



HAL
open science

Symbioses mycorhiziennes des orchidées épiphytes

Rémi Petrolli

► **To cite this version:**

Rémi Petrolli. Symbioses mycorhiziennes des orchidées épiphytes. Sciences du Vivant [q-bio]. Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN), 2022. Français. NNT: . tel-04518726

HAL Id: tel-04518726

<https://hal.science/tel-04518726v1>

Submitted on 24 Mar 2024

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.



MUSEUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE
Ecole Doctorale Sciences de la Nature et de l'Homme – ED 227

Année 2022

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DU MUSEUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE

Spécialité : Biologie des organismes – Écologie des interactions

Présentée et soutenue publiquement par

Rémi PETROLI

Le 29/11/2022

Symbioses mycorhiziennes des orchidées épiphytes

Sous la co-direction de :

Marc-André SELOSSE, Professeur du MNHN

& Florent MARTOS, Maître de conférences du MNHN

JURY :

M. MARTIN, Francis	Directeur de recherche émérite, INRAE, Nancy, France	Président du jury
Mme. BONFANTE, Paola	Professeure émérite, Université de Turin, Italie	Examinatrice
Mme. ROY, Mélanie	Maîtresse de Conférences, Université Paul Sabatier, Toulouse, France	Rapportrice
Mme. LEROY, Céline	Directrice de recherche, IRD, Kourou, Guyane, France	Rapportrice
M. SELOSSE, Marc-André	Professeur, MNHN, Paris, France	Direction de thèse
M. MARTOS Florent	Maître de Conférences, MNHN, Paris, France	Direction de thèse

Symbioses mycorhiziennes des orchidées épiphytes



Mycorrhizal symbioses in epiphytic orchids

Remerciements

Je tiens en tout premier lieu à remercier mes deux encadrants de thèse, Marc-André Selosse et Florent Martos. Marc-André pour m'avoir chaleureusement accueilli au sein de son équipe et pour m'avoir donné l'opportunité de démarrer cette grande aventure à la fois scientifique et humaine. Florent, pour m'avoir guidé tout au long de cette épreuve et transmis ta passion de la recherche. Merci pour ta confiance, ta patience, et tous les conseils avisés que tu as pu distiller durant ces trois années et demie. Merci enfin de m'avoir permis d'explorer les forêts Réunionnaises, avec leurs lots de merveilles qui ne se laissent pas toujours si facilement approcher.

Je tiens ensuite à remercier de tout mon cœur l'ensemble de l'équipe sans qui cette aventure n'aurait pas été aussi belle. Pour les journées studieuses comme pour les soirées un peu moins sérieuses, merci à : Céline Bonillo, Amélia Bourceret, Pascaline Chifflet-Belle, Géromine Collobert, Tomas Figura, Chantal Griveau, Eve Hellequin, Rosa Kemmerling, Liam Laurent, Florent Martos, Julie Muller, Benoit Perez-Lamarque, Philippe Rech et Marc-André Selosse. Un grand merci en particulier à Benoit pour m'avoir sauvé à maintes reprises, à Géromine pour avoir affronté par deux fois les conditions climatiques aléatoires de La Réunion, à Rosa pour m'avoir accompagné dans une partie de ce projet de thèse, à Eve pour son soutien salvateur à la paille et à Chantal pour m'avoir guidé au laboratoire et dans les travées du Muséum.

Merci aux membres de mon comité de suivi de thèse pour leur accompagnement et nombreux conseils : Marc Buée, Jérôme Sueur et Lucie Zinger. Merci également à Tony Robinet pour ses conseils et son précieux enthousiasme.

Merci aux membres de l'école doctorale et du corps enseignant pour leur accompagnement lors de ma mission doctorale. Je tiens particulièrement à remercier Aurélie Coulon, Emilie Detouillon, Samuel Rebulard et Hervé Tostivint pour leur confiance. Je tiens également à remercier chaleureusement Yohann Chaudron, Perle Guarino-Vignon, Charline Pinna, Julie Zalko pour leur aide, leur soutien, et leur compagnie durant ces heures d'enseignement.

Merci enfin à tous ceux qui ont pu me supporter de près ou de loin durant ces trois années et plus, et qu'il serait trop long de citer ici. Merci en particulier à mes parents et à ma sœur, soutiens infailibles et oreilles attentives aux petits comme aux grands aléas de la vie.

Table des matières

Introduction	9
I. Les mycorhizes	12
II. Les mycorhizes d'orchidées	27
III. Approche écologique des symbioses mycorhiziennes d'orchidées	44
IV. Outils d'étude des symbioses mycorhiziennes d'orchidées	63
Objectifs et problématiques de la thèse	81
Résultats	83
V. Structure spatiale des communautés fongiques de l'écorce (Article I)	84
VI. Réseaux mycorhiziens épiphytes (Article II)	100
VII. Évolutions spatiale et temporelle des communautés mycorhiziennes (Article III)	122
VIII. Application à la vanille cultivée (Article IV)	155
Discussion générale	184
9.1. Diversité des associations fongiques chez les orchidées épiphytes	186
9.2. Quelle est la niche des rhizoctonias sur l'écorce des arbres tropicaux ?	190
9.3. Influences réciproques entre les partenaires symbiotiques	198
9.4. Les méthodes employées et leurs limites	208
Bilan et perspectives	212
Annexes	214
Références	219

Glossaire

Sont rappelées ci-dessous les définitions de certains termes, non définis dans le texte, à l'attention du lecteur non-biologiste ou non-spécialiste du domaine qui souhaiterait tout de même s'attarder sur tout ou partie du manuscrit ci-dessous. Les termes définis ci-dessous sont indiqués par une * à leur première apparition dans le texte.

Autotrophie. Pour un élément donné (ex : le carbone), capacité à prélever puis métaboliser cet élément sous une forme minérale (ex : le CO₂). Les plantes vertes sont autotrophes au carbone. On parle d'hétérotrophie lorsque l'élément à prélever est forcément sous une forme organique.

Convergence. En évolution, processus par lequel des organismes non-apparentés acquièrent, au cours de l'évolution, des caractéristiques morphologiques et/ou fonctionnelles similaires de manière indépendante, généralement en étant soumis à des contraintes environnementales similaires.

Chitine. Structure composée de sucres complexes assurant le soutien cellulaire chez les champignons (parois fongiques) ou les arthropodes. Son équivalent dans le monde végétal est la cellulose.

Épiphytisme. Du grec *epi*, sur, et *phyton*, végétal, se dit d'un organisme qui réalise l'ensemble de son cycle de vie sur une plante. Exemple : plantes épiphytes, certains lichens, certaines mousses etc.

Généraliste. En écologie des interactions, se dit d'un organisme capable d'interagir avec une large de gamme de partenaires différents (ex : une plante en interaction avec plusieurs espèces de champignons mycorhiziens). Dans le cas contraire, on parle d'organisme spécialiste.

Hétérotrophie. Pour un élément donné (ex : le carbone), nécessité de bénéficier d'une source nutritive d'origine organique (ex : sucre C₆H₁₂O₆). Les champignons, ou l'Homme, sont hétérotrophes au carbone. Les organismes capables d'utiliser un élément sous sa forme minérale sont dits autotrophes pour cet élément.

Lyse. Destruction de structures organiques, notamment de cellules.

Membrane plasmique. Double membrane lipidique délimitant chaque cellule.

Mutualisme. Interaction à bénéfices réciproques entre deux organismes différents.

Photosynthèse. Processus physico-chimique par lequel les plantes convertissent le CO₂ atmosphérique en sucres grâce à l'énergie lumineuse. Ce processus fait notamment intervenir la chlorophylle, molécule qui donne sa couleur verte au monde végétal. L'équation de la réaction est la suivante : $6\text{CO}_2 + 6\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6\text{O}_2$.

Phylogénie. Étude de l'évolution et des liens de parentés entre organismes.

Plante vasculaire. Plantes présentant des tissus vasculaires (assurant le transport des sèves) différenciés et spécialisés. Cela comprend la majorité des plantes à l'exclusion des mousses et hépatiques.

Polyphylétique. Se dit d'un groupe phylogénétique* composé de plusieurs organismes sans lien de parenté direct.

Saprophytisme. Capacité d'un organisme à dégrader et à se nourrir de matière organique morte d'origine végétale. Le saprotrophisme fait référence à tout type de matière organique morte (non forcément végétale).

Spore. Structure de dissémination chez les champignons. Les spores peuvent résister plusieurs années dans les sols ou sur d'autres surfaces. Elles peuvent être issues d'une reproduction sexuée (avec brassage génétique entre deux individus) ou asexuée (sans brassage génétique).

Introduction

Plan détaillé - Introduction

I. Les mycorhizes	12
1.1. Préambule : qu'est-ce qu'une plante ?	12
1.2. Les symbioses mycorhiziennes : découverte et définition actuelle	13
1.2.1. La symbiose, origine historique et définition	13
1.2.2. Les symbioses mycorhiziennes	13
1.2.2.a Les symbioses ecto-mycorhiziennes	15
1.2.2.b Les endomycorhizes à arbuscules	17
1.2.2.c Les endomycorhizes éricoïdes	18
1.2.2.d Les endomycorhizes à pelotons des orchidées	18
1.2.2.e Les autres symbioses mycorhiziennes	21
1.2.3. Quels avantages pour les partenaires mutualistes ?	22
1.2.3.a Les symbioses mycorhiziennes, des mutualismes	22
1.2.3.b Modalités de rencontre et de contrôle des deux partenaires	23
1.2.3.c Symbioses mycorhiziennes et relation de nutrition	24
1.2.3.d Symbioses mycorhiziennes et relation de protection	26
II. Les mycorhizes d'orchidées	27
2.1. Partenaires fongiques et structures des mycorhizes d'orchidées	27
2.1.1. La famille des orchidées	27
2.1.2. Diversité des partenaires fongiques	28
2.1.3. Structure de l'interface orchidée-champignon mycorhizien	31
2.2. Germination symbiotique et fonctionnement de la symbiose	33
2.2.1. Germination symbiotique des graines d'orchidées	33
2.2.2. Mise en place de la symbiose mycorhizienne chez les orchidées	35
2.2.3. Échanges nutritifs lors des symbioses mycorhiziennes d'orchidées	36
2.2.4. Un <i>continuum</i> trophique chez les orchidées	38
2.3. Origines évolutives des mycorhizes d'orchidées	40
2.3.1. De la symbiose ancestrale jusqu'aux évolutions récentes	40
2.3.2. Les origines de cette évolution	41
2.4. Les orchidées et leurs mycorhiziens : des associations symbiotiques ?	42
III. Approche écologique des symbioses mycorhiziennes d'orchidées	44
3.1. Spécificité des symbioses mycorhiziennes d'orchidées	44
3.1.1. Une spécificité variable entre espèces et au cours du développement	44
3.1.2. Spécificité mycorhizienne : une variabilité pas si contradictoire ?	47
3.1.3. Déterminismes et conséquences de la spécificité mycorhizienne	47

3.2. Contraintes réciproques sur la distribution spatiale des partenaires	48
3.2.1. Le mystère de la distribution spatiale des orchidées	48
3.2.2. Distribution spatiale des orchidées terrestres à l'échelle régionale	49
3.2.3. Distribution spatiale des orchidées terrestres à l'échelle locale	50
3.2.4. Distribution spatiale des orchidées épiphytes	52
3.2.5. Influences réciproques des partenaires sur leur distribution spatiale	54
3.3. Réseaux d'interactions orchidées-champignons mycorhiziens	55
3.3.1. Construction et propriétés des réseaux plantes-champignons	55
3.3.2. Réseaux écologiques orchidées-champignons mycorhiziens	58
3.3.3. Les réseaux mycorhiziens communs : le cas des orchidées	59
IV. Outils d'étude des symbioses mycorhiziennes d'orchidées	63
4.1. Détecter l'invisible : le cas des microorganismes	63
4.1.1. Détection des champignons mycorhiziens par microscopie	63
4.1.2. Isolement et culture des champignons mycorhiziens d'orchidées	64
4.1.3. Identification des champignons mycorhiziens par (meta)barcoding	66
4.2. Les analyses spatiales appliquées aux communautés microbiennes	73
4.2.1. Distribution spatiale des microorganismes : quelques contraintes	73
4.2.2. Analyses spatiales en écologie	74

Encadrés

Encadré 1. Les orchidées : des symbioses souterraines, aériennes, et un peu de tricherie.	20
Encadré 2. Les milieux épiphytes et leurs contraintes : le cas des orchidées.	29
Encadré 3. Les réseaux mycorhiziens communs.	59
Encadré 4. Le concept d'espèce chez les microorganismes.	68
Encadré 5. L'ITS comme <i>barcode</i> fongique ?	70
Encadré 6. La normalisation des données en écologie microbienne.	72
Encadré 7. L'île de La Réunion et la forêt de Mare Longue.	77

I. Les mycorhizes

1.1. Préambule : qu'est-ce qu'une plante ?

Quiconque a déjà posé les yeux sur une plante pourrait grossièrement en dessiner les traits. Prenons l'exemple d'un arbre : un tronc naissant du sol, s'élançant plus ou moins vers le ciel pour se ramifier en une multitude de branches portant des feuilles vertes. En étirant le trait, on pourrait rajouter que la plante s'étend également dans le sol, à travers un réseau racinaire complexe.

Les feuilles permettent à la plante de se nourrir : elles utilisent l'énergie lumineuse afin de convertir le dioxyde de carbone de l'atmosphère (CO₂) en sucres, nécessaires à sa croissance et à son métabolisme : c'est la photosynthèse*. Pendant ce temps, les racines absorbent les minéraux et nutriments du sol, ainsi que l'eau, également nécessaires à sa survie. Entre ces deux compartiments, des flux de sèves acheminent les sucres aux racines d'une part, et les minéraux et l'eau aux parties aériennes d'autre part.

Voici donc, en quelques lignes et de manière quelque peu grossière, à quoi il est possible de résumer la structure et le fonctionnement d'une plante.

Cependant, nous avons manqué ici de nous attarder sur un point essentiel de la vie d'une plante (et de l'ensemble du vivant d'ailleurs) : la plante -comme le reste du monde vivant - n'est jamais seule¹. Elle interagit dans son environnement avec une multitude d'organismes, parfois très différents d'elle. Certains peuvent lui causer du tort, comme les herbivores qui en dévorent les feuilles, mais d'autres lui sont bénéfiques, voire lui sont indispensables. On pourrait penser par exemple aux abeilles qui, butinant de fleurs en fleurs à la recherche de nectar, en disséminent le pollen assurant ainsi la reproduction des plantes. Cependant, à la nuit tombée, l'abeille rentre dans son nid et laisse la plante, bien ancrée dans le sol, à son triste sort.

Pourtant, il est des partenaires qui ne l'abandonnent jamais et sans qui les plantes n'auraient sûrement pas eu le succès (évolutif !) qu'on leur connaît aujourd'hui. Pour les voir, armez-vous d'une loupe ou d'un microscope (et d'une pelle) et partez explorer leurs racines à la recherche de leurs compagnons de toujours : les champignons !

Ainsi, s'il sera ici question de plantes (et pas n'importe lesquelles : les orchidées !), vous comprendrez vite que l'on ne peut dissocier la plante de ses partenaires fongiques. Nous parlerons donc, avant tout et contre toute attente, de champignons ! Plus particulièrement de ceux qui,

¹ Formule tirée de l'ouvrage éponyme « Jamais seul. Ces microbes qui construisent les plantes, les animaux et les civilisations », écrit par Marc-André Selosse, aux éditions Actes Sud.

associés de manière durable et bénéfique aux racines des plantes (on parle alors de symbioses mycorhiziennes ou mycorhizes), participent à leur développement, à leur croissance, à leur survie et à leur succès.

1.2. Les symbioses mycorhiziennes : découverte et définition actuelle

1.2.1. La symbiose, origine historique et définition

Pour bien comprendre la notion de *symbiose*, il est nécessaire de revenir aux origines de sa définition, qui nous ramènent à la fin des années 1870-1880 (Perru, 2006). À cette époque, le terme *symbiose*, du grec *syn*, ensemble, et *bios*, la vie, fait référence à la vie conjointe de deux organismes dans un cadre essentiellement parasitique : le premier organisme parasite le second.

C'est en étudiant les lichens, organismes mi algues, mi champignons, que les scientifiques Albert-Bernhardt Frank (Frank, 1877) et Anton de Bary (de Bary, 1879) élargissent le terme de *symbiose* à l'ensemble des « phénomènes de la vie en commun d'organismes différents ». Ce nouveau paradigme, basé uniquement sur la notion du « vivre ensemble », ouvre donc la voie à considérer comme symbiotique toute association parasitique, mais également mutualiste*, tant que celle-ci est de caractère physique et durable (Selosse, 2017).

Dans la littérature anglophone, le terme *symbiosis* continue de désigner cette association physique et durable dans son sens le plus large. Dans la littérature francophone en revanche, le terme *symbiose* restreint généralement l'interaction à un caractère mutualiste, c'est-à-dire que les deux partenaires tirent des bénéfices réciproques de l'association. Dans la suite du texte, c'est cette dernière définition que nous tâcherons d'utiliser.

1.2.2. Les symbioses mycorhiziennes

C'est au botaniste et scientifique Albert-Bernhard Frank, déjà cité plus haut, que l'on doit l'introduction du terme *mycorhize* (Trappe, 2005; Bonfante, 2018). Dans un article publié en 1885 (Frank, 1885 ; traduction en anglais : Frank, 2005), il décrit et conceptualise cette association racinaire entre une plante et un champignon, « union de deux organismes différents en un seul » et la nomme *mycorhize*, du grec *myco*, champignon, et *rhiza*, racine. La mycorhize ainsi définie désigne aussi bien l'association que l'organe lui-même : un organe chimérique mi plante, mi champignon.

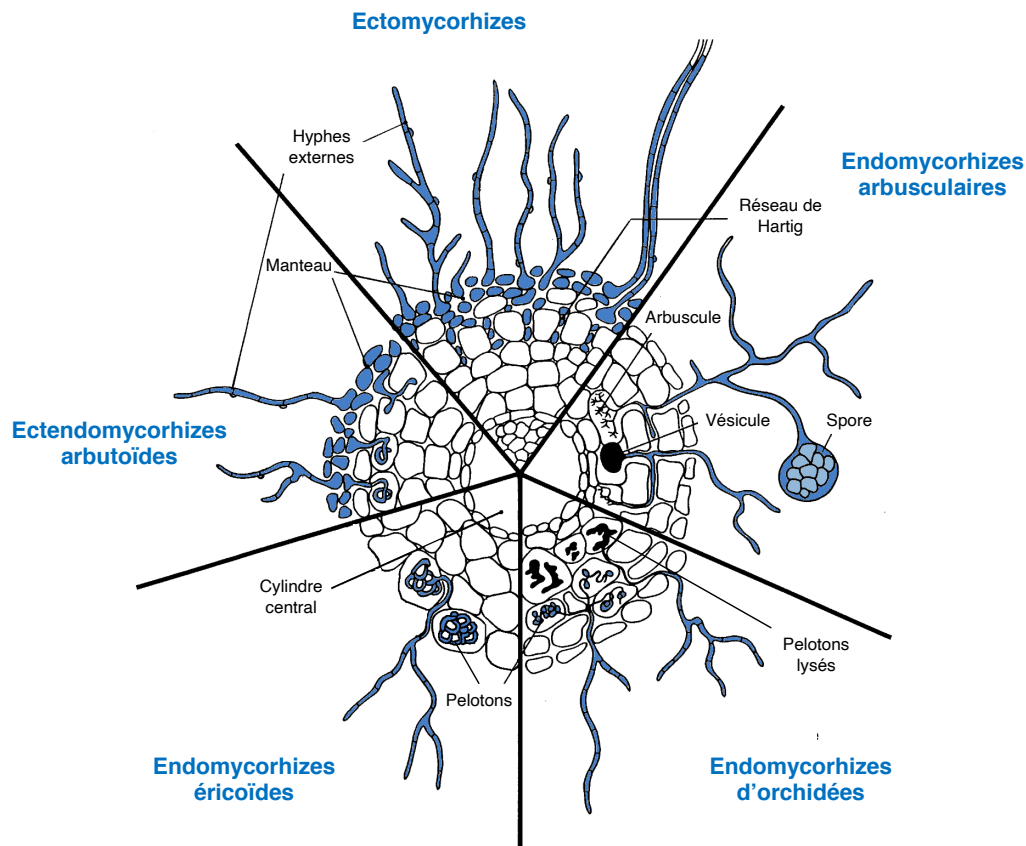


Figure 1 Principaux types de mycorhizes observés au sein du règne végétal. Les cellules végétales racinaires sont en blanc, les structures fongiques sont colorées en bleu. Adapté de Selosse & Le Tacon, 1998.

D'abord décrite entre la truffe *Elaphomyces granulatus* et le pin², sous la forme d'un manchon mycélien entourant la racine de la plante (on parle alors d'ecto-mycorhize), la notion d'association mycorhizienne est élargie quelques années plus tard par A.B. Frank aux symbioses dites endo-mycorhiziennes, c'est-à-dire lorsque le champignon ne forme pas de manchon mycélien extra-racinaire, mais pénètre au cœur de la racine (Trappe, 2005). De ce fait, la complexité du monde mycorhizien ne tarda pas à émerger aux yeux de la communauté scientifique de l'époque, et continue encore aujourd'hui d'interroger ceux qui s'en passionnent et que l'on ose parfois appeler les mycorhizologues. De ce fait, il est préférable d'employer le pluriel plutôt que le singulier au moment d'aborder les symbioses mycorhiziennes. Nous nous efforcerons de nous y tenir dans la suite du texte, pour n'évoquer la symbiose mycorhizienne que dans son tout, multiple et hétérogène.

² Dès la fin des années 1870 (Boudier, 1876 ; Reess, 1880), donc quelques années avant que A.B. Frank n'introduise le terme de 'mycorhize'. Dans son article publié en 1885, A.B. Frank s'intéresse lui aux truffes consommées du genre *Tuber*.

On considère aujourd'hui que près de 90% des plantes vasculaires terrestres sont mycorhizées (Brundrett & Tedersoo, 2018a), soit près de 250 000 espèces de plantes vasculaires* interagissant avec au moins 50 000 espèces de champignons mycorhiziens (Van Der Heijden *et al.*, 2015). À cela s'ajoutent également les colonisations moins bien documentées de plantes non-vasculaires (mousses, hépatiques etc. ; Rimington *et al.*, 2020), et l'on comprend rapidement que la diversité des interactions en jeu est colossale.

On classe les symbioses mycorhiziennes en différents types (résumés ci-dessous), définis en fonction des partenaires (plantes hôtes et champignons mycorhiziens) et des structures formées par leurs interactions (Figure 1 ; Selosse & Le Tacon, 1998; Smith & Read, 2008). Cette vision, volontairement simplificatrice, ne doit pas masquer le *continuum* morphologique et fonctionnel de ces symbioses (Brundrett & Tedersoo, 2018b; Bueno *et al.*, 2019). Elle permet cependant, en première approche, d'en dégager les grandes caractéristiques et d'en introduire les principaux protagonistes.

1.2.2.a Les symbioses ecto-mycorhiziennes

Bien qu'elles ne concernent que 2 à 3% des interactions mycorhiziennes (Brundrett & Tedersoo, 2018a), les symbioses ecto-mycorhiziennes ont un rôle majeur dans le fonctionnement des écosystèmes forestiers du monde entier (Courty *et al.*, 2010). En effet, ces symbioses, retrouvées chez > 6000 espèces de plantes vasculaires (Tedersoo & Brundrett, 2017), sont apparues indépendamment chez près de 30 lignées d'Angiospermes et de Gymnospermes. Les espèces concernées sont essentiellement des arbres de régions tempérées et boréales, comme chez les Fagacées (Chênes, Hêtres, Châtaigniers etc.) ou les Pinacées (Pins, Épicéas, etc.). Certaines familles d'arbres tropicaux (comme les Dipterocarpaceés en Asie ; Ducouso *et al.*, 2004) ou certaines plantes herbacées comme la Renouée vivipare (*Polygonum viviparum*; Mühlmann *et al.*, 2008), sont également concernées par ce type de symbiose.

En formant un manchon mycélien autour des racines (appelé manteau) et en modifiant la structure de ces dernières via la sécrétion de phytohormones comme l'auxine, les champignons ecto-mycorhiziens sont à l'origine d'organes mixtes aux formes et aux couleurs multiples (Figure 2A-B ; Smith & Read, 2008). Les hyphes du champignon s'enfoncent également dans les tissus de la racine, s'infiltrant entre les cellules du cortex racinaire sans en traverser la paroi (d'où le terme d'ecto-mycorhize) et formant ainsi un réseau mycélien intra-racinaire, zone d'échange entre la plante et son partenaire fongique, appelé réseau de Hartig.

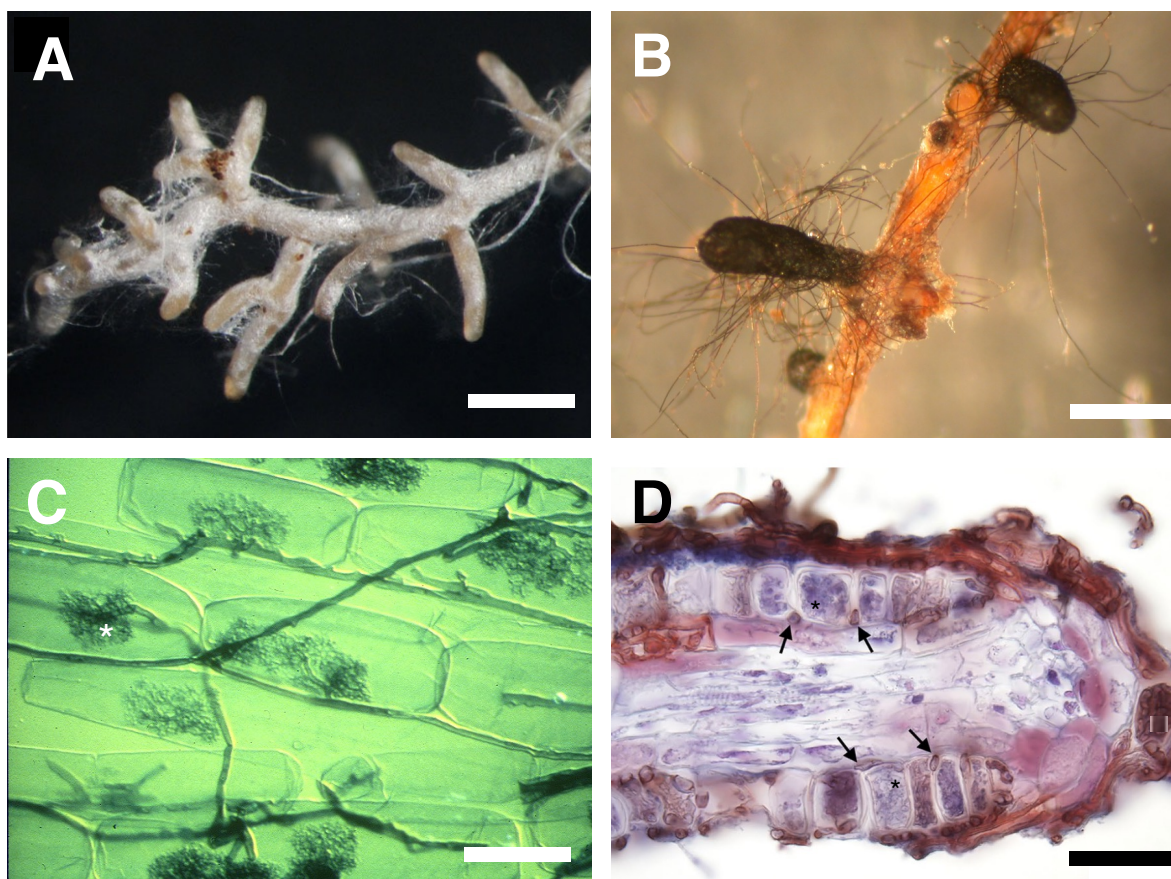


Figure 2 Observations microscopiques des structures formées par les principaux types mycorhiziens. (A-B) Structures ectomycorhiziennes de *Scleroderma areolatum* et *Cenococcum geophilum* sur racines de Hêtre (*Fagus sylvatica*). A : modifié de Mrak *et al.*, 2017, échelle : 1 mm ; B : © J.-L. Jany, échelle : 0.5 mm. (C) Observation microscopique d'une coupe longitudinale de racine endomycorhizée par des champignons arbusculaires (*) Échelle : 50 μm © Larry Peterson. (D) Coupe longitudinale de racine de Myrtille (*Vaccinium myrtillus*) colorée à la fuchsine et au bleu trypan. Les astérisques indiquent les pelotons intracellulaires et les flèches pointent des hyphes fongiques extracellulaires vus en section transversale. Échelle : 25 μm . Modifié de Vohník, 2020.

Les champignons impliqués appartiennent principalement aux grands groupes des Basidiomycètes (comme l'Amanite tue-mouche, *Amanita muscaria*) ou des Ascomycètes (comme la truffe noire, *Tuber melanosporum*), qui forment l'ensemble des Dikaryas (Smith & Read, 2008). De manière plus marginale, certains groupes comme les Endogonales (Mucoromycotina) peuvent également former des associations ectomycorhiziennes (Yamamoto *et al.*, 2017). On estime à plus de 20 000 le nombre d'espèces de champignons potentiellement ectomycorhiziens (Rinaldi *et al.*, 2008). Cette diversité résulte d'une évolution convergente* multiple depuis 270 Ma (Strullu-Derrien *et al.*, 2018) comptant près de 80 apparitions indépendantes de l'écologie ectomycorhizienne chez ces champignons (Figure 3).

1.2.2.b Les endomycorhizes à arbuscules

Près de 80% des espèces de plantes vasculaires forment des symbioses endomycorhiziennes arbusculaires (Brundrett & Tedersoo, 2018a). Ces symbioses sont donc de loin les plus répandues dans les écosystèmes terrestres, où elles ne semblent absentes que de certains types d'habitats extrêmes (milieux salés, très froids ou encore épiphytes* ; nous y reviendrons).

Contrairement aux ectomycorhizes, les endomycorhizes à arbuscules sont invisibles à l'œil nu et il est nécessaire d'avoir recours à une coloration sous microscope pour les observer (Helme-Guizon & Selosse, 2010). Les champignons impliqués pénètrent dans la racine, dégradant la paroi des cellules du cortex racinaire avant de la traverser. Ils repoussent la membrane plasmique* des cellules végétales, sans jamais la percer, et forment alors des ramifications typiques (en forme d'arbuscules ; **Figure 2C**) au contact des cellules de l'hôte, véritables zones d'échanges (ou interface symbiotique) entre les deux partenaires (Smith & Read, 2008; Bonfante & Genre, 2010). Ces structures sont dynamiques, constamment renouvelées, et leur durée de vie n'excède pas 4-5 jours (Bonfante & Genre, 2010).

Les champignons impliqués appartiennent principalement à l'ordre des Glomeromycètes (Glomeromycotina) (Smith & Read, 2008 ; **Figure 3**). Ce sont des symbiotes obligatoires, ce qui signifie qu'on ne les trouve dans la nature qu'associés à des plantes, ou dans le sol sous forme de spores*, et qu'ils ne peuvent pas être cultivés seuls en laboratoire (Bonfante & Genre, 2008). Entre 250 et 1 600 espèces seulement ont été décrites à ce jour, selon les définitions de l'espèce adoptées (Kivlin *et al.*, 2011; Öpik *et al.*, 2014; Van Der Heijden *et al.*, 2015). En comparaison notamment avec la très grande diversité d'espèces hôtes (>200 000), cela révèle la nature généraliste* de cette association (Davison *et al.*, 2015).

Plus récemment, des travaux ont démontré que des champignons de l'ordre des Mucoromycètes (Mucoromycotina) (Bidartondo *et al.*, 2011), groupe frère des Glomeromycètes au sein des Mucoromycota (Spatafora *et al.*, 2017), forment des endomycorhizes similaires, en particulier chez les lignées de plantes ayant divergé précocement, comme chez les bryophytes (Field *et al.*, 2015) ou les lycophytes (Rimington *et al.*, 2015). Les ancêtres communs de ces deux ordres de champignons, dont des traces de colonisation ont été retrouvées dans des fossiles de plantes dès le Dévonien (Remy *et al.*, 1994), auraient permis la conquête du milieu terrestre par les plantes il y a près de 450 Ma (Selosse & Strullu-Derrien, 2015; Strullu-Derrien *et al.*, 2018).

1.2.2.c Les endomycorhizes éricoïdes

La famille des Éricacées est une grande famille de plantes à fleurs contenant environ 4400 espèces colonisant une vaste diversité d'écosystèmes, en particulier les biomes tempérés, méditerranéens et boréaux ainsi que les régions montagneuses du monde entier (Schwery *et al.*, 2015). Du fait de la prédominance de cette famille dans les écosystèmes riches en matière organique, comme les toundras qui pourraient accueillir jusqu'à 20% du stock mondial de carbone des sols, les mycorhizes d'Éricacées ont un rôle important dans le cycle du carbone à l'échelle planétaire (Read *et al.*, 2004).

Les Éricacées se divisent en 8 sous-familles, dont 5 (les Cassiopoideae, les Ericoideae, les Harrimaneloideae, les Vaccinioideae et les Styphelioideae) forment des symbioses typiques de ce groupe monophylétique : des endomycorhizes éricoïdes (Schwery *et al.*, 2015). Les plantes de ces sous-familles possèdent des racines très fines (< 100µM de diamètre) et leur système racinaire est dit « chevelu » (Smith & Read, 2008). Ces racines présentent un épiderme unistratifié à grosses cellules formant l'interface sol-racine. A l'extrémité terminale de la racine, ces cellules sont colonisées par des hyphes fongiques enroulés en pelotons et occupant quasiment tout l'espace cellulaire sans toutefois perforer la membrane plasmique des cellules végétales (Figure 2D). Au bout de quelques semaines, les cellules végétales et fongiques se dégradent, laissant place à une rangée de cellules corticales subérifiées (Smith & Read, 2008).

Les champignons impliqués appartiennent principalement aux Helotiales dans les Ascomycètes, ainsi qu'aux Serendipitaceae (Sebacinales) dans les Basidiomycètes (Figure 3C ; Selosse *et al.*, 2007; Smith & Read, 2008; Weiß *et al.*, 2016), bien que d'autres partenaires fongiques aient également été décrits (Vohník *et al.*, 2012; Van Der Heijden *et al.*, 2015). Comparé aux symbioses précédentes, la symbiose éricoïde est relativement récente, et s'est probablement mise en place au milieu du Crétacé (Strullu-Derrien *et al.*, 2018).

1.2.2.d Les endomycorhizes à pelotons des orchidées

Avec près de 28 000 espèces, la famille des orchidées est souvent considérée comme la plus grande famille d'Angiospermes (Christenhusz & Byng, 2016). Ayant émergé au cours du Crétacé (76-84 Ma), les orchidées ont subi une diversification importante au cours du Cénozoïque, et on les retrouve aujourd'hui sur l'ensemble des continents, excepté l'Arctique (Givnish *et al.*, 2015).

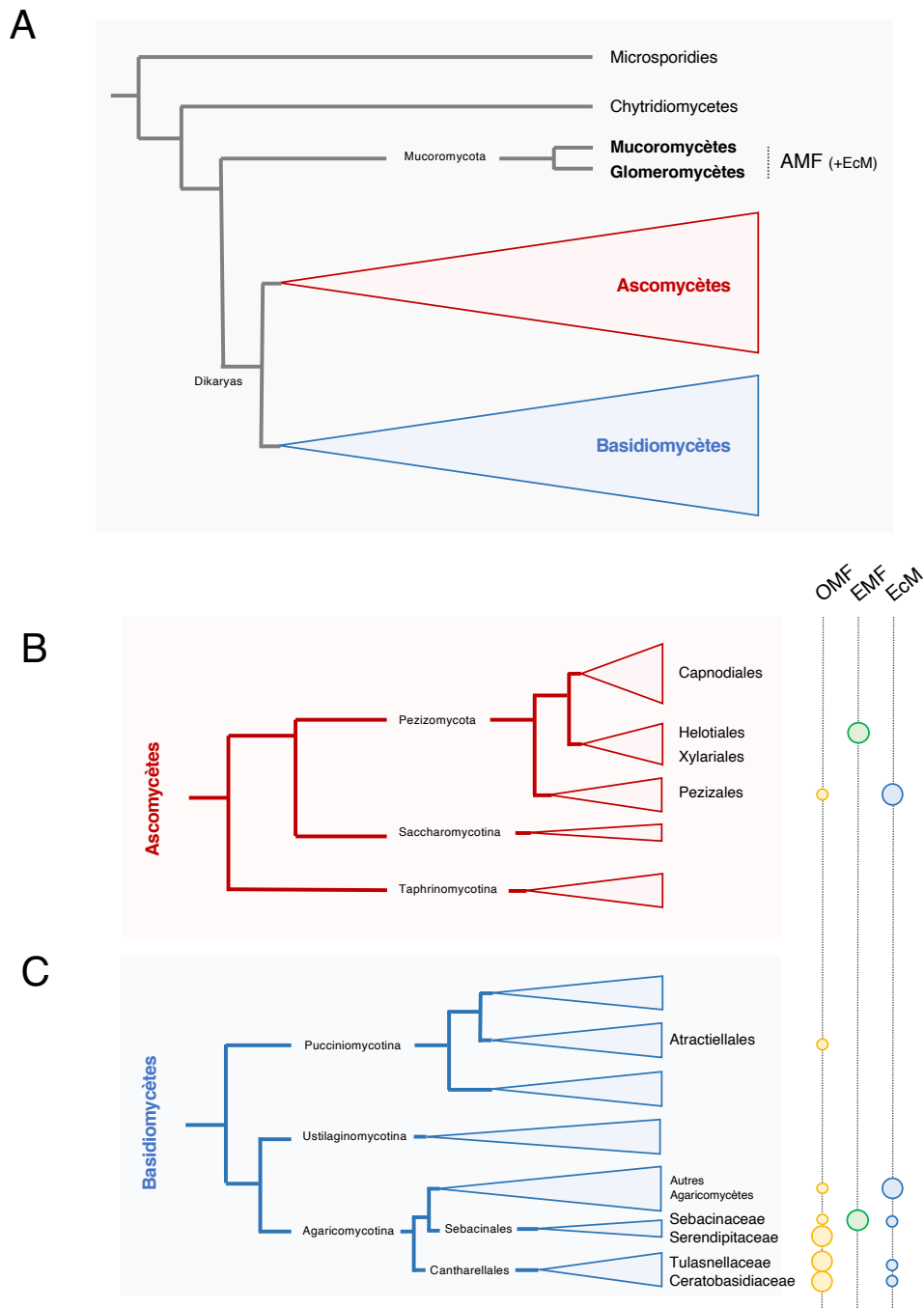


Figure 3 Arbres phylogénétiques simplifiés des champignons (Eumycètes) avec placement des principaux groupes mycorhiziens. (A) Principaux types mycorhiziens : les Mucoromycota formant principalement des endomycorhizes arbusculaires (AMF, *arbuscular mycorrhizal fungi*) et les Dikaryas (Ascomycètes et Basidiomycètes) formant les autres types de mycorhizes. (B-C) Zoom sur (B) les Ascomycètes et (C) les Basidiomycètes. Les types mycorhiziens sont indiqués au bout des branches (la grosseur du cercle rend compte de l'importance du groupe dans ce type de mycorhizes). OMF, *orchid mycorrhizal fungi* (mycorhiziens d'orchidées) ; EMF, *ericoid mycorrhizal fungi* (mycorhiziens d'éricacées) ; EcM, ectomycorhiziens. Adapté et simplifié de Spatafora *et al.*, 2017.

Les orchidées fascinent tant par leur beauté, quoique très subjective, que par leur capacité à interagir avec d'autres organismes (voir **Encadré 1**). Toutes les espèces de la famille forment des symbioses mycorhiziennes typiques, appelées endomycorhizes à pelotons d'orchidées (Smith & Read, 2008 ; pour une illustration, voir partie 2 de l'introduction). Dans cette symbiose, probablement ancestrale dans la famille (Yukawa *et al.*, 2009; Dearnaley *et al.*, 2012), les hyphes des champignons pénètrent dans la racine, repoussent la membrane plasmique des cellules corticales et y forment des structures enroulées appelées pelotons (Rasmussen, 1995; Dearnaley *et al.*, 2012). Il s'agit donc bien d'une endosymbiose telle que définie précédemment.

Les structures formées sont, comme dans la plupart des autres types de mycorhizes décrites précédemment, dynamiques, c'est-à-dire avec une durée de vie courte, quoique variable selon les champignons considérés. Néanmoins, les orchidées présentent la particularité de lyser* les hyphes formant les pelotons au bout de quelques jours et ainsi d'en recycler les éléments constitutifs (Smith & Read, 2008). On a ainsi longtemps considéré que les orchidées parasitaient leurs champignons mycorhiziens (nous y reviendrons dans la suite du texte ; mais voir aussi Selosse, 2014). Cette vision était également appuyée par le fait que les orchidées produisent de minuscules graines (Arditti & Ghani, 2000), dépourvues de réserves, qui nécessitent, pour germer, la présence d'un champignon mycorhizien. Celui-ci fournit l'intégralité des éléments nutritifs nécessaires à la croissance de la plante, jusqu'à ce que celle-ci ne développe de la chlorophylle et ne commence à faire la photosynthèse (Dearnaley *et al.*, 2012).

Un argument supplémentaire provient de l'écologie des champignons impliqués dans cette symbiose : ceux-ci appartiennent à des groupes de Basidiomycètes saprophytes*, c'est-à-dire capables de dégrader puis d'absorber la matière organique morte d'origine végétale. Trois familles, historiquement classées dans le genre *Rhizoctonias*, aujourd'hui polyphylétique* (Dearnaley *et al.*, 2012), sont principalement impliquées : les Tulasnellaceae, les Ceratobasidiaceae et les Serendipitaceae (**Figure 3**). Beaucoup d'espèces de ces groupes sont capables de vivre seules, sans plante hôte, et leur dépendance vis-à-vis des orchidées reste à ce jour encore très mal comprise. On continue de les appeler, par commodité, les *rhizoctonias*.

Encadré 1. Les orchidées : des symbioses souterraines, aériennes, et un peu de tricherie.

Avec plus de 28 000 espèces, la famille des orchidées est souvent considérée comme la plus grande famille de plantes à fleurs (Christenhusz & Byng, 2016). À elles seules, elles représentent ainsi près de 10% de la diversité totale des plantes vasculaires (Givnish *et al.*, 2015). Présentes dans presque tous les biomes et habitats du globe, les orchidées comportent plusieurs espèces emblématiques, comme l'étoile de Madagascar (*Angraecum sesquipedale*) bien

connue de Darwin et des évolutionnistes, ou encore la vanille (*Vanilla sp.*) bien connue de tous les amateurs de cuisine.

La très grande majorité des orchidées vivent en régions tropicales, et 80% d'entre-elles sont épiphytes, c'est-à-dire qu'elles réalisent l'ensemble de leur cycle de vie sur l'écorce ou les branches d'une plante hôte, généralement un arbre (Givnish *et al.*, 2015). L'exemple le plus connu est la célèbre *Phalaenopsis*, l'orchidée des fleuristes.

Ce que l'on ignore plus généralement, c'est que les orchidées sont particulièrement dépendantes des interactions interspécifiques pour germer, croître, et se reproduire.

Tout d'abord, elles s'associent de manière constante à des champignons mycorrhiziens, au niveau de l'embryon ou de leurs racines, et ce dès les stades germinatifs (Dearnaley *et al.*, 2012).

Au stade adulte, certaines orchidées demeurent non chlorophylliennes et reposent ainsi totalement sur leurs champignons mycorrhiziens pour leur apport carboné : ce sont des tricheuses qui détournent les symbioses mycorrhiziennes à leur profit, comme le fait la Néottie nid-d'oiseau (*Neottia nidus-avis*) dans nos régions (Selosse *et al.*, 2002, 2003).

Pour se reproduire ensuite, la plupart des orchidées ont besoin de la visite de pollinisateurs, le plus souvent des Hyménoptères (comme les abeilles) ou des Lépidoptères (comme les sphinx, papillons à longue « trompe »). Pour les attirer, elles parent leurs fleurs d'attributs visuels et olfactifs, mais surtout de nectar très recherché par certains insectes. Là encore, certaines espèces dupent leurs partenaires en n'offrant pas la récompense escomptée (Jersáková *et al.*, 2006).

Certaines attirent les pollinisateurs, mais n'offrent pas de nectar en retour, comme l'Orchis sureau (*Dactylorhiza sambucina* ; Gigord *et al.*, 2001). D'autres présentent des fleurs à l'allure et à l'odeur d'insectes femelles, leurrant les mâles de la même espèce qui, croyant s'accoupler, pollinisent la fleur d'orchidée. C'est le cas de très nombreuses espèces comme l'Ophrys abeille (*Ophrys apifera*) dans nos régions ou l'Orchidée trapèze (*Chiloglottis trapeziformis*) en Australie (Schiestl *et al.*, 2003; Mant *et al.*, 2005).

Finalement, sous terre comme au sommet de leurs tiges, les orchidées se doivent d'être accompagnées : certaines récompensent leurs partenaires, d'autres se transforment en tricheuses, mais une chose est sûre, elles ne sont jamais seules (Selosse, 2014).

1.2.2.e Les autres symbioses mycorrhiziennes

Nous venons ici de dresser un état rapide des grands types de symbioses mycorrhiziennes. Il en existe cependant de multiples variantes, plus ou moins bien documentées et acceptées par la communauté scientifique. Par exemple, les ectendomycorhizes (à la fois ecto- et endomycorhizes) retrouvées chez certains Pins (*Pinus spp.*) ou chez les Arbousiers (*Arbutus spp.*, Éricacées, Arbutoideae), sont caractérisées par un manteau variable et une colonisation intracellulaire éparse (Brundrett & Tedersoo, 2018a). Dans la famille des Éricacées toujours

(sous-famille des Monotropoideae) les Monotropes (*Monotropus spp.*) présentent un épais manteau et une colonisation intracellulaire intense et digèrent les hyphes fongiques (symbioses monotropoïdes) à l'inverse des Pyroles (*Pyrola spp.*) qui elles ne les digèrent pas (symbioses pyroloïdes ; [Brundrett & Tedersoo, 2018a](#)).

En conclusion, les mycorhizes, quoique le plus souvent invisibles à nos yeux, sont présentes chez la grande majorité des plantes qui nous entourent. Elles contribuent en grande partie à la nutrition minérale des plantes, et ce probablement depuis leur colonisation du milieu terrestre il y a plus de 450 Ma. De structures et d'origines diverses, elles résultent d'évolutions convergentes multiples. Dans tous les cas, les mycorhizes constituent une interface d'échanges entre la plante et ses partenaires fongiques, que nous allons brièvement aborder dans la partie suivante.

1.2.3. Quels avantages pour les partenaires mutualistes ?

1.2.3.a Les symbioses mycorhiziennes, des mutualismes

Si A-B. Frank n'est pas le premier à avoir observé et décrit des structures mycorhiziennes, c'est en revanche le premier à en avoir compris la nature fongique ainsi que leur rôle pour la plante ([Trappe, 2005](#)). Par exemple, si l'on doit à Theodor Hartig la description des ectomycorhizes chez le pin (son nom restera d'ailleurs pour en caractériser le réseau filamenteux intercellulaire, dit réseau de Hartig), ce dernier les interprète comme de simples structures racinaires ([Hartig, 1840](#)). Par la suite, l'identification des structures fongiques dans la racine suggère aux scientifiques de l'époque une relation de parasitisme, soit de la plante par le champignon, soit du champignon par la plante ([Trappe, 2005](#)). C'est Frank le premier qui, en 1885, comprend la nature mutualiste et l'importance écologique des mycorhizes ([Frank, 1885, 2005; Trappe, 2005](#)).

L'association mycorhizienne est ainsi une symbiose, c'est-à-dire dans son sens francophone, un mutualisme. On considère en effet que les deux partenaires impliqués (la plante et le champignon) tirent des bénéfices de cette association, c'est-à-dire que leur valeur sélective est augmentée en présence de leur partenaire. Cette augmentation de valeur sélective passe par deux principaux mécanismes : la nutrition et la protection ([Selosse, 2000](#)), que nous aborderons après avoir brièvement rappelé les modalités de rencontre des différents partenaires.

1.2.3.b Modalités de rencontre et de contrôle des deux partenaires

Contrairement à d'autres symbioses comme les symbioses rhizobium-légumineuse, et malgré les vastes similitudes entre celles-ci (Bonfante & Genre, 2010), les mécanismes moléculaires régissant la mise en place des symbioses mycorhiziennes sont encore à ce jour relativement mal connus (Van Der Heijden *et al.*, 2015). La rencontre des deux partenaires est régie par un dialogue moléculaire complexe qui a lieu dans le sol, au contact des racines, et que nous allons tenter de synthétiser dans les paragraphes ci-dessous (Figure 4).

Tout d'abord, les plantes libèrent, de façon naturelle, des exsudats racinaires et notamment des phytohormones, dont des molécules de la famille des strigolactones (Bonfante & Genre, 2010, 2015; Van Der Heijden *et al.*, 2015). Ces strigolactones sont reconnus par certains champignons, dont les champignons mycorhiziens, et induisent chez eux la croissance et la ramification des hyphes qui entrent alors au contact de la racine. En réponse à ce signal, les champignons sécrètent des lipo-chitooligosaccharides fongiques (Myc-LCO ; Maillet *et al.*, 2011), des molécules complexes dérivées de la chitine* et induisant chez la plante plusieurs cascades de signalisation. Celles-ci, basées sur des signaux calciques, induisent l'expression des gènes nécessaires à la mise en place de la symbiose (régulation des défenses immunitaires, remodelage des parois végétales, synthèse de transporteurs etc. ; Bonfante & Genre, 2015).

Un point essentiel de ces étapes de dialogue moléculaire, important pour la suite de notre discussion, concerne la capacité des partenaires à contrôler leurs réponses immunitaires respectives. En effet, beaucoup de champignons mycorhiziens sont évolutivement proches de champignons pathogènes, notamment chez les Dikaryas (Veldre *et al.*, 2013; Kohler *et al.*, 2015; Weiß *et al.*, 2016; Miyauchi *et al.*, 2020) ceux-ci sécrétant également des molécules proches des Myc-LCO qui activent la réponse immunitaire des plantes (Bonfante & Genre, 2015). Pour la plante, il est nécessaire de contrôler l'entrée du champignon dans ses tissus, en régulant notamment les enzymes de lyse des parois végétales. Une plante colonisée se doit donc de différencier un potentiel pathogène d'un partenaire mycorhizien, lequel doit en retour réguler les défenses immunitaires de son hôte (Volpin *et al.*, 1995).

Les mécanismes impliqués dans de tels contrôles sont encore mal connus, mais certains au moins semblent reposer sur la suppression de l'immunité de la plante par le champignon, par le biais de petits peptides sécrétés (*mycorrhizal-induced small secreted peptides*, MiSSPs ; Van Der Heijden *et al.*, 2015; Martin *et al.*, 2016). L'un des exemples les mieux documentés concerne l'interaction entre le Peuplier (*Populus trichocarpa*) et *Laccaria bicolor*, champignon ectomycorhizien de l'ordre des Basidiomycètes. Une fois dans les tissus racinaires de son hôte, *L. bicolor* sécrète de petits peptides, dont MiSSP7, qui via une répression des voies de défenses de la plante liées à l'acide jasmonique, inhibent la réponse immunitaire de cette dernière (Plett *et al.*, 2014).

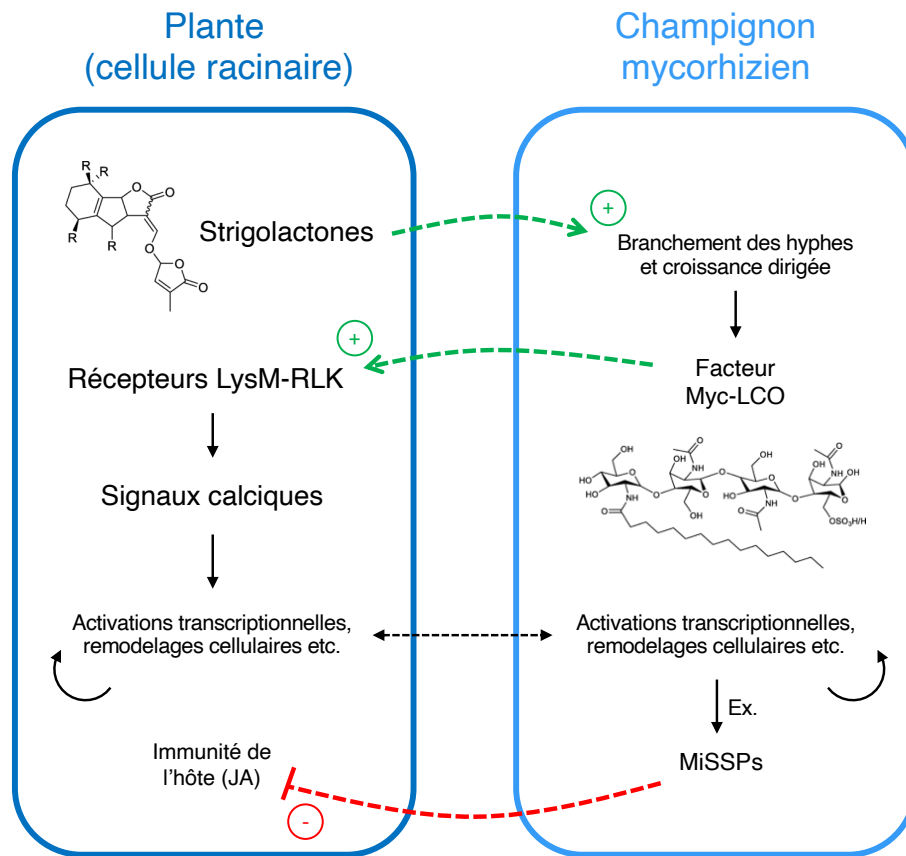


Figure 4 Dialogue moléculaire entre une plante et un champignon mycorhizien. Les flèches en pointillées rendent compte d'un mouvement de molécules entre les deux organismes, activant (vert) ou inhibant (rouge) des voies de signalisation. Les flèches noires rendent compte d'activation de voies de signalisation au sein d'un organisme. Les formules des molécules sont tirées de Favre-Godal *et al.*, 2020.

La symbiose mycorhizienne repose ainsi sur un équilibre instable entre les deux partenaires, régi par un dialogue moléculaire complexe. Une fois la symbiose mise en place, elle offre l'opportunité aux deux partenaires d'échanger nutriments et informations.

1.2.3.c Symbioses mycorhiziennes et relation de nutrition

Les symbioses mycorhiziennes reposent en grande partie sur la complémentarité métabolique et morphologique des partenaires (Selosse, 2000). D'un côté les plantes, autotrophes*, sont capables de synthétiser leur propre matière organique à partir du CO₂ atmosphérique et ont donc accès à une source de sucres quasi-inépuisable (aux limitations énergétiques près). De l'autre côté, les champignons, qui sont eux hétérotrophes*, présentent une

croissance très rapide et à moindre coût (le diamètre des filaments fongiques n'excédant généralement pas 10 μm) leur permettant d'explorer de gros volumes de sols, et d'accéder à des interstices inaccessibles aux racines, plus grosses. De plus, certains champignons mycorrhiziens sont capables de dégrader eux-mêmes la matière organique des sols et d'en extraire les éléments nutritifs (notamment l'azote), alors que les plantes sont limitées à des sources d'azote minérales ($\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ essentiellement). C'est le cas notamment des champignons mycorrhiziens d'Éricacées et d'Orchidées et, dans une moindre mesure, des champignons ectomycorrhiziens (Veldre *et al.*, 2013; Kohler *et al.*, 2015; Weiß *et al.*, 2016; Martino *et al.*, 2018; Miyauchi *et al.*, 2020).

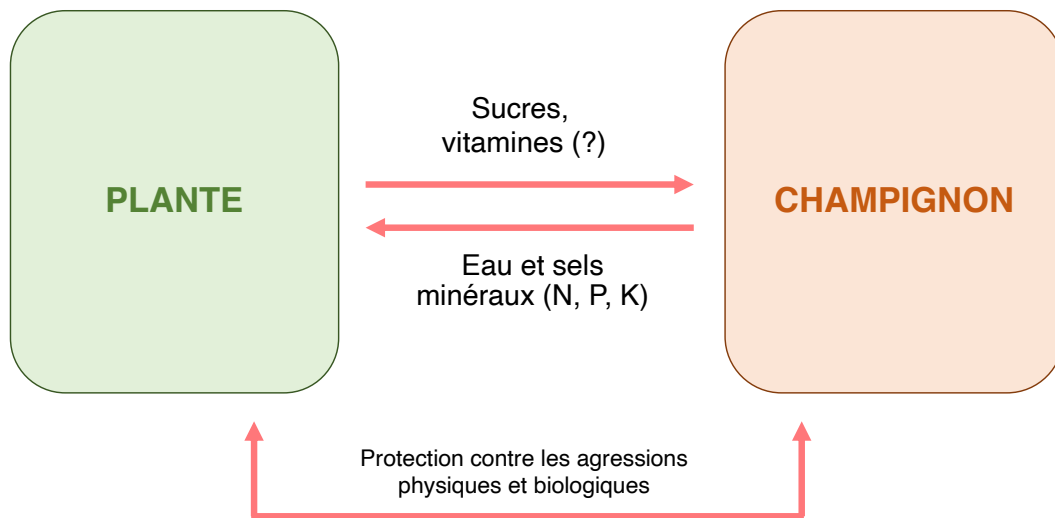


Figure 5 Relations de nutrition et de protection lors de la symbiose mycorrhizienne. Les flèches partent du donneur et pointent vers le receveur. N, azote ; P, phosphate ; K, potassium.

