologique de colonisation de l'aulne (B). Les paramètres explicatifs de la distribution sont représentés sous forme de vecteur en (C). Le pourcentage de la variance expliqué est indiqué sur chacun des deux axes.

3.3 Diversité et abondance des communautés

Les données de séquençage haut-débit en metabarcoding sur les gènes ADNr 16S et *nifH* sont en cours d'analyse et ne sont pas présentées ici.

Les résultats de qPCR sont présentés dans le tableau III.3.

Tableau III.3. Quantification dans le sol des gènes *amoA* archéen et bactérien d'oxydation de l'ammonium (AOA et AOB) et des gènes bactériens *nirK* et *nirS* de réduction des nitrites.

Les données sont exprimées en log du nombre de copies par gramme de sol sec.

Site	Stade	AOA	AOB	nirK	nirS
Croix de Fer	Prairie	5.62 ± 0.47	4.57 ± 1.66	7.04 ± 0.02	6.82 ± 0.05
	Mosaïque	6.33 ± 0.14	6.86 ± 0.57	7.03 ± 0.09	6.74 ± 0.11
Lautaret 1	Prairie	4.64 ± 1.20	3.76 ± 0.79	7.30 ± 0.18	6.63 ± 0.23
	Mosaïque	6.28 ± 0.28	7.18 ± 0.26	7.85 ± 0.17	7.82 ± 0.24
	Dense	6.54 ± 0.08	7.29 ± 0.11	7.58 ± 0.21	7.04 ± 0.36
Lautaret 2	Prairie	5.38 ± 1.06	5.37 ± 1.06	7.15 ± 0.16	6.54 ± 0.09
	Mosaïque	5.61 ± 0.10	6.03 ± 0.27	7.29 ± 0.06	6.71 ± 0.05
Madeleine	Prairie	6.15 ± 0.45	4.74 ± 1.32	7.13 ± 0.14	6.88 ± 0.31
	Dense	7.64 ± 0.29	6.93 ± 0.15	6.93 ± 0.09	6.64 ± 0.03
Tous sites	Prairie	5.40 ± 0.42	4.61 ± 0.56	7.15 ± 0.07	6.72 ± 0.09
	Mosaïque	6.07 ± 0.15	6.69 ± 0.26	7.39 ± 0.13	6.91 ± 0.12
	Dense	7.09 ± 0.28	7.11 ± 0.12	7.26 ± 0.18	6.84 ± 0.18

Aucune différence significative n'a été observée entre les sites au niveau de l'abondance du gène *amoA* archéen (AOA) (Kruskal-Wallis, p=0.10) ou bactérien (AOB) (Kruskal-Wallis, p=0.69). En revanche, des abondances significativement différentes sont mesurées pour les deux gènes selon les stades écologiques de succession écologique tous sites confondus (Kruskal-Wallis, AOA p=0.03, AOB, p=0.004), ainsi qu'entre les stades prairie et dense du site de la Madeleine pour AOA (Kruskal-Wallis, p=0.05). Pour l'abondance du gène *nirK*, seules les différences entre sites sont significatives (Kruskal-Wallis, p=0.004). Aucune différence significative n'est mesurée dans l'abondance du gène *nirS*, que ce soit entre les sites (Kruskal-Wallis, p=0.39), entre les trois stades de succession écologique tout site confondu (Kruskal-Wallis, p=0.27), ou entre les stades au sein d'un site (Kruskal-Wallis, Lau1, p=0.31, Lau2, p=0.19, Mad, p=0.52, Cf, p=0.52). Enfin, les abondances des gènes AOA et AOB ne sont pas significativement différentes selon le stade de succession écologique (Wilcoxon, forêt, p=0.9, mosaïque, p=0.08, prairie, p=0.32).

Une forte variabilité est observée à l'échelle des sites limitant la détection d'un patron, cependant ces données complètent les résultats précédemment obtenus dans Schwob *et al.*

(2017) en montrant que l'abondance des communautés nitrifiantes bactériennes, et pour la première fois archéennes, semble impactées positivement par la présence de l'aulne. Des fluctuations de l'abondance des communautés nitrifiantes ont été décrites en réponse à des changements de couvert végétal et de disponibilité en substrat (Henry, 2008; Tai *et al.*, 2014). La plus forte abondance observée sous couvert de l'aulne pourrait ainsi être due à une plus forte disponibilité de substrat, notamment nitraté comme précédemment présenté (Wang *et al.*, 2015b). Plusieurs études ont montré des abondances de nitrifiants archéens supérieures aux nitrifiants bactériens, leur supposant un rôle majeur dans la nitrification des environnements moins favorables aux bactéries, notamment dans les milieux froids et/ou acides comme les milieux alpins (Zhang *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2012a; Beman and Hayden, 2013; Tai *et al.*, 2014). Cependant, des variations de ratio AOA/AOB ont été observées au cours de l'année en lien supposé avec les variations saisonnières du climat, notamment avec un écart maximum au milieu de l'hiver (Wang *et al.*, 2012a). Ceci pourrait ainsi expliquer l'absence de différence dans les abondances AOA et AOB de notre étude et justifierait une cinétique d'échantillonnage sur l'année sur les différents stades écologiques de succession.

3.4 Fonctionnement du cycle de l'azote

Dans notre étude, le fonctionnement du cycle de l'azote a été estimé par les teneurs en ammonium et en nitrate ainsi que par les activités de nitrification et dénitrification. Pour le NH_4^+ comme pour le NO_3^-, la même tendance est observée avec des teneurs croissantes du stade prairie au stade aulnaie dense (Figure III.7, A et B), ces différences étant significatives pour le nitrate (ANOVA, F=13.77, p=0.0002) mais pas pour l'ammonium (ANOVA, F=2.037, p=0.16). Le regroupement des données des stades mosaïque et aulnaie dense d'une part et prairie d'autre part montre toutefois que la présence de l'aulne aurait un impact sur la teneur en NH_4^+ (Test de Student, p=0.055).

Des différences significatives de la teneur en nitrate entre les différents sites (ANOVA, F=2.52, p=0.003, données non présentées) sont observées avec les teneurs les plus basses sur les deux aulnaies les plus jeunes (Cf et Lau2 avec une valeur moyenne de 0,17 mg N-NO_3^-/L) et les teneurs plus hautes dans les aulnaies les plus âgées (Mad et Lau1 avec une valeur moyenne de 1,23 mg de N-NO_3^-/L).

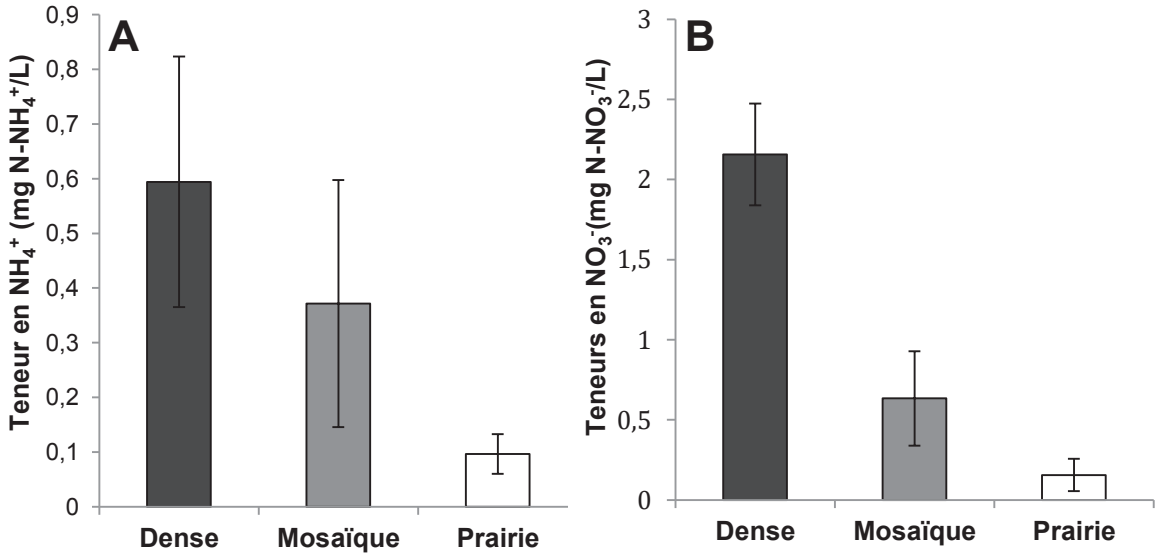


Figure III.7. Teneurs en ions ammonium NH_4^+ (A) et ions nitrate NO_3^- (B) dans le sol en fonction du stade écologique de colonisation de l'aulne. Les valeurs sont exprimées en mg de N-NH_4^+/L.

Ces résultats suggèrent que la présence et la densification des aulnes sur un site s'accompagnent d'une accumulation d'azote minéral dans les sols, résultant d'une demande (absorption végétale) inférieure aux apports (retours d'azote au sol et sa minéralisation). Le bilan positif excédentaire du NO_3^- dans le sol pourrait trouver son explication dans les mesures de fixation d'azote par isotopie naturelle ^{15}N qui suggèrent une alimentation de l'aulne presque exclusivement assurée par la fixation d'azote (voir paragraphe 3.5 de ce chapitre). Cette accumulation de nitrate qui peut persister sur plus d'un siècle (Bühlmann *et al.*, 2016), impacte fortement la diversité des communautés végétales adjacentes. Sur certaines parties de l'aulnaie dense des sites Lau1 et Lau2, elle est à l'origine en bordure d'aulnaie d'une mégaphorbiée luxuriante, riche en plantes nitratophiles (Photo et détail des espèces dans partie bibliographique).

Les activités de nitrification potentielles mesurées sont fortement corrélées à la teneur en nitrate des sols (Test de spearman, R^2=0.77, p=2.73 x 10^{-6}), et donc au stade écologique de colonisation de l'aulne (Kruskal-Wallis, p=0.02) et à l'âge de l'aulnaie (Kruskal-Wallis, p=0.02) (Figure III.8). Les activités de dénitrification potentielles ne présentent pas de différence entre les sites (ANOVA, F=1.96, p=0.16), entre les différents stades écologique de colonisation de l'aulne (ANOVA, F=0.6, p=0.56) et entre le stade de développement de l'aulnaie, *i.e.* précoce vs climacique (données non présentées, test de Student, p=0.2). Ces mesures d'activité de nitrification et dénitrification suivent un patron similaire à celui précédemment discuté dans l'aulnaie de la Vanoise (première partie de ce chapitre).

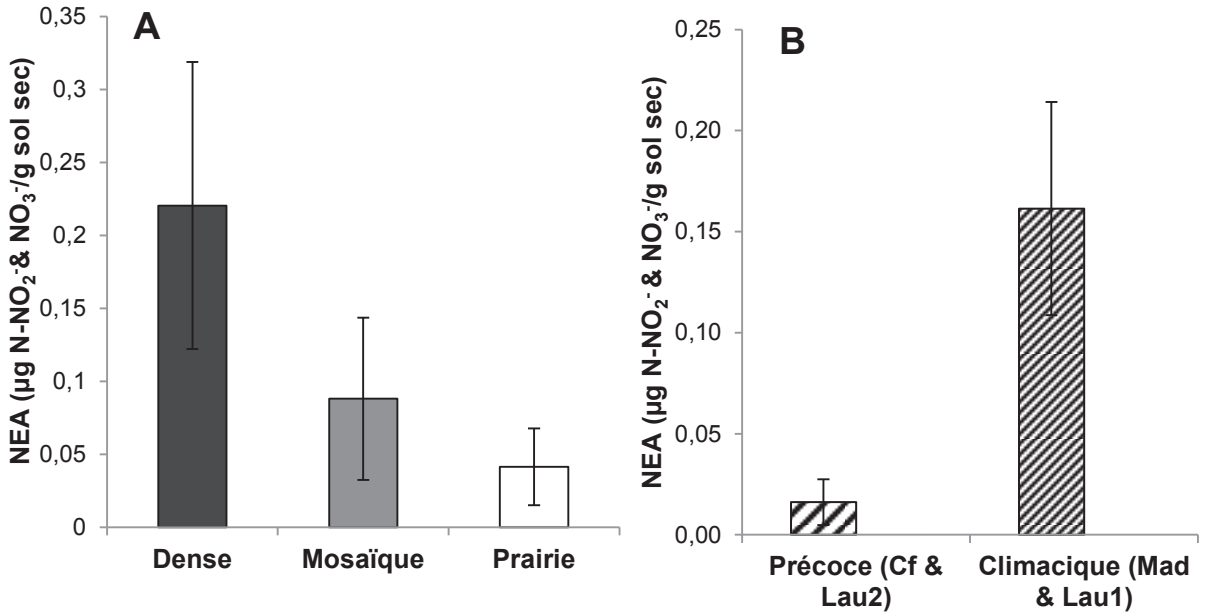


Figure III.8. Activités potentielles de nitrification dans le sol en fonction du stade de colonisation du stade écologique de colonisation de l'aulne (A) et du stade de développement de l'aulnaie (B). Les valeurs sont exprimées en µg de $N\text{-}NO_2^-$ et NO_3^-/g de sol sec.

3.5 Fixation d'azote

3.5.1 Activité de réduction d'acétylène (ARA)

Les valeurs d'ARA mesurées ont été en moyenne de 0,27 µg $C_2H_4.g^{-1}.h^{-1}$ et par heure aux premières neiges de l'automne 2016, et de 11,8 µg $C_2H_4.g^{-1}.h^{-1}$ en pleine saison de végétation de l'été 2017. En utilisant le ratio de la nitrogénase de 3,5:1 entre le N_2 et le C_2H_2 dû au fonctionnement de la nitrogénase avec chacun de ces substrats (Schwintzer and Tjepkema, 1997; Tobita *et al.*, 2013), nous obtenons des valeurs de fixation d'environ 1 à 24

µg $C_2H_4.g^{-1}.h^{-1}$, comparables à celles obtenues par Benecke (1970) en conditions semi-naturelles et à des températures similaires.

Des variations saisonnières significatives sont observées entre les activités de fixation mesurées en automne et en été, sur les sites de Lau et Cf (Figure III.9 A). En effet, les activités de fixation d'été sont environ 17 fois supérieures sur le site de Lau (Wilcoxon, $p=1,63^{e}10^{-5}$), et 6 fois supérieures sur le site de Croix de Fer (Wilcoxon, p=0,05), par rapport aux activités de fixation mesurées en automne. C'est la première fois que des variations saisonnières d'activités de fixation sont mise en évidences sur l'espèce *Alnus alnobetula*, par ailleurs semblables aux patrons de variation précédemment observés sur d'autres espèces d'aulnes des milieux froids, principalement en réponse aux variations de température et d'humidité du sol (*Alnus incana* sp. *tenuifolia* et *Alnus viridis* sp. *fruticosa*) (Uliassi and Ruess, 2002; Anderson *et al.*, 2009; Mitchell and Ruess, 2009b).

Bien que non-significative, une tendance émerge des mesures d'ARA de l'automne moyennées par site, avec une corrélation négative entre l'activité de fixation et le niveau de développement de l'aulnaie (ancienne/dense, intermédiaire ou pionnière), donc la fréquence des souches Sp+ (Figure III.9 B). Dans notre étude, ces 3 types d'aulnaies étaient situés à des altitudes très comparables et les mesures ont été réalisées dans une fenêtre de temps de 10 jours dans des conditions météorologiques semblables. Il est donc peu probable que les différences observées proviennent de facteurs environnementaux ponctuels. Ces résultats corroborent notre hypothèse (*i.e.* capacité de fixation différente entre Sp+ et Sp-), mais ils pourraient également être dus à des écotypes d'aulnes verts différents (Anderson *et al.*, 2009; Mitchell and Ruess, 2009b). Ces premiers résultats ont justifié le second échantillonnage de l'été 2017 en pleine saison de croissance centré sur le site Lau2 (mixte Sp+/Sp-).

Les mesures d'été sur le site Lau2 ont révélé une forte variabilité (Figure III.9 C), allant de 0,67 à 9,21 $C_2H_4.g^{-1}.h^{-1}$ dans les flacons contenant 100% de nodosités Sp+, ce qui couplé au faible nombre de points avec des fréquences Sp+ intermédiaire, empêche de conclure sur un effet du phénotype de sporulation sur l'activité fixatrice potentielle (p=1). Dans de nombreux organismes fixateurs d'azote, la régulation de l'activité réductrice de la nitrogénase se fait au niveau transcriptionnel via les régulateurs *nifL*/*nifA* en réponse aux taux d'oxygène et d'azote NH_4^+ cellulaire (Halbleib and Ludden, 2000). La transcription de *nifA* est sous le contrôle de *ntrBC*, un système régulateur à deux composantes qui régule l'ensemble de la nutrition azotée de la plante expliquant, sur de nombreux systèmes symbiotiques, un rétrocontrôle de la quantité d'azote minéral disponible pour la plante sur la fixation d'azote (Streeter and Wong, 1988; Bowman *et al.*, 1996; Vitousek *et al.*, 2013).

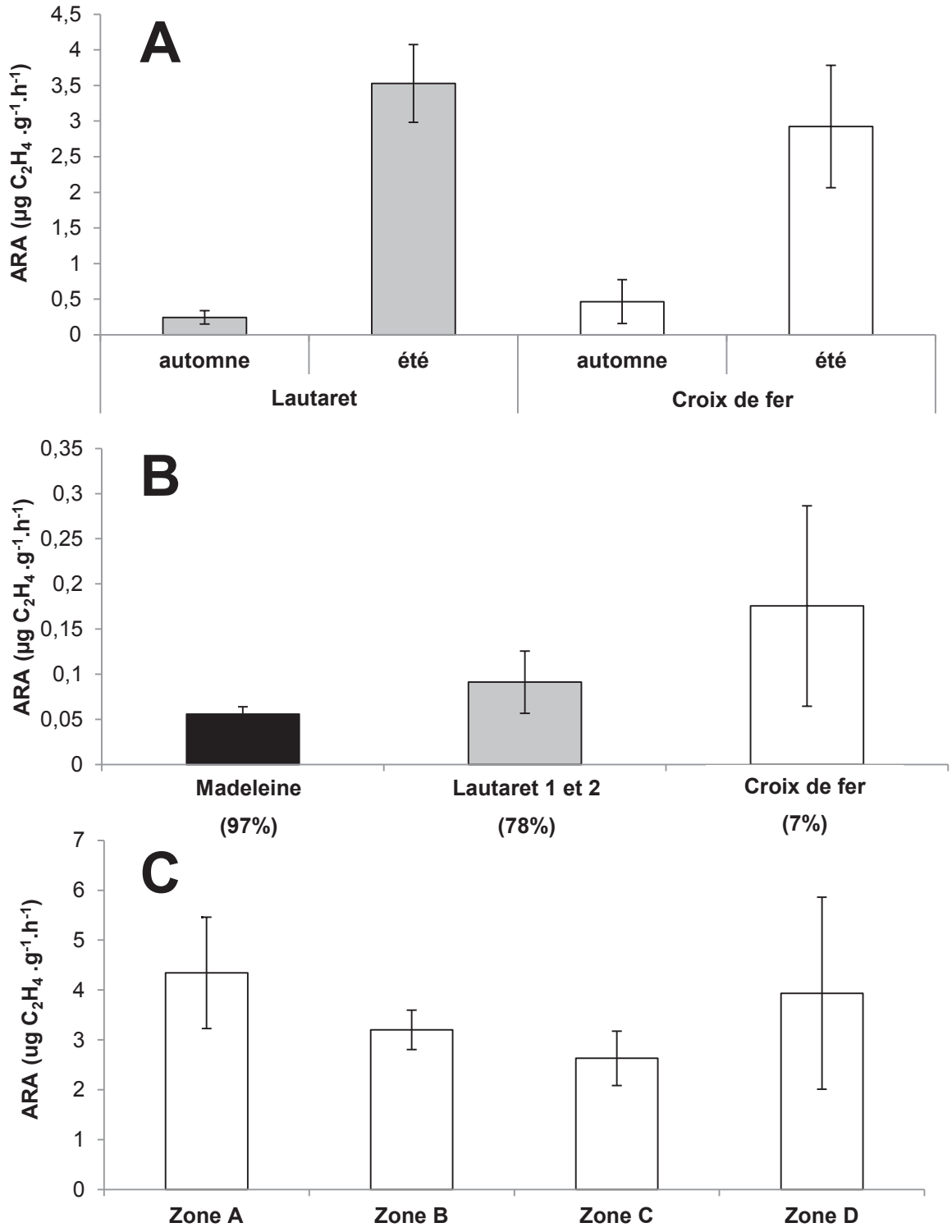


Figure III.9. Mesure des activités de réduction d'acétylène (ARA) en fonction du site et de la saison (A), des sites échantillonnés en automne 2016 et leurs fréquences Sp+ (valeur entre parenthèses) (B), des zones d'échantillonnage d'été 2017 au Lautaret 2 (C). Les valeurs moyennes sont présentées avec les d'erreur correspondant aux erreurs standards. Le gradient de couleur correspond à l'âge de l'aulnaie, du blanc pour l'aulnaie pionnière au noir pour l'aulnaie climacique.

Dans notre étude, les différentes variables pédologiques notamment les quantités d'azote total, d'ammonium et de nitrate n'expliquent pas cette variabilité (respectivement p=0,8, p=0,1 et p=0,3), ce qui suggère une absence de rétrocontrôle de la fixation symbiotique de *Frankia* par la teneur en azote du sol. Du fait de la très forte homogénéité génétique des souches Sp+ sur ce site (données non présentées) et de leur prédominance dans plus de 90% de nos flacons de mesure, l'hypothèse de l'influence du génotype de *Frankia* est exclue pour expliquer la variabilité observée à l'échelle du site.

Trois types de facteurs pourraient expliquer cette variabilité notamment des paramètres géoclimatiques, l'âge des plantes et la méthodologie expérimentale. L'activité fixatrice varie pendant la journée, avec un maximum entre 8h et 12h chez *Alnus nepalensis* (Sharma *et al.*, 2009), et en fonction de la température et l'humidité du sol chez *Alnus incana* sp. *tenuifolia* *Alnus viridis* sp. *fruticosa* et *Alnus nepalensis* (Sharma and Ambasht, 1986; Uliassi and Ruess, 2002; Mitchell and Ruess, 2009a; Sharma *et al.*, 2009). Dans notre étude, les mesures ont été réalisées tout au long de la journée, entre 9h et 17h, mais ni l'heure du début de mesure (p=0,4), ni la température de l'air (p=0,17), ni l'humidité du sol (p=0,27) n'influent sur nos valeurs d'ARA.

L'âge des nodosités, leur morphologie (mono- à multilobé), leur teneur en azote (plus forte dans les vieilles nodosités) et leur teneur en eau ont été démontrés comme des facteurs explicatifs de la variabilité de l'ARA chez *Alnus nepalensis* (Sharma and Ambasht, 1984, 1986; Sharma *et al.*, 2009). Nous n'avons cependant pas observé de corrélation entre la teneur en eau des nodosités et les valeurs d'ARA de nos flacons (p=0,62). Cependant nos mesures ont été réalisées sur un mélange de 8 nodosités (4 arbres différents), dont l'âge et l'état physiologique pouvaient varier dans un même flacon, brouillant ainsi la corrélation.

Sur plusieurs sites en Alaska, il a été démontré que le pourcentage d'azote fixé par la plante (*Alnus incana* sp. *tenuifolia* et *Alnus viridis* sp. *fruticosa*) pouvait varier en fonction du stade de succession et/ou du stade phénologique de l'aulne, avec les activités maximales observées pour les stades de colonisation les plus pionniers (Uliassi and Ruess, 2002; Anderson *et al.*, 2009). Dans notre étude, une tendance inverse, bien que non significative, a été observée sur le site Lau2 (Figure III.9 C), avec des activités de fixation maximales sur la zone A climacique, qui diminuent sur les zones B et C en direction du front de colonisation de l'aulnaie, pour ré-augmenter dans la zone D la plus pionnière. Des âges, et/ou des phénologies d'arbres, très différents à l'échelle d'une même zone d'échantillonnage pourraient ainsi être à l'origine de la forte variabilité observée, notamment dans la zone D.

Enfin, un flacon étant un assemblage de nodosités de 4 arbres plus ou moins éloignés géographiquement, et l'ARA étant connue pour chuter rapidement après le prélèvement de la nodosité sur l'arbre (Minchin *et al.*, 1983), le délai entre la collecte de la 1ère et de la dernière nodosité pour constituer chaque flacon de mesure a pu introduire une variabilité supplémentaire dans nos mesures.

La méthodologie de l'ARA bien qu'étant précise, rapide et bon marché, reste une mesure ponctuelle et potentielle sur une ou plusieurs nodosités excisées, ne permettant pas de déterminer la quantité d'azote fixée à l'échelle d'une saison de végétation, et justifiant ainsi l'utilisation de l'isotopie naturelle ^{15}N.

3.5.2 Isotopie naturelle ^{15}N

Aucune différence significative de $\delta^{15}N$ n'a été observée entre les différentes zones d'échantillonnage (Figure III.10, Kruskal-Wallis, p=0.12), ni entre les arbres présentant des nodosités Sp- et ceux présentant des nodosités Sp+ (Wilcoxon, p=0.65). Nos valeurs présentent une moyenne statistique de 1,79 et sont distribuées autour de la valeur de ^{15}N de l'azote fixé (-1,8) (Figure III.10), valeur qui correspond à la valeur expérimentale retrouvée sur l'aulne cultivé en absence d'azote minéral dans le milieu (Domenach *et al.*, 1988; Domenach *et al.*, 1989). Cette valeur qui est la même quel que soit le $\delta^{15}N$ de l'azote du sol, suggère que dans nos différents sites, la nutrition azotée de l'aulne vert repose à 100% sur la fixation et est complétement indépendante de l'azote du sol.