Dans le cas général, le fonctionnement d'une mycorhize, à l'interface symbiotique, est le suivant : la plante fournit au champignon des sucres issus de sa photosynthèse, tandis que celui-ci améliore les capacités d'absorption en eau et en nutriments de la plante (**Figure 5** ; Bonfante & Genre, 2010). Les champignons endomycorhiziens arbusculaires par exemple, peuvent assurer jusqu'à 85-90% de l'apport en phosphate nécessaire à la croissance des plantes (Jakobsen *et al.*, 2001), celui-ci étant particulièrement limitant pour les plantes à proximité des racines (Jungk & Claassen, 1989). Le prélèvement d'azote par les champignons est plus variable et dépend des types de sols et des espèces impliquées (van der heijden *et al.*, 2015). Les champignons ectomycorhiziens ou formant des mycorhizes ericoïdes sont capables d'accéder à des sources d'azote organiques inaccessibles pour les plantes (Turnbull *et al.*, 1995), leur fournissant jusqu'à 80% de leur apport en azote et facilitant ainsi leur survie sur des sols pauvres en éléments nutritifs disponibles (Turnbull *et al.*, 1995; Hobbie & Hobbie, 2006; Perotto *et al.*, 2018).

En retour, les plantes cèdent environ 10-20% de leurs photosynthétats à leurs champignons endomycorhiziens, et jusqu'à 50% dans le cas des symbioses ectomycorhiziennes et ericoïdes (Hobbie & Hobbie, 2006; van der heijden *et al.*, 2015). Le cas particulier des endomycorhizes d'orchidées sera abordé au prochain chapitre. Enfin, les plantes pourraient fournir à leurs champignons, en plus des sucres photosynthétiques, d'autres molécules nutritives comme des vitamines (Selosse & Rousset, 2011).

1.2.3.d Symbioses mycorhiziennes et relation de protection

En plus d'échanges nutritifs entre les partenaires, les symbioses mycorhiziennes participent également à leur protection respective contre des stress biotiques et abiotiques (van der heijden *et al.*, 2015).

Tout d'abord, la présence de champignons mycorhiziens dans les racines renforce le système immunitaire des plantes, notamment en maintenant un état de veille immunitaire (appelé « résistance induite »), régulé une nouvelle fois par les voies de l'acide jasmonique. La plante réagit alors de manière plus rapide et efficace face à l'attaque d'un pathogène (champignons, bactéries, virus etc.), ou d'un parasite (nématodes, insectes, autres plantes parasites, etc. ; Newsham *et al.*, 1995; Jung *et al.*, 2012; Kaling *et al.*, 2018). Les champignons mycorhiziens peuvent également limiter les attaques de pathogènes au niveau des racines en les protégeant physiquement (ex : manchon mycélien des ectomycorhizes) ou chimiquement (ex : sécrétion de molécules antibiotiques) et en entrant en compétition avec ces derniers dans l'utilisation des ressources de la plante (Jung *et al.*, 2012).

La colonisation mycorhizienne permet également aux plantes de mieux supporter certains stress abiotiques comme les sécheresses (Augé, 2001) ou la pollution des sols aux métaux lourds (Schützendübel & Polle, 2002). Là encore les effets des mycorhizes peuvent être à la fois directs (par exemple une meilleure absorption d'eau dans les sols par les plantes mycorhizées qui résistent alors mieux aux sécheresses) et indirects (amélioration de l'état physiologique des plantes qui répondent plus rapidement et efficacement aux stress rencontrés ; Augé, 2001).

Côté champignon, le bénéfice de la symbiose d'un point de vue protection est peu documenté car difficile à étudier. Il semble toutefois que l'habitat racinaire constitue un environnement protégé pour le champignon, à la fois contre les stress biotiques (présence d'organismes mycophages comme les collemboles ou les acariens, mycoparasites etc.) et abiotiques (protection dans les racines en cas de sécheresse intense ; Augé, 2001).

II. Les mycorhizes d'orchidées

2.1. Partenaires fongiques et structures des mycorhizes d'orchidées

2.1.1. La famille des orchidées

Les orchidées fascinent par leur capacité à interagir, de façon parfois surprenante, avec les autres êtres vivants (voir **Encadré 1**). Avec près de 28 000 espèces réparties dans > 700 genres, la famille des Orchidacées est probablement la famille de plantes à fleurs la plus diversifiée (Christenhusz & Byng, 2016). De nombreuses espèces sont rares et endémiques, et au moins 45% d'entre elles sont considérées comme vulnérables ou menacées par l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature (IUCN ; 2021), du fait de leur commerce ou de la fragmentation des habitats. On distingue 5 sous-familles d'orchidées (**Figure 6** ; Givnish *et al.*, 2015) : les Apostasioideae, les Vanilloideae et les Cypripedioideae forment trois lignées évolutives basales relativement petites en nombre de genres et d'espèces ; la sous-famille et lignée des Orchidoideae, plus grande, comprend essentiellement des espèces terrestres tandis que la sous-famille des Epidendroideae, qui concentre l'essentiel de la diversité au sein de la famille, est riche d'espèces épiphytes tropicales, mais pas uniquement.

Toutes les orchidées examinées forment des symbioses mycorhiziennes appelées « endomycorhizes à pelotons d'orchidées » (**Figure 7**). La présence de champignons dans les racines d'orchidées hétérotrophes a été reconnue dès le début du 19^e siècle (voir Selosse *et al.*, 2017), et leur nature mycorhizienne a probablement été élucidée dès la fin du 19^e siècle à la suite de la découverte des symbioses ectomycorhiziennes à la même époque (Frank, 1885). Cependant, il faut attendre les travaux pionniers du scientifique français Noël Bernard en 1899 (Bernard, 1899; Selosse *et al.*, 2011, 2017) pour que les mycorhizes d'orchidées soient réellement décrites. Pourtant, aujourd'hui encore, la diversité, le fonctionnement, et l'importance écologique et évolutive de ces associations mycorhiziennes restent encore mal compris.

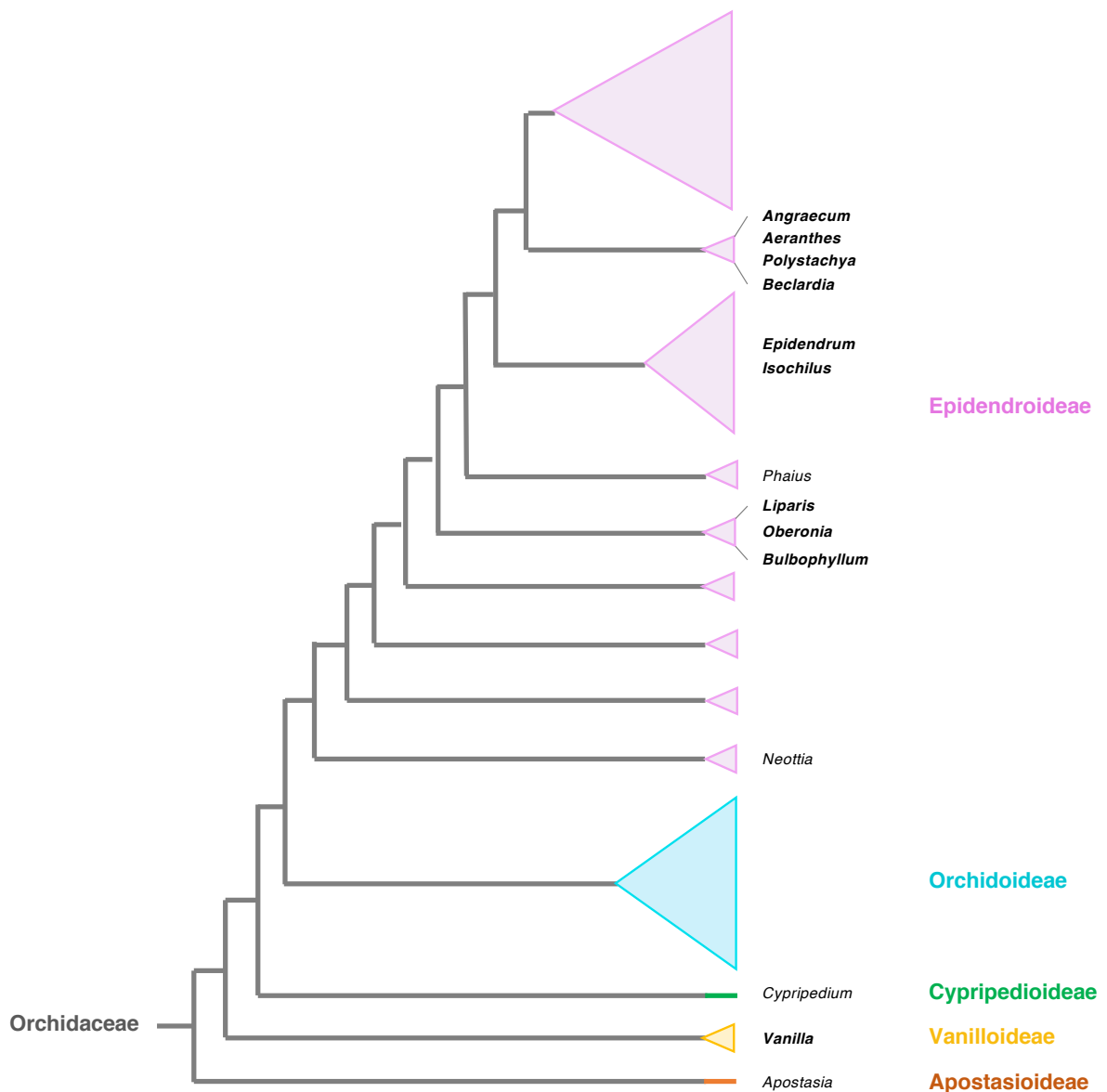


Figure 6 Reconstruction phylogénétique simplifiée des orchidées (Orchidaceae). Les 5 sous-familles sont indiquées en couleur à droite de l'arbre. Les noms des principaux genres abordés dans ce manuscrit sont indiqués à l'extrémité des branches correspondantes ; ceux en gras correspondent aux genres étudiés durant la thèse. Adapté et simplifié de Givnish *et al.*, 2015.

2.1.2. Diversité des partenaires fongiques

Les principaux partenaires mycorhiziens des orchidées forment un groupe polyphylétique de champignons basidiomycètes appelé « rhizoctonias » (Selosse *et al.*, 2011; Dearnaley *et al.*, 2012). Les rhizoctonias regroupent trois familles de champignons de l'ordre des Cantharellales (familles des Tulasnellaceae et Ceratobasidiaceae ; Veldre *et al.*, 2013) et des Sebaciniales (famille

des Serendipitaceae ; **Figure 3** ; [Weiß et al., 2016](#)). Ces champignons à l'écologie encore mal connue sont supposés présenter un mode de vie saprophyte libre dans l'environnement, mais également endophyte (c'est-à-dire colonisant les racines d'autres plantes sans former de structure particulière ni provoquer de symptôme ; [Wilson, 1995](#); [Selosse & Martos, 2014](#); [Selosse et al., 2022](#)) et bien sûr mycorhizien d'orchidées ([Dearnaley et al., 2012](#)).

En plus des rhizoctonias fréquents dans les mycorhizes d'orchidées, de nombreux autres groupes fongiques sont capables de former des associations mycorhiziennes avec des orchidées (voir liste dans [Dearnaley et al., 2012](#) ; voir aussi [Wang et al., 2021](#)). Les champignons impliqués sont presque toujours des Basidiomycètes et, dans une moindre mesure, des Ascomycètes, mais leur écologie varie selon les cas (**Figure 3**).

En régions tempérées ou tropicales, certaines orchidées terrestres du sous-bois s'associent à des champignons ectomycorhiziens, eux-mêmes associés à des plantes voisines. C'est le cas par exemple de l'orchidée hétérotrophe *Neottia nidus-avis*, associée à un champignon de la famille des Sebacinaceae (Sebacinales), champignon ectomycorhizien des arbres voisins comme le Hêtre (*Fagus sylvatica* ; [Selosse et al., 2002](#)). En région tropicale, certaines orchidées s'associent à des champignons saprophytes non-rhizoctonias, comme à des Psathyrellaceae (genres *Psathyrella*, *Coprinellus* etc.) chez certaines orchidées terrestres ([Bayman et al., 2016](#); [Suetsugu et al., 2022](#)), ou à des Atractiellomycètes chez certaines orchidées épiphytes ([Kottke et al., 2010](#); [Herrera et al., 2019](#)). Ces dernières, cependant, semblent majoritairement associées aux rhizoctonias dans la plupart des régions étudiées (voir **Encadré 2**).

Le recrutement de champignons aux origines évolutives et niches écologiques très variées sera abordé dans la partie 2.3. Toutefois, malgré cette diversité de partenaires mycorhiziens, tous semblent former des structures similaires dans les racines de leur hôte : des pelotons caractéristiques des endomycorhizes d'orchidées (**Figure 7**).

Encadré 2. Les milieux épiphytes et leurs contraintes : le cas des orchidées.

Les plantes épiphytes réalisent l'ensemble de leur cycle de vie sur l'écorce ou les branches d'autres plantes. Leurs racines, si elles en ont, ne s'enfoncent pas dans le sol, mais serpentent à la surface des arbres qui leur servent de support.

On dénombre environ 28 000 espèces de plantes épiphytes, soit presque 10% de la flore vasculaire ([Zotz, 2016](#)). L'épiphytisme est un caractère hautement convergent, retrouvé dans près de 73 familles de plantes tropicales, comme les Broméliacées, les Aracées ou les Pipéracées, ou encore chez diverses familles de fougères ou de mousses. Toutefois, la famille de plantes contenant le plus d'espèces épiphytes est celle des orchidées, dont 80% des membres sont épiphytes. Ceux-ci représentent ainsi près de 80% de toute la diversité spécifique épiphyte sur Terre ([Givnish et al., 2015](#); [Zotz, 2016](#)) ! Au sein des orchidées, l'épiphytisme semble être un caractère labile et convergent, avec au moins 3 apparitions et 4 recolonisations du sol estimées

dans la seule lignée des Epidendroideae (Collobert, en préparation). En outre, certaines orchidées, comme les vanilles (*Vanilla spp.*), forment des lianes et s'enracinent à la fois dans le sol et sur l'écorce d'autres plantes : elles sont dites semi-épiphytes.

Les environnements épiphytes sont des milieux généralement considérés comme stressants. En effet, en l'absence de sol (même si des accumulations locales d'humus peuvent conduire à la formation de pseudo-sol dans certains systèmes épiphytes), l'eau et les nutriments sont rares, localisés, et leur accès est souvent limité dans le temps (Zotz, 2016). L'eau ruisselle sur les écorces, emportant avec elle les nutriments qui ne sont alors disponibles que de manière localisée et éphémère. De même, la structure des écorces, ainsi que son évolution dans le temps, peuvent impacter la dynamique des plantes épiphytes (Rasmussen & Rasmussen, 2018). Une écorce desquamante empêche la fixation de plantules, et à l'inverse, une écorce crevassée et pérenne favorise leur implantation dans des microsites (Wagner *et al.*, 2015; Wagner & Zotz, 2019).

Ainsi, l'écorce d'un arbre peut être vue comme un milieu très hétérogène, favorisant la co-existence de nombreuses espèces, dont des orchidées (Hietz & Hietz-Seifert, 1995; Lancaster, 2004). Ces dernières présentent de nombreuses adaptations morphologiques et physiologiques à l'épiphytisme. Leurs racines sont souvent recouvertes d'un velamen, constitué d'une ou plusieurs assises cellulaires formées de cellules mortes, qui joue un rôle d'éponge en absorbant l'humidité de l'air ambiant et en retenant l'eau ruisselant sur les écorces. Selon leur position sur la hauteur du tronc, et donc selon leur exposition à la lumière, elles présentent des métabolismes de type C3 ou CAM, souvent associés à une crassulescence, limitant notamment les pertes en eau au niveau des stomates (Winter *et al.*, 1983). Toutefois, il faut garder à l'esprit qu'il n'existe pas un, mais plutôt des environnements épiphytes, et que ceux-ci constituent un ensemble d'habitats extrêmement complexes et hétérogènes (Johansson, 1974). Par exemple, les conditions de vie d'une orchidée de la canopée, très exposée notamment aux irradiations, sont très différentes de celles d'une orchidée de sous-bois, vivant à la base des troncs, parfois proche du sol, en situation bien plus ombragée. Sur un même arbre et *a fortiori* dans une même forêt, il existe ainsi un fort gradient environnemental du sol vers la canopée, conditionnant en partie la structure des communautés épiphytes (ex : Winter *et al.*, 1983).

Si l'écologie et la physiologie des plantes épiphytes ont fait l'objet de nombreuses études, celles de leurs champignons mycorhiziens sont longtemps restées inexploitées. En effet, chez les Broméliacées par exemple, les espèces pourvues de mycorhizes arbusculaires semblent plus rares en milieu épiphyte qu'en milieu terrestre (Grippa *et al.*, 2007; Leroy *et al.*, 2021) ou sont alors restreintes aux pseudo-sols des canopées (Rabatin *et al.*, 1993; Rowe & Pringle, 2005). Chez les orchidées en revanche, la présence de mycorhizes chez les espèces épiphytes semble être la règle (Suárez *et al.*, 2006; Martos *et al.*, 2012). Celles-ci s'associent préférentiellement à des rhizoctonias (Dearnaley *et al.*, 2012), mais d'autres associations ont été décrites avec des Atractiellomycètes (Pucciniomycotina ; Kottke *et al.*, 2010), des *Mycena* (Zhang *et al.*, 2012) ou

des *Fusarium* (Jiang *et al.*, 2019). En revanche, on ne connaît rien de l'écologie de ces champignons sur les écorces des arbres : on suppose qu'ils sont saprophytes, ce qui pourrait expliquer la fréquence des associations mycorhiziennes chez les orchidées épiphytes, mais il n'est pas exclu que certains puissent être endophytes d'autres plantes, voire parasites de l'arbre hôte (Leake & Cameron, 2012, mais voir Eskov *et al.*, 2020).

2.1.3. Structure de l'interface orchidée-champignon mycorhizien

Les mycorhizes d'orchidées sont des endomycorhizes, c'est-à-dire que les hyphes fongiques, une fois dans la racine, traversent les parois des cellules corticales et provoquent des invaginations de leur membrane plasmique. Les hyphes s'enroulent alors de manière typique, formant des structures en forme de pelotons, caractéristiques de cette symbiose (Smith & Read, 2008). Chaque hyphe formant le peloton est entouré par la membrane plasmique de la cellule végétale, multipliant considérablement la surface d'échanges entre les deux partenaires (Dearnaley *et al.*, 2016).

Les pelotons sont présents dès les stades précoces de la germination des graines, où ils sont contraints à la zone basale des embryons (voir 2.2) éloignée du méristème apical. Aux stades plantules puis adultes, leur répartition dans les racines est très variable selon les espèces d'orchidées : ils peuvent occuper l'ensemble du parenchyme cortical des racines (cas des orchidées terrestres de sous-bois), être restreints à certaines zones (par exemple au contact de l'écorce ou des mousses chez les orchidées épiphytes ; Porras-Alfaro & Bayman, 2007; Pujasatria *et al.*, 2022) ou à certaines racines (par exemple chez *Oeceoclades maculata* ; Bayman *et al.*, 2016). Chez les espèces d'orchidées soumises à de fortes variations saisonnières, la colonisation des racines varie également au cours de l'année, de façon très variable selon les espèces considérées (Ercole *et al.*, 2015; Ventre Lespiaucq *et al.*, 2021). Ces taux de colonisations variables sont possibles du fait d'un renouvellement rapide de l'interface plante-champignon. En effet, la durée de vie d'un peloton n'est que de quelques jours (mais peut descendre jusqu'à < 24h, par exemple chez *Dactylorhiza purpurella* ; Hadley & Williamson, 1971) : les hyphes sont rapidement « lysés » et « digérés » par la plante (Smith & Read, 2008), on parle alors de tolypophagie (nous reviendrons sur les termes entre guillemets dans la partie 2.4).

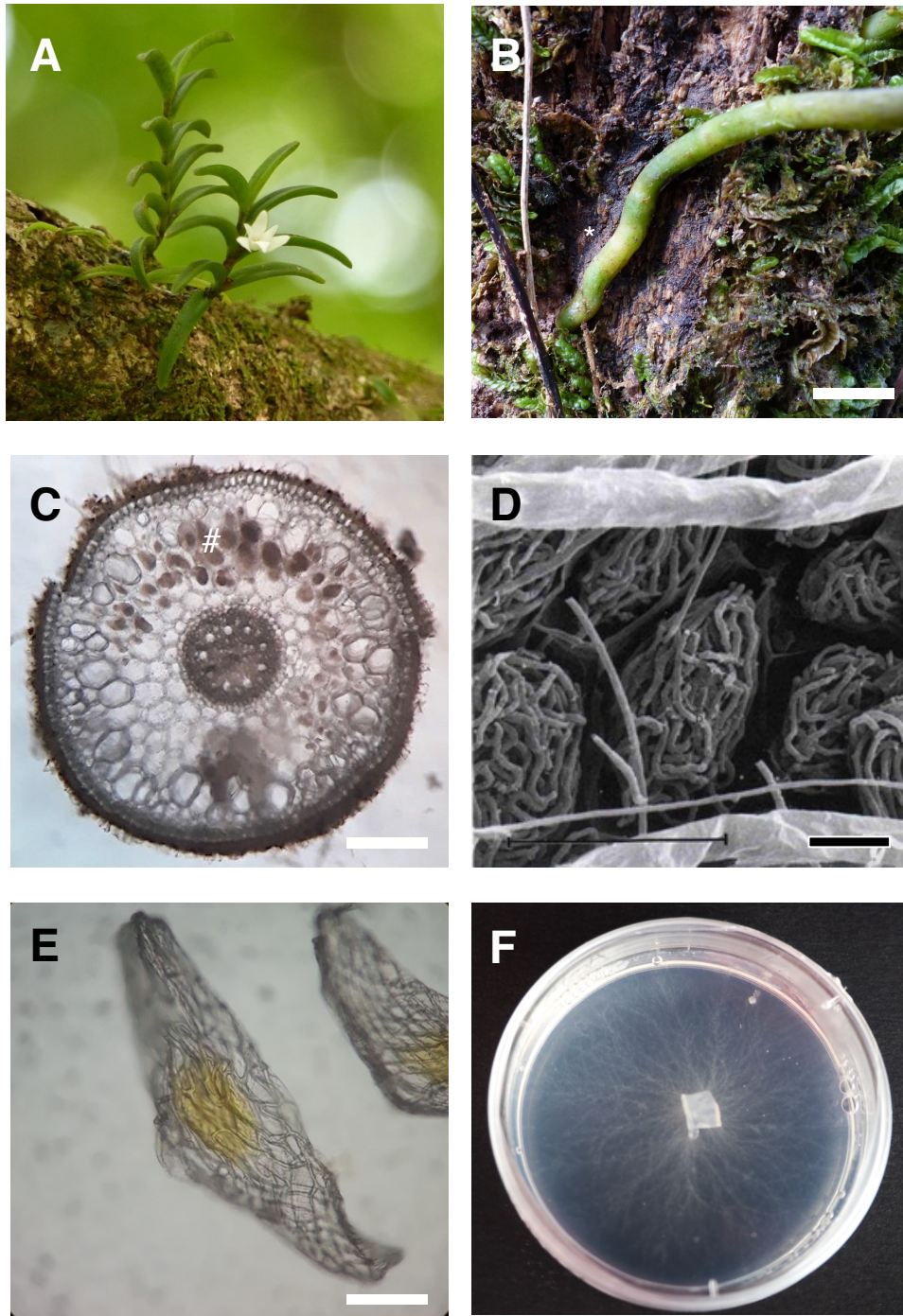


Figure 7 Structures mycorhiziennes chez les orchidées. (A) Orchidée épiphyte (*Angraecum pectinatum*) enracinée sur l'écorce d'un arbre. (B) Racine d'orchidée épiphyte (*Angraecum* sp.) montrant des portions vertes (pas ou peu mycorhizées), et des portions jaunâtres (*) (mycorhizées). Échelle : 1 cm. (C) Coupe transversale de racine d'orchidée épiphyte (*Bulbophyllum variegatum*) sans coloration. Les pelotons mycorhiziens (âgés ici) sont indiqués par un #. Échelle : 0.5 mm. (D) Observation en microscopie électronique à balayage de pelotons chez une orchidée terrestre (*Orchis morio*). Échelle : 50 µm. D'après Beyrle *et al.*, 1995. (E) Graine d'orchidée épiphyte (*Bulbophyllum variegatum*) montrant la présence d'un embryon central (en jaune) entouré d'un tégument rempli d'air. Echelle : 0.4 µm (F) Champignon mycorhizien (*Tulasnella* sp.) isolé à partir de racine d'une orchidée épiphyte (*Angraecum pectinatum*), cultivé seul sur milieu FIM (Fungal Isolation medium). Photographies : R. Petrolli sauf image D.

2.2. Germination symbiotique et fonctionnement de la symbiose

L'étude des mécanismes moléculaires régissant les symbioses mycorhiziennes d'orchidées est essentielle à la compréhension des processus écologiques et évolutifs qui en résultent. Par exemple, comprendre la nature précise des échanges moléculaires entre les deux partenaires permet de mieux appréhender la dépendance des orchidées vis-à-vis de leurs champignons sur des substrats et sous des climats variés. De même, une meilleure identification des signaux de reconnaissance des partenaires pourrait permettre de mieux comprendre pourquoi certaines espèces d'orchidées sont très spécifiques dans leurs associations mycorhiziennes, tandis que d'autres ne le sont pas.

Ainsi, nous tacherons ici de synthétiser les mécanismes moléculaires connus et régissant les symbioses mycorhiziennes des orchidées, de la rencontre des deux partenaires jusqu'à la mise en place et au fonctionnement de la symbiose.

2.2.1. Germination symbiotique des graines d'orchidées

Les orchidées produisent des graines microscopiques, appelées en anglais « *dust seed* », littéralement « graines poussières » (Figure 7E; Arditti & Ghani, 2000), caractéristique qu'elles partagent avec un nombre réduit de plantes (Eriksson & Kainulainen, 2011). Ces graines sont quasiment dépourvues de réserves nutritives nécessaires à la croissance de l'embryon, à l'exception de quelques réserves lipidiques et protéiques (Dearnaley *et al.*, 2016). Pour germer, elles nécessitent un apport nutritif extérieur, fourni dans le cas des orchidées par un champignon mycorhizien qu'elles doivent rencontrer dans leur milieu (Figure 8). La nutrition de la plante ainsi assurée par son champignon est appelée « mycohétérotrophie ».

La mystérieuse germination des graines d'orchidées a en effet longtemps intrigué les scientifiques jusqu'au début du 20^e siècle, ceux-ci ne parvenant pas à faire germer des graines autre part que dans le sol, proche d'individus adultes. On doit la découverte de la germination symbiotique des graines d'orchidées au scientifique français Noël Bernard, dans des travaux publiés en 1899 (Selosse *et al.*, 2011). Celui-ci, en promenade dans la forêt de Fontainebleau, proche de Paris, découvrit un pied de Néottie nid-d'oiseau dont l'inflorescence, cassée, était enfoncée dans le sol. Il y découvrit des graines germées entourées de filaments fongiques et contenant des pelotons, et conclut à une germination symbiotique médiée par le champignon (Bernard, 1899; Selosse *et al.*, 2017).

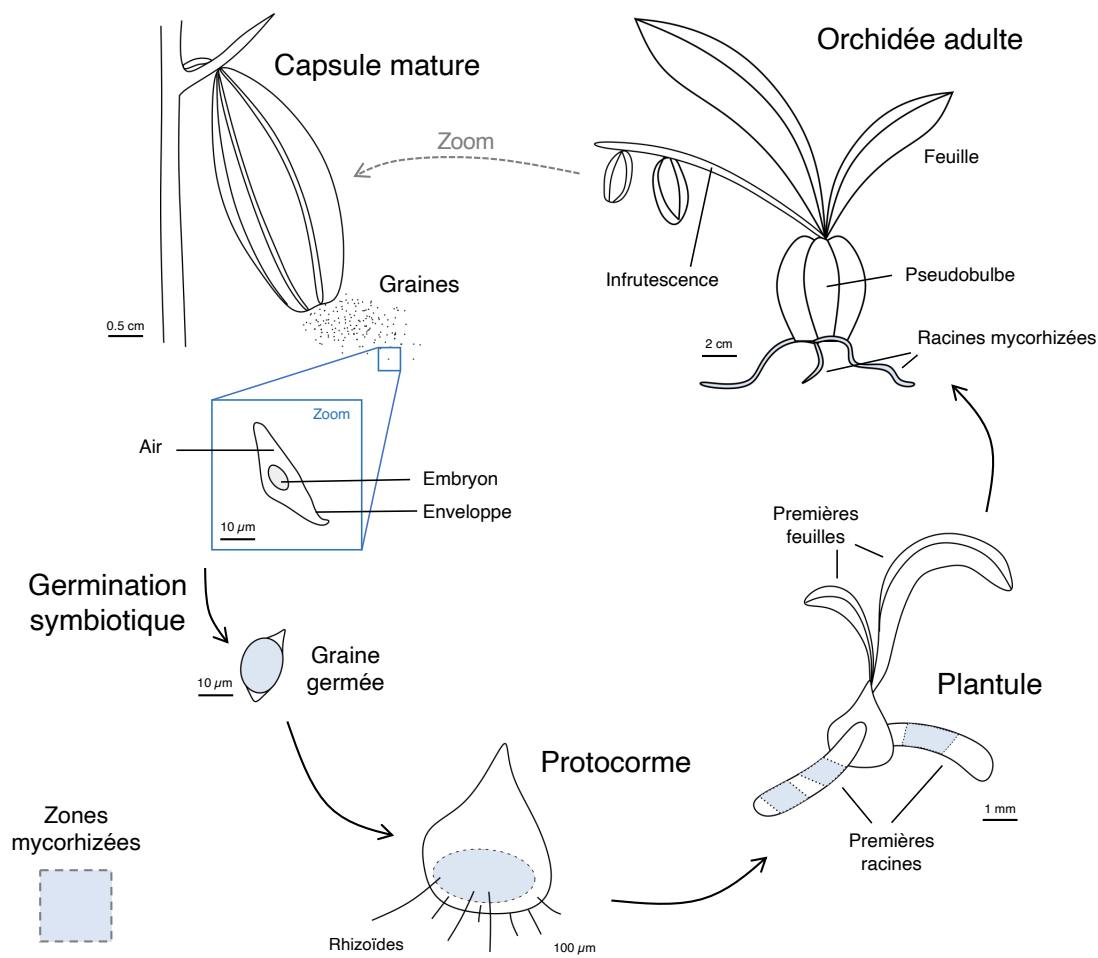


Figure 8 Cycle de vie d'une orchidée. Différents stades de croissances successifs sont représentés, et la colonisation des tissus végétaux par les champignons mycorhiziens est figurée en bleu clair.

Une fois germé, l'embryon de la graine grossit en une structure hétérotrophe de quelques millimètres appelée « protocorme » (Smith & Read, 2008). Ce protocorme est nourri par le ou les champignons mycorhiziens qui lui sont associés, et ce n'est qu'après l'apparition des premières feuilles vertes (*i.e.*, photosynthétiques) que des échanges bidirectionnels se mettent en place entre les deux partenaires. Toutefois, certaines orchidées demeurent totalement ou partiellement hétérotrophes au stade adulte, et sont alors nourries, au moins en partie, par leurs champignons mycorhiziens (voir 2.2.4 ; Selosse & Roy, 2009). De plus, les protocormes des espèces d'orchidées épiphytes germés *in vitro* sont généralement de couleur verte (Dearnaley *et al.*, 2016) et l'importance des champignons mycorhiziens dans la germination de ces espèces *in situ* reste encore mal comprise.

2.2.2. Mise en place de la symbiose mycorhizienne chez les orchidées

Si les modalités de rencontre entre les partenaires mycorhiziens (*i.e.*, plante et champignon) ont été partiellement décrites dans plusieurs symbioses mycorhiziennes (Bonfante & Genre, 2010, 2015; Van Der Heijden *et al.*, 2015) leur compréhension dans le cas des symbioses mycorhiziennes d'orchidées reste encore à ce jour très limitée (Dearnaley *et al.*, 2016; Favre-Godal *et al.*, 2020).

Des travaux récents de Valadares *et al.*, (2014) ont montré une expression accrue d'une enzyme de la voie de biosynthèse des strigolactones aux stades précoces de germination de l'orchidée *Oncidium sphacelatum*, suggérant que ces molécules pourraient servir de signal pour l'attraction des champignons mycorhiziens (Favre-Godal *et al.*, 2020). Des travaux menés sur l'orchidée mycohétérotrophe *Gastrodia elata* ont également mis en évidence un répertoire génétique accru lié à la synthèse et à l'export de strigolactones, ceux-ci induisant la ramification d'un des champignons mycorhiziens de cette espèce, *Armillaria mellea* (Yuan *et al.*, 2018). Les modalités de rencontre entre les orchidées et leurs champignons mycorhiziens pourraient donc être similaires à celles décrites dans les ectomycorhizes ou endomycorhizes à arbuscules (Miura *et al.*, 2018), mais de plus amples travaux seront nécessaires pour confirmer ces résultats. Par exemple, si des travaux menés par Zhao *et al.*, (2013, 2014) ont mis en évidence une surexpression par des orchidées, en présence de champignons mycorhiziens, de récepteurs LRR et LysM, tous deux impliqués dans les voies de transduction du signal lors de la mise en place de la symbiose mycorhizienne, aucun Myc-LCO n'a à ce jour été mis en évidence chez les champignons mycorhiziens d'orchidées (Favre-Godal *et al.*, 2020).

Suite à la rencontre entre les deux partenaires, plusieurs issues sont possibles : le champignon peut être immédiatement rejeté par la plante, ou bien celui-ci peut coloniser les tissus de manière très transitoire, déclenchant une réponse immunitaire de la part de la plante, ou de manière plus prolongée, permettant soit la mise en place de la symbiose, soit le déclenchement d'une réaction pathogène entraînant la mort de la plante. Les facteurs moléculaires contrôlant ces différentes issues sont encore inconnus, mais il semble qu'en présence de champignon mycorhizien compatible, la réponse immunitaire de la plante reste limitée (Perotto *et al.*, 2014), peut-être inhibée par le champignon (Valadares *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2014). Il faut toutefois rappeler que quels que soient les champignons impliqués, les structures mycorhiziennes formées prennent la forme de pelotons, suggérant que les orchidées contrôlent bien, au moins en partie, la colonisation fongique.

Des études récentes se sont focalisées sur les changements transcriptionnels et métabolomiques induits par la symbiose orchidée-champignon (ex : Fochi *et al.*, 2017a,b; Adamo

et al., 2020; Ghirardo *et al.*, 2020; Valadares *et al.*, 2021). Par exemple, Ghirardo *et al.*, (2020) ont montré une forte modification du métabolisme lipidique de *Tulasnella calospora* en présence de protocormes de *Serapias vomeracea*, suggérant d'importants changements métaboliques induits par la symbiose. Dans la même étude, les protocormes de *S. vomeracea* présentaient une accumulation d'oligomères de chitine, probablement issus de la lyse des parois chitineuses du champignon par la plante, suggérant une activation des défenses immunitaires de la plante. De manière alternative, certaines de ces molécules semblent impliquées dans la mise en place de dialogues moléculaires aboutissant à la symbiose, suggérant également un dialogue entre la plante et ses champignons, voire une prise de contrôle de la plante par ceux-ci (Bonfante & Genre, 2015). Dans certains cas, la mise en place de la symbiose peut conduire au sur-développement du champignon qui décompose alors les tissus végétaux grâce à son arsenal d'enzymes lytiques (des *Carbohydrate Active Enzymes*, CAZymes), mais les mécanismes régissant cette issue tragique restent encore mal compris (Adamo *et al.*, 2020).

2.2.3. Échanges nutritifs lors des symbioses mycorhiziennes d'orchidées

Les échanges trophiques entre orchidées et champignons mycorhiziens sont difficiles à résumer car ceux-ci semblent dépendre du stade de vie de la plante (protocorme *versus* stade adulte), de son type trophique (plante autotrophe *versus* mycohétérotrophe) et des champignons impliqués. Ainsi, le rôle réel de la symbiose mycorhizienne dans la biologie des orchidées n'est pas encore parfaitement élucidé. Toutefois, les orchidées sont souvent enrichies en azote par rapport aux plantes voisines (Hynson *et al.*, 2013), et ce malgré un système racinaire souvent réduit, suggérant un rôle important des champignons mycorhiziens dans leur nutrition.

Au stade protocorme non chlorophyllien tout d'abord, la plante est dépendante du champignon pour sa nutrition azotée (N), phosphatée (P) et carbonée (C; Smith, 1966; Dearnaley *et al.*, 2016; Fochi *et al.*, 2017b). En plus d'expériences de marquage ou de suivi d'expression des gènes, de multiples études ont démontré l'importance des champignons mycorhiziens pour la germination des graines *in vitro* (sur milieu cellulose notamment ; Hadley, 1969), ce qui confirme le rôle central de ces champignons dans la nutrition des stades précoces d'orchidées (Rasmussen, 1995; Dearnaley *et al.*, 2016). En revanche, les échanges entre les protocormes chlorophylliens d'orchidées épiphytes et leurs champignons mycorhiziens restent encore à ce jour mal connus.

Des flux nets de N et P ont également été mesurés du champignon *Ceratobasidium cornigerum* vers l'orchidée verte adulte *Goodyera repens* par Cameron *et al.*, (2006, 2007). Récemment, l'existence d'un flux de P du champignon vers la plante a été confirmé chez d'autres espèces de champignons (*Ceratobasidium sp.* et *Tulasnella sp.*) et d'orchidées par Davis *et al.*, (2022).

Ainsi, il est aujourd'hui largement admis que les flux de N et P observés aux stades de croissance précoces persistent à des stades plus avancés (Dearnaley *et al.*, 2016).

On sait également que les différents champignons mycorhiziens varient dans leur capacité à exploiter des formes minérales d'azote ; par exemple il semble que les Tulasnellaceae étudiés ne possèdent pas de systèmes de prélèvement des nitrates (Fochi *et al.*, 2017a) et ne soient capables de croître que sur un milieu contenant de l'ammonium ou de l'azote organique (Nurfadilah *et al.*, 2013). A l'inverse, les Ceratobasidiaceae étudiés sont capables de prélever le nitrate et l'ammonium du milieu, en plus des formes organiques d'azote (Cameron *et al.*, 2006; Nurfadilah *et al.*, 2013; Kuga *et al.*, 2014). Étant donné la dépendance de la plante vis-à-vis de ses champignons mycorhiziens pour la nutrition azotée, cela suggère une possible complémentarité de niche écologique entre les différents partenaires fongiques des orchidées, à tous les stades de vie de la plante.

Malgré des premières tentatives infructueuses (Hadley & Purves, 1974; Alexander & Hadley, 2022), des flux nets de C, cette fois de l'orchidée vers le champignon, ont également été mesurés par Cameron *et al.*, (2006, 2008) puis confirmés par Látalová & Baláž, (2010) chez des orchidées vertes adultes (*G. repens* associée à *C. cornigerum* et *Serapias strictiflora* associée à *Tulasnella* sp., respectivement), suggérant une réversion des flux de C entre les stades précoces et adultes des orchidées (Dearnaley *et al.*, 2016). Ainsi, si les échanges sont unidirectionnels aux stades de croissance précoce hétérotrophe de la plante, la phase symbiotique semble se mettre en place dès l'acquisition de la photosynthèse par les orchidées. Chez certaines orchidées épiphytes, l'acquisition rapide de la photosynthèse après germination des graines suggère une phase d'échanges unidirectionnels très limitée, voire absente. Récemment, un possible reflux de N, sous la forme de NH_4^+ , des cellules végétales du protocorme vers les pelotons a été identifié chez l'orchidée terrestre *S. vomeracea* (Fochi *et al.*, 2017a), suggérant une mise en place précoce de la phase symbiotique (Dearnaley & Cameron, 2017). Cependant, ni sa réelle importance écologique, ni la distinction avec un simple recyclage d'azote apoplastique, n'ont encore pu être élucidées.

Les modalités d'échanges des nutriments sont encore mal connues, mais un nombre croissant de travaux tendent à montrer que le champignon fournit à l'orchidée de l'azote sous forme d'acides aminés ou de petits peptides (Cameron *et al.*, 2006; Fochi *et al.*, 2017a,b; Lallemand *et al.*, 2019; Valadares *et al.*, 2021). Ces transferts semblent se faire à la fois à travers l'interface symbiotique au niveau de pelotons vivants (Hadley & Williamson, 1971; Kuga *et al.*, 2014; Fochi *et al.*, 2017b), et via une lyse des pelotons par la plante (*i.e.*, tolypophagie ; Bougoure *et al.*, 2010; Kuga *et al.*, 2014; Dearnaley & Cameron, 2017). Ces modalités de transfert pourraient varier selon les espèces considérées et leurs modes trophiques (*e.g.*, autotrophe *versus* hétérotrophe ; Dearnaley *et al.*, 2016). La forme de carbone reçue en retour par le champignon de la part de la plante (*i.e.*, sous forme de dioside (saccharose) où d'oses (glucose + fructose)) n'a

encore été que très peu étudiée (Dearnaley *et al.*, 2016), et l'on ne connaît par ailleurs quasiment rien des possibles flux d'autres nutriments organiques ou de vitamines entre les partenaires.

2.2.4. Un *continuum* trophique chez les orchidées : de l'autotrophie à l'hétérotrophie

Suite à leur germination hétérotrophe, les orchidées acquièrent la photosynthèse et deviennent alors autonomes pour leur nutrition carbonée. Cependant, certaines espèces demeurent non chlorophylliennes au stade adulte, et dépendent entièrement de leurs champignons mycorhiziens pour assurer leur nutrition : on parle alors d'espèces mycohétérotrophes (MH ; Leake, 1994). En outre, certaines espèces acquièrent la photosynthèse, mais continuent de recevoir de la matière organique d'origine fongique au stade adulte : on parle alors d'espèces partiellement mycohétérotrophes ou d'espèces mixotrophes (MxH ; Gebauer & Meyer, 2003; Selosse & Roy, 2009).

La mycohétérotrophie totale est apparue au moins 46 fois de manière indépendante au cours de l'évolution des plantes, et concerne environ 500-530 espèces de plantes (Merckx, 2013; Jacquemyn & Merckx, 2019). On la retrouve dans 10 familles, dont celle des orchidées qui en compte environ 235-295 espèces réparties dans plus de 43 genres (Merckx, 2013; Jacquemyn & Merckx, 2019). Au sein des orchidées, la mycohétérotrophie serait apparue au moins 17 fois de manière indépendante (Wang *et al.*, 2021), ce qui suggère que l'existence d'une mycohétérotrophie à des stades de développement précoce serait une prédisposition évolutive à son maintien au stade adulte (Selosse & Roy, 2009). Parmi les espèces d'orchidées MH, on trouve essentiellement des espèces terrestres de sous-bois en région tempérée (ex : *N. nidus-avis* ; Selosse *et al.*, 2002) ou tropicale (ex : *Gastrodia similis* ; Martos *et al.*, 2009) et seulement quelques semi-épiphytes en région tropicale : toutes des Vanilloideae comme *Erythrorchis altissima* en Asie (Merckx, 2013; Ogura-Tsujita *et al.*, 2018).

Au cours de l'évolution, la transition de régimes autotrophes à des régimes MxH ou MH s'accompagne généralement d'un changement des partenaires fongiques (Wang *et al.*, 2021). En effet, on suppose que les rhizoctonias ne sont pas capables de dégrader et transmettre une quantité de carbone organique suffisante pour compenser l'absence de photosynthèse chez leur hôte (Selosse & Martos, 2014). Ainsi, les orchidées MH ou MxH sont généralement associées à des champignons ectomycorhiziens par ailleurs associés à des plantes voisines, en régions tempérées et tropicales (ex : *N. nidus-avis* associée à un Sebacinaceae ; Selosse *et al.*, 2002), ou à d'autres champignons saprotrophes en régions tropicales (ex : *G. similis* et *E. altissima* associées à divers champignons décomposeurs du bois et de la litière du sol ; Martos *et al.*, 2009; Ogura-

Tsujita *et al.*, 2018). Dans certains cas, les champignons ectomycorhiziens impliqués appartiennent aux familles de rhizoctonias, ce qui complique leur identification en tant que partenaires ectomycorhiziens (voir **Article IV**). Par exemple, l'orchidée MxH *Platanthera minor* s'associe à des Ceratobasidiaceae en Asie, mais ceux-ci présentent une écologie également ectomycorhizienne (Yagame *et al.*, 2012). Il est ainsi possible que de nombreux partenaires mycorhiziens d'orchidées de sous-bois soient en réalité ectomycorhiziens malgré leur appartenance aux familles de rhizoctonias (Bougoure *et al.*, 2009).

Outre leur association à des champignons particuliers, il a été récemment démontré que certaines orchidées vertes, principalement de sous-bois, dépendaient en partie de ces champignons pour leur apport carboné (*i.e.*, orchidées MxH ; Gebauer & Meyer, 2003; Selosse & Roy, 2009). Cette dépendance accrue vis-à-vis de champignons mycorhiziens, généralement un assemblage de champignons non-rhizoctonias avec parfois quelques rhizoctonias (Bidartondo *et al.*, 2004; Julou *et al.*, 2005; Abadie *et al.*, 2006 ; voir plus haut), pourrait permettre aux espèces concernées de mieux tolérer les conditions ombragées du sous-bois auxquelles elles sont adaptées (par exemple *Cephalanthera damasonium* ; Bidartondo *et al.*, 2004 ; voir aussi Liebel *et al.*, 2010), et explique par ailleurs la persistance, rare, de certains individus albinos (Julou *et al.*, 2005; Roy *et al.*, 2013; Lallemand *et al.*, 2019). Cependant, la détection de ces espèces MxH est difficile et se base essentiellement sur des mesures isotopiques dont les résultats peuvent varier en fonction des conditions environnementales et selon les types de mesures effectuées (isotopes stables du carbone, de l'hydrogène etc.), et il est probable que le statut MxH de nombreuses espèces d'orchidées soit encore inconnu à ce jour (Selosse & Martos, 2014; Stöckel *et al.*, 2014; Gebauer *et al.*, 2016; Lallemand, 2018). Ainsi, les espèces d'orchidées semblent plutôt représenter un *continuum* trophique de l'autotrophie stricte vers la mycohétérotrophie totale, en passant par tous les stades intermédiaires de dépendance aux champignons mycorhiziens pour la nutrition carbonée (Schiebold *et al.*, 2017, 2018).

La grande majorité de ces études ont été conduites sur des orchidées terrestres de régions tempérées, parfois tropicales, et l'on a encore très peu d'informations sur le statut trophique et la dépendance mycorhizienne des espèces tropicales épiphytes, qui représentent pourtant la majeure partie de la diversité au sein de la famille. En particulier, aucun exemple d'orchidée épiphyte MxH n'a à ce jour été décrit, alors même que de nombreuses espèces épiphytes poussent sur les parties basses des troncs sous la canopée dense des forêts tropicales.

2.3. Origines évolutives des mycorhizes d'orchidées

2.3.1. De la symbiose ancestrale jusqu'aux évolutions récentes

Toutes les espèces d'orchidées étudiées forment des symbioses avec des Dikaryas, appartenant essentiellement aux familles de rhizoctonias dans les Basidiomycètes (Dearnaley *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2021). Certaines études ont révélé la présence de champignons du groupe des Glomeromycotina ou des Mucoromycotina dans certaines racines d'orchidées terrestres (Abadie *et al.*, 2006; May *et al.*, 2020; Perez-Lamarque *et al.*, 2022) ou épiphytes (Cevallos *et al.*, 2018; Novotná *et al.*, 2018), mais leur très faible fréquence et abondance indique probablement une colonisation endophyte des tissus racinaires. Bien que les amorces utilisées en PCR pour détecter les champignons mycorhiziens d'orchidées ne permettent souvent pas de cibler ces champignons endomycorhiziens arbusculaires, ceux-ci n'ont jamais été observés au sein de structures mycorhiziennes chez une espèce d'orchidée (Selosse *et al.*, 2022). Ainsi, malgré le faible nombre de fossiles d'orchidées décrits à ce jour (et aucune racine fossilisée connue ; Strullu-Derrien *et al.*, 2018), la symbiose des orchidées avec des rhizoctonias est perçue comme ancestrale du fait de la présence de ces champignons dans les lignées les plus basales de cette famille (Dearnaley *et al.*, 2012).

Il existe au moins deux arguments favorables à l'acquisition d'une symbiose ancestrale avec des rhizoctonias. Premièrement, ceux-ci constituent la majeure partie des partenaires fongiques d'orchidées au sein de la famille (Dearnaley *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2021) et les associations à des champignons mycorhiziens non-rhizoctonias résultent souvent d'histoires évolutives récentes (Těšitelová *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2021). Deuxièmement, les espèces appartenant aux deux genres formant la sous-famille des Apostasioideae (*i.e.*, *Apostasia* et *Neuwiedia*), sous-famille ayant divergé le plus précocement dans l'histoire évolutive des Orchidaceae (Givnish *et al.*, 2015), sont associées respectivement à des Ceratobasidiaceae et Botryobasidiaceae (également dans les Cantharellales) ou à des Ceratobasidiaceae et Tulasnellaceae (Kristiansen *et al.*, 2004 ; Yukawa *et al.*, 2009; Suetsugu & Matsubayashi, 2021). Si l'on ne peut exclure une association plus récente des membres de cette sous-famille à ces groupes fongiques, une récente étude basée sur une reconstruction des traits ancestraux semble également indiquer l'existence d'un état mycorhizien ancestral « rhizoctonias » (Wang *et al.*, 2021).

La famille des Orchidaceae est généralement placée à la base de l'ordre des Asparagales (APG IV, 2016) dont les autres familles forment des symbioses endomycorhiziennes à arbuscules. Cela suggère une transition unique de partenaires mycorhiziens du groupe des Mucoromycota

(incluant les Glomeromycètes) vers celui des rhizoctonias chez l'ancêtre commun des orchidées, il y a plus de 75 Ma (Dearnaley *et al.*, 2012; Givnish *et al.*, 2015). Les ancêtres communs aux trois familles de rhizoctonias semblent avoir vécu il y a environ 260-280 Ma (Miyachi *et al.*, 2020), mais les âges de début de diversification de ces groupes sont bien plus récents (env. 70-80 Ma au sein des Ceratobasidiaceae ; Miyachi *et al.*, 2020 ; env. 60-70 Ma au sein des Serendipitaceae ; Garnica *et al.*, 2016) et pourraient correspondre à celui du début de la diversification au sein de la famille des Orchidaceae. Néanmoins, ces estimations se basent sur un nombre très réduit de génomes de rhizoctonias, et de futurs travaux seront nécessaires pour éclaircir les relations entre les diversifications des orchidées et de celles de leurs partenaires fongiques. L'association à des groupes de Basidio- et Ascomycètes non-rhizoctonias, plus tardive, s'est ensuite très probablement faite de manière multiple au cours de l'évolution des orchidées, entraînant de multiples transitions de l'autotrophie vers la mixotrophie ou la mycohétérotrophie (Jacquemyn & Merckx, 2019; Wang *et al.*, 2021).

2.3.2. Les origines de cette évolution : de l'endophytisme vers la symbiose mycorhizienne ?

La fréquence des transitions évolutives du régime autotrophe vers des régimes MxH ou MH chez les orchidées (> 17 événements de transition ; Wang *et al.*, 2021) a de quoi surprendre. Celles-ci ont été très probablement facilitées par l'association entre certaines espèces d'orchidées et des espèces fongiques ectomycorhiziennes ou saprotrophes. Des indices sur les origines évolutives de ces associations récentes pourraient se trouver dans l'écologie particulière de ces champignons : ceux-ci sont très fréquemment retrouvés comme endophytes de tissus de plantes, notamment dans les racines. La présence fréquente de ces champignons endophytes dans les racines des orchidées (Selosse *et al.*, 2022, et références citées) pourrait en effet avoir conduit, au cours de l'évolution, à une émergence répétée d'associations mycorhiziennes nouvelles et à la mise en place d'échanges trophiques entre les partenaires. Ce scénario évolutif porte le nom d'« hypothèse de la salle d'attente », ou plutôt en anglais, de la *waiting room hypothesis* (WRH ; Selosse & Roy, 2009; Selosse *et al.*, 2022).

Les rhizoctonias sont également fréquemment retrouvés comme endophytes de plantes non-orchidées (Veldre *et al.*, 2013; Weiß *et al.*, 2016b; Selosse *et al.*, 2022), y compris en étant également mycorhiziens d'orchidées voisines (Girlanda *et al.*, 2011). Cela suggère deux choses : premièrement, il est probable que la mise en place de la symbiose mycorhizienne ancestrale des orchidées avec des rhizoctonias résulte elle-même d'un mécanisme de type WRH (Selosse *et al.*, 2022). Deuxièmement, ces rhizoctonias également endophytes de plantes voisines pourraient favoriser les échanges de nutriments entre plantes orchidées et non-orchidées (Selosse & Martos,

2014), ou également favoriser la persistance des champignons mycorhiziens d'orchidées dans l'environnement (une hypothèse cependant non confirmée par [Calevo et al., 2021](#)).

2.4. Les orchidées et leurs champignons mycorhiziens : des associations symbiotiques ?

Une symbiose, dans son sens francophone, est définie comme une interaction à bénéfices réciproques entre deux partenaires. Dans le cadre de la symbiose mycorhizienne, la plante fournit au champignon des sucres issues de la photosynthèse, tandis que le champignon fournit en retour de l'eau et divers nutriments. Toutefois, la symbiose reste avant tout un équilibre dynamique, tant sur le plan évolutif que physiologique, et les bénéfices pour les partenaires peuvent varier selon les conditions du milieu. Par exemple, des plantes habituellement mycorhizées et cultivées en milieu riche (où les nutriments ne sont pas limitants dans le sol) ne forment pas de symbiose mycorhizienne car celle-ci devient alors coûteuse pour elles ([Lilleskov et al., 2002](#); [Treseder, 2004](#)). Chez les orchidées, la teneur en phosphate du sol a également été négativement corrélée au taux de colonisation mycorhizienne chez l'orchidée *Bipinnula fimbriata* ([Mujica et al., 2020](#)). De manière générale, la qualité du sol ainsi que sa diversité microbienne influencent tous deux la réponse des plantes à l'inoculation de partenaires mycorhiziens ([Hoeksema et al., 2010](#)). De plus, les mécanismes de mise en place et de maintien de la symbiose sont finement régulés, et chaque organisme contrôle au moins en partie son partenaire symbiotique (voir 1.2.3). Les éventuels tricheurs (par exemple des champignons recevant du carbone sans rien fournir en retour) sont généralement sanctionnés par les hôtes (ex : [Kiers et al., 2011](#); [Van Der Heijden et al., 2015](#) ; et références associées). Si ce constat est valable pour l'ensemble des associations symbiotiques (voir par exemple : [Kiers et al., 2003](#)), le cas des associations mycorhiziennes d'orchidées continue de diviser au sein de la communauté scientifique.

Comme nous l'avons vu au chapitre 2.2.3, la nature des échanges trophiques entre les orchidées et leurs champignons mycorhiziens n'a été élucidée que récemment et sur un nombre réduit d'espèces ([Cameron et al., 2006, 2008](#); [Látalová & Baláž, 2010](#)). En particulier, on en sait très peu sur les échanges ayant lieu au sein des mycorhizes d'orchidées épiphytes en régions tropicales. Celles-ci développent généralement la photosynthèse plus tôt dans le protocorme, et leur dépendance vis-à-vis des champignons peut ainsi être questionnée. Ainsi, les conséquences même de la symbiose pour les deux partenaires restent floues.

En effet, les orchidées ont souvent été vues comme adoptant une stratégie de type « *take now, pay latter* » (littéralement : « prend maintenant, paye plus tard »), c'est-à-dire que si l'association semble plutôt profiter à l'orchidée lorsque celle-ci est jeune, le transfert de carbone de la plante

vers ses champignons mycorhiziens au stade adulte rétablit le caractère mutualiste de l'association. Pourtant, certaines orchidées adultes continuent d'exploiter leurs champignons (*i.e.*, espèces MH ou MxH), et les orchidées ont souvent été considérées comme parasitant leurs partenaires fongiques. Cette vision a d'ailleurs été entretenue par le fait que les pelotons sont régulièrement lysés et digérés par la plante (ou « phagocytés », selon le terme introduit par N. Bernard ; [Selosse et al., 2011](#)), suggérant un contrôle exercé par cette dernière sur les champignons de ses racines. En outre, le bénéfice de la symbiose sur la valeur sélective des champignons mycorhiziens d'orchidées est difficilement mesurable, notamment car ces derniers ne fructifient pas ou très peu ([Dearnaley et al., 2012](#)).