Par ailleurs, les teneurs en azote total des aulnes présentent une forte variabilité allant de 2,5 à 4 (Figure III.10). Du fait de leur indépendance vis à vis de l'azote du sol, et l'absence de corrélation entre la quantité d'azote fixé et la teneur en azote du sol, l'hypothèse privilégiée est qu'ils auraient fixé des quantités d'azote différentes. Cependant, ni les activités ARA mesurées (p=0.27), ni le phénotype de sporulation des *Frankia* associées (Kruskal-Wallis, p=0.58) n'expliquent ces variations. Le positionnement géographique (combe ombragée ou prairie exposée) et l'environnement immédiat (individu isolé ou aulnaie dense) des arbres sur lesquelles ont été effectuées les mesures peuvent entraîner des variations locales dans l'exposition lumineuse journalière, la disponibilité en phosphore, et qui pourraient expliquer les différences observées dans les quantités d'azote fixées.

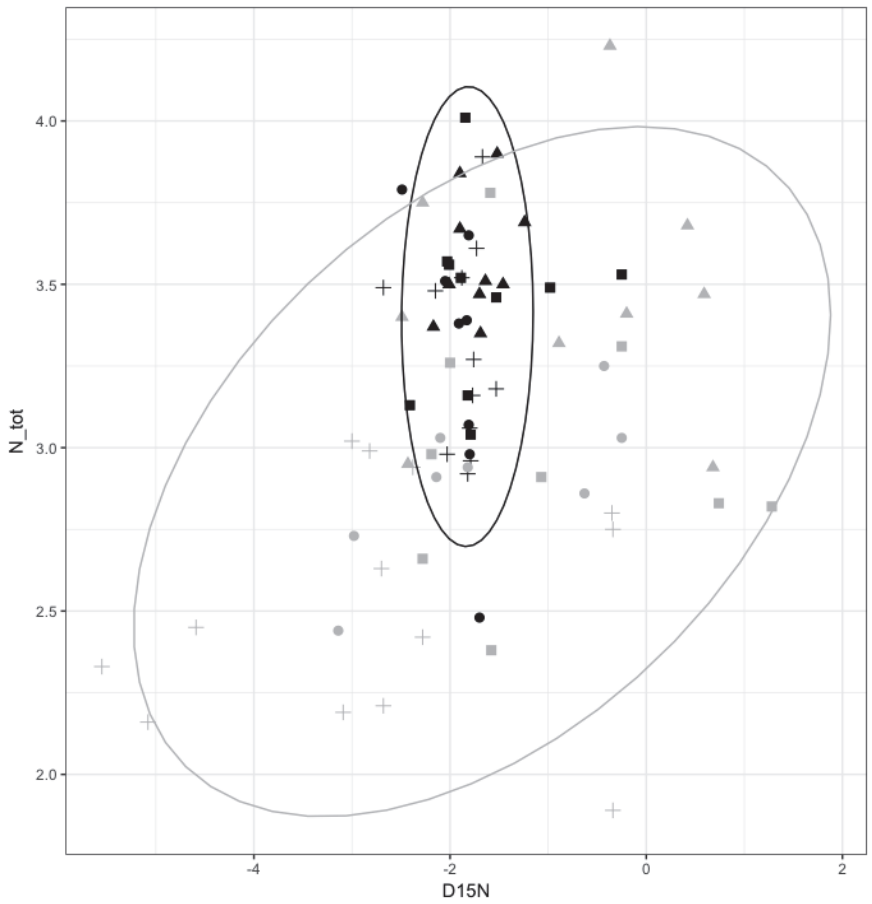


Figure III.10. Valeurs de $\delta^{15}N$ des feuilles prélevées sur du Lautaret 2, en fonction de leurs pourcentages en azote total.

La couleur noire correspond aux mesures effectuées sur l'aulne vert, la grise aux valeurs mesurées sur les plantes de référence candidates. Les ronds, les triangles, les carrés et les croix correspondent respectivement aux zones A, B, C et D.

Rappelons que pour un calcul de la quantité d'azote fixé à l'année, le choix d'un $\delta^{15}N$ d'une plante de référence est nécessaire. Une bonne plante de référence doit présenter une valeur de $\delta^{15}N$ suffisamment éloignée de la plante fixatrice et une nutrition azotée comparable à celle de la plante fixatrice (ammonium ou nitrate). Les valeurs de $\delta^{15}N$ obtenues ont présenté une variation importante au sein d'une même espèce (données non présentées), et leurs pourcentages d'azote ont varié fortement selon la zone (Figure III.10, Kruskal-Wallis, p-value = 0,0003), suggérant un effet de la richesse du sol en azote assimilable plutôt qu'un effet de l'espèce. Les aulnes présentant des quantités d'azote fixé variables, l'entrée de litière azotée serait différente en terme de quantité et qualité ce qui ferait varier le $\delta^{15}N$ du sol et donc celui des plantes non-fixatrices se nourrissant de cet azote. L'utilisation de l'isotopie naturelle ^{15}N a donc permis d'estimer la proportion de fixation d'azote chez l'aulne proche de 100% mais une estimation plus précise demanderait maintenant un travail plus approfondi sur le choix des plantes de références.

4. Conclusions et perspectives

Dans cette deuxième partie du chapitre 3, nous avons voulu étendre l'étude de l'expansion du complexe symbiotique *Alnus*/*Frankia* à d'autres aulnaies subalpines afin, (1) de tester le patron précédemment observé en Vanoise sur les propriétés du sol, les communautés microbiennes et le fonctionnement du cycle de l'azote (CHAPITRE 3A), (2) d'évaluer l'impact du phénotype de sporulation de *Frankia* sur la fixation et sur le fonctionnement de l'aulnaie. Nos conclusions ont été limitées par la fréquence de nodosités Sp- dans nos échantillons plus faible qu'escompté.

1) Comme nous avons pu l'observer sur l'un des sites en Vanoise, il y a absence d'une structuration significative de la pédologie des sols. Cette étude nous avait amené à faire l'hypothèse que l'hétérogénéité spatiale (*e.g.* topographie) spécifique à ce type de milieu, ainsi que l'histoire agropastorale et écologique des sites, pouvaient brouiller le patron classiquement observé en réponse à la colonisation de l'aulne.

Un enrichissement du sol en ammonium et nitrate est observé en réponse à la présence de l'aulne, se traduisant par l'augmentation d'abondance des micro-organismes nitrifiants (AOA, AOB) et une stimulation de l'activité de nitrification. La dominance chez les nitrifiants du groupe des *Archaea* par rapport aux bactéries sera à vérifier à différentes saisons. L'analyse des données de séquençage haut débit des communautés bactériennes globales et fonctionnelles actuellement en cours nous permettra de mettre en lien ces changements d'abondance avec de possibles modifications de la structure des communautés.

Nous confirmons l'absence d'effet de l'aulne sur l'activité potentielle de dénitrification comme précédemment observé en Vanoise, en lien avec des abondances inchangées des communautés bactériennes impliquées. La contribution des communautés dénitrifiantes fongiques et archéennes reste inconnue dans ces milieux.

2) Les aulnes verts semblent être en autosuffisance azotée grâce à la fixation symbiotique avec *Frankia*, cependant leurs teneurs variables en azote total semblent indiquer des quantités fixées différentes, que nos mesures d'activités potentielles et ponctuelles par ARA ne parviennent pas à expliquer. Le développement de la méthodologie de l'isotopie naturelle ^{15}N sur ces aulnaies vertes devrait permettre de mieux expliquer ces résultats. La définition d'une plante de référence adéquate dans ce contexte écologique est complexe et devra faire l'objet d'études spécifiques. Les résultats préliminaires d'ARA ne semblent pas soutenir l'hypothèse d'une meilleure efficience de fixation des *Frankia* Sp- malgré une tendance sur les mesures d'automne. Des optimisations méthodologiques et de nouveaux échantillonnages tout au long de l'année seront à réaliser pour approfondir ces premiers résultats.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'objectif de ces travaux de thèse était de comprendre le rôle écologique de la sporulation *in planta* dans le cas de la symbiose actinorhizienne *Alnus-Frankia* et d'en étudier les implications en termes de biogéographie, de spécificité à l'hôte et de fonctionnement des écosystèmes subalpins. Dans ce but, plusieurs hypothèses ont été formulées et cette discussion finale reprendra chacune d'elles en se focalisant sur les aspects nécessitants des travaux futurs et sur les nouvelles perspectives de recherche qui en découle.

Un symbiote génétiquement homogène et un hôte en expansion

Nous avons effectué un large échantillonnage sur 10 espèces d'aulne réparties dans les régions froides des 3 continents de la zone Holarctique et montré que les souches de *Frankia* Sp+ associées étaient peu diverses génétiquement, et phylogénétiquement divergentes des souches Sp- (CHAPITRE 1A). Cette large distribution de quelques génotypes Sp+, centrée sur les zones de hautes altitudes et de hautes latitudes pourrait s'expliquer par une convergence adaptative en réponse au climat et/ou d'une co-migration avec les espèces hôtes lors des recolonisations postglaciaires. Les analyses complémentaires qui seront effectuées sur les données actuelles (Régressions Multiples sur Matrices de distance, CHAPITRE 1A), permettront de quantifier l'influence de l'espèce hôte, de la géographie et du climat sur la distribution observée des *Frankia* Sp+.
Différentes lignées très homogènes de Sp+ semblent émerger à partir de la phylogénie de *Frankia*, formant des clades monophylétiques spécifiques à une espèce ou sous-espèce donnée dans lesquelles les souches sont quasiment clonales (CHAPITRE 1A). Au vu des incompatibilités d'associations observées (CHAPITRE 2B), ces clades (1a et 1b) pourraient correspondre à différentes espèces de *Frankia* caractérisés par des spectres d'infection mono-spécifiques distincts. Cependant, nos expériences d'infection croisées portaient sur des lignées Sp+ et des espèces d'aulne provenant d'Europe, et nous manquons de données pour conclure sur la spécificité à l'hôte des Sp+ nord-américaines et asiatiques. Sous l'hypothèse d'une évolution des souches de *Frankia* d'aulne qui se serait faite vers un degré de spécialisation accrue à l'hôte, comme observé chez les Hamamelidae supérieures (groupe d'appartenance du genre *Alnus*) (Maggia and Bousquet, 1994), les différentes lignées de Sp+ identifiées dans ces travaux devraient avoir un ancêtre commun vraisemblablement Sp- et à spectre d'hôte large.

L'hypothèse selon laquelle les souches de génotype Sp+ seraient des symbiotes obligatoires implique une transmission horizontale d'un hôte à l'autre en absence de vie saprophytique dans le sol (Schwintzer, 1990; Pozzi *et al.*, 2015). Ainsi au cours de l'histoire évolutive, les souches Sp+ auraient suivi la distribution de leur hôte le long des voies de colonisation

postglaciaires. Les résultats de notre étude sur les populations de *Frankia* associées aux espèces *A. glutinosa* et *A. cordata* en Corse et sur le continent appuient en faveur de cette co-migration hôte/symbiotes (CHAPITRE 1B). Les premières analyses sur le contenu en mutations (non-synonymes et synonymes) et sur les vitesses d'évolutions des séquences Sp+ et Sp- de *Frankia* vont dans le sens du caractère symbiote obligatoire des Sp+ (données non présentées). Cette hypothèse suggère implicitement un lien entre la sporulation *in planta* et le degré de dépendance à l'hôte (Pozzi, 2014) ce qui implique une identification fine de l'hôte. Dans cette étude nous n'avons caractérisé l'hôte qu'au niveau de la sous-espèce. Une nouvelle méthodologie de typage basée sur les microsatellites chloroplastiques, suffisamment résolutive pour discriminer différentes lignées (et origine géographique) au sein d'une même espèce d'aulne (Gryta *et al.*, 2017) permettrait de mieux appréhender l'effet de l'hôte et de ses voies de recolonisations post-glaciaires sur la distribution observées des souches de *Frankia* Sp+.

Ce travail a mis en évidence une importante biodiversité encore non étudiée des souches Sp+. Cependant des échantillonnages supplémentaires sont nécessaires pour compléter la phylobiogéographie des souches de *Frankia* Sp+ subarctiques. En effet, l'aire asiatique, sous-représentée dans notre échantillonnage, reste très largement inexplorée malgré la grande diversité d'espèces d'aulne présente (Chen and Li, 2004). Nos échantillons du Japon, bien que se limitant à deux sites, confirment *a priori* le patron général de distribution des Sp+ et, malgré la forte homogénéité génétique de ces souches avec celles d'Amérique du Nord et de Corse, une diversité nouvelle et spécifique aux 3 espèces asiatiques (AHI, AMT, AAM) semblent émerger. Comme sur l'île de Corse dans la mer Méditerranée, une forte endémicité a été décrite dans l'archipel du Japon (Kubota *et al.*, 2015). Durant le Quaternaire, ces îles furent tantôt connectées continent asiatique pendant les épisodes de glaciation, et notamment pendant le dernier maximum glaciaire il y a 24-18.000 ans, et tantôt isolées pendant les périodes interglaciaires du fait de l'élévation du niveau des océans (Harrison *et al.*, 2001). Elles auraient pu constituer un refuge glaciaire pour plusieurs espèces végétales pendant la migration vers le sud de l'Asie (25-30°N) (Bai *et al.*, 2010). L'intérêt double de l'aire nippone par son statut insulaire et sa localisation dans l'aire asiatique justifierait une approche comparable à celle réalisée en Corse (CHAPITRE 1B) afin d'en évaluer les patrons de diversité, d'endémisme et de spécialisation des souches de *Frankia* associées à l'aulne et de les comparer aux populations du continent adjacent (Corée, Chine, régions de la Mandchourie et du Kamstsacha).

Une aire géographique entière reste encore vierge de tout échantillonnage, il s'agit de la région boréale de l'Est du continent eurasiatique (*i.e.* Sibérie et Mandchourie), qui représente plus d'une dizaine de millions de km^2 (Rapport de la FAO, 2001). Deux sous espèces d'*Alnus alnobetula* y sont retrouvées, *A. alnobetula* ssp. *fruticosa* et *A. alnobetula* ssp.

sinuata, et sur cette dernière aucune donnée sur les souches de *Frankia* Sp+ n'est disponible à ce jour. Cette zone représente un intérêt majeur pour la compréhension de la phylogéographie des *Frankia* Sp+ car étant à la fois une aire de transition entre les massifs d'Europe centrale et la zone asiatique, et le point d'origine de la colonisation de l'aulne par le détroit de Béring en Amérique du Nord. De plus, il est intéressant de préciser que la région de Béring, au-dessus des eaux il y a 15 à 28 000 ans, a été démontrée comme une zone refuge de plusieurs espèces boréales dont plusieurs appartenant au genre *Alnus* durant le dernier maximum glaciaire (Brubaker *et al.*, 2005).

Comme précédemment évoqué dans ce manuscrit, une problématique d'expansion d'espèces ligneuses arbustives (majoritairement *Alnus viridis*), similaire à celle décrite dans l'arc alpin européen, est observée depuis le début du siècle dernier dans les toundras boréales d'Alaska et de Sibérie (Sturm *et al.*, 2001; Tape *et al.*, 2006), et s'accélère en lien avec le réchauffement climatique de ces 30 dernières années (Keyser *et al.*, 2000; Serreze *et al.*, 2000; Hinzman *et al.*, 2005). Au-delà des conséquences sur le fonctionnement de ces écosystèmes boréaux en termes de propriétés du sol, de diversités et d'activités microbiennes, et de dynamique du cycle de l'azote (CHAPITRE 3 A et B), l'ouverture de ces milieux à la colonisation par *A. viridis* soulève la question de l'identité et de la disponibilité des souches de *Frankia* dans ces sols congelés depuis plusieurs milliers d'années, et/ou de la migration des hôtes avec leur cortège symbiotique dans ces sols nouvellement colonisables.

De par la difficulté à isoler et cultiver les *Frankia* Sp+, la base de ces travaux repose sur l'analyse de nodosités racinaires et l'utilisation de plante-pièges, rendant l'obtention d'un génome est complexe. A ce jour, 33 génomes de *Frankia* Sp- avec des qualités d'assemblage variable sont disponibles. Un premier génome de *Frankia* obtenu par isolement de spores à partir de nodosités d'*Alnus incana* ss. *incana* (clade 1b, CHAPITRE 1A), est en cours d'assemblage et d'autres candidats ont déjà été identifiés (*Alnus alnobetula* ssp *alnobetula, Alnus cordata, Alnus glutinosa*). L'apport de ces analyses phylogénomiques et de génomiques comparées permettront (i) de confirmer nos analyses des différences génotypiques et phylogénétique à l'échelle des génomes entiers, et potentiellement définir des espèces mono-spécifiques, (ii) d'identifier de nouveaux marqueurs génétique discriminants les Sp+ et les Sp- permettant par la suite la mise au point de nouveaux outils de suivis qualitatifs et quantitatifs des souches Sp+ et Sp- dans les nodosités et le sol, (iii) d'apporter des preuves supplémentaires en faveur du caractère symbiote obligatoire des Sp+ comme une taille de génome inférieur, un pourcentage G+C réduit, un ratio de dN/dS supérieur et/ou l'absence de certaines voies métaboliques comme observée couramment dans les symbioses obligatoires d'insectes (Charles and Ishikawa,

1999; Akman *et al.*, 2002), et (iv) de comparer les gènes et les régulateurs de la sporulation des Sp+ et des Sp-, puis par une approche de transcriptomique, d'identifier la présence ou l'absence de signaux inducteurs provenant de l'hôte, de *Frankia* ou de l'environnement.

Physiologie des Frankia Sp+ et Sp-

Depuis la fin des années 80, la plupart des études en cultures expérimentales suggèrent une efficience moindre (*i.e.* fixation d'azote plus faible) des nodosités Sp+ par rapport aux nodosités Sp- (Normand and Lalonde, 1982; Vandenbosch and Torrey, 1984; Monz and Schwintzer, 1989) mais à ce jour, aucune n'a étudié le lien entre le phénotype de sporulation des nodosités et les valeurs de fixation potentielles d'azote *in natura*. Dans nos travaux, les premières mesures de fixation d'azote sur les nodosités d'*A. alnobetula ssp. alnobetula* réalisées sur le terrain révèlent une très forte variabilité à l'échelle d'une aulnaie et d'un même génotype et aucune corrélation linéaire n'a pu être établie entre la fréquence Sp+ et les valeurs d'ARA (CHAPITRE 3B). En revanche, les variations observées entre sites majoritairement Sp+ ou Sp- suivent la tendance attendue avec les valeurs de fixation potentielles les plus hautes mesurées dans l'aulnaie Sp- et les plus faibles dans l'aulnaie pure Sp+.

Plusieurs limites méthodologiques ont pu être source de variabilité et ont suggéré notamment la nécessité de (i) réduire au maximum et de quantifier le temps de latence entre le prélèvement des nodosités sur la racines et le début de la prise des mesures, (ii) estimer l'âge des nodosités (déduit de la teneur en eau et en azote) (Sharma and Ambasht, 1984, 1986), (iii) prendre en considération l'état physiologique de l'hôte (*e.g.* âge, rendement photosynthétique). Les points (i) et (ii) peuvent facilement être pris en compte en ne réalisant les différentes analyses (*i.e.* phénotypage, ARA, teneur en eau et en azote) que sur une seule et même nodosité. Le point (iii) reste quant à lui problématique. Tout d'abord, du fait de la structure multi-troncs (souvent supérieure à 10 dans les vieilles aulnaies, observation personnelle) et la croissance végétative de l'aulne vert, l'âge de l'individu déterminé par la méthode classique de dendrographie est largement sous-estimé (CHAPITRE 3A). Par ailleurs, nous ne disposons pas pour l'heure de traits fonctionnels à relier à la fixation d'azote ou à l'état physiologique de l'aulne en général. Des travaux encore préliminaires ont été réalisés dans ce but par mesure de fluorescence du photosystème PSII, permettant d'inférer sur l'état de stress et de la performance photosynthétique globale de l'arbre (Murchie and Lawson, 2013) et d'expliquer l'efficacité de fixation symbiotique d'azote (Gundale *et al.*, 2012). Du fait de leur meilleure efficacité de fixation d'azote, les souches Sp- auraient la capacité de mieux supporter la croissance de la plante (Hall *et al.*, 1979; Normand and Lalonde, 1982; Vandenbosch and Torrey, 1984; Wheeler *et al.*, 1986). Cet effet mesuré au

laboratoire est difficile à estimer *in natura*, sur des arbres âgés et à architecture complexe justifiant une fois de plus l'identification de traits fonctionnels pertinents pour évaluer l'impact des deux génotypes sur la physiologie de l'arbre à long terme. En ce qui concerne la quantité d'azote fixée à l'année ($\delta^{15}N$ des feuilles), quel que soit le génotype associé (Sp+ ou Sp-), une valeur très proche de -1,8 est mesurée indiquant que l'azote de l'arbre provient probablement exclusivement de la fixation (Domenach *et al.*, 1989). Une des limites majeures reposent sur l'inférence du statut Sp+ ou Sp- d'un arbre, basée sur le phénotypage de quelques nodosités seulement. En effet, la cohabitation des deux génotypes sur le système racinaire d'un même individu est possible (Schwintzer and Tjepkema, 1990), aussi un diagnostic exhaustif de l'ensemble des nodosités à l'échelle d'un individu est nécessaire afin d'appréhender la temporalité de cette cooccurrence supposée transitoire de par la plus forte infectivité et compétitivité des souches Sp+ (CHAPITRE 2A).

Enfin, un fort effet de la saison a été observé sur les activités potentielles de fixation quel que soit le site considéré (CHAPITRE 3B). Une de nos hypothèses serait une saisonnalité différente dans la fixation d'azote entre les nodosités Sp+ et Sp-, avec en réponse au pic de sporulation en automne (Schwintzer, 1990) et la forte demande en ressources carbonées, une cessation de l'activité de la nitrogénase plus précocement chez les aulnes associés à des Sp+. Des cinétiques de mesures d'ARA sur des nodosités Sp+ et Sp- prélevées sur la fin de la période de croissance de l'aulne permettraient de vérifier cette hypothèse.

Ecologie des Frankia Sp+ et Sp-

Quelle que soit leur zone de provenance, et contrairement aux *Frankia* Sp-, les *Frankia* Sp+ associées aux espèces d'aulne de la zone Holarctique se regroupent dans la phylogénie en fonction de l'espèce hôte (CHAPITRE 1), ce qui indiquerait que le facteur hôte et/ou le contexte pédoclimatique, confondus dans notre étude, seraient davantage déterminant dans la biogéoraphie des Sp+ que dans celles des Sp-. De précédentes études avaient suggéré un spectre d'hôtes différent entre *Frankia* Sp+ et Sp-, plus restreint pour les souches Sp+ par rapport aux Sp- (Weber *et al.*, 1987; Kurdali *et al.*, 1988; van Dijk *et al.*, 1988; Schwintzer, 1990; Markham, 2008). Nos résultats montrent un biais selon la méthode d'infection des racines utilisées expérimentalement. Les inoculations de broyats de nodosités ont mise en évidence des associations préférentielles mais pas d'incompatibilité témoignant de spectres d'hôtes différents (CHAPITRE 2A). En revanche le piégeage à partir des communautés complexes du solv correspondant à des conditions plus proches de celles *in natura*, a montré une différence de spectre d'hôtes entre *Frankia* Sp+ et Sp-, avec des incompatibilités notables entre certains génotypes de *Frankia* Sp+ et certains hôtes (Figure 7).

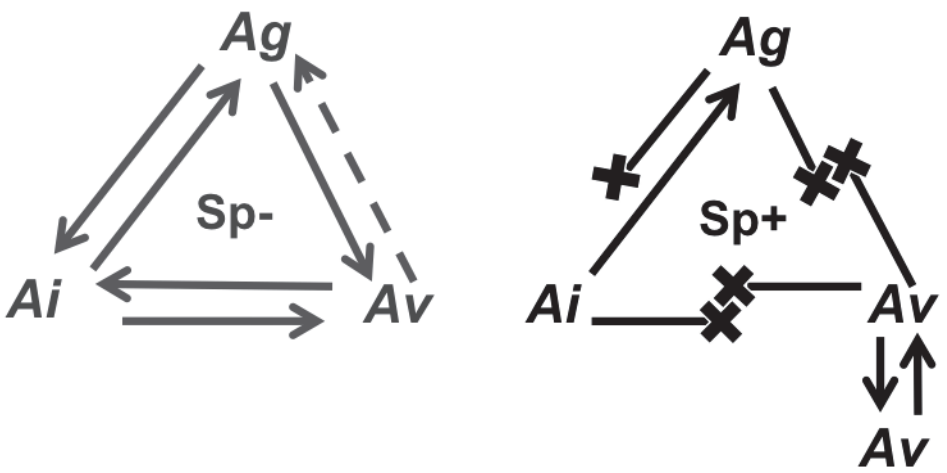


Figure 7. Représentation schématique des spectres d'hôtes des génotypes Sp+ et Sp- de *Frankia* vis à vis des espèces-hôtes *A. glutinosa*, A*. incana, A. viridis* (*Alnobetula*).

Les flèches se lisent « … hôte compatible à la souche provenant de … ».

Une souche de *Frankia* Sp- peut s'associer indifféremment à des espèce d'aulnes différentes, contrairement à une souche Sp+ qui est inféodée à une espèce-hôte donnée en conditions naturelles. De ce fait les *Frankia* Sp- auraient une biogéographie moins contrainte par la distribution de l'hôte, par rapport aux *Frankia* Sp+ dépendantes de la présence d'une espèce-hôte compatible. Cependant, lorsqu'une plante-hôte est capable de s'associer aux deux types de souches *in natura,* elle ne manifeste pas de préférence entre ces deux génotypes de souches dans les expériences de piégeages au laboratoire (CHAPITRE 2B). Or, les très nombreux échantillonnages réalisés dans les Alpes au cours des six dernières années, et notamment ceux ayant été réalisés à l'échelle d'aulnaies entières (Projet Green Alps, CHAPITRE 3B), montrent que le génotype Sp- est extrêmement rare en montagne et qu'une aulnaie dite Sp-, c'est à dire composée d'individus exclusivement associés à des *Frankia* Sp-, n'existerait pas. Dès lors, le succès évolutif majeur des génotypes Sp+ dans ces milieux serait lié au contexte pédoclimatique.