Pourtant, d'autres bénéfices pour les deux partenaires pourraient entrer en jeu, comme le transfert de vitamines des orchidées MH vers leurs partenaires mycorhiziens ([Selosse & Roy, 2009](#)) ou encore la protection des hyphes fongiques dans les racines de leur hôte ([Calevo et al., 2021](#)). En milieu épiphyte, il a été suggéré que les conditions stressantes du milieu (voir **Encadré 2**), ainsi que l'acquisition plus précoce de la photosynthèse par les orchidées, pourraient favoriser une relation mutualiste, bénéfique à chaque partenaire ([Leake & Cameron, 2012](#)).

S'il semble difficile d'appréhender les conséquences de la symbiose mycorhizienne sur les orchidées et leurs champignons à l'échelle des organismes, prenons à présent un peu de recul et intéressons-nous aux conséquences de cette association à une échelle plus globale : celle des écosystèmes.

III. Approche écologique des symbioses mycorhiziennes d'orchidées

3.1. Spécificité des symbioses mycorhiziennes d'orchidées

3.1.1. Une spécificité variable entre espèces et au cours des stades de développement

On considère généralement la symbiose mycorhizienne d'orchidées comme plus spécifique que les autres symbioses mycorhiziennes (Dearnaley *et al.*, 2012; Van Der Heijden *et al.*, 2015; Pölme *et al.*, 2018). Néanmoins, étant donné le nombre d'espèces d'orchidées identifiées dans le monde (~ 28 000 ; Christenhusz & Byng, 2016), toute tentative de généralisation semble illusoire. Certaines études suggèrent des taux de spécificité variables selon, par exemple, le mode de vie des espèces d'orchidées (terrestre *versus* épiphyte ; Xing *et al.*, 2019) ou leur aire géographique (incidence d'espèces spécifiques plus élevée en Australie comparée aux autres continents ; Phillips *et al.*, 2011; Davis *et al.*, 2015; Jacquemyn *et al.*, 2017a), mais les patrons observés varient en réalité beaucoup selon les espèces (ou assemblages d'espèces) considérées (ex : Swarts *et al.*, 2010, voir aussi Li *et al.*, 2021b).

En Asie par exemple, l'orchidée épiphyte *Taeniophyllum glandulosum* semble s'associer spécifiquement à la famille des Ceratobasidiaceae, au sein de laquelle elle montre une très nette préférence pour un seul OTU (*Operational taxonomic unit*), et ce quel que soit la période, le site d'échantillonnage, ou le stade de développement de la plante (Rammitsu *et al.*, 2019). À l'inverse, certaines espèces semblent plus opportunistes dans leurs associations (Herrera *et al.*, 2019), comme l'orchidée terrestre australienne *Microtis media* (Bonnardeaux *et al.*, 2007) ou l'orchidée mycohétérotrophe (MH) à distribution Eurasiatique *Epipogium aphyllum* (Roy *et al.*, 2009).

En outre, les patrons de spécificité mycorhizienne peuvent varier en fonction des stades du cycle de vie des espèces d'orchidées (Figure 9 ; Li *et al.*, 2021b). Dans une méta-analyse récente, Ventre Lespiaucq *et al.*, (2021) ont mis en évidence une forte variabilité des patrons d'évolution de la spécificité mycorhizienne des orchidées au cours de leur développement : dans la majorité des cas, la composition fongique des plantules et des plantes adultes était différente, mais celle-ci était associée aussi bien à des gains qu'à des pertes de partenaires fongiques entre ces deux stades, selon les études considérées.

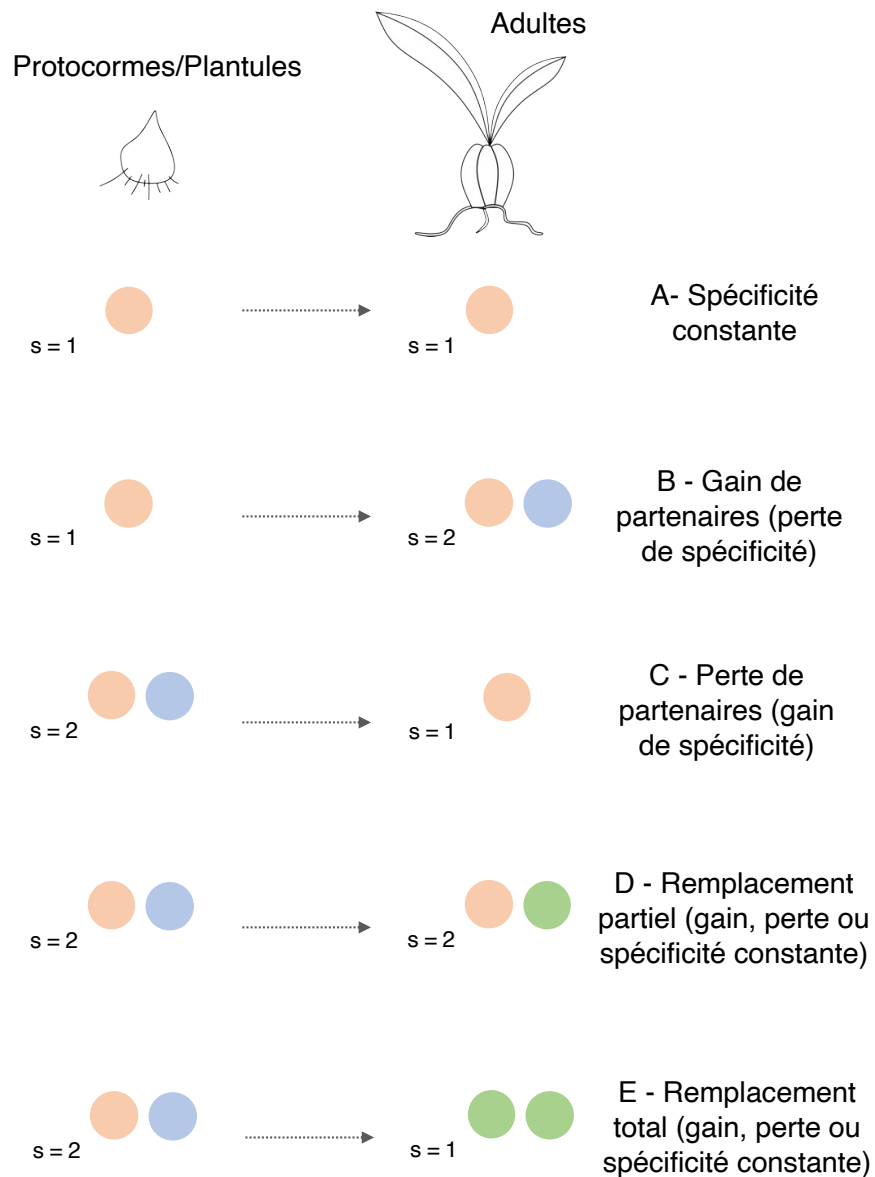


Figure 9 Évolution qualitative des communautés mycorhiziennes au cours du développement des orchidées. Cinq cas de figures sont représentés ici. Chaque cercle correspond à un partenaire mycorhizien, identifié par sa couleur. S ; diversité mycorhizienne. Pour une considération de l'évolution des partenaires mycorhiziens en termes de richesse, voir [Ventre-Lespiaucq et al., 2021](#).

Certaines espèces d'orchidées montrent une forte spécificité mycorhizienne aux stades germinatifs, mais s'associent ensuite soit avec davantage de partenaires (incluant ceux déjà présents ; ex : [Bayman et al., 2016](#); [McCormick et al., 2021](#)), soit avec des partenaires différents (ex : [Meng et al., 2019b](#) ; pour une germination peu spécifique, voir aussi [Chen et al., 2019](#)). Dans chacun de ces cas, un changement de spécificité mycorhizienne au cours des stades ontogéniques et observé à l'échelle de l'espèce d'orchidée se traduit également par une modification des

communautés mycorhiziennes à l'échelle des individus. Certaines espèces d'orchidées à l'inverse, semblent capables de germer avec de nombreux champignons, mais peu d'individus atteignent l'âge adulte (ex : Meng *et al.*, 2019a). Dans ce deuxième cas, un éventuel changement de spécificité mycorhizienne se traduit alors à l'échelle de la population et non à l'échelle de l'individu, puisqu'une partie des stades germinatifs n'atteignent pas le stade adulte (Figure 10).

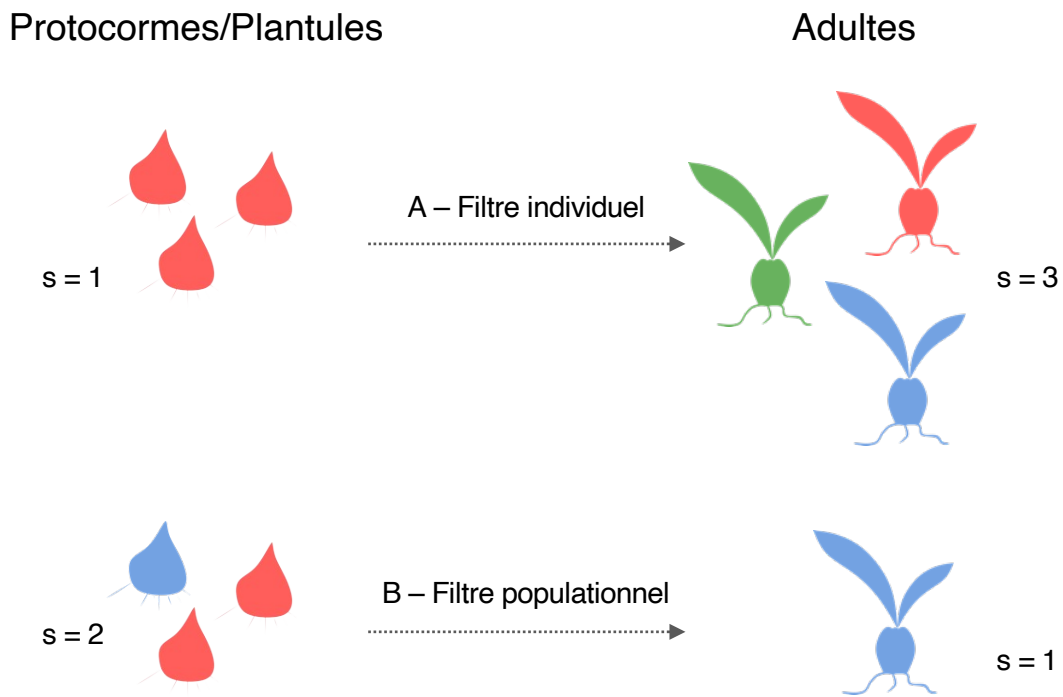


Figure 10 Évolution de la spécificité mycorhizienne à l'échelle des individus *versus* à l'échelle de la population. L'identité des partenaires mycorhiziens des orchidées est donnée par la couleur des protocormes/adultes. s ; diversité mycorhizienne à l'échelle de la population.

Ainsi, lors d'analyses des communautés mycorhiziennes d'orchidées *in situ*, l'interprétation des communautés fongiques associées aux protocormes reste délicate car les communautés observées peuvent ne pas être favorables à une croissance ultérieure de la plante. Dans ce cas, des tests de germinations *in vitro* sont nécessaires afin de valider, ou non, l'importance biologique des partenaires mycorhiziens identifiés (Meng *et al.*, 2019a). Une approche synchrone peut également être mise en place, consistant à évaluer *in situ* les cortèges fongiques liés à différentes plantes d'une même population ayant des stades de croissance plus ou moins avancés (voir par exemple **Article III**).

3.1.2. Spécificité mycorhizienne : une variabilité pas si contradictoire ?

Dans une récente analyse de la spécificité mycorhizienne d'espèces de la sous-famille des Cypripedioideae, [Shefferson et al., \(2019\)](#) tentent de réconcilier les différents modèles de spécificité précédemment décrits, et introduisent la notion de « généralisme apparent ». Dans ce modèle, les espèces d'orchidées sont souvent spécifiques d'un ou de quelques champignons mycorhiziens dominants, mais s'associent également, de manière plus opportuniste, à d'autres champignons phylogénétiquement éloignés les uns des autres. Pour la plante, l'association à certains champignons abondants ([McCormick et al., 2016](#)) ou plus performants assure une croissance optimale, mais l'association à d'autres champignons peu abondants ou moins performants lui permet également d'élargir sa niche trophique et sa résistance aux variations environnementales, lui permettant éventuellement d'étendre sa distribution ([Swarts et al., 2010](#); [Shefferson et al., 2019](#)).

De plus, la notion de « généralisme apparent », bien que *a priori* non applicable dans certains cas (e.g., [Phillips et al., 2011](#); [Rammitsu et al., 2019](#)), permet de mieux rendre compte de l'augmentation du pouvoir de détection des champignons mycorhiziens dans les racines d'orchidées par l'utilisation des nouvelles méthodes de séquençage à haut-débit (NGS, *New Generation Sequencing*). En effet, ces méthodes permettent la détection de communautés mycorhiziennes bien plus riches que les techniques de culture de champignons (voir par exemple **Article III** de ce manuscrit) ou de clonage ([Martos et al., 2012](#)) mais une partie des OTUs détectées pourraient en réalité avoir une importance écologique mineure pour la plante ([Pöhlme et al., 2018](#)). Ainsi, cette notion permet par exemple de différencier une orchidée véritablement généraliste (i.e., *true generalism sensu* [Shefferson et al., 2019](#)) capable de germer, grandir et survivre avec une large gamme de partenaires, d'une orchidée associée à de multiples champignons de l'environnement mais dépendante en réalité d'une ou de quelques espèces pour germer et assurer l'essentiel de sa nutrition.

3.1.3. Déterminismes et conséquences de la spécificité mycorhizienne des orchidées

D'une manière plus générale, le ou les déterminismes de ces patrons de spécificité mycorhizienne et de leur variabilité restent encore inconnus : les orchidées sélectionnent-elles leurs partenaires dans l'environnement, ou s'associent-elles avec ceux disponibles à un endroit donné ?

À l'échelle des écosystèmes, la spécificité mycorhizienne de certaines orchidées pourrait contraindre leur distribution spatiale, du fait par exemple d'une distribution réduite, ou limitée à certains habitats, des partenaires mycorhiziens ([Swarts et al., 2010](#)). A l'inverse, des espèces

d'orchidées peu spécifiques ne devraient théoriquement pas être limitées par la distribution de leurs partenaires fongiques. Pourtant, il ne semble pas exister de lien clair entre rareté et spécificité mycorhizienne d'une espèce d'orchidée (Phillips *et al.*, 2011; McCormick & Jacquemyn, 2014) et l'on en sait encore peu sur l'influence possible des champignons mycorhiziens sur la distribution spatiale des orchidées, et inversement.

En outre, les patrons de spécificité mycorhizienne des orchidées pourraient façonner la manière dont différentes espèces partagent des partenaires mycorhiziens, induisant de véritables réseaux d'interactions entre plantes et champignons (ex : Jacquemyn *et al.*, 2011; Herrera *et al.*, 2018). Dans la suite de ce chapitre, nous nous intéresserons successivement aux contraintes réciproques des deux partenaires sur leurs distributions spatiales respectives (partie 3.2), puis à la mise en réseaux de ces interactions plantes-champignons mycorhiziens (partie 3.3).

3.2. Contraintes réciproques sur la distribution spatiale des partenaires

3.2.1. Le mystère de la distribution spatiale des orchidées

Si les orchidées forment probablement la famille de plantes la plus diversifiée sur Terre (Christenhusz & Byng, 2016), la plupart des espèces sont rares, présentes sur une aire de distribution limitée, et sont souvent menacées dans leurs habitats naturels. La distribution d'une espèce peut être notamment affectée par sa capacité à se disperser (production et acheminement des graines viables vers un site donné ; contrainte dispersive) ou à tolérer une certaine gamme de conditions environnementales (germination des graines et croissance des individus sur un site donné ; contrainte de l'habitat ; Münzbergová & Herben, 2005).

Les orchidées présentent un système de dispersion *a priori* très efficace puisqu'une fois fécondées, les fleurs se transforment en capsules libérant des milliers (et jusqu'à plusieurs millions !) de graines microscopiques, disséminées par le vent sur des distances pouvant atteindre plusieurs milliers de kilomètres (Close *et al.*, 1978; Arditti & Ghani, 2000). Charles Darwin, le premier, s'étonnait de la contradiction apparente entre la capacité de production des graines d'orchidées, et leur pourtant relative rareté dans les habitats (Darwin, 1862). Il observa ainsi que l'orchidée *Orchis (Dactylorhiza) maculata* pouvait produire jusqu'à 6 200 graines par capsule. A raison d'une production annuelle de > 30 capsules par plante, il calcula qu'un seul individu pouvait produire jusqu'à 186 300 graines. En extrapolant ce résultat à plusieurs générations successives d'orchidées produisant un nombre similaire de graines, il calcula qu'en seulement trois générations, les descendants d'une seule plante d'*O. maculata* recouvrirait la surface totale

des terres émergées du globe³ (Darwin, 1862). Ce n'est donc pas la quantité de graines produites qui semble limiter la dispersion des orchidées.

Comme nous l'avons vu précédemment, ces graines sont dépourvues de réserves et nécessitent la présence d'un champignon pour germer. Cette germination symbiotique pourrait représenter une contrainte pour l'implantation de la plante, puisque l'absence de champignon compatible condamne la graine à ne pas germer. McCormick & Jacquemyn (2014) se sont intéressés aux contraintes limitant la distribution spatiale des orchidées, notamment en étudiant le rôle des partenaires mycorhiziens. Les résultats, illustrés ci-dessous, pointent vers des contraintes différentielles à l'échelle locale (un même habitat, considéré comme homogène) ou à l'échelle régionale (une mosaïque d'habitats, hétérogène Münzbergová & Herben, 2005).

3.2.2. Distribution spatiale des orchidées terrestres à l'échelle régionale

Une première étude de la répartition mondiale des principales familles mycorhiziennes (*i.e.*, les rhizoctonias ; Dearnaley *et al.*, 2012) a révélé leur présence dans la plupart des habitats du globe étudiés, suggérant que l'absence d'une famille n'était pas une contrainte à l'implantation des orchidées à très large échelle (Jacquemyn *et al.*, 2017a ; pour l'Asie, voir par exemple : Xing *et al.*, 2019).

D'autre part, l'étude des cortèges mycorhiziens associés à diverses espèces d'orchidées a révélé la très large distribution de nombreux champignons mycorhiziens (Swarts *et al.*, 2010; Jacquemyn *et al.*, 2011; Phillips *et al.*, 2011; Duffy *et al.*, 2019; Xing *et al.*, 2020a) suggérant là encore que ceux-ci n'étaient probablement pas limitants pour l'implantation de leur hôte. Les expériences de transplantation de graines de sites colonisés par des plantes adultes vers des sites non colonisés (mais néanmoins adaptés aux exigences écologiques des espèces d'orchidées étudiées) semblent d'ailleurs confirmer la présence de ces champignons sur des sites où les orchidées sont absentes (McCormick & Jacquemyn, 2014).

Une partie des études précédentes ont par ailleurs été menées sur des orchidées rares et spécifiques de quelques champignons mycorhiziens. S'il ne semble pas exister de lien clair entre spécificité mycorhizienne et rareté des espèces d'orchidées (Jacquemyn *et al.*, 2012b; McCormick & Jacquemyn, 2014), plusieurs grands cas de figures peuvent en réalité être rencontrés (Tableau 1). Swarts *et al.*, (2010) suggèrent par exemple que la rareté de l'espèce *C. huegelii*, une orchidée terrestre du Sud-Ouest de l'Australie peut être expliquée par sa spécificité vis-à-vis d'un champignon mycorhizien rare. A l'inverse, *D. elastica*, une autre espèce poussant sur le même

³ Ce calcul théorique ne prend bien évidemment pas en compte la capacité de germination des graines. De nombreuses espèces d'orchidées sont auto-compatibles, et une part non négligeable de leurs graines ne sont pas pourvues d'embryon viable.

territoire, est rare et spécifique d'un seul champignon mycorhizien pourtant largement répandu sur le territoire (Phillips *et al.*, 2011). Cet exemple montre que les champignons mycorhiziens ne suffisent pas toujours à expliquer la distribution spatiale de leurs plantes hôtes. D'autres facteurs comme le régime de reproduction, les pollinisateurs, ou la préférence pour certains facteurs abiotiques, peuvent alors intervenir (Phillips *et al.*, 2011).

Tableau 1. Combinaisons possibles entre spécificité mycorhizienne (Spécificité), fréquence de la plante hôte (Orchidée) ou du/des partenaire(s) mycorhizien(s) (Myc.). R, distribution restreinte géographiquement.

Orchidée	Spécificité	Myc.	Exemple	Référence
Rare	Forte	Rare (+ R)	<i>Caladenia huegelii</i>	Swarts <i>et al.</i> , 2010
Rare	Forte	Commun	<i>Drakea elastica</i>	Phillips <i>et al.</i> , 2011
Rare	Faible	Commun	<i>Liparis loeselii</i> var. <i>ovata</i>	Waud <i>et al.</i> , 2017
Commune (R)	Forte	Commun (R)	<i>Caladenia arenicola</i>	Swarts <i>et al.</i> , 2010
Commune	Forte	Commun	<i>Drakea glyptodon</i>	Phillips <i>et al.</i> , 2011
Commune	Faible	Commun	<i>Caladenia flava</i>	Swarts <i>et al.</i> , 2010

En conclusion, la contrainte à la distribution des orchidées à l'échelle régionale semble peu dépendante des champignons mycorhiziens et pourrait plutôt être dispersive (*sensu* Münzbergová & Herben, 2005), ou liée à d'autres facteurs environnementaux comme l'humidité ou le pH des sols (McCormick & Jacquemyn, 2014).

3.2.3. Distribution spatiale des orchidées terrestres à l'échelle locale

Une succession de travaux menés dès le début des années 2000 par Jacquemyn *et al.*, a permis de mieux comprendre la structure et la dynamique spatiale des communautés d'orchidées terrestres des prairies et pelouses tempérées et méditerranéennes d'Europe. Dans une première étude menée en Belgique, Jacquemyn *et al.*, (2007) ont mis en évidence la structure spatiale agrégée des plants d'*Orchis purpurea* à l'échelle de la prairie, ceux-ci formant des patches de quelques mètres de diamètres regroupant la plupart des individus. Ce constat, confirmé ensuite chez d'autres espèces d'orchidées terrestres (Jacquemyn *et al.*, 2012a) est issu de la dynamique suivante : les nouvelles graines germent généralement proches des adultes, à l'intérieur des patches, favorisant ainsi une structure agrégée des populations d'orchidées terrestres de milieu ouvert (Figure 11 ; Diez, 2007; Jacquemyn *et al.*, 2007, 2012a).

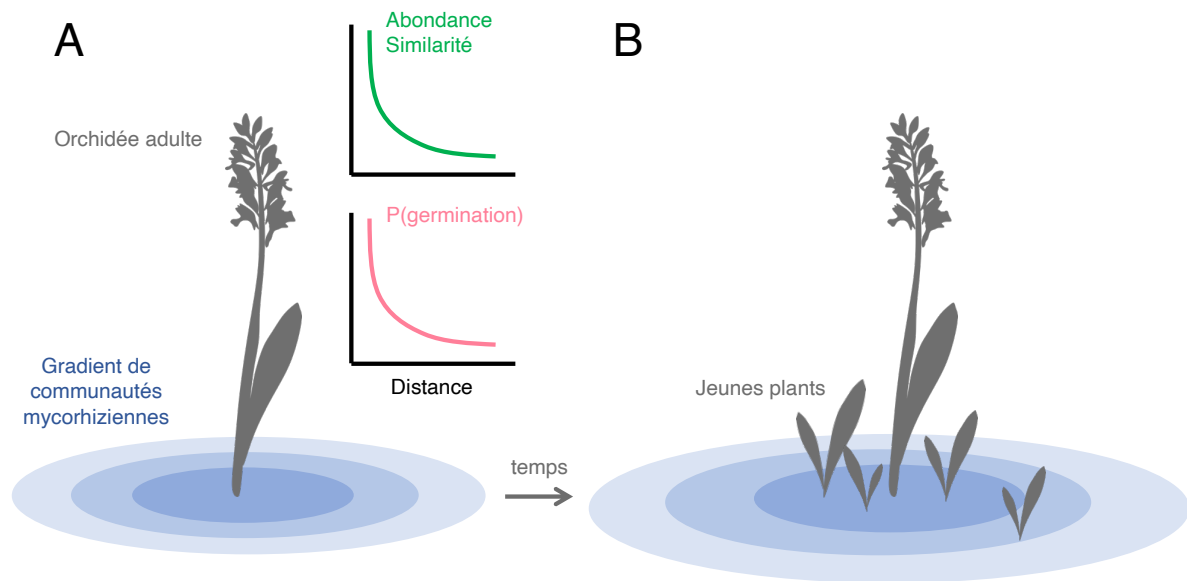


Figure 11 Dynamique d'une population d'orchidées terrestres en prairie tempérée. (A) Les communautés mycorhiziennes (en bleu) sont localisées à proximité des plantes adultes. La probabilité de germination des graines est d'autant plus élevée que la richesse fongique en champignons mycorhiziens compatibles est élevée. (B) Cela conduit à la germination de jeunes plants à proximité des adultes, entraînant une structure agrégée des populations d'orchidées à l'échelle de la prairie.

Plusieurs facteurs peuvent expliquer cette structure, comme les propriétés du sol sur des microsites particuliers (Diez, 2007) ou encore la prévalence des champignons mycorhiziens à proximité des adultes, favorisant la germination des graines. En étudiant la distribution spatiale des champignons mycorhiziens de ces orchidées de prairies, Jacquemyn *et al.*, (2012a) et Waud *et al.*, (2016a,b) ont montré que les champignons mycorhiziens des plantes adultes étaient localisés de manière préférentielle à proximité de ceux-ci, favorisant ainsi la germination des graines d'orchidées. Plus que la présence de champignons mycorhiziens compatibles, c'est leur abondance dans le sol qui semble déterminante pour assurer un réel succès germinatif des graines (McCormick *et al.*, 2016, 2018). Des résultats similaires ont été obtenus en milieu forestier (ex : Mckendrick *et al.*, 2002; McCormick *et al.*, 2021), montrant l'importance des champignons mycorhiziens dans la distribution spatiale des orchidées terrestres à des échelles locales (McCormick & Jacquemyn, 2014).

D'autres travaux ont révélé l'existence d'une structure spatiale agrégée des champignons mycorhiziens d'orchidées dans le sol (ex : Voyron *et al.*, 2017 ; et dans une moindre mesure : Oja *et al.*, 2016). Cette distribution agrégée, donc hétérogène, des champignons mycorhiziens pourrait donc bien contraindre celle de leur hôte à échelle locale. De plus, des distributions agrégées de partenaires fongiques spécifiques d'espèces d'orchidées différentes pourraient expliquer la coexistence de ces dernières à faible échelle (de l'ordre de quelques mètres ;

McCormick & Jacquemyn, 2014). En effet, d'après la théorie de ségrégation des niches écologiques (ou exclusion compétitive), deux espèces qui coexistent de manière stable doivent exploiter deux niches écologiques différentes. Ces niches écologiques peuvent être d'ordre abiotique (ex : exploitation directe de différentes ressources dans le sol), biotique (ex : association à des champignons mycorhiziens différents), ou les deux. Il a ainsi été suggéré que la coexistence d'espèces d'orchidées dans des prairies pouvait être en partie expliquée par l'association à des champignons mycorhiziens différents (Jacquemyn *et al.*, 2012a, 2014 ; voir aussi Waterman *et al.*, 2011, pour un parallèle avec les pollinisateurs d'orchidées). Par exemple, dans l'étude menée par Jacquemyn *et al.*, (2012a) les trois espèces d'orchidées terrestres étudiées (*Anacamptis morio*, *Gymnadenia conopsea* et *Orchis mascula*) présentaient, sur un même site (40 x 70 m) des distributions spatiales bien distinctes, et étaient associées à des communautés mycorhiziennes distinctes également. Toutefois, les espèces *A. morio* et *G. conopsea* partageaient tout de même un OTU appartenant aux Tulasnellaceae, suggérant que les partenaires mycorhiziens ne sont pas les seuls facteurs déterminant la distribution spatiale des orchidées. De fait, on ignore encore actuellement si la ségrégation des espèces d'orchidées peut s'expliquer par une compétition pour ou entre les champignons mycorhiziens, et donc indirectement pour l'accès aux nutriments du sol, ou si elle repose sur une adaptation de la plante, et/ou des champignons, à certains microhabitats du sol (McCormick & Jacquemyn, 2014).

3.2.4. Distribution spatiale des orchidées épiphytes

Comme nous venons de le voir, la grande majorité des travaux portant sur la distribution spatiale des orchidées et de leurs champignons mycorhiziens ont été menés sur des espèces terrestres, essentiellement de prairies. En effet, la distribution spatiale des champignons mycorhiziens sur les écorces n'a été étudiée que très récemment laissant suggérer une structure agrégée des communautés fongiques sur l'écorce (Cook *et al.*, 2022 ; et **Article I** de ce manuscrit), ou une distribution préférentielle de certains champignons dans des microsites (ex : présence d'humus) à la surface des arbres (Izuddin *et al.*, 2019; Zarza *et al.*, 2022).

En particulier, aucun lien précis entre communautés fongiques et distribution des orchidées sur l'écorce n'avait été établi avant le début de cette thèse. Pourtant, les orchidées épiphytes présentent souvent des structures agrégées à l'échelle d'un arbre hôte (Hietz & Hietz-Seifert, 1995; Zotz & Schultz, 2008) et certaines espèces présentent une structure génétique à des échelles fines (exemple : < 0.5m ; Trapnell *et al.*, 2004), suggérant une dissémination et une meilleure germination des graines à proximité des parents. Toutefois, les travaux menés par Kartzinel *et al.*, (2013) et Yang *et al.*, (2017) montrent des taux de germination des graines à proximité des adultes variables selon les espèces considérées. De plus amples travaux sont nécessaires pour confirmer ou infirmer ces résultats, et permettre une meilleure caractérisation des communautés fongiques

d'écorces d'arbres tropicaux, et de leur influence sur la dynamique des orchidées épiphytes. Ces aspects seront abordés plus en détails en fin de manuscrit (partie 9.3).

À une plus large échelle, la distribution des orchidées épiphytes dans une forêt tropicale peut être influencée par la capacité de dispersion des graines (Fan *et al.*, 2020) et par la capacité de ces graines à germer sur les écorces de diverses espèces d'arbres hôtes. Comme les autres espèces épiphytes, les orchidées colonisent de manière assez variable les arbres dans une forêt tropicale (Zotz, 2016). En effet, certaines espèces d'arbres portent très peu ou pas d'épiphytes, en raison par exemple d'une structure ou d'une chimie particulière de l'écorce (Zotz, 2016). À l'inverse, certaines espèces d'arbres apparaissent comme de meilleurs hôtes pour les communautés végétales épiphytes (dont les orchidées) en présence. De plus, certaines espèces d'orchidées montrent des préférences (généralement peu marquées) pour certaines espèces d'arbres épiphytes (Rasmussen & Rasmussen, 2018).

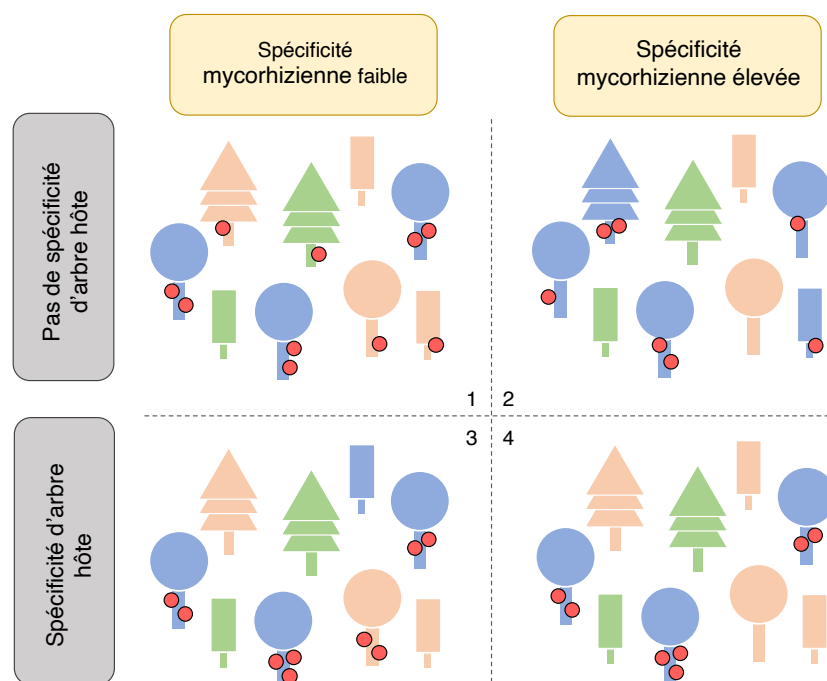


Figure 12 Scénarios de distribution d'une espèce d'orchidée épiphyte (cercles rouges) dans une forêt plurispécifique (3 espèces d'arbres) en fonction de sa spécificité mycorhizienne et de sa préférence d'arbre hôte. L'identité des champignons mycorhiziens colonisant les écorces est donnée par la couleur des arbres. Dans le scénario 1, l'orchidée est distribuée sur plusieurs arbres hôtes dans la forêt, eux-mêmes colonisés par les différents champignons mycorhiziens de l'orchidée. Dans le scénario 2, le champignon mycorhizien de l'orchidée est retrouvé sur différentes espèces d'arbres, autorisant une colonisation non spécifique des arbres malgré une spécificité mycorhizienne marquée. Dans le scénario 3, l'orchidée est spécifique d'une seule espèce d'arbre, mais sa distribution n'est pas expliquée par celle de ses champignons mycorhiziens, suggérant l'existence d'autres mécanismes régissant cette spécificité orchidée-arbre hôte. Dans le scénario 4, la distribution du champignon mycorhizien de l'orchidée sur un seul arbre contraint, au moins en partie, la distribution de cette dernière.

Cependant, cette préférence d'hôte semblent souvent soit issue de biais statistiques (les orchidées coloniseraient d'avantage les arbres abondants et à gros diamètre ; [Wagner & Zotz, 2019](#), et références associées), soit demeurent non-identifiés (ex: [Lancaster, 2004](#)). En particulier, l'influence de la distribution spatiale des champignons mycorhiziens sur la préférence d'hôte des orchidées épiphytes (**Figure 12**) n'a été abordé que très récemment, et sur des cas de préférences peu marquées ([Gowland et al., 2013](#); [Pecoraro et al., 2021](#)).

D'autre part, aucune étude n'a à ce jour étudié la distribution des champignons mycorhiziens entre les écorces d'arbres à large échelle en région tropicale. Certains partenaires mycorhiziens semblent pouvoir coloniser l'écorce d'un nombre important d'arbres hôtes (en extrapolant leur présence sur l'écorce à partir de celle dans les racines d'orchidées, ex : [Rammitsu et al., 2019](#)), mais l'on ignore encore si cette tendance est généralisable à l'ensemble des champignons mycorhiziens d'orchidées épiphytes. Par exemple, des semis de graines *in situ* réalisés par [Yang et al., \(2017\)](#) sur des arbres hôtes ont montré un taux de germination bien supérieur en présence (et à proximité) d'orchidées adultes qu'en l'absence de celles-ci, suggérant une abondance plus faible des partenaires mycorhiziens sur les arbres dépourvues d'orchidées.

3.2.5. Influences réciproques des partenaires sur leur distribution spatiale

Nous avons essentiellement discuté, jusqu'à présent, de la manière dont les champignons mycorhiziens pouvaient influencer la distribution spatiale de leurs hôtes. Cependant, cette approche phyto-centrée occulte un possible effet inverse, c'est-à-dire une influence des plantes sur la distribution spatiale de leurs champignons mycorhiziens. Ceux-ci, connus pour être des champignons saprophytes libres, sont généralement considérés comme ayant une distribution spatiale indépendante de celles de leurs hôtes ([Dearnaley et al., 2012](#)). En effet, des fructifications formées par des rhizoctonias sont retrouvées même en l'absence d'orchidées dans leur voisinage. Pourtant, au sein d'une même famille de rhizoctonias, les champignons associés aux orchidées peuvent être phylogénétiquement distincts de ceux retrouvés fructifiant seuls dans l'environnement, et on en sait en réalité peu sur leur distribution. Plusieurs auteurs ont suggéré une possible influence des orchidées sur la distribution spatiale de leurs symbiotes ([McCormick & Jacquemyn, 2014](#); [Waud et al., 2016a](#); [Li et al., 2021a](#)) mais ceci n'a jamais été démontré. De nombreuses études ont démontré via des semis de graines *in situ* la présence de ces champignons sur des sites non colonisés par des orchidées adultes (ex : [Phillips et al., 2011](#)), mais on ne connaît pas l'influence de l'implantation d'une orchidée adulte sur la dynamique des réseaux mycéliens mycorhiziens associés, ni sur la reproduction et la valeur sélective des champignons concernés. Il est pourtant probable que les champignons soient eux-mêmes favorisés par l'association symbiotique car, malgré de récentes études suggérant un flux de carbone des champignons vers

les orchidées adultes (Gebauer *et al.*, 2016), aucun flux net de C n'a pour l'instant été démontré du champignon vers la plante (voir partie II).

En outre, rechercher un champignon microscopique dans l'environnement équivaut probablement à rechercher une aiguille dans une botte de foin, et les tentatives de détection de ces champignons dans le sol par des approches moléculaires ont rarement été concluantes (Voyron *et al.*, 2017; Egidi *et al.*, 2018), mais voir aussi McCormick *et al.*, 2016). Cela suggère qu'en l'absence de racine à coloniser, les champignons mycorhiziens d'orchidées pourraient avoir une croissance réduite dans le sol.

Dans la suite de ce manuscrit, nous tâcherons d'équilibrer autant que possible la balance entre les points de vue phyto- et myco-centrés en nous intéressant notamment aux conséquences possibles de la symbiose sur les champignons eux-mêmes. Par ailleurs, cette approche sera grandement facilitée par la détection relativement aisée, sur les écorces des arbres, des champignons mycorhiziens d'orchidées épiphytes, en comparaison de ceux associés aux orchidées du sol (Izuddin *et al.*, 2019).

3.3. Réseaux d'interactions orchidées-champignons mycorhiziens

3.3.1. Construction et propriétés des réseaux plantes-champignons

Chaque plante ou espèce de plante interagit avec de nombreux organismes (ex : pollinisateurs, pathogènes, microorganismes etc.) qui eux-mêmes interagissent avec plusieurs plantes ou espèces de plantes. De véritables réseaux d'interactions se mettent ainsi en place, à plusieurs échelles. Les interactions mutualistes des plantes (pollinisateurs, champignons mycorhiziens etc.) sont généralement représentées sous la forme de graphes, ou réseaux bipartites, où chaque plante ou espèce de plante interagit avec un ou plusieurs partenaire(s) mutualiste(s), et inversement (Figure 13A ; Bascompte & Jordano, 2007).

L'étude de la structure des réseaux d'interactions peut fournir des informations clefs sur le déterminisme ou les contraintes des associations mutualistes (par exemple la complémentarité des traits, poids de la phylogénie, etc.), sur le fonctionnement des écosystèmes, leur stabilité ou résilience face aux perturbations (Bascompte & Jordano, 2007; Herrera *et al.*, 2018). De nombreux indices ont été développés pour tenter de caractériser la structure de ces réseaux. Ils peuvent rendre compte de sa complexité (nombre d'interactions, de partenaires moyens etc.) ou de sa structure (emboîtement ou modularité du réseau observé).

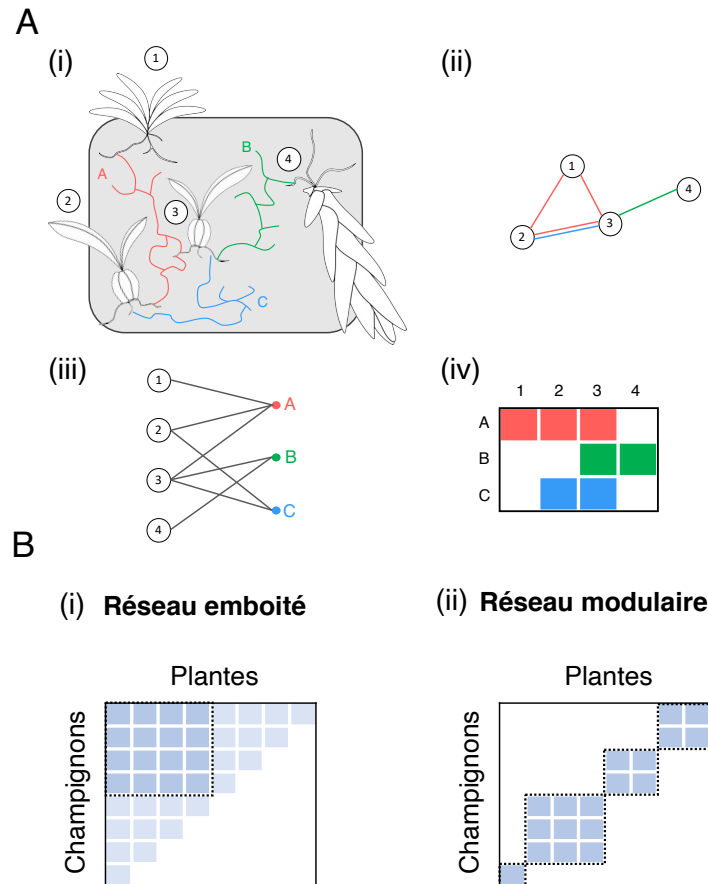


Figure 13 Construction, représentations et structures des réseaux plantes-champignons. (A) Exemple de réseau plantes-champignons (i) et représentations associées en réseau unipartite (ii) et réseaux bipartites (iii-iv). (B) Structures emboîtées (i) ou modulaires (ii) classiquement observées sur les réseaux bipartites ; bleu, présence d'interaction, blanc, absence d'interaction. (i) Une structure emboîtée est associée à la présence d'un *core* d'interactions entre partenaires généralistes, figuré ici par un encadré en pointillés. (ii) Chaque module d'interaction est symbolisé par un encadré en pointillés.

L'emboîtement d'un réseau (on parle de *nestedness* en anglais ; **Figure 13B**) correspond à une situation dans laquelle les espèces spécialistes interagissent avec des sous-ensembles des espèces généralistes, qui elles-mêmes interagissent entre elles (Bascompte & Jordano, 2007). De ce fait, il existe dans ce type de réseaux un noyau de partenaires (aussi appelé « *core* » ; ex : Herrera *et al.*, 2018) qui interagissent entre eux et avec le reste du réseau. Un réseau modulaire, à l'inverse, correspond à une situation où les partenaires forment des sous-groupes (appelés « modules » ou « compartiments ») interagissant plus entre eux qu'avec le reste du réseau (Bascompte & Jordano, 2007).

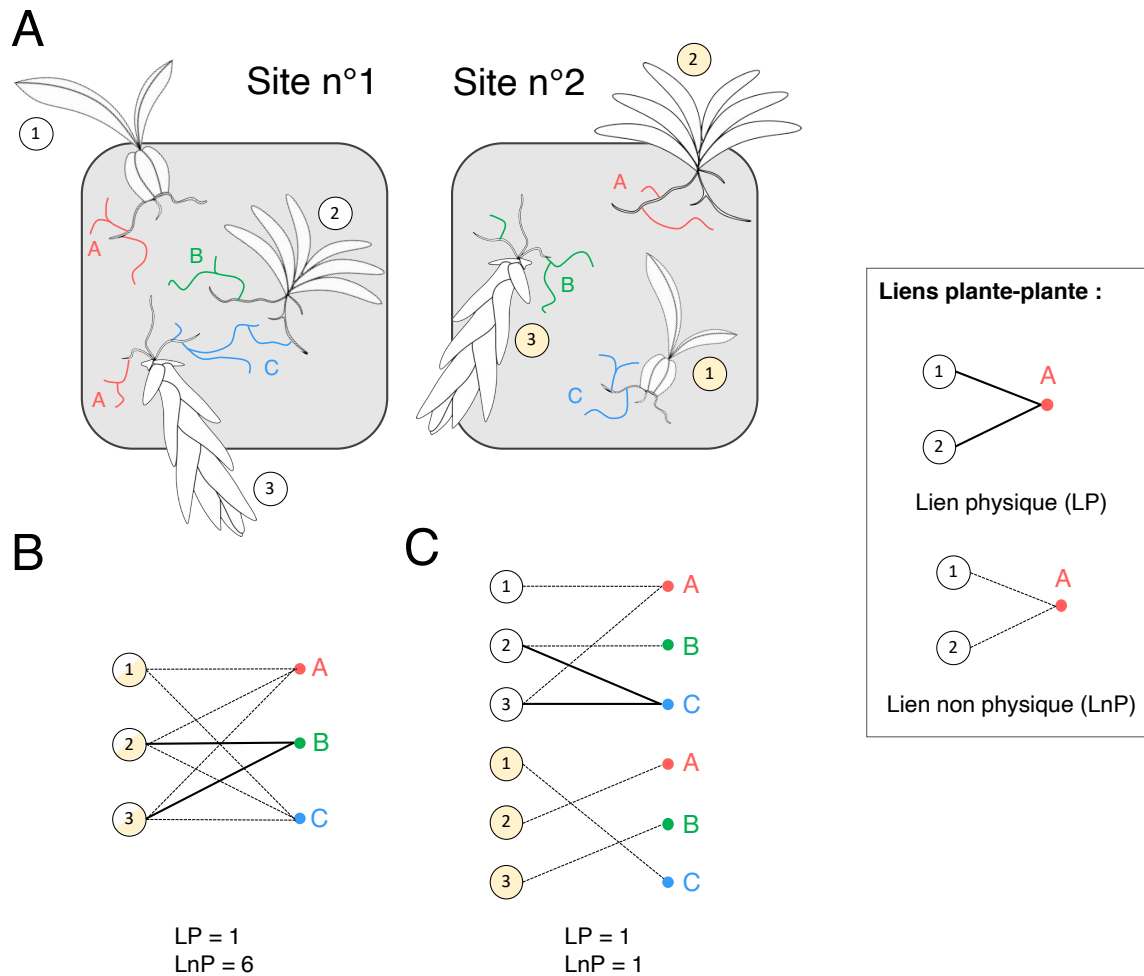


Figure 14 (page suivante) Réseaux écologiques *versus* réseaux physiques. (A) Chaque zone grise délimite une zone géographique (= site) où les interactions plantes-champignons sont mesurées. Trois espèces d'orchidées (numérotés 1 à 3) sont représentées chacune par un individu par site. Trois espèces de champignons mycorrhiziens (nommés A à C) sont indiquées par des couleurs différentes et leurs hyphes sont symbolisés par des traits colorés. (B) Réseau bipartite correspondant, tracé en additionnant les interactions des différents individus appartenant à une même espèce d'orchidée, bien qu'échantillonnés dans différents sites (= réseau écologique). Il comprend un seul lien physique plante-plante (entre deux individus de plantes des espèces 2 et 3) mais 6 liens non physiques. (C) Réseau bipartite correspondant, tracé en considérant chaque individu d'orchidée séparément (=réseau physique). Il comprend un lien physique et un seul lien non physique.

Il existe de multiples manières de construire des réseaux bipartites, et la méthode employée peut avoir une grande influence sur les résultats obtenus (Pölmé *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2021a). Considérons ici deux grands types de réseaux (Figure 14). Les premiers, que l'on peut qualifier de réseaux écologiques, rendent compte d'interactions observées à l'échelle des espèces, les individus échantillonnés ne vivant pas obligatoirement sur un même site. Dans ce cas, une espèce peut interagir avec plusieurs partenaires même si chaque individu est spécifique d'un seul

d'entre eux. Ce type de réseau peut par exemple servir d'outil en biologie de la conservation (ex : [Herrera et al., 2018](#)) ou en évolution. Les réseaux physiques, à l'inverse, rendent compte d'interactions à l'échelle des individus. Dans ce cas, le réseau rend compte de la situation sur un site donné, et chaque chemin emprunté dans le réseau (aussi long soit-il) correspond à une situation biologiquement observable. Dans le cadre des interactions plantes-champignons mycorhiziens, ces réseaux sont appelés des réseaux mycorhiziens communs (*common mycorrhizal networks*, CMNs ; [Simard & Durall, 2004](#); [Van Der Heijden & Horton, 2009](#)). Ces deux approches ont été maintes fois utilisées pour décrire les interactions mycorhiziennes d'orchidées, et nous reviendrons ci-dessous sur les principales tendances observées.

3.3.2. Réseaux écologiques orchidées-champignons mycorhiziens

Dans une récente méta-analyse menée par [Pölme et al., \(2018\)](#), les auteurs ont comparé la structure de 111 réseaux plantes-champignons en comparant notamment les différents types d'interactions mycorhiziennes entre eux. Contrairement à ce qui était suggéré jusque-là, les différents types de réseaux mycorhiziens ne semblent pas différer entre eux dans leurs valeurs d'emboîtement, bien que celles-ci soient beaucoup plus variables chez les orchidées. De plus les symbioses mycorhiziennes d'orchidées, ainsi que celles d'éricacées, semblent adopter une structure généralement plus modulaire que les autres symbioses mycorhiziennes. Cependant, les résultats sont en réalité très variables selon les espèces ou les sites considérés, ou encore selon les méthodes d'échantillonnage employées.

Par exemple, une étude menée par [Martos et al., \(2012\)](#) sur l'ensemble de l'île de La Réunion a permis de mettre en évidence une forte ségrégation des communautés mycorhiziennes entre les orchidées terrestres et épiphytes, entraînant une forte modularité du réseau global à l'échelle de l'île. Une tendance similaire a été obtenue en Asie ([Xing et al., 2019](#)), suggérant que les orchidées terrestres et épiphytes s'associent à des champignons mycorhiziens différents. Dans chaque cas, la ségrégation n'est pas totale et certains champignons colonisent les deux habitats ([Xing et al., 2014](#)), y compris en s'associant à des espèces différentes d'orchidées ([Martos et al., 2012](#); [Xing et al., 2019](#)). Cependant, dans une étude similaire mais conduite sur une échelle spatiale plus réduite en Équateur, [Herrera et al., \(2018\)](#) ont observé un fort partage de partenaires entre orchidées épiphytes et terrestres, entraînant une structure de réseau emboîtée. Ces tendances différentes pourraient ainsi être dues à des communautés d'orchidées différentes, mais aussi à des conditions climatiques ou à des procédures d'échantillonnages différentes ([Herrera et al., 2018](#); [Pölme et al., 2018](#)).

D'une manière plus générale, les tendances observées semblent variables d'un site et d'une étude à l'autre. Par exemple, des structures de réseau emboîtées ont été décrites à la fois en milieu

terrestre (Jacquemyn *et al.*, 2010, 2011), en milieu épiphyte (Martos *et al.*, 2012; Xing *et al.*, 2020b), ou en prenant en compte les deux milieux (Kottke *et al.*, 2013; Herrera *et al.*, 2018; Xing *et al.*, 2019). De même, des réseaux modulaires ont été décrits en milieu terrestre (Jacquemyn *et al.*, 2015, 2016) et chez des communautés d'orchidées terrestres et épiphytes (Martos *et al.*, 2012; Xing *et al.*, 2019).

L'ensemble de ces études a porté sur des réseaux entre espèces d'orchidées, n'incluant pas d'autres familles de plantes. Pourtant, les champignons mycorhiziens d'orchidées sont parfois retrouvés dans les racines d'autres plantes, et des membres des Tulasnellaceae ou Sebaciniales forment par exemple des structures mycorhiziennes chez des hépatiques (Bidartondo *et al.*, 2003; Kottke *et al.*, 2003) ou des Éricacées (Weiß *et al.*, 2016), respectivement. Des travaux menés en Équateur ont révélé une absence de partage de champignons mycorhiziens entre ces différents groupes de plantes à l'échelle de la forêt (Kottke *et al.*, 2008), n'excluant pas toutefois un partage de partenaires fongiques entre espèces spatialement proches. Cette question mériterait davantage d'attention, et nous y reviendrons plus en détails dans le dernier chapitre de ce manuscrit.

3.3.3. Les réseaux mycorhiziens communs : le cas des orchidées

Les réseaux mycorhiziens communs (CMNs ; Simard & Durall, 2004; Van Der Heijden & Horton, 2009) se définissent par le partage de mycélium (appartenant à un/des champignon(s) mycorhizien(s)) entre différents individus de plantes, formant des réseaux d'interactions mycorhiziennes entre ces plantes. Ces dernières peuvent être à des stades de développement plus ou moins avancés, voire appartenir à des espèces différentes. Les CMNs ont été particulièrement étudiés dans le cadre des symbioses ectomycorhiziennes et dans une moindre mesure endomycorhiziennes arbusculaires (Hoeksema, 2015; Liang *et al.*, 2020), mais leurs effets supposés sur l'écologie des peuplements végétaux sont loin de faire l'unanimité au sein de la communauté scientifique (voir **Encadré 3**).

Encadré 3. Les réseaux mycorhiziens communs.

Les symbioses mycorhiziennes sont généralement peu spécifiques à l'échelle des communautés locales. Un même champignon (mycélium) peut interagir de manière symbiotique avec plusieurs plantes de la même espèce voire d'espèces différentes. L'observation de ce phénomène, mis en évidence à partir de séquençages et/ou génotypages des champignons dans les racines des plantes, a rapidement mené à la notion de réseaux mycorhiziens communs (CMNs) : les plantes sont mises en réseaux dans le sol par des filaments fongiques soupçonnés

d'assurer des transferts de nutriments ou d'eau, voire d'informations. Le transfert de sucres provenant de la photosynthèse des arbres vers des plantes mycohétérotrophes a été mis en évidence dès les années 1960 (Björkman, 1960), mais ce n'est que 25 ans plus tard qu'un tel transfert est vérifié entre plantes vertes en pots (Francis & Read, 1984), puis *in situ* (Simard *et al.*, 1997). Des estimations de flux de nutriments via ces réseaux indiquent que jusqu'à 280 kg de carbone pourraient être transférés entre plantes par hectare de forêt et par an (Klein *et al.*, 2016) ! Ces chiffres importants ont longtemps interpellé aussi bien la communauté scientifique (van der Heijden & Horton, 2009) que le grand public, aboutissant à la notion de *wood wide web*, l'internet (sous sa forme mycélienne) du sol.

Cependant, si transfert de matière il y a, les bénéfices pour la croissance ou la survie des plantes sont encore débattus (Selosse *et al.*, 2006; Bever *et al.*, 2010; Hoeksema, 2015). Pourtant, alors que les preuves de flux nets de carbone entre plantes vertes semblent limitées (Bever *et al.*, 2010), de nombreux exemples de flux d'azote, de phosphore ou d'eau ont été mis en évidence, bien que l'implication directe des CMNs soit, dans certains cas, difficile à confirmer (Hoeksema, 2015).

Outre les transferts de nutriments entre plantes via les CMNs, leurs conséquences physiologiques sur celles-ci (survie, croissance) ont été jusqu'ici relativement peu étudiées (Hoeksema, 2015). La première preuve d'un effet des CMNs sur la croissance des plantes remonte à une étude de Booth (2004), montrant un effet très variable selon les espèces de plantes étudiées. Quelques années plus tard, un effet positif des CMNs sur la survie de plantules a été mis en évidence (Booth & Hoeksema, 2010), cet effet positif provenant probablement d'une meilleure redistribution de l'eau au sein du réseau au bénéfice des jeunes plantes : on parle alors de processus de *facilitation*. Cependant, il serait maladroit d'y voir là une forme d'altruisme entre plantes âgées et jeunes. Dans cette étude en effet, l'effet positif des CMNs semble seulement compenser une forte compétition des racines de plantes entre elles (Booth & Hoeksema, 2010; Hoeksema, 2015 ; voir aussi : Bingham & Simard, 2012). Cette observation permet de soulever un point important de cette discussion : quels sont les effets des CMNs sur les champignons mycorhiziens, et quelles en sont les conséquences ? Ces questions ont été jusqu'à présent très peu soulevées par la communauté scientifique du fait d'approches souvent phyto-centrées. Pourtant, un champignon connecté dans un réseau pourrait favoriser la survie de tous ses partenaires afin de maximiser sa propre survie (Selosse *et al.*, 2006).