Toutefois, il est intéressant de noter que très localement, généralement en bordures d'aulnaie d'altitude, de jeunes arbres isolés sont associés à des *Frankia* Sp- (observations personnelles), traduisant la coexistence (transitoire) des deux génotypes Sp+ et Sp- dans l'histoire du développement d'une aulnaie de milieu froid. Cette observation questionne la dynamique d'expansion des souches de *Frankia* Sp+ au cours du temps dans les sols, de l'installation des premiers aulnes sur un site au phénomène d'expansion des aulnaies matures précédemment décrit dans les milieux subarctiques (CHAPITRE 3A). Une des hypothèses à tester pour expliquer ces individus Sp- en périphérie d'aulnaie serait une influence de la physiologie de l'hôte (notamment à travers l'âge). Les jeunes plantules

pourraient contre-sélectionner les souches Sp+ favorisant l'association avec des souches Sp- aux premiers stades de développement. De façon similaire l'âge de la plante a un effet sur la résistance à de nombreux pathogènes ou ravageurs. Cependant les d'expériences d'inoculation par des broyats de nodosités basées également sur l'utilisation de très jeunes plantules ne mettent pas en évidence un tel biais d'association en faveur des génotypes Sp-(CHAPITRE 2B). Cette différence pourrait s'expliquer par la forte densité de particules infectieuses dans l'inoculum qui représenterait une pression de sélection élevée capable de forcer certaines associations. Sur le terrain, l'expansion progressive des Sp+ serait réalisée par la dissémination des spores via les torrents, le ruissellement, les animaux sauvages, le vent et la croissance par stolon des arbres de l'aulnaie primaire. Cette hypothèse implique qu'avant l'installation de l'aulnaie sur ces sols pionniers, les souches de Frankia présentes, seraient essentiellement des Sp-. Une fois introduit par l'un des vecteurs précédemment cités, le génotype Sp+ remplacerait progressivement le génotype Sp-. Néanmoins la question de la provenance de ces premières souches Sp+ reste entière. L'hypothèse d'un génotype Sp+ dérivé du génotype Sp- locale par mutation semble peu vraisemblable au vu de la distance génétique entre ces deux lignées. On ne peut exclure la préexistence dans les sols de génotypes Sp+ dormants (spores) qui seraient sélectionnés par les effets conjugués de l'hôte et du contexte pédoclimatique. Pour confirmer cette hypothèse, un suivi au cours du temps des communautés de *Frankia* du sol puis dans les nodosités associées à des jeunes aulnes isolés est nécessaire. A l'heure actuelle, aucun marqueur génétique ne permet de discriminer directement à partir de l'ADN génomique du sol et par séquençage haut débit les *Frankia* selon leur phénotype de sporulation. Les premières étapes de développement d'une méthode de suivi des populations de *Frankia* Sp+ et Sp- ont été réalisées pendant ce travail de thèse. Dans ce but, un premier séquençage a été réalisé sur des amplicons obtenus à partir d'ADN génomique d'un sol d'aulnaie, par PCR nichée d'une séquence interne du gène de ménage *dnaA* connue pour discriminer le génotype Sp+/Sp-(travaux non présentés dans ce manuscrit). L'analyse de ces séquences et en cours. Si la profondeur et la spécificité de ce marqueur suffisent pour identifier le genre *Frankia*, cette méthodologie permettra d'observer pour la première fois les dynamiques de populations des différents phénotypes de sporulation selon le contexte écologique considéré, sans passer par le proxy biaisé d'une plante de piégeage car ne donnant accès qu'aux souches infectives et compatibles à l'espèce-utilisée (Hahn et al., 1999)(CHAPITRE 2B).

Avantages évolutifs de la sporulation in planta de Frankia

La valeur adaptative (*fitness*) d'un génotype est classiquement définie par sa capacité à survivre et à se multiplier dans un contexte écologique donné. Ainsi, outre leur plus grande

infectivité et compétitivité *in vitro* par rapport aux *Frankia* Sp- (CHAPITRE 2A), la prédominance des *Frankia* Sp+ observée dans les milieux d'altitude/latitude élevés pourrait être liée à une meilleure survie dans des conditions climatiques défavorables en dehors de l'hôte. Cette survie peut être distinguée en deux composantes, que sont la dispersion spatiale (*i.e.* capacité à disséminer) et la dispersion temporelle (*i.e.* capacité à persister). Deux hypothèses ont été formulées au début de ce manuscrit quant à l'avantage évolutif de la sporulation, en lien avec la spécificité des milieux subarctiques. Premièrement, la formation de spores, sphériques, de taille micrométrique, permettrait une meilleure dissémination des *Frankia* Sp+ dans les sols squelettiques subarctiques et soumis à de fort mouvement d'eau (ruissellement par la pente et/ou fonte annuelle des neiges). Ensuite, le statut dormant et la forte pression osmotique interne des spores confèreraient aux Sp+ une meilleure persistance face à des perturbations abiotiques telles que les cycles de gel/dégel et la congélation prolongée des sols. Ces deux paramètres, résistance et dispersion, favoriseraient la probabilité d'une réassociation à l'hôte des *Frankia* Sp+, une fois libérées dans le compartiment du sol à la sénescence des nodosités. Ces deux hypothèses seront à tester dans des travaux futurs et constitueront des premiers éléments de réponse sur la vie saprophytique de *Frankia*.

Sous couvert de ces hypothèses, les souches Sp+ une fois introduites dans un sol prendraient le dessus sur les souches Sp- indigènes du sol, et seraient majoritairement associées aux hôtes disponibles. Une expérimentation de terrain a été lancée durant cette thèse en collaboration avec la fondation Pierre VEROTS de la Dombes (Rhône-Alpes, France), afin d'évaluer les capacités d'installation, de persistance et d'invasion d'un génotype Sp+ inoculé massivement dans un contexte environnemental où seules des souches Sp- étaient retrouvées dans les nodosités des aulnes. Une cinétique de prélèvement de sols est en cours, avec et sans plantation d'aulnes en surface. La persistance de la souche introduite sera évaluée par séquençage haut débit d'amplicons d'ADN génomique de sol, sur le marqueur *nifH* ou *dnaA*, si le développement méthodologique de ce dernier s'avère concluant.

Stratégie Sp+ et réchauffement climatique

Dans le contexte actuel de réchauffement climatique, le climat des milieux de montagne est particulièrement sensible (Beniston, 2006). A court terme, une augmentation des événements de gel/dégel et des mouvements d'eau plus intenses par les fontes des neiges éternelles sont prédits (Brooks and Williams, 1999; Beniston, 2003), ce qui favoriseraient la stratégie Sp+ visant à maximiser le succès de l'étape d'association à l'hôte (*bet-hedging*) (Pozzi, 2014). En revanche à long terme, la raréfaction des périodes sub-zéro et la

diminution des mouvements d'eau liés à la fonte des neiges/glaces annuelles favoriseraient la stratégie Sp- à croissance saprophytique dans le sol. Sous l'hypothèse de la meilleure fixation des souches Sp-, l'impact des aulnaies sur les écosystèmes serait accentué, avec une entrée de matière organique azotée plus importante dans les sols et une plus forte stimulation des activités en aval du cycle de l'azote (notamment la dénitrification). En lien avec l'élévation des moyennes de températures dans la zone subarctique, une augmentation du taux de fixation symbiotique d'azote est également prédite (Gundale *et al.*, 2012). De plus, contrairement à ce qui est classiquement observé chez *Rhizobium* (Streeter and Wong, 1988), il n'y a pas de boucle de rétroaction de la fixation symbiotique d'azote de *Frankia* avec l'augmentation de la teneur l'azote du sol (CHAPITRE 3B). A long terme, les sols subarctiques sous aulnaies pourraient présenter un état de saturation en azote (Hunziker *et al.*, 2017), et des pertes azotées importantes, elles-mêmes responsables de problématiques de santé humaine, avec la lixiviation des nitrates dans les bassins versants, et environnementales avec l'émission de gaz à effet de serre (NO/N_2O) (Bühlmann *et al.*, 2017).

CONCLUSION GENERALE

Ces travaux de thèse ont, par une approche multidisciplinaire, mis en lien la phylobiogéographie des symbiotes bactériens et fongiques des aulnes dans les zones alpines/subarctiques de l'hémisphère nord, avec leurs spécificités et capacités d'association à l'hôte, jusqu'aux conséquences sur le fonctionnement global de ces écosystèmes en présence du complexe symbiotique.

Cette étude a permis de décrire la distribution holarctique de quelques génotypes de *Frankia* Sp+ génétiquement très homogènes et dont la phylobiogéographie est fortement liée aux milieux de haute altitude et haute latitude, ainsi qu'aux espèces d'aulne qui y vivent. Deux refuges glaciaires, la Corse et le Japon, ont été étudiés. Des diversités de symbiontes spécifiques à ces aires géographiques y ont été observées, et partiellement retrouvées sur le continent dans le cas de la Corse, indiquant que l'histoire des glaciations et des voies de recolonisation de l'aulne sont à considérer pour comprendre la distribution actuelle des génotypes Sp+ de *Frankia*. Des patrons d'association à l'hôte notablement différents ont été observés entre les souches Sp+ et Sp- se traduisant par une meilleure infectivité et compétitivité, et des compatibilités d'hôte généralement restreint à une seule espèce-hôte, pour les souches Sp+ par rapport aux souches Sp-. A l'inverse, les champignons ectomycorhiziens spécifiques à l'aulne ne présentent pas de barrière hôte-spécifique, mais les communautés associées sont influencées par le génotype Sp+ ou Sp- de *Frankia*. Entre deux génotypes compatibles Sp+ et Sp-, l'hôte ne semble pas privilégier activement un génotype au détriment d'un autre, suggérant un effet du contexte pédo-climatique prédominant sur la forte occurrence des souches Sp+ des zones froides *in natura*. L'aulne vert connaît une expansion majeure dans les alpes européennes. Notre étude a montré pour la première fois une modification des communautés microbiennes globales et fonctionnelles du cycle de l'azote en réponse à cette colonisation, se traduisant notamment par des changements de composition, et une augmentation de l'abondance et de l'activité potentielle des communautés bactériennes nitrifiantes. D'autres communautés microbiennes, *Archaea* et champignons, de plus en plus décrites comme des acteurs non négligeables du cycle de l'azote des milieux froids, sont suspectées d'être impactées par l'expansion de l'aulne sur les prairies sub-/alpines et à l'origine des émissions de gaz à effet de serre qui en résultent.

Tout comme son hôte l'aulne vert, le génotype Sp+ connaîtrait une expansion progressive au fur et à mesure de la fermeture de l'aulnaie. Notre travail a apporté les premiers résultats sur l'impact du génotype de sporulation de *Frankia* sur les taux d'azote fixé qui demanderont à être confirmés sur plusieurs saisons et sites. En revanche, l'effet du génotype de l'hôte sur le fonctionnement global de l'écosystème reste encore hypothétique et devra faire l'objet

d’étude dédiée. Cette étude a souligné les difficultés inhérentes à l’étude d’un système symbiotique complexe impliquant des arbres comme espèce hôte, des bactéries pour la plupart non cultivables et des champignons mycorhiziens. L’étude des interactions au niveau cellulaires, moléculaires et génétique entre les deux types de symbiotes, bactériens et fongiques et l’obtention dans le proche futur des génomes des différentes espèces d’aulne et de souches Sp+ sont des étapes importantes pour la compréhension de ce complexe symbiotique. Sur le terrain, la conduite d’études écologiques sur des termes plus longs seront un atout important pour la compréhension de cette symbiose et de son rôle dans les écosystèmes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abbasi, M., and Adams, W. (2000) Gaseous N emission during simultaneous nitrification–denitrification associated with mineral N fertilization to a grassland soil under field conditions. *Soil Biology and Biochemistry* **32**: 1251-1259.
Abdel-Magid, A.H., Schuman, G.E., and Hart, R.H. (1987) Soil bulk density and water infiltration as affected by grazing systems. *Journal of Range Management*: 307-309.
Aber, J.D., Nadelhoffer, K.J., Steudler, P., and Melillo, J.M. (1989) Nitrogen saturation in northern forest ecosystems. *BioScience* **39**: 378-286.
Akkermans, A., and van Dijk, C. (1976) The formation and nitrogen-fixing activity of the root nodules of *Alnus glutinosa* under field conditions. In. London: Cambridge University Press, pp. 511-520.
Akman, L., Yamashita, A., Watanabe, H., Oshima, K., Shiba, T., Hattori, M., and Aksoy, S. (2002) Genome sequence of the endocellular obligate symbiont of tsetse flies, Wigglesworthia glossinidia. *Nature genetics* **32**: 402-407.
Alberti, G., Leronni, V., Piazzi, M., Petrella, F., Mairota, P., Peressotti, A. *et al.* (2011) Impact of woody encroachment on soil organic carbon and nitrogen in abandoned agricultural lands along a rainfall gradient in Italy. *Regional Environmental Change* **11**: 917-924.
Alexander, V., Billington, M., and Schell, D.M. (1978) Nitrogen fixation in arctic and alpine tundra. In *Vegetation and production ecology of an Alaskan Arctic Tundra*: Springer, pp. 539-558.
Alves, R.J.E., Wanek, W., Zappe, A., Richter, A., Svenning, M.M., Schleper, C., and Urich, T. (2013) Nitrification rates in Arctic soils are associated with functionally distinct populations of ammonia-oxidizing archaea. *The ISME Journal* **7**: 1620.
Anderson, M.D., Taylor, D.L., and Ruess, R.W. (2013) Phylogeny and assemblage composition of Frankia in Alnus tenuifolia nodules across a primary successional sere in interior Alaska. *Mol Ecol* **22**: 3864-3877.
Anderson, M.D., Ruess, R.W., Uliassi, D.D., and Mitchell, J.S. (2004) Estimating N2 fixation in two species of Alnus in interior Alaska using acetylene reduction and 15N2 uptake. *Ecoscience* **11**: 102-112.
Anderson, M.D., Ruess, R.W., Myrold, D.D., and Taylor, D.L. (2009) Host species and habitat affect nodulation by specific Frankia genotypes in two species of Alnus in interior Alaska. *Oecologia* **160**: 619-630.
Anthelme, F. (2001) Expansion d'Alnus viridis (Chaix) DC. sur pelouses subalpines dans les Alpes françaises du Nord: mécanismes et conséquences sur la biodiversité des systèmes écologiques. In: Université Joseph Fourier (Grenoble).
Anthelme, F., Cornillon, L., and Brun, J.-J. (2002) Secondary succession of Alnus viridis (Chaix) DC. in Vanoise National Park, France: coexistence of sexual and vegetative strategies. *Annals of forest science* **59**: 419-428.
Anthelme, F., Villaret, J.-C., and Brun, J.-J. (2007) Shrub encroachment in the Alps gives rise to the convergence of sub-alpine communities on a regional scale. *Journal of Vegetation Science* **18**: 355-362.
Anthelme, F., Grossi, J.-L., Brun, J.-J., and Didier, L. (2001) Consequences of green alder expansion on vegetation changes and arthropod communities removal in the northern French Alps. *Forest Ecology and Management* **145**: 57-65.
Anthelme, F., Michalet, R., Barbaro, L., and Brun, J.-J. (2003) Environmental and Spatial Influences of Shrub Cover (Alnus viridis DC.) on Vegetation Diversity at the Upper Treeline in the Inner Western Alps. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research* **35**: 48-55.
Antoine, J.-M., Milian, J., Alet, B., Angeliaume-Descamps, A., Bertrand, G., Briane, G. *et al.* (2011) *La Ressource Montagne-Entre potentialités et contraintes*: l'Harmattan.
Attard, E., Recous, S., Chabbi, A., De Berranger, C., Guillaumaud, N., Labreuche, J. *et al.* (2011) Soil environmental conditions rather than denitrifier abundance and diversity drive potential denitrification after changes in land uses. *Global Change Biology* **17**: 1975-1989.
Bahn, M., Wohlfahrt, G., Haubner, E., Horak, I., Michaeler, W., Rottmar, K. *et al.* (1999) Leaf photosynthesis, nitrogen contents and specific leaf area of grassland species in mountain ecosystems under different land use. *Land use changes in European mountain ecosystems: ECOMONT concepts and results Blackwell, Vienna, Austria*: 247-255.
Bahram, M., Polme, S., Koljalg, U., Zarre, S., and Tedersoo, L. (2012) Regional and local patterns of ectomycorrhizal fungal diversity and community structure along an altitudinal gradient in the Hyrcanian forests of northern Iran. *New Phytol* **193**: 465-473.
Bai, W.N., Liao, W.J., and Zhang, D.Y. (2010) Nuclear and chloroplast DNA phylogeography reveal two refuge areas with asymmetrical gene flow in a temperate walnut tree from East Asia. *New Phytol* **188**: 892-901.
Baker, D., and Schwintzer, C. (1990) The biology of Frankia and actinorhizal plants. In: Academic Press London, pp. 1-13.

Baker, D.D. (1987) Relationships among pure cultured strains of Frankia based on host specificity. *Physiologia Plantarum* **70**: 245-248.
Barry, R.G. (1992) *Mountain weather and climate*: Psychology Press.
Barthlott, W., Lauer, W., and Placke, A. (1996) Global Distribution of Species Diversity in Vascular Plants: Towards A World Map Of Phytodiversity (Globale Verteilung der Artenvielfalt Höherer Pflanzen: Vorarbeiten zu einer Weltkarte der Phytodiversität). *Erdkunde*: 317-327.
Bartoli, C. (1966) Études écologiques sur les associations forestières de la Haute Maurienne. In *Annales des Sciences forestières*: EDP Sciences, pp. 429-751.
Bates, S.T., Berg-Lyons, D., Caporaso, J.G., Walters, W.A., Knight, R., and Fierer, N. (2011) Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. *ISME J* **5**: 908-917.
Bell, T., Newman, J.A., Silverman, B.W., Turner, S.L., and Lilley, A.K. (2005) The contribution of species richness and composition to bacterial services. *Nature* **436**: 1157-1160.
Beman, J., and Hayden, C. (2013) Abundance, Activity, and Diversity of Ammonia-oxidizing Bacteria and Archaea in Oligotrophic Alpine Lakes of Yosemite National Park, California. In *AGU Fall Meeting Abstracts*.
Benecke, U. (1970) Nitrogen fixation by Alnus viridis (Chaix) DC. *Plant and Soil* **33**: 30-48.
Beniston, M. (2003) Climatic change in mountain regions: a review of possible impacts. *Climatic change* **59**: 5-31.
Beniston, M. (2006) Mountain weather and climate: a general overview and a focus on climatic change in the Alps. *Hydrobiologia* **562**: 3-16.
Benson, D., and Clawson, M. (2000) Evolution of the actinorhizal plant symbiosis. *Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for the analysis of a biological process*: 207-224.
Benson, D.R., and Silvester, W. (1993) Biology of Frankia strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. *Microbiological reviews* **57**: 293-319.
Benson, D.R., and Dawson, J.O. (2007) Recent advances in the biogeography and genecology of symbiotic Frankia and its host plants. *Physiologia Plantarum* **130**: 318-330.
Bever, J.D., Schultz, P.A., Pringle, A., and Morton, J.B. (2001) Arbuscular Mycorrhizal Fungi: More Diverse than Meets the Eye, and the Ecological Tale of Why: The high diversity of ecologically distinct species of arbuscular mycorrhizal fungi within a single community has broad implications for plant ecology. *AIBS Bulletin* **51**: 923-931.
Bilbrough, C.J., Welker, J.M., and Bowman, W.D. (2000) Early spring nitrogen uptake by snow-covered plants: a comparison of arctic and alpine plant function under the snowpack. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*: 404-411.
Binkley, D. (2003) Seven decades of stand development in mixed and pure stands of conifers and nitrogen-fixing red alder. *Canadian Journal of Forest Research* **33**: 2274-2279.
Binkley, D., Sollins, P., and McGill, W.B. (1985) Natural abundance of nitrogen-15 as a tool for tracing alder-fixed nitrogen. *Soil Science Society of America Journal* **49**: 444-447.
Bintrim, S.B., Donohue, T.J., Handelsman, J., Roberts, G.P., and Goodman, R.M. (1997) Molecular phylogeny of Archaea from soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**: 277-282.
Blume, F., Bergmann, I., Nettmann, E., Schelle, H., Rehde, G., Mundt, K., and Klocke, M. (2010) Methanogenic population dynamics during semi - continuous biogas fermentation and acidification by overloading. *Journal of applied microbiology* **109**: 441-450.
Bobbink, R., Hornung, M., and Roelofs, J.G. (1998) The effects of air - borne nitrogen pollutants on species diversity in natural and semi - natural European vegetation. *Journal of Ecology* **86**: 717-738.
Bond, W. (1994) Keystone species. In *Biodiversity and ecosystem function*: Springer, pp. 237-253.
Bowman, W.D. (1992) Inputs and storage of nitrogen in winter snowpack in an alpine ecosystem. *Arctic and Alpine Research*: 211-215.
Bowman, W.D., Schardt, J.C., and Schmidt, S.K. (1996) Symbiotic N2 fixation in alpine tundra: ecosystem input and variation in fixation rates among communities. *Oecologia* **108**: 345-350.
Bowman, W.D., Theodose, T.A., Schardt, J.C., and Conant, R.T. (1993) Constraints of nutrient availability on primary production in two alpine tundra communities. *Ecology* **74**: 2085-2097.
Bowman, W.D., Steltzer, H., Rosenstiel, T.N., Cleveland, C.C., and Meier, C.L. (2004) Litter effects of two co - occurring alpine species on plant growth, microbial activity and immobilization of nitrogen. *Oikos* **104**: 336-344.
Bradley, R., Titus, B., and Preston, C. (2000) Changes to mineral N cycling and microbial communities in black spruce humus after additions of (NH 4) 2 SO 4 and condensed tannins extracted from Kalmia angustifolia and balsam fir. *Soil Biology and Biochemistry* **32**: 1227-1240.
Brooks, P.D., and Williams, M.W. (1999) Snowpack controls on nitrogen cycling and export in seasonally snow-covered catchments. *Hydrological Processes* **13**: 2177-2190.

Brooks, P.D., Williams, M.W., and Schmidt, S.K. (1996) Microbial activity under alpine snowpacks, Niwot Ridge, Colorado. *Biogeochemistry* **32**: 93-113.
Brooks, P.D., Williams, M.W., and Schmidt, S.K. (1998) Inorganic nitrogen and microbial biomass dynamics before and during spring snowmelt. *Biogeochemistry* **43**: 1-15.
Brubaker, L.B., Anderson, P.M., Edwards, M.E., and Lozhkin, A.V. (2005) Beringia as a glacial refugium for boreal trees and shrubs: new perspectives from mapped pollen data. *Journal of Biogeography* **32**: 833-848.
Bryant, J.A., Lamanna, C., Morlon, H., Kerkhoff, A.J., Enquist, B.J., and Green, J.L. (2008) Microbes on mountainsides: contrasting elevational patterns of bacterial and plant diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 11505-11511.
Bühlmann, T., Hiltbrunner, E., and Körner, C. (2013) Die Verbuschung des Alpenraums durch die Grünerle. *Factsheet der Akademien der Wissenschaften Schweiz, Bern*.
Bühlmann, T., Hiltbrunner, E., and Körner, C. (2014) Alnus viridis expansion contributes to excess reactive nitrogen release, reduces biodiversity and constrains forest succession in the Alps. *Alpine Botany* **124**: 187-191.
Bühlmann, T., Körner, C., and Hiltbrunner, E. (2016) Shrub Expansion of Alnus viridis Drives Former Montane Grassland into Nitrogen Saturation. *Ecosystems*: 1-18.
Bühlmann, T., Caprez, R., Hiltbrunner, E., Körner, C., and Niklaus, P. (2017) Nitrogen fixation by Alnus species boosts soil nitrous oxide emissions. *European Journal of Soil Science*.
Burggraaf, A., and Shipton, W. (1983) Studies on the growth of Frankia isolates in relation to infectivity and nitrogen fixation (acetylene reduction). *Canadian journal of botany* **61**: 2774-2782.
Burleigh, S., and Torrey, J.G. (1990) Effectiveness of different Frankia cell types as inocula for the actinorhizal plant Casuarina. *Applied and environmental microbiology* **56**: 2565-2567.
Burrows, R.L., and Pfleger, F.L. (2002) Arbuscular mycorrhizal fungi respond to increasing plant diversity. *Canadian Journal of Botany* **80**: 120-130.
Buttolph, L.P., and Coppock, D.L. (2004) Influence of deferred grazing on vegetation dynamics and livestock productivity in an Andean pastoral system. *Journal of Applied Ecology* **41**: 664-674.
Caldwell, M. (1981) Plant response to solar ultraviolet radiation. *Encyclopedia of plant physiology* **12**: 169-197.
Callaghan, T.V., Björn, L.O., Chernov, Y., Chapin, T., Christensen, T.R., Huntley, B. *et al.* (2004) Biodiversity, distributions and adaptations of Arctic species in the context of environmental change. *AMBIO: A Journal of the Human Environment* **33**: 404-417.
Callaway, R.M., Brooker, R., Choler, P., Kikvidze, Z., Lortie, C.J., Michalet, R. *et al.* (2002) Positive interactions among alpine plants increase with stress. *Nature* **417**: 844-848.
Campbell, D.H., Baron, J.S., Tonnessen, K.A., Brooks, P.D., and Schuster, P.F. (2000) Controls on nitrogen flux in alpine/subalpine watersheds of Colorado. *Water resources research* **36**: 37-47.
Campbell, D.H., Clow, D.W., Ingersoll, G.P., Mast, M.A., Spahr, N.E., and Turk, J.T. (1995) Processes controlling the chemistry of two snowmelt - dominated streams in the Rocky Mountains. *Water Resources Research* **31**: 2811-2821.
Canfield, D.E., Glazer, A.N., and Falkowski, P.G. (2010) The evolution and future of Earth's nitrogen cycle. *science* **330**: 192-196.
Cardelús, C.L., Colwell, R.K., and Watkins, J.E. (2006) Vascular epiphyte distribution patterns: explaining the mid - elevation richness peak. *Journal of Ecology* **94**: 144-156.
Cavicchioli, R. (2006) Cold-adapted archaea. *Nature reviews Microbiology* **4**: 331.
Cavieres, L.A., Brooker, R.W., Butterfield, B.J., Cook, B.J., Kikvidze, Z., Lortie, C.J. *et al.* (2014) Facilitative plant interactions and climate simultaneously drive alpine plant diversity. *Ecology Letters* **17**: 193-202.
Caviezel, C., Hunziker, M., Schaffner, M., and Kuhn, N.J. (2014) Soil–vegetation interaction on slopes with bush encroachment in the central Alps–adapting slope stability measurements to shifting process domains. *Earth Surface Processes and Landforms* **39**: 509-521.
Cerabolini, B., Pierce, S., Luzzaro, A., and Ossola, A. (2010) Species evenness affects ecosystem processes in situ via diversity in the adaptive strategies of dominant species. *Plant Ecology* **207**: 333-345.
Chaia, E., Guevara, S.R., Rizzo, A., and Arribére, M. (2005) Occurrence of Discaria trinervis nodulating Frankia in dated sediments of glacial Andean lakes. *Symbiosis* **39**: 67-75.
Chaia, E.E., and Myrold, D.D. (2010) Variation of 15N natural abundance in leaves and nodules of actinorhizal shrubs in Northwest Patagonia. *Symbiosis* **50**: 97-105.
Chapin, F.S., Walker, L.R., Fastie, C.L., and Sharman, L.C. (1994) Mechanisms of primary succession following deglaciation at Glacier Bay, Alaska. *Ecological Monographs* **64**: 149-175.
Chapin, F.S.I., and Körner, C. (2013) *Arctic and alpine biodiversity: patterns, causes and ecosystem consequences*: Springer Science & Business Media.

Chardon, M. (1989) Essai d'approche de la spécificité des milieux de la montagne alpine. *Revue de géographie alpine* **77**: 15-28.
Charles, H., and Ishikawa, H. (1999) Physical and genetic map of the genome of Buchnera, the primary endosymbiont of the pea aphid Acyrthosiphon pisum. *Journal of molecular evolution* **48**: 142-150.
Chauvet, E. (1987) Changes in the chemical composition of alder, poplar and willow leaves during decomposition in a river. *Hydrobiologia* **148**: 35-44.
Chen, Z. (1994) Phylogeny and phytogeography of the Betulaceae. *Acta Phytotaxonomica Sinica* **32**: 1-31.
Chen, Z., and Li, J. (2004) Phylogenetics and biogeography of Alnus (Betulaceae) inferred from sequences of nuclear ribosomal DNA ITS region. *International Journal of Plant Sciences* **165**: 325-335.
Clement, J., Robson, T., Guillemin, R., Saccone, P., Lochet, J., Aubert, S., and Lavorel, S. (2012) The effects of snow-N deposition and snowmelt dynamics on soil-N cycling in marginal terraced grasslands in the French Alps. *Biogeochemistry* **108**: 297-315.
Cleveland, C.C., Townsend, A.R., Schimel, D.S., Fisher, H., Howarth, R.W., Hedin, L.O. *et al.* (1999) Global patterns of terrestrial biological nitrogen (N2) fixation in natural ecosystems. *Global biogeochemical cycles* **13**: 623-645.
Cline, D. (1995) Snow surface energy exchanges and snownielt at a continental alpine site.
Cooper, W.S. (1923) The recent ecological history of Glacier Bay, Alaska: the present vegetation cycle. *Ecology* **4**: 223-246.
Cooper, W.S. (1937) The problem of Glacier Bay, Alaska: a study of glacier variations. *Geographical Review* **27**: 37-62.
Cotin-Galvan, L., C. Pozzi, A., Schwob, G., Fournier, P., P. Fernandez, M., and Herrera-Belaroussi, A. (2015) *In-planta* Sporulation Capacity Enhances Infectivity and Rhizospheric Competitiveness of *Frankia* Strains. *Microbes and environments*.
Dai, Y., Zhang, C., Xiong, Z., and Zhang, Z. (2005) Correlations between the ages of *Alnus* host species and the genetic diversity of associated endosymbiotic *Frankia* strains from nodules. *Science in China Series C: Life Sciences* **48**: 76-81.
Dambreville, C., Hallet, S., Nguyen, C., Morvan, T., Germon, J.-C., and Philippot, L. (2006) Structure and activity of the denitrifying community in a maize-cropped field fertilized with composted pig manure or ammonium nitrate. *FEMS microbiology ecology* **56**: 119-131.
Danby, R.K., and Hik, D.S. (2007) Variability, contingency and rapid change in recent subarctic alpine tree line dynamics. *Journal of Ecology* **95**: 352-363.
Daniere, C., Capellano, A., and Moiroud, A. (1986) Dynamique de l'azote dans un peuplement naturel d'Alnus incana (L.) Moench. *Acta oecologica Oecologia plantarum* **7**: 165-175.
Dassonville, N., Guillaumaud, N., Piola, F., Meerts, P., and Poly, F. (2011) Niche construction by the invasive Asian knotweeds (species complex Fallopia): impact on activity, abundance and community structure of denitrifiers and nitrifiers. *Biological Invasions* **13**: 1115-1133.
David, F. (2010) Expansion of green alder (Alnus alnobetula [Ehrh] K. Koch) in the northern French Alps: a palaeoecological point of view. *C R Biol* **333**: 424-428.
Dawson, J. (2007) Ecology of actinorhizal plants. In *Nitrogen-fixing actinorhizal symbioses*. Pawlowski, K., and Newton, W. (eds): Springer Netherlands, pp. 199-234.
Day, T., and Detling, J. (1990) Grassland patch dynamics and herbivore grazing preference following urine deposition. *Ecology* **71**: 180-188.
Delwiche, C.C., and Steyn, P.L. (1970) Nitrogen isotope fractionation in soils and microbial reactions. *Environmental Science & Technology* **4**: 929-935.
Denison, R., and Sinclair, T. (1985) Diurnal and seasonal variation in dinitrogen fixation (acetylene reduction) rates by field-grown soybeans. *Agronomy Journal* **77**: 679-684.
Devi, L.S., Khaund, P., Nongkhlaw, F.M., and Joshi, S. (2012) Diversity of culturable soil micro-fungi along altitudinal gradients of Eastern Himalayas. *Mycobiology* **40**: 151-158.
Diagne, N., Arumugam, K., Ngom, M., Nambiar-Veetil, M., Franche, C., Narayanan, K.K., and Laplaze, L. (2013) Use of Frankia and actinorhizal plants for degraded lands reclamation. *BioMed research international* **2013**.
Díaz-Varela, R.A., Colombo, R., Meroni, M., Calvo-Iglesias, M.S., Buffoni, A., and Tagliaferri, A. (2010) Spatio-temporal analysis of alpine ecotones: A spatial explicit model targeting altitudinal vegetation shifts. *Ecological Modelling* **221**: 621-633.
Didier, L. (2001) Invasion patterns of European larch and Swiss stone pine in subalpine pastures in the French Alps. *Forest Ecology and Management* **145**: 67-77.
Dilworth, M. (1966) Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations from Clostridium pasteurianum. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **127**: 285-294.
Dixon, R., and Wheeler, C.T. (1986) Nitrogen fixation in plants. *BLACKIE AND SON, GLASGOW(UK) 1986*.

Dixon, R., and Kahn, D. (2004) Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nature reviews Microbiology* **2**: 621.
Domenach, A., Kurdali, F., and Bardin, R. (1989) Estimation of symbiotic dinitrogen fixation in alder forest by the method based on natural15N abundance. *Plant and Soil* **118**: 51-59.
Domenach, A., Kurdali, F., Daniere, C., and Bardin, R. (1988) Détermination de l'identité isotopique de l'azote fixé par le Frankia associé au genre Alnus. *Canadian journal of botany* **66**: 1241-1247.
Edgar, R.C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research* **32**: 1792-1797.
Eickenscheidt, T., Heinichen, J., Augustin, J., Freibauer, A., and Drösler, M. (2014) Nitrogen mineralization and gaseous nitrogen losses from waterlogged and drained organic soils in a black alder (Alnus glutinosa (L.) Gaertn.) forest. *Biogeosciences* **11**: 2961-2976.
Ekblad, A., and Huss - Danell, K. (1995) Nitrogen fixation by Alnus incana and nitrogen transfer from A. incana to Pinus sylvestris influenced by macronutrients and ectomycorrhiza. *New Phytologist* **131**: 453-459.
Elmi, A.A., Madramootoo, C., Hamel, C., and Liu, A. (2003) Denitrification and nitrous oxide to nitrous oxide plus dinitrogen ratios in the soil profile under three tillage systems. *Biology and Fertility of Soils* **38**: 340-348.
Escaravage, N., Pornon, A., and Doche, B. (1996) Evolution des potentialités dynamiques des landes à Rhododendron ferrugineum L. avec les conditions de milieu (étage subalpin des Alpes du Nord-France). *Ecologie* **27**: 35-50.
Fastie, C.L. (1995) Causes and ecosystem consequences of multiple pathways of primary succession at Glacier Bay, Alaska. *Ecology* **76**: 1899-1916.
Fenchel, T. (1993) There are more small than large species? *Oikos*: 375-378.
Fierer, N., Schimel, J.P., Cates, R.G., and Zou, J. (2001) Influence of balsam poplar tannin fractions on carbon and nitrogen dynamics in Alaskan taiga floodplain soils. *Soil Biology and Biochemistry* **33**: 1827-1839.
Fierer, N., McCain, C.M., Meir, P., Zimmermann, M., Rapp, J.M., Silman, M.R., and Knight, R. (2011) Microbes do not follow the elevational diversity patterns of plants and animals. *Ecology* **92**: 797-804.
Fischer, M., Rudmann-Maurer, K., Weyand, A., and Stöcklin, J. (2008) Agricultural land use and biodiversity in the Alps: how cultural tradition and socioeconomically motivated changes are shaping grassland biodiversity in the Swiss Alps. *Mountain Research and Development* **28**: 148-155.
Fisk, M.C., and Schmidt, S.K. (1995) Nitrogen mineralization and microbial biomass nitrogen dynamics in three alpine tundra communities. *Soil Science Society of America Journal* **59**: 1036-1043.
Flanagan, P. (1986) Substrate quality influences on microbial activity and mineral availability in taiga forest floors. *Forest Ecosystems in the Alaskan Taiga*: 138-151.
Flohn, H. (1974) Contribution to a comparative meteorology of mountain areas. *Arctic and alpine environments London, UK: Methuen* **55**.
Foissner, W. (2006) Biogeography and dispersal of micro-organisms: a review emphasizing protists. *Acta Protozoologica* **45**: 111-136.
Fontaneto, D. (2011) *Biogeography of microscopic organisms: is everything small everywhere?*: Cambridge University Press.
Forster, P., Ramaswamy, V., Artaxo, P., Berntsen, T., Betts, R., Fahey, D.W. *et al.* (2007) Changes in atmospheric constituents and in radiative forcing. In *Climate Change 2007 The Physical Science Basis*.
Fowler, D., Muller, J.B., and Sheppard, L.J. (2005) The GaNE programme in a global perspective. *Water, Air, & Soil Pollution: Focus* **4**: 3-8.
Frank, D.A., and Evans, R.D. (1997) Effects of native grazers on grassland N cycling in Yellowstone National Park. *Ecology* **78**: 2238-2248.
Frank, D.A., and Groffman, P.M. (1998) Ungulate vs. landscape control of soil C and N processes in grasslands of Yellowstone National Park. *Ecology* **79**: 2229-2241.
Frankenberger, W., and Abdelmagid, H. (1985) Kinetic parameters of nitrogen mineralization rates of leguminous crops incorporated into soil. *Plant and Soil* **87**: 257-271.
Freléchoux, F., Meisser, M., and Gillet, F. (2007) Succession secondaire et perte de diversité végétale après réduction du broutage dans un pâturage boisé des Alpes centrales suisses. *Botanica Helvetica* **117**: 37-56.
Frost, G.V., and Epstein, H.E. (2014) Tall shrub and tree expansion in Siberian tundra ecotones since the 1960s. *Glob Chang Biol* **20**: 1264-1277.
Furlow, J.J. (1979) The systematics of the American species of Alnus (Betulaceae). *Rhodora* **81**: 1-121.
Gai, J.P., Tian, H., Yang, F.Y., Christie, P., Li, X.L., and Klironomos, J.N. (2012) Arbuscular mycorrhizal fungal diversity along a Tibetan elevation gradient. *Pedobiologia* **55**: 145-151.
Gansert, D. (2004) Treelines of the Japanese Alps – altitudinal distribution and species composition under contrasting winter climates. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* **199**: 143-156.

Gao, Y., Luo, P., Wu, N., and Chen, H. (2008) Nitrification and denitrification in an alpine meadow soil of the eastern Tibetan Plateau. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B-Soil and Plant Science* **58**: 93-96.
Gehrig-Fasel, J., Guisan, A., and Zimmermann, N.E. (2007) Tree line shifts in the Swiss Alps: Climate change or land abandonment? *Journal of vegetation science* **18**: 571-582.
Geml, J., Pastor, N., Fernandez, L., Pacheco, S., Semenova, T.A., Becerra, A.G. *et al.* (2014) Large-scale fungal diversity assessment in the Andean Yungas forests reveals strong community turnover among forest types along an altitudinal gradient. *Mol Ecol* **23**: 2452-2472.
Gerzabek, M., Haberhauer, G., Stemmer, M., Klepsch, S., and Hauhold, E. (2004) Fate of nitrogen in an alpine grassland ecosystem. *Biogeochemistry*.
Giardina, C.P., Huffman, S., Binkley, D., and Caldwell, B.A. (1995) Alders increase soil phosphorus availability in a Douglas-fir plantation. *Canadian journal of forest research* **25**: 1652-1657.
Glaser, B., Turrion, M.-B., Solomon, D., Ni, A., and Zech, W. (2000) Soil organic matter quantity and quality in mountain soils of the Alay Range, Kyrgyzia, affected by land use change. *Biology and Fertility of Soils* **31**: 407-413.
Gökkaya, K., Hurd, T.M., and Raynal, D.J. (2006) Symbiont nitrogenase, alder growth, and soil nitrate response to phosphorus addition in alder (Alnus incana ssp. rugosa) wetlands of the Adirondack Mountains, New York State, USA. *Environmental and Experimental Botany* **55**: 97-109.
Goldthwait, R.P., Loewe, F., Ugolini, F., Decker, H., DeLong, D., Trautman, M. *et al.* (1966) Soil development and ecological succession in a deglaciated area of Muir Inlet, Southeast Alaska. In: Research Foundation and the Institute of Polar Studies, The Ohio State University.
Gómez-Hernández, M., Williams-Linera, G., Guevara, R., and Lodge, D.J. (2012) Patterns of macromycete community assemblage along an elevation gradient: options for fungal gradient and metacommunity analyse. *Biodiversity and Conservation* **21**: 2247-2268.
Goncalves, J., and Carlyle, J. (1994) Modelling the influence of moisture and temperature on net nitrogen mineralization in a forested sandy soil. *Soil Biology and Biochemistry* **26**: 1557-1564.
Goodman, P. (1988) Nitrogen fixation, transfer and turnover in upland and lowland grass-clover swards, using 15 N isotope dilution. *Plant and Soil* **112**: 247-254.
Gouy, M., Guindon, S., and Gascuel, O. (2010) SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular biology and evolution* **27**: 221-224.
Govaerts, R., and Frodin, D.G. (1998) World checklist and bibliography of Fagales. *Kew: Royal Botanic Gardens, Kew vii, 407p-illus ISBN* **1900347466**.
Grabherr, G., Gottfried, M., and Pauli, H. (2010) Climate change impacts in alpine environments. *Geography Compass* **4**: 1133-1153.
Grabherr, G., Gottfried, M., Gruber, A., and Pauli, H. (1995) Patterns and current changes in alpine plant diversity. In *Arctic and alpine biodiversity: patterns, causes and ecosystem consequences*: Springer, pp. 167-181.
Graham, C.H., Parra, J.L., Rahbek, C., and McGuire, J.A. (2009) Phylogenetic structure in tropical hummingbird communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 19673-19678.
Granli, T. (1994) Nitrous oxide from agriculture. *Nor J Agric Sci, Suppl* **12**: 7-128.
Granli, T., and Bockman, O. (1994) Processes that from N2O in soils, nitrogen oxide from agriculture. *Norwegian Journal of Agricultural Sciences* **12**: 18-22.
Green, R.A., and Detling, J.K. (2000) Defoliation - induced enhancement of total aboveground nitrogen yield of grasses. *Oikos* **91**: 280-284.
Griekspoor, A., and Groothuis, T. (2005) 4Peaks: a program that helps molecular biologists to visualize and edit their DNA sequence files v1. 7. In.
Grime, J.P. (2006) *Plant strategies, vegetation processes, and ecosystem properties*: John Wiley & Sons.
Grimmond, C., Robeson, S., and Schoof, J. (2000) Spatial variability of micro-climatic conditions within a mid-latitude deciduous forest. *Climate Research* **15**: 137-149.
Gryta, H., Van de Paer, C., Manzi, S., Holota, H., Roy, M., and Besnard, G. (2017) Genome skimming and plastid microsatellite profiling of alder trees (Alnus spp., Betulaceae): phylogenetic and phylogeographical prospects. *Tree Genetics & Genomes* **13**.
Guindon, S., Dufayard, J.-F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., and Gascuel, O. (2010) New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic biology* **59**: 307-321.
Gundale, M.J., Nilsson, M., Bansal, S., and Jäderlund, A. (2012) The interactive effects of temperature and light on biological nitrogen fixation in boreal forests. *New Phytologist* **194**: 453-463.
Gundersen, P., Callesen, I., and De Vries, W. (1998) Nitrate leaching in forest ecosystems is related to forest floor CN ratios. *Environmental pollution* **102**: 403-407.

Hagedorn, F., Spinnler, D., and Siegwolf, R. (2003) Increased N deposition retards mineralization of old soil organic matter. *Soil Biology and Biochemistry* **35**: 1683-1692.
Hahn, D., Nickel, A., and Dawson, J. (1999) Assessing Frankia populations in plants and soil using molecular methods. *FEMS microbiology ecology* **29**: 215-227.
Halbleib, C.M., and Ludden, P.W. (2000) Regulation of biological nitrogen fixation. *The Journal of nutrition* **130**: 1081-1084.
Hall, R.B., Mc Nabb Jr, H., Maynard, C., and Green, T. (1979) Toward development of optimal Alnus glutinosa symbioses. *Botanical Gazette* **140**: S120-S126.
Halvorson, J.J., Franz, E.H., Smith, J.L., and Black, R.A. (1992) Nitrogenase activity, nitrogen fixation, and nitrogen inputs by lupines at Mount St. Helens. *Ecology* **73**: 87-98.
Hardy, R., Holsten, R., Jackson, E., and Burns, R. (1968) The acetylene-ethylene assay for N2 fixation: laboratory and field evaluation. *Plant physiology* **43**: 1185-1207.
Harrison, S., Yu, G., Takahara, H., and Prentice, I. (2001) Palaeovegetation (Communications arising): diversity of temperate plants in east Asia. *Nature* **413**: 129-130.
Hart, S.C., Binkley, D., and Perry, D.A. (1997) Influence of red alder on soil nitrogen transformations in two conifer forests of contrasting productivity. *Soil Biology and Biochemistry* **29**: 1111-1123.
Haselwandter, K., Hofmann, A., Holzmann, H.-P., and Read, D. (1983) Availability of nitrogen and phosphorus in the nival zone of the Alps. *Oecologia* **57**: 266-269.
He, J.-Z., Shen, J.-P., Zhang, L.-M., and Di, H.J. (2012) A review of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in Chinese soils. *Frontiers in microbiology* **3**: 296.
Hebeisen, T., Lüscher, A., and Nösberger, J. (1997) Effects of elevated atmospheric CO 2 and nitrogen fertilisation on yield of Trifolium repens and Lolium perenne. *Acta Oecologica* **18**: 277-284.
Hedberg, I., and Hedberg, O. (1979) Tropical-alpine life-forms of vascular plants. *Oikos*: 297-307.
Heisey, R.M., Delwiche, C., Virginia, R.A., Wrona, A.F., and Bryan, B.A. (1980) A new nitrogen-fixing non-legume: Chamaebatia foliolosa (Rosaceae). *American Journal of Botany*: 429-431.
Henry, H.A. (2008) Climate change and soil freezing dynamics: historical trends and projected changes. *Climatic Change* **87**: 421-434.
Heuvel, B.D.V. (2011) Alnus. In *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources*: Springer, pp. 1-14.
Hickman, J.E., Wu, S., Mickley, L.J., and Lerdau, M.T. (2010) Kudzu (Pueraria montana) invasion doubles emissions of nitric oxide and increases ozone pollution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**: 10115-10119.
Higgins, L.M., and Kennedy, P.G. (2012) Symbiotic Frankia bacteria in Alnus forests in Mexico and the United States of America: is geographic location a good predictor of assemblage structure? *Botany* **90**: 423-431.
Hill, G.B., and Henry, G.H. (2011) Responses of High Arctic wet sedge tundra to climate warming since 1980. *Global Change Biology* **17**: 276-287.
Hiltbrunner, E., Aerts, R., Buhlmann, T., Huss-Danell, K., Magnusson, B., Myrold, D.D. *et al.* (2014) Ecological consequences of the expansion of N(2)-fixing plants in cold biomes. *Oecologia* **176**: 11-24.
Hinterstoisser, H. (1987) Effects on forests of alpine skiing. *Förderungsdienst* **35**: 186-195.
Hinzman, L.D., Bettez, N.D., Bolton, W.R., Chapin, F.S., Dyurgerov, M.B., Fastie, C.L. *et al.* (2005) Evidence and implications of recent climate change in northern Alaska and other arctic regions. *Climatic Change* **72**: 251-298.
Hixson, S., Walker, R., and Skau, C. (1988) Spring denitrification rates in soils of four eastside Sierra Nevada plant communities. *The Great Basin Naturalist*: 558-562.
Holland, E.A., and Detling, J.K. (1990) Plant response to herbivory and belowground nitrogen cycling. *Ecology* **71**: 1040-1049.
Holland, E.A., Parton, W.J., Detling, J.K., and Coppock, D.L. (1992) Physiological responses of plant populations to herbivory and their consequences for ecosystem nutrient flow. *The American Naturalist* **140**: 685-706.
Holland, E.A., Dentener, F.J., Braswell, B.H., and Sulzman, J.M. (1999) Contemporary and pre-industrial global reactive nitrogen budgets. *Biogeochemistry* **46**: 7-43.
Holman, R.M., and Schwintzer, C.R. (1987) Distribution of spore-positive and spore-negative nodules of Alnus incana ssp. rugosa in Maine, USA. *Plant and Soil* **104**: 103-111.
Holzmann, H.-P., and Haselwandter, K. (1988) Contribution of nitrogen fixation to nitrogen nutrition in an alpine sedge community (Caricetum curvulae). *Oecologia* **76**: 298-302.
Hood, E.W., Williams, M.W., and Caine, N. (2003) Landscape controls on organic and inorganic nitrogen leaching across an alpine/subalpine ecotone, Green Lakes Valley, Colorado Front Range. *Ecosystems* **6**: 0031-0045.