Ainsi, bien que les mécanismes en jeu soient dans la plupart des cas inconnus, il semble que les CMNs aient une importance écologique non négligeable pour les plantes et, peut-être, pour les champignons eux-mêmes. De plus, les effets des CMNs pourraient être plus marqués en cas de stress environnemental, par exemple en cas de stress hydrique (Bingham & Simard, 2011, 2012), contribuant ainsi à la résilience de certaines forêts. Cependant, le rôle des CMNs

est très variable selon les systèmes étudiés. Par exemple, ils semblent beaucoup plus bénéfiques aux plantes ectomycorhizées qu'aux plantes à endomycorhizes arbusculaires (Liang *et al.*, 2020), avec des effets là encore très variables d'une espèce de plante à l'autre. Enfin, si des effets sur la survie ou la croissance des jeunes plantes ont été mis en évidence (voir plus haut), l'importance écologique des CMNs sur les arbres adultes a seulement été suggérée (Birch *et al.*, 2020), bien que l'existence de flux ne soit, elle, plus à démontrer (ex : Rog *et al.*, 2020).

Chez les orchidées, les CMNs sont connus pour assurer la nutrition des plantes mycohétérotrophes voire en partie celle des plantes mixotrophes (**Figure 15**). En effet, celles-ci s'associent souvent à des champignons ectomycorhiziens eux-mêmes associés aux arbres voisins (Selosse *et al.*, 2002, 2004). Par exemple, la Néottie nid-d'oiseau (plante mycohétérotrophe) survit grâce au carbone fourni par les arbres voisins et transmis via un champignon ectomycorhizien (un *Sebacina* ; Selosse *et al.*, 2002). Chez certaines espèces d'orchidées vertes, une partie du carbone semble provenir des champignons mycorhiziens. Même si aucun transfert direct des plantes voisines vers les orchidées n'a encore été démontré, des preuves isotopiques (ex : Liebel *et al.*, 2010; Jacquemyn *et al.*, 2017b, 2021) ainsi que la persistance d'espèces albinos (Julou *et al.*, 2005; Roy *et al.*, 2013; Lallemand *et al.*, 2019), suggèrent l'existence d'un réseau fonctionnel entre orchidées et plantes voisines. De plus, étant donné que les stades germinatifs d'orchidées sont dépendants de leurs champignons pour croître, et que les graines d'orchidées germent généralement mieux à proximité des adultes (Jacquemyn *et al.*, 2012a ; voir partie 3.2), un phénomène de facilitation des jeunes plants hétérotrophes par les plantes voisines autotrophes est possible.

A fortiori, on ne sait quasiment rien aujourd'hui de l'existence possible de CMNs dans les communautés d'orchidées épiphytes (et de plantes épiphytes plus généralement) dans les forêts tropicales. Pourtant, le milieu épiphyte est caractérisé par un stress hydrique élevé, et une faible disponibilité des éléments nutritifs (Zotz, 2016), deux facteurs qui pourraient favoriser la mise en place et le rôle essentiel de tels réseaux (Leake & Cameron, 2012). L'étude de potentiels CMNs épiphytes sera abordée plus en détails dans l'**Article II** de ce manuscrit.

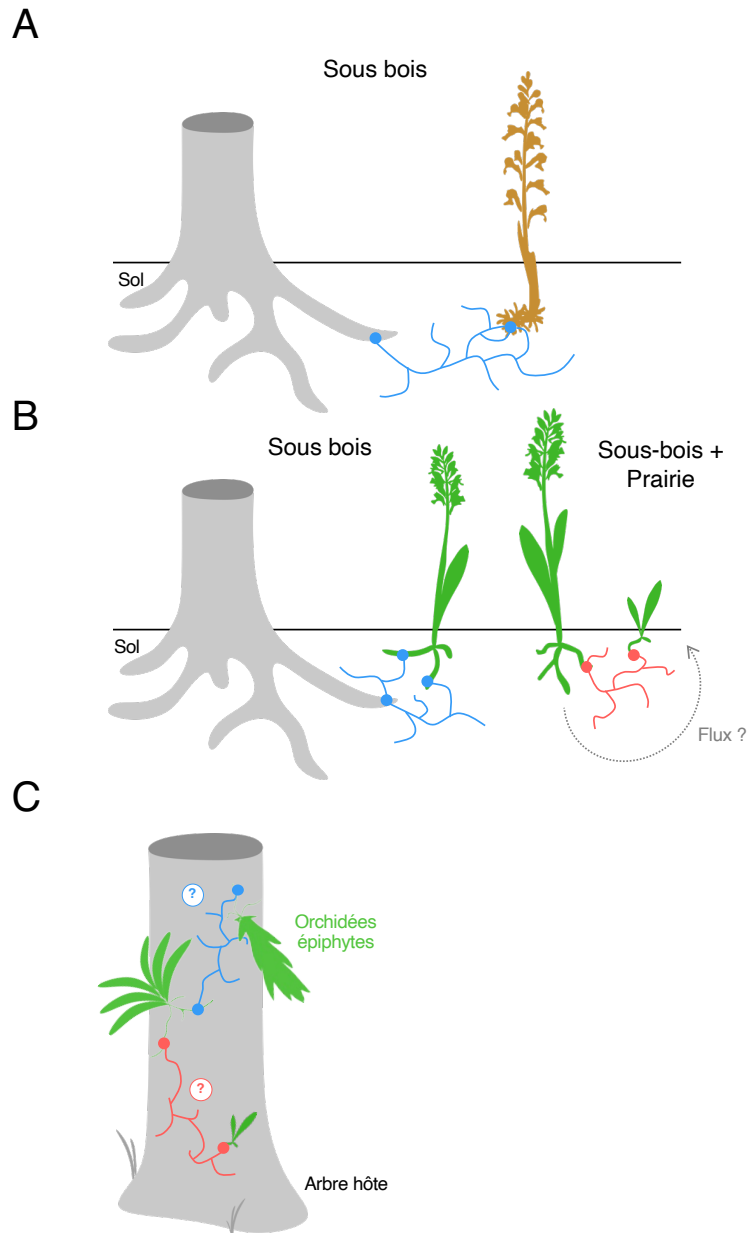


Figure 15 Réseaux mycorhiziens communs (CMN) chez les orchidées. Les champignons mycorhiziens sont symbolisés dans le sol ou sur l'écorce par des traits colorés, et les mycorhizes sont symbolisés par des cercles de la même couleur. (A) CMN chez une orchidée mycohétérotrophe associée à un champignon ectomycorhizien d'un arbre voisin. (B) CMN chez des orchidées vertes mixotrophes associées à un champignon ectomycorhizien (en sous-bois) ou autotrophes associées à des rhizotonia (prairie et sous-bois). Un phénomène de facilitation entre orchidées adultes et plantules a été observé en prairie, mais la présence de flux, et donc de CMN fonctionnel, n'a pas été démontrée. (C) CMN épiphyte : ceux-ci n'ont pas encore été démontré, ni entre orchidées d'espèces différentes (champignon bleu) ni entre orchidées d'une même espèce à des stades de vie différents (champignon rouge).

IV. Outils d'étude des symbioses mycorhiziennes d'orchidées

4.1. Détecter l'invisible : le cas des microorganismes

Les champignons sont des microorganismes filamenteux dont l'essentiel de la biomasse est constitué de filaments microscopiques, souvent invisibles à l'œil nu. Certains champignons forment des fructifications, des structures de reproduction sexuée appelées carpophores. C'est le cas de nombreux champignons ectomycorhiziens, dont certains sont associés à des orchidées partiellement ou totalement hétérotrophes. Les champignons endomycorhiziens arbusculaires, en revanche, ne forment pas de fructifications visibles, et se multiplient essentiellement de façon asexuée (Smith & Read, 2008). Chez les principales familles de champignons mycorhiziens d'orchidées (*i.e.*, comprenant les rhizoctonias), certaines espèces fructifient de façon visible, formant des structures aux formes variées (voir par exemple Fig. 1 dans Weiß *et al.*, 2016). La plupart du temps cependant, ces fructifications sont retrouvées seules, sans proximité avec une orchidée, et il semble que les champignons capables de former des mycorhizes avec les orchidées ne soient pas les mêmes que ceux capables de produire des structures reproductrices dans l'environnement. Par exemple, seules une cinquantaine d'espèces de *Tulasnella* ont été décrites sur la base de leurs basidiomes (Kirk *et al.*, 2008), alors que près de 500 espèces potentielles sont présentes dans les bases de données en ligne (Martos, comm. pers.)

Ainsi, les champignons mycorhiziens d'orchidées sont, dans l'immense majorité des cas, invisibles à l'œil nu et non décrits. L'étude macroscopique d'une coupe racinaire permet tout juste d'en révéler la nature mycorhizienne, mais pas l'état des pelotons formés (jeunes pelotons, ou en cours de lyse). Pour réellement appréhender la structure des mycorhizes d'orchidées, et surtout identifier les partenaires fongiques impliqués, il est possible d'avoir recours à plusieurs méthodes de détection. Les principales utilisées sont récapitulées, et leurs limites discutées, dans les paragraphes ci-dessous.

4.1.1. Détection des champignons mycorhiziens par microscopie

La microscopie optique, avec ou sans coloration, peut être utilisée pour identifier la présence de pelotons et connaître leur état de développement. Cependant, pour avoir une idée

plus précise des champignons mycorhiziens impliqués, il est nécessaire d'avoir recours à de la microscopie électronique à transmission (MET). En effet, les champignons mycorhiziens d'orchidées appartiennent au groupe des Dikaryas, qui sont des champignons à hyphes cloisonnés pour la plupart. Les cloisons peuvent comporter des pores, appelés dolipores, dont la structure peut être caractéristique de certaines familles. Par exemple, les rhizoctonias présentent des parenthosomes, des structures opaques aux électrons qui bordent les dolipores et permettent de les différencier d'autres familles fongiques. Ce critère, entre autres, a par exemple permis de révéler, sans ambiguïté, la formation de pelotons formés par des Atractiellomycètes chez certaines orchidées tropicales (Kottke *et al.*, 2010). Au sein des rhizoctonias, la structure des dolipores permet également de différencier les différentes familles (Kottke & Suárez, 2009), et l'on sait par exemple grâce à cela que plusieurs espèces de rhizoctonias peuvent participer à la formation d'un seul peloton (Martos *et al.*, 2012) !

Cependant, l'approche par microscopie présente plusieurs limites. La taille des coupes (quelques microns) limite fortement la surface de la zone de la racine étudiable, et il n'est pas rare de ne pas observer, en MET, de structures formées par des champignons détectés via des approches moléculaires (ex : Selosse *et al.*, 2004). De plus, l'approche MET ne permet pas, ou très rarement, d'identifier les partenaires fongiques en deçà d'un rang taxonomique correspondant à l'ordre ou à la famille. D'autres approches peuvent être utilisées pour identifier de potentiels partenaires mycorhiziens d'orchidées, comme la microscopie à fluorescence (ex : Jiang *et al.*, 2019) mais celles-ci restent encore peu développées dans le cas des rhizoctonias.

4.1.2. Isolement et culture des champignons mycorhiziens d'orchidées

Du fait de leur écologie saprotrophe, les champignons mycorhiziens d'orchidées peuvent être cultivés seuls (ex : **Figure 7F**), sur des milieux de cultures divers (Rasmussen, 1995). Cette faculté de mise en culture rend le modèle de la symbiose des orchidées-champignons mycorhiziens particulièrement intéressant à manipuler (par exemple en termes d'expression de gènes lors de la symbiose, ex : Ghirardo *et al.*, 2020) puisque les deux partenaires peuvent être étudiés à la fois ensemble et séparément. En outre, la confrontation des graines d'orchidées à diverses souches de champignons permet d'identifier des partenaires mycorhiziens nécessaires à la germination symbiotique des graines (Rasmussen, 1995; Dearnaley *et al.*, 2012 ; voir **Article III**), et de comparer les performances d'une orchidée en présence de différentes souches mycorhiziennes.

La technique d'isolement des souches mycorhiziennes consiste à déposer des morceaux de racines ou des protocormes stérilisés en surface sur un milieu favorable à la croissance des

champignons, puis à isoler une à une les souches fongiques colonisant le milieu (**Figure 16**). L'identification morphologique macroscopique des souches est délicate car plusieurs souches peuvent adopter une croissance très similaire, celle-ci variant de plus considérablement selon les milieux de culture employés. Leur identification repose donc généralement sur l'étude microscopique de structures filamenteuses particulières, et surtout sur le séquençage des régions de l'ADN ribosomique nucléaire (voir ci-dessous) (Freitas *et al.*, 2020; Fritsche *et al.*, 2021).

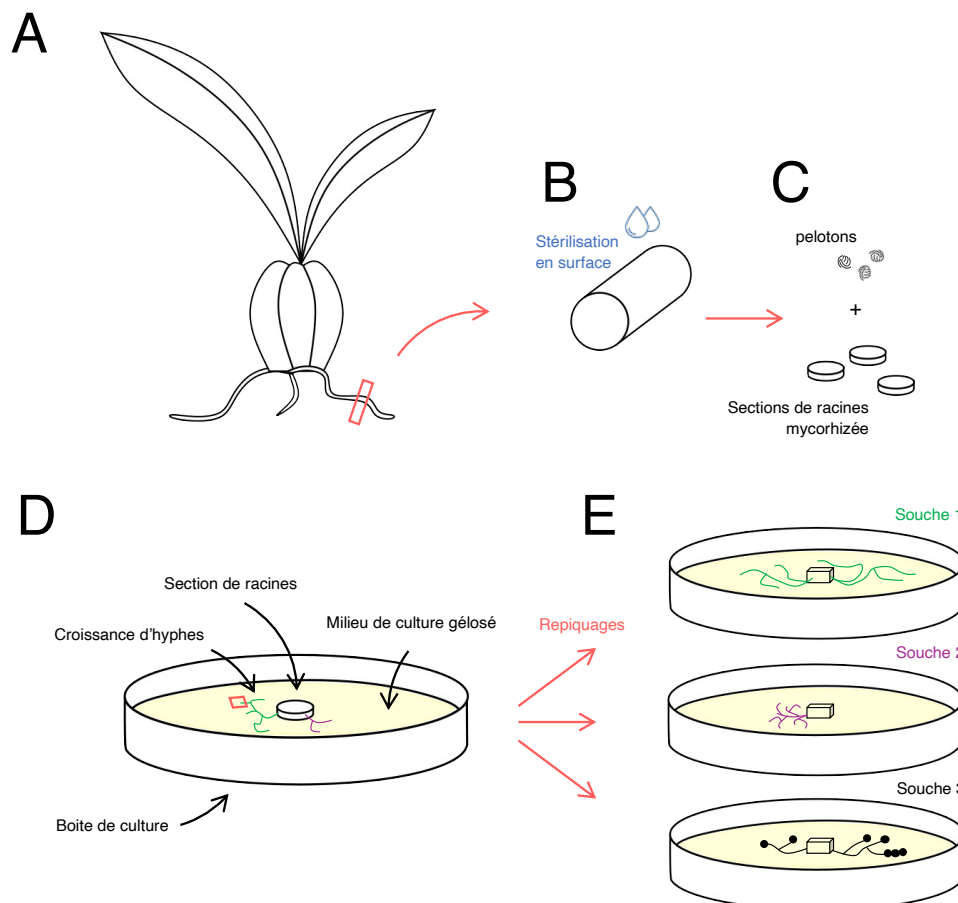


Figure 16 Isolement et culture de souches fongiques mycorhiziennes. (A) un morceau de racine d'orchidée (ou un protocorme) est prélevé sur le terrain puis (B) nettoyé et stérilisé en surface. (C) Il est ensuite découpé en petits tronçons contenant de jeunes structures mycorhiziennes. Il est également possible d'isoler les pelotons du matériel végétal à l'aide de pinces à microdissection, sous loupe binoculaire. (D) Les pelotons ou les tronçons racinaires sont déposés sur un milieu de culture gélosé favorable à la croissance des champignons étudiés. Au fur et à mesure de la croissance des hyphes en dehors des tissus végétaux, les extrémités de ceux-ci sont repiquées (par prélèvement de petits cubes de gélose, cadre rouge) et (E) maintenues en cultures pures dans des boîtes séparées.

L'isolement des souches offre la possibilité de valider le statut mycorhizien de celles-ci lors d'expériences de germination puis de croissance *in vitro* des orchidées (Rasmussen, 1995).

Cependant, de nombreux champignons semblent non cultivables sur les milieux classiques et les tests multiples de milieux favorables nécessitent une grande quantité de matériel racinaire frais, souvent limitant (ex : espèce protégée). Ainsi, la méthode d'identification des champignons mycorhiziens la plus communément employée aujourd'hui repose sur le séquençage direct de l'ADN fongique des racines.

4.1.3. Identification des champignons mycorhiziens par approches de (meta)barcoding

La méthode de *barcoding* consiste à amplifier (par *polymerase chain reaction* ; PCR) de manière spécifique, puis à identifier, une séquence génétique conservée au sein d'un groupe d'organismes (**Figure 17**). Pour chaque organisme, la séquence obtenue fait office d'identificateur ou de code-barre (*barcode* en anglais). La méthode de *metabarcoding* consiste à amplifier un échantillon (comme une portion de racine ou un petit volume de sol), en ciblant sans *a priori* l'ensemble des organismes qui s'y trouvent (ou leur ADN environnemental), par exemple l'ensemble des champignons (Taberlet *et al.*, 2012).

L'étape de PCR génère des amplicons (des portions d'ADN amplifiées) qu'il faut identifier par séquençage. Le séquençage d'échantillons complexes (*i.e.*, contenant plusieurs organismes) reposait il y a une quinzaine d'années sur des méthodes de clonage fastidieuses, mais le développement des nouvelles technologies de séquençage (Pyroséquençage, Illumina, PacBio, nanopore) a depuis permis une forte augmentation des capacités d'analyses d'échantillons (Tedersoo *et al.*, 2021).

L'identification des communautés de champignons par *metabarcoding* repose le plus souvent sur l'amplification et l'identification des séquences ITS-1 ou ITS-2 (*internal transcribed spacers*) de l'ADN ribosomal (Tedersoo *et al.*, 2015a; Yang *et al.*, 2018). Il s'agit de séquences suffisamment variables pour permettre la discrimination des différentes « espèces » de champignons (voir ci-dessous), mais aussi présentant des régions conservées garantissant l'utilisation d'amorces de PCR « universelles » (Waud *et al.*, 2014). Toutefois, si l'ITS est adapté à la délimitation taxonomique des champignons au sein des Dikaryas, il ne permet malheureusement pas ou très peu la détection des groupes issus de branches basales dans la phylogénie des Eumycètes, comme les Mucoromycota qui contiennent pourtant les champignons mycorhiziens arbusculaires (les Glomeromycètes) et dont le gène 18S fait office de code-barre (Perez-Lamarque *et al.*, 2022). Une fois les séquences obtenues, elles sont assemblées en « unités taxonomiques opérationnelles » (OTUs ; voir **Encadré 4**), concepts d'espèces largement utilisés en microbiologie.

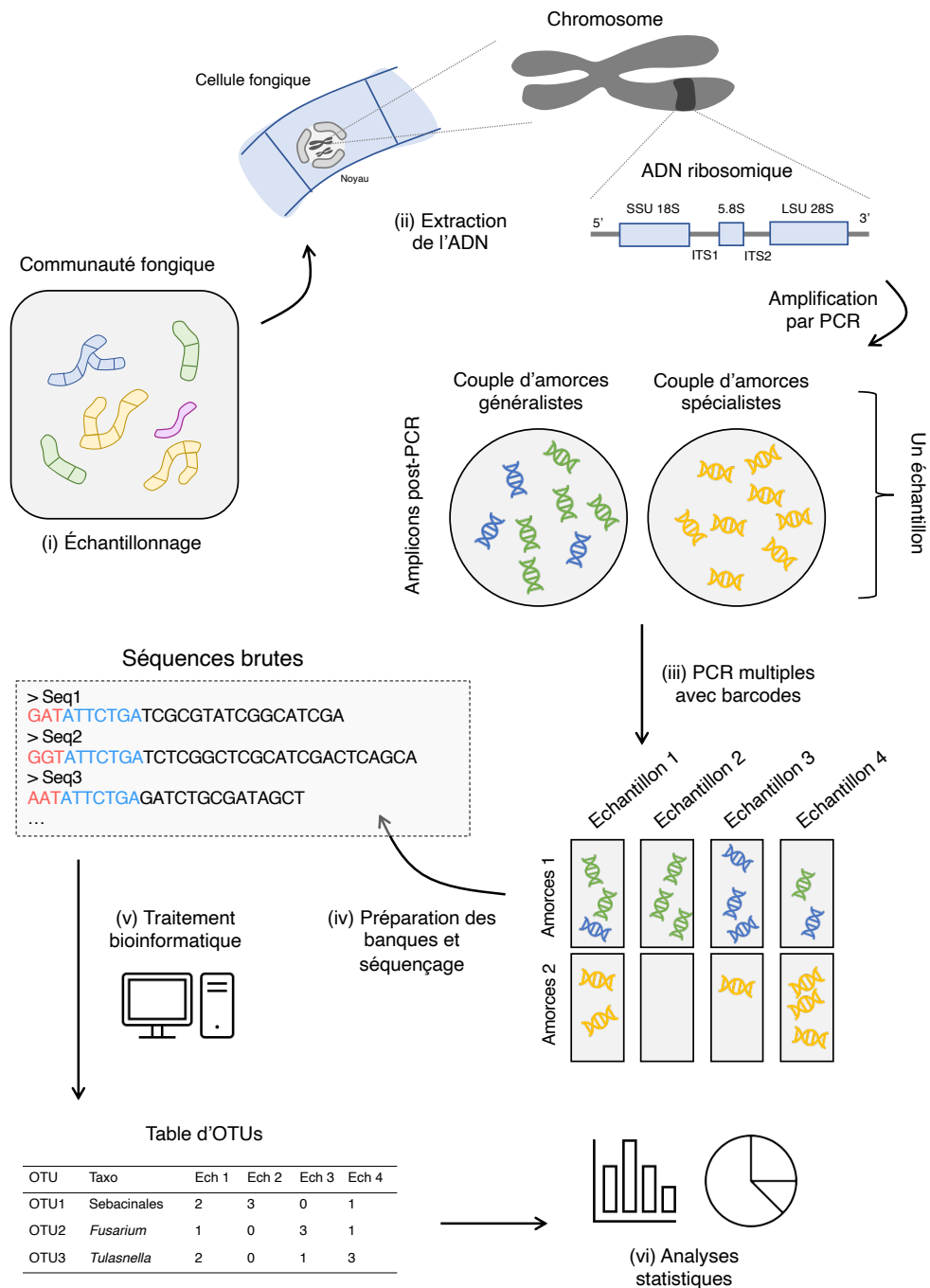


Figure 17 Processus de traitement des données de *metabarcoding* environnemental. (i) Un échantillon environnemental (sol, écorce, racine etc.) est prélevé sur le terrain puis (ii) broyé et extrait au laboratoire afin d'en isoler l'ADN génomique. Cet ADN contient des séquences ribosomiques qui peuvent être amplifiées par PCR à l'aide d'amorces spécifiques. L'utilisation de plusieurs couples d'amorces pour un seul échantillon permet d'amplifier différents groupes d'organismes (ici en bleu et vert d'une part, et en jaune d'autres part). Quel que soit le couple d'amorces utilisé, certains organismes échappent à l'amplification (en rose dans ce schéma). L'amplification d'ADN est effectuée pour chaque échantillon (iii), en utilisant des amorces modifiées et propres à chacun d'entre eux. A l'issue du séquençage (iv), les séquences sont attribuées aux différents échantillons sur la base de leur combinaison *barcode* (en rouge) + amorce (en bleu). Ces séquences sont ainsi triées, filtrées et identifiées lors d'une étape de traitement bioinformatique (v), aboutissant à la construction d'une table d'OTUs sur laquelle les analyses statistiques sont menées (vi).

Encadré 4. Le concept d'espèce chez les microorganismes.

Comment définir une espèce ? La question a longtemps tourmenté les biologistes, et continue de le faire aujourd'hui puisqu'aucune définition ne fait consensus. Chez les microorganismes, pour lesquels un critère morphologique est rarement disponible et souvent peu pertinent en raison de fortes convergences, la notion morphologique de l'espèce ne peut être appliquée. De plus, beaucoup de microorganismes ne présentent pas, *a priori*, de phase de reproduction sexuée, ou bien celle-ci a lieu de façon cachée. Ils présentent également une forte capacité d'échange de matériel génétique par transferts horizontaux, même entre individus phylogénétiquement éloignés. Ainsi, la définition d'espèce basée sur des critères reproductifs *i.e.*, concept biologique d'espèce, est également peu applicable aux microorganismes (Taylor *et al.*, 2000).

De fait, la définition de l'espèce généralement adoptée repose sur l'information génétique : appartiennent à une même espèce, ou plutôt entité génétique, deux microorganismes dont les séquences d'une région donnée de l'ADN (appelée code-barre génétique, en anglais *genetic barcode*) présentent un certain pourcentage de similarité.

Cette définition laisse entrevoir plusieurs limites : elle dépend de la séquence d'ADN choisie (ex : ITS ADN_r chez les champignons), mais aussi du seuil de similarité choisi. Dans les faits, l'étude des microorganismes repose généralement sur la construction d'unités taxonomiques opérationnelles (OTUs), définies sur la base d'un seuil de similarité de séquences (par exemple l'ITS-2) généralement de 97%, mais variable selon les organismes et les études. Une espèce, ou concept d'espèce, peut alors être vue comme une OTU ou bien un ensemble d'OTUs formant un groupe monophylétique (Taylor *et al.*, 2000) : on parle alors de concept phylogénétique d'espèce.

Toutefois, les OTUs comme la notion d'espèce chez les microorganismes doivent avant tout être vus comme des outils, nécessaires aux analyses et aux discussions, et non comme des réalités biologiques immuables.

A l'heure actuelle, l'utilisation d'OTUs à 97% semble être un outil adapté à l'étude des communautés fongiques, par rapport notamment à l'utilisation de seuils plus stringents (ex : ASV, *amplicon single variant* ; Tedersoo *et al.*, 2022 ; voir **Article 2**), mais des méthodes alternatives (notamment celle utilisée dans l'**Article 1** de ce manuscrit) peuvent donner des résultats tout à fait similaires (Perez-Lamarque *et al.*, 2022). L'utilisation d'un tel seuil a par ailleurs été justifié au sein de la famille des Tulasnellaceae par Linde *et al.*, (2014) suggérant que, jusqu'à preuve du contraire, son utilisation dans nos études était pertinente.

Comme décrit précédemment, certaines familles de champignons échappent aux amorces « universelles », du fait de taux de substitutions plus élevés dans les séquences de l'ADN nucléaire. C'est le cas, malheureusement (!), de la famille des Tulasnellaceae, une des principales familles mycorhiziennes d'orchidées (Rammitzu *et al.*, 2021). De ce fait, l'usage d'un second couple d'amorces spécifiques de cette famille est nécessaire (Vogt-Schilb *et al.*, 2020), mais contraint grandement les analyses de données ainsi que les conclusions qui en résultent (voir suite de ce manuscrit). De manière générale, le choix du couple d'amorces conditionne grandement les communautés de champignons ciblées (Waud *et al.*, 2014) et il convient de garder en tête que les communautés fongiques identifiées à l'issue d'un séquençage ne reflètent qu'une partie des communautés réellement présentes dans les échantillons. De même, les abondances relatives des champignons obtenus peuvent ne pas refléter la réalité biologique de l'échantillon (Tedersoo *et al.*, 2022). A titre d'exemple, un vif débat a eu lieu en 2015 lorsqu'un atlas mondial de la diversité fongique des sols (Tedersoo *et al.*, 2014) a omis l'un des groupes de champignons les plus fréquents dans le sol, en raison de l'usage d'amorces qui n'amplifient pas l'ADN chez ce groupe (Schadt & Rosling, 2015; Tedersoo *et al.*, 2015b).

Outre la spécificité des amorces, l'approche par séquençage peut représenter plusieurs biais comme une surestimation de la diversité fongique (voir **Encadré 5**), ou une sous-estimation du nombre de séquences longues (Castaño *et al.*, 2020). La technologie Illumina en particulier (utilisée lors des travaux présentés dans ce manuscrit), permet seulement de séquencer des amplicons d'une taille inférieure à 500-550 pb. Ainsi, les séquences obtenues sont courtes et leur assignation taxonomique est parfois incertaine. De plus, leur usage en analyses phylogénétiques se révèle limité car les séquences ITS, pauvres en régions conservées, ne permettent pas d'obtenir des alignements fiables à une échelle supra-générique (Tedersoo *et al.*, 2022). Enfin, l'ensemble du protocole de *metabarcoding* (de la PCR au séquençage) autorise la détection de séquences initialement très peu abondantes dans les échantillons, augmentant le risque de contaminations extérieures ou de détection de champignons très peu abondants initialement (voir **Encadré 6**). De ce fait, des étapes de tris et de nettoyage des données (ex : Hornung *et al.*, 2019; Zinger *et al.*, 2019), ainsi qu'un regard critique sur celles-ci sont nécessaires afin de limiter au maximum les risques de surinterprétation, ou d'interprétations erronées des résultats. Par exemple, il est impossible de déterminer le statut mycorhizien d'un champignon avec comme seul outil le séquençage de son ADN (ex : Johnson *et al.*, 2020), et il est alors nécessaire d'avoir recours à d'autres méthodes comme de la microscopie (identification de la présence de pelotons).

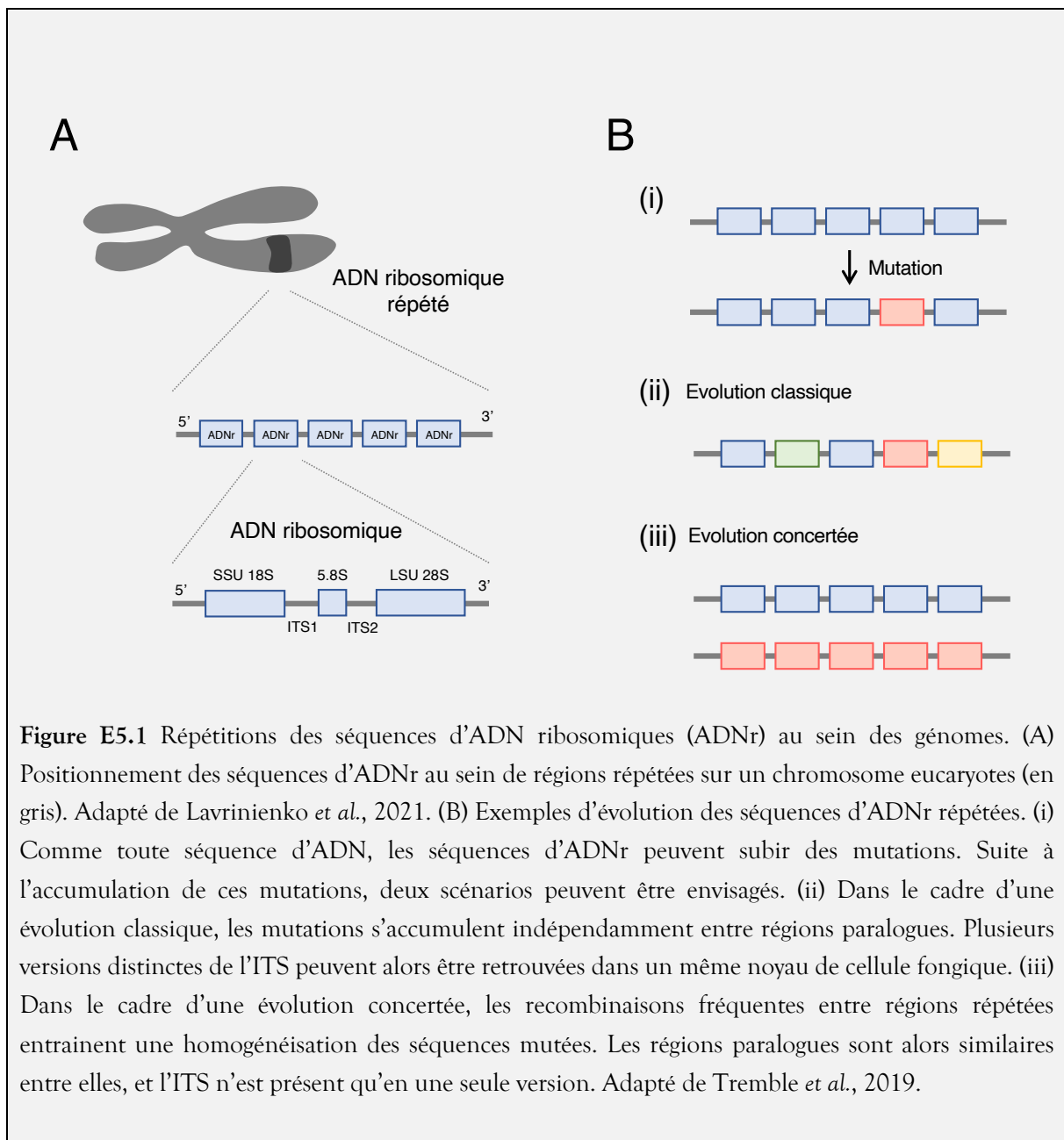
Encadré 5. L'ITS comme *barcode* fongique ?

La région génomique généralement utilisée comme *barcode* chez les microorganismes appartient à l'ADN ribosomal (ADNr). Les séquences ADNr sont des séquences répétées au sein des génomes, présentant une organisation en tandem (*i.e.*, à la suite les unes des autres ; [Lavrinienko et al., 2021](#)) ce qui augmente leur capacité d'amplification par PCR (**Figure E5.1**). Cependant, cette dernière particularité présente un inconvénient de taille : si les séquences ADNr peuvent varier de manière inter- ou intra-spécifique, leur variation peut également être intra-génomique, c'est-à-dire qu'au sein d'un même génome (*i.e.*, d'un même organisme), plusieurs séquences d'ADNr différentes peuvent coexister. Plus problématique encore, leur nombre peut varier en fonction des conditions environnementales (ex : en cas de stress ; [Lavrinienko et al., 2021](#)). L'hypothèse généralement admise est celle de « l'évolution concertée », qui consiste à considérer que, du fait des recombinaisons homologues fréquentes au sein des génomes, chaque copie de l'ADNr présente une séquence similaire. Cependant, plusieurs études montrent que ce constat n'est pas applicable chez de nombreux microorganismes.

Les microorganismes eucaryotes, en particulier, peuvent présenter un grand nombre de copies d'ADNr au sein de leur génome, et chez les champignons, ce nombre a varié de 14 à 1442 copies sur les espèces récemment étudiées ([Lofgren et al., 2019](#)). Bien que la variabilité intra-génomique des ADNr semble finalement toucher un faible nombre d'espèces de champignons (de l'ordre de 3 à 5% ; [Lindner et al., 2013](#)), les espèces concernées sont mal identifiées à l'heure actuelle. En particulier, aucune des études citées précédemment n'a inclus de rhizoctonias dans leurs analyses.

L'existence d'un polymorphisme intra-génomique pourrait avoir plusieurs conséquences dans les analyses de *metabarcoding* : surestimation de la richesse spécifique ([Lindner et al., 2013](#)), problème de délimitation des espèces ([Tremble et al., 2019](#)) etc.

Dans nos études en particulier, une place importante a été faite à la famille des Tulasnellaceae (en termes de profondeur de séquençage), autorisant la détection d'un éventuel polymorphisme intra-génomique de la région ITS-2. Heureusement, le regroupement des séquences en OTUs corrige probablement au moins en partie l'éventuel bruit issu de variants d'ITS. Il reste cependant possible qu'une partie des patrons obtenus pour cette famille dans les études qui suivent puissent être influencés par ce polymorphisme génétique. Il semble toutefois difficile de s'affranchir de ces biais à l'heure actuelle, et de plus amples travaux sur le séquençage des génomes de ces champignons seront nécessaires pour permettre, à l'avenir, une meilleure interprétation des données de *metabarcoding* ([Lavrinienko et al., 2021](#)).



En dépit du tableau plutôt mitigé de l'approche de *metabarcoding* précédemment dressé, celle-ci reste idéale, toute précaution prise et à l'heure actuelle, pour étudier et décrire les communautés fongiques dans les racines des plantes et dans l'environnement. Elle offre la possibilité de traiter un grand nombre d'échantillons et de capter une large diversité fongique simultanément. A l'avenir, l'évolution des techniques de séquençage permettra de s'affranchir des biais actuels, en passant notamment par une augmentation de la taille des fragments amplifiés et séquencés, voire une capture de fragments ciblée, et donc une augmentation des résolutions taxonomique et phylogénétique correspondantes (Karst *et al.*, 2021; Tedersoo *et al.*, 2022).

Encadré 6. La normalisation des données en écologie microbienne.

Les données de séquençage à haut-débit sont issues d'une succession d'étapes comportant des biais (ex : extraction et amplification de l'ADN, préparation des bibliothèques de séquençage etc.) altérant notamment l'abondance des différents organismes détectés. Chaque échantillon est représenté par un nombre de séquences qui est rarement représentatif de la quantité d'ADN présente au départ dans l'échantillon. De ce fait, il est nécessaire d'avoir recours à une étape de normalisation avant leur analyse statistique.

À l'heure actuelle, il n'existe pas de consensus et de nombreuses méthodes peuvent être employées. Dans l'**Article I** de ce manuscrit, la méthode employée est dite de « raréfaction » : elle consiste à tirer au hasard dans chaque échantillon un nombre fixe de séquences (McKnight *et al.*, 2019). À l'issue de ce tirage aléatoire, la profondeur de séquençage de chaque échantillon est identique. De plus les occurrences rares (dont les contaminations) sont généralement retirées. Cette méthode a cependant été critiquée notamment car la fixation d'un seuil minimal de séquences à tirer entraîne mécaniquement la perte de certains échantillons à la profondeur de séquençage trop faible (McMurdie & Holmes, 2014).

Dans les **Articles II à IV** de ce manuscrit, nous avons préféré une méthode de normalisation par proportions (McKnight *et al.*, 2019), notamment afin d'éviter ce dernier biais. Ici, les abondances absolues sont converties en abondances relatives, et la somme de celles-ci dans chaque échantillon vaut 1. Cependant, il convient de noter qu'aucun OTU n'est retiré à cette étape, et des occurrences rares (potentiellement issues de contaminants) persistent dans les données. Étant donné que nous avons réalisé une partie des analyses ci-dessous sur des données de présence-absence (du fait de l'utilisation de deux couples d'amorces à la spécificité radicalement différente), nous avons fait le choix de fixer un seuil arbitraire (mais basé sur une estimation du taux de contaminants potentiels, voir suite de ce manuscrit) au-dessous duquel chaque occurrence était considérée comme nulle. Les données ainsi normalisées ont pu être analysées à la fois en abondances relatives (analyses à l'échelle de l'OTUs ou pour un seul couple d'amorces) et en présence-absence (calculs d'indices de diversité α ou β à l'échelle de la communauté).

4.2. Les analyses spatiales appliquées aux communautés microbiennes

4.2.1. Distribution spatiale des microorganismes : quelques contraintes

L'étude de la distribution des espèces, sa dynamique et les facteurs qui peuvent l'expliquer, tiennent une place centrale en écologie. Dans certains cas, l'aspect spatial de la distribution d'une espèce donnée est un biais d'échantillonnage dont on veut s'affranchir afin d'étudier, par exemple, un facteur biotique ou abiotique contraignant cette distribution. Dans d'autres cas, l'étude de la structure spatiale d'une espèce ou communauté d'espèces peut apporter à elle seule des éléments sur la dynamique des écosystèmes. Par exemple, l'étude de la distribution spatiale des champignons mycorhiziens d'orchidées, nécessaires à la germination des graines de leur hôte, peut donner des indices sur la capacité des orchidées à se disperser et à coloniser certains habitats (voir partie 3.2).

La question de la structure spatiale chez les microorganismes n'a été posée que relativement récemment du fait de contraintes techniques liées notamment à la détection de ces communautés microbiennes (Green & Bohannan, 2006). De plus, il a longtemps été considéré que contrairement aux organismes de plus grande taille, les microorganismes présentent une structure spatiale limitée notamment à large échelle où ils sont supposés ubiquistes (en anglais « *everything is everywhere* »). Chez les champignons mycorhiziens d'orchidées par exemple, les principales familles de rhizoctonias sont retrouvées sur chaque continent (Jacquemyn *et al.*, 2017a). Néanmoins, à des échelles taxonomiques plus fines (espèce, variant génétique, etc.), de nombreuses études ont suggéré l'existence de structures spatiales à la fois locales (jusqu'à quelques millimètres) et globales (jusqu'à plusieurs centaines de kilomètres ; Green *et al.*, 2004; Green & Bohannan, 2006), y compris chez les mycorhiziens d'orchidées (e.g., Xing *et al.*, 2020a).

De manière générale, l'échelle taxonomique considérée peut exercer une forte influence sur les patrons de distribution observés (Hanson *et al.*, 2012). Ceci est d'autant plus problématique chez les microorganismes puisqu'il n'existe pas de consensus sur la manière de définir un taxon (voir Encadré 4). Notamment, les structures spatiales de communautés fongiques définies sur la base d'OTUs à 97% ou sur la base d'ASV peuvent différer du fait de la variabilité génétique intra-OTUs.

À échelle fine cependant (*i.e.*, du même ordre de grandeur que la croissance d'un mycélium), ces différences peuvent être atténuées car un OTU donné a davantage de chances d'être composé d'un seul haplotype (*i.e.*, un seul mycélium génétiquement homogène) qu'à des échelles plus grandes. Cependant, ce constat se heurte à plusieurs inconnues : on connaît très rarement, pour ne pas dire jamais, les taux de croissance *in situ*, la taille des formations mycéliennes, ou encore

l'importance de la sporulation chez les champignons étudiés, en particulier chez les champignons mycorrhiziens d'orchidées dont l'écologie est encore aujourd'hui très mal connue. Par exemple, il est difficile de savoir si un champignon recouvrant l'écorce d'un arbre est composé d'un seul ou de multiples mycéliums, ceux-ci éventuellement connectés entre eux, ou s'il s'agit simplement d'une sporée sans croissance hyphale.

L'étude de la distribution spatiale des champignons sur l'écorce d'un arbre peut se baser sur l'étude de microsites (e.g., branches, base du tronc etc. ; [Izuddin et al., 2019](#); [Zarza et al., 2022](#)). Cependant, dans un environnement *a priori* homogène (ex : le tronc d'un arbre), il est nécessaire d'introduire un système de coordonnées spatiales. Celui-ci présente l'avantage de pouvoir cartographier à échelle très fine les communautés fongiques de l'environnement. L'étude des données collectées repose sur la comparaison entre les distances spatiales (i.e., distances euclidiennes) et les distances écologiques (calculées avec différents indices de similarité, voir [Koleff et al., 2003](#)) entre échantillons. Sur une écorce d'arbre, il convient de calculer les distances spatiales en tenant compte de l'aspect cylindrique de l'écorce (**Figure 18**). Les distances sont calculées le long de l'écorce, en faisant l'hypothèse que les champignons considérés se limitent à la surface de celle-ci et ne pénètrent pas en profondeur dans l'arbre (ce dernier point sera discuté dans la partie finale de ce manuscrit).

4.2.2. Analyses spatiales en écologie

La structure spatiale d'une communauté est souvent étudiée par le biais de son autocorrélation spatiale. Une structure est autocorrélée si elle est similaire à elle-même de proche en proche ; pour une communauté de microorganismes cela revient à dire que des points d'échantillonnages proches ont une composition proche également.

Si la similarité entre paires d'échantillons diminue avec leur éloignement, alors la communauté présente une structure agrégée (on parle de renouvellement spatial, ou *turnover* en anglais). Si elle est constante alors la structure de la communauté est homogène. Enfin, en l'absence de signal significatif, la structure de la communauté peut être considérée comme aléatoire.

La mesure de l'autocorrélation spatiale passe généralement par un test de Mantel comparant les valeurs de deux matrices : l'une de distances spatiales et l'autre de distances écologiques (**Figure 19**). Pour chaque classe de distance (définie manuellement ou non), l'objectif est de tester l'existence d'une corrélation entre les valeurs de distances écologiques et l'appartenance à cette classe de distance (D). Si le coefficient de corrélation (r) obtenu est compris entre 0 et 1, alors la corrélation est positive (les communautés éloignées d'une distance D sont similaires entre elles), s'il est compris entre -1 et 0, alors elle est négative (les communautés éloignées d'une distance D sont différentes entre elles ; [Fortin et al., 2002](#)).

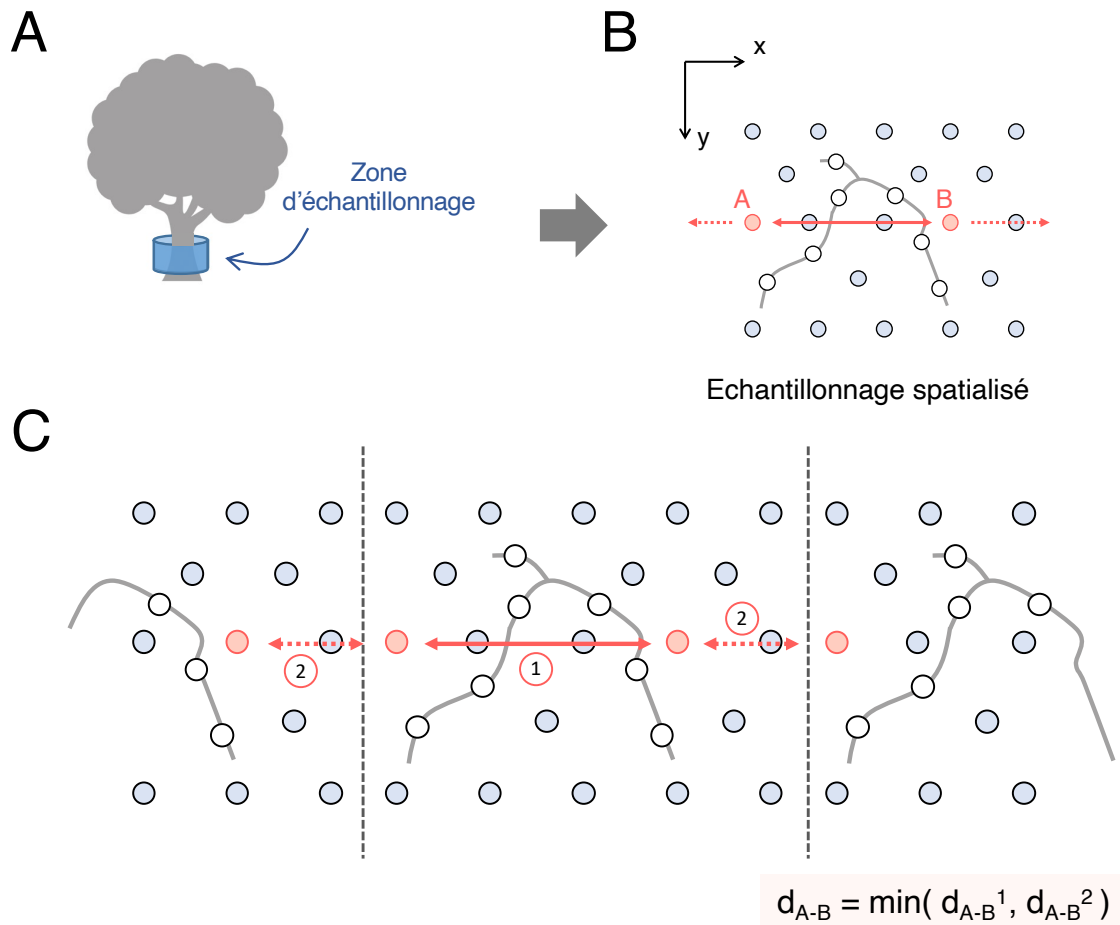


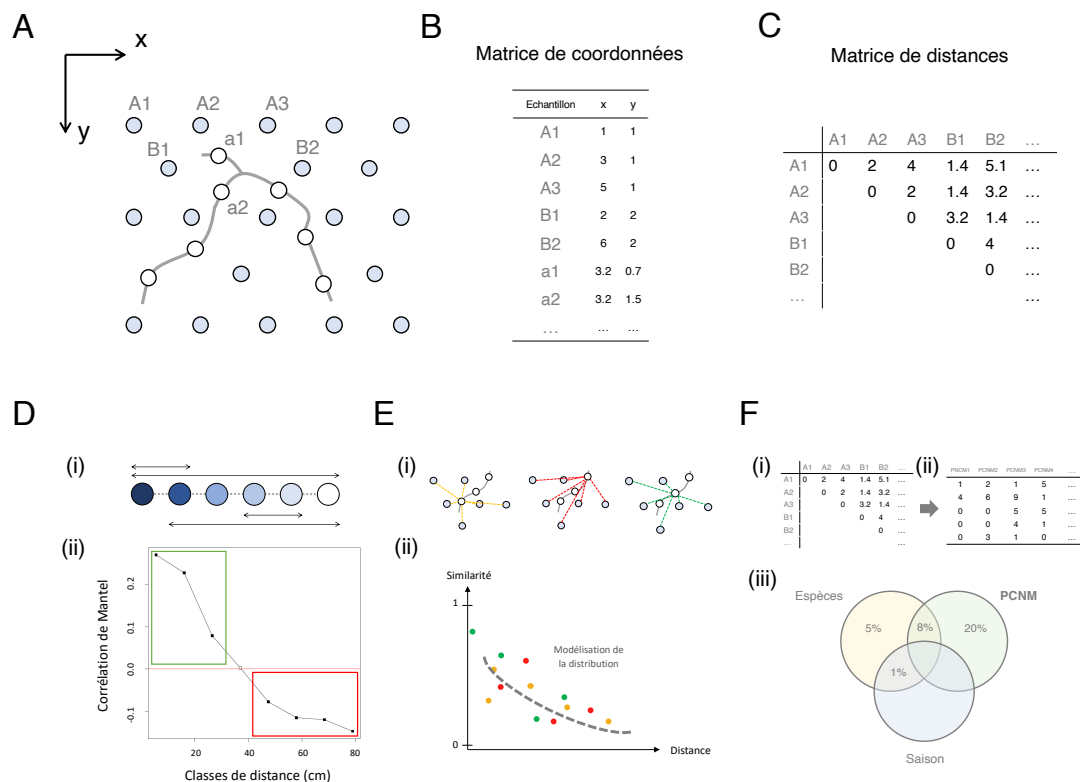
Figure 18 Calcul des distances spatiales sur le tronc. (A) Le tronc est cylindrique au niveau de la zone d'échantillonnage, permettant le calcul de distances précises entre points d'échantillonnages. (B) Échantillonnage spatialisé comprenant des points d'écorce (cercles bleus) et des portions de racines (cercles blancs). La distance entre les points A et B peut être calculée en suivant deux chemins le long de l'écorce cylindrique (traits pleins et en pointillés). (C) Les distances le long de ces deux chemins (d_{A-B}^1 et d_{A-B}^2) sont calculées en apposant virtuellement la grille d'échantillonnage de part et d'autre de la grille réelle. La distance minimale (d_{A-B}) est conservée pour les analyses spatiales.

Une alternative au corrélogramme de Mantel est la représentation de l'évolution des similarités entre échantillons en fonction de leur éloignement spatial continu, appelé en anglais *distance decay of similarity* (= déclin de similarité avec la distance). Puisque les indices de distances écologiques sont généralement compris entre 0 et 1, la tendance obtenue peut être modélisée à l'aide d'une distribution binomiale (Millar *et al.*, 2011), ceci étant d'autant plus vrai que l'indice de Jaccard, utilisé dans ce manuscrit, est un pourcentage. Il est alors possible de calculer divers paramètres comme la *halving distance*, distance nécessaire pour que la similarité moyenne entre paires d'échantillons soit réduite de moitié. La significativité de la tendance obtenue est également testée à l'aide d'un test de Mantel (Anderson *et al.*, 2013). Dans ce manuscrit, cette approche a été choisie afin d'étudier la structure spatiale des communautés non pas entre toutes

les combinaisons possibles d'échantillons, mais seulement pour les combinaisons « racine *versus* écorce ». La matrice de distances ainsi obtenue est une matrice non-carrée, format non pris en compte dans les logiciels classiques de calcul de corrélogramme (par exemple sur R).

Pour l'étude d'une quantité liée à un échantillon (e.g., richesse fongique) et non d'une qualité (composition), d'autres tests statistiques existent comme le test de Moran (Fortin *et al.*, 2002), non détaillé ici mais abordé dans l'Article I.

Figure 19 Exemple d'analyses spatiales en écologie microbienne. (A) Échantillonnage spatialisé sur le tronc d'un arbre, comprenant des échantillons d'écorce (cercles bleus) et de racines de plantes épiphytes (cercles blancs le long des racines grises). (B) La collecte des coordonnées de chaque échantillon sur le terrain permet d'obtenir une matrice de coordonnées qui est transformée (C) en matrice de distances (voir Figure 18) à partir de laquelle les analyses statistiques sont menées. (D) Calcul d'autocorrélation spatiale. (i) Les similarités écologiques sont calculées pour toutes les paires d'échantillons, ici symbolisés par des cercles bleus dont l'intensité rend compte de la composition microbienne. (ii) La corrélation entre les matrices de distances écologiques et spatiales aboutit à la construction d'un corrélogramme de Mantel. Vert : autocorrélation positive ; rouge : autocorrélation négative. (E) Calcul de *distance decay of similarity*. (i) Les distances spatiales et écologiques sont calculées entre chaque paire d'échantillons racine-écorce. (ii) Les deux séries de distances sont représentées sur un même graphique et la distribution obtenue est modélisée à l'aide d'un modèle mathématique. (F) Analyse de partition de variance incluant la variable spatiale. (i) La matrice de distances spatiales est convertie en (ii) vecteurs utilisés comme variables dans (iii) l'analyse de partition de variance. Dans cet exemple, la distribution spatiale des échantillons (PCNM) explique 28% de la variation totale des communautés microbiennes, dont 8% de manière conjointe avec l'identité des plantes hôtes échantillonnées (Espèces).



Dans certains cas, il peut être intéressant de confronter l'effet, sur une communauté quelconque, d'une contrainte spatiale avec celui d'une ou de plusieurs autres contraintes (e.g., identité des espèces mycorhizées). Un test de Mantel partiel permet par exemple de tester la corrélation entre une matrice de distances écologiques et une matrice de variables environnementales, et ce en contrôlant l'effet des distances spatiales. Cependant, cette approche a été critiquée (Guillot & Rousset, 2013) notamment car le test devient incorrect lorsque les facteurs considérés sont eux même spatialement autocorrélés (c'est le cas par exemple d'orchidées poussant sur le tronc d'un arbre, voir **Article II**).

Aussi, une seconde approche a été utilisée dans la suite de ce manuscrit, et se base sur la conversion de distances spatiales en facteurs numériques utilisables par exemple en analyses d'ordination (i.e., explication des communautés par des variables environnementales). Cette approche par PCNM (*Principal Coordinates of Neighbourhood Matrix*) convertit les distances spatiales en vecteurs numériques (les vecteurs propres associés à la matrice de distance). Ceux-ci sont ensuite sélectionnés (par « sélection *forward* » ; Blanchet *et al.*, 2008) selon leur capacité à significativement rendre compte de la structure spatiale des données. Une fois sélectionnés, ils peuvent être incorporés à diverses analyses comme une analyse de partition de variance qui détermine la part de variabilité des communautés étudiées expliquée par différents facteurs (ex : spatial *versus* identité des espèces hôtes).

Encadré 7. L'île de La Réunion et la forêt de Mare Longue.

L'île de La Réunion est une île volcanique âgée d'environ 2.5 Ma, située à environ 800km à l'Est des côtes de Madagascar, dans l'Océan Indien. Elle appartient à l'archipel des Mascareignes, comprenant également l'île Maurice, et l'île Rodrigues. L'île de la Réunion a été, et continue d'être façonnée par la présence de ses deux volcans : le Piton des Neiges (3069m) éteint il y a environ 10 000 ans et le Piton de la Fournaise (2632m), âgé de seulement 500 000 ans, l'un des volcans les plus actifs au monde.

Du fait d'un important relief et d'une exposition différentielle aux vents entre ses faces est et ouest, l'île comporte une forte variabilité de climats et donc d'écosystèmes naturels. Malheureusement ceux-ci sont fortement menacés par l'urbanisation et la prolifération d'espèces envahissantes. Depuis sa colonisation par l'Homme il y a 4 siècles seulement, l'île a perdu l'essentiel de sa végétation de basse altitude. Les forêts indigènes ne recouvraient plus que 38% de la surface de l'île à la fin des années 1990, ce qui reste malgré tout bien supérieur aux autres îles de l'Archipel où moins de 1% des écosystèmes naturels subsistent encore (Strasberg, 1994).

L'île de la Réunion se caractérise par une richesse floristique relativement faible mais présente un taux d'endémisme très élevé : 34% des 500 espèces indigènes d'Angiospermes sont

endémiques (Strasberg, 1994). Une des familles les plus représentées est celle des orchidées avec près de 150 espèces, dont respectivement 50% sont endémiques des Mascareignes, et 25% de La Réunion (Martos *et al.*, 2012).



Figure E7.1 Vue de la forêt de Mare Longue (La Réunion) dans sa zone la mieux préservée, Avril 2021.