Houwers, A., and Akkermans, A. (1981) Influence of inoculation on yield of Alnus glutinosa in the Netherlands. *Plant and Soil* **61**: 189-202.
Huber, E., Wanek, W., Gottfried, M., Pauli, H., Schweiger, P., Arndt, S.K. *et al.* (2007) Shift in soil–plant nitrogen dynamics of an alpine–nival ecotone. *Plant and Soil* **301**: 65-76.
Hudson, J.M., and Henry, G.H. (2009) Increased plant biomass in a High Arctic heath community from 1981 to 2008. *Ecology* **90**: 2657-2663.
Huguet, V., Batzli, J.M., Zimpfer, J.F., Normand, P., Dawson, J.O., and Fernandez, M.P. (2001) Diversity and Specificity of Frankia Strains in Nodules of Sympatric Myrica gale, Alnus incana, andShepherdia canadensis Determined by rrsGene Polymorphism. *Applied and environmental microbiology* **67**: 2116-2122.
Hunziker, M., Caviezel, C., and Kuhn, N.J. (2017) Shrub encroachment by green alder on subalpine pastures: Changes in mineral soil organic carbon characteristics. *Catena* **157**: 35-46.
Huss-Danell, K. (1986) Growth and production of leaf litter nitrogen by Alnus incana in response to liming and fertilization on degenerated forest soil. *Canadian Journal of Forest Research* **16**: 847-853.
Huss-Danell, K. (1997) Actinorhizal symbioses and their N2 fixation. *New Phytologist* **136**: 375-405.
Huss-Danell, K., Uliassi, D., and Renberg, I. (1997) River and lake sediments as sources of infective Frankia (Alnus). *Plant and soil* **197**: 35-39.
Igual, J.M., Valverde, A., Velázquez, E., Santa Regina, I., and Rodríguez-Barrueco, C. (2006) Natural diversity of nodular microsymbionts of Alnus glutinosa in the Tormes River basin. *Plant and soil* **280**: 373-383.
Ingestad, T. (1981) Nutrition and growth of birch and grey alder seedlings in low conductivity solutions and at varied relative rates of nutrient addition. *Physiologia Plantarum* **52**: 454-466.
Jacot, K.A., Hartwig, U., Lüscher, A., and Nösberger, J. (1998) The Significance of Legumes and Symbiotic N2-Fixation Along an Altitudinal Gradient in the Alps. In *Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century*: Springer, pp. 653-653.
Jacot, K.A., Lüscher, A., Nösberger, J., and Hartwig, U.A. (2000a) Symbiotic N2 fixation of various legume species along an altitudinal gradient in the Swiss Alps. *Soil Biology and Biochemistry* **32**: 1043-1052.
Jacot, K.A., Lüscher, A., Nösberger, J., and Hartwig, U.A. (2000b) The relative contribution of symbiotic N2 fixation and other nitrogen sources to grassland ecosystems along an altitudinal gradient in the Alps. *Plant and Soil* **225**: 201-211.
Jacot, K.A., Lüscher, A., Suter, M., Nösberger, J., and Hartwig, U.A. (2005) Significance of legumes for the distribution of plant species in grassland ecosystems at different altitudes in the Alps. *Plant ecology* **180**: 1-12.
Jaeger, C.H., Monson, R.K., Fisk, M.C., and Schmidt, S.K. (1999) Seasonal partitioning of nitrogen by plants and soil microorganisms in an alpine ecosystem. *Ecology* **80**: 1883-1891.
Jeong, S.-C., and Myrold, D.D. (2001) Population size and diversity of Frankia in soils of Ceanothus velutinus and Douglas-fir stands. *Soil Biology and Biochemistry* **33**: 931-941.
Johnson, D., and Rumbaugh, M. (1986) Field nodulation and acetylene reduction activity of high-altitude legumes in the western United States. *Arctic and Alpine Research*: 171-179.
Johnson, D., Vandenkoornhuyse, P.J., Leake, J.R., Gilbert, L., Booth, R.E., Grime, J.P. *et al.* (2004) Plant communities affect arbuscular mycorrhizal fungal diversity and community composition in grassland microcosms. *New phytologist* **161**: 503-515.
Johnson, L.C., and Matchett, J.R. (2001) Fire and grazing regulate belowground processes in tallgrass prairie. *Ecology* **82**: 3377-3389.
Jordan, D., McNicol, P.J., and Marshall, M.R. (1978) Biological nitrogen fixation in the terrestrial environment of a high Arctic ecosystem (Truelove Lowland, Devon Island, NWT). *Canadian Journal of Microbiology* **24**: 643-649.
Junk, G., and Svec, H.J. (1958) The absolute abundance of the nitrogen isotopes in the atmosphere and compressed gas from various sources. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **14**: 234-243.
Kapos, V., Lysenko, I., and Lesslie, R. (2000) Assessing forest integrity and naturalness in relation to biodiversity. *Forest Resources Assessment Programme Working Paper (FAO)*.
Kashanski, C.R., and Schwintzer, C.R. (1987) Distribution of spore-positive and spore-negative nodules of Myrica gale in Maine, USA. *Plant and soil* **104**: 113-120.
Kerle, E.A. (1985) The ecology of lupines in Crater Lake National Park, Oregon.
Kernaghan, G., and Currah, R. (1998) Ectomycorrhizal fungi at tree line in the Canadian Rockies.
Kernaghan, G., and Harper, K. (2001) Community structure of ectomycorrhizal fungi across an alpine/subalpine ecotone. *Ecography* **24**: 181-188.
Keyser, A.R., Kimball, J.S., Nemani, R.R., and Running, S.W. (2000) Simulating the effects of climate change on the carbon balance of North American high - latitude forests. *Global Change Biology* **6**: 185-195.

Khan, A., Myrold, D.D., and Misra, A.K. (2007) Distribution of Frankia genotypes occupying Alnus nepalensis nodules with respect to altitude and soil characteristics in the Sikkim Himalayas. *Physiologia Plantarum* **130**: 364-371.
Kielland, K., Olson, K., Ruess, R.W., and Boone, R.D. (2006) Contribution of winter processes to soil nitrogen flux in taiga forest ecosystems. *Biogeochemistry* **81**: 349-360.
Klironomos, J.N., Moutoglis, P., Kendrick, B., and Widden, P. (1993) A comparison of spatial heterogeneity of vesicular–arbuscular mycorrhizal fungi in two maple-forest soils. *Canadian Journal of Botany* **71**: 1472-1480.
Knapp, A., and Seastedt, T. (1986) Detritus accumulation limits productivity of tallgrass prairie. *BioScience* **36**: 662-668.
Koch, B., Edwards, P.J., Blanckenhorn, W.U., Walter, T., and Hofer, G. (2015) Shrub Encroachment Affects the Diversity of Plants, Butterflies, and Grasshoppers on Two Swiss Subalpine Pastures. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research* **47**: 345-357.
Komac, B., Pladevall, C., Domènech, M., and Fanlo, R. (2015) Functional diversity and grazing intensity in sub - alpine and alpine grasslands in Andorra. *Applied vegetation science* **18**: 75-85.
Kopacek, J., Stuchlik, E., and Wright, R.F. (2005) Long-term trends and spatial variability in nitrate leaching from alpine catchment-lake ecosystems in the Tatra Mountains (Slovakia-Poland). *Environ Pollut* **136**: 89-101.
Körner, C. (1995) Alpine plant diversity: a global survey and functional interpretations. In *Arctic and alpine biodiversity: patterns, causes and ecosystem consequences*: Springer Science & Business Media, pp. 45-62.
Körner, C. (2000) Why are there global gradients in species richness? mountains might hold the answer. *Trends in Ecology & Evolution* **15**: 513-514.
Körner, C. (2003) *Alpine plant life: functional plant ecology of high mountain ecosystems; with 47 tables*: Springer.
Körner, C. (2004) Mountain biodiversity, its causes and function. *Ambio*: 11-17.
Körner, C. (2012) *Alpine treelines: functional ecology of the global high elevation tree limits*. Springer Basel: Springer Science & Business Media.
Kottek, M., Grieser, J., Beck, C., Rudolf, B., and Rubel, F. (2006) World map of the Köppen-Geiger climate classification updated. *Meteorologische Zeitschrift* **15**: 259-263.
Kräuchi, N., Brang, P., and Schönenberger, W. (2000) Forests of mountainous regions: gaps in knowledge and research needs. *Forest Ecology and Management* **132**: 73-82.
Krumholz, G.D., Chval, M.S., McBride, M.J., and Tisa, L.S. (2003) Germination and physiological properties of Frankia spores. In *Frankia symbiosis*: Springer, pp. 57-67.
Kubota, Y., Shiono, T., and Kusumoto, B. (2015) Role of climate and geohistorical factors in driving plant richness patterns and endemicity on the east Asian continental islands. *Ecography* **38**: 639-648.
Kurdali, F., Capellano, A., Moiroud, A., and Domenach, A. (1989) Study of the contribution of the shoot and/or root of Alnus sp. in the compatibility between the host and a Sp+ Frankia strain using a grafting technique. *Plant and soil* **113**: 101-109.
Kurdali, F., Rinaudo, G., Moiroud, A., and Domenach, A. (1990) Competition for nodulation and 15N2-fixation between a Sp+ and a Sp− *Frankia* strain in *Alnus incana*. *Soil Biology and Biochemistry* **22**: 57-64.
Kurdali, F., Domenach, A.-M., Fernandez, M.D.L.P., Capellano, A., and Moiroud, A. (1988) Compatibility of Frankiae spore positive and spore negative inocula with Alnus glutinosa and Alnus incana. *Soil Science and Plant Nutrition* **34**: 451-459.
Lam, P., Jensen, M.M., Lavik, G., McGinnis, D.F., Müller, B., Schubert, C.J. *et al.* (2007) Linking crenarchaeal and bacterial nitrification to anammox in the Black Sea. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**: 7104-7109.
Lawrie, A. (1981) Nitrogen fixation by native Australian legumes. *Australian Journal of Botany* **29**: 143-157.
Lawton, J.H. (1994) What do species do in ecosystems? *Oikos*: 367-374.
Le Roux, X., Bardy, M., Loiseau, P., and Louault, F. (2003) Stimulation of soil nitrification and denitrification by grazing in grasslands: do changes in plant species composition matter? *Oecologia* **137**: 417-425.
Le Roux, X., Schmid, B., Poly, F., Barnard, R.L., Niklaus, P.A., Guillaumaud, N. *et al.* (2013) Soil environmental conditions and microbial build-up mediate the effect of plant diversity on soil nitrifying and denitrifying enzyme activities in temperate grasslands. *PLoS One* **8**: e61069.
Leininger, S., Urich, T., Schloter, M., Schwark, L., Qi, J., Nicol, G. *et al.* (2006) Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature* **442**: 806-809.

Li, K., Gong, Y., Song, W., Lv, J., Chang, Y., Hu, Y. *et al.* (2012) No significant nitrous oxide emissions during spring thaw under grazing and nitrogen addition in an alpine grassland. *Global Change Biology* **18**: 2546-2554.
Lichstein, J.W. (2007) Multiple regression on distance matrices: a multivariate spatial analysis tool. *Plant Ecology* **188**: 117-131.
Lipson, D.A. (2007) Relationships between temperature responses and bacterial community structure along seasonal and altitudinal gradients. *FEMS microbiology ecology* **59**: 418-427.
Lipson, D.A., and Monson, R.K. (1998) Plant-microbe competition for soil amino acids in the alpine tundra: effects of freeze-thaw and dry-rewet events. *Oecologia* **113**: 406-414.
Lipson, D.A., Schmidt, S.K., and Monson, R.K. (2000) Carbon availability and temperature control the post-snowmelt decline in alpine soil microbial biomass. *Soil Biology and Biochemistry* **32**: 441-448.
Lomolino, M. (2001) Elevation gradients of species - density: historical and prospective views. *Global Ecology and biogeography* **10**: 3-13.
Luo, J., Tillman, R., and Ball, P. (1999) Grazing effects on denitrification in a soil under pasture during two contrasting seasons. *Soil Biology and Biochemistry* **31**: 903-912.
Maggia, L., and Bousquet, J. (1994) Molecular phylogeny of the actinorhizal Hamamelidae and relationships with host promiscuity towards Frankia. *Molecular ecology* **3**: 459-467.
Makarov, M., Glaser, B., Zech, W., Malysheva, T., Bulatnikova, I., and Volkov, A. (2003) Nitrogen dynamics in alpine ecosystems of the northern Caucasus. *Plant and Soil* **256**: 389-402.
Malcolm, D., Hooker, J., and Wheeler, C. (1985) Frankia symbiosis as a source of nitrogen in forestry: a case study of symbiotic nitrogen-fixation in a mixed Alnus-Picea plantation in Scotland. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh, Section B: Biological Sciences* **85**: 263-282.
Malhi, S., McGill, W., and Nyborg, M. (1990) Nitrate losses in soils: effect of temperature, moisture and substrate concentration. *Soil Biology and Biochemistry* **22**: 733-737.
Mansour, S.R., Dewedar, A., and Torrey, J.G. (1990) Isolation, culture, and behavior of Frankia strain HFPCgI4 from root nodules of Casuarina glauca. *Botanical gazette* **151**: 490-496.
Margesin, R., and Miteva, V. (2011) Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. *Research in microbiology* **162**: 346-361.
Margesin, R., Jud, M., Tscherko, D., and Schinner, F. (2009) Microbial communities and activities in alpine and subalpine soils. *FEMS microbiology ecology* **67**: 208-218.
Margesin, R., Gander, S., Zacke, G., Gounot, A.M., and Schinner, F. (2003) Hydrocarbon degradation and enzyme activities of cold-adapted bacteria and yeasts. *Extremophiles* **7**: 451-458.
Mariotti, A. (1983) Atmospheric nitrogen is a reliable standard for natural 15N abundance measurements. *Nature* **303**: 685-687.
Markham, J.H. (2008) Variability of nitrogen-fixing Frankia on Alnus species. *Botany* **86**: 501-510.
Markham, J.H. (2009) Variation in moss-associated nitrogen fixation in boreal forest stands. *Oecologia* **161**: 353-359.
Markham, J.H., and Chanway, C.P. (1996) Alnus rubra nodulation capacity of soil under five species from harvested forest sites in coastal British Columbia. *Plant and soil* **178**: 283-286.
Martens-Habbena, W., Berube, P.M., Urakawa, H., José, R., and Stahl, D.A. (2009) Ammonia oxidation kinetics determine niche separation of nitrifying Archaea and Bacteria. *Nature* **461**: 976-979.
Maunuksela, L., Zepp, K., Koivula, T., Zeyer, J., Haahtela, K., and Hahn, D. (1999) Analysis of Frankia populations in three soils devoid of actinorhizal plants. *FEMS microbiology ecology* **28**: 11-21.
Mayer, R., Kaufmann, R., Vorhauser, K., and Erschbamer, B. (2009) Effects of grazing exclusion on species composition in high-altitude grasslands of the Central Alps. *Basic and Applied Ecology* **10**: 447-455.
Maynard, C.A. (1980) Host-symbiont interactions among Frankia strains and Alnus open-pollinated families.
McGrady-Steed, J., Harris, P.M., and Morin, P.J. (1997) Biodiversity Regulates Ecosystem Predictability. *Nature* **390**: 162-165.
McNeill, A., and Unkovich, M. (2007) The nitrogen cycle in terrestrial ecosystems. In *Nutrient cycling in terrestrial ecosystems*: Springer, pp. 37-64.
Mejstrik, V., and Benecke, U. (1969) The ectotrophic mycorrhizas of Alnus viridis (Chaix) DC and their significance in respect to phosphorus uptake. *New Phytologist* **68**: 141-149.
Melillo, J., Steudler, P., Aber, J., Newkirk, K., Lux, H., Bowles, F. *et al.* (2002) Soil warming and carbon-cycle feedbacks to the climate system. *Science* **298**: 2173-2176.
Menge, D.N., Levin, S.A., and Hedin, L.O. (2009) Facultative versus obligate nitrogen fixation strategies and their ecosystem consequences. *The American Naturalist* **174**: 465-477.
Menu, F., Roebuck, J.-P., and Viala, M. (2000) Bet-hedging diapause strategies in stochastic environments. *The American Naturalist* **155**: 724-734.

Merrill, E.H., Stanton, N.L., and Hak, J.C. (1994) Responses of bluebunch wheatgrass, Idaho fescue, and nematodes to ungulate grazing in Yellowstone National Park. *Oikos*: 231-240.
Meybeck, M., Green, P., and Vörösmarty, C. (2001) A new typology for mountains and other relief classes: an application to global continental water resources and population distribution. *Mountain Research and Development* **21**: 34-45.
Mikan, C.J., Schimel, J.P., and Doyle, A.P. (2002) Temperature controls of microbial respiration in arctic tundra soils above and below freezing. *Soil Biology and Biochemistry* **34**: 1785-1795.
Miki, A. (1977) Late Cretaceous pollen and spore floras of northern Japan: composition and interpretation. *Journal of the Faculty of Science, Hokkaido University Series 4, Geology and mineralogy= 北海道大學理學部紀要* **17**: 399-436.
Mills, L.S., Soulé, M.E., and Doak, D.F. (1993) The keystone-species concept in ecology and conservation. *BioScience* **43**: 219-224.
Minchin, F., Witty, J., Sheehy, J., and Müller, M. (1983) A major error in the acetylene reduction assay: decreases in nodular nitrogenase activity under assay conditions. *Journal of Experimental Botany* **34**: 641-649.
Mirza, B.S., Welsh, A., Rieder, J.P., Paschke, M.W., and Hahn, D. (2009) Diversity of frankiae in soils from five continents. *Syst Appl Microbiol* **32**: 558-570.
Mitchell, J.S., and Ruess, R.W. (2009a) N2 fixing alder (Alnus viridis spp. fruticosa) effects on soil properties across a secondary successional chronosequence in interior Alaska. *Biogeochemistry* **95**: 215-229.
Mitchell, J.S., and Ruess, R.W. (2009b) Seasonal Patterns of Climate Controls Over Nitrogen Fixation by Alnus viridis subsp.Fruticosa in a Secondary Successional Chronosequence in Interior Alaska. *Ecoscience* **16**: 341-351.
Mogge, B., Kaiser, E.-A., and Munch, J.-C. (1998) Nitrous oxide emissions and denitrificationN-losses from forest soils in the Bornhöved Lake region (Northern Germany). *Soil Biology and Biochemistry* **30**: 703-710.
Montané, F., Rovira, P., and Casals, P. (2007) Shrub encroachment into mesic mountain grasslands in the Iberian peninsula: Effects of plant quality and temperature on soil C and N stocks. *Global Biogeochemical Cycles* **21**: n/a-n/a.
Montané, F., Romanyà, J., Rovira, P., and Casals, P. (2010) Aboveground litter quality changes may drive soil organic carbon increase after shrub encroachment into mountain grasslands. *Plant and Soil* **337**: 151-165.
Monz, C.A., and Schwintzer, C.R. (1989) The physiology of spore-negative and spore-positive nodules of Myrica gale. *Plant and soil* **118**: 75-87.
Mosier, A., Klemedtsson, L., Sommerfeld, R., and Musselman, R. (1993) Methane and nitrous oxide flux in a Wyoming subalpine meadow. *Global Biogeochemical Cycles* **7**: 771-784.
Mueller, M.H., Alaoui, A., and Alewell, C. (2016) Water and solute dynamics during rainfall events in headwater catchments in the Central Swiss Alps under the influence of green alder shrubs and wetland soils. *Ecohydrology*.
Mueller, R.C., Paula, F.S., Mirza, B.S., Rodrigues, J.L., Nüsslein, K., and Bohannan, B.J. (2014) Links between plant and fungal communities across a deforestation chronosequence in the Amazon rainforest. *The ISME journal* **8**: 1548-1550.
Mueller-Dombois, D., and Whiteaker, L. (1990) Plants associated with Myrica faya and two other pioneer trees on a recent volcanic surface in Hawaii Volcanoes National Park. *Phytocoenologia* **19**: 29-41.
Murai, S. (1964) Phytotaxonomical and geobotanical studies on gen. Alnus in Japan (III). Taxonomy of whole world species and distribution of each section. *Bulletin of the Government Forest Experiment Station= Ringyo Shikenjo kenkyu hokoku*: 1-107.
Murchie, E.H., and Lawson, T. (2013) Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *Journal of experimental botany* **64**: 3983-3998.
Myers-Smith, I.H., Forbes, B.C., Wilmking, M., Hallinger, M., Lantz, T., Blok, D. *et al.* (2011) Shrub expansion in tundra ecosystems: dynamics, impacts and research priorities. *Environmental Research Letters* **6**: 045509.
Nadelhoffer, K., Giblin, A., Shaver, G., and Laundre, J. (1991) Effects of temperature and substrate quality on element mineralization in six arctic soils. *Ecology* **72**: 242-253.
Navarro, E., Bousquet, J., Moiroud, A., Munive, A., Piou, D., and Normand, P. (2003) Molecular phylogeny of Alnus (Betulaceae), inferred from nuclear ribosomal DNA ITS sequences. In *Frankia Symbiosis*: Springer, pp. 207-217.
Neff, J.C., Bowman, W.D., Holland, E.A., Fisk, M.C., and Schmidt, S.K. (1994) Fluxes of nitrous oxide and methane from nitrogen-amended soils in a Colorado alpine ecosystem. *Biogeochemistry* **27**: 23-33.

Nicol, G.W., Leininger, S., Schleper, C., and Prosser, J.I. (2008) The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. *Environ Microbiol* **10**: 2966-2978.
Nicolussi, K., Kaufmann, M., Patzelt, G., and Thurner, A. (2005) Holocene tree-line variability in the Kauner Valley, Central Eastern Alps, indicated by dendrochronological analysis of living trees and subfossil logs. *Vegetation History and Archaeobotany* **14**: 221-234.
Niedrist, G., Tasser, E., Lüth, C., Dalla Via, J., and Tappeiner, U. (2009) Plant diversity declines with recent land use changes in European Alps. *Plant Ecology* **202**: 195.
Nordin, A., Schmidt, I.K., and Shaver, G.R. (2004) Nitrogen uptake by arctic soil microbes and plants in relation to soil nitrogen supply. *Ecology* **85**: 955-962.
Normand, P., and Lalonde, M. (1982) Evaluation of Frankia strains isolated from provenances of two Alnus species. *Canadian Journal of Microbiology* **28**: 1133-1142.
Nouhra, E.R., Urcelay, C., Longo, M.S., and Fontenla, S. (2012) Differential hypogeous sporocarp production from Nothofagus dombeyi and N. pumilio forests in southern Argentina. *Mycologia* **104**: 45-52.
Nyborg, M., Laidlaw, J., Solberg, E., and Malhi, S. (1997) Denitrification and nitrous oxide emissions from a Black Chernozemic soil during spring thaw in Alberta. *Canadian journal of soil science* **77**: 153-160.
Ochsenreiter, T., Selezi, D., Quaiser, A., Bonch - Osmolovskaya, L., and Schleper, C. (2003) Diversity and abundance of Crenarchaeota in terrestrial habitats studied by 16S RNA surveys and real time PCR. *Environmental Microbiology* **5**: 787-797.
Oline, D.K., Schmidt, S.K., and Grant, M.C. (2006) Biogeography and landscape-scale diversity of the dominant Crenarchaeota of soil. *Microbial ecology* **52**: 480-490.
Ollinger, S., Smith, M., Martin, M., Hallett, R., Goodale, C., and Aber, J. (2002) Regional variation in foliar chemistry and N cycling among forests of diverse history and composition. *Ecology* **83**: 339-355.
Olofsson, J., Kitti, H., Rautiainen, P., Stark, S., and Oksanen, L. (2001) Effects of summer grazing by reindeer on composition of vegetation, productivity and nitrogen cycling. *Ecography* **24**: 13-24.
Osono, T. (2007) Ecology of ligninolytic fungi associated with leaf litter decomposition. *Ecological Research* **22**: 955-974.
Paine, R.T. (1969) A note on trophic complexity and community stability. *The American Naturalist* **103**: 91-93.
Paradis, E. (2011) *Analysis of Phylogenetics and Evolution with R*: Springer.
Pastor, J., and Binkley, D. (1998) Nitrogen fixation and the mass balances of carbon and nitrogen in ecosystems. *Biogeochemistry* **43**: 63-78.
Pastor, J., Dewey, B., Naiman, R., McInnes, P., and Cohen, Y. (1993) Moose browsing and soil fertility in the boreal forests of Isle Royale National Park. *Ecology* **74**: 467-480.
Patra, A., Abbadie, L., Clays-Josserand, A., Degrange, V., Grayston, S., Loiseau, P. *et al.* (2005) Effects of grazing on microbial functional groups involved in soil N dynamics. *Ecological Monographs* **75**: 65-80.
Pauli, H., Gottfried, M., and Grabherr, G. (1996) Effects of climate change on mountain ecosystems--upward shifting of alpine plants. *World resource review* **8**.
Peel, M.C., Finlayson, B.L., and McMahon, T.A. (2007) Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. *Hydrology and earth system sciences discussions* **4**: 439-473.
Pellissier, L., Alvarez, N., Espíndola, A., Pottier, J., Dubuis, A., Pradervand, J.-N., and Guisan, A. (2013) Phylogenetic alpha and beta diversities of butterfly communities correlate with climate in the western Swiss Alps. *Ecography* **36**: 541-550.
Philippi, T. (1993) Bet-hedging germination of desert annuals: beyond the first year. *The American Naturalist* **142**: 474-487.
Phoenix, G.K., Hicks, W.K., Cinderby, S., Kuylenstierna, J.C., Stock, W.D., Dentener, F.J. *et al.* (2006) Atmospheric nitrogen deposition in world biodiversity hotspots: the need for a greater global perspective in assessing N deposition impacts. *Global Change Biology* **12**: 470-476.
Pisetta, M., Montecchio, L., Longa, C.M.O., Salvadori, C., Zottele, F., and Maresi, G. (2012) Green alder decline in the Italian Alps. *Forest Ecology and Management* **281**: 75-83.
Podrázský, V., and Ulbrichova, I. (2003) Soil chemistry changes in green alder [Alnus alnobetula (Ehrh.) C. Koch] stands in mountain areas. *Journal of Forest Science* **49**: 104-107.
Põlme, S., Bahram, M., Koljalg, U., and Tedersoo, L. (2014) Global biogeography of Alnus-associated Frankia actinobacteria. *New Phytol* **204**: 979-988.
Põlme, S., Bahram, M., Yamanaka, T., Nara, K., Dai, Y.C., Grebenc, T. *et al.* (2013) Biogeography of ectomycorrhizal fungi associated with alders (Alnus spp.) in relation to biotic and abiotic variables at the global scale. *New Phytologist* **198**: 1239-1249.

Porter, R.B., Lacourse, T., Hawkins, B.J., and Yanchuk, A. (2013) Adaptive variation in growth, phenology, cold tolerance and nitrogen fixation of red alder (Alnus rubra Bong.). *Forest Ecology and Management* **291**: 357-366.
Powers, R.F. (1990) Nitrogen mineralization along an altitudinal gradient: interactions of soil temperature, moisture, and substrate quality. *Forest Ecology and Management* **30**: 19-29.
Pozzi, A.C. (2014) Rôles adaptatifs et contraintes de la sporulation chez les microorganismes associés aux plantes: cas de la sporulation in planta dans la symbiose actinorhizienne Frankia (Frankiaceae)–Alnus (Betulaceae). In: Université Claude Bernard-Lyon I.
Pozzi, A.C., Roy, M.e., Nagati, M.e., Schwob, G., Manzi, S., Gardes, M. *et al.* (accepted 2017) Patterns of diversity, endemism and specialization in the root symbiont communities of alder species on the island of Corsica. *New Phytologist*.
Pozzi, A.C., Bautista-Guerrero, H.H., Abby, S.S., Herrera-Belaroussi, A., Abrouk, D., Normand, P. *et al.* (accepted 2018) Robust Frankia phylogeny, species delineation and intraspecies diversity based on MLSA and a simplified protocol adapted to intensive field sampling. *Systematic and Applied Microbiology*.
Pozzi, A.C., Bautista - Guerrero, H.H., Nouioui, I., Cotin - Galvan, L., Pepin, R., Fournier, P. *et al.* (2015) In - planta sporulation phenotype: a major life history trait to understand the evolution of Alnus - infective Frankia strains. *Environmental microbiology* **17**: 3125-3138.
Prescott, C.E. (2005) Do rates of litter decomposition tell us anything we really need to know? *Forest Ecology and Management* **220**: 66-74.
Quispel, A. (1990) Discoveries, discussions, and trends in research on actinorhizal root nodule symbioses before 1978. *The biology of Frankia and actinorhizal plants*: 15-33.
Rastin, N., Schlechte, G., and Hüttermann, A. (1990) Soil macrofungi and some soil biological, biochemical and chemical investigations on the upper and lower slope of a spruce forest. *Soil Biology and Biochemistry* **22**: 1039-1047.
Rehder, H., and Schäfer, A. (1978) Nutrient turnover studies in alpine ecosystems. *Oecologia* **34**: 309-327.
Ren, B.Q., Xiang, X.G., and Chen, Z.D. (2010) Species identification of Alnus (Betulaceae) using nrDNA and cpDNA genetic markers. *Mol Ecol Resour* **10**: 594-605.
Rhoades, C., Oskarsson, H., Binkley, D., and Stottlemyer, B. (2001) Alder (Alnus crispa) effects on soils in ecosystems of the Agashashok River valley, northwest Alaska. *Ecoscience* **8**: 89-95.
Richard, L. (1967) L'aire de répartition de l'Aulne vert. *Doc Carte Végét des Alpes*: 81-113.
Risch, A.C., Jurgensen, M.F., Page-Dumroese, D.S., Wildi, O., and Schütz, M. (2008) Long-term development of above- and below-ground carbon stocks following land-use change in subalpine ecosystems of the Swiss National Park. *Canadian Journal of Forest Research* **38**: 1590-1602.
Robson, T.M., Lavorel, S., Clement, J.-C., and Le Roux, X. (2007) Neglect of mowing and manuring leads to slower nitrogen cycling in subalpine grasslands. *Soil Biology and Biochemistry* **39**: 930-941.
Rodriguez, D., Guerra, T.M., Forstner, M.R., and Hahn, D. (2016) Diversity of Frankia in soil assessed by Illumina sequencing of nifH gene fragments. *Systematic and Applied Microbiology* **39**: 391-397.
Rodriguez-Barrueco, C. (1968) The occurrence of the root-nodule endophytes of Alnus glutinosa and Myrica gale in soils. *Microbiology* **52**: 189-194.
Romme, W.H. (1982) Fire and landscape diversity in subalpine forests of Yellowstone National Park. *Ecological Monographs* **52**: 199-221.
Roy, J., Albert, C.H., Ibanez, S., Saccone, P., Zinger, L., Choler, P. *et al.* (2013a) Microbes on the cliff: alpine cushion plants structure bacterial and fungal communities. *Front Microbiol* **4**: 64.
Roy, M., Rochet, J., Manzi, S., Jargeat, P., Gryta, H., Moreau, P.A., and Gardes, M. (2013b) What determines Alnus - associated ectomycorrhizal community diversity and specificity? A comparison of host and habitat effects at a regional scale. *New Phytologist* **198**: 1228-1238.
Ruffini, F.V., Hoffmann, C., Streifeneder, T., and Stiefenhofer, A. (2009) Estimation of the future agro-structural development in the Alps until 2020. *OGA Jahrbuch-Journal of the Austrian Society of Agricultural Economics* **19**: 21-30.
Ryden, J., Lund, L., Letey, J., and Focht, D. (1979) Direct measurement of denitrification loss from soils: II. Development and application of field methods. *Soil Science Society of America Journal* **43**: 110-118.
Sala, O.E., Chapin, F.S., Armesto, J.J., Berlow, E., Bloomfield, J., Dirzo, R. *et al.* (2000) Global biodiversity scenarios for the year 2100. *science* **287**: 1770-1774.
Samant, S., Huo, T., Dawson, J.O., and Hahn, D. (2016) Abundance and relative distribution of Frankia host infection groups under actinorhizal Alnus glutinosa and non-actinorhizal Betula nigra trees. *Microbial ecology* **71**: 473-481.
Samant, S., Sha, Q., Iyer, A., Dhabekar, P., and Hahn, D. (2012) Quantification of Frankia in soils using SYBR Green based qPCR. *Syst Appl Microbiol* **35**: 191-197.

Sanginga, N., Danso, S., and Bowen, G. (1989) Nodulation and growth response of *Allocasuarina* and *Casuarina* species to phosphorus fertilization. *Plant and Soil* **118**: 125-132.
Schimel, J.P., and Clein, J.S. (1996) Microbial response to freeze-thaw cycles in tundra and taiga soils. *Soil Biology and Biochemistry* **28**: 1061-1066.
Schinner, F. (1982) Soil microbial activities and litter decomposition related to altitude. *Plant and Soil* **65**: 87-94.
Schinner, F., and Gstraunthaler, G. (1981) Adaptation of microbial activities to the environmental conditions in alpine soils. *Oecologia* **50**: 113-116.
Schmidt, S.K., Lipson, D.A., and Raab, T.K. (2000) Effects of willows (Salix brachycarpa) on populations of salicylate-mineralizing microorganisms in alpine soils. *Journal of Chemical Ecology* **26**: 2049-2057.
Schürmann, A., Mohn, J., and Bachofen, R. (2002) N2O emissions from snow - covered soils in the Swiss Alps. *Tellus B* **54**: 134-142.
Schwintzer, C., and Tjepkema, J. (1990) The biology of Frankia and actinorhizal plants. In: San Diego, CA: Academic Press.
Schwintzer, C.R. (1989) All field-collected actinorhizae examined on Comptonia peregrina and Myrica pensylvanica in Maine are spore negative. *Canadian Journal of Botany* **67**: 1460-1464.
Schwintzer, C.R. (1990) Spore-positive and spore-negative nodules. *The biology of Frankia and actinorhizal plants*: 177-193.
Schwintzer, C.R., and Tjepkema, J.D. (1997) Field nodules of Alnus incana ssp. rugosa and Myrica gale exhibit pronounced acetylene-induced declines in nitrogenase activity. *Canadian journal of botany* **75**: 1415-1423.
Schwob, G., Roy, M., Manzi, S., Pommier, T., and Fernandez, M. (2017) Green alder (Alnus viridis) encroachment shapes microbial communities in subalpine soils and impacts its bacterial or fungal symbionts differently. *Environmental Microbiology*.
Seastedt, T. (1985) Maximization of primary and secondary productivity by grazers. *The American Naturalist* **126**: 559-564.
Seastedt, T.R., Bowman, W.D., Caine, T.N., McKNIGHT, D., Townsend, A., and Williams, M.W. (2004) The landscape continuum: a model for high-elevation ecosystems. *AIBS Bulletin* **54**: 111-121.
Sen, A., Daubin, V., Abrouk, D., Gifford, I., Berry, A.M., and Normand, P. (2014) Phylogeny of the class Actinobacteria revisited in the light of complete genomes. The orders 'Frankiales' and Micrococcales should be split into coherent entities: proposal of Frankiales ord. nov., Geodermatophilales ord. nov., Acidothermales ord. nov. and Nakamurellales ord. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **64**: 3821-3832.
Serreze, M., Walsh, J., Chapin, F.S., Osterkamp, T., Dyurgerov, M., Romanovsky, V. *et al.* (2000) Observational evidence of recent change in the northern high-latitude environment. *Climatic change* **46**: 159-207.
Sharma, E., and Ambasht, R. (1984) Seasonal variation in nitrogen fixation by different ages of root nodules of Alnus nepalensis plantations, in the Eastern Himalayas. *Journal of Applied Ecology*: 265-270.
Sharma, E., and Ambasht, R. (1986) Root nodule age-class transition, production and decomposition in an age sequence of Alnus nepalensis plantation stands in the Eastern Himalayas. *Journal of Applied Ecology*: 689-701.
Sharma, G., Sharma, R., and Sharma, E. (2009) Impact of altitudinal gradients on energetics and efficiencies of N2-fixation in alder–cardamom agroforestry systems of the eastern Himalayas. *Ecological research* **25**: 1-12.
Sharma, G., Sharma, R., Sharma, E., and Singh, K. (2002) Performance of an age series of Alnus–cardamom plantations in the Sikkim Himalaya: Nutrient dynamics. *Annals of Botany* **89**: 273-282.
Shaver, G., and Chapin, F.S. (1980) Response to fertilization by various plant growth forms in an Alaskan tundra: nutrient accumulation and growth. *Ecology* **61**: 662-675.
Shearer, G., and Kohl, D.H. (1986) N2-fixation in field settings: estimations based on natural 15N abundance. *Functional Plant Biology* **13**: 699-756.
Shearer, G., Kohl, D.H., and Chien, S.-H. (1978) The nitrogen-15 abundance in a wide variety of soils. *Soil Science Society of America Journal* **42**: 899-902.
Sheffer, E., Batterman, S.A., Levin, S.A., and Hedin, L.O. (2015) Biome-scale nitrogen fixation strategies selected by climatic constraints on nitrogen cycle. *Nature Plants* **1**: 15182.
Shen, J.p., Zhang, L.m., Zhu, Y.g., Zhang, J.b., and He, J.z. (2008) Abundance and composition of ammonia - oxidizing bacteria and ammonia - oxidizing archaea communities of an alkaline sandy loam. *Environmental Microbiology* **10**: 1601-1611.
Sievering, H., Burton, D., and Caine, N. (1992) Atmospheric loading of nitrogen to alpine tundra in the Colorado Front Range. *Global Biogeochemical Cycles* **6**: 339-346.

Siles, J.A., and Margesin, R. (2016) Abundance and Diversity of Bacterial, Archaeal, and Fungal Communities Along an Altitudinal Gradient in Alpine Forest Soils: What Are the Driving Factors? *Microb Ecol* **72**: 207-220.
Singh, D., Shi, L., and Adams, J.M. (2013) Bacterial diversity in the mountains of South-West China: climate dominates over soil parameters. *J Microbiol* **51**: 439-447.
Singh, D., Takahashi, K., Park, J., and Adams, J.M. (2016) Similarities and contrasts in the archaeal community of two Japanese mountains: Mt. Norikura compared to Mt. Fuji. *Microbial ecology* **71**: 428-441.
Singh, D., Takahashi, K., Kim, M., Chun, J., and Adams, J.M. (2012) A hump-backed trend in bacterial diversity with elevation on Mount Fuji, Japan. *Microbial ecology* **63**: 429-437.
Sirotnak, J.M., and Huntly, N.J. (2000) Direct and indirect effects of herbivores on nitrogen dynamics: voles in riparian areas. *Ecology* **81**: 78-87.
Smit, E., Leeflang, P., Gommans, S., van den Broek, J., van Mil, S., and Wernars, K. (2001) Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. *Applied and environmental microbiology* **67**: 2284-2291.
Smith, A.T., and Foggin, J.M. (1999) The plateau pika (Ochotona curzoniae) is a keystone species for biodiversity on the Tibetan plateau. In *Animal Conservation forum*: Cambridge University Press, pp. 235-240.
Smith-Mckenna, E.K., Resler, L.M., Tomback, D.F., Zhang, H., and Malanson, G.P. (2013) Topographic influences on the distribution of white pine blister rust in Pinus albicaulis treeline communities. *Écoscience* **20**: 215-229.
Soltis, D.E., Soltis, P.S., Morgan, D.R., Swensen, S.M., Mullin, B.C., Dowd, J.M., and Martin, P.G. (1995) Chloroplast gene sequence data suggest a single origin of the predisposition for symbiotic nitrogen fixation in angiosperms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**: 2647-2651.
Soudzilovskaia, N.A., Aksenova, A.A., Makarov, M.I., Onipchenko, V.G., Logvinenko, O.A., ter Braak, C.J.F., and Cornelissen, J.H.C. (2012) Legumes affect alpine tundra community composition via multiple biotic interactions. *Ecosphere* **3**: art33.
Souto, X.C., Chiapusio, G., and Pellissier, F. (2000) Relationships between phenolics and soil microorganisms in spruce forests: significance for natural regeneration. *Journal of chemical ecology* **26**: 2025-2034.
Sprent, J.I. (1987) *The Ecology of the Nitrogen Cycle*: Cambridge University Press.
Strauss, S.Y. (1991) Indirect effects in community ecology: their definition, study and importance. *Trends in Ecology & Evolution* **6**: 206-210.
Streeter, J., and Wong, P.P. (1988) Inhibition of legume nodule formation and N2 fixation by nitrate. *Critical Reviews in Plant Sciences* **7**: 1-23.
Streifeneder, T., Tappeiner, U., Ruffini, F.V., Tappeiner, G., and Hoffmann, C. (2007) Selected Aspects of Agro-structural Change within the Alps. A Comparison of Harmonised Agro-structural Indicators on a Municipal Level in the Alpine Convention Area. *Journal of Alpine Research| Revue de géographie alpine*: 41-52.
Struwe, S., and Kjøller, A. (1990) Seasonality of denitrification in water-logged alder stands. *Plant and Soil* **128**: 109-113.
Sturm, M., Racine, C., and Tape, K. (2001) Climate change: increasing shrub abundance in the Arctic. *Nature* **411**: 546.
Sveinbjörnsson, B., Davis, J., Abadie, W., and Butler, A. (1995) Soil carbon and nitrogen mineralization at different elevations in the Chugach Mountains of south-central Alaska, USA. *Arctic and Alpine research*: 29-37.
Taberlet, P. (1998) Biodiversity at the intraspecific level: the comparative phylogeographic approach. *Journal of Biotechnology* **64**: 91-100.
Tahktajan, A. (1969) Flowering plants: origin and dispersal. *Oliver and Boyd, Edinburgh*.
Tai, X., Mao, W., Liu, G., Chen, T., Zhang, W., Wu, X. *et al.* (2014) Distribution of ammonia oxidizers in relation to vegetation characteristics in the Qilian Mountains, northwestern China. *Biogeosciences Discussions* **11**: 5123-5146.
Tape, K., Sturm, M., and Racine, C. (2006) The evidence for shrub expansion in northern Alaska and the Pan - Arctic. *Global Change Biology* **12**: 686-702.
Tardiff, S.E., and Stanford, J.A. (1998) Grizzly bear digging: effects on subalpine meadow plants in relation to mineral nitrogen availability. *Ecology* **79**: 2219-2228.
Taylor, B.R., Parsons, W.F., and Parkinson, D. (1989) Decomposition of Populus tremuloides leaf litter accelerated by addition of Alnus crispa litter. *Canadian Journal of Forest Research* **19**: 674-679.

Team, R.C. (2012) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2012. In: ISBN 3-900051-07-0.
Teepe, R., Brumme, R., and Beese, F. (2001) Nitrous oxide emissions from soil during freezing and thawing periods. *Soil Biology and Biochemistry* **33**: 1269-1275.
Theodose, T.A., and Bowman, W.D. (1997) Nutrient availability, plant abundance, and species diversity in two alpine tundra communities. *Ecology* **78**: 1861-1872.
Theurillat, J.-P., and Guisan, A. (2001) Potential impact of climate change on vegetation in the European Alps: a review. *Climatic change* **50**: 77-109.
Thomas, T.E., and Harrison, P.J. (1987) Rapid ammonium uptake and nitrogen interactions in five intertidal seaweeds grown under field conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **107**: 1-8.
Thuiller, W., Lavorel, S., Araujo, M.B., Sykes, M.T., and Prentice, I.C. (2005) Climate change threats to plant diversity in Europe. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 8245-8250.
Tibbett, M., Sanders, F., and Cairney, J. (1998) The effect of temperature and inorganic phosphorus supply on growth and acid phosphatase production in arctic and temperate strains of ectomycorrhizal Hebeloma spp. in axenic culture. *Mycological Research* **102**: 129-135.
Tilman, D., and Pacala, S. (1993) The maintenance of species richness in plant communities. *Species diversity in ecological communities*: 13-25.
Tjepkema, J., Schwintzer, C., and Benson, D. (1986) Physiology of actinorhizal nodules. *Annual review of plant physiology* **37**: 209-232.
Tobita, H., Hasegawa, S.F., Yazaki, K., Komatsu, M., and Kitao, M. (2013) Growth and N2 fixation in an Alnus hirsuta (Turcz.) var. sibirica stand in Japan. *Journal of Biosciences* **38**: 761-776.
Torrey, J.G. (1987) Endophyte sporulation in root nodules of actinorhizal plants. *Physiologia Plantarum* **70**: 279-288.
Tortosa, R.D., and Cusato, M. (1991) Effective nodulation of rhamnaceous actinorhizal plants induced by air dry soils. *Plant and Soil* **131**: 229-233.
Tourna, M., Stieglmeier, M., Spang, A., Könneke, M., Schintlmeister, A., Urich, T. *et al.* (2011) Nitrososphaera viennensis, an ammonia oxidizing archaeon from soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**: 8420-8425.
Trinick, M., Dilworth, M., and Grounds, M. (1976) Factors affecting the reduction of acetylene by root nodules of Lupinus species. *New Phytologist* **77**: 359-370.
Tripp, L., Bezdicek, D., and Heilman, P. (1979) Seasonal and diurnal patterns and rates of nitrogen fixation by young red alder. *Forest Science* **25**: 371-380.
Tzean, S.S., Torrey J.G. (1989) Spore germination and the life cycle of Frankia in vitro. *Canadian journal of microbiology* **35**.
Uesaka, S., and Tsuyuzaki, S. (2005) Differential establishment and survival of species in deciduous and evergreen shrub patches and on bare ground, Mt. Koma, Hokkaido, Japan. *Plant Ecology* **175**: 165-177.
Uliassi, D.D., and Ruess, R.W. (2002) Limitations to symbiotic nitrogen fixation in primary succession on the Tanana River floodplain. *Ecology* **83**: 88-103.
Uliassi, D.D., Huss-Danell, K., Ruess, R.W., and Doran, K. (2000) Biomass allocation and nitrogenase activity in Alnus tenuifolia: responses to successional soil type and phosphorus availability. *Ecoscience* **7**: 73-79.
Uri, V., Lõhmus, K., Mander, Ü., Ostonen, I., Aosaar, J., Maddison, M. *et al.* (2011) Long-term effects on the nitrogen budget of a short-rotation grey alder (Alnus incana (L.) Moench) forest on abandoned agricultural land. *Ecological Engineering* **37**: 920-930.
Valdés, M. (2007) Frankia ecology. In *Nitrogen-fixing Actinorhizal Symbioses*: Springer, pp. 49-71.
van Dijk, C. (1978) Spore formation and endophyte diversity in root nodules of Alnus glutinosa (L.) Vill. *New phytologist* **81**: 601-615.
Van Dijk, C. (1984) Ecological aspects of spore formation in the Frankia-Alnus symbiosis.
van Dijk, C., and Merkus, E. (1976) A microscopical study on the development of a spore-like stage on the life cycle of the root-nodule endophyte of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. *New phytologist* **77**: 73-91.
van Dijk, C., Simmer, A., and Weber, A. (1988) Host range differentiation of spore - positive and spore - negative strain types of Frankia in stands of Alnus glutinosa and Alnus incana in Finland. *Physiologia Plantarum* **72**: 349-358.
Vandenbosch, K.A., and Torrey, J.G. (1984) Consequences of sporangial development for nodule function in root nodules of Comptonia peregrina and Myrica gale. *Plant physiology* **76**: 556-560.
Vandenkoornhuyse, P., Ridgway, K., Watson, I., Fitter, A., and Young, J. (2003) Co - existing grass species have distinctive arbuscular mycorrhizal communities. *Molecular Ecology* **12**: 3085-3095.
Verhamme, D.T., Prosser, J.I., and Nicol, G.W. (2011) Ammonia concentration determines differential growth of ammonia-oxidising archaea and bacteria in soil microcosms. *The ISME journal* **5**: 1067.

Virginia, R.A., and Delwiche, C.C. (1982) Natural 15 N abundance of presumed N 2-fixing and non-N 2-fixing plants from selected ecosystems. *Oecologia* **54**: 317-325.
Virtanen, R., Salminen, J., and Strömmer, R. (2008) Soil and decomposer responses to grazing exclusion are weak in mountain snow-beds. *acta oecologica* **33**: 207-212.
Vitousek, P.M., and Walker, L.R. (1989) Biological invasion by Myrica faya in Hawaii: plant demography, nitrogen fixation, ecosystem effects. *Ecological monographs* **59**: 247-265.
Vitousek, P.M., and Howarth, R.W. (1991) Nitrogen limitation on land and in the sea: how can it occur? *Biogeochemistry* **13**: 87-115.
Vitousek, P.M., Menge, D.N., Reed, S.C., and Cleveland, C.C. (2013) Biological nitrogen fixation: rates, patterns and ecological controls in terrestrial ecosystems. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **368**: 20130119.
Vitousek, P.M., Aber, J.D., Howarth, R.W., Likens, G.E., Matson, P.A., Schindler, D.W. *et al.* (1997) Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. *Ecological applications* **7**: 737-750.
Vitousek, P.M., Cassman, K., Cleveland, C., Crews, T., Field, C.B., Grimm, N.B. *et al.* (2002) Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation. *Biogeochemistry* **57**: 1-45.
Vogel, J.G., and Gower, S.T. (1998) Carbon and nitrogen dynamics of boreal jack pine stands with and without a green alder understory. *Ecosystems* **1**: 386-400.
Wagner-Riddle, C., and Thurtell, G. (1998) Nitrous oxide emissions from agricultural fields during winter and spring thaw as affected by management practices. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* **52**: 151-163.
Walker, L.R., and Del Moral, R. (2003) *Primary succession and ecosystem rehabilitation*: Cambridge University Press.
Wall, L.G. (2000) The Actinorhizal Symbiosis. *J Plant Growth Regul* **19**: 167-182.
Wallentin, G., Tappeiner, U., Strobl, J., and Tasser, E. (2008) Understanding alpine tree line dynamics: an individual-based model. *Ecological Modelling* **218**: 235-246.
Wang, A., Wu, F.-Z., Yang, W.-Q., Wu, Z.-C., Wang, X.-X., and Tan, B. (2012a) Abundance and composition dynamics of soil ammonia-oxidizing archaea in an alpine fir forest on the eastern Tibetan Plateau of China. *Canadian journal of microbiology* **58**: 572-580.
Wang, J., Soininen, J., He, J., and Shen, J. (2012b) Phylogenetic clustering increases with elevation for microbes. *Environ Microbiol Rep* **4**: 217-226.
Wang, J.-T., Zheng, Y.-M., Hu, H.-W., Zhang, L.-M., Li, J., and He, J.-Z. (2015a) Soil pH determines the alpha diversity but not beta diversity of soil fungal community along altitude in a typical Tibetan forest ecosystem. *Journal of Soils and Sediments* **15**: 1224-1232.
Wang, J.-T., Cao, P., Hu, H.-W., Li, J., Han, L.-L., Zhang, L.-M. *et al.* (2015b) Altitudinal distribution patterns of soil bacterial and archaeal communities along Mt. Shegyla on the Tibetan Plateau. *Microbial ecology* **69**: 135-145.
Weber, A. (1986) Distribution of Spore-Positive and Spore-Negative Nodules in Stands of Alnus-Glutinosa and Alnus-Incana in Finland. *Plant and Soil* **96**: 205-213.
Weber, A., Nurmiaho - Lassila, E.L., and Sundman, V. (1987) Features of the intrageneric Alnus - Frankia specificity. *Physiologia Plantarum* **70**: 289-296.
Wei, S., Cui, H., He, H., Hu, F., Su, X., and Zhu, Y. (2014) Diversity and distribution of Archaea community along a stratigraphic permafrost profile from Qinghai-Tibetan Plateau, China. *Archaea* **2014**.
Weih, M., and Karlsson, P.S. (2002) Low winter soil temperature affects summertime nutrient uptake capacity and growth rate of mountain birch seedlings in the subarctic, Swedish lapland. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*: 434-439.
Welsh, A.K., Dawson, J.O., Gottfried, G.J., and Hahn, D. (2009) Diversity of Frankia populations in root nodules of geographically isolated Arizona alder trees in central Arizona (United States). *Applied and environmental microbiology* **75**: 6913-6918.
Wheeler, C., Akkermans, A., and Berry, A. (2008) Frankia and actinorhizal plants: a historical perspective. In *Nitrogen-fixing Actinorhizal Symbioses*: Springer, pp. 1-24.
Wheeler, C., Hooker, J., Crowe, A., and Berrie, A. (1986) The improvement and utilization in forestry of nitrogen fixation by actinorhizal plants with special reference toAlnus in Scotland. *Plant and Soil* **90**: 393-406.
Whitham, T.G., Bailey, J.K., Schweitzer, J.A., Shuster, S.M., Bangert, R.K., LeRoy, C.J. *et al.* (2006) A framework for community and ecosystem genetics: from genes to ecosystems. *Nature Reviews Genetics* **7**: 510-523.
Williams, E., Hutchinson, G., and Fehsenfeld, F. (1992) NOx and N2O emissions from soil. *Global Biogeochemical Cycles* **6**: 351-388.
Williams, M.W., Hood, E., and Caine, N. (2001) Role of organic nitrogen in the nitrogen cycle of a high - elevation catchment, Colorado Front Range. *Water Resources Research* **37**: 2569-2581.