Plusieurs travaux de cette thèse (**Articles II et III**) ont été menés au sud-est de l'île, dans l'un des derniers fragments de forêt humide de basse altitude, et le mieux préservé. Cette forêt constitue la réserve de Mare Longue (**Figure E7.1**), une bande de végétation ininterrompue de 68 ha reliant la partie basse de l'île au volcan (altitude env. 100-700m ; Strasberg, 1994). Le sol est constitué d'une coulée de basalte âgée d'un peu plus de 4 siècles (Albert *et al.*, 2020). De par sa préservation exceptionnelle, la forêt de Mare Longue a fait l'objet de nombreux projets de recensement de végétation, et plusieurs hectares de forêts ont été entièrement cartographiés (ex : Lancaster, 2004). La forêt a suivi une dynamique d'implantation forestière depuis la mise en place de la coulée (Cadet, 1977), et est aujourd'hui constituée d'arbres parfois pluricentennaires atteignant plusieurs dizaines de mètres de haut. Le sol forestier, assombri par la couleur de la lave et par une canopée dense, montre des signes de renouvellement d'arbres endémiques (comme le délicat bois de corail ; *Chassalia corallioides*), malgré l'apparition d'espèces envahissantes, comme *Clidemia hirta*. Les écorces des arbres sont riches d'une flore

épiphyte essentiellement constituée de fougères et d'orchidées. Ces dernières, colonisant parfois densément l'écorce d'un seul tronc, feront l'objet de l'**Article II**. L'une d'entre-elles, l'orchidée épiphyte *Bulbophyllum variegatum*, espèce pleine de mystères retrouvée presque exclusivement sur une seule espèce d'arbre, fera, elle, l'objet de l'**Article III**.

Cette forêt très bien préservée offre une excellente opportunité d'étudier l'écologie mycorhizienne d'espèces épiphytes dans leur état naturel. À titre plus personnel, je suis très heureux d'avoir eu la chance d'y travailler.

Objectifs et problématiques de la thèse

Les symbioses mycorhiziennes des orchidées ont été essentiellement étudiées dans des environnements terrestres, en régions tempérées. Cependant, la majeure partie des espèces d'orchidées sont épiphytes, et nos connaissances sur les symbioses mycorhiziennes de ces espèces restent assez éparées. En particulier, si l'identification des partenaires mycorhiziens des orchidées épiphytes connaît une attention croissante depuis plusieurs années, l'écologie de ces champignons reste encore très peu étudiée.

Cette thèse vise à mieux comprendre l'écologie des champignons mycorhiziens d'orchidées épiphytes, notamment via l'étude de leur distribution spatiale dans les racines des orchidées et dans leur environnement proche. En toile de fond, elle s'interroge également sur les déterminismes des associations orchidées-champignons mycorhiziens : sont-elles régies par des contraintes spatiales, par des contraintes liées à la reconnaissance des partenaires, ou les deux ?

Elle se divise en différents axes, associés à une ou plusieurs questions :

(i) comment se distribuent les champignons mycorhiziens d'orchidées sur les écorces des arbres autour de leurs hôtes ?

(ii) des individus ou espèces d'orchidées qui coexistent spatialement sur l'écorce peuvent-ils partager des champignons mycorhiziens ?

(iii) la distribution spatiale des champignons de l'écorce est-elle hétérogène entre différentes espèces d'arbres dans une forêt ? Cette distribution peut-elle contraindre celle des orchidées sur certains arbres à l'échelle de la forêt ?

La thèse comporte un dernier volet plus appliqué, portant sur la mycorhization des vanilles, des orchidées semi-épiphytes cultivées à La Réunion sous différents modes de culture. Le statut mycorhizien des vanilles (ici *Vanilla planifolia* essentiellement) n'a jamais été étudié dans le sud-ouest de l'océan Indien. La question posée est la suivante :

(iv) quelles sont les communautés mycorhiziennes de la vanille introduite et cultivée à La Réunion et en quoi celles-ci peuvent-elles influencer ou être influencées par les pratiques culturelles ?

Ces différentes questions seront abordées au cours de quatre articles, publiés ou en cours de préparation :

- **L'article I** (publié dans *New Phytologist*) présente les résultats d'une étude menée au Brésil et visant à étudier, par *metabarcoding* environnemental, la distribution spatiale des communautés fongiques de l'écorce et des racines d'orchidées épiphytes poussant sur deux arbres hôtes. Il met en évidence la structuration spatiale des différents groupes fonctionnels de champignons (dont les rhizoctonias) sur l'écorce et l'influence des orchidées épiphytes sur cette structure.
- **L'article II** (publié dans *Journal of Ecology*) s'inscrit dans la continuité de la première étude et vise à corroborer les résultats obtenus dans une autre région à l'île de La Réunion, en cherchant cette fois à maximiser le nombre d'espèces d'orchidées épiphytes coexistant sur un même arbre. Il présente ainsi la manière dont les champignons mycorhiziens mettent en réseau des orchidées épiphytes lorsque celles-ci sont spatialement proches sur l'écorce d'un seul arbre. En annexe, nous aborderons également les relations entre les champignons mycorhiziens de l'écorce et les autres plantes épiphytes (fougères, lianes etc.).
- **L'article III** (en préparation) se concentre sur une espèce d'orchidée épiphyte de sous-bois à La Réunion, *Bulbophyllum variegatum*, et tente d'en étudier la préférence d'hôte, marquée chez cette espèce, par le spectre de ses partenaires mycorhiziens. Par une double approche de *metabarcoding* environnemental et d'expérience de semis *in vitro*, il met en évidence la spécificité mycorhizienne de cette espèce, ainsi que le *turnover* temporel des champignons mycorhiziens.
- **L'article IV** (en préparation) aborde un volet de la thèse appliqué à la culture de la vanille (*Vanilla planifolia*), une orchidée semi-épiphyte introduite et cultivée à La Réunion. Il décrit, par une approche de *metabarcoding*, l'influence des modes de culture sur la mycorhization de la vanille, mais aussi l'influence de ces dernières sur les communautés de pathogènes associées à la plante.

L'ensemble des questions abordées durant la thèse s'intègre dans un projet plus global, financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) et coordonné par Florent Martos (MC MNHN) : « L'épiphytisme en tant qu'écosystème fongique colonisé par les plantes vasculaires (EPIFUN) ». Si les travaux réalisés durant la thèse se concentrent donc sur l'écologie mycorhizienne d'une famille de plantes vasculaires épiphytes, les orchidées, d'autres familles de plantes épiphytes et d'autres guildes de champignons (*i.e.*, non-mycorhiziens) sont également abordés tout au long de ce manuscrit afin de rendre compte, le plus largement possible, du rôle des plantes et des champignons dans la structuration des écosystèmes épiphytes.

Résultats

V. Structure spatiale des communautés fongiques de l'écorce

Article I. *A fine-scale spatial analysis of fungal communities on tropical tree bark unveils the epiphytic rhizosphere in orchids.*

Cet article porte sur l'étude des communautés fongiques de l'écorce de deux espèces d'arbres tropicaux au Brésil (*Siparuna* sp. et *Himathanthus sucuuba*) et des racines de deux espèces d'orchidées épiphytes colonisant leur tronc (*Isochilus linearis* (Jacq.) R.Br. et *Epidendrum armeniacum* Lindl.). L'approche utilisée repose sur un *metabarcoding* de l'ITS-2 fongique d'échantillons de l'écorce et des racines d'orchidées épiphytes. Le schéma expérimental est novateur puisqu'il consiste en un échantillonnage à échelle très fine (de l'ordre du centimètre, avec 348 échantillons analysés) et entièrement spatialisé.

Cette étude dévoile une communauté fongique complexe, constituée de plusieurs guildes fongiques colonisant l'écorce des arbres tropicaux. Chaque guildes présente une forte autocorrélation spatiale, c'est-à-dire que les communautés fongiques ne sont pas homogènes sur l'écorce mais présentent une structure en agrégats, ici de l'ordre de quelques dizaines de centimètres. Cette structure semble influencée par la présence des racines d'orchidées épiphytes, suggérant l'existence d'une rhizosphère épiphyte, c'est-à-dire une zone d'influence des racines épiphytes sur l'écorce environnante. En particulier, les champignons mycorhiziens d'orchidées sont localisés préférentiellement à proximité des racines, ce qui suggère que celles-ci pourraient constituer une niche écologique importante en milieu épiphyte.

Il s'agit à notre connaissance des premiers travaux visant à étudier la distribution spatiale des champignons de l'écorce d'arbres tropicaux à une échelle si fine et *via* une technique de séquençage. Depuis sa publication dans *New Phytologist* en 2021 (Vol. 231), une étude similaire conduite dans une forêt tropicale au Costa Rica a confirmé une partie des résultats obtenus ([Cook et al., 2022](#)). L'apport de cette nouvelle étude sera discuté dans la dernière partie de ce manuscrit (Discussion générale).

Cet article est l'aboutissement d'un travail initié lors de mon stage de Master 2 en janvier 2019. La récolte d'échantillons et leur traitement au laboratoire avaient été effectués en amont du stage et je me suis chargé du traitement des données ainsi que de l'écriture du manuscrit. Ce travail s'intègre dans une série d'études pionnières initiées par Marc-André Selosse au Brésil à la

fin des années 2010. J'ai également participé, dans le cadre de ce projet, à l'avancée d'un second volet portant sur l'influence de l'arbre hôte sur les communautés fongiques épiphytes (laboratoire, traitement bio-informatique des données). Ce second volet sera analysé après la thèse et ne figure pas dans ce manuscrit.

A fine-scale spatial analysis of fungal communities on tropical tree bark unveils the epiphytic rhizosphere in orchids

Rémi Petrolli^{1*} , Conrado Augusto Vieira^{1,2*} , Marcin Jakalski³ , Melissa F. Bocayuva², Clément Vallé¹ , Everaldo Da Silva Cruz² , Marc-André Selosse^{1,2,3†} , Florent Martos^{1†}  and Maria Catarina M. Kasuya^{2†} 

¹Institut de Systématique, Évolution, Biodiversité (ISYEB), Muséum national d'Histoire naturelle, CNRS, EPHE, Sorbonne Université, CP 39, 57 rue Cuvier, Paris F-75005, France;

²Department of Microbiology, Viçosa Federal University (UFV), P. H. Rolfs Street, CEP: 36570-900, Viçosa, Minas Gerais, Brazil; ³Faculty of Biology, University of Gdańsk, ul. Wita Stwosza 59, Gdańsk 80-308, Poland

Summary

Author for correspondence:

Rémi Petrolli

Email: remi.petrolli@mnhn.fr

Received: 9 March 2021

Accepted: 4 May 2021

New Phytologist (2021) **231**: 2002–2014

doi: 10.1111/nph.17459

Key words: epiphytism, fungal guilds, fungal spatial distribution, metabarcoding, orchid mycorrhizal fungi, Tulasnellaceae.

- Approximately 10% of vascular plants are epiphytes and, even though this has long been ignored in past research, are able to interact with a variety of fungi, including mycorrhizal taxa. However, the structure of fungal communities on bark, as well as their relationship with epiphytic plants, is largely unknown.
- To fill this gap, we conducted environmental metabarcoding of the ITS-2 region to understand the spatial structure of fungal communities of the bark of tropical trees, with a focus on epiphytic orchid mycorrhizal fungi, and tested the influence of root proximity.
- For all guilds, including orchid mycorrhizal fungi, fungal communities were more similar when spatially close on bark (i.e. they displayed positive spatial autocorrelation). They also showed distance decay of similarity with respect to epiphytic roots, meaning that their composition on bark increasingly differed, compared to roots, with distance from roots.
- We first showed that all of the investigated fungal guilds exhibited spatial structure at very small scales. This spatial structure was influenced by the roots of epiphytic plants, suggesting the existence of an epiphytic rhizosphere. Finally, we showed that orchid mycorrhizal fungi were aggregated around them, possibly as a result of reciprocal influence between the mycorrhizal partners.

Introduction

Although they are globally distributed, microorganisms exhibit highly variable local richness and show spatial structure at every scale (from centimeters to thousands of kilometers), especially in soils (Green *et al.*, 2004; Green & Bohannan, 2006). Much of the microbial biodiversity observed in soil appears to be intrinsically linked to plants in the rhizosphere and soil–root interactions have been shown to influence their community structure (Bever *et al.*, 2010). Reciprocally, the community structure of soil microorganisms that develop nutritional and protective symbioses with roots are particularly affected by host presence and diversity (Peay *et al.*, 2013) such as the mycorrhizal fungi that associate with *c.* 90% of vascular land flora (Van Der Heijden *et al.*, 2015; Brundrett & Tedersoo, 2018). Fungal metabarcoding studies in soils have shown that mycorrhizal taxa are not randomly distributed but exhibit spatial structure at rather fine scales, in temperate as well as tropical systems (Pickles *et al.*, 2010; Tedersoo *et al.*, 2010; Coince *et al.*, 2013; Anderson *et al.*, 2014; Bahram *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2017); that is, there is a

patchiness due to host distribution, but also due to other factors such as spore dispersal and community interactions (Hanson *et al.*, 2012). However, the characterization of the underground distribution of soil fungi (mycorrhizal fungi, saprotrophs or pathogens) is complicated by the three-dimensional nature of soils, since differences may exist between soil horizons (Anderson *et al.*, 2014; Bahram *et al.*, 2015).

Unlike soils, tree barks can be easily investigated as their multiple layers can all be sampled and sequenced at once, especially on young trees where the bark is usually thin. Thus, young barks can be seen as virtually two-dimensional and are ideal systems for surveying the spatial distribution of fungal communities and mycorrhizal taxa around their epiphytic plant hosts. Indeed, *c.* 10% of vascular plant species root on barks in the tropical wet forests around the globe (Zotz, 2016). These plants have long been considered as essentially nonmycorrhizal in such aerial substrates (Lehnert *et al.*, 2017; Brundrett & Tedersoo, 2018; but see Rowe & Pringle, 2005) and their fungal partners have therefore largely been ignored. However, there is now growing interest in fungal endophytes in epiphytic plant species, as they may strongly influence the population dynamics of such plants (Leroy *et al.*, 2019). One symbiosis that regularly occurs in the epiphytic habitats is the orchid mycorrhiza (Martos *et al.*, 2012; Herrera *et al.*, 2018;

*These authors contributed equally to this work.

†These authors equally supervised this work.

Novotná *et al.*, 2018). Epiphytic orchids, representing $\geq 80\%$ of this hyper-diverse plant family (with over 25 000 species (Givnish *et al.*, 2015)), harbor typical hyphal coils within their root cortical cells, which are formed by the same families but different species of saprotrophic basidiomycetes (Dearnaley *et al.*, 2012; Martos *et al.*, 2012; Xing *et al.*, 2019) than those found in soil. The fungi are also required for germination of the minute, nutrient-poor orchid seeds (Smith & Read, 2008). It was therefore hypothesized that the distribution of orchids must be constrained by that of their mycorrhizal fungi (McCormick & Jacquemyn, 2014; McCormick *et al.*, 2018).

The distribution of orchid mycorrhizal fungi (OMF) has been investigated in soils (Jacquemyn *et al.*, 2014, 2017; McCormick & Jacquemyn, 2014; McCormick *et al.*, 2016, 2018; Voyron *et al.*, 2017), but only marginally on barks (Kartzinel *et al.*, 2013), perhaps because most studies focus on temperate and Mediterranean ecosystems where orchids are strictly terrestrial. For example, two recent studies (Waud *et al.*, 2016a,b) showed a decline in both OMF abundance and the similarity of OMF community composition with distance from adult orchids, which likely explains the patchy distribution of grassland orchids (Jacquemyn *et al.*, 2007, 2014). Still, in grassland habitats, Voyron *et al.* (2017) found that communities of OMF are more similar in adjacent soil locations (i.e. they display spatial autocorrelation; Hanson *et al.*, 2012). As for the epiphytic environment, very little is known on the spatial distribution of mycorrhizal fungi on bark (but see (Izuddin *et al.*, 2019) for a first approach). Similarly, the evolution of their community structure according to distance from epiphytic host roots is not yet resolved. We can only hypothesize that the low hydro-mineral supply (Yoder *et al.*, 2010; Izuddin *et al.*, 2019) and the particular structure of tree bark (e.g. flaking bark, Rasmussen & Rasmussen, 2018) can constrain both orchids and fungi, and make the symbiosis even more necessary for the mycorrhizal partners.

Here, we aim to bridge the knowledge gap on epiphytic fungi, including mycorrhizal fungi, through an investigation of the fine-scale spatial distribution on trees of bark fungi, with a focus on each fungal functional guild (including endophytes), and the OMF in particular. We investigated a low number of trees to enable us to carry out very dense sampling, especially in the vicinity of epiphytic roots, in order to obtain the first detailed view of the structure of fungal communities on bark and of their relationships to vascular epiphytic plants. We made the following hypotheses: first, as described in soils, these communities are not randomly distributed on bark (patchiness); second, due to the ability of many fungi to colonize plant roots, their distribution should be modulated by the distance to roots of vascular epiphytes; and third, communities of OMF should be aggregated around their orchid hosts.

Materials and Methods

Study area

The study site was situated in a protected area of the Atlantic Forest at Parque Estadual Serra do Brigadeiro (Rolim & Ribeiro,

2001), a secondary forest in transition between Dense Rain Forest and Semideciduous Forest (Fávaro, 2012), close to the city of Araponga, Minas Gerais state, Brazil (lat. $20^{\circ}43'15.3''\text{S}$, long. $42^{\circ}28'54.0''\text{W}$; elevation 1050 m). The elevation provides frequent fogs throughout the year, and the humidity is around 80%, even in the dry season. The climate of the region is humid subtropical mesothermic, with temperatures ranging from 17 to 23°C and annual rainfall averaging 1300 mm (Rolim & Ribeiro, 2001). This forest is characterized by medium to large trees and a high diversity of orchid species, the majority of which are epiphytic (Lana *et al.*, 2018).

Bark and root sampling

Two trees, belonging to *Siparuna* sp. (Siparunaceae; tree 1) and *Himathanthus sukuuba* (Apocynaceae; tree 2), were selected in February 2015 and February 2016 (95 m away from each other) respectively because they had epiphytic orchids growing on their lower trunk, namely *Isochilus linearis* (Jacq.) R.Br. and *Epidendrum armeniacum* Lindl. Flexible plastic grids of regular mesh size (7 cm) were placed around these trunks, covering the whole circumference of tree 1 (58 cm, Fig. 1) and tree 2 (23 cm, Supporting Information Fig. S1). Grid 1 extended from 2 to 2.7 m above the ground and encompassed five individuals of *I. linearis*. Grid 2 extended from 0.7 to 2.4 m and encompassed five *I. linearis* and two *E. armeniacum* individuals. On each point of the grid, we sampled 100 mg of bark at the center of every pore of the grid using a sterilized scalpel, without removing the covering lichens, mosses, or liverworts. The samples thus consisted of small amounts of surface bark (up to but not including the cambium) and its cryptogamic cover, which was made easier by the young age of trees and the thinness of these species' bark. We also sampled 3 mm root sections every 1.5 cm along each epiphytic orchid root, starting from the stem (Figs 1, S1), and bark was collected under each root sample. On grid 1, we took additional bark samples in the close vicinity of orchid roots (Fig. 1). This resulted in a total of 482 samples for the two grids (167 on grid 1 and 315 on grid 2; Table S1). The rationale behind this dense sampling method was twofold: we expected a high turnover of fungal communities at a scale of a few cm, and we did not want to miss any important fungi on the bark, especially endophytic ones. All samples were frozen at -20°C within few h, at the nearby field laboratory of the Serra do Brigadeiro State Park headquarters, for downstream molecular analyses. Two additional thin sections of orchid roots surrounding each piece of sample material were collected to check, under a microscope, for mycorrhizal fungal colonization on the following day, and all, without exception, displayed hyphal coils in at least one of each of the inspected sections.

High-throughput sequencing of fungal communities

Bark and root samples were kept frozen and manually ground in liquid nitrogen until a fine powder was obtained. Genomic DNA was extracted from this powder using the NucleoSpin Soil Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) following the manufacturer's instructions. Amplification trials were conducted for each

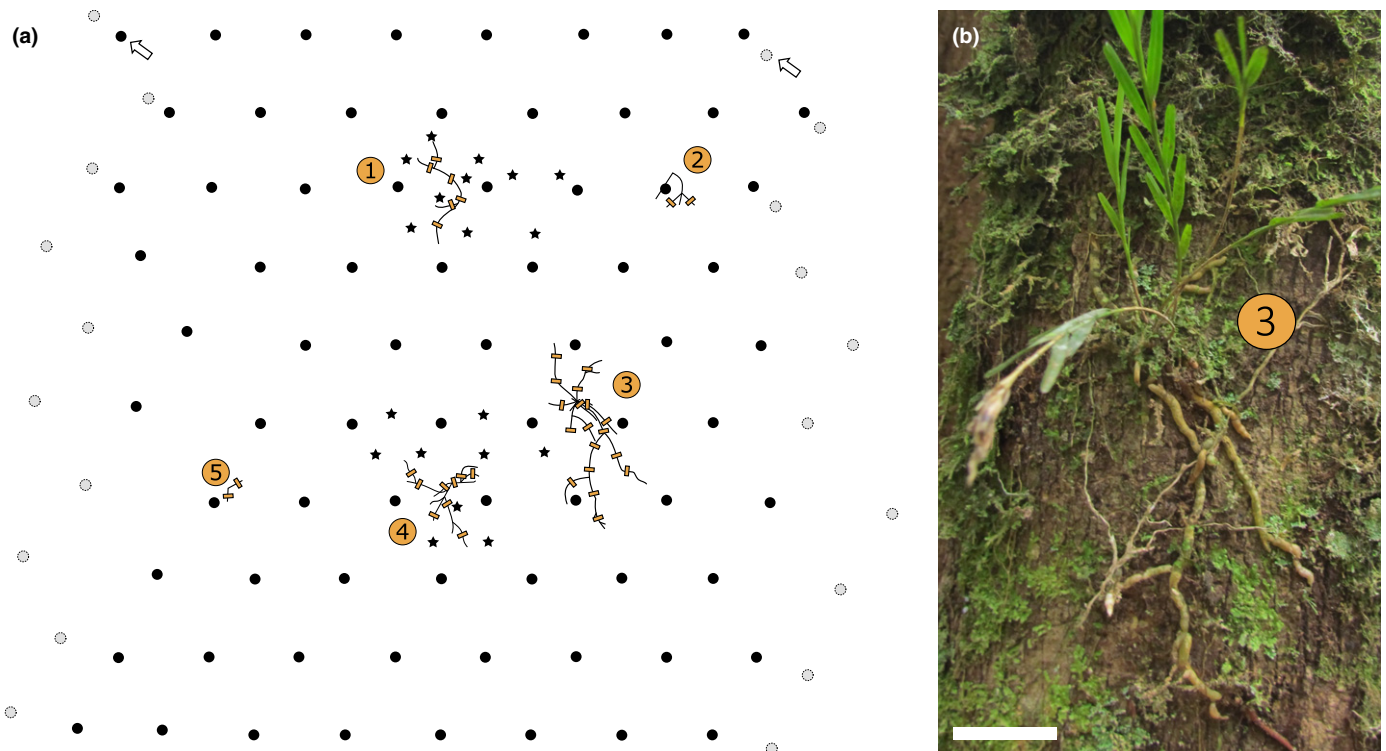


Fig. 1 Sampling design for tree 1. (a) Sampling design of the first tree (*Siparuna* sp.) containing five individuals of the epiphytic orchid *Isochilus linearis* (orange circles, 1–5). Bark was sampled regularly (black filled circles) across the grid, and several additional points were randomly sampled around orchid individuals 1 and 4 (black filled stars). The grid covered the whole circumference of the tree, and the grey filled circles indicate the positions of sampling points on the opposite side of the grid (as an example, the points designated by an arrow are at the same position on the trunk). Orchid roots were regularly sampled along each root (orange filled rectangles). Panel (b) shows a detail of orchid individual 3 before sampling, showing that orchid roots were easily traceable along the trunk, allowing precise spatial analyses. Bar, 3 cm. The sampling design for tree 2 is presented in Supporting Information Fig. S1.

isolate, using two primer pairs: ITS86-F/ITS4 (White *et al.*, 1990; Turenne *et al.*, 1999), amplifying the internal transcribed spacer 2 (ITS-2) of ribosomal DNA (Yang *et al.*, 2018) of most fungi, and ITS86-F/ITS4-tul (Taylor & McCormick, 2008) amplifying the same region in Tulasnellaceae, since this OMF family requires specific primers for amplification of its ribosomal DNA (Martos *et al.*, 2012). High sample multiplexing (up to 576 samples for each primer pair) was made possible by the use of a unique pair of barcoded primers in the polymerase chain reaction (PCR); 36 forward primers (ITS86-F barcodes 1–36) and 16 reverse primers (ITS4 barcodes 1–16 in fungi-specific PCR or ITS4-Tul barcodes 17–32 in Tulasnellaceae-specific PCR) were used. Each barcode was a unique sequence of eight bases added to the 5' end of the primer sequence, and the set of 36 barcodes was designed to have at least five differences between barcodes.

Tagging-system negative controls were implemented at this stage (Hornung *et al.*, 2019; Zinger *et al.*, 2019), that is, pairs of barcoded primers were intentionally omitted in the final sequencing to control for cross-contamination. Polymerase chain reaction was performed with 25 μ l of reaction mixture containing 0.2 mM of each dNTP, 0.2 mM of each primer, 1 unit of AmpliTaq Gold 360 DNA Polymerase (Life Technologies), 1 \times AmpliTaq Buffer supplied with $MgCl_2$, and 1.5 μ l template DNA. The following program was used: initial denaturation, 10 min at 95°C; 30 cycles of denaturation, 30 s at 95°C; annealing, 30 s at 56.5°C (ITS86-F/ITS4) or 55°C (ITS86-F/ITS4-tul); and elongation

30 s at 72°C – final elongation 7 min at 72°C. Plate designs were randomized in order to avoid possible cross-contamination leading to misinterpretation in subsequent spatial analysis. After visualization on gel, the positive amplicons were purified with NucleoMag NGS Clean-up and Size Select (Macherey-Nagel), quantified by fluorescence with Qubit dsDNA High-Sensitivity (Invitrogen), and pooled in equimolar ratios before library preparation and 2 \times 250 bp paired-end sequencing on an Illumina MiSeq platform at Fasteris (Geneva, Switzerland). Three positive controls (mock community) and three negative controls (ultrapure water) were used per PCR trial (plate), resulting in a total of 36 positive and 36 negative controls. All of them were added to the amplicon pool for subsequent bioinformatic analysis (Hornung *et al.*, 2019; Zinger *et al.*, 2019). The mock community used in positive controls was a defined mixture of fungal DNAs of known concentration, including four Ascomycota and 21 Tulasnellaceae strains grown in pure cultures.

Sequencing data processing

Paired reads were merged using BBMERGE (Bushnell *et al.*, 2017) and the resulting reads were demultiplexed using BBDUK (sourceforge.net/projects/bbmap/); mistagging (Zinger *et al.*, 2019) was also controlled but represented < 0.2% of the reads. The reads were trimmed from their barcode+primer sequences, allowing zero discrepancy, filtered for size > 200 bp and quality \geq 25 using

CUTADAPT (Martin, 2011); sequences with 'Ns' were removed at this step. Operational taxonomic units (OTUs) were constructed using the SWARM v.3.0 algorithm (Mahé *et al.*, 2015) with a resolution of 5 (Schneider-Maunoury *et al.*, 2018). Chimeras were removed using both the *de novo* search option of VSEARCH (Rognes *et al.*, 2016) and a reference-based search of UCHIME (Edgar *et al.*, 2011) against the reference dataset v.7.2 (Nilsson *et al.*, 2015). The original (i.e. trimmed) reads were then mapped on the filtered SWARM representative sequences using BLASTN (Altschul *et al.*, 1990) and a 97% threshold. This step deals with sequences of different size, especially when using two sets of primers amplifying different fragment lengths. Operational taxonomic units represented by only one sequence (singletons) were removed. The most abundant sequence was chosen as representative of each OTU, and the final taxonomic assignment was performed using *assign_taxonomy.py* ('blast' assignment method, with default *e*-value of 0.001) in QIIME v.1.9.1 (Caporaso *et al.*, 2010) against UNITE v.8.0 ('All eukaryotes'; <https://dx.doi.org/10.15156/BIO/786350>). Raw sequences are available in the Sequence Read Archive (SRA) under the BioProject accession no. PRJNA692353.

Two OTU tables were retrieved for each primer pair and merged into a single OTU table. Operational taxonomic units were filtered with the DECONTAM package (Davis *et al.*, 2018) using the 'frequency' method. We also discarded those found in the negative and positive PCR controls (Hornung *et al.*, 2019), and those of nonfungal origin. Moreover, we generated rarefaction curves using QIIME v.1.9.1 (Caporaso *et al.*, 2010) (Fig. S2) and then rarefied the OTU table at 10^3 sequences (in order to maximize both the number of samples kept for subsequent analyses and the fungal community read coverage) (McKnight *et al.*, 2019) using the *rrarefy* function in the VEGAN package of R (Oksanen *et al.*, 2013).

Fungal functional guilds

Operational taxonomic units found in at least one orchid root sample were attributed to endophytes. Among them, those Basidiomycota belonging to Tulasnellaceae, Ceratobasidiaceae (Veldre *et al.*, 2013), Serendipitaceae (Weiß *et al.*, 2016), and Atractiellales (Kottke *et al.*, 2010) were recognized as OMF (Dearnaley *et al.*, 2012). Trophic guilds were assigned to all OTUs using FUNGUILD (Zanne *et al.*, 2019): we chose to keep those which were either exclusively saprotrophs, symbiotrophs, plant pathogens, or lichenized fungi. As a consequence of this filter, the majority of OTUs used for guild analysis were identified at least at the genus level (85.3%) or at the family level (97.2%). For the remaining OTUs, guilds provided by FUNGUILD were validated based on the author's expertise. The OMF were kept in a separate category, despite their saprotrophic and symbiotrophic abilities (Dearnaley *et al.*, 2012; Selosse & Martos, 2014).

Statistical analysis

All statistical analyses (except neutral community model analysis, which was conducted using abundance data) were conducted

from presence–absence data because the specific primer pair biased the read counts of Tulasnellaceae relative to other fungi. We tested the effect of sample sources (root or bark, grid 1 or 2) on the composition of fungal communities using PERMANOVA (999 permutations; grids as 'strata') using ADONIS, complemented with a *betadisper* test as indicated in the corresponding R package VEGAN (Oksanen *et al.*, 2013). The data were visually assessed by nonmetric multidimensional scaling ordination (NMDS) using *metaMDS* in VEGAN. Additionally, we tested for each OTU the ecological dispersion from bark to orchid roots using a neutral community model (Sloan *et al.*, 2006), as detailed in studies by Venkataraman *et al.* (2015) and Burns *et al.* (2016). Briefly, for each grid, the relationship between the abundance of an endophytic OTU (considering the OTUs shared between bark and roots only) on the overall bark and the frequency detection of this OTU in roots was compared to a neutral model. This neutral model was computed using the *nlsM* function of the R package MINPACK.LM. The variability of the model was assessed using a 95% binomial proportion confidence interval (Wilson, 1927) using the R package HMISC, and the goodness of fit of the model was assessed using the coefficient of determination (R^2).

For fine-scale spatial analyses, we then calculated Euclidean distances, preferring the shortest distance between two samples on the cylindrical trunk, and the Jaccard index of ecological similarity using *vegdist* in VEGAN. Spatial autocorrelation of fungal communities was analyzed on each grid for composition, using the Mantel test in the R package ECODIST, and for richness, using Moran's *I* test in the R package SPDEP; for the latter, the neighborhood matrix was computed using a neighboring distance of < 10 cm. The significance of the Mantel and Moran's *I* statistics was assessed by permutation testing (999 replicates). We further tested the spatial structures of the single OTUs using the *joincount.test* in SPDEP.

Finally, we assessed the turnover of bark fungal communities with increasing distance from the roots, for OTU composition (i.e. distance decay of similarity, based on Jaccard index, between root and bark samples) and OTU richness using a generalized linear model (GLM; *glm* function in the R default package) specifying a log-link binomial (Millar *et al.*, 2011) and a negative binomial distribution respectively. As the similarities between samples are not independent of one another, coefficients of the binomial GLM were obtained using a leave-one-out Jackknife procedure as described previously (Millar *et al.*, 2011). The significance of the distance decay of similarity was tested using a permutational Mantel test (Spearman method, 9999 permutations; Anderson *et al.*, 2013), while the significance of the distance decay of richness was assessed by ANOVA (F-test).

Results

Roots and bark harbored distinct but partially overlapping fungal communities

We retrieved a total of 22 554 729 reads after the molecular analyses and high-throughput sequencing. The primer pair ITS86-F/ITS4 yielded much more data and diversity (6823 OTUs, $36 477 \pm 31 597$ sequences per sample) than the specific ITS86-F/

ITS4-tul set of primers (41 OTUs, including 17 Tulasnellaceae, $15\,589 \pm 11\,583$ sequences per sample). Eighteen OTUs, including two Tulasnellaceae, were amplified by both sets of primers. Ascomycota from positive controls (mock community) were all retrieved after sequencing, while Tulasnellaceae showing no mismatch with IT86-F and ITS4 or ITS4-tul primers were often but not always (56%) retrieved after sequencing, depending on their DNA quality and/or concentration.

After removing the controls, 3 121 888 sequences passed our quality (removal of contaminants) and taxonomic filters (fungi only), resulting in a total of 4 390 fungal OTUs in the whole dataset (348 samples, Table S1), comprising mostly Ascomycota (2670) and Basidiomycota (1303) sequences, but also Chytridiomycota (23), Mortiellomycota (9), Mucoromycota (7), Rozellomycota (2), Glomeromycota (1) and unidentified fungi (375). Overall, Agaricomycetes (Basidiomycota) were the most abundant (1 782 079 sequences; 57.08%), followed by Dothideomycetes (Ascomycota; 507 594 sequences; 16.26%; Fig. S3; Table S2). The list of all fungal families and genera detected in the dataset is presented in Table S3. Notably, Sebaciales OTUs all belonged to the clade of Serendipitaceae (data not shown; Weiß *et al.*, 2016).

Fungal richness (average number of OTUs per sample) was significantly different between bark and roots within each grid (i.e. grid 1 (116 ± 90 in bark, 42 ± 32 in roots) and grid 2 (125 ± 63 in bark, 255 ± 108 in roots; $P < 0.001$ in both cases)), as well as between roots ($P < 0.001$) and between bark ($P = 0.0081$) from the two grids.

Total fungal communities were significantly different between both grids (PERMANOVA: $F = 13.91$, $R^2 = 0.047$, $P = 0.001$, *betadisper.* $F = 12.69$, $P < 0.001$), and between roots and bark (PERMANOVA: $F = 4.57$, $R^2 = 0.016$, $P = 0.001$, *betadisper.* $F = 29.67$, $P < 0.001$), as shown by nested PERMANOVA. Additionally, grids and compartments (root vs bark) were clearly segregated in NMDS analyses (Fig. 2) despite significant heteroscedasticity, which has been shown to weakly affect PERMANOVA testing (Anderson & Walsh, 2013). However, 265 (18.8%) and 1000 (38.4%) OTUs were shared between bark and roots in grids 1 and 2, respectively (Table S4). Neutral community model (NCM) analyses showed that, on both grids, endophytic fungal communities tended to differ from a neutral dispersal model 'from bark to roots', and were, on the contrary, largely overrepresented in the root compartment (Figs S4, S5). Only lichenized fungi on grid 2 were unambiguously less overrepresented in roots than other fungi (Fig. S6). When considering roots only, fungal communities differed between orchid individuals (PERMANOVA: $F = 1.39$, $R^2 = 0.148$, $P = 0.001$, *betadisper.* $F = 98.47$, $P < 0.001$) and species (PERMANOVA: $F = 1.92$, $R^2 = 0.023$, $P = 0.001$, *betadisper.* $F = 10.48$, $P = 0.002$), but more strikingly between grids (PERMANOVA: $F = 4.91$, $R^2 = 0.058$, $P = 0.001$, *betadisper.* $F = 23.96$, $P < 0.001$; Fig. S7), with only 237 (10.36%) shared OTUs (Table S4).

Among the 31 OMF OTUs that were found, encompassing the four OMF families (see 'Fungal functional guilds' in the Materials and Methods section, above; Fig. 3), only five OTUs were shared between the two trees after rarefaction (Table S4)

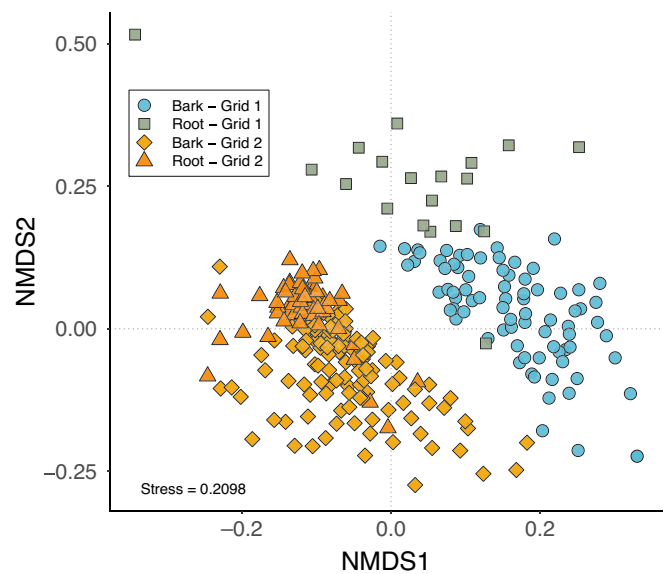


Fig. 2 Nonmetric multidimensional scaling (NMDS) on total fungal community, considering all samples and presence/absence data. Stress = 0.2098. Nested PERMANOVA revealed significant differences between both grids ($F = 13.91$, $R^2 = 0.047$, $P = 0.001$, *betadisper.* $F = 12.69$, $P < 0.001$), sample type (root vs bark; $F = 4.57$, $R^2 = 0.016$, $P = 0.001$, *betadisper.* $F = 29.67$, $P < 0.001$) and their interaction ($F = 3.07$, $R^2 = 0.011$, $P = 0.001$).

and only one OTU (Tulasnellaceae, TUL-1) when considering the roots only (Tables S4, S5). However, the sharing of OMF between the grids was not statistically different to that of other fungi, meaning that the trees harbored different fungal communities overall. On grid 2, where two orchid species co-exist, OMF OTUs belonging to Ceratobasidiaceae (CER-1) and Serendipitaceae (SER-1) were shared between the two species when they were spatially close (Table S5; Fig. S1). Among the OMF found in roots, only 50% (2/4) and 47% (7/15) were also retrieved on bark on grid 1 and 2, respectively (Table S4), so that root communities did not appear to be only a subset of adjacent bark communities.

All fungal communities were spatially structured

All functional guilds, except lichenized fungi on grid 1 and symbiotrophs on both grids, showed significant spatial autocorrelation of OTU composition (Mantel test; Table 1). Among the different guilds, OMF on grid 2 showed positive spatial autocorrelation within 30 cm, which was the largest distance detected in this study (Fig. 4). The whole fungal community, as well as endophytes alone, also showed positive spatial autocorrelation within 15 and 18 cm on grids 1 and 2, respectively. For the other guilds, that is, lichenized fungi, plant pathogens, saprotrophs, and symbiotrophs, spatial autocorrelation was more significant on grid 2, with positive autocorrelation between 0 and 10–20 cm, whereas for grid 1, it was observed within the first 10 cm only. The mean Jaccard index for adjacent points separated by 14 cm tended to be higher vertically than horizontally (comparison possible on grid 1 only;

Fig. 3 Operational taxonomic unit (OTU) composition of the orchid mycorrhizal fungi (OMF) communities in orchid roots. Bars show the cumulative proportion of sequences (in %) for each OTU in each orchid individual. One *Isochilus linearis* individual on grid 1 has been removed because of the absence of detected OMF in its roots. Bar colors indicate the OTU family. The number of samples available for each individual (N_{samples}) as well as the number of OMF OTUs (N_{OTUs}) found in them are given above each bar. The orchid individual numbers at the bottom of the graph refer to the sampling designs illustrated in Fig. 1 and Supporting Information Fig. S1. See Table S5 for further details concerning these communities. *E. armeniacum*, *Epidendrum armeniacum*; *I. linearis*, *Isochilus linearis*.

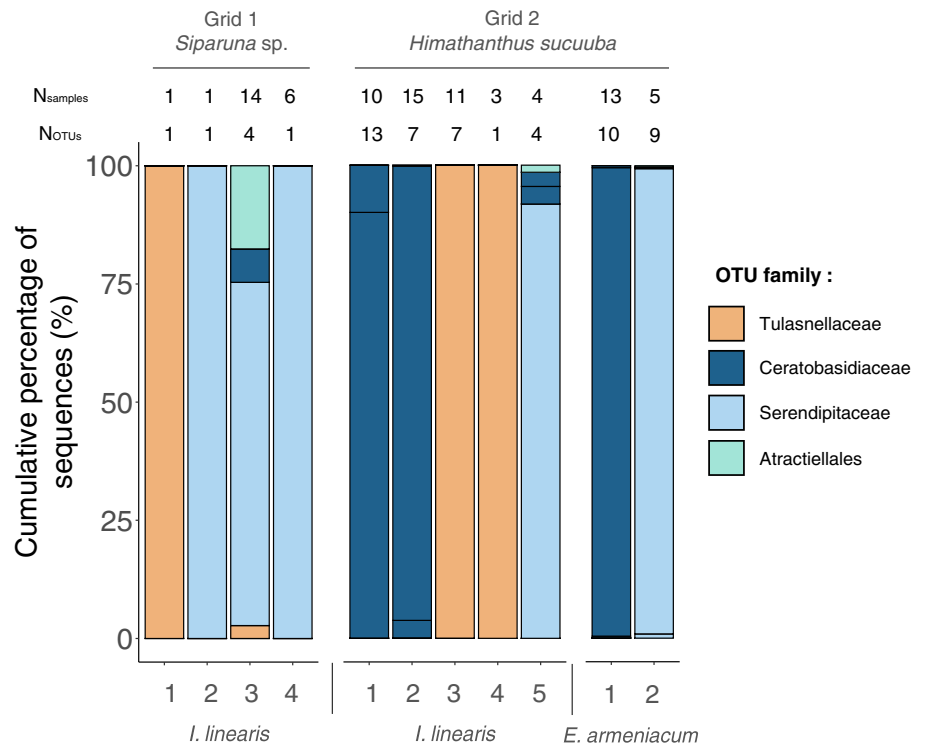


Table 1 General spatial features for each fungal guild.

Guild	Grid	No. of OTUs	Mantel <i>R</i>	Sim. dec. β slope; <i>r</i>
Total	1	2445	0.238***	0.013; 0.231*
	2	3724	0.215***	0.004; 0.235***
Endophyte	1	1816	0.234***	0.012; 0.201*
	2	3233	0.191***	0.004; 0.235***
OMF	1	14	0.206***	0.005; -0.291 ^{ns}
	2	31	0.560***	0.035; 0.604***
Lichenized	1	196	0.005 ^{ns}	0.043; 0.123 ^{ns}
	2	263	0.072**	0.006; 0.032 ^{ns}
Plant pathogen	1	333	0.098**	0.013; 0.012 ^{ns}
	2	493	0.091**	0.002; 0.144**
Saprotroph	1	637	0.125**	-0.002; 0.082 ^{ns}
	2	956	0.070**	0.002; 0.092*
Symbiotroph	1	26	-0.005 ^{ns}	0.009; 0.392*
	2	55	0.094 ^{ns}	0.003; -0.041 ^{ns}

The number of operational taxonomic units (OTUs) in each guild is given before rarefaction. Mantel *R* index and Sim. dec. β slope (slope of similarity decay between bark and roots, based on Jaccard index, and associated *r* value for the Mantel test; see Supporting Information Table S8 for details) are calculated after rarefaction. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ns, not significant.

Fig. S8), but due to large variation in the values the difference was not statistically supported.

Regarding spatial autocorrelation of OTU richness, all fungal guilds, except symbiotrophs on grid 1, showed a significant autocorrelation (Moran's *I*; Table S7). Orchid mycorrhizal fungi exhibited positive autocorrelation at the largest distances on both grids (30 cm).

Spatial autocorrelation of single OTUs showed that only OMF on grid 2 tended to be more frequently spatially clustered than other fungi (Table S6). Orchid mycorrhizal fungal families showed vertical stratification on grid 2 that covered a greater height on the tree (1.7 m), whereas this pattern was not obvious on grid 1 (covering 0.7 m only; Fig. S9).

Epiphytic roots influenced all fungal communities

The Jaccard similarity between root and bark fungal compositions significantly decreased with increasing distance from the roots for the whole fungal community on both grids (Fig. 5). This was also observed for endophytes on both grids, for non-OMF symbiotrophs on grid 1 only, and for OMF, plant pathogens and saprotrophs on grid 2 only (Table 1; Fig. 5; see also Fig. S10 and Table S8 for details). The distance decay of bark fungal richness showed contrasting results, with either nonsignificant or opposing results between grids (Figs S12–S14; Table S9).

The evolution of density (i.e. spatial density based on occurrence data) of OMF on bark at a distance from colonized roots showed that they were spatially distributed in close proximity to the roots on both grids, but contrasting spatial structures were detected between OMF families on grid 2 (with Tulasnellaceae tending to spread at a longer distance from roots; Fig. S11). However, by comparing the density distribution of OMF with that of endophytes (distance from roots beyond which 80% of the occurrences of a given OTU are limited), the OMF were not statistically closer to roots than other endophytes (Wilcox tests, $W = 370$, $P = 0.423$ and $W = 1142$, $P = 0.397$ for grids 1 and 2, respectively).

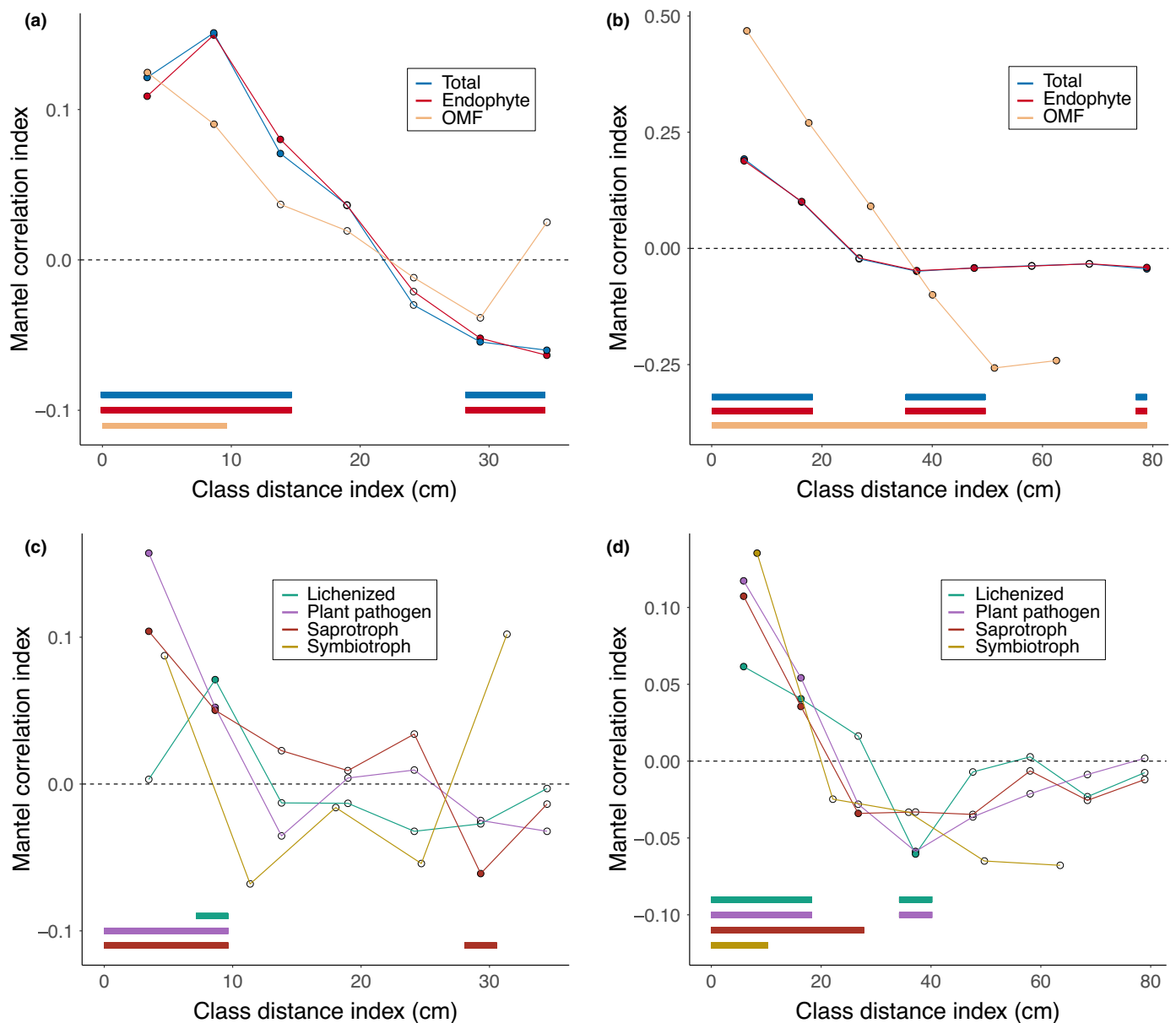


Fig. 4 Spatial autocorrelation of fungal community composition. Mantel correlograms show spatial autocorrelation based on the presence/absence of (a, b) total fungal community, fungal endophytes and orchid mycorrhizal fungi (OMF) and (c, d) lichenized, plant pathogen, saprotroph and symbiotroph fungal guilds (Jaccard index) for (a, c) grid 1 and (b, d) grid 2. A positive value corresponds to a positive autocorrelation, and a negative value corresponds to a negative autocorrelation. Filled circles indicate a statistically significant value. The thick lines at the bottom of each plot indicate the significant spatial autocorrelation distance for each guild represented. Total and endophyte curves are confounded on panel (b).

Discussion

Features of fungal communities on bark compared to soil

The majority of fungal OTUs identified on the investigated tree barks belonged to Ascomycota (61%) and Basidiomycota (30%), even if the latter were the most abundant in reads. Other phyla that are usually associated with plants, such as arbuscular mycorrhizal fungi of the Glomeromycotina division, (Spatafora *et al.*, 2017), were largely missing in our dataset. These fungi poorly amplify with ITS primers (Berruti *et al.*, 2017) and, according to

some observational studies (Lehnert *et al.*, 2017), they are less represented (but not absent, see for instance Rowe & Pringle, 2005) in epiphytic environments than in soils. Conversely, saprotrophic fungi are particularly expected on barks, including the ones known to be symbiotically associated with epiphytic orchids (Kottke *et al.*, 2010; Martos *et al.*, 2012; Herrera *et al.*, 2018; Novotná *et al.*, 2018). It is noteworthy that Tulasnellaceae were broadly retrieved from barks and roots on both trees, which shows the relevance of using specific primers (Tedersoo *et al.*, 2015), even though we cannot exclude the possibility that some *Tulasnella* species did not amplify with these primers.

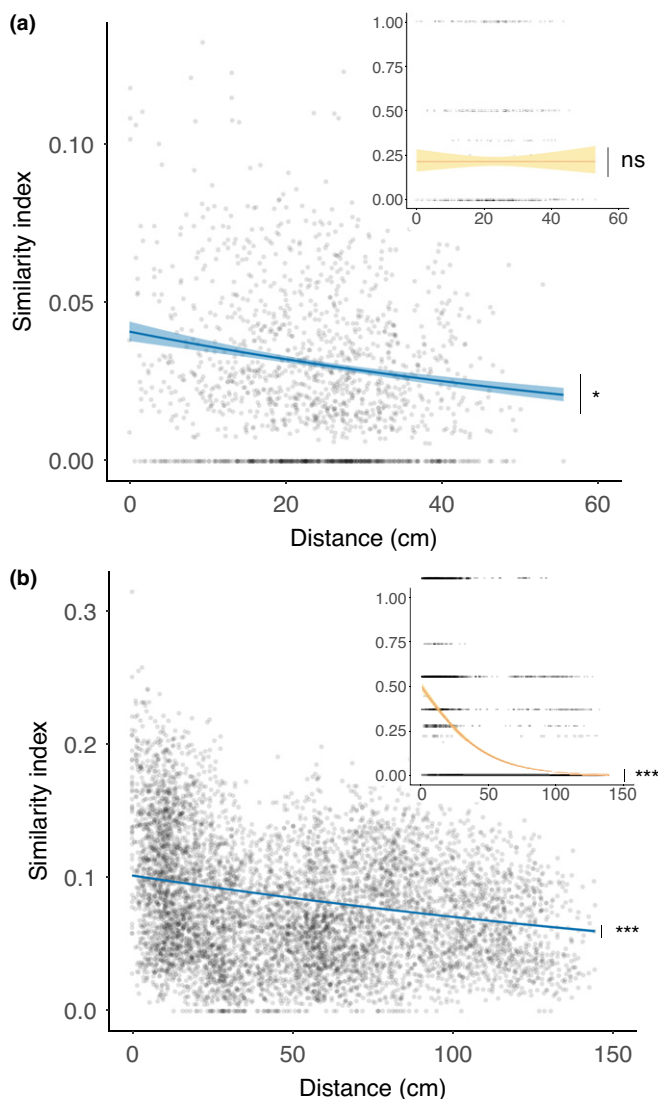


Fig. 5 Distance decay of similarity (based on Jaccard index) between roots and bark for total fungal community (large panel, blue) and orchid mycorrhizal fungi (OMF; small panel, orange) community for (a) grid 1 and (b) grid 2. Colored lines show the regressions of a binomial generalized linear model (GLM, log-link function) and the colored areas represent the associated 95% confidence interval. Asterisks denote statistically significant trends, according to the Mantel test (*, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$; ns, not significant). See Supporting Information Table S8 for details.

Fungal metabarcoding has long been carried out in soils and in soil-dwelling plant roots (Schmidt *et al.*, 2013). Soils are complex three-dimensional environments where fungal species and functional groups occupy different horizons (Anderson *et al.*, 2014; Bahram *et al.*, 2015), and where mycorrhizal fungi may not be easily found outside the rhizosphere (Egidi *et al.*, 2018), perhaps due to insufficiently deep investigations. Conversely, bark, especially when thin, offers a nearly two-dimensional environment suitable for exhaustive sampling of microbial species in space and time. While bark has been commonly studied in the context of diseases (e.g. Arrigoni *et al.*, 2020), it has only very recently been

regarded as a niche for other fungal guilds (Izuddin *et al.*, 2019; Eskov *et al.*, 2020).

Here, the fungal communities growing on two trees were clearly distinct, both on the bark and in the roots of epiphytes (Figs 2, S7). Although the purpose of our sampling was to characterize fungal diversity within rather than between trees, we can expect that the structure of epiphytic fungal communities is very complex (Kembel & Mueller, 2014; Vacher *et al.*, 2016) and far from understood. In both cases, they encompassed much more diverse guilds than the expected saprotrophic and lichenized fungi, showing the complexity of fungal communities as well as the presence in the environment of endophytic and symbiotrophic fungi. Furthermore, 377 fungal OTUs (8.6%) could not be identified at a lower taxonomic rank, suggesting that a high and previously unknown fungal diversity exists in such a tropical environment (Cevallos *et al.*, 2018).

As we chose to work on young trees, the thinness of their bark did not allow us to test for a possible differentiation of the fungal communities throughout the bark layers (e.g. inner vs outer bark), but future studies could focus on this question using older trees with more differentiated barks. However, this thinness allowed us to exhaustively sample fungal communities at a given position. Whether these communities are spatially structured or are either homogeneously or randomly distributed remained an open question, which we investigated in this study.

Most operational taxonomic units tend to have an endophytic niche on bark

In soils, there is growing evidence that fungal communities are spatially structured (Blaalid *et al.*, 2012; Kadowaki *et al.*, 2014; Bahram *et al.*, 2016). In our study, total and endophytic communities showed similar and strong spatial turnover on bark (Fig. 4; Table 1). This suggests there is no difference between fungi that are able to colonize living roots and those that are not. This may be because most fungi regarded as endophytes only colonize roots superficially (e.g. in orchid velamen; Herrera *et al.*, 2010) without any functional interaction with the plants; yet many endophytic fungi are likely to extend away from plant tissues and have a partially free-living lifestyle (i.e. not within plant tissues; Selsos *et al.*, 2018). In our study, most of the fungi were found to be endophytes (34.63% and 78.25% for grids 1 and 2, respectively; Table S4). These results reveal that on bark much of the fungal community is able to colonize epiphytic roots, probably because they contain more assimilable carbon than the oligotrophic surrounding bark. Accordingly, saprotrophs and plant pathogens tended to be slightly more present in roots than the rest of the community (though this finding was nonsignificant for plant pathogens). On the other hand, lichenized fungi, which can acquire their own carbon through photosynthesis, were less present in roots than other fungi (Table S4).