Williams, M.W., Seibold, C., and Chowanski, K. (2009) Storage and release of solutes from a subalpine seasonal snowpack: soil and stream water response, Niwot Ridge, Colorado. *Biogeochemistry* **95**: 77-94.
Wojciechowski, M., and Heimbrook, M. (1984) Dinitrogen fixation in alpine tundra, Niwot Ridge, Front Range, Colorado, USA. *Arctic and Alpine Research*: 1-10.
Wu, B., Hogetsu, T., Isobe, K., and Ishii, R. (2007) Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi in a primary successional volcanic desert on the southeast slope of Mount Fuji. *Mycorrhiza* **17**: 495-506.
Wu, D., Hugenholtz, P., Mavromatis, K., Pukall, R., Dalin, E., Ivanova, N.N. *et al.* (2009) A phylogeny-driven genomic encyclopaedia of Bacteria and Archaea. *Nature* **462**: 1056-1060.
Wuchter, C., Abbas, B., Coolen, M.J., Herfort, L., van Bleijswijk, J., Timmers, P. *et al.* (2006) Archaeal nitrification in the ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**: 12317-12322.
Wurtz, T.L. (1995) Understory alder in three boreal forests of Alaska: local distribution and effects on soil fertility. *Canadian journal of forest research* **25**: 987-996.
Yamanaka, T., Li, C.-Y., Bormann, B.T., and Okabe, H. (2003) Tripartite associations in an alder: effects of Frankia and Alpova diplophloeus on the growth, nitrogen fixation and mineral acquisition of Alnus tenuifolia. *Plant and Soil* **254**: 179-186.
Yuan, Y., Si, G., Li, W., and Zhang, G. (2015) Altitudinal Distribution of Ammonia-Oxidizing Archaea and Bacteria in Alpine Grassland Soils Along the South-Facing Slope of Nyqentangula Mountains, Central Tibetan Plateau. *Geomicrobiology Journal* **32**: 77-88.
Zacheis, A., Ruess, R.W., and Hupp, J.W. (2002) Nitrogen dynamics in an Alaskan salt marsh following spring use by geese. *Oecologia* **130**: 600-608.
Zeller, V., Bahn, M., Aichner, M., and Tappeiner, U. (2000) Impact of land-use change on nitrogen mineralization in subalpine grasslands in the Southern Alps. *Biology and Fertility of Soils* **31**: 441-448.
Zhang, L.M., Wang, M., Prosser, J.I., Zheng, Y.M., and He, J.Z. (2009) Altitude ammonia-oxidizing bacteria and archaea in soils of Mount Everest. *FEMS Microbiol Ecol* **70**: 52-61.
Zhang, S., Chen, D., Sun, D., Wang, X., Smith, J.L., and Du, G. (2012) Impacts of altitude and position on the rates of soil nitrogen mineralization and nitrification in alpine meadows on the eastern Qinghai–Tibetan Plateau, China. *Biology and Fertility of Soils* **48**: 393-400.
Zhang, X., Zhao, L., Xu, S., Liu, Y., Liu, H., and Cheng, G. (2013) Soil moisture effect on bacterial and fungal community in Beilu River (Tibetan Plateau) permafrost soils with different vegetation types. *Journal of applied microbiology* **114**: 1054-1065.
Zhao, K., Kong, W., Khan, A., Liu, J., Guo, G., Muhanmmad, S. *et al.* (2017) Elevational diversity and distribution of ammonia-oxidizing archaea community in meadow soils on the Tibetan Plateau. *Applied Microbiology and Biotechnology*: 1-10.
Zimpfer, J., McCarty, B., Kaelke, C., Mulongwe, L., Igual, J., Smyth, C., and Dawson, J. (2002) Casuarina cunninghamiana cladode extracts increase the Frankia infectious capacity of a tropical soil.
Zou, X., Binkley, D., and Caldwell, B.A. (1995) Effects of dinitrogen-fixing trees on phosphorus biogeochemical cycling in contrasting forests. *Soil Science Society of America Journal* **59**: 1452-1458.
Zumft, W.G. (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and molecular biology reviews* **61**: 533-616.

ANNEXE

Study of the ribosomal proteins as a phylogenetic marker for *Frankia* strains

or

Long range PCR to study ribosomal proteins, a robust phylogenetic marker for *Frankia* strains

Jean-Pierre Flandrois[1], Céline Brochier[1], Jérôme Briolay[2], Danis Abrouk[3], Guillaume Schwob[3], Maria Fernandez[3]* and Philippe Normand[3].

1-Université de Lyon, F-69622, Lyon, France; Université Lyon 1; CNRS, UMR5558, Biométrie et Biologie Evolutive, Villeurbanne, France.

2- Université de Lyon, F-69622, Lyon, France; Université Lyon 1; DTAMB, Villeurbanne, France.

3- Université de Lyon, F-69622, Lyon, France; Université Lyon 1; CNRS, UMR5557, Ecologie Microbienne, Villeurbanne, France; INRA, UMR1418, Villeurbanne, France.

*corresponding author : Philippe.Normand@univ-lyon1.fr

Abstract

Taxonomic assignment of uncharacterized isolates to known species is a challenge that is generally met by sequencing the 16S rRNA genes or other conserved markers, that are known to cause distortion in phylogenetic topologies due in part to their short length. We targeted the 30kb ribosomal proteins region, amplified it with specific primers and a long range PCR approach from both isolates and from nodular endophytes and obtained sequences that permitted a phylogenetic reconstruction. All known clusters were recovered with this approach with a very high confidence and the topology was found to be highly dependent on the outgroup used, due to a long-branch attraction effect. The robust topology recovered was found to yield the asymbiotic cluster4 as the ancestor of all *Frankia* lineages, from which then emerged the generally obligate cluster2, then the other clusters (1 and 3). The strongly symbiotic cluster2 was also found to have the fastest (0.295 substitution.site^{-1}) and the asymbiotic cluster4 the slowest mutation rate (0.237 substitution.site^{-1}).

Introduction

Phylogeny of *Frankia* has long been debated, both the question of the inner structure of the genus and the position of the genus in the actinobacterial lineage (Sen *et al.* 2014). Various markers have been used starting with the classical 16S rRNA (Normand *et al.* 1996), *nifH* (Cournoyer *et al.* 1993), *glnII* {Clawson, 2004 #2484} or *gyrB* (Nouioui *et al.* 2011) but all these approaches suffer from the same basic problem, which is that a single gene may have been transferred laterally, it may have been subjected to unusual evolutionary pressures, it may have been duplicated or it may have been lost such as the *nif* region in non-symbiotic strains (Tisa *et al.* 2016).

The most widely-used phylogenetic marker, the 16S rRNA gene has yielded a topology for genus *Frankia* with four clusters : cluster1 with *Alnus-, Myricaceae*-, *Allocasuarina*- and *Casuarina*-infective strains, cluster2 with *Ceanothus-, Coriaria-, Datisca*- and *Rosaceae*-infective strains that are generally unable to grow in pure culture, cluster3 with *Elaeagnaceae-, Rhamnaceae*- and *Gymnostoma*-infective strains (except *Ceanothus*) and cluster4 with a large array of divergent non-symbiotic strains (Normand *et al.* 1996). Yet the 16S-rRNA topology is wobbly, varying upon the reconstruction approach used, the set of strains considered, on the genomic region analyzed and on the outgroup used. Long branch attraction in particular is a constant worry in groups of organisms that do not have the same evolutionary speed (Philippe *et al.* 2005). Furthermore, the 16S has a poor resolution, not permitting to distinguish different genomospecies (Fernandez *et al.* 1989).

Considering several genes together to offset these biases has been done using Multi-Locus Sequence Analysis (MLSA) which is now considered a cheap, solid and reliable approach (Glaeser and Kampfer 2015) and has been applied to *Frankia* (Pozzi *et al.* (in preparation)), permitting to recover the 16S-rRNA derived four clusters described above. MLSA has a drawback in that it requires several independent sets of primers, and several PCR and sequencing reactions, each of which can fail thus requiring time-consuming protocol adjustments.

Whole genomes are also increasingly studied, in particular to investigate the phylogeny of organisms. In *Frankia*, the genomes have been found to be large (5-10Mb), with a high G+C (70-73%) that may render assembly difficult (Normand *et al.* 2007b). On a larger scale, whole genomes permitted to position *Frankia* at the root of aerobic actinobacteria (Sen *et al.* 2014). However, whole genomes remain quite expensive to obtain and many in the draft state still have gaps that can lower the quality of the alignments and thus the reliability of the topology obtained (Tisa *et al.* 2016). Furthermore, different approaches exist to compare two genomes among which the ANI (Goris *et al.* 2007) or Digital DNA-DNA hybridization (Auch *et al.* 2010) and there is thus no consensus as to the best approach.

Ribosomal proteins necessary to stabilize the ribosome, form several clusters on the genome, the main one being conserved in all *Frankia* strains analysed so far, together with such genes as *rpoAB, fusA, tufA, secY* or *rpoA* at positions 1145171-1177614 of the *Frankia alni* genome (Normand *et al.* 2007a). This DNA region of around 33kb, called the spectinomycin operon is highly conserved between all *Frankia* genomes and even with other actinobacteria where conserved proteins at both ends of the region provide anchors for the PCR primers and long range PCR.

Conventional PCR permits routinely amplification of 2-4kb sequences (Erlich 1989), however constant progress has been made on the thermal regime, chemical conditions and the fidelity and performance of enzymes used to increase the length amplified (Waggott 1998; Knierim *et al.* 2011). Recently, it has been claimed amplicons up to 15000nt could be obtained using DNA Polymerase III holoenzyme from *Thermus thermophilus* (Ribble *et al.* 2015) and this trend toward longer amplicons should be maintained in the foreseeable future. We decided to use this approach to revisit the phylogeny of isolates and of non-isolated endophytic strains.

Materials and methods

Treatment of Frankia strains and field nodules

The *Frankia* strains were grown at 28°C in liquid F medium (Cluster 3 strains) (Simonet *et al.* 1985) or in BAP- medium (Murry *et al.* 1984) (other strains). The cells were grown in 200mL Erlenmeyers on an orbital shaker at 200 rpm for 6 days. Total DNA from pure cell cultures was extracted with the DNeasy Plant Mini kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions.

Root nodules were harvested in the field from three *Alnus* species: *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn, *A. incana* ssp. *incana* (L) Moench, *A. alnobetula* subsp. *alnobetula* (Ehrh.) K. Koch. Composite nodular DNA was extracted aseptically from a single lobe (Pozzi *et al.* 2015) using the DNeasy Plant Mini kit (Qiagen, France) according to the manufacturer's instructions.

Long range PCR

For 11 out of 16 samples, the ribosomal proteins region was amplified by a three overlapping PCR fragments strategy (Fig.1). PCRs were performed using the following primers: F1-for, 5'- TCYKCCYCCCGCATCTCGTTCGCYAAGAT-3', F1-rev, 5'-CGAACTCCATGGCCTCCTGGCA 3', F2-for, TCMGBACCGACGAGGAGACCG -3', F2-rev, 5'- GCGGACGACCTCGCCCTGGTA -3' and F3-for, 5'-GAGATCCTSCAGCAGGAGGGHTACATC -3', F3-rev, 5'-TCRTCGATCGACTTCTGVCCGAAGTT -3'. Touchdown PCR reactions were done in a final

volume of 50µL. Each PCR reaction contained 5 µL of template DNA (50-200 ng), 10 µL of 5 X GXL PCR buffer, 1 µL of each primer (10 mM), 4 µL of a dNTP mix (2.5 mM), 1 µl (1.25 U) of high fidelity PrimeSTAR GLX Taq DNA polymerase (TaKaRa Bio, Ozyme, France), 0.5 µl of ET-SSB protein (New England Biolabs, France) and 28.5 µL of sterile MilliQ water. The reaction conditions were: an initial step consisting of 5 cycles of 1initial for 5 min sec at 98°C and annealing/elongation for 10 min at 74°C followed by four similar steps but with annealing temperature decreasing by 2°C per step to reach a final annealing temperature of 68°C and 25 cycles at the last step. To avoid any contamination with non-specific bands, PCR fragments were gel-sliced from the agarose gel and purified with Zymoclean Large Fragment Recovery Kit (Zymo, Proteigene, France). Purified DNAs were normalized after quantification with the QuantiFluor dsDNA System assay (Promega, France).

NGS sequencing and assembly

Illumina libraries preparation was done with the Nextera Kit following the manufacturer's instructions, starting with 0.8 ng of DNA and analyzed by paired-end sequencing (2x300bp) on a MiSeq instrument (Biofidal/DTAMB, France). Raw reads were cleaned using the Sickle trimming tool software (Joshi and Fass 2011) to remove poor quality regions (Q<30) and de novo assembled with the SPAdes assembler (Bankevich *et al.* 2012).

Frankia riboproteins extraction

All the 30 available genomes of strains of the *Frankia* genus, even at the contig stage were extracted from GenBank (2017 sept 20) and submitted to the riboDB construction engine (Jauffrit *et al.* 2016) to extract the ribo-proteins and classify them into ribo-protein families (R-families) with paralogs excluded automatically.

For the 11 assemblies corresponding to the long-range PCR amplification of the spectinomycin operon containing the ribosomal proteins and the 5 genomes from witch this operon was extracted in *Frankia*, the R-proteins were extracted on the basis of their homology with the R-proteins from the *Frankia alni* ACN14a complete genome NC_008278 by using the TFASTX program of the Fasta36 (Pearson 2016) set (E 10^{-5}, parameters lambda and K being estimated by Maximum Likelihood). The results were validated by aligning the extracted riboproteins on the *F. alni* ACN14a reference sequences and the absence of paralogs was verified.

External group selection

We determined the phylogenetically closest relatives to the *Frankia* genus using leBIBI-PPF (https://umr5558-bibiserv.univ-lyon1.fr/lebibi/PPF-in.cgi), derived from leBIBI (Flandrois *et al.* 2015) that fully automatizes phylogenetic reconstruction. The following

genomes were selected to be the outgroup genera: *Modestobacter_caceresii* NZ_JPMX01000019, *Geodermatophilus_soli* NZ_FNIR01000001, *Blastococcus_endophyticus* NZ_FOEE01000003, *Cryptosporangium_aurantiacum* NZ_FRCS01000005, *Sporichthya_polymorpha* (DSM43042) NZ_KB913029, *Acidothermus cellulolyticus* (11B) NC_008578, *Jatrophihabitans*_sp.| GAS493~NZ_LT907982, *Jatrophihabitans_endophyticus*| DSM45627~NZ_FQVU00000000 and (SupMat FigS2) Frankineae_bacterium_mt45 (NZ_LT629697). The riboprotein gene sequences were then extracted as previously explained.

Supermatrix construction

Only R-protein families with homologs in more that 60% of the analyzed genomes were conserved. Genomes containing more than 60% of the R-proteins families were similarly conserved. Extremely short sequences representing less than 30% of the median length in a family were excluded.

After these quality checks, the nucleotide sequences were independently aligned by R-family at the codon level using Seaview running CLUSTAL-Omega-1.1.0 (Sievers *et al.* 2011; Sievers and Higgins 2014) and then trimmed using GBLOCKS (Talavera and Castresana 2007) with parameters set to a minimal trimming level, and concatenated using Seaview-4.5.4 (Gouy *et al.* 2010). For each R-protein family FastTreeMP (Price *et al.* 2010) was used to reconstruct the phylogeny of the selected genomes and the resulting set of trees was submitted to PhyloMCOA (de Vienne *et al.* 2012) to detect the outliers (sequences, genome or protein families) by using both nodal and patristic distance. Outliers sequences were then eliminated.

The nucleic codon-based alignments for each families of R-proteins were then concatenated using Seaview v4.1 (Gouy *et al.* 2010) to a nucleic supermatrix.

Phylogenetic reconstruction

All the Maximum Likelihood (ML) reconstructions were built using IQtree (Nguyen *et al.* 2014). In the case of nucleic the GTR+R3 model was determined as optimal by the Model Finder (Kalyaanamoorthy *et al.* 2017) included in IQtree and parametric Bootstrap (Felsenstein 1985) was computed with 100 replicates.

Evolution rate

We determined the branch lengths for each leave of the tree from the ancestor to all *Frankia* lineages and outgroups using Seaview and computed the average and standard error for each cluster and subcluster. The homogeneity of mutation rates was assessed by the relative rate test (Tajima 1993) implemented on the Mega platform v.7 (Kumar *et al.* 2016).

Results

Long range PCR

Initial attempts to amplify the whole 35kb region failed probably because of the high GC content of *Frankia* strains. For that reason, it was decided to target three overlapping parts of that region F1 (12 kb), F2 (10 kb) and F3 (9 kb) and we proceeded with three independent PCR reactions that were successful in all tested strains (Figure 1) except Ea262 for which F1 fragment was not obtained (not shown). CcI3 was used as positive control for PCR and for reads assembly.

We could amplify directly from all nodules or isolated strains DNA tested (Table1).

Phylogenetic analysis

Different groups were tested as outgroups and these were found to yield topologies differing essentially in the position of the cluster at the root of the *Frankia* radiation with either cluster4 at the root when *Acidothermus cellulolyticus* was used as outgroup or cluster2 when *Geodermatophilus soli* or *Cryptosporangium aurantiacum* were used. This instability is indicative of a possible long branch attraction phenomenon (LBA). To determine is LBA was indeed causing the instability, we used only the first and second nucleotides of each codons (C1+C2), recoded this supermatrix as purine/pyrimidine (R/Y) or used a protein-based phylogeny (data not shown), which all resulted in positioning cluster4 at the root. Increasing the outgroup species number is also known to limit or suppress this phenomenon (Moreira and Philippe 2000) and indeed also positioned cluster4 at the root. Finally we selected only the closest sequences in terms of patristic distance and maintained also a sufficient genodiversity to limit the LBA effect. Using *Modestobacter caceresii, Geodermatophilus soli, Blastococcus endophyticus, Cryptosporangium aurantiacum, Sporichthya polymorpha* as the outgroup, no difference in terms of topology was found between the nucleic, C1+C2, R/Y or protein phylogeny and we thus consider no LBA occurred with cluster4 at the root.

All known clusters were recovered : cluster1, cluster2, cluster3 and cluster4. The newly sequenced strains were positioned as expected, that is *Alnus*-nodules and *Alnus*-infective isolates fell into cluster1 while *Elaeagnaceae*-infective isolates fell into cluster3 (Figure 3).

Evolution rate

The average branch lengths from the *Frankia* ancestor for cluster2 was found to be 0.295 +/-0.0007substitution.site^{-1} and 0.237 +/-0.002 for cluster4 (Table2). The other clusters had intermediary values. The relative rate test permitted to conclude the different lineages had indeed different evolutionary rates.

Discussion

Several studies have been published to determine the phylogeny of genus *Frankia*. Based on different approaches and different markers, these studies have yielded significantly different topologies. The four 16S rRNA-based clusters (Normand *et al.* 1996) are recovered by most of these approaches but not by all of them and different sets of sequences have been found to yield different topologies.

Long range PCR permits the rapid characterization of >20kb genome fragments for various purposes such as phylogenetic approaches, or for genetic studies where long fragments are targeted. Long range PCR is especially appropriate for gain of function studies in heterologous hosts given there is no genetic transformation system for *Frankia* (Kucho *et al.* 2010) and that many syntons are very long with tens of genes such as those coding for secondary metabolites. Gain-of-function using fosmids has already been used to confirm the function of *Frankia* genes (Lurthy *et al.* 2018) and should become more widely used based on long-range PCR to clone and study long DNA regions.

Long-branch attraction is a known artefact of phylogenetic reconstruction (Felsenstein 2003), where two long branches are incorrectly linked regardless of their true relationships. This artefact is due to a similar amount of changes between branches and not at all related to the phylogenetic signal. This phenomenon is especially encountered between isolated branches or taxon-poor clades and often created by a too divergent outgroup with erroneous conclusions concerning the deep branches relationships (Sanderson and Shaffer 2002). One way to offset the long-branch attraction is to enrich sampling for outgroups and to select genomes as closely related as possible to the sequences analyzed (Moreira and Philippe 2000), such as here with *Geodermatophilaceae* or *Cryptosporangium*. Conversely, *Acidothermus* is a distant relative to *Frankia*, with only the 16S gene close to it, presumably resulting from a recent lateral transfer. This LBA phenomenon is also detectable by comparing nucleic acid- to protein-based topologies (Husnik *et al.* 2011).

One varying feature is the cluster at the root of the *Frankia* evolutionary radiation. The cluster at the root of the genus is either cluster2 (Normand *et al.* 1996) or cluster4 (Huguet *et al.* 2001). Two evolutionary histories of the genus are thus competing. The most intuitive one based on markers such as *gyrB* or as here using the ribosomal genes sequences would see the ancestor to all *Frankia* strain as a non-nitrogen-fixing soil microbe, close to present-day

cluster4 strains, that would have acquired the ability to fix nitrogen and to penetrate inside nodules, giving rise later to the other three symbiotic clusters (Nouioui *et al.* 2011). The other scenario based on ribosomal amino acids proteins or the MLSA would see the most ancient *Frankia* strains emerging from the lineage of aerobic actinobacteria as nitrogen fixing obligate symbionts or nearly so, close to cluster2 strains, later on diversifying as on the one hand the non-symbiotic cluster4 or on the other hand as symbionts of *Alnus-, Elaeagnaceae-* or *Casuarina*-infective lineages. Cluster2 strains are not really obligate symbionts, since one strain BMG5.1 was isolated as a very slow-growing alkaliphilic strain (Gtari *et al.* 2015), yet its extremely slow growth rate and alkaliphily would make it a very poor soil microbe. One factor that determines the cluster at the root is the outgroup selected with the thermal spring *Acidothermus cellulolyticus* favouring cluster2 while the soil *Geodermatophilus obscurus* favouring cluster4. The previously approach based on the Prunier algorithm and whole genomes had yielded cluster2 at the base (Sen *et al.* 2014) contrary to what was found here, one difference is that here the outgroup was optimized to select short branches whereas previously most actinobacterial lineages had been used including many with long branches.

Various lineages are known to mutate faster than others. *Mycoplasma* for instance are well known tachytelic bacteria (Woese *et al.* 1984), a feature hypothesized to be due to the absence of a mismatch repair system as well as to the 3′-5′ proofreading exonuclease activity of DNA polymerase (Razin *et al.* 1998). Other lineages have been shown to mutate faster than their close relatives such as the obligate animal pathogens *Mycobacterium leprae* and *M. lepromatasis* (Han *et al.* 2009) or the obligate animal symbiont *Buchnera* (Bennett and Moran 2015) due to a Muller's ratchet effect (Moran 1996) linked to an asexual lifestyle in a monoxenic biotope. The effect seen in *Frankia* would be the first time it is seen in an plant symbiont. We found that relative to the last common ancestor to all *Frankia* strains, cluster2 strains are essentially clonal (Normand *et al.* 2017), and have a much faster mutation rate. This may be related to the fact these strains have all small genomes and are for the most obligate symbionts that have resisted attempts at cultivation (Normand *et al.* 2014) except for an unusual very slow growing alkaliphile (Gtari *et al.* 2015). Conversely the cluster4 have among the largest genomes and are non-symbiotic saprophytes (Normand *et al.* 2014) likely able to exchange genetic material in the soil. The other lineages have intermediate values with local long branch distortions especially in the case of the non-cultivated Sp+ strains (Pozzi *et al.* (in preparation)).

The position of *Frankia canadensis* closer to cluster1a (Bautista *et al.* 2011) or at the root of cluster1 (this study) would yield two scenarios with an ancient evolutionary radiation yielding several *Alnus*-infective lineages, giving rise to *Frankia alni* (Nouioui *et al.* 2016), as well as cluster1a and cluster1b species. One scenario would then see the early emergence of *Casuarina*-infective lineage from the ancestor to all *Alnus*-infective lineages, while the

other scenario would see a much more recent event occurring with a cluster1a *Alnus*-infective strain becoming able to infect *Casuarina* trees long before cluster1b emerged. According to various authors (Bell *et al.* 2010; Tank *et al.* 2015), Casuarinaceae would have emerged 29-47MY, from an ancestor that would have yielded also the *Betulaceae*, the *Myricaceae*, and the *Juglandaceae*. Among these, the Myricaceae with a world-wide distribution and a large spectrum of strains (Huguet *et al.* 2005) would have provided a permissive biotope in which the various *Frankia* could have emerged and later on specialized for hosts with narrower geographical distributions.

Data accessibility

The 14 assemblies obtained (Table 1, a and b) are available in the European Nucleotide Archive under accession numbers ERZ483113-126.

Acknowledgements

Thanks are expressed to Pascale Fournier for growth of *Frankia* strains. Thanks are expressed to Fondation Verots for access to the biological material.