Neutral community model analyses revealed that endophytes tended to occur more frequently in roots than expected by neutral dispersal processes (Fig. S4), which may suggest that root

colonization by endophytic fungi is not passive but rather is actively built by hyphal foraging. Interestingly, lichenized fungi on grid 2 tended to occur less frequently in roots than expected by neutral dispersal processes (Fig. S6), suggesting that some fungi colonize (or contaminate) roots accidentally. However, contrary to air dispersal, in the context of which this model was initially applied (Venkataraman *et al.*, 2015), fungi may instead disperse through hyphae growth (not sporulation) at the small scales studied here. Thus, the filtering of fungal communities by the root compartment, although expected, may reflect the abundance of these fungi on adjacent bark. The sampling procedure applied here successfully allowed us to investigate the very fine-scale spatial structure of fungal guilds on the bark in proximity to epiphytic roots.

All fungal communities exhibit intrinsic spatial structure

All trophic guilds exhibited spatial structure on at least one tree (Fig. 4). Consistent with previous results on soil communities (Bahram *et al.*, 2016; Voyron *et al.*, 2017), OMF (despite their low statistical power due to the limited number of OTUs), saprotrophs and plant pathogens were the most spatially structured communities, as shown by Mantel (Table 1; Fig. 4) and Moran's *I* (Table S7) tests, perhaps because they exploit resources that are more localized than, for example, lichenized fungi. As tree bark is subjected to water runoff, one might expect that fungal communities would be more similar vertically than horizontally: this trend was observed but not statistically supported on grid 1 (Fig. S8). However, this analysis was limited by the small diameter of the trunks, which limits horizontal measurement (especially on grid 2), and a limited vertical range. Future sampling may investigate a possible axis-dependence of epiphytic fungal communities.

Mycorrhizal fungi in particular are known to display spatial structure (Bahram *et al.*, 2015), for example in ectomycorrhizal (Pickles *et al.*, 2010; Tedersoo *et al.*, 2010; Coince *et al.*, 2013; Anderson *et al.*, 2014), arbuscular (Whitcomb & Stutz, 2007), ericoid (Toju *et al.*, 2016) and orchid mycorrhizal fungi (Voyron *et al.*, 2017). Orchid mycorrhizal fungi from grassland soils display spatial autocorrelation up to several m (Voyron *et al.*, 2017), whereas in our study spatial autocorrelation was limited to a few tens of cm (Fig. 4). Although a weak spatial structure is not excluded in soil (Oja *et al.*, 2016), this suggests that epiphytic OMF (or perhaps epiphytic fungi as a whole) experience stronger competition for space on the limited bark surface and thus are more segregated in this environment than in soils (Lekberg *et al.*, 2007; Mujic *et al.*, 2016). A nonexclusive explanation may be the fact that the stressing and oligotrophic epiphytic environment of the plant limits the availability of carbohydrates and, from there, the foraging ability of the mycorrhizal mycelia. Alternatively, the turnover of the bark substrate by radial growth, leading to flaking bark (Rasmussen & Rasmussen, 2018), could also disturb microbial communities, preventing them from spreading throughout the bark surface.

In a recent study, Izuddin *et al.* (2019) showed that fungal communities vary between microsites (stem/branch/fork) on

tropical trees. Our study highlights the fact that even without any apparent heterogeneity of substrate, bark fungal communities have a spatial structure and are neither randomly nor homogeneously distributed. As discussed in the next sub-section ('Roots influence all fungal communities in the epiphytic rhizosphere', below), vascular epiphytes, like orchids, also influence the diversity and spatial structure of fungal communities. Barks devoid of epiphytes would thus be of interest, as they could be used to compare the composition and spatial structure of fungal communities in the absence of epiphytic roots. Even though trees devoid of epiphytes can be scarce in tropical rainforests (and are often associated with altered habitat), we encourage such investigations for future studies as we cannot exclude the possibility that contrasting patterns might be found. Here, as we tested the influence of these epiphytes on fungal communities, we chose trees colonized by orchids and showed for the first time that they can shape epiphytic fungal communities.

Roots influence all fungal communities in the epiphytic rhizosphere

Roots are generally colonized by numerous fungi which positively or negatively interact with the plants (e.g. mycorrhizal fungi or fungal pathogens). It can thus be hypothesized that these fungal communities are influenced by the presence of roots (Goldmann *et al.*, 2016; Waud *et al.*, 2016a; Zhang *et al.*, 2017), and *vice versa*. For instance, it has recently been shown that saprotrophic, pathotrophic and symbiotrophic fungi in soil were more abundant near roots (Zhang *et al.*, 2017). Our analysis of richness confirmed this tendency on grid 2 only (Figs S12, S14), showing that the distance decay of richness at a distance from roots is dependent upon the study system.

However, all of the fungal guilds except lichenized fungi (see also the sub-section 'Most operational taxonomic units tend to have an endophytic niche on bark', above) were influenced by the presence of epiphytic roots, at least on one grid. Thus, this significant decay of fungal community similarity with distance from the roots (Figs 5, S10; Table S8) does suggest the presence of an epiphytic 'rhizosphere' similar to that classically described in soils. The mechanisms of this rhizosphere influence may differ from one guild to another. For instance, while the OMF should get direct or indirect nutrient and/or protection benefits from the orchid roots (Dearnaley *et al.*, 2012), plant pathogenic fungi should be attracted by the living plants (Morris *et al.*, 1998), and saprotrophic fungi should benefit from root exudates (Sun & Fries, 1992).

For OMF particularly, the strong decay of similarity observed on grid 2 (Waud *et al.*, 2016a), with short halving distance (Table S8), as well as the quasi-absence of OMF at a distance higher than 60 cm from colonized roots (Fig. S11), suggests that the roots, but also their close vicinity, act as their main ecological niche (Dearnaley *et al.*, 2012). Although the latter observation and conclusion are often not reported in OMF analyses in soil (Egidi *et al.*, 2018), this may be due to problems of vertical depth of sampling, which are alleviated by the thinness of the bark environment studied here.

Fungal communities could modulate epiphytic plant population dynamics

The clustered structure of the epiphytic fungal communities and the existence of an epiphytic root rhizosphere, although the two are intrinsically linked, should strongly influence plant establishment and dynamics. For orchids especially, whose seeds lack reserves and depend on OMF for germination (Dearnaley *et al.*, 2012), it is likely that the distribution of plants may be controlled by OMF distribution (McCormick & Jacquemyn, 2014; but see a balanced view in Kartzinel *et al.*, 2013).

Here, the OMF were more spatially clustered than any other fungi (Table S6), as reflected in the vertical stratification on grid 2 (Fig. S9), which suggests that they could strongly constrain orchid seed germination. In soil, it has also been proposed that the patchiness of orchid individuals (Jacquemyn *et al.*, 2007) could be due to that of their mycorrhizal partners (Jacquemyn *et al.*, 2012). Additionally, plant pathogens should also be involved in the establishment of epiphytic plants by modulating the probability of a seedling becoming established (Sarmiento *et al.*, 2017). In future, experimental approaches coupled to metabarcoding may investigate, again with ease as the system is nearly two-dimensional, whether epiphytic orchid seed germination can be predicted from the fungal community at the site of seed deposition (Kartzinel *et al.*, 2013).

Conclusion and perspectives

While metabarcoding studies are increasingly used to describe microbial communities and their spatial structure (Schmidt *et al.*, 2013), epiphytic habitats of tropical environments have been largely overlooked in such research (McCormick *et al.*, 2018). We show for the first time that fungi and their trophic guilds, in accordance with our first hypothesis, are spatially structured on barks colonized by vascular epiphytes, and that this structure is influenced by the presence of their roots. We thus suggest that a rhizosphere effect also exists for epiphytic plants, and particularly concerning OMF fungi, confirming our second and third hypotheses, respectively. Additionally, some fungi, including OMF or pathogens, may also have influenced the presence of the orchid roots (e.g. through seed germination), and the mechanisms behind this epiphytic rhizosphere are yet to be explored.

Although the two tree species were colonized by distinct fungal communities, the results were consistent between them, and we therefore postulate that the observed features can be viewed as default expectations for other bark fungal communities. However, future investigations in other epiphytic environments, especially environments colonized by epiphytes with arbuscular mycorrhizal fungi, are needed to test this hypothesis and further shed light on epiphytic fungal communities and their interactions with plants.

In this study, we observed a vertical niche differentiation for OMF communities, but not for other fungal guilds, probably because our sampling design was not appropriate for the investigation of such vertical gradients. Yet, our observations also suggested that there may be a lower degree of vertical structure

than horizontal structure. As both biotic (e.g. interspecific competition) and abiotic (e.g. water runoff) factors should influence vertical niche segregation, future studies should focus on bark microbial communities of taller forest trees (Izuno *et al.*, 2016) and their roles as potential drivers of epiphytic plant population structure and dynamics.

Acknowledgements


We are very grateful for the financial support from the following Brazilian institutions: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES – Finance Code 001), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). FM was funded by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-19-CE02-0002). The authors thank the Service de Systématique Moléculaire (UMS2700 MNHN/CNRS) for access to its facilities, David Marsh for English corrections and Tomas Gomes Reis Veloso for help with sampling. We also acknowledge the administration and scientific staff of the Instituto Estadual de Floresta of the State of Minas Gerais and Serra do Brigadeiro State Park for their provision of facilities and for permission (license no. 066/2016) to conduct exploratory surveys in their protected areas. Finally, the authors thank the anonymous referees as well as the editor for their helpful remarks on the manuscript. We declare no conflict of interest regarding this work.


Author contributions

M-AS and MCMK designed the study. CAV, MFB and EDSV performed the sampling and the molecular analyses. RP, FM, MJ and CV analyzed the data and wrote the manuscript, which was edited by all co-authors.


ORCID


Conrado Augusto Vieira  <https://orcid.org/0000-0003-0312-2882>


Everaldo Da Silva Cruz  <https://orcid.org/0000-0003-0828-5496>


Marcin Jakalski  <https://orcid.org/0000-0002-5481-9148>

Maria Catarina M. Kasuya  <https://orcid.org/0000-0002-9539-9370>

Florent Martos  <https://orcid.org/0000-0003-1213-5466>

Rémi Petrolli  <https://orcid.org/0000-0001-8079-6130>

Marc-André Selosse  <https://orcid.org/0000-0003-3471-9067>

Clément Vallé  <https://orcid.org/0000-0003-3814-7975>

Data availability

Raw sequences are available in the Sequence Read Archive (SRA) under the BioProject accession no. PRJNA692353. The bioinformatic pipeline is provided on the GitHub page of the corresponding author (<https://github.com/PetrolliR/MetaBarkCod>)

ing.git). Authors can provide initial tables and metadata upon reasonable request.

References

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403–410.
- Anderson IC, Genney DR, Alexander IJ. 2014. Fine-scale diversity and distribution of ectomycorrhizal fungal mycelium in a Scots pine forest. *New Phytologist* 201: 1423–1430.
- Anderson MJ, Tolimieri N, Millar RN. 2013. Beta diversity of demersal fish assemblages in the North-Eastern Pacific: interactions of latitude and depth. *PLoS ONE* 8: e57918.
- Anderson MJ, Walsh DCI. 2013. PERMANOVA, ANOSIM, and the Mantel test in the face of heterogeneous dispersions: what null hypothesis are you testing? *Ecological Monographs* 83: 557–574.
- Arrigoni E, Albanese D, Longa CMO, Angeli D, Donati C, Ioriatti C, Pertot I, Perazzolli M. 2020. Tissue age, orchard location and disease management influence the composition of fungal and bacterial communities present on the bark of apple trees. *Environmental Microbiology* 22: 2080–2093.
- Bahram M, Kohout P, Anslan S, Harend H, Abarenkov K, Tedersoo L. 2016. Stochastic distribution of small soil eukaryotes resulting from high dispersal and drift in a local environment. *ISME Journal* 10: 885–896.
- Bahram M, Peay KG, Tedersoo L. 2015. Local-scale biogeography and spatiotemporal variability in communities of mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 205: 1454–1463.
- Beruti A, Desirò A, Visentin S, Zecca O, Bonfante P. 2017. ITS fungal barcoding primers versus 18S AMF-specific primers reveal similar AMF-based diversity patterns in roots and soils of three mountain vineyards. *Environmental Microbiology Reports* 9: 658–667.
- Bever JD, Dickie IA, Facelli E, Facelli JM, Klironomos J, Moora M, Rillig MC, Stock WD, Tibbett M, Zobel M. 2010. Rooting theories of plant community ecology in microbial interactions. *Trends in Ecology and Evolution* 25: 468–478.
- Blaalid R, Carlsen T, Kumar S, Halvorsen R, Ugland KI, Fontana G, Kausrud H. 2012. Changes in the root-associated fungal communities along a primary succession gradient analysed by 454 pyrosequencing. *Molecular Ecology* 21: 1897–1908.
- Brundrett MC, Tedersoo L. 2018. Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytologist* 220: 1108–1115.
- Burns AR, Stephens WZ, Stagaman K, Wong S, Rawls JF, Guillemin K, Bohannan BJM. 2016. Contribution of neutral processes to the assembly of gut microbial communities in the zebrafish over host development. *ISME Journal* 10: 655–664.
- Bushnell B, Rood J, Singer E. 2017. BBMerge – accurate paired shotgun read merging via overlap. *PLoS ONE* 12: e0185056.
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JI *et al.* 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods* 7: 335–336.
- Cevallos S, Herrera P, Sánchez-Rodríguez A, Declerck S, Suárez JP. 2018. Untangling factors that drive community composition of root associated fungal endophytes of Neotropical epiphytic orchids. *Fungal Ecology* 34: 67–75.
- Coince A, Caël O, Bach C, Lengellé J, Cruaud C, Gavory F, Morin E, Murat C, Marçais B, Buée M. 2013. Below-ground fine-scale distribution and soil versus fine root detection of fungal and soil oomycete communities in a French beech forest. *Fungal Ecology* 6: 223–235.
- Davis NM, Proctor DM, Holmes SP, Relman DA, Callahan BJ. 2018. Simple statistical identification and removal of contaminant sequences in marker-gene and metagenomics data. *Microbiome* 6. doi: 10.1186/s40168-018-0605-2.
- Dearnaley JDW, Martos F, Selosse MA. 2012. Orchid mycorrhizas: molecular ecology, physiology, evolution and conservation aspects. In: Hock B, ed. *Fungal associations, 2nd edn. The Mycota IX*. Berlin/Heidelberg, Germany: Springer, 207–230.
- Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R. 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 27: 2194–2200.
- Egidi E, May TW, Franks AE. 2018. Seeking the needle in the haystack: undetectability of mycorrhizal fungi outside of the plant rhizosphere associated with an endangered Australian orchid. *Fungal Ecology* 33: 13–23.
- Eskov AK, Voronina EY, Tedersoo L, Tiunov AV, Manh V, Prilepsky NG, Antipina VA, Elumeeva TG, Abakumov EV, Onipchenko VG. 2020. Orchid epiphytes do not receive organic substances from living trees through fungi. *Mycorrhiza* 30: 697–704.
- Fávaro LB. 2012. Estudo ecológico e econômico da palmeira Juçara (*Euterpe edulis* Mart.) no entorno do Parque Estadual Serra do Brigadeiro (PESB), MG.
- Givnish TJ, Spalink D, Ames M, Lyon SP, Hunter SJ, Zuluaga A, Iles WJD, Clements MA, Arroyo MTK, Leebens-Mack J *et al.* 2015. Orchid phylogenomics and multiple drivers of their extraordinary diversification. *Proceedings of the Royal Society B* 282: 20151553.
- Goldmann K, Schröter K, Pena R, Schöning I, Schrupf M, Buscot F, Polle A, Wubet T. 2016. Divergent habitat filtering of root and soil fungal communities in temperate beech forests. *Scientific Reports* 6. doi: 10.1038/sre p31439.
- Green J, Bohannan BJM. 2006. Spatial scaling of microbial biodiversity. *Trends in Ecology and Evolution* 21: 501–507.
- Green J, Holmes A, Westoby M, Oliver I, Briscoe D, Dangerfield M, Gillings M, Beattie A. 2004. Spatial scaling of microbial diversity. *Nature* 432: 747–750.
- Hanson CA, Fuhrman JA, Horner-Devine MC, Martiny JBH. 2012. Beyond biogeographic patterns: processes shaping the microbial landscape. *Nature Reviews Microbiology* 10: 497–506.
- Van Der Heijden MGA, Martín FM, Selosse MA, Sanders IR. 2015. Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytologist* 205: 1406–1423.
- Herrera P, Suárez JP, Kottke I. 2010. Orchids keep the ascomycetes outside: a highly diverse group of ascomycetes colonizing the velamen of epiphytic orchids from a tropical mountain rainforest in Southern Ecuador. *Mycology* 1 (4), 262–268.
- Herrera P, Suárez JP, Kottke I, Méndez M, Molina MC, Méndez M, Suárez JP. 2018. Generalism in the interaction of Tulasnellaceae mycobionts with orchids characterizes a biodiversity hotspot in the tropical Andes of Southern Ecuador. *Mycoscience* 59: 38–48.
- Hornung BVH, Zwittink RD, Kuijper EJ. 2019. Issues and current standards of controls in microbiome research. *FEMS Microbiology Ecology* 95. doi: 10.1093/ femsec/fiz045.
- Izuddin M, Srivathsan A, Lee AL, Yam TW, Webb EL. 2019. Availability of orchid mycorrhizal fungi on roadside trees in a tropical urban landscape. *Scientific Reports* 9, 19528.
- Izuno A, Kanzaki M, Artchawakom T, Wachrinrat C, Isagi Y. 2016. Vertical structure of phyllosphere fungal communities in a tropical forest in Thailand uncovered by high-throughput sequencing. *PLoS ONE* 11: e0166669.
- Jacquemyn H, Brys R, Lievens B, Wiegand T. 2012. Spatial variation in below-ground seed germination and divergent mycorrhizal associations correlate with spatial segregation of three co-occurring orchid species. *Journal of Ecology* 100: 1328–1337.
- Jacquemyn H, Brys R, Merckx VSFT, Waud M, Lievens B, Wiegand T. 2014. Coexisting orchid species have distinct mycorrhizal communities and display strong spatial segregation. *New Phytologist* 202: 616–627.
- Jacquemyn H, Duffy KJ, Selosse M-A. 2017. Biogeography of orchid mycorrhizas. In: Tedersoo L, ed. *Biogeography of mycorrhizal symbiosis*. Cham, Switzerland: Springer International, 159–177.
- Jacquemyn H, Rein B, Katrien V, Olivier H, Isabel R-R, Thorsten W. 2007. A spatially of seedling recruitment in analysis explicit the terrestrial orchid *Orchis purpurea*. *New Phytologist* 176: 448–459.
- Kadowaki K, Sato H, Yamamoto S, Tanabe AS, Hidaka A, Toju H. 2014. Detection of the horizontal spatial structure of soil fungal communities in a natural forest. *Population Ecology* 56: 301–310.
- Kartzinel TR, Trapnell DW, Shefferson RP. 2013. Critical importance of large native trees for conservation of a rare neotropical epiphyte. *Journal of Ecology* 101: 1429–1438.
- Kembel SW, Mueller RC. 2014. Plant traits and taxonomy drive host associations in tropical phyllosphere fungal communities. *Botany-Botanique* 92: 303–311.

- Kottke I, Garnica S, Herrera P, Cruz D, Haug I, Suárez JP, Bauer R. 2010. Atractiellomycetes belonging to the 'rust' lineage (Pucciniomycotina) form mycorrhizae with terrestrial and epiphytic neotropical orchids. *Proceedings of the Royal Society B* 277: 1289–1298.
- Lana LG, Escobar TF, Godinho EM, Peluzio LE. 2018. Survey of Orchidaceae species of Serra das Cabeças, in Parque Estadual da Serra do Brigadeiro, Araponga-MG, Brazil. *Horticultura Brasileira* 36: 156–166.
- Lehnert M, Krug M, Kessler M. 2017. A review of symbiotic fungal endophytes in lycophytes and ferns – a global phylogenetic and ecological perspective. *Symbiosis* 71: 77–89.
- Lekberg Y, Koide RT, Rohr JR, Aldrich-Wolfe L, Morton JB. 2007. Role of niche restrictions and dispersal in the composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Journal of Ecology* 95: 95–105.
- Leroy C, Maes AQM, Louisanna E, Séjalon-Delmas N. 2019. How significant are endophytic fungi in bromeliad seeds and seedlings? Effects on germination, survival and performance of two epiphytic plant species. *Fungal Ecology* 39: 296–306.
- Mahé F, Rognes T, Quince C, de Vargas C, Dunthorn M. 2015. Swarmv2: highly-scalable and high-resolution amplicon clustering. *PeerJ* 3: e1420.
- Martin M. 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* 17: 10–12.
- Martos F, Munoz F, Pailler T, Kottke I, Gonneau C, Selosse M-A. 2012. The role of epiphytism in architecture and evolutionary constraint within mycorrhizal networks of tropical orchids. *Molecular Ecology* 21: 5098–5109.
- McCormick MK, Jacquemyn H. 2014. What constrains the distribution of orchid populations? *New Phytologist* 202: 392–400.
- McCormick MK, Taylor DL, Whigham DF, Burnett RK. 2016. Germination patterns in three terrestrial orchids relate to abundance of mycorrhizal fungi. *Journal of Ecology* 104: 744–754.
- McCormick MK, Whigham DF, Canchani-Viruet A. 2018. Mycorrhizal fungi affect orchid distribution and population dynamics. *New Phytologist* 219: 1207–1215.
- McKnight DT, Huerlimann R, Bower DS, Schwarzkopf L, Alford RA, Zenger KR. 2019. Methods for normalizing microbiome data: an ecological perspective. *Methods in Ecology and Evolution* 10: 389–400.
- Millar RB, Anderson MJ, Tolimieri N. 2011. Much ado about nothings: using zero similarity points in distance-decay curves. *Ecology* 92: 1717–1722.
- Morris PF, Bone E, Tyler BM. 1998. Chemotropic and contact responses of *Phytophthora sojae* hyphae to soybean isoflavonoids and artificial substrates. *Plant Physiology* 117: 1171–1178.
- Mujic AB, Durall DM, Spatafora JW, Kennedy PG. 2016. Competitive avoidance not edaphic specialization drives vertical niche partitioning among sister species of ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist* 209: 1174–1183.
- Nilsson RH, Tedersoo L, Ryberg M, Kristiansson E, Hartmann M, Unterseher M, Porter TM, Bengtsson-Palme J, Walker DM, De Sousa F *et al.* 2015. A comprehensive, automatically updated fungal ITS sequence dataset for reference-based chimera control in environmental sequencing efforts. *Microbes and Environments* 30: 145–150.
- Novotná A, Benítez Á, Herrera P, Cruz D, Filipczykóvá E, Suárez JP. 2018. High diversity of root-associated fungi isolated from three epiphytic orchids in southern Ecuador. *Mycoscience* 59: 24–32.
- Oja J, Vahtra J, Bahram M, Kohout P, Kull T, Rannap R, Kõljalg U, Tedersoo L. 2016. Local-scale spatial structure and community composition of orchid mycorrhizal fungi in semi-natural grasslands. *Mycorrhiza* 27: 355–367.
- Oksanen J, Guillaume Blanchet RK, Legendre P, Minchin PR, O'Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Henry H, Stevens HW. 2013. *Vegan: community ecology package*. [WWW document] URL <http://cran.r-project.org/package=vegan> [accessed 15 February 2018].
- Peay KG, Baraloto C, Fine PVA. 2013. Strong coupling of plant and fungal community structure across western Amazonian rainforests. *ISME Journal* 7: 1852–1861.
- Pickles BJ, Genney DR, Potts JM, Lennon JJ, Anderson IC, Alexander IJ. 2010. Spatial and temporal ecology of Scots pine ectomycorrhizas. *New Phytologist* 186: 755–768.
- Rasmussen HN, Rasmussen FN. 2018. The epiphytic habitat on a living host: reflections on the orchid – tree relationship. *Botanical Journal of the Linnean Society* 186: 456–472.
- Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahé F. 2016. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* 4: e2584.
- Rolim FA, Ribeiro GA. 2001. INPE, Poster Session. In: *Levantamento do potencial turístico do parque estadual da Serra do Brigadeiro – PESB com o Suporte em Geoprocessamento*. X Simpósio brasileiro de sensoriamento remoto, Foz do Iguaçu, Brazil, 967–969.
- Rowe AR, Pringle A. 2005. Morphological and molecular evidence of arbuscular mycorrhizal fungal associations in Costa Rican epiphytic bromeliads. *Biotropica* 37: 245–250.
- Sarmiento C, Zalamea PC, Dalling JW, Davis AS, Stump SM, U'Ren JM, Arnold AE. 2017. Soilborne fungi have host affinity and host-specific effects on seed germination and survival in a lowland tropical forest. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 114: 11458–11463.
- Schmidt PA, Bálint M, Greshake B, Bandow C, Römbke J, Schmitt I. 2013. Illumina metabarcoding of a soil fungal community. *Soil Biology and Biochemistry* 65: 128–132.
- Schneider-Maunoury L, Leclercq S, Clément C, Covès H, Lambourdière J, Sauve M, Richard F, Selosse MA, Taschen E. 2018. Is *Tuber melanosporum* colonizing the roots of herbaceous, non-ectomycorrhizal plants? *Fungal Ecology* 31: 59–68.
- Selosse MA, Martos F. 2014. Do chlorophyllous orchids heterotrophically use mycorrhizal fungal carbon? *Trends in Plant Science* 19: 683–685.
- Selosse MA, Schneider-Maunoury L, Martos F. 2018. Time to re-think fungal ecology? Fungal ecological niches are often prejudged. *New Phytologist* 217: 968–972.
- Sloan WT, Lunn M, Woodcock S, Head IM, Nee S, Curtis TP. 2006. Quantifying the roles of immigration and chance in shaping prokaryote community structure. *Environmental Microbiology* 8: 732–740.
- Smith SE, Read DJ. 2008. *Mycorrhizal symbiosis*. Cambridge, UK: Elsevier.
- Spatafora JW, Aime MC, Grigoriev IV, Martin F, Stajich JE, Blackwell M. 2017. The fungal tree of life: from molecular systematics to genome-scale phylogenies. *Microbiology Spectrum* 5: 3–34.
- Sun YP, Fries N. 1992. The effect of tree-root exudates on the growth rate of ectomycorrhizal and saprotrophic fungi. *Mycorrhiza* 1: 63–69.
- Taylor DL, McCormick MK. 2008. Internal transcribed spacer primers and sequences for improved characterization of basidiomycetous orchid mycorrhizas. *New Phytologist* 177: 1020–1033.
- Tedersoo L, Anslan S, Bahram M, Põlme S, Riit T, Liiv I, Kõljalg U, Kisand V, Nilsson H, Hildebrand F *et al.* 2015. Shotgun metagenomes and multiple primer pair-barcode combinations of amplicons reveal biases in metabarcoding analyses of fungi. *MycKeys* 10: 1–43.
- Tedersoo L, Sadam A, Zambrano M, Valencia R, Bahram M. 2010. Low diversity and high host preference of ectomycorrhizal fungi in Western Amazonia, a neotropical biodiversity hotspot. *ISME Journal* 4: 465–471.
- Toju H, Tanabe AS, Ishii HS. 2016. Ericaceous plant–fungus network in a harsh alpine-subalpine environment. *Molecular Ecology* 25: 3242–3257.
- Turenne CY, Sanche SE, Hoban DJ, Karlowsky JA, Kabani AM. 1999. Rapid identification of fungi by using the ITS2 genetic region and an automated fluorescent capillary electrophoresis system. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 1846–1851.
- Vacher C, Cordier T, Vallance J. 2016. Phyllosphere fungal communities differentiate more thoroughly than bacterial communities along an elevation gradient. *Microbial Ecology* 72: 1–3.
- Veldre V, Abarenkov K, Bahram M, Martos F, Selosse M-A, Tamm H, Kõljalg U, Tedersoo L. 2013. Evolution of nutritional modes of Ceratobasidiaceae (Cantharellales, Basidiomycota) as revealed from publicly available ITS sequences. *Fungal Ecology* 6: 256–268.
- Venkataraman A, Bassis CM, Beck JM, Young VB, Curtis JL, Huffnagle GB, Schmidt TM. 2015. Application of a neutral community model to assess structuring of the human lung microbiome. *mBio* 6. doi: 10.1128/mbio.02284-14.
- Voyron S, Ercole E, Ghignone S, Perotto S, Girlanda M. 2017. Fine-scale spatial distribution of orchid mycorrhizal fungi in the soil of host-rich grasslands. *New Phytologist* 213: 1428–1439.
- Waud M, Busschaert P, Lievens B, Jacquemyn H. 2016a. Specificity and localised distribution of mycorrhizal fungi in the soil may contribute to co-existence of orchid species. *Fungal Ecology* 20: 155–165.

- Waud M, Wiegand T, Brys R, Lievens B, Jacquemyn H. 2016b. Nonrandom seedling establishment corresponds with distance-dependent decline in mycorrhizal abundance in two terrestrial orchids. *New Phytologist* 211: 255–264.
- Weiß M, Waller F, Zuccaro A, Selosse M-A. 2016. Sebaciales – one thousand and one interactions with land plants. *New Phytologist* 211: 20–40.
- Whitcomb S, Stutz JC. 2007. Assessing diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a local community: role of sampling effort and spatial heterogeneity. *Mycorrhiza* 17: 429–437.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Shinsky JJ, White TJ, eds. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. London, UK: Academic Press, 315–322.
- Wilson EB. 1927. Probable inference, the law of succession, and statistical inference. *Journal of the American Statistical Association* 22: 209–212.
- Xing X, Jacquemyn H, Gai X, Gao Y, Liu Q, Zhao Z, Guo S. 2019. The impact of life form on the architecture of orchid mycorrhizal networks in tropical forest. *Oikos* 128: 1254–1264.
- Yang RH, Su JH, Shang JJ, Wu YY, Li Y, Bao DP, Yao YJ. 2018. Evaluation of the ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS), specifically ITS1 and ITS2, for the analysis of fungal diversity by deep sequencing. *PLoS ONE* 13: 0206428
- Yoder JA, Imfeld SM, Heydinger DJ, Hart CE, Collier MH, Gribbins KM, Zettler LW. 2010. Comparative water balance profiles of Orchidaceae seeds for epiphytic and terrestrial taxa endemic to North America. *Plant Ecology* 211: 7–17.
- Zanne AE, Abarenkov K, Afkhami ME, Aguilar-Trigueros CA, Bates S, Bhatnagar JM, Busby PE, Christian N, Cornwell WK, Crowther TW *et al.* 2019. Fungal functional ecology: bringing a trait-based approach to plant-associated fungi. *Biological Reviews* 95: 409–433.
- Zhang K, Adams JM, Shi Y, Yang T, Sun R, He D, Ni Y, Chu H. 2017. Environment and geographic distance differ in relative importance for determining fungal community of rhizosphere and bulk soil. *Environmental Microbiology* 19: 3649–3659.
- Zinger L, Bonin A, Alsos IG, Bálint M, Bik H, Boyer F, Chariton AA, Creer S, Coissac E, Deagle BE *et al.* 2019. DNA metabarcoding – need for robust experimental designs to draw sound ecological conclusions. *Molecular Ecology* 28: 1857–1862.
- Zotz G. 2016. *Plants on plants – the biology of vascular epiphytes*. Heidelberg/Berlin, Germany: Springer International.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

- Fig. S1** Sampling design of tree 2.
- Fig. S2** Rarefaction curves.
- Fig. S3** Global fungal composition.
- Fig. S4** Application of a neutral community model (NCM) to fungal endophytes.
- Fig. S5** Operational taxonomic unit (OTU) deviation from the neutral community model (NCM).
- Fig. S6** Fungal guild deviation from the neutral community model (NCM).

Fig. S7 Nonmetric multidimensional scaling (NMDS) on total fungal community, considering root samples only.

Fig. S8 Turnover of fungal community on vertical vs horizontal axis.

Fig. S9 Vertical density distribution of orchid mycorrhizal fungal (OMF) families.

Fig. S10 Distance decay of similarity from roots for other fungal guilds.

Fig. S11 Density distribution of orchid mycorrhizal fungi (OMF) at a distance from roots.

Fig. S12 Distance decay of bark richness from roots for total fungal community.

Fig. S13 Distance decay of bark richness from roots for orchid mycorrhizal fungal (OMF) community.

Fig. S14 Distance decay of bark richness from roots for other fungal guilds.

Table S1 Details of the sampling depth.

Table S2 Global fungal composition.

Table S3 Fungal composition at family and genus levels.

Table S4 Number of operational taxonomic units (OTUs) shared between roots and bark compartments in each grid.

Table S5 Orchid mycorrhizal fungal (OMF) composition of orchid roots.

Table S6 Spatial autocorrelation of operational taxonomic units (OTUs).

Table S7 Spatial autocorrelation of richness based on Moran's *I*.

Table S8 Generalized linear model (GLM) result parameters for distance decay of similarity.

Table S9 ANOVA results for distance decay of bark richness from roots.

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

Supporting information

Supporting information of **Article I** can be accessed at the following link:

<https://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/nph.17459>

VI. Réseaux mycorhiziens épiphytes

Article II. *Spatial turnover of fungi and partner choice shape mycorrhizal networks in epiphytic orchids*

Cet article présente les résultats d'une étude des réseaux d'interactions entre des orchidées épiphytes et leurs champignons mycorhiziens. En effet, l'**Article I** de ce manuscrit a suggéré un partage de champignons mycorhiziens entre orchidées épiphytes voisines sur l'écorce, mais les tendances soulevées ne reposaient que sur une poignée d'individus. Dans cette nouvelle étude, nous avons voulu (i) confirmer, dans une forêt tropicale de La Réunion les résultats obtenus dans l'**Article I** (au Brésil) et (ii) étudier plus en détails les réseaux mycorhiziens épiphytes suggérés. Pour cela, nous avons échantillonné les racines d'orchidées épiphytes appartenant à 10 espèces différentes et poussant sur deux espèces d'arbres différentes (6 arbres au total), ainsi que l'écorce de ces arbres. Le schéma expérimental est similaire à celui réalisé dans l'**Article I** (*i.e.*, échantillonnage spatialisé à échelle très fine), mais cette fois nous nous sommes concentrés sur l'échantillonnage des racines (348 échantillons au total) par rapport aux écorces (206 échantillons au total, dont 105 analysés).

Les résultats confirment l'existence de réseaux mycorhiziens épiphytes : des orchidées épiphytes spatialement proches sur l'écorce partagent des champignons mycorhiziens, cela même lorsqu'elles appartiennent à des espèces ou à des stades de croissance différents. De plus, l'analyse de réseaux conduite sur chaque arbre hôte révèle une structure modulaire des réseaux plantes-champignons fortement expliquée par le choix des partenaires (spécificité orchidée-champignon mycorhizien) mais aussi par la structure spatiale du réseau (disposition des orchidées et des communautés fongiques sur l'arbre). Ces résultats confirment ainsi l'importance de la composante spatiale dans la structure des réseaux d'interactions plantes-champignons, et nous invitent à étudier plus en détail la fonctionnalité de ces réseaux. Notamment, il sera désormais nécessaire de vérifier si les réseaux formés ont une importance écologique (par exemple transfert d'eau ou de nutriments entre plantes par des hyphes fongiques et phénomènes de facilitation), c'est-à-dire s'ils se comportent en réseaux mycorhiziens communs (CMNs) épiphytes.

Dans cette étude, nous avons fait le choix de nous concentrer sur les réseaux mycorhiziens d'orchidées, en sélectionnant les champignons étudiés. Des analyses complémentaires, et non publiées, suggèrent également que le partage de ces champignons peut avoir lieu entre orchidées

et autres plantes épiphytes (fougères notamment). Ces résultats préliminaires seront brièvement exposés à la suite de cet article et discutés à la fin de ce manuscrit.

Les données présentées dans cet article sont issues d'une mission d'échantillonnage que nous avons menée avec une partie de l'équipe à La Réunion en Février 2020. J'ai ensuite pris en charge les analyses moléculaires, bio-informatiques et statistiques des données, ainsi que la rédaction de l'article, en collaboration avec tous les co-auteurs.

RESEARCH ARTICLE

Spatial turnover of fungi and partner choice shape mycorrhizal networks in epiphytic orchids

Rémi Petrolli¹ | Lucie Zinger^{2,3} | Benoît Perez-Lamarque^{1,2} |
Géromine Collobert¹ | Chantal Griveau¹ | Thierry Paillet⁴ |
Marc-André Selosse^{1,5,6} | Florent Martos¹

¹Institut de Systématique, Évolution, Biodiversité (ISYEB), Muséum national d'Histoire naturelle, CNRS, Sorbonne Université, EPHE, Université des Antilles, Paris, France; ²Institut de Biologie de l'ENS (IBENS), École normale supérieure, CNRS, INSERM, Université PSL, Paris, France; ³Naturalis Biodiversity Center, Leiden, The Netherlands; ⁴Herbier de l'Université de La Réunion, UMR C53 Cirad-Université, Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical, St Pierre, La Réunion, France; ⁵Department of Plant Taxonomy and Nature Conservation, University of Gdańsk, Gdańsk, Poland and ⁶Institut Universitaire de France (IUF), Paris, France

Correspondence

Rémi Petrolli

Email: remi.petrolli@mnhn.fr

Funding information

Agence Nationale de la Recherche, Grant/
Award Number: ANR-19-CE02-0002

Handling Editor: Hans Jacquemyn

Abstract

1. In soils, plants and fungi can form complex mycorrhizal networks allowing nutrient transfers between plant individuals and species. It is less clear, however, whether such networks exist on the bark of trees where epiphytic plant communities thrive in rainforests. Previous work showed that tropical epiphytic orchids especially, harbour symbiotic fungi in their roots, but the structure and determinants of the resulting networks remain unknown at the tree scale.
2. We tested the hypothesis that epiphytic orchids rooted in the same area on the bark share mycorrhizal fungi, regardless of their species (i.e. spatial determinant). For this purpose, we selected the trunk of six trees of two common species in a rainforest and sampled orchid roots, protocorms and surrounding bark. We identified mycorrhizal fungi including Tulasnellaceae using high-throughput sequencing of the ITS2 marker, and reconstructed orchid–fungus bipartite networks for each tree to analyse their structure and the spatial turnover of this symbiosis.
3. We found that epiphytic orchid communities form antinested and highly modular networks with mycorrhizal fungi spread on the bark. As expected, modules of interactions are explained by their spatial structure, with nearby roots sharing fungi, but also by the orchid species involved. These results reveal the presence of shared mycelial networks in epiphytic habitats, whose roles in the resilience and facilitation of epiphytic plant communities need to be assessed.
4. *Synthesis.* Tropical tree barks are densely colonized by certain mycorrhizal fungi that can form symbioses in nearby adult and young orchids simultaneously. These mycorrhizal networks may allow water and nutrient transfers to alleviate the stressful conditions of the epiphytic habitats.

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2022 The Authors. *Journal of Ecology* published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of British Ecological Society.

1 | INTRODUCTION

Most vascular plants harbour mutualistic fungi in their roots, forming associations called mycorrhizas (Brundrett & Tedersoo, 2018; Van Der Heijden et al., 2015). Mycorrhizas are chimeric organs, composed of both plant tissues and fungal hyphae, where nutrient exchanges can occur in both directions (Smith & Read, 2008). While plants provide photosynthetic acquired carbon to their fungal partners, the latter improve the hydro-mineral nutrition of their host and enhance their defence against both biotic and abiotic stresses. As mycorrhizal fungi can associate with plants of the same (Beiler et al., 2010) or different species (Richard et al., 2005; Selosse et al., 2002), they are known to form complex networks of interactions with roots in soils (e.g. Jacquemyn et al., 2015; Rog et al., 2020; Toju et al., 2014, 2016).

Plant–fungus networks can be classified into two categories: ecological networks, in which fungal species or operational taxonomic units (OTUs) interact with plant species that do not obligately co-occur, meaning that the fungi do not necessarily link different plant species in a given site, and physical networks, where single fungal mycelia can simultaneously interact with several plant individuals. Regarding mycorrhizas, physical networks have often been referred to as common mycorrhizal networks (CMNs; Simard & Durall, 2004; Van Der Heijden & Horton, 2009). Because they involve physical contacts between plant roots mediated by fungal hyphae, such networks can lead to fungal-mediated plant–plant interactions. First, two plants connected to the same fungus may asymmetrically contribute to its carbon need, resulting in a benefit for the less providing one (Walder et al., 2012). Second, both nutrients and information exchanges can occur between plants species (Klein et al., 2016; Selosse & Roy, 2009; Simard et al., 1997, 2015) even though their consequences are not always easy to experiment or observe (Booth, 2004; Liang et al., 2020).

Plant–fungus interaction networks have been mainly studied in soils, especially in temperate ecosystems. By contrast, tropical ecosystems have been largely overlooked, especially when considering the epiphytic habitat where plants grow on tree bark and twigs. Indeed, epiphytes represent 9% of vascular plants world-wide (Zotz, 2016), reaching up to 25% in tropical ecosystems (Nieder et al., 2001). Notably, these plants can undergo transient water and nutrient limitation between rainfall events (Yoder et al., 2010; Zotz, 2016). By mediating nutrients and/or water transfers between co-occurring plants, the networks formed by plants and fungal mycelia could thus be highly advantageous in the epiphytic habitat (Leake & Cameron, 2012) as also previously suggested in terrestrial mycorrhizal mutualisms (Bingham & Simard, 2011).

Epiphytic plants were long considered to lack mycorrhizal associations (Brundrett & Tedersoo, 2018) but many works are now demonstrating that mycorrhizas of the same or different types compared to their terrestrial counterparts, are also frequent in the epiphytic habitat (e.g. Kottke et al., 2010; Martos et al., 2012; Petrolli et al., 2021; Rowe & Pringle, 2005). Particularly, 70% of the epiphytic plant species are members of the Orchidaceae family (Zotz, 2016).

This family comprises no less than 28,000 species (Christenhusz & Byng, 2016), >80% of which are epiphytic (Givnish et al., 2015).

Orchids form one of the major types of mycorrhizas (Brundrett & Tedersoo, 2018), called orchid endomycorrhiza, which is constantly found throughout the family (Selosse et al., 2022; Smith & Read, 2008; Wang et al., 2021) in terrestrial as well as in epiphytic orchids (Dearnaley et al., 2012, 2016; Martos et al., 2012). The orchid–fungus symbiosis is atypical because it takes the form of intracellular hyphal structures called pelotons, and because fungal partners are required at each step of the plant life cycle from the symbiotic germination of the orchid dust seeds to the colonization of adult roots (Rasmussen, 1995; Smith & Read, 2008). Orchid mycorrhizal fungi (OMF) form a polyphyletic group of mostly Basidiomycota and, to a lesser extent, Ascomycota (Dearnaley et al., 2012; Selosse et al., 2022; Wang et al., 2021). In green photosynthetic orchids, the main fungal partners belong to the historically called ‘rhizoctonias’ (Dearnaley et al., 2012; Selosse et al., 2011) which include members of the Cantharellales (namely Ceratobasidiaceae and Tulasnellaceae; Veldre et al., 2013) and Sebaciniales (namely Serendipitaceae; Weiß et al., 2016).

On bark, orchids seem to associate with a limited range of fungal partners, including rhizoctonias (Herrera et al., 2019; Izuddin et al., 2019; Martos et al., 2012; Petrolli et al., 2021), as well as other fungal families such as *Mycena* (Zhang et al., 2012), *Fusarium* (Jiang et al., 2019) and some Pucciniomycota belonging to the Atractiellales (Herrera et al., 2019; Kottke et al., 2010).

Since they require a symbiotic germination, it is sometimes suggested that orchids ‘take now and pay later’, meaning that they first receive carbon from their fungal partners during germination and subsequently reward it at photosynthetic adult stage. Thus, CMNs in orchids may be particularly relevant when adults and germinating plants co-occur (Jacquemyn et al., 2012). Orchid–fungal networks have been investigated in several ecosystems (reviewed in Li, Shimao, et al., 2021), but have often been limited to ecological networks, that is, at large scale and considering plant species instead of individuals, sometimes ignoring direct, physical interactions between plants mediated by fungi (e.g. Herrera et al., 2018; Kottke et al., 2008, 2013; Martos et al., 2012; Xing et al., 2020). This can be particularly limiting when considering epiphytic orchids because orchid individuals growing on different trees may hardly share single fungal hyphae. Yet, indirect plant interactions, such as nutrient or information transfers, can only occur at a scale at which fungal mycelia can be shared among plants.

In a recent investigation of epiphytic fungal communities in Brazilian orchids, we suggested that fungal communities, including OMF, extend away from the roots of their host to forage the surrounding bark in the epiphytic rhizosphere (Petrolli et al., 2021). More importantly, OMF fungi were found to be shared between different co-occurring orchid species, suggesting the existence of epiphytic CMNs among orchids of a single tree. However, these results were supported by only few individuals on a limited number of trees.

Additionally, as previous works have focused on ecological networks (merging interactions on different trees; see references

above), the factors shaping plant–fungal interactions at the scale of a single tree are still poorly understood. Particularly, whether these networks are shaped by species identity (i.e. orchids of the same species share mycorrhizal fungi), spatial distribution (i.e. orchids that are spatially close share similar mycorrhizal fungi regardless of their species) or stochastic determinants remains in question.

Using a spatially explicit sampling design, we investigated epiphytic plant–fungal networks, on six trunks of two common tree species in a tropical rainforest of La Réunion (French overseas island in the Indian Ocean) colonized by 10 epiphytic orchid species. Our working hypotheses were that, when spatially close, orchid individuals from (i) the same species and from (ii) different species shared mycorrhizal symbionts, meaning that the spatial distribution of the mycorrhizal partners should prevail in determining plant–fungus interactions in the stressing epiphytic habitat. Particularly, (iii) ‘seedlings facilitation’ may occur in the epiphytic orchid habitat, meaning that different growth stages of an orchid species share symbiotic fungi that may sustain the growth of adjacent seedlings.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Study site and species

The study was conducted in February 2020 in a well-preserved fragment of lowland rainforest on La Réunion island (Mare-longue, 21°21′14″S 55°44′29″E, elevation 205–560 m; Strasberg, 1994) under the permission number DIR-I-2020-013. Six trees, three of each *Labourdonnaisia calophylloides* Bojer (Sapotaceae) or *Nuxia verticillata* Lam. (Stilbaceae; Table 1), were selected according to their diameter (approx. 20 cm) at breast height and the coexistence of at least three orchid species on their trunk. *L. calophylloides*, the dominant tree species of this forest, has a straight trunk with cracked bark, whereas *N. verticillata* (also common) has a twisted, crevassed trunk with leafy exfoliating bark (Figure S1). Both tree species are endemic to the Mascarene islands and were shown to host at least 15 and 14 orchid species respectively in a survey of 1-ha plot in this forest (Lancaster, 2004). The selected trunks (labelled A–F), harboured a total of 10 epidendroid orchid species in six genera that were morphologically identified (Table 1; Table S1), except protocorms on trunk F that were later identified by DNA analysis (see below). All the tree and orchid species studied are listed as ‘Least Concern’ or ‘Data Deficient’ according to the IUCN, except *Beclardia macrostachya* (Thouars) A. Rich which is ‘Near Threatened’ (IUCN France, CBNM, FCBN & MNHN, 2013).

2.2 | Sampling procedure

On each trunk, the position of each sample (roots, protocorms and bark) was precisely determined in a coordinate system comprising the height on the trunk between c. 1 and 3 m and the horizontal distance on the trunk from a vertical reference line, using measuring

tape (Figure S1). Yellow–orange portions (c. 2 cm) of roots in contact with the bark, that is, where mycorrhizal colonization is known to occur (Martos et al., 2012), were sampled using sterile razor blades leaving the orchids alive on their trunk. Their surface was sterilized in 70% ethanol, then quickly dried in silica gel. Each root sample was assigned to an orchid species and growth stage: protocorm, no leaf; stage 2, one leaf; stage 3, young seedling (not in age of flowering); stage 4, adult (Figure S2). Plant individuals were not counted given that half of these orchids have sympodial growth allowing vegetative multiplication. In addition to the roots of adults and seedlings, orchid protocorms found on trunk F were sampled and preserved in 50% ethanol at 4°C and later identified by DNA analysis (see below). Because the OMF also distribute on the bark around the roots of epiphytic orchids (Petrolli et al., 2021), we also collected c. 50 mg outer bark samples at regular intervals in the coordinate system using a sterilized blade. These bark samples were immediately dried in individual bags of silica gel, preventing any cross-contamination between samples. In the end, 341 root sections, 7 protocorms, and 105 pieces of bark, that is, 453 samples, were collected and used for molecular analyses.

2.3 | Molecular analyses of fungi and plants

The root or bark samples were powdered in a TissueLyser II (Qiagen) with two sterilized tungsten beads per tube, and genomic DNA was extracted using the DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen) or the NucleoSpin Soil Mini Kit (Macherey–Nagel, GmbH & Co KG.) respectively. Polyvinylpyrrolidone (PVPP) was added to the bark samples during cell lysis to precipitate the tannins. Due to their small size, the protocorms were ground manually in the lysis buffer using sterilized pellet pestles, and their DNA was extracted as for the roots. Each sample was then amplified by PCR using two sets of primers targeting the internal transcribed spacer 2 (ITS2) of nuclear ribosomal DNA which provides more suitable results than the ITS1 (Yang et al., 2018), namely the widely used ITS86-F/ITS4 (White et al., 1990) amplifying both Asco- and Basidiomycota except the OMF family Tulasnellaceae (Rammitsu et al., 2021), and the more recent 5.8S-OF/ITS4-Tul (Vogt-Schilb et al., 2020) to specifically amplify Tulasnellaceae. Each PCR amplification was conducted with both forward and reverse tagged primers as in (Petrolli et al., 2021). The PCR experimental design also included three negative (ultrapure water) and three mock community controls per plate, resulting in 36 positive and 36 negative controls in total. We also included tagging system negative controls to assess cross-contamination during PCR trials, library preparation or sequencing (Hornung et al., 2019; Zinger et al., 2019). The mock community consisted in a defined mixture of 10 fungal strains, including both Asco- and Basidiomycota (Table S2). The organization of samples in PCR plates was randomized. PCR were performed in 25 µl containing 0.2 mM each dNTP, 0.4 µM each primer, 1 unit AmpliTaq Gold® 360 DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific), 1X AmpliTaq Buffer supplied with MgCl₂ and 1.5 µl template DNA, using the following program:

TABLE 1 Sampling design. Of the 453 sequenced samples (tree bark and orchid roots), 368 harboured orchid mycorrhizal fungi (OMF) sequences and were thus kept for subsequent analyses. Concerning protocorms, this represented one of seven sampled protocorms. N samples, number of sampled orchid roots. Additional details regarding the orchid tribes and sub-tribes are given in Table S1

Tree ID	N samples (inc. protocorms)	Sample type	Species	Family	Coordinates	Alt. (m)
A	17	Bark	<i>Labourdonnaisia calophylloides</i>	Sapotaceae	21°21'06"S 55°44'31"E	237
	8	Roots	<i>Oberonia disticha</i>	Orchidaceae	—	—
	20	Roots	<i>Aeranthes arachnites</i>	Orchidaceae	—	—
	15	Roots	<i>Bulbophyllum prismaticum</i>	Orchidaceae	—	—
B	16	Bark	<i>Labourdonnaisia calophylloides</i>	Sapotaceae	21°20'57.7"S 55°44'38.6"E	338
	7	Roots	<i>Polystacchia concreta</i>	Orchidaceae	—	—
	26	Roots	<i>Angraecum mauritianum</i>	Orchidaceae	—	—
	3	Roots	<i>Angraecum pectinatum</i>	Orchidaceae	—	—
	10	Roots	<i>Bulbophyllum prismaticum</i>	Orchidaceae	—	—
C	17	Bark	<i>Labourdonnaisia calophylloides</i>	Sapotaceae	21°21'20"S 55°44'20"E	205
	15	Roots	<i>Angraecum pectinatum</i>	Orchidaceae	—	—
	5	Roots	<i>Polystacchia concreta</i>	Orchidaceae	—	—
	11	Roots	<i>Angraecum mauritianum</i>	Orchidaceae	—	—
	7	Roots	<i>Bulbophyllum prismaticum</i>	Orchidaceae	—	—
	8	Roots	<i>Bulbophyllum occultum</i>	Orchidaceae	—	—
D	17	Bark	<i>Nuxia verticillata</i>	Stilbaceae	21°20'28"S 55°44'14"E	553
	6	Roots	<i>Beclardia macrostachya</i>	Orchidaceae	—	—
	45	Roots	<i>Angraecum cucullatum</i>	Orchidaceae	—	—
	9	Roots	<i>Bulbophyllum prismaticum</i>	Orchidaceae	—	—
	8	Roots	<i>Polystacchia concreta</i>	Orchidaceae	—	—
E	17	Bark	<i>Nuxia verticillata</i>	Stilbaceae	21°20'30"S 55°44'08"E	556
	13	Roots	<i>Angraecum ramosum</i>	Orchidaceae	—	—
	14	Roots	<i>Bulbophyllum prismaticum</i>	Orchidaceae	—	—
	23	Roots	<i>Angraecum cucullatum</i>	Orchidaceae	—	—
F	21	Bark	<i>Nuxia verticillata</i>	Stilbaceae	21°20'29"S 55°44'07"E	560
	23	Roots	<i>Angraecum ramosum</i>	Orchidaceae	—	—
	21	Roots	<i>Beclardia macrostachya</i>	Orchidaceae	—	—
	43 (7)	Roots	<i>Angraecum cucullatum</i>	Orchidaceae	—	—
	1	Roots	<i>Polystacchia concreta</i>	Orchidaceae	—	—
	7	Roots	<i>Bulbophyllum prismaticum</i>	Orchidaceae	—	—

initial denaturation 10 min at 95°C; 35 cycles of denaturation 30s at 95°C, annealing 30s at 56.5°C (ITS86-F/ITS4) or 52°C (5.8S-OF/ITS4-tul), and elongation 30s at 72°C; final elongation 12min at 72°C. Whenever samples did not amplify with the more universal primer set (47 samples), we used a nested PCR protocol with ITS1/

TW13 as follows—initial denaturation 10 min at 95°C; 35 cycles of denaturation 30s at 95°C, annealing 30s at 55°C and elongation 1 min at 72°C; final elongation 12min at 72°C—then ITS86-F/ITS4 as above. Each PCR trial was replicated twice, pooled and loaded on agarose gel for visualization of the amplicons. Each amplicon was

then purified with the NucleoMag® NGS Clean-up and Size Select (Macherey-Nagel), quantified by fluorescence using the Qubit™ dsDNA High-Sensitivity (Invitrogen™), and then mixed equimolarly with other amplicons in four pools. The four pools were sequenced in two 2×250bp paired-end sequencing runs on an Illumina MiSeq platform at FASTERIS (Geneva, Switzerland).

For the species identification of protocorms, we performed seminested PCRs with first ITS1P/ITS4 (Ridgway et al., 2003) then ITS1/ITS4 (White et al., 1990), and sequenced these amplicons with the Sanger method at Eurofins Genomics (Germany). The obtained sequences were aligned with sequences of orchids from La Réunion retrieved on GenBank using MAFFT (Katoh et al., 2002), and a phylogenetic inference was performed by ML using IQTREE 2.1.3 (Minh et al., 2020) for phylogenetic comparison, using default parameters.

2.4 | Bioinformatics and OTU filtering

Paired reads from 2×250bp Illumina sequencing were processed using a customized pipeline based on VSEARCH (Rognes et al., 2016) as in Perez-Lamarque, Krehenwinkel, et al. (2022). Briefly, paired-end reads were assembled using the *fastq_mergepairs* function with default parameters and assembled reads with more than two errors in the alignment were discarded. The resulting assembled reads were assigned to samples according to their tag+primer sequences using CUTADAPT (Martin, 2011) allowing zero discrepancies. Tag jumps (Zinger et al., 2019) was estimated at this step and represented 0.04% of the reads. Operational taxonomic units (OTUs) were clustered using a 97% similarity threshold with VSEARCH algorithm. Chimeras were detected at this step using the *uchime_denovo* option of VSEARCH and removed from the dataset. OTUs were taxonomically assigned using the *usearch_global* option of VSEARCH with default parameters on the UNITE V8.3 (2021-05-10) eukaryotes reference database (Nilsson et al., 2015).

Singletons and short OTUs (<200bp) were removed before OTU table building. Nonfungal OTUs and OTUs abnormally detected in the positive and negative controls were also discarded from the dataset, as well as OTUs identified as contaminants by the DECONTAM R-package with frequency method (Davis et al., 2018). Finally, based on the previously estimated tag-jumps rate, OTUs that represented <0.5% of the sample reads (hereafter referenced as the bioinformatics threshold) were set to 0, hence minimizing the impact of artefactual sequences and tag jumps. Samples with <1000 reads or without OMF were not considered in subsequent analyses. Because we used two pairs of primers of varying specificity, the read counts obtained with ITS86-F/ITS4 and 5.8S-OF/ITS4-Tul were not comparable and therefore, only the presence-absence (1/0) of the OMF OTUs colonizing the 368 remaining samples was considered in following statistical analyses (except in Figure 1; Figures S3, S15 where all fungi were analysed). As OTUs with low abundances can be over-represented in statistical analyses using presence-absence data, we repeated the main analyses by excluding OTUs whose per-sample relative abundance was ≤10% (instead of the 0.5% mentioned

above), to confirm the robustness of our results to potential mid-to-low-abundance errors.

Amplicon sequence variant (ASV) construction methods have been developed to improve the delineation of microbial taxa and the reproducibility of metabarcoding data, although their relevance in comparison to OTUs has been questioned when using ITS regions and Dikarya fungi (Tedersoo et al., 2022). We therefore repeated some of the analyses, that is, the network analyses (see below), using the most abundant unique sequences (up to five) inside each OMF OTU. This finer delineation of OMF, that is, 100%-similarity OTUs, aimed at determining whether the same fungal haplotype was found in several adjacent roots or protocorms of the same or of different orchid species.

2.5 | Diversity analyses

The following beta diversity analyses were conducted with the VEGAN R-package (Oksanen et al., 2013), using the Jaccard index as implemented in the *vegdist* function. To assess differences in OMF composition between substrates (i.e. root vs. bark), orchid species and tree individuals and species in the overall dataset, we used a non-metric multidimensional scaling (NMDS) approach using the *metaMDS* function. The differences were tested using a PERMANOVA, with 999 permutations, using the *adonis* function. As the studied epiphytic orchids grew on different trunks in the same forest area, the permutations were constrained to each tree individual using the *strata* option in *adonis*. To test the effect of tree individuals on fungal communities within orchid species growing on several trees we conducted a PERMANOVA using the tree identity (A–F) as explanatory variable and orchid species as *strata*.

2.6 | Network analyses

Bipartite interaction networks have been used to describe and analyse the patterns of interactions between species belonging to two groups of organisms, for example, plants and their mycorrhizal fungi (Jacquemyn et al., 2011; Martos et al., 2012). These networks usually have a nonrandom, rather nested or modular structure (Chagnon et al., 2012). In a nested network, interactions are between generalist species or between specialist and generalist species, with little or no reciprocal specificity (Bascompte et al., 2003). Nestedness is a common feature of mutualistic networks where it is supposed to confer stability (Thébaud & Fontaine, 2010), but it can also result from neutral processes (Krishna et al., 2008). In a modular network, however, interactions are mainly within modules with little or no interaction between modules (Olesen et al., 2007). Modularity may indicate the presence of reciprocal specialization (e.g. in parasitic co-evolution), but also environmental constraints (Martos et al., 2012). However, the study scale and the individual- versus species-level scale considered both have large influence on a given network's structure (e.g. Olesen et al., 2007).

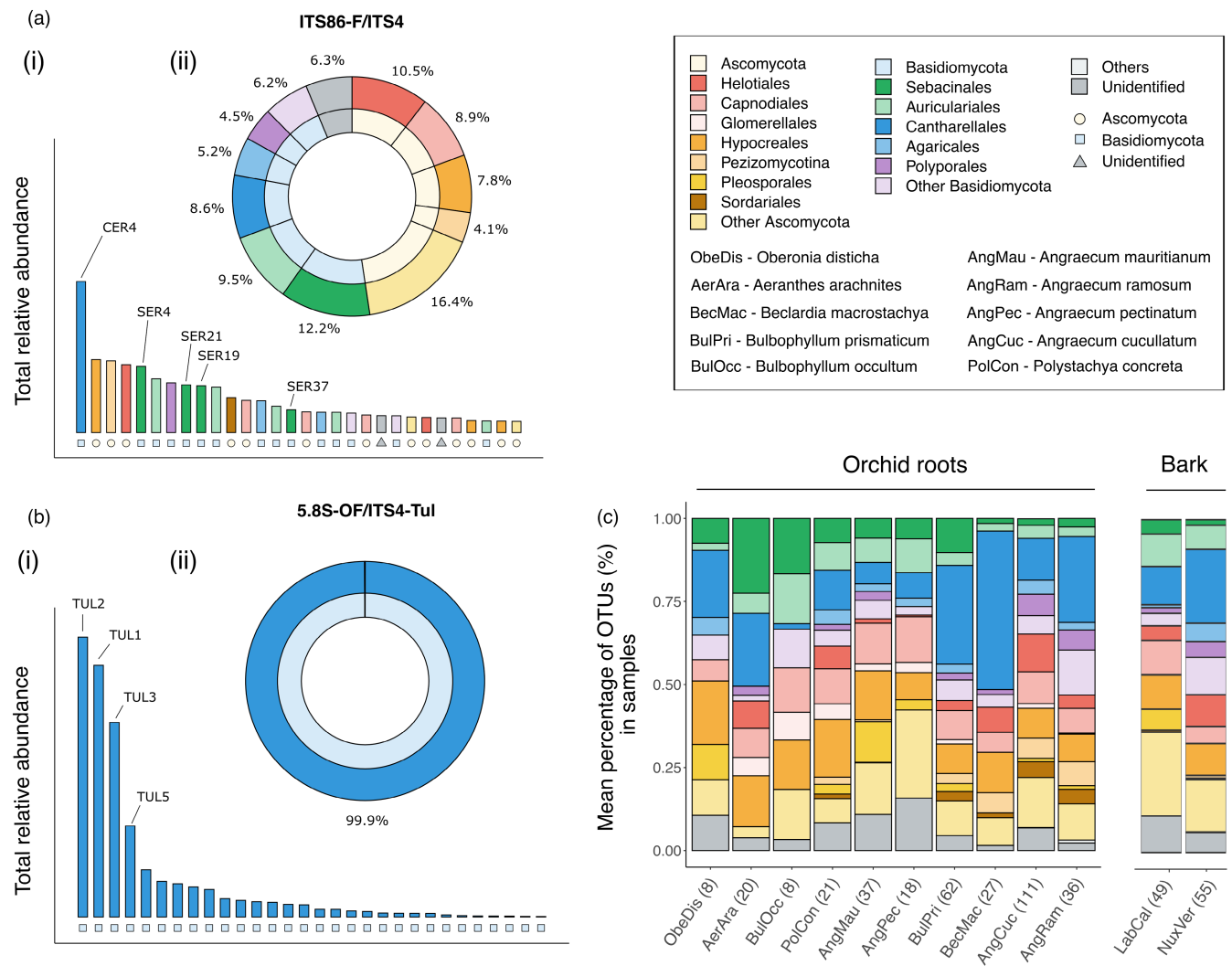


FIGURE 1 Overview of fungal community composition in the epiphytic environment colonized by orchid species identified with the primers (a) ITS86-F/ITS4 or (b) 5.8S-OF/ITS4-Tul across the whole dataset. (i) Ranked relative abundances of the first 30 OTUs. OTUs are coloured according to their taxonomy and main OMF OTUs are named. (ii) Relative abundance of the main identified fungal clades. (c) Main fungal clades occurring in epiphytic orchid roots and in the surrounding bark with the two set of primers using presence/absence data. LabCal, *Labourdonnaisia calophylloides*; NuxVer, *Nuxia verticillata*. The number of samples considered is given in brackets.

In order to study interactions at the scale of fungal mycelia, all network analyses were performed using the six interaction matrices independently, corresponding to the six trunks studied. Binary matrices of interactions between fungal OTUs (rows) and plant root samples (columns; i.e. bipartite networks), retrieved after the low-count occurrences filtering described above, were used as inputs for the following analyses. From each matrix, we evaluated both the nestedness and the modularity in the observed network and tested their significance against 1000 null models reconstructed using the *permatswap* function of the VEGAN R-package. Nestedness was calculated using the *nested* function of bipartite (Dormann et al., 2008), considering the 'NODF2' method. The modularity 'Q' was calculated using the *computeModule* function of the same package using default method (Newman) and 1000 steps. As module detection may slightly vary during calculation due to randomized procedure, modules were first calculated 100

times and then the most frequent set of modules was kept for subsequent analyses. To assess the reliability of each obtained module, we then searched how many times these modules were found in 1000 additional modularity calculation, and calculated p-values accordingly for each one of them.

2.7 | Spatial analyses

The spatial distances between samples were calculated from their coordinates taken in the field, considering the smallest distance between them on the cylindrical trunks. The trunk of the tree F separated into two vertical branches and therefore, the spatial distances between samples located on different branches were calculated by considering the smallest distance between these samples passing through the fork. To assess for the presence of a spatial structure in

the orchid-OMF interaction, spatial autocorrelations of OMF communities in orchid roots were analysed using mantel correlograms in vegan, with the 'spearman' method, and 999 permutations. To corroborate the presence of an epiphytic rhizosphere as previously observed in an Atlantic Forest (Petrolli et al., 2021), we calculated the distance decay of similarity between orchid roots and surrounding bark as in the above reference.

In order to include the full spatial component in statistical analyses (i.e. not only the height on tree trunk which was only used as a proxy of the spatial component in illustrations), we used a principal coordinates of neighbour matrices (PCNM) approach. PCNM allows the reduction of a complex system of spatial coordinates into a limited number of vectors called eigenvectors. PCNM eigenvectors were computed using the *pcnm* function of the VEGAN package. Eigenvectors (i.e. PCNM axes) associated with positive eigenvalues were submitted to a forward selection (Blanchet et al., 2008) using the code provided in (Bauman et al., 2018). Variance partitioning was then performed using the *varpart* function in the VEGAN R-package, using the orchid species identity as first explanatory variable and the sets of selected PCNM vectors as second explanatory variable. Associated p-values were computed after redundancy analyses (RDAs) of the previously cited variables, followed by an 'anova' test considering either orchid species or selected PCNM vectors as explanatory variables of the OMF communities.

Additionally, for each module in each reconstructed network (see above), we tested if the module was determined (i) by the spatial distribution of orchid roots and/or (ii) by the orchid species composition inside the module. To do so, we randomized 10,000 times the sample names in the interaction matrix and compared (i) the mean spatial distance (mD) between samples within module and (ii) the species composition (sC) within module, between the original and randomized matrices. For each module, p-values were computed as the proportion of (i) $mD_{\text{randomized}} < mD_{\text{original}}$ or (ii) $sC_{\text{randomized}} = sC_{\text{original}}$.

3 | RESULTS

3.1 | Data quality and fungal community description

A total of 25,806,753 and 24,989,711 raw sequencing reads were obtained with primer pairs ITS86-F/ITS4 and 5.8S-OF/ITS4-Tul respectively. The remaining 32,593,936 reads obtained after the selective bioinformatics process clustered into 4564 OTUs in total. The expected fungal species were all identified in the 36 mock community positive controls. After filtering OTUs' occurrences representing <0.5% of reads from each sample, the remaining reads in positive controls all belonged to fungal species of the mock community. Applying this stringent curation of the data led to 794 OTUs (i.e. 27,595,918 reads). The 5.8S-OF/ITS4-Tul primer pair detected 57 OTUs of Tulasnellaceae (Figure 1), among which only one OTU was amplified with the more universal pair ITS86-F/ITS4. Despite our fine sampling of roots and bark on each tree between 1 and 3 m

in height, the rarefaction curves did not reach a plateau, neither for all fungal OTUs nor only OMF OTUs (Figure S3).

Ninety-one of 794 OTUs (11.5%) were assigned to families of OMF, namely Tulasnellaceae (57 OTUs) and Ceratobasidiaceae (3 OTUs) in the Cantharellales and Serendipitaceae (31 OTUs) in the Sebaciales, representing in average between 12% and 50% of the orchid root-associated fungi (Figure 1C). Other putative OMF, for example, Atractiellomycetes (two OTUs), *Fusarium* (two OTUs) or *Mycena* (one OTU), were too occasional to be considered as key OMF here and were not kept in our analyses. Regarding other fungal guilds, the 703 fungal OTUs included non-OMF saprotrophs (13.6%), plant pathogens (7.7%) and lichenized fungi (4.8%; Figure S4A). Remaining OTUs (62.5%) could not be unambiguously assigned to a unique trophic guild due to insufficiently taxonomic resolution.

Tulasnellaceae were the most frequent OMF in almost all orchid species (Figure S4B). While Tulasnellaceae were equally distributed between both tree species, Serendipitaceae were more frequent on *L. calophylloides* than on *N. verticillata* (Figure 2). Conversely, the most abundant Ceratobasidiaceae was found only on *N. verticillata* where it was notably retrieved in all the roots of the epiphytic orchid *Beclardia macrostachya*.

3.2 | Communities of OMF in orchid roots and on bark

On each tree trunk, OMF communities significantly differed between bark and orchid roots (nested PERMANOVA; $F = 4.53$, $R^2 = 0.05$, $p = 0.001$; Figure S5). The overall OMF community varied more across tree species ($F = 47.27$, $R^2 = 0.11$, $p = 0.001$) and even more across tree individuals ($F = 35.87$, $R^2 = 0.32$, $p = 0.001$, Figure S5).

Considering orchid roots only, the OMF communities also varied across tree individuals ($F = 38.18$, $R^2 = 0.33$, $p = 0.001$; Figure S6) and tree species ($F = 52.45$, $R^2 = 0.12$, $p = 0.001$). They also differed between orchid species when controlling for tree individuals ($F = 7.99$, $R^2 = 0.25$, $p = 0.001$). We also found an effect of tree individuals on OMF communities while controlling for orchid species ($F = 25.98$, $R^2 = 0.33$, $p = 0.001$; see e.g. *Polystachya concreta* on Figure S6).

3.3 | Plant-fungus network analyses

OMF sharing between orchids was variable among OTUs and orchid species, although a high level of OTU's sharing was clearly visible (Figure 2). The two most shared OTUs were TUL1 and SER21 (six orchid species each) while CER4 was largely shared between orchid species growing on *N. verticillata* (Figures 2 and 6).

The orchid-fungus networks were very consistent in their structure among the six trees, showing significant modularity and antinestedness (Figure S8). Using unique sequences within each OTU instead of the 97% OTUs did not change these results

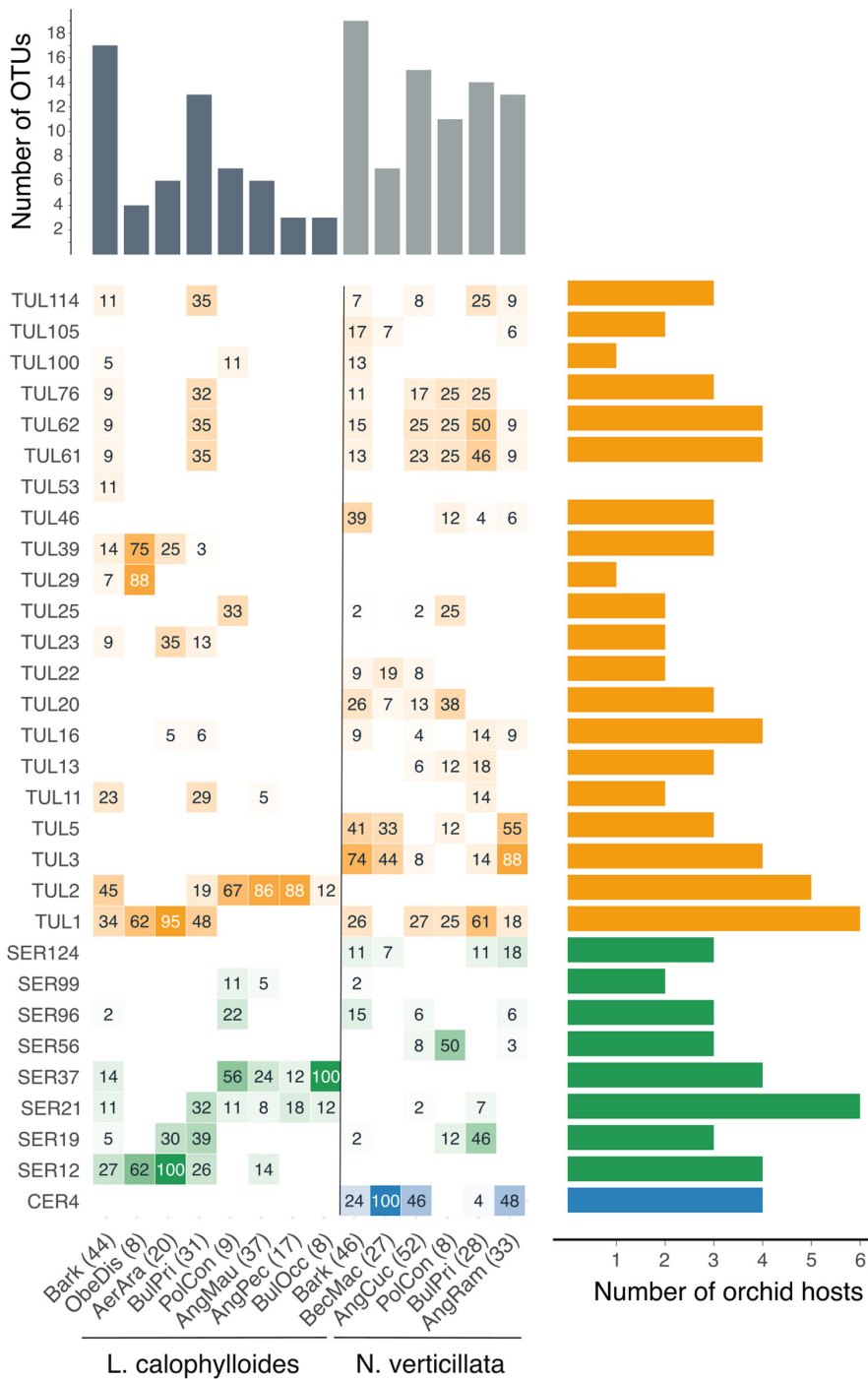


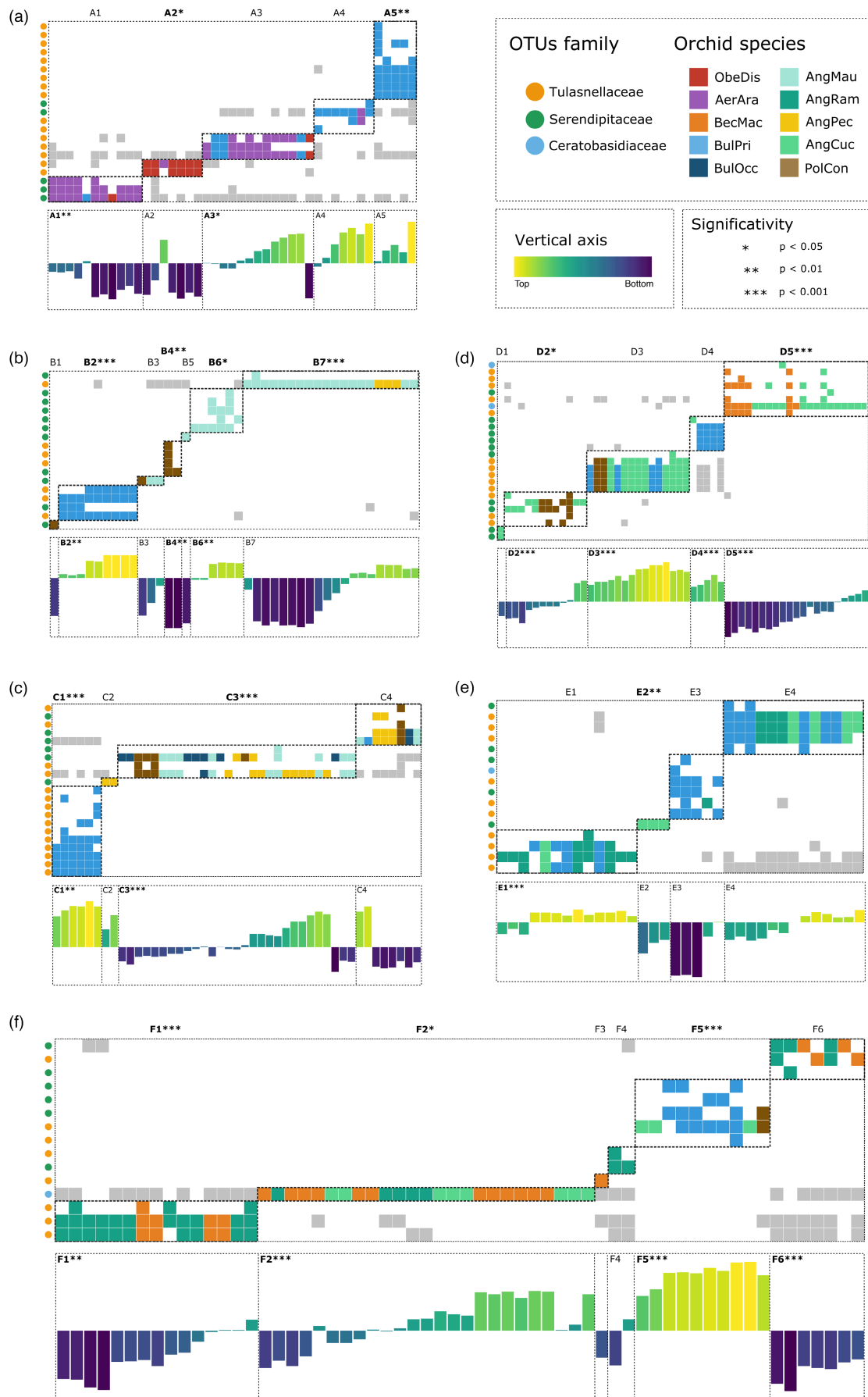
FIGURE 2 Communities of orchid mycorrhizal fungi (OMF) in 10 epiphytic orchid species growing on two tree species (three individuals each). Only the 30 most abundant OTUs are represented. Numbers in the table indicate the % of colonized roots. The number of sampled roots or bark is given in brackets. *L. calophylloides*, *Labourdonnaisia calophylloides*; *N. verticillata*, *Nuxia verticillata*. TUL, Tulasnellaceae; SER, Serendipitaceae; CER, Ceratobasidiaceae. Right, number of orchid host species for each OMF OTU. Top, number of different OTUs colonizing each compartment (bark or orchid species).

(Figure S9). Modules of interactions between OMFs and orchid roots involved either one (29.6%), two (37.0%), three (25.9%) or >4 (7.4%) orchid species (Figure 3, see also Figure S10). Similarly, they also included one (41.7%), two (50.0%) or three (8.3%) OMF families.

3.4 | Spatial versus orchid species determinants of the network structures

On each tree individual, we observed a positive spatial autocorrelation of OMF communities in roots ranging from 15 to 90 cm (Figure 4;

FIGURE 3 Interaction networks between orchid mycorrhizal fungi (OMF, rows) and their orchid hosts (columns) and associated structures. Networks are represented separately for each tree (a–f). Top; modules of interactions are delimited by grey-dashed lines. Squares inside modules are coloured according to the orchid species. Full circles at the left of each network indicate the OMF family of each OTU. Modules are named above each graph and those that are significantly shaped by the orchid species composition are bolded and associated with their significance code (*, <0.05; **, <0.01; ***, <0.001). Bottom; spatial distribution of orchid roots. The coordinate of each orchid root in the vertical axis on the coordinate system was plotted and coloured according to its value. Modules that are significantly shaped by the spatial distribution of orchid roots are bolded and associated with their significance code (see above). See Table S3 for significance details.



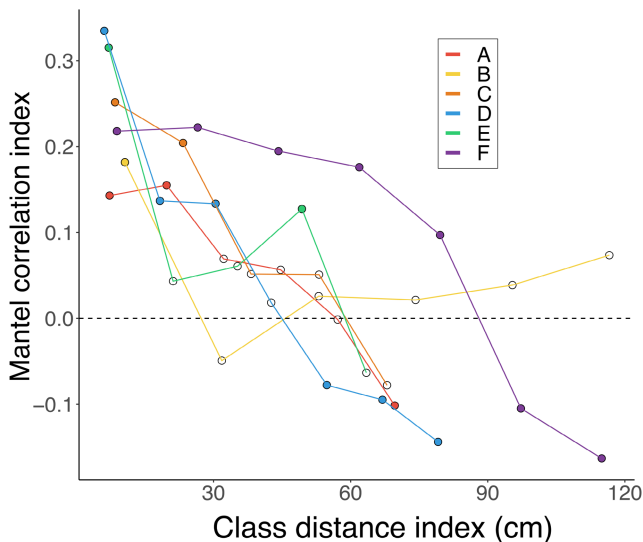


FIGURE 4 Mantel correlogram showing spatial autocorrelation of the interactions between orchid mycorrhizal fungi (OMF) and orchid roots for each tree. Full circles indicate significant ($p < 0.05$) autocorrelation (positive or negative).

Figure S11). This suggests that, even when not considering the orchid species, the interactions between OMF and the roots were spatially structured, at least over short distances (~20 cm). In addition, network visualizations suggested that OMF OTUs were mostly shared between spatially close orchid roots (Figure 3; Figure S10).

We used two approaches to quantify these tendencies. First, at the network scale, variance partitioning revealed that, on each tree, the identity of orchid species, the spatial distribution of samples (as assessed with PCNMs) and their interaction, both had a significant influence on OMF communities (Figure 5; Figure S11). Second, we quantified the contribution of each of these two determinants in the networks' structures at the module scale by comparing the modules observed in Figure 3 to similar sized modules in randomized matrices. Results (synthesized in Table S3) showed that the spatial component or the species identity component alone, explained respectively 22.2% and 11.1% of the observed modules. The interplay between these two components explained 37.0% of the modules. Accordingly, roots sharing OMF on a single tree were spatially closer to each other than roots that did not share any OMF OTU, even when considering different orchid species (Figure S12).

In addition, OTUs that were frequent in the roots of an orchid species on a tree tended to be also detected in other orchid species from the same tree (Figure S13) suggesting that OTUs that intensively colonized an orchid species had more chance to colonize other spatially close species.

We finally observed that OMF OTUs retrieved in roots were more frequent in the surrounding bark than at greater distances, as suggested by the distance decay of similarity of OMF communities between orchid roots and bark (Figure S14). This reveals that fungi could effectively link orchid roots of different species by their expansion from roots to the epiphytic rhizosphere.

3.5 | OMF turnover from protocorms to adult orchids in *Angraecum cucullatum*

On tree F all the protocorms and all but one of the stage 2 seedlings successfully sequenced by Sanger method belonged to the orchid species *A. cucullatum*. The remaining seedling could not be identified and was not kept for analyses. These protocorms and seedlings were mostly colonized by non-OMF fungi, but four seedlings and one protocorm were also colonized by a single OMF OTU, that is, CER4 (Figure S15), which was also detected in all growth stages of *A. cucullatum* on other trees (Table 2). We additionally found that this OTU was shared between different orchid species and different growth stages of *A. cucullatum* (Figure 6). When looking at the distribution of unique sequences within this OTU as a proxy of fungal haplotypes, we found mainly two sequences (Figure 6; Figure S16) that were also shared between the roots of different but spatially close orchid species, including protocorm and seedlings of *A. cucullatum* and surrounding adults of *A. ramosum*.

4 | DISCUSSION

4.1 | Diversity of OMF in bark-dwelling communities

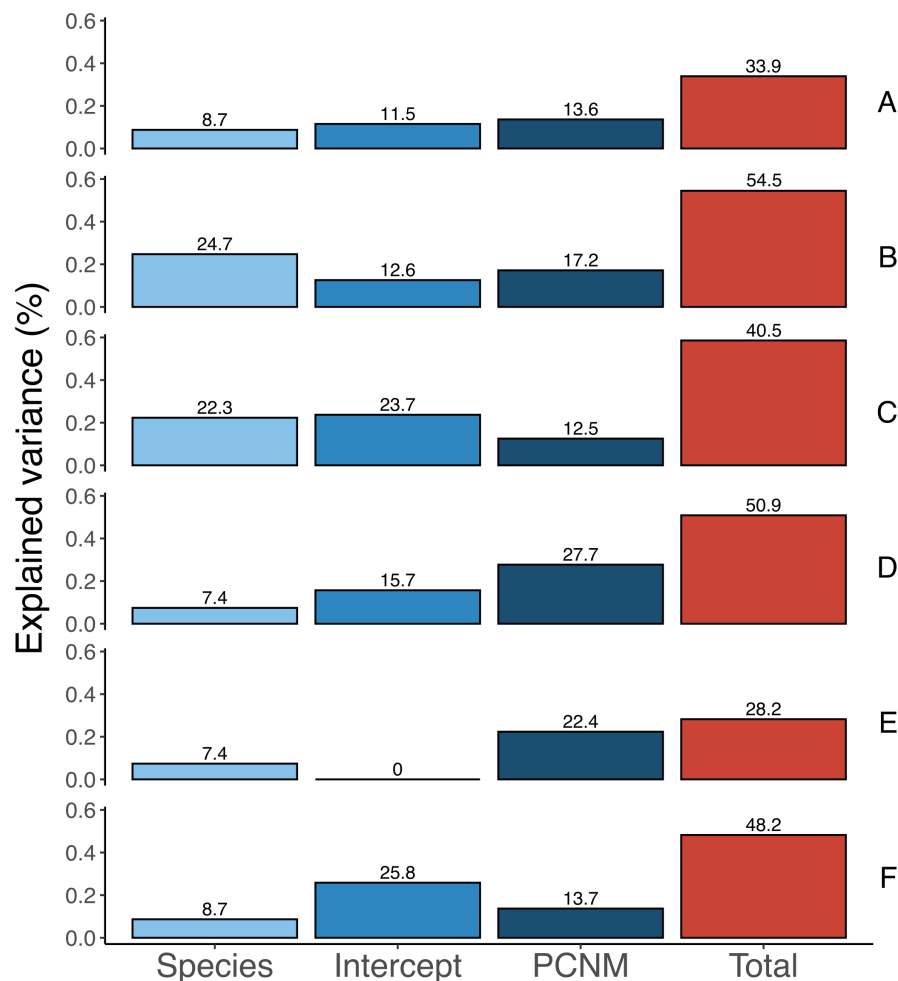
After filtering low-count OTU's occurrences (i.e. <0.5% of reads in each sample), we retrieved 794 fungal OTUs in the whole dataset, 91 (11.46%) of which were considered as OMF. Perhaps because of the use of an additional specific primer pair, Tulasnellaceae were the most abundant OMF in nearly all orchid species. However, the need to use specific primers to amplify this family is largely acknowledged and has been recently demonstrated by Rammitsu et al. (2021). Tulasnellaceae and Serendipitaceae were both represented by numerous OTUs whereas only three OTUs of Ceratobasidiaceae were detected, only one being frequent, suggesting that Ceratobasidiaceae might be rarer in these epiphytic rainforest habitats (Martos et al., 2012).

4.2 | Mycorrhizal specificity in epiphytic orchids and consequences for fungal networks

The question of whether orchid species are mycorrhizal generalists or specialists has long triggered research in terrestrial (Jacquemyn et al., 2011) as well as in epiphytic (Herrera et al., 2019) orchids (reviewed by Li, Yang, et al., 2021). Here, no orchid species associated with less than three OTUs from at least two OMF families. Some species were opportunistic in their mycorrhizal interactions, as illustrated by *Bulbophyllum prismaticum* which was growing on both tree species and associated with a richer guild of OMF than any other orchid species. *B. prismaticum* could therefore be considered as a *true generalist* sensu Shefferson et al. (2019).

Conversely, all investigated roots from *Beclardia macrostachya* or *Aeranthus arachnites* were associated with CER4 and SER12

FIGURE 5 Drivers of the orchid mycorrhizal fungi (OMF)–orchids networks, using variance partitioning for each tree of the OMF β -diversities between orchid species identity ('species'), spatial component ('PCNM' i.e. set of PCNM vectors retained by) and their interaction ('intercept'). The 'Total' represents the total variance explained by these two explanatory variables and their interaction. The two variables explained a highly significant ($p < 0.001$) part of the total variance for each tree except 'Species' on grid E ($p = 0.033$).



respectively. While these interactions were observed on a limited number of individuals, they were consistent with a previous study conducted at the scale of the whole island (Martos et al., 2012). This suggests that, as conceptualized by Shefferson et al. (2019), these species show signs of *apparent generalism*, meaning that in addition with few specific interactions, they also interact, more inconsistently, with a broader range of mycorrhizal partners (Herrera et al., 2019; Selosse et al., 2022; Shefferson et al., 2019; Xing et al., 2019). Moreover, CER4 was only detected in the roots of other species spatially close to *B. macrostachya*. This could imply that some orchids could promote their mycorrhizal symbiont on certain habitats (Li, Yang, et al., 2021; McCormick et al., 2018) enable them to interact with other species in their vicinity.

Given that some orchid species (e.g. *B. prismaticum*) seem to weakly filter their mycorrhizal partners from the environment, these observations question the role of the spatial component in determining mycorrhizal associations and plant–fungus networks in epiphytic orchids.

4.3 | Fungal networks in the epiphytic habitat

Orchid species can be terrestrial, lithophytic (growing on rocks) or epiphytic (Dearnaley et al., 2012). Root endophytic fungi, including OMF, tend to vary across these habitats (Martos et al., 2012;

Xing et al., 2014, 2019). Thus, for both strictly epiphytic orchids and their mycorrhizal partners, the tree can be viewed as an island and the forest as an archipelago. Consequently, each tree and its bark-inhabiting communities constitute an island of physical interactions.

Network properties are difficult to compare between studies as they highly depend on the sampling design (Pölme et al., 2018). For instance, ecological networks (i.e. considering plant species rather than individuals, as in Cevallos et al., 2017; Jacquemyn et al., 2011, 2016; Martos et al., 2012; Kottke et al., 2013; Herrera et al., 2018; Xing et al., 2019; Perez-Lamarque, Petrolli, et al., 2022) cannot be directly compared with common mycorrhizal networks (CMNs; see references below) where physical links by fungal mycelium are likely to occur. As we worked on coexisting orchids with putative mycelial connections, we focus here on the latter category and analysed separately the orchid–OMF network of each tree.

In our study, networks on each tree showed a modular structure. The majority of modules comprised the roots of several orchid species, indicating that OMF are shared among co-occurring epiphytic orchid species. Modules comprising several orchid species have also been observed in co-occurring meadow's orchids by Jacquemyn et al. (2015), while studies conducted in other sites in close Mediterranean (Jacquemyn et al., 2014) or temperate grasslands (Jacquemyn et al., 2012) had previously shown that co-occurring orchid species tended to segregate their fungal communities. However, in

TABLE 2 Orchid mycorrhizal fungi (OMF) community composition (in % of colonized roots) of *Angraecum cucullatum*. Individuals were sampled at various growth stages (see Figure S2). The number of samples (*N* samples) are indicated for all trees (colonized by *A. cucullatum*, i.e. D, E and F) and for tree F only because the latter was the only one to host all growth stages. For each OMF OTU, the % of colonized roots are given by numbers in italic; numbers in brackets indicate the same % for grid F only. The underlined OTUs CER4 and TUL13 were the only two OMF OTUs detected on grid F

	Protocorm	Stage 2	Stage 3	Stage 4
N samples (Total)	7	19	37	49
N samples (grid F)	7	19	14	4
Ceratobasidiaceae				
<u>CER4</u>	14 (14)	21 (21)	27 (21)	18 (0)
CER1708	–	–	3	–
Tulasnellaceae				
TUL1	–	–	3	27
<u>TUL13</u>	–	–	3 (13)	4 (50)
TUL22	–	–	3	6
TUL61	–	–	3	22
TUL62	–	–	3	24
TUL76	–	–	3	16
TUL265	–	–	3	14
TUL3	–	–	–	8
TUL16	–	–	–	4
TUL20	–	–	–	14
TUL25	–	–	–	2
TUL114	–	–	–	8
TUL253	–	–	–	2
TUL390	–	–	–	2
Serendipitaceae				
SER56	–	–	5	4
SER96	–	–	5	2
SER164	–	–	5	6
SER21	–	–	3	–
SER629	–	–	–	2
SER666	–	–	–	2
SER702	–	–	–	2
SER1559	–	–	–	2

the above-cited references, orchids were coexisting in plots of several dozens of metres and in soil their root systems may not have been in vicinity, contrary to the small areas of bark where root systems of coexisting orchids often overlap. Thus, in the systems studied by Jacquemyn et al. (2012, 2014, 2015), where orchids had very patchy distributed communities (a common property of terrestrial orchids in grasslands; Jacquemyn et al., 2012, and references therein), fungal sharing might be

less likely to occur. On bark, however, several epiphytic orchid species often coexist even at very fine scale (Petrolli et al., 2021). The limited available surface for both orchids and fungi on bark could then favour symbiont sharing between coexisting epiphytes compared to soil.

4.4 | Explanatory factors for the orchid–fungus network modularity

In addition to modularity, networks all displayed antinestedness, a topology already observed in other mycorrhizal types such as ectomycorrhizal (Bahram et al., 2014) or ericaceous mycorrhizal networks (Toju et al., 2016). Almeida-Neto et al. (2007) related antinestedness to several mechanisms, including modularity or high community turnover. When organizing the networks according to the spatial distribution of the samples (Figure S7), we found a high fungal turnover indicating that the modules could be explained by the spatial turnover of the fungal communities.

Indeed, the modules of orchids–OMF interactions could either be controlled by the orchid species identity, by the spatial assemblage of the orchid community (e.g. Toju et al., 2014) or by stochastic effects (Encinas-Viso et al., 2016). We found here that most modules could be explained by nonstochastic effects as also revealed by the large variance ($\geq 30\%$) explained by species and/or spatial effects in the variance partitioning. Regarding modules, 37.0% of them were explained both by the orchid species identity and root spatial distribution, which mirrors the fact that orchid roots were not randomly distributed on bark. Some modules were, however, explained by only one of the two factors, namely spatial assemblage (22.2%) or species identity (11.1%), suggesting that these factors effectively shaped the fungal interactions among roots. Strikingly, variance partitioning revealed that most of the variance in *L. calophylloides* (tree A–C) was explained by the orchid species composition, whereas on *N. verticillata* (tree D–F) it was mostly explained by spatial effects. It suggests that the environment (e.g. the structure or chemical composition of the bark type which may influence mycelial growth) can modulate orchid preferences for fungi.

Importantly, OTUs that were frequent in the roots of one species tended to be also present in the roots of other surrounding species. Although such a pattern may evoke mere physical contact with the root surface or endophytism (i.e. extraradical mycelium foraging the bark and colonizing other roots without forming mycorrhizas; Wilson, 1995), it was also retrieved when only considering strong (i.e. high-count) interactions. This is unlikely to reflect contamination or endophytism and supports that such OTUs effectively form mycorrhizas on both species. Although this should be tested on field, it raises the issue of functional cooperation between co-occurring plant species.

4.5 | Towards common mycorrhizal networks and nursery effect in the epiphytic habitats?

The results described above were consistent when considering fungal OTUs or haplotype (i.e. intra-OTU polymorphism), suggesting

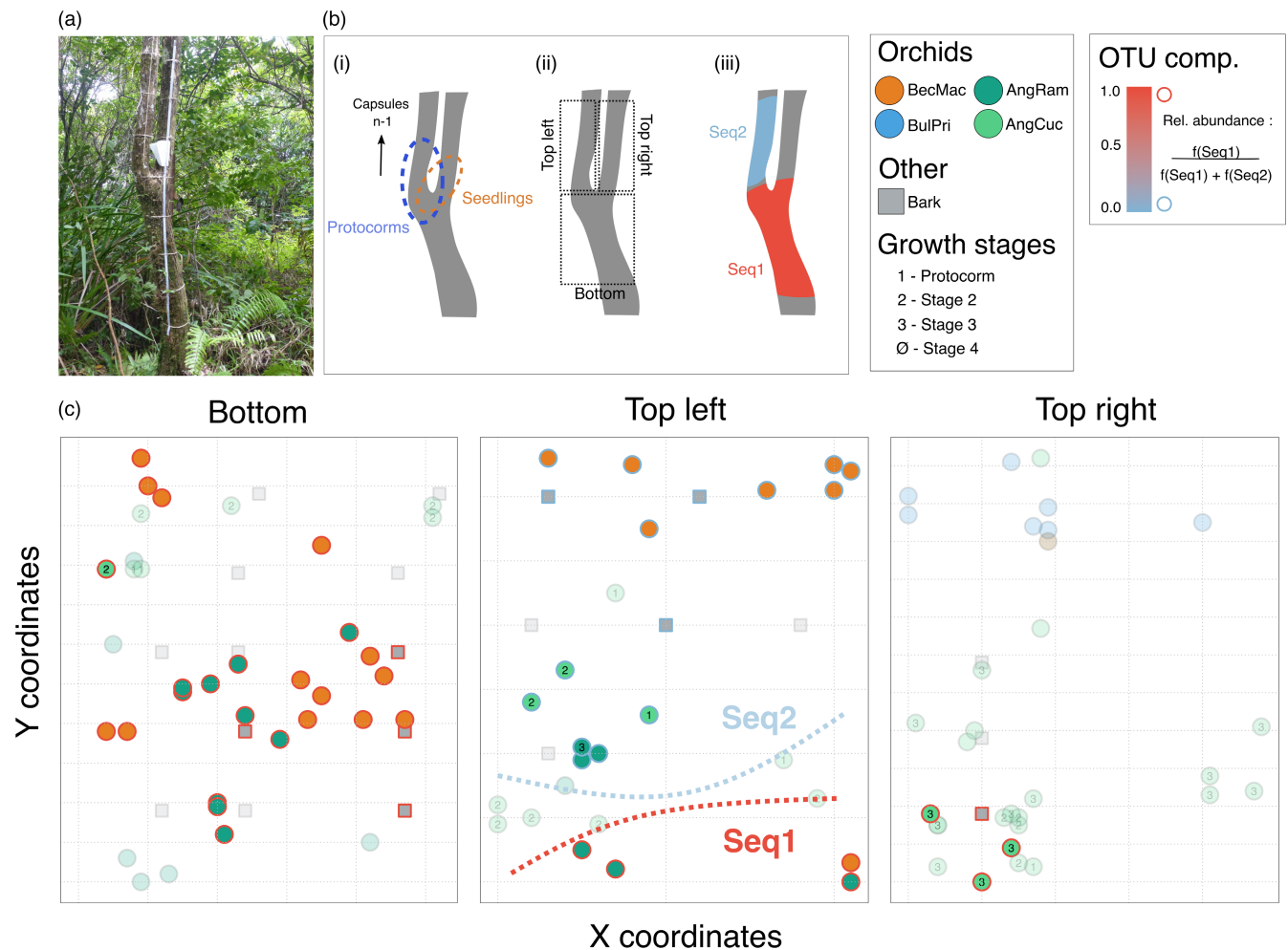


FIGURE 6 Distribution of CER4 on tree F. (a) Tree F during sampling. The trunk of tree F split into two branches but was included for analyses because of its bark-inhabiting orchid richness. (b–c) As tree F had two branches, the spatial distribution of OTUs cannot be plotted on a single graph, and the distributions were thus split on three panels as indicated in panel b-ii. Protocorms and seedlings of *Angraecum cucullatum* were found close to the fork as indicated in panel b-i. (c) Distribution of CER4 in orchid roots (circles) or bark (squares); the distance between two parallel grey lines is 10 cm. Coloured symbols indicate that the OTU has been detected in the sample. For *A. cucullatum*, symbols are labelled according to their growth stage (see Figure S2). The 100 most abundant unique sequences composing the OTU CER4 were analysed (see Figure S16) and two of them (Seq1 and Seq2) mainly composed the OTU. Their relative abundance is indicated by the colour of the symbol's stroke revealing that the two sequences exclude each other and most probably represent two fungal individuals. Their observed distributions on the tree bark are represented on panel b-iii and delimited in panel c (top left) as dotted lines.

that OTU's sharing mirrors that of fungal mycelium (e.g. CER4 on tree F). Although these results should be confirmed by other molecular methods revealing individual polymorphism (Beiler et al., 2010, 2015), they most probably show that some fungal mycelia are shared by several co-occurring epiphytic orchids (McCormick et al., 2016).

Notably, we studied protocorms and seedlings of *A. cucullatum* on a tree colonized by several other orchid species. These naturally established germinations give key information about their early mycorrhizal needs. Although OMF colonization inside those protocorms was scarce, an OMF OTU retrieved in few young seedlings of *A. cucullatum* (stages 2 and 3) was also present in the roots of co-occurring adults, both from the same and different species. Such a fungal sharing between adults and seedlings has been linked with seedling's facilitation in ectomycorrhizal symbiosis (e.g. Diédhiou

et al., 2010; Liang et al., 2020), and further studies are needed to test for facilitation in epiphytic orchids. Notably, OTUs were frequently found on bark in the vicinity of colonized roots, which shows that a continuum of mycelia exists on the bark between roots in the so called epiphytic rhizosphere (Petrolli et al., 2021). Yet, contrary to soils (Jacquemyn et al., 2012), seeds of epiphytic orchids have not always been found to germinate more efficiently on bark in the vicinity of adults (Kartzinel et al., 2013; but see Yang et al., 2017). Here, all protocorms were already green which could suggest that mycorrhizal dependence of epiphytic orchids (at least in *A. cucullatum*) occurs after germination, especially for water and nitrogen supply.

We hypothesize that the sharing of mycelium between orchid individuals of the same or different species could help sustaining the whole colony and allow a nursery effect, by sharing nutrients such as

nitrogen or phosphorus whose inputs on bark are occasional, localized and ephemeral (Zotz, 2016). Following this hypothesis, limited hydro-mineral supply in epiphytic conditions (Yoder et al., 2010) may also promote fungal sharing, a form of reciprocal help for nutrition. Indeed, stressing conditions tend to select for more reciprocally beneficial interactions between plants (e.g. Callaway et al., 2002; see also Brooker et al., 2008). From a fungal point of view particularly, rerouting resources among different partners increases sustainability and resilience by creating a diverse host set (Selosse et al., 2006). Thus, isotopic labelling should be performed in the epiphytic habitats to reveal whether the CMNs revealed in this study are truly functional or not (Klein et al., 2016; Selosse & Roy, 2009; Simard et al., 1997, 2015).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Florent Martos, Marc-André Selosse, Lucie Zinger and Rémi Petrolli designed the study and performed the sampling additionally with Géromine Collobert and Chantal Griveau. Rémi Petrolli performed the molecular, bioinformatics and statistical analyses. Rémi Petrolli, Florent Martos, Benoît Perez-Lamarque, Lucie Zinger and Marc-André Selosse wrote the manuscript which was edited by all coauthors.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-19-CE02-0002). Sampling in the protected area was authorized by the Reunion National Park (DIR-I-2020-013). Logistic support was provided by the field station of Marelongue, funded by the P.O.E., Reunion National Park and OSU Reunion. We also thank Claudine Ah-Peng, Audrey Valery and Jocelyne Glaudert for logistic support during the fieldwork, Soraya Chaouch from the 'plateau technique de Cytométrie en flux et QPCR, Plateforme analytique du MNHN (UMR7245)' and Céline Bonillo for laboratory assistance.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest regarding this work.

PEER REVIEW

The peer review history for this article is available at <https://publons.com/publon/10.1111/1365-2745.13986>.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Raw data have been deposited in the Sequence Read Archive (SRA) under the BioProject accession no. PRJNA692353.


ORCID

Rémi Petrolli  <https://orcid.org/0000-0001-8079-6130>

Lucie Zinger  <https://orcid.org/0000-0002-3400-5825>

Benoît Perez-Lamarque  <https://orcid.org/0000-0001-7112-7197>

Géromine Collobert  <https://orcid.org/0000-0002-4167-2044>

Thierry Pailler  <https://orcid.org/0000-0002-6854-9126>

Marc-André Selosse  <https://orcid.org/0000-0003-3471-9067>

Florent Martos  <https://orcid.org/0000-0003-1213-5466>

REFERENCES

- Almeida-Neto, M., Guimarães, P. R., Jr., & Lewinsohn, T. M. (2007). On nestedness analyses: Rethinking matrix temperature and anti-nestedness. *Oikos*, 116, 716–722.
- Bahram, M., Harend, H., & Tedersoo, L. (2014). Network perspectives of ectomycorrhizal associations. *Fungal Ecology*, 7, 70–77.
- Bascompte, J., Jordano, P., Melián, C. J., & Olesen, J. M. (2003). The nested assembly of plant-animal mutualistic networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 9383–9387.
- Bauman, D., Drouet, T., Dray, S., & Vleminckx, J. (2018). Disentangling good from bad practices in the selection of spatial or phylogenetic eigenvectors. *Ecography*, 41, 1638–1649.
- Beiler, K. J., Durall, D. M., Simard, S. W., Maxwell, S. A., & Kretzer, A. M. (2010). Architecture of the wood-wide web: *Rhizopogon* spp. genets link multiple Douglas-fir cohorts. *New Phytologist*, 185, 543–553.
- Beiler, K. J., Simard, S. W., & Durall, D. M. (2015). Topology of tree-mycorrhizal fungus interaction networks in xeric and Mesic Douglas-fir forests. *Journal of Ecology*, 103, 616–628.
- Bingham, M. A., & Simard, S. W. (2011). Do mycorrhizal network benefits to survival and growth of interior Douglas-fir seedlings increase with soil moisture stress? *Ecology and Evolution*, 1, 306–316.
- Blanchet, F. G., Legendre, P., & Borcard, D. (2008). Forward selection of explanatory variables. *Ecology*, 89, 2623–2632.
- Booth, M. G. (2004). Mycorrhizal networks mediate overstorey-understorey competition in a temperate forest. *Ecology Letters*, 7, 538–546.
- Brooker, R. W., Maestre, F. T., Callaway, R. M., Lortie, C. L., Cavieres, L. A., Kunstler, G., Liancourt, P., Tielbörger, K., Travis, J. M. J., Anthelme, F., Armas, C., Coll, L., Corcket, E., Delzon, S., Forey, E., Kikvidze, Z., Oloffson, J., Pugnaire, F., Quiroz, C. L., ... Michalet, R. (2008). Facilitation in plant communities: The past, the present, and the future. *Journal of Ecology*, 96, 18–34.
- Brundrett, M. C., & Tedersoo, L. (2018). Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytologist*, 220, 1108–1115.
- Callaway, R. M., Brooker, R. W., Choler, P., Kikvidze, Z., Lortie, C. J., Michalet, R., Paolini, L., Pugnaire, F. I., Newingham, B., Aschehoug, E. T., Armas, C., Kikvidze, D., & Cook, B. J. (2002). Positive interactions among alpine plants increase with stress. *Nature*, 417, 844–848.
- Cevallos, S., Sánchez-Rodríguez, A., Decock, C., Declerck, S., & Suárez, J. P. (2017). Are there keystone mycorrhizal fungi associated to tropical epiphytic orchids? *Mycorrhiza*, 27, 225–232.
- Chagnon, P. L., Bradley, R. L., & Klironomos, J. N. (2012). Using ecological network theory to evaluate the causes and consequences of arbuscular mycorrhizal community structure. *New Phytologist*, 194, 307–312.
- Christenhusz, M. J. M., & Byng, J. W. (2016). The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa*, 261, 201–217.
- Davis, N. M., Proctor, D. M., Holmes, S. P., Relman, D. A., & Callahan, B. J. (2018). Simple statistical identification and removal of contaminant sequences in marker-gene and metagenomics data. *Microbiome*, 6, 226.
- Dearnaley, J., Perotto, S., & Selosse, M. A. (2016). Structure and development of orchid mycorrhizas. In F. Martin (Ed.), *Molecular mycorrhizal symbiosis* (1st ed., pp. 63–86). John Wiley & Sons.
- Dearnaley, J. D. W., Martos, F., & Selosse, M. A. (2012). Orchid mycorrhizas: Molecular ecology, physiology, evolution and conservation aspects. In B. Hock (Ed.), *Fungal associations* (2nd ed., pp. 207–230). The Mycota IX. Springer.
- Diédhiou, A. G., Selosse, M. A., Galiana, A., Diabaté, M., Dreyfus, B., Bà, A. M., de Faria, S. M., & Béna, G. (2010). Multi-host ectomycorrhizal fungi are predominant in a Guinean tropical rainforest and shared between canopy trees and seedlings. *Environmental Microbiology*, 12, 2219–2232.

- Dormann, C. F., Gruber, B., & Fründ, J. (2008). Introducing the bipartite package: Analysing ecological networks. *Interaction*, 8, 8–11.
- Encinas-Viso, F., Alonso, D., Klironomos, J. N., Etienne, R. S., & Chang, E. R. (2016). Plant-mycorrhizal fungus co-occurrence network lacks substantial structure. *Oikos*, 125, 457–467.
- Givnish, T. J., Spalink, D., Ames, M., Lyon, S. P., Hunter, S. J., Zuluaga, A., Iles, W. J. D., Clements, M. A., Arroyo, M. T. K., Leebens-Mack, J., Endara, L., Kriebel, R., Neubig, K. M., Whitten, W. M., Williams, N. H., & Cameron, K. M. (2015). Orchid phylogenomics and multiple drivers of their extraordinary diversification. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282, 20151553.
- Herrera, P., Kottke, I., Molina, M. C., Méndez, M., & Suárez, J. P. (2018). Generalism in the interaction of Tulasnellaceae mycobionts with orchids characterizes a biodiversity hotspot in the tropical Andes of southern Ecuador. *Mycoscience*, 59, 38–48.
- Herrera, P., Suárez, J. P., Sánchez-Rodríguez, A., Molina, M. C., Prieto, M., & Méndez, M. (2019). Many broadly-shared mycobionts characterize mycorrhizal interactions of two coexisting epiphytic orchids in a high elevation tropical forest. *Fungal Ecology*, 39, 26–36.
- Hornung, B. V. H., Zwitter, R. D., & Kuijper, E. J. (2019). Issues and current standards of controls in microbiome research. *FEMS Microbiology Ecology*, 95, fizo045.
- Izuddin, M., Srivathsan, A., Lee, A. L., Yam, T. W., & Webb, E. L. (2019). Availability of orchid mycorrhizal fungi on roadside trees in a tropical urban landscape. *Scientific Reports*, 9, 19528.
- Jacquemyn, H., Brys, R., Lievens, B., & Wiegand, T. (2012). Spatial variation in below-ground seed germination and divergent mycorrhizal associations correlate with spatial segregation of three co-occurring orchid species. *Journal of Ecology*, 100, 1328–1337.
- Jacquemyn, H., Brys, R., Merckx, V. S. F. T., Waud, M., Lievens, B., & Wiegand, T. (2014). Coexisting orchid species have distinct mycorrhizal communities and display strong spatial segregation. *New Phytologist*, 202, 616–627.
- Jacquemyn, H., Brys, R., Waud, M., Busschaert, P., & Lievens, B. (2015). Mycorrhizal networks and coexistence in species-rich orchid communities. *New Phytologist*, 206, 1127–1134.
- Jacquemyn, H., Merckx, V., Brys, R., Tyteca, D., Cammue, B. P. A., Honnay, O., & Lievens, B. (2011). Analysis of network architecture reveals phylogenetic constraints on mycorrhizal specificity in the genus *orchis* (Orchidaceae). *New Phytologist*, 192, 518–528.
- Jacquemyn, H., Waud, M., Merckx, V. S. F. T., Brys, R., Tyteca, D., Hedrén, M., & Lievens, B. (2016). Habitat-driven variation in mycorrhizal communities in the terrestrial orchid genus *Dactylorhiza*. *Scientific Reports*, 6, 37182.
- Jiang, J., Zhang, K., Cheng, S., Nie, Q., Zhou, S. X., Chen, Q., Zhou, J., Zhen, X., Li, X. T., Zhen, T. W., et al. (2019). *Fusarium oxysporum* KB-3 from *Bletilla striata*: An orchid mycorrhizal fungus. *Mycorrhiza*, 29, 531–540.
- Kartzinel, T. R., Trapnell, D. W., & Shefferson, R. P. (2013). Critical importance of large native trees for conservation of a rare neotropical epiphyte. *Journal of Ecology*, 101, 1429–1438.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K. I., & Miyata, T. (2002). MAFFT: A novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*, 30, 3059–3066.
- Klein, T., Siegwolf, R. T. W., & Körner, C. (2016). Belowground carbon trade among tall trees in a temperate forest. *Science*, 352, 342–344.
- Kottke, I., Haug, I., Setaro, S., Suárez, J. P., Weiß, M., Preußing, M., Nebel, M., & Oberwinkler, F. (2008). Guilds of mycorrhizal fungi and their relation to trees, ericads, orchids and liverworts in a neotropical mountain rain forest. *Basic and Applied Ecology*, 9, 13–23.
- Kottke, I., Setaro, S., Haug, I., Herrera, P., Cruz, D., Fries, A., Gawlik, J., Homeier, J., Werner, F. A., Gerique, A., & Suárez, J. P. (2013). Mycorrhiza networks promote biodiversity and stabilize the tropical mountain rain forest ecosystem: Perspectives for understanding complex communities. In J. Bendix, E. Beck, A. Bräuning, F. Makeschin, R. Mosandl, S. Scheu, & W. Wilcke (Eds.), *Ecosystem services, biodiversity and environmental change in a tropical mountain ecosystem of South Ecuador* (pp. 187–203). Springer.
- Kottke, I., Suárez, J. P., Herrera, P., Cruz, D., Bauer, R., Haug, I., & Garnica, S. (2010). Atractiellomycetes belonging to the 'rust' lineage (Pucciniomycotina) form mycorrhizae with terrestrial and epiphytic neotropical orchids. *Proceedings of the Royal Society B*, 277, 1289–1298.
- Krishna, A., Guimaraes, P. R., Jr., Jordano, P., & Bascompte, J. (2008). A neutral-niche theory of nestedness in mutualistic networks. *Oikos*, 117, 1609–1618.
- Lancaster, N. (2004). *A study of the distribution of orchids in the Mascarene islands* (Thesis; MSc Plant Diversity). Reading University.
- Leake, J. R., & Cameron, D. D. (2012). Untangling above-and below-ground mycorrhizal fungal networks in tropical orchids. *Molecular Ecology*, 21, 4921–4924.
- Li, T., Shimao, W., Yang, W., Selosse, M. A., & Gao, J. (2021). How mycorrhizal associations influence orchid distribution and population dynamics. *Frontiers in Plant Science*, 12, 647114.
- Li, T., Yang, W., Shimao, W., Selosse, M. A., & Gao, J. (2021). Progress and prospects of mycorrhizal fungal diversity in orchids. *Frontiers in Plant Science*, 12, 646325.
- Liang, M., Johnson, D., Burslem, D. F. R. P., Yu, S., Fang, M., Taylor, J. D., Taylor, A. F. S., Helgason, T., & Liu, X. (2020). Soil fungal networks maintain local dominance of ectomycorrhizal trees. *Nature Communications*, 11, 2636.
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet journal*, 17, 10–12.
- Martos, F., Munoz, F., Paillet, T., Kottke, I., Gonneau, C., & Selosse, M. A. (2012). The role of epiphytism in architecture and evolutionary constraint within mycorrhizal networks of tropical orchids. *Molecular Ecology*, 21, 5098–5109.
- McCormick, M. K., Taylor, D. L., Whigham, D. F., & Burnett, R. K., Jr. (2016). Germination patterns in three terrestrial orchids relate to abundance of mycorrhizal fungi. *Journal of Ecology*, 104, 744–754.
- McCormick, M. K., Whigham, D. F., & Canchani-Viruet, A. (2018). Mycorrhizal fungi affect orchid distribution and population dynamics. *New Phytologist*, 219, 1207–1215.
- Minh, B. Q., Schmidt, H. A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M. D., von Haeseler, A., & Lanfear, R. (2020). IQ-TREE 2: New models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Molecular Biology and Evolution*, 37, 1530–1534.
- Nieder, J., Propser, J., & Michaloud, G. (2001). Epiphytes and their contribution to canopy diversity. *Plant Ecology*, 153, 51–63.
- Nilsson, R. H., Tedersoo, L., Ryberg, M., Kristiansson, E., Hartmann, M., Unterseher, M., Porter, T. M., Bengtsson-Palme, J., Walker, D. M., De Sousa, F., et al. (2015). A comprehensive, automatically updated fungal ITS sequence dataset for reference-based chimera control in environmental sequencing efforts. *Microbes and Environments*, 30, 145–150.
- Oksanen, J. F., Guillaume Blanchet, R. K., Legendre, P., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., Simpson, G. L., Solymos, P. M., Henry, H., & Stevens, H. W. (2013). *Vegan: Community ecology package*. <http://cran.r-project.org/package=vegan>
- Olesen, J. M., Bascompte, J., Dupont, Y. L., & Jordano, P. (2007). The modularity of pollination networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 19891–19896.
- Perez-Lamarque, B., Krehenwinkel, H., Gillespie, R. G., & Morlon, H. (2022). Limited evidence for microbial transmission in the phyllosymbiosis between Hawaiian spiders and their microbiota. *Msystems*, 7, e0110-214.
- Perez-Lamarque, B., Petrolli, R., Strullu-Derrien, C., Strasberg, D., Morlon, H., Selosse, M. A., & Martos, F. (2022). Structure and specialization of mycorrhizal networks in phylogenetically diverse tropical communities. *Environmental Microbiome*, 17, 38.