Bibliography

Auch AF, von Jan M, Klenk HP, Goker M (2010) Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison. Stand Genomic Sci 2: 117-134

Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD *et al.* (2012) SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. J Comput Bio 19: 455-477

Bautista GH, Cruz HA, Nesme X, Valdes M, Mendoza HA, Fernandez MP (2011) Genomospecies identification and phylogenomic relevance of AFLP analysis of isolated and non-isolated strains of *Frankia* spp. Syst Appl Microbiol 34: 200-206

Bell CD, Soltis DE, Soltis PS (2010) The age and diversification of the Angiosperms re-revisited. Am J Bot 97: 1–8

Bennett GM, Moran NA (2015) Heritable symbiosis: The advantages and perils of an evolutionary rabbit hole. Proc Natl Acad Sci U S A 112: 10169-10176

Cournoyer B, Gouy M, Normand P (1993) Molecular phylogeny of the symbiotic actinomycetes of the genus *Frankia* matches host-plant infection processes. Mol Biol Evol 10: 1303-1316

de Vienne DM, Ollier S, Aguileta G (2012) Phylo-MCOA: a fast and efficient method to detect outlier genes and species in phylogenomics using multiple co-inertia analysis. Mol Biol Evol 29: 1587-1598

Erlich HA (1989) Polymerase chain reaction. J Clin Immunol 9: 437-447

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

- (2003) Inferring phylogenies. Sinauer Associates, Sunderland, MA

Fernandez MP, Meugnier H, Grimont PAD, Bardin R (1989) Deoxyribonucleic acid relatedness among members of the genus *Frankia*. Int J Syst Bacteriol 39: 424-429

Flandrois JP, Perrière G, Gouy M (2015) leBIBI QBPP: a set of databases and a webtool for automatic phylogenetic analysis of prokaryotic sequences. BMC Bioinformatics 16: 251

Glaeser SP, Kampfer P (2015) Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. Syst Appl Microbiol 38: 237-245

Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA, Coenye T, Vandamme P, Tiedje JM (2007) DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. Int J Syst Evol Microbiol 57: 81-91

Gouy M, Guindon S, Gascuel O (2010) SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. Mol Biol Evol 27: 221-224

Gtari M, Ghodhbane-Gtari F, Nouioui I, Ktari A, Hezbri K, Mimouni W, Sbissi I, Ayari A, Yamanaka T, Normand P *et al.* (2015) Cultivating the uncultured: growing the recalcitrant cluster-2 *Frankia* strains. Sci Rep 5: 13112

Han XY, Sizer KC, Thompson EJ, Kabanja J, Li J, Hu P, Gómez-Valero L, Silva FJ (2009) Comparative sequence analysis of *Mycobacterium leprae* and the new leprosy-causing *Mycobacterium lepromatosis*. J Bacteriol 191: 6067-6074

Huguet V, Batzli JM, Zimpfer JF, Normand P, Dawson JO, Fernandez MP (2001) Diversity and specificity of *Frankia* strains in nodules of sympatric *Myrica gale, Alnus incana*, and *Shepherdia canadensis* determined by rrs gene polymorphism. Appl Environ Microbiol 67: 2116-2122

Huguet V, Gouy M, Normand P, Zimpfer JF, Fernandez MP (2005) Molecular phylogeny of Myricaceae: a reexamination of host-symbiont specificity. Mol Phylogenet Evol 34: 557-568

Husnik F, Chrudimsky T, Hypsa V (2011) Multiple origins of endosymbiosis within the *Enterobacteriaceae* (γ-Proteobacteria): convergence of complex phylogenetic approaches. BMC Biol 9: 87

Jamann S, Fernandez M, Moiroud A (1992) Genetic diversity of Elaeagnaceae-infective *Frankia* strains isolated from various soils. Acta Oecolog 13: 395-405

Jauffrit F, Penel S, Delmotte S, Rey C, de Vienne DM, Gouy M, Charrier JP, Flandrois JP, Brochier-Armanet C (2016) RiboDB Database: A comprehensive resource for prokaryotic systematics. Mol Biol Evol 33: 2170–2172

Joshi NA, Fass JN (2011) Sickle: A sliding-window, adaptative, quality-based trimming tool for FastQ files (Version 1.33)[Software.].

Kalyaanamoorthy S, Minh BQ, Wong TK, von Haeseler A, Jermiin LS (2017) Model-Finder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. Nature Meth 14: 587-589

Knierim E, Lucke B, Schwarz JM, Schuelke M, Seelow D (2011) Systematic comparison of three methods for fragmentation of long-range PCR products for next generation sequencing. PLoS ONE 6: e28240

Kucho K, Hay A, Normand P (2010) The determinants of the actinorhizal symbiosis. Microb Environ 25: 241-252

Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis. Molec Biol Evol, msw054

Lalonde M, Calvert H, Pine S (1981) Isolation and use of *Frankia* strains in actinorhizae formation. In Current Perspectives in Nitrogen Fixation, (ed. WN AH Gibson), pp. 296-299. Australian Academy of Science, Canberra

Lurthy T, Alloisio N, Fournier P, Anchisi S, Ponsero A, Normand P, Pujic P, Boubakri H (2018) Molecular response to nitrogen starvation by *Frankia alni* ACN14a revealed by transcriptomics and functional analysis with a fosmid library in *Escherichia coli*. Res Microbiol (in press)

Moran NA (1996) Accelerated evolution and Muller's rachet in endosymbiotic bacteria. Proc Natl Acad Sci U S A 93: 2873-2878

Moreira D, Philippe H (2000) Molecular phylogeny: pitfalls and progress. Int Microbiol 3: 9-16

Murry M, Fontaine M, Torrey J (1984) Growth kinetics and nitrogenase induction in *Frankia* sp. HFPArI3 grown in batch culture. Plant & Soil 78: 61-78

Nguyen LT, Schmidt HA, von Haeseler A, Minh BQ (2014) IQ-TREE: a fast and effec-tive stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. Molec Biol Evol 32: 268-274

Normand P, Benson DR, Berry AM, Tisa LS (2014) The family *Frankiaceae*. In The Prokaryotes, DOI10.1007/978-3-642-30138-4_183. (ed. E Rosenberg, Delong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E. and Thompson, F.), pp. 339-351. Springer, Berlin Heidelberg

Normand P, Lalonde M (1982) Evaluation of *Frankia* strains isolated from provenances of two *Alnus* species. Can J Microbiol 28: 1133-1142

Normand P, Lapierre P, Tisa LS, Gogarten JP, Alloisio N, Bagnarol E, Bassi CA, Berry AM, Bickhart DM, Choisne N *et al.* (2007a) Genome characteristics of facultatively symbiotic *Frankia* sp. strains reflect host range and host plant biogeography. Genome Res 17: 7-15

Normand P, Nguyen TV, Battenberg K, Berry AM, Vanden Heuvel B, Fernandez MP, Pawlowski K (2017) Proposal of *Candidatus* Frankia californiensis, the uncultured symbiont in nitrogen-fixing root nodules of a phylogenetically broad group of hosts endemic to western North America. Int J Syst Evol Microbiol 67: 3706-3715

Normand P, Orso S, Cournoyer B, Jeannin P, Chapelon C, Dawson J, Evtushenko L, Misra AK (1996) Molecular phylogeny of the genus *Frankia* and related genera and emendation of the family *Frankiaceae*. Int J Syst Bacteriol 46: 1-9

Normand P, Queiroux C, Tisa LS, Benson DR, Cruveiller S, Rouy Z, Medigue C (2007b) Exploring the genomes of *Frankia* sp. Physiol Plant 130: 331-346

Nouioui I, Ghodhbane-Gtari F, Beauchemin NJ, Tisa LS, Gtari M (2011) Phylogeny of members of the *Frankia* genus based on *gyrB, nifH* and *gln*II sequences. Antonie Van Leeuwenhoek 100: 579-587

Nouioui I, Ghodhbane-Gtari F, Montero-Calasanz MD, Goker M, Meier-Kolthoff JP, Schumann P, Rohde M, Goodfellow M, Fernandez MP, Normand P *et al.* (2016) Proposal of a type strain for *Frankia alni* (Woronin 1866) Von Tubeuf 1895, emended description of *Frankia alni*, and recognition of *Frankia casuarinae* sp. nov. and *Frankia elaeagni* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 66: 5201-5210

Pearson WR (2016) Finding protein and nucleotide similarities with FASTA. Curr Protoc Bioinform 53: 3.9.1-3.9.25

Philippe H, Zhou Y, Brinkmann H, Rodrigue N, Delsuc F (2005) Heterotachy and long-branch attraction in phylogenetics. BMC Evol Biol 5: 50

Pozzi A, Bautista-Guerrero HH, Abby SS, Herrera-Belaroussi A, Abrouk D, Normand P, Valdes M, Fernandez MP ((in preparation)) Multi-Locus Sequence Analysis and extensive sampling bring new insights on *Frankia* phylogeny and phylogeography. Syst Appl Microbiol

Pozzi AC, Bautista-Guerrero HH, Nouioui I, Cotin-Galvan L, Pepin R, Fournier P, Menu F, Fernandez MP, Herrera-Belaroussi A (2015) In-planta sporulation phenotype: a major life history trait to understand the evolution of *Alnus*-infective *Frankia* strains. Environ Microbiol 17: 3125-3138

Price MN, Dehal PS, Arkin AP (2010) FastTree 2--approximately maximum-likelihood trees for large alignments. PLoS ONE 5: e9490

Razin S, Yogev D, Naot Y (1998) Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. Microbiol Mol Biol Rev 62: 1094–1156

Ribble W, Kane SD, Bullard JM (2015) Long-Range PCR Amplification of DNA by DNA Polymerase III Holoenzyme from Thermus thermophilus. Enzyme Res 2015: 837842

Sanderson MJ, Shaffer HB (2002) Troubleshooting molecular phylogenetic analyses. Ann Rev Ecol Syst 33: 49-72

Sen A, Daubin V, Abrouk D, Gifford I, Berry AM, Normand P (2014) Phylogeny of the class Actinobacteria revisited in the light of complete genomes. The orders '*Frankiales*' and *Micrococcales* should be split into coherent entities: proposal of *Frankiales* ord. nov., *Geodermatophilales* ord. nov., *Acidothermales* ord. nov. and *Nakamurellales* ord. nov. Int J Syst Evol Microbiol 64: 3821-3832

Sievers F, Higgins DG (2014) Clustal omega. Curr protoc bioinfo 3: 13

Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Soding J *et al.* (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. Mol Syst Biol 7: 539

Simonet P, Normand P, Moiroud A, Lalonde M (1985) Restriction enzyme digestion patterns of *Frankia* plasmids. Plant & Soil 87: 49-60

Tajima F (1993) Simple methods for testing the molecular evolutionary clock hypothesis. Genetics 135: 599-607

Talavera G, Castresana J (2007) Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. Syst Biol 56: 564-577

Tank DC, Eastman JM, Pennell MW, Soltis PS, Soltis DE, Hinchliff CE, Brown JW, Sessa EB, Harmon LJ (2015) Nested radiations and the pulse of angiosperm diversification: increased diversification rates often follow whole genome duplications. New Phytol 207: 454-467

Tisa LS, Oshone R, Sarkar I, Ktari A, Sen A, Gtari M (2016) Genomic approaches toward understanding the actinorhizal symbiosis: An update on the status of *Frankia* genomes. Symbiosis 70: 5-16

Vallenet D, Calteau A, Cruveiller S, Gachet M, Lajus A, Josso A, Mercier J, Renaux A, Rollin J, Rouy Z *et al.* (2017) MicroScope in 2017: an expanding and evolving integrated resource for community expertise of microbial genomes. Nucleic Acids Res 45: D517-D528

Waggott W (1998) Long range PCR. Meth Mol Med 16: 81-91

Woese CR, Stackebrandt E, Ludwig W (1984) What are mycoplasmas: the relationship of tempo and mode in bacterial evolution. J Mol Evol 21: 305-316

Zhang Z, Lopez MF, Torrey JG (1984) A comparison of cultural characteristics and infectivity of *Frankia* isolates from root nodules of *Casuarina* species. Plant Soil 78: 79-90

Table 1. List of *Frankia* strains and nodules analyzed in the present study.

a) Assemblies from sequenced PCR-fragment, b) assemblies extracted from genome (unpublished data), c) sequences extracted from published genome.

Cluster	Strain	Sequences	Host, geographic origin	Reference
1	ACN1ag	a	*Alnus alnobetula* subsp *crispa,* Ontario, Canada	(Lalonde *et al.* 1981)
1	ARgP5	a	*A. incana* spp. *rugosa,* Quebec, Canada	(Normand and Lalonde 1982)
1	ARgN22 d	a	*A. incana* spp. *rugosa,* Quebec, Canada	(Normand and Lalonde 1982)
1	CcI3	a	*Casuarina cunninghamiana,* Florida, US	(Normand *et al.* 2007a)
3	EUN1f	c	*Elaeagnus umbellata,* Illinois, USA	(Lalonde *et al.* 1981)
3	R43	b	*Casuarina cunninghamiana,* Florida, USA	(Zhang *et al.* 1984)
3	Ea1-12	c	*E. angustifolia,* Ecully, France	(Fernandez *et al.* 1989)
3	Ea262	a	*E. angustifolia,* Miribel, France	(Jamann *et al.* 1992)
3	Ea354	a	*E. angustifolia,* Sutri, Italy	(Jamann *et al.* 1992)
3	Ea488	a	*E. angustifolia,* St-Etienne-Tinée, France	(Jamann *et al.* 1992)

Cluster	Nodule	Sequences	Host, geographic origin	Reference
1	*AgRi3-1*	a	*A. glutinosa*, Saint-Jean-de-Thurigneux, France	this study
1	*AgRi81*	a	*A. glutinosa*, Saint-Jean-de-Thurigneux, France	this study
1	*AgTrS*	b	*A. glutinosa*, Le Tremblay, France	(Pozzi *et al.* 2015)
1	*AiOR*	b	*A. incana* spp. *incana,* Col d'Ornon, France	(Pozzi *et al.* 2015)
1	*AvOR3*	a	*A. alnobetula spp. alnobetula, Col d'Ornon,* France	(Pozzi *et al.* 2015)
1	*AvOR5*	a	*A. alnobetula spp. alnobetula, Col d'Ornon,* France	(Pozzi *et al.* 2015)

Table 2. Genetic distances (substitutions.site^{-1}) computed from the common ancestor of the outgroup strains (*Geodermatophilaceae* and *Cryptosporangium*) and the *Frankia* strains to each of the *Frankia* strains. These distances are averaged for each cluster and subcluster and the standard error computed.

Cluster	1a	1a	1a	1a	1a	1a	1a	1a	1a	1a	1b	1b	1b	1b	1b	1c	1c	1c	1c	1c	1c	1c
Strain	QA3	AvOr5	AiOr	AvcI1	ACN14a	CpI1-P	CpI1-S	ARgN22d	ACN1ag	ACN1ag*	AgTrS	AgRi31	AgRi81	AvOr3	ARgP5	THR	CcI6	BMG5.23	CeD	Allo2	CcI3	CcI3*
Distance	0.123	0.274	0.274	0.248	0.248	0.247	0.247	0.247	0.247	0.247	0.292	0.292	0.29	0.284	0.264	0.283	0.283	0.283	0.283	0.283	0.283	0.283
Mean	0.2402										0.2844					0.283						
Std error	0.0426										0.01187					0.000						
clu1	0,2639																					
std error	0,03599																					

Cluster	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4
Strain	coriariae	symbiont Dg1	EUN1f	R43	G2	BMG5.12	BCU110501	Ea488	Ea354	EAN1pec	Ea112	Ea262	EuI1c	DC12	CN3
Distance	0.294	0.295	0.261	0.261	0.261	0.144	0.273	0.264	0.264	0.264	0.264	0.264	0.237	0.239	0.235
Mean	0.2945		0.252										0.237		
Std error	0.00071		0.0381										0.002		

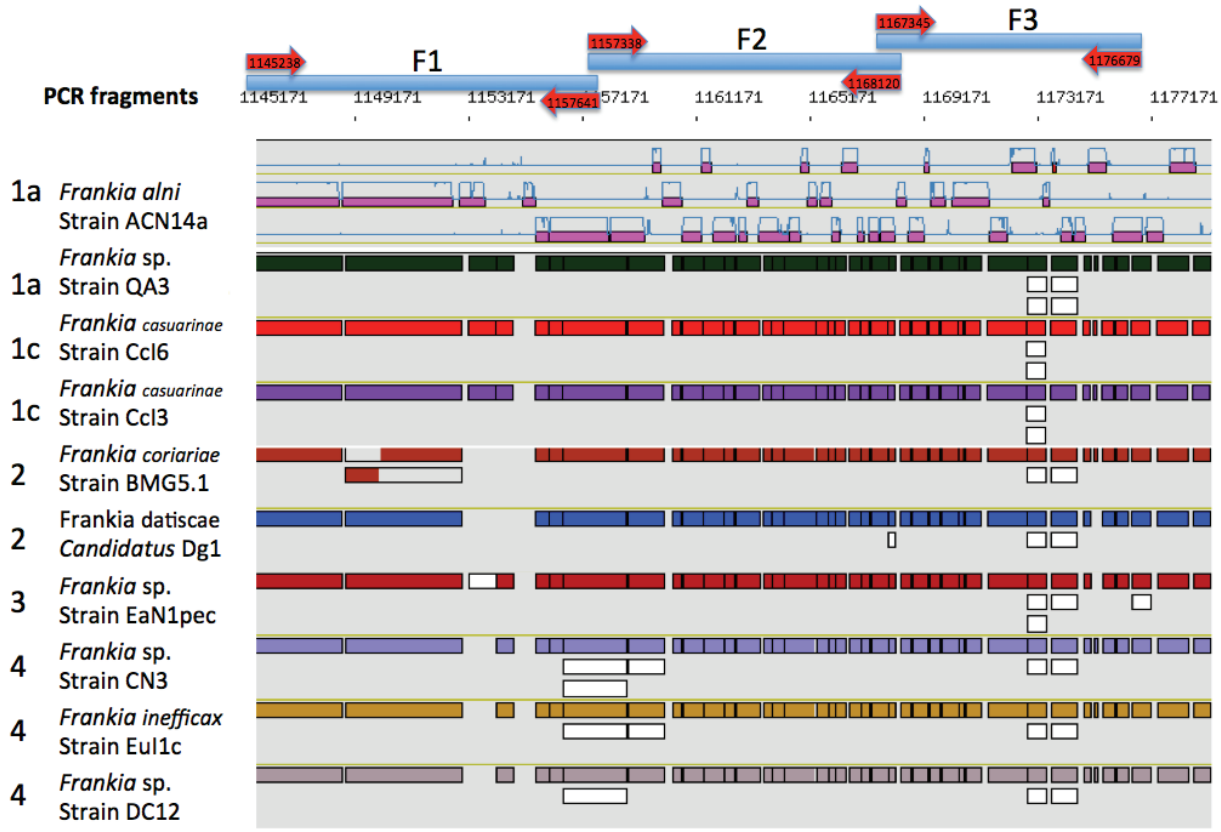


Figure 1. Schematics of the ribosomal genes region and the position of the primers permitting to obtain the three PCR products of 12kb (F1), of 10 kb (F2) and of 9kb (F3). The reference genome is that of ACN14a (cluster1a) and the coordinates written on the primers arrows (top) are those of that *Frankia alni* genome. The compared genomes below are QA3 (cl1a), Ccl6 and Ccl3 (cl1c), BMG5.1 and Dg1 (cl2), EAN1pec (cl3) and Eul1c and DC12 (cl4), where the presence of a rectangle indicates the presence of a protein with >30% similarity over 80% the length of the shorter peptide as obtained from Mage (Vallenet *et al.* 2017). When the rectangles are of the same colour, it means the peptides form a conserved cluster of genes (with <5 non-conserved genes in between) or synton.

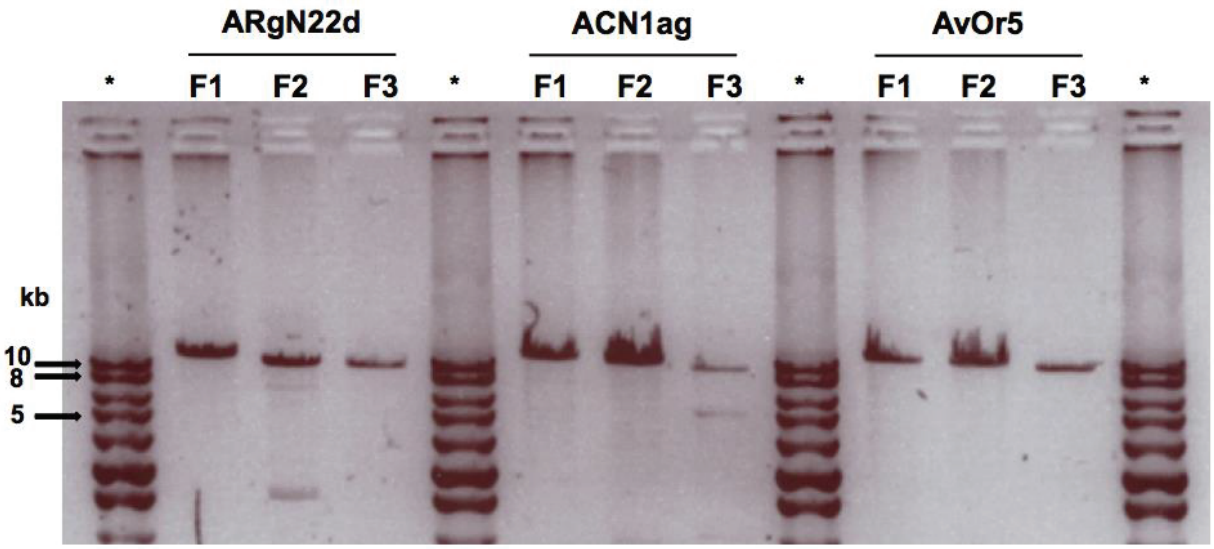


Figure 2. Agarose gel electrophoresis of touchdown-PCR products obtained from three *Frankia* strains. For each strain, PCRs, as described in Materials and Methods, yielded a single major fragment of 12kb (F1), of 10 kb (F2) and of 9kb (F3). Lanes indicated with a "*" carried the molecular weight marker (1 kb ladder, BIOfidal).

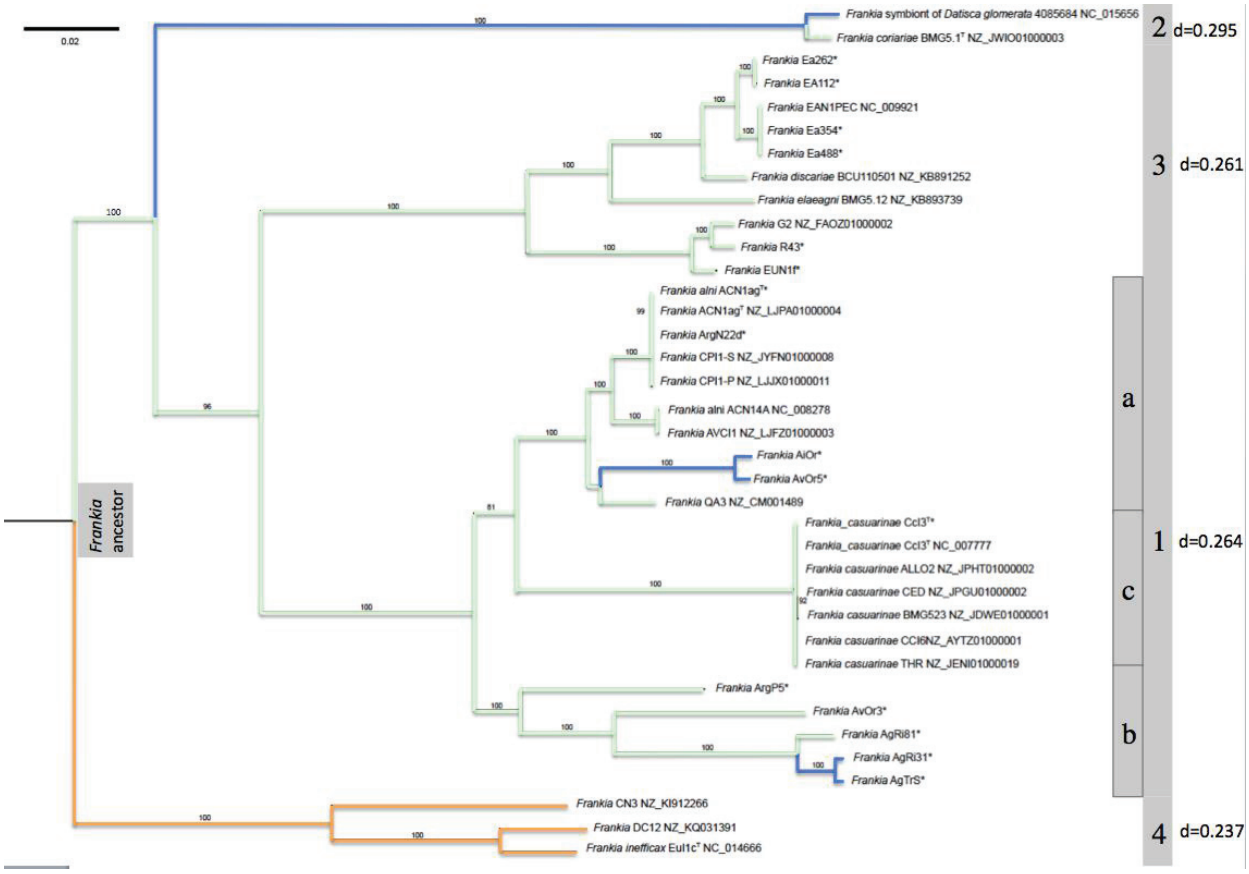


Figure 3. Maximum likelihood (Nguyen *et al.* 2014) phylogenetic tree (GTR+R3 model) of the ribosomal region with a bootstrap analysis (Felsenstein 1985) to assess robustness (in percentages) of the branches. On the right are indicated the known clusters according to (Normand *et al.* 1996) and the distances from the ancestor (common to the *Geodermatophilaceae/Cryptosporangium* outgroups and to *Frankia*) to each *Frankia* lineage (Table2). The colors of the branches are brown to indicate asymbiotic non-N2 fixing lineages, light green for facultative symbiotic lineages and blue for those that have resisted cultivation in vitro such as the majority of cluster2 strains and a few scattered Sp+ *Alnus* endophytes (Pozzi *et al.* (in preparation)).