- Petrolli, R., Vieira, C. A., Jakalski, M., Bocayuva, M. F., Vallé, C., Cruz, E. S., Selosse, M. A., Martos, F., & Kasuya, M. C. M. (2021). A fine-scale spatial analysis of fungal communities on tropical tree bark unveils the epiphytic rhizosphere in orchids. *New Phytologist*, 231, 2002–2014.
- Pölme, S., Bahram, M., Jacquemyn, H., Kennedy, P., Kohout, P., Moora, M., Oja, J., Öpik, M., Pecoraro, L., & Tedersoo, L. (2018). Host preference and network properties in biotrophic plant-fungal associations. *New Phytologist*, 217, 1230–1239.
- Rammitsu, K., Kajita, T., Imai, R., & Ogura-Tsujita, Y. (2021). Strong primer bias for Tulasnellaceae fungi in metabarcoding: Specific primers improve the characterization of the mycorrhizal communities of epiphytic orchids. *Mycoscience*, 62, 356–363.
- Rasmussen, H. N. (1995). *Terrestrial orchids – From seed to mycotrophic plant*. Cambridge University Press.
- Richard, F., Millot, S., Gardes, M., & Selosse, M. A. (2005). Diversity and specificity of ectomycorrhizal fungi retrieved from an old-growth Mediterranean forest dominated by *Quercus ilex*. *New Phytologist*, 166, 1011–1023.
- Ridgway, K. P., Duck, J. M., & Young, J. P. W. (2003). Identification of roots from grass swards using PCR-RFLP and FFLP of the plastid trnL (UAA) intron. *BMC Ecology*, 3, 8.
- Rog, I., Rosenstock, N. P., Körner, C., & Klein, T. (2020). Share the wealth: Trees with greater ectomycorrhizal species overlap share more carbon. *Molecular Ecology*, 29, 2321–2333.
- Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., & Mahé, F. (2016). VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, 4, e2584.
- Rowe, A. R., & Pringle, A. (2005). Morphological and molecular evidence of arbuscular mycorrhizal fungal associations in Costa Rican epiphytic bromeliads. *Biotropica*, 37, 245–250.
- Selosse, M. A., Boullard, B., & Richardson, D. (2011). Noël Bernard (1874–1911): Orchids to symbiosis in a dozen years, one century ago. *Symbiosis*, 54, 61–68.
- Selosse, M. A., Petrolli, R., Mujica, M. I., Laurent, L., Perez-Lamarque, B., Figura, T., Bourceret, A., Jacquemyn, H., Li, T., Gao, J., Minasiewicz, J., & Martos, F. (2022). The waiting room hypothesis revisited by orchids: Were orchid mycorrhizal fungi recruited among root endophytes? *Annals of Botany*, 129, 259–270.
- Selosse, M. A., Richard, F., He, X., & Simard, S. W. (2006). Mycorrhizal networks: Des liaisons dangereuses? *Trends in Ecology & Evolution*, 21, 621–628.
- Selosse, M. A., & Roy, M. (2009). Green plants that feed on fungi: Facts and questions about mixotrophy. *Trends in Plant Science*, 14, 64–70.
- Selosse, M. A., Weiß, M., Jany, J. L., & Tillier, A. (2002). Communities and populations of sebacinoïd basidiomycetes associated with the achlorophyllous orchid *Neottia nidus-avis* (L.) L.C.M. Rich. and neighbouring tree ectomycorrhizae. *Molecular Ecology*, 11, 1831–1844.
- Shefferson, R. P., Bunch, W., Cowden, C. C., Lee, Y. I., Kartzinel, T. R., Yukawa, T., Downing, J., & Jiang, H. (2019). Does evolutionary history determine specificity in broad ecological interactions? *Journal of Ecology*, 107, 1582–1593.
- Simard, S., Asay, A., Beiler, K., Bingham, M., Deslippe, J., He, X., Philip, L., Song, Y., & Teste, F. (2015). Resource transfer between plants through ectomycorrhizal fungal networks. In T. Horton (Ed.), *Mycorrhizal networks*. Springer.
- Simard, S. W., & Durall, D. M. (2004). Mycorrhizal networks: A review of their extent, function, and importance. *Canadian Journal of Botany*, 82, 1140–1165.
- Simard, S. W., Perry, D. A., Jones, M. D., Myrold, D. D., Durall, D. M., & Molina, R. (1997). Net transfer of carbon between ectomycorrhizal tree species in the field. *Nature*, 388, 579–582.
- Smith, S. E., & Read, D. J. (2008). *Mycorrhizal symbiosis*. Elsevier Ltd.
- Strasberg, D. (1994). *Dynamique des forêts tropicales de l'île de La Réunion: Processus d'invasions et de régénération sur les coulées volcaniques* (Thesis). Université de Montpellier II, Sciences et Techniques du Languedoc.
- Tedersoo, L., Bahram, M., Zinger, L., Nilsson, R. H., Kennedy, P. G., Yang, T., Anslan, S., & Mikryukov, V. (2022). Best practices in metabarcoding of fungi: From experimental design to results. *Molecular Ecology*, 31, 2769–2795.
- Thébault, E., & Fontaine, C. (2010). Stability of ecological communities and the architecture of mutualistic and trophic networks. *Science*, 329, 853–856.
- Toju, H., Sato, H., & Tanabe, A. S. (2014). Diversity and spatial structure of belowground plant-fungal symbiosis in a mixed subtropical forest of ectomycorrhizal and arbuscular mycorrhizal plants. *PLoS ONE*, 9, e86566.
- Toju, H., Tanabe, A. S., & Ishii, H. S. (2016). Ericaceous plant-fungus network in a harsh alpine-subalpine environment. *Molecular Ecology*, 25, 3242–3257.
- UICN France, CBNM, FCBN & MNHN. (2013). La Liste rouge des espèces menacées en France—Chapitre Flore vasculaire de La Réunion, Paris, France. ISBN: 9978-2-918105-30-5.
- van der Heijden, M. G. A., & Horton, T. R. (2009). Socialism in soil? The importance of mycorrhizal fungal networks for facilitation in natural ecosystems. *Journal of Ecology*, 97, 1139–1150.
- van der Heijden, M. G. A., Martin, F. M., Selosse, M. A., & Sanders, I. R. (2015). Mycorrhizal ecology and evolution: The past, the present, and the future. *New Phytologist*, 205, 1406–1423.
- Veldre, V., Abarenkov, K., Bahram, M., Martos, F., Selosse, M. A., Tamm, H., Kõljalg, U., & Tedersoo, L. (2013). Evolution of nutritional modes of Ceratobasidiaceae (Cantharellales, Basidiomycota) as revealed from publicly available ITS sequences. *Fungal Ecology*, 6, 256–268.
- Vogt-Schilb, H., Těšitelová, T., Kotlínek, M., Sucháček, P., Kohout, P., & Jersáková, J. (2020). Altered rhizoctonia assemblages in grasslands on ex-arable land support germination of mycorrhizal generalist, not specialist orchids. *New Phytologist*, 227, 1200–1212.
- Walder, F., Niemann, H., Natarajan, M., Lehmann, M. F., Boller, T., & Wiemken, A. (2012). Mycorrhizal networks: Common goods of plants shared under unequal terms of trade. *Plant Physiology*, 159, 789–797.
- Wang, D., Jacquemyn, H., Gomes, S. I. F., Vos, R. A., & Merckx, V. S. F. T. (2021). Symbiont switching and trophic mode shifts in Orchidaceae. *New Phytologist*, 231, 791–800.
- Weiß, M., Waller, F., Zuccaro, A., & Selosse, M. A. (2016). Sebaciales – One thousand and one interactions with land plants. *New Phytologist*, 211, 20–40.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR protocols: A guide to methods and applications* (pp. 315–322). Academic Press.
- Wilson, D. (1995). Endophyte – The evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos*, 73, 274–276.
- Xing, X., Gai, X., Liu, Q., Hart, M. M., & Guo, S. (2014). Mycorrhizal fungal diversity and community composition in a lithophytic and epiphytic orchid. *Mycorrhiza*, 25, 289–296.
- Xing, X., Jacquemyn, H., Gai, X., Gao, Y., Liu, Q., Zhao, Z., & Guo, S. (2019). The impact of life form on the architecture of orchid mycorrhizal networks in tropical forest. *Oikos*, 128, 1254–1264.
- Xing, X., Liu, Q., Gao, Y., Shao, S., Guo, L., Jacquemyn, H., Zhao, Z., & Guo, S. (2020). The architecture of the network of orchid-fungus interactions in nine co-occurring *Dendrobium* species. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 8, 130.
- Yang, F. S., Sun, A. H., Zhu, J., Downing, J., Song, X. Q., & Liu, H. (2017). Impacts of host trees and sowing conditions on germination success and a simple *ex situ* approach to generate symbiotic seedlings of a rare epiphytic orchid endemic to Hainan Island China. *Botanical Review*, 83, 74–86.
- Yang, R. H., Su, J. H., Shang, J. J., Wu, Y. Y., Li, Y., Bao, D. P., & Yao, Y. J. (2018). Evaluation of the ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS), specifically ITS1 and ITS2, for the analysis of fungal diversity by deep sequencing. *PLoS ONE*, 13, e0206428.
- Yoder, J. A., Imfeld, S. M., Heydinger, D. J., Hart, C. E., Collier, M. H., Gribbins, K. M., & Zettler, L. W. (2010). Comparative water balance

- profiles of Orchidaceae seeds for epiphytic and terrestrial taxa endemic to North America. *Plant Ecology*, 211, 7–17.
- Zhang, L., Chen, J., Lv, Y., Gao, C., & Guo, S. (2012). *Mycena* sp., a mycorrhizal fungus of the orchid *Dendrobium officinale*. *Mycological Progress*, 11, 395–401.
- Zinger, L., Bonin, A., Alsos, I. G., Bálint, M., Bik, H., Boyer, F., Chariton, A. A., Creer, S., Coissac, E., Deagle, B. E., de Barba, M., Dickie, I. A., Dumbrell, A. J., Ficetola, G. F., Fierer, N., Fumagalli, L., Gilbert, M. T. P., Jarman, S., Jumpponen, A., ... Taberlet, P. (2019). DNA metabarcoding – Need for robust experimental designs to draw sound ecological conclusions. *Molecular Ecology*, 28, 1857–1862.
- Zotz, G. (2016). *Plants on plants – The biology of vascular epiphytes* (p. 2016). Springer International Publishing.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Petrolli, R., Zinger, L., Perez-Lamarque, B., Collobert, G., Griveau, C., Pailler, T., Selosse, M.-A., & Martos, F. (2022). Spatial turnover of fungi and partner choice shape mycorrhizal networks in epiphytic orchids. *Journal of Ecology*, 00, 1–17. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.13986>

Supporting information

Supporting information of **Article II** can be accessed at the following link:

<https://besjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1365-2745.13986>

Article II – Figures annexes

Figure A6.1 Mantel correlogram showing spatial autocorrelation of orchid mycorrhizal fungi (OMF) on bark for each tree. Full circles indicate significant ($p < 0.05$) autocorrelation (positive or negative).

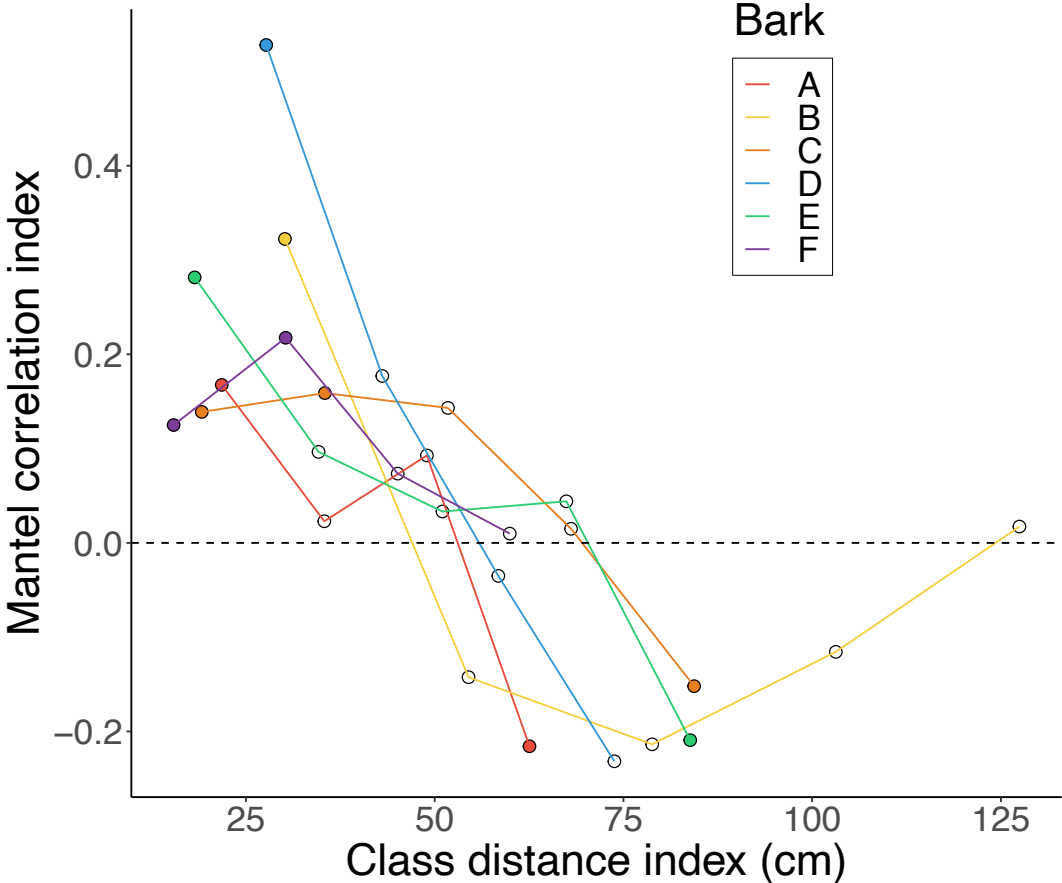
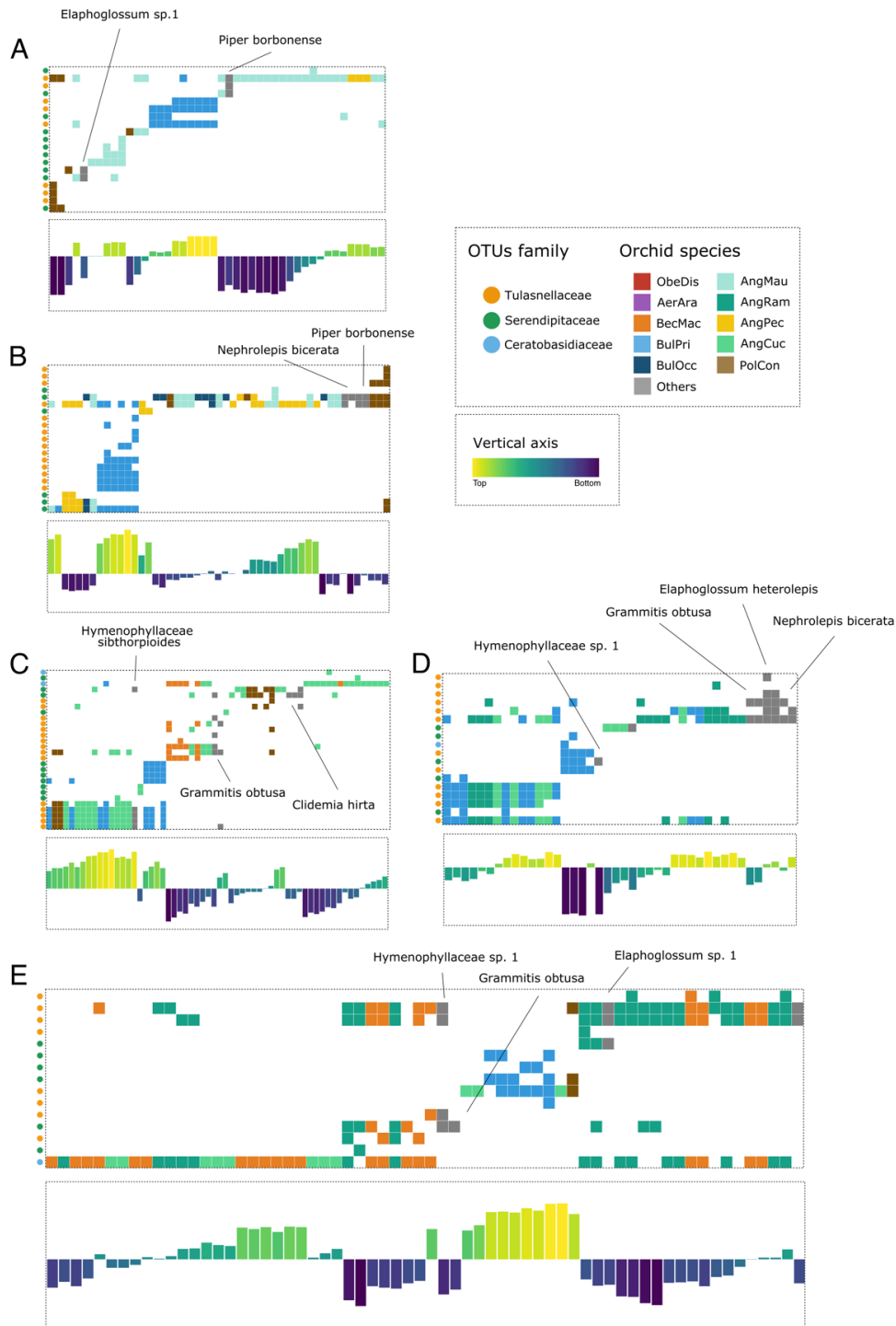


Figure A6.2 Interaction networks between orchid mycorrhizal fungi (OMF, rows) and their plant hosts (orchid or others; columns). (A-E) Networks are represented separately for each tree (B to F). No non-orchid species was sampled on tree A which is thus not represented here. Top; full circles at the left of each network indicate the OMF family of each OTU. Bottom; spatial distribution of plant roots. The coordinates of each plant root in the vertical axis on the coordinate system was plotted and coloured according to its value.



VII. Évolutions spatiale et temporelle des communautés mycorhiziennes

Article III. *Spatial and temporal turnovers of mycorrhizal communities in the host-tree specific epiphytic orchid *Bulbophyllum variegatum*.*

Cet article présente les résultats d'un premier volet d'une étude portant sur l'écologie atypique d'une orchidée épiphyte de La Réunion, *Bulbophyllum variegatum*. Cette espèce montre une forte préférence d'hôte pour une seule espèce d'arbre (*Agarista salicifolia*) à La Réunion, mais les mécanismes sous-jacents restent encore inconnus à ce jour.

Notre hypothèse de travail est que les communautés fongiques de *B. variegatum*, notamment mycorhiziennes, pourraient expliquer au moins en partie sa distribution spatiale à l'échelle de la forêt. Pour tester cette hypothèse, nous avons entrepris une étude en deux volets, basée sur un échantillonnage que nous avons réalisé à La Réunion en Avril 2021.

- Le premier volet (**Article III**) vise à caractériser, par séquençage NGS des racines et culture de souches fongiques *in vitro*, les communautés fongiques endophytes et mycorhiziennes de *B. variegatum* à l'échelle de l'île de La Réunion en prenant soin de capter la diversité totale de ses habitats (*i.e.*, différents sites et arbres hôtes alternatifs) et des individus (différents stades de développement).
- Le second volet (en cours de traitement) consiste à caractériser, par séquençage NGS, les communautés fongiques de l'écorce de différentes espèces d'arbres incluant *A. salicifolia* dans la forêt de Mare Longue, afin de déterminer si celles-ci pourraient être liées à une distribution biaisée de *B. variegatum* dans cette forêt. Ce second volet est en cours de traitement mais souffre d'un retard en raison de problèmes techniques liés à l'étape de séquençage des ADN amplifiés issus des écorces.

Les résultats présentés dans l'**Article III** (en cours de préparation) montrent que *B. variegatum* s'associe préférentiellement à trois champignons mycorhiziens ainsi qu'à plusieurs champignons endophytes sur toute l'île et sur tous ses arbres hôtes. Les trois champignons sont associés préférentiellement à différents stades de croissance et pourraient donc présenter des écologies variables.

Ce travail, débuté dès la mission de 2020 lors d'un échantillonnage préliminaire, a été pour moi l'occasion de me former à l'isolement, à la culture et au suivi de souches fongiques *in vitro* que l'on a isolées par la suite chez plusieurs espèces d'orchidées de La Réunion (voir

Annexe 2, page 217). J'ai également pris en charge la mise en place de l'expérience de germination *in vitro* sous la tutelle de Chantal Griveau. J'ai reçu une aide précieuse de la part d'Eve Hellequin et de Rosa Kemmerling pour le traitement moléculaire des échantillons de racines et d'écorces (près de 1000 échantillons au total). Enfin, les données de séquençages présentées ci-dessous ont fait l'objet d'un stage de M2 co-encadré par Florent Martos et moi-même et réalisé par Rosa Kemmerling. Rosa Kemmerling a réalisé la majeure partie des comptages de graines dans le cadre de l'expérience de germination symbiotique, ainsi que l'ensemble des analyses préliminaires que j'ai repris, complété, et mis en forme dans l'article présenté ci-dessous.

Spatial and temporal turnovers of mycorrhizal communities in the host-tree specific epiphytic orchid *Bulbophyllum variegatum*

Rémi Petrolli¹, Rosa Kemmerling¹, Eve Hellequin¹, Tony Robinet², Géromine Collobert¹, Chantal Griveau¹, Thierry Paillet³, Marc-André Selosse^{1,4,5}, Florent Martos¹

¹Institut de Systématique, Évolution, Biodiversité (ISYEB), Muséum National d'Histoire Naturelle, CNRS, Sorbonne Université, EPHE, Université des Antilles, CP 39, 57 rue Cuvier, F-75005 Paris, France

²Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques (UMR 8067 BOREA) Muséum National d'Histoire Naturelle, CNRS, Sorbonne Université, IRD, UCN, UA, Station Marine de Concarneau, 29900 Concarneau, France

³Herbier de l'Université de La Réunion, UMR C53 Cirad-Université, Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical, F-97410 St Pierre, La Réunion, France

⁴Department of Plant Taxonomy and Nature Conservation, University of Gdańsk, Wita Stwosza 59, 80-308, Gdańsk, Poland

⁵Institut universitaire de France (IUF)

Abstract

Background. Orchids form one of the richest plant families with ca. 28,000 species. They associate with mycorrhizal fungi throughout their lifecycle, from the fungal-dependent germination of their reserve-less seeds to the establishment of perennial adults. However, they are known to display varying degrees of specificity regarding mycorrhizal interactions. Yet, the turnover of their fungal partners during plant development has been poorly investigated, in particular in epiphytic species which germinate and grow on the bark of tropical trees.

Methods. We investigated the spatial and temporal evolutions of the mycorrhizal partners of the epiphytic orchid *Bulbophyllum variegatum* in La Réunion island, using high-throughput sequencing of the fungal ITS-2 region with two sets of primers to detect fungal communities and Tulasnellaceae specifically. Additionally, we conducted *in vitro* seed germination experiments with fungal strains isolated from adults' roots.

Results. *B. variegatum* is consistently associated with three mycorrhizal partners across the island. Two of them, one Serendipitaceae and one Tulasnellaceae are specifically associated with the early developmental stages while another Tulasnellaceae is retrieved more consistently in the roots of adults. The latter did not promote germination of seeds *in vitro*, and no other mycorrhizal partner could be isolated from adults' roots. Additionally, this species consistently interacts with few non-mycorrhizal fungi, mainly in the Helotiales and especially in adults.

Discussion. *B. variegatum* is specific in its mycorrhizal associations, and its fungal partners display temporal turnover during ontogeny. Future studies could investigate whether the mycorrhizal partners associated with early developmental stages could explain the constrained distribution of the orchid on one tree species.

Introduction

The majority of plants form mutualistic interactions with fungi in their roots called mycorrhizal symbioses (Van Der Heijden *et al.*, 2015; Brundrett & Tedersoo, 2018). Mycorrhizas are chimeric organs where nutrient exchanges occur between the two partners: the plant provides fixed carbon to its fungi and receives in return water and nutrients foraged in the soil by fungal hyphae. The mycorrhizal symbiosis is considered as poorly specific (*i.e.*, generalist), meaning that one plant species can generally interact with multiple fungi (Van Der Heijden *et al.*, 2015). However, the different mycorrhizal types harbor a varying degree of specificity, depending on the partners involved (Pöhlme *et al.*, 2018). Orchids, notably, are considered to form relatively specific interactions, though very variable, with their mycorrhizal partners (Pöhlme *et al.*, 2018).

The Orchidaceae family is one of the largest plant family with ca. 28,000 species (Christenhusz & Byng, 2016) and has a unique type of mycorrhizas (Smith & Read, 2008). Contrary to the majority of land plants which associate with arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycotina), orchids associate with fungi mainly in the Basidiomycota and, to a lesser extent, in the Ascomycota (Dearnaley *et al.*, 2012). Their fungal partners are generally considered as saprotrophic fungi, but their ecology remains poorly understood. The main fungi encountered are part of a polyphyletic group of Basidiomycota, called the rhizoctonias, which encompasses the Tulasnellaceae and the Ceratobasidiaceae in the Cantharellales, as well as the Serendipitaceae in the Sebaciales (Dearnaley *et al.*, 2012). The fungal hyphae can penetrate into the plant cells without disrupting the membrane, forming coiled-like structures called pelotons (Dearnaley *et al.*, 2012). Notably, the orchids produce minute seeds almost devoid of any reserve, which need the presence of a compatible fungus to germinate (Rasmussen, 1995). The seed supplied with fungal nutrients can grow into a heterotrophic stage called protocorm, and then eventually develop into an adult whose roots are colonized by mycorrhizal fungi.

Due to this high dependency on fungi at the germinating stage (Rasmussen, 1995), and later on (Cameron *et al.*, 2006, 2007; Davis *et al.*, 2022), it is generally acknowledged that the distribution of the fungal partners can influence that of the plant (Jacquemyn *et al.*, 2012; McCormick & Jacquemyn, 2014). However, this influence may be modulated by the degree of specificity in the interaction, because orchids that specifically interact with rare fungi should be more constrained in their distribution than orchids interacting with a large range of fungi (Swarts *et al.*, 2010) or

with few frequent fungi. Yet, no clear link between mycorrhizal specificity and orchid's rarity has been demonstrated so far (Phillips *et al.*, 2011; McCormick & Jacquemyn, 2014).

Varying degrees of mycorrhizal specificity have been demonstrated in orchids. Some species seem opportunistic in their associations, forming mycorrhizas with several fungal partners (e.g., Bonnardeaux *et al.*, 2007; Herrera *et al.*, 2019). At the opposite, some species such as the epiphytic orchid *Taeniophyllum glandulosum* associate with the same fungi regardless of their developmental stage or of the studied site (Rammitsu *et al.*, 2019).

The lack of relationship between orchid's rarity and mycorrhizal specificity might be explained in some cases by an evolution of the mycorrhizal preferences throughout the lifecycle of the orchid. Indeed, specific requirements regarding fungal partners at early developmental stages could constrain the distribution of the plant, even though adults associate with a larger range of fungal partners. In many orchid species, the degree of specificity can vary during the plant's development, from the germinating seed to the adult, but no consistent pattern seems to exist (Ventre Lespiaucq *et al.*, 2021). Some species show a high specificity at germinating stages and eventually associate with a larger range of fungal partners (Bayman *et al.*, 2016; Meng *et al.*, 2019; McCormick *et al.*, 2021) while at the contrary, some species show little specificity during germination (Meng *et al.*, 2019b).

About 80% of the orchid species are epiphytic, meaning that they germinate and subsequently grow on the bark or on the branches of tropical trees (Zotz, 2016). Epiphytic orchids can be either generalist or specialist in their mycorrhizal interactions (Herrera *et al.*, 2019; Rammitsu *et al.*, 2019). The mycorrhizal fungi colonizing their roots can extend on the surrounding bark (Petrolli *et al.*, 2021) but their ecology is still poorly known.

Regarding tree hosts, epiphytic orchids are often generalist, meaning that they can germinate and grow on several tree species (Zotz, 2016). Even though some cases of orchid preference toward their host trees have been documented (see Rasmussen & Rasmussen, 2018), the putative factors explaining these preferences have rarely been investigated. Gowland *et al.*, (2011) have proposed that mycorrhizal communities could be a factor influencing the probability of orchid seed germination on trees. Yet, because of the rarity of orchid species that are very specific to a host tree species, this hypothesis has so far never been properly tested (Pecoraro *et al.*, 2021).

In this study, we investigated the mycorrhizal ecology of an epiphytic orchid, *Bulbophyllum variegatum* Thouars, which almost exclusively colonises a single tree species (*i.e.*, *Agarista salicifolia*; Ericaceae) in the undergrowth of the lowland rainforest of La Réunion (Lancaster, 2004). We used high-throughput sequencing as well as isolation methods and germination experiments. As previously suggested by Martos *et al.*, (2012), we hypothesized that (i) *B. variegatum* should specifically interact with a limited range of mycorrhizal partners across its whole habitat. According to a pilot study in our lab, we suspected that (ii) some of these fungi may be required at the germinating step, while some may be more consistently retrieved in adult's roots, *i.e.*, temporal turnover of mycorrhizal partners during ontogeny.

Materials and methods

Study species

Bulbophyllum variegatum Thouars is an epiphytic orchid found in La Réunion and occasionally in Madagascar (Fischer *et al.*, 2007). In La Réunion, it grows almost exclusively on the trunk of the tree species *Agarista salicifolia* (Ericaceae; Fig 1; Lancaster, 2004). It is a sympodial, robust orchid species forming pseudobulbs. Although it is an epiphytic species, its roots are sometimes hairy (Fig. S1). The species usually flowers between the beginning of December and the end of January (Humeau *et al.*, 2011). *B. variegatum* is listed “Least Concern” in the IUCN red list (IUCN France, CBNM, FCBN & MNHN, 2013).

A. salicifolia is a large early pioneer tree which grows on young lava flows and persists over centuries in lowland rainforests of La Réunion (Cadet, 1977). It has a thick, toxic (Nganou *et al.*, 2018) and spongy bark which can subsequently form a soil-like surface covered by mosses in which the roots of *B. variegatum* can easily penetrate and grow (Fig. 1D). Large individuals of *A. salicifolia* are very often covered by colonies of *B. variegatum* on the island, but can also host ferns and more scarcely other orchid species such as the generalist *Angraecum ramosum* (Lancaster, 2004).

Among the few known alternative hosts of *B. variegatum* on the island, *Labourdonnaisia callophyloides*, *Pandanus sylvestris* and two species of *Syzigium* (*S. borbonicum* and *S. cymosum*) have

dense, thin, and hard bark (Fig 1F). At the contrary, the bark of *Eucalyptus robusta* has similar physical characteristics compared to *A. salicifolia*, i.e., a thick, and spongy bark.

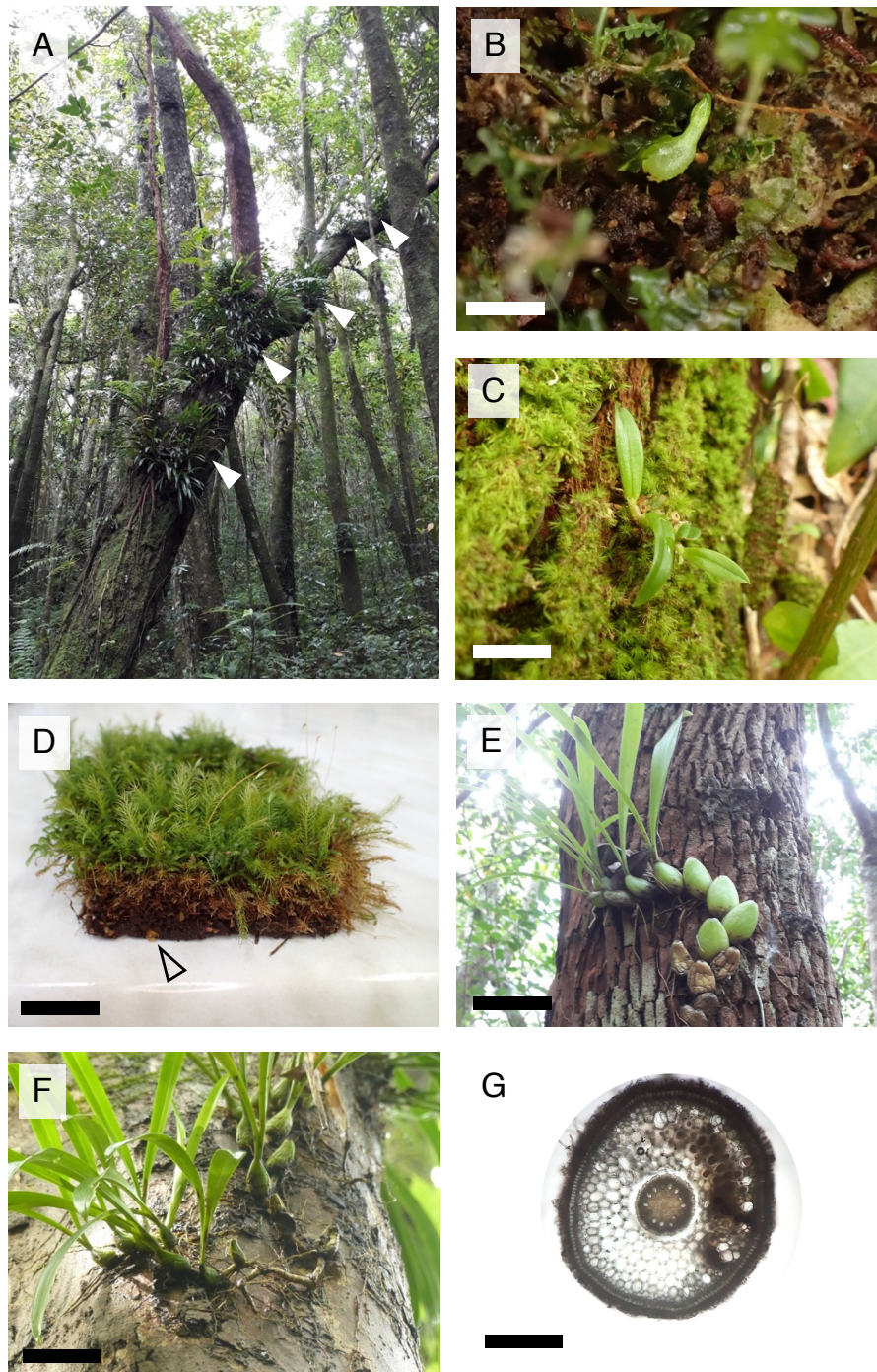


Figure 1 (A) *Bulbophyllum variegatum* colony (white arrows) growing on *Agarista salicifolia* in Mare Longue (ML, La Réunion). (B) Young seedling and (C) seedling of *B. variegatum* growing on *A. salicifolia*. (D) Bark of *A. salicifolia* forming a pseudo-soil covered with mosses in which the roots of *B. variegatum* can penetrate (arrows). (E) Adult of *B. variegatum* growing on *A. salicifolia*. (F) *B. variegatum* growing on an alternative host, i.e., *Syzgium* sp. Note the aspect of pseudobulbs compared to (E). (G) Peloton-containing root section of *B. variegatum*. Scales: (B-C) 1mm, (D) 5 cm, (E) 10 cm, (F) 15 cm, (G) 1.5 mm.

Study sites

The study was conducted at three dates (in 2006, 2020 and 2021) in La Réunion, in seven tropical lowland rainforests or fragments of forest on the East side of the island (Fig. S2). At each site (except Tremblet, see after), we sampled *B. variegatum* individuals growing on all host tree species found, *i.e.*, *A. salicifolia* and alternative hosts, in order to test for a possible “host effect” on endophytic fungal communities of *B. variegatum*, hence covering the full spectrum of known hosts on the island.

In 2006, root samples were collected at Mare Longue (ML), Eden (Ed) and Bassin Boeuf (BB) sites. In 2020, they were collected at Langevin (Lg) only. In 2021, additionally with ML, Ed and BB, they were collected at Tremblet (Tr), Basse Vallée (BV) and Grand Etang (GE) sites (Table 1, Fig. S2).

Table 1 Sampling design across sites and tree species. NA, data non available.

Site	Abbreviation	Date	Tree species	N trees	N orchid individuals	N samples
Mare Longue	ML	2021	<i>Agarista salicifolia</i>	16	40	120
Mare Longue	ML	2021	<i>Labourdonnaisia callophyloides</i>	1	2	5
Mare Longue	ML	2021	<i>Syzigium borbonicum</i>	2	4	14
Mare Longue	ML	2021	<i>Syzigium cymosum</i>	1	1	3
Mare Longue	ML	2006	NA	NA	NA	20
Basse Vallée	BV	2021	<i>Agarista salicifolia</i>	6	18	51
Tremblet	Tr	2021	<i>Pandanus sylvestris</i>	2	2	4
Bassin Boeuf	BB	2021	<i>Agarista salicifolia</i>	6	20	61
Bassin Boeuf	BB	2006	NA	NA	NA	10
Eden	Ed	2021	<i>Agarista salicifolia</i>	4	16	46
Eden	Ed	2006	NA	NA	NA	10
Grand Etang	GE	2021	<i>Eucalyptus robusta</i>	5	10	30
Langevin	Lg	2020	<i>Agarista salicifolia</i>	1	NA	19

The ML forest is a well-preserved, protected site located at the South of the island (elev. 205-560 m; Strasberg, 1994). The forest is settled on a lava rocky soil and is estimated ~400 years old (Albert *et al.*, 2020). *B. variegatum* is found there on old *A. salicifolia* trees, and scarcely on alternative tree species (Table 1, Fig. S2). BV, Lg and Tr sites are located close to ML and are also well-preserved lowland rainforest. At Tr site, *B. variegatum* is mainly found on *A. salicifolia* but was exclusively sampled on an alternative host (*i.e.*, *Pandanus sylvestris*). BB and Ed sites are located North of the island and are secondary forests, locally invaded by exotic plants, but individuals of

B. variegatum were growing there only on old *A. salicifolia* trees. Finally, GE site is a roadside, open area, where *B. variegatum* thrives in large colonies on the bark of *Eucalyptus robusta*. Additionally, three roots from one individual of *Angraecum ramosum* growing on *A. salicifolia* near *B. variegatum* at ML site were collected and treated similarly.

Sampling of the root communities

On each tree, three individuals of different growth stages (when possible) of *B. variegatum* were selected at various heights on the trunks for sampling (Table 1). Individuals with no roots were considered as young seedlings, those with the longest leaf < 3 cm as seedlings, and others as adults (Fig. 1B, 1C and 1E). This species harbours numerous, long roots, allowing their sampling while keeping the plant alive. For each orchid individual, three root sections were collected on field with sterile scalpels and treated in the lab within few hours. The six young seedlings with no roots (Fig. 1B) were collected on one tree at Ed site and processed entirely similarly as the root sections. Measures were made on each sampled individual (*i.e.*, height on the trunk, length and width of the longest leaf, number of pseudobulbs and largest diameter). Roots were carefully cleaned using sterile clamp in sterile water under a loupe microscope and for each one of them, one healthy portion of ca. 1 cm containing pelotons was selected and dried in individual bags of silica gel for subsequent analyses. Samples collected in 2006 had been conserved in 50% ethanol at 4°C until current processing.

In order to isolate the mycorrhizal fungi of *B. variegatum*, fresh roots were collected on field several times during the year 2021 (Table 2), conserved in individual tubes and processed within two days.

Molecular analyses for Illumina data

The dried roots were processed as in (Petrolli *et al.*, 2022). Briefly, they were powdered using a TissueLyser II (Qiagen) and their genomic DNA was extracted using the DNAeasy® Plant Mini Kit (Qiagen). Roots collected in 2006 were manually ground using sterile pestles and then extracted for genomic DNA similarly as the others. Each sample was amplified with two sets of primers targeting the fungal internal transcribed spacer 2 (ITS-2): the generalist primer pair ITS86-F/ITS4 (White *et al.*, 1990) targeting the whole fungal communities and the specific

primer pair 5.8S-OF/ITS4-Tul (Vogt-Schilb *et al.*, 2020) specifically targeting the Tulasnellaceae which fail amplification using generalist primers (Rammitsu *et al.*, 2021). Each PCR was conducted in two replicates, using both forward and reverse tagged primers, and following the same PCR protocol as in (Petrolli *et al.*, 2022). The PCR experimental design included positive (mock community) and negative (ultrapure water) controls as well as tagging system negative controls as in the above reference. The resulting amplicons were loaded on agarose gel for visualization, then purified using the NucleoMag® NGS Clean-up and Size Select kit (Macherey-Nagel), quantified by fluorescence using the Qubit™ dsDNA High-Sensitivity (Invitrogen™) and then mixed equimolarly in two pools, one for each primer pair. The two pools were sequenced in one 2*250 bp paired-end sequencing run on an Illumina MiSeq platform at Fasteris (Geneva, Switzerland).

Bioinformatics and OTU filtering for Illumina data

Paired reads from 2*250bp Illumina sequencing were processed as in (Perez-Lamarque *et al.*, 2022) using a customized pipeline based on VSEARCH (Rognes *et al.*, 2016). Importantly, reads were assigned to samples according to their tag+primer sequences allowing zero discrepancies with CUTADAPT (Martin, 2011). We used a 97% similarity threshold for Operational Taxonomic Units (OTUs) clustering in VSEARCH. After chimeras removal, OTUs were taxonomically assigned using the UNITE V8.3 (2021-05-10) eukaryotes reference database (Nilsson *et al.*, 2015). Singletons and short OTUs (< 200bp) were removed before OTU table building. Non-fungal OTUs and OTUs abnormally detected in the positive and negative controls were also discarded from the dataset, as well as OTUs identified as contaminants by the decontam R-package with frequency method (Davis *et al.*, 2018). Finally, based on the previously estimated tag-jumps rate, OTUs that represented less than 0.5% of the reads in each sample were set to 0, hence minimizing the impact of artefactual sequences and tag jumps. Samples with < 1000 reads were not considered in subsequent analyses. Putative orchid mycorrhizal fungi (OMF) were manually selected based on the list provided in (Dearnaley *et al.*, 2012).

Statistical analyses

In order to assess the spatial turnover of fungal associations, we used beta-diversity analyses using samples collected in 2021. Beta-diversities between pairs of samples were calculated using the Jaccard index in the *vegdist* function of the VEGAN R-package (Oksanen *et al.*, 2013), using presence/absence data. Differences in fungal composition were visually assessed through a Non-Metric Multidimensional Scaling (NMDS) using the *metaMDS* function and selecting only the 100 most abundant OTUs to avoid noise in the data. Statistical differences of fungal communities between parameters were tested by PERMANOVA using the *adonis* function of VEGAN (999 replications).

Ontogenic temporal turnover of fungal communities was assessed using samples collected in 2021. The parameters collected on field, *i.e.*, leaf length, width, and pseudobulb's diameter, were correlated, and the former was chosen as a proxy of orchid individual's age for subsequent analyses. The abundances of each fungal OTU in samples were plotted over the length of the longest leaf of the corresponding orchid individual. Significance of the resulting tendency was tested through a linear regression model followed by an anova test, and only those with p-value < 0.05 were considered as significant and showed in results. Samples collected in 2020 from Langevin were only used to visually assessed the fungal communities in seedlings.

Long-term temporal turnover of fungal communities was assessed by comparing fungal communities in samples collected in sites investigated both in 2006 and 2021 (*i.e.*, ML, Ed and BB). The sharing of OTUs between the two dates was visually assessed using the *ggvenn* R-package. Differences in frequency of the three main OTUs between the two dates were tested for significance using chi-squared test or Fisher test when marginal sums were too low.

In order to quantify the relative importance of the different recorded parameters (*i.e.*, site, species identity of host tree, host tree individual, height on the trunk and leaf length), we used variance partitioning using the *varpart* function of the VEGAN R-package. The above-cited variables were first selected through a forward selection using the *ordistep* function of the same package, and then used as explanatory variables of the fungal communities (presence/absence data). Associated p-values were computed after redundancy analysis (RDA) of the previously cited variables using the *rda* function, followed by an 'anova' test considering each selected variable as explanatory variable of the fungal communities.

Phylogenetic analyses

We used a phylogenetic approach to compare the mycorrhizal OTUs retrieved here as well as the isolated fungal strains with OMF already identified on the island by (Martos *et al.*, 2012) or by previous isolation from other orchid species at other sites. Due to the short length of the representative sequences obtained in this study using the Illumina technology (*i.e.*, < 500 bp), we first aligned the full-ITS sequences from Martos *et al.*, (2012) and from Sanger sequencing in this study (see above) using MAFFT with default parameters and then added the representative sequences of OTUs using the --add option of the same algorithm. The phylogenetic tree was built using IQTREE 2.1.3 with standard model selection and using the first alignment as a constraint (-g option) to add OTU representative sequences.

Fungal strain isolation and identification

Each fresh root section was carefully cleaned in water, then washed in sterile water complemented with Mercryl 0.1x (10 min), then washed in sodium hypochlorite 1% (5-10 min) and then rinsed three times in sterile water (3x10min). Ultimately, either thin root sections or pelotons isolated under loupe microscope were deposited on petri dishes filled with Fungal Isolation Medium (FIM; Rasmussen, 1995) and stocked at room temperature for subsequent monitoring. Emerging fungal hyphae were transferred in new petri dishes at the beginning of their growth to guarantee pure strain cultures.

Small agarose cubes of pure cultures were ground using a TissueLyser II (Qiagen) and extracted for DNA using the DNAeasy® Plant Mini Kit (Qiagen). The genomic DNA was amplified using both ITS1/ITS4 and ITS1/ITS4-Tul primers and then sequenced using a Sanger approach (Eurofins, Germany). Retrieved sequences were manually cleaned in Geneious 2020.1.2 and identified using BLAST on GenBank.

Germination experiment

To test for an induction of the germination of *B. variegatum* seeds by the isolated strains we selected 13 strains as follows. Three putative OMF isolated from *B. variegatum* were selected to assess their mycorrhizal ability *in vitro* and were compared to five putative OMF isolated from

other epiphytic (*Angraecum pectinatum*, *A. mauritianum* and *A. cucullatum*) and terrestrial (*Phaius tetragonum*) orchids growing in the same habitat as *B. variegatum* in the Mare Longue forest. This allowed us to test for the specificity of putative OMF strains at the germinating step, included strains that are encountered in the environment of *B. variegatum* but not in the roots of their adult counterparts. Finally, five non-mycorrhizal fungi isolated from *B. variegatum*, were selected to control for an unspecific fungal effect at the germination step. The strains were inoculated on OAT medium-containing petri dishes (5 replicates per strain; [Rasmussen, 1995](#)) two weeks before the beginning of the experiment, in order to allow the full growth of the mycelium in each petri dish.

The seeds of *B. variegatum* were harvested in the field by collecting 2 closed capsules from 1 individual in Mare Longue in April 2021. The capsules matured and opened in close bags and the seeds were conserved at -4°C until further processing. The seeds from the two capsules were merged, and a fraction of them was tested for viability using Tetrazolium (TZ). The remaining seeds were rinsed into sterile water (2h), then permeabilized using Mercryl 1/10 (45min), then sterilized using sodium hypochlorite 5% (15min) and then rinsed three times using sterile water (3x10min). Approx. 600 seeds were then deposited on each petri dish filled with OAT medium and colonized by fungal hyphae (see above). Seeds were also deposited on 10 additional petri dishes without fungal strain: 5 filled with OAT medium, and 5 filled with P668 medium (commercial medium for asymbiotic orchid seed germination), as controls. The petri dishes were stored in an incubator at 25°C with a 12/12 light/dark cycle, under a light exposure of ~500 lux, hence reproducing average conditions at the ML site within a year. The petri dishes were periodically randomized into the incubator in order to account for light variations. After 69 days of growth, the plant growth stages were counted under loupe microscope for three replicates per strain. The growth stages were defined as follows: stage 0, no germination; stage 1, swelling of the embryo; stage 2, development of radical hairs, stage 3, development of leaf projection, stage 4, development of the first leaf ([Otero et al., 2004](#)).

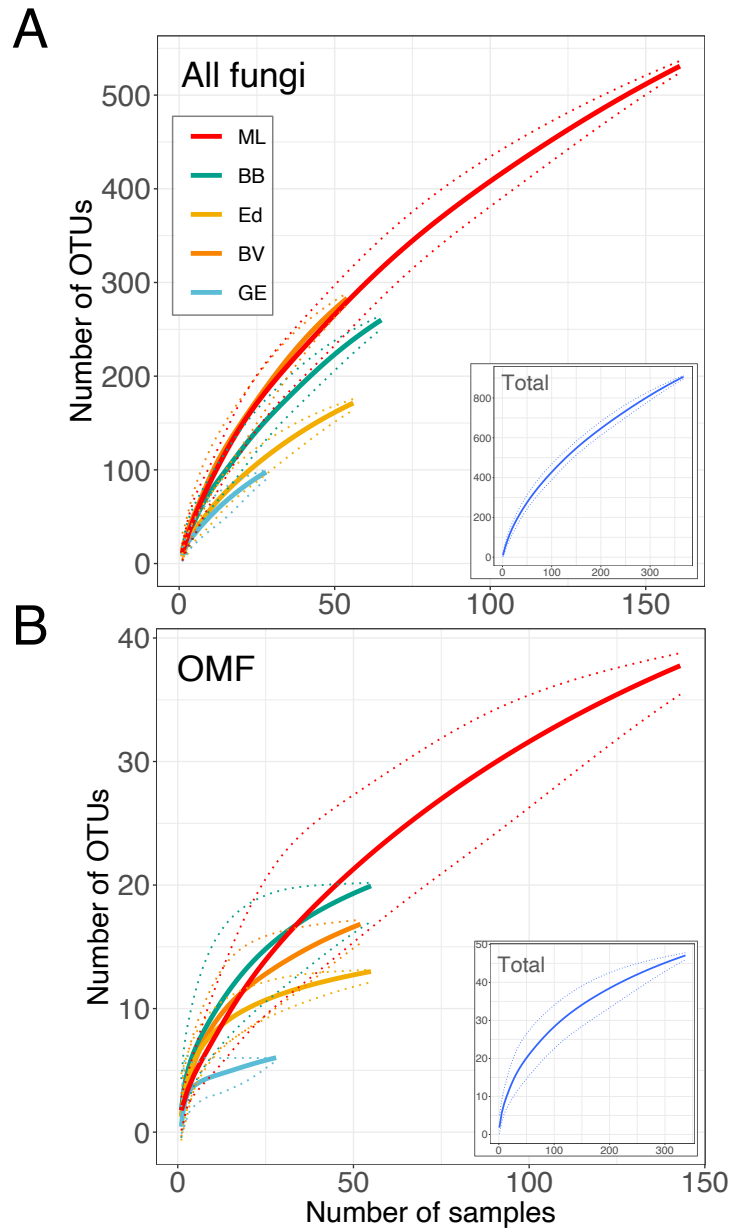


Figure 2 Rarefaction curves at each site sampled in 2021 using (A) all fungi and (B) putative OMF. The rarefaction curve for all sites combined is given at the bottom right of each panel. ML, Mare Longue ; BB, Bassin Bœuf ; Ed, Eden ; BV, Basse Vallée ; GE, Grand Etang. The Tremblet site (Tr) contained only 4 samples and was not included in this analysis. Dotted line: standard error.

Results

Data quality and filtering

A total of 16,570,593 and 6,836,099 sequences were retrieved after the Illumina sequencing with the ITS86-F/ITS4 and 5.8S-OF/ITS4-Tul primer pairs, respectively. After the removal of chimeras and singletons, they clustered into 4,361 OTUs encompassing 17,194,591 sequences. The removal of possible contaminants as well as the application of a highly selective bioinformatics threshold (*i.e.*, OTUs < 0.5% of the sequences in each sample set to zero) led to a total of 932 OTUs which encompassed 14,716,502 sequences. Among them, 57 belonged to putative OMF, including 47 rhizoctonias. The 5.8S-OF/ITS4-Tul primer pair successfully amplified 26 OTUs of Tulasnellaceae.

Root endophytic fungal communities

Despite a high sampling effort across several sites on the island, none of the rarefaction curves reached a plateau considering either total fungal communities or putative OMF communities (Fig. 2).

When considering the cumulative frequencies of OTUs in root samples, endophytic fungal communities of *B. variegatum* across the island were mainly represented by Ascomycota (57.5%), followed by Basidiomycota (34%). The remaining OTUs were mainly unidentified (6.9%) or non-dikarya fungi (1.7%; Fig. 3). The Cantharellales and the Sebaciniales represented 11.2% and 5.1% of the cumulative frequencies, respectively. The Cantharellales were represented mainly by members of the Tulasnellaceae (26 OTUs), but also by members of the Ceratobasidiaceae (3 OTUs), the Sistotrema genera (2 OTUs), the Botryobasidiaceae (2 OTUs) and the Clavulinaceae (1 OTU). However, only the Tulasnellaceae were abundant, representing 98.9% of the sequences in this order. Sebaciniales were represented by members of the Serendipitaceae only (18 OTUs; Fig. S3). Overall, the putative OMF communities were largely represented by Tulasnellaceae and Serendipitaceae which represented 70.8% and 28.7% of the sequences, respectively. Particularly, two OTUs of Tulasnellaceae, namely OTU1 and OTU3, accounted for 89.7% of the sequences amplified with the specific 5.8S-OF/ITS4-Tul pair of primers, while the OTU2 in the Serendipitaceae accounted for 7.9 % of the sequences amplified with the generalist ITS86-F/ITS4

pair of primers. None of these three OTUs were found in the roots of the investigated *Angraecum mauritianum* individual growing near *B. variegatum* on *A. salicifolia*.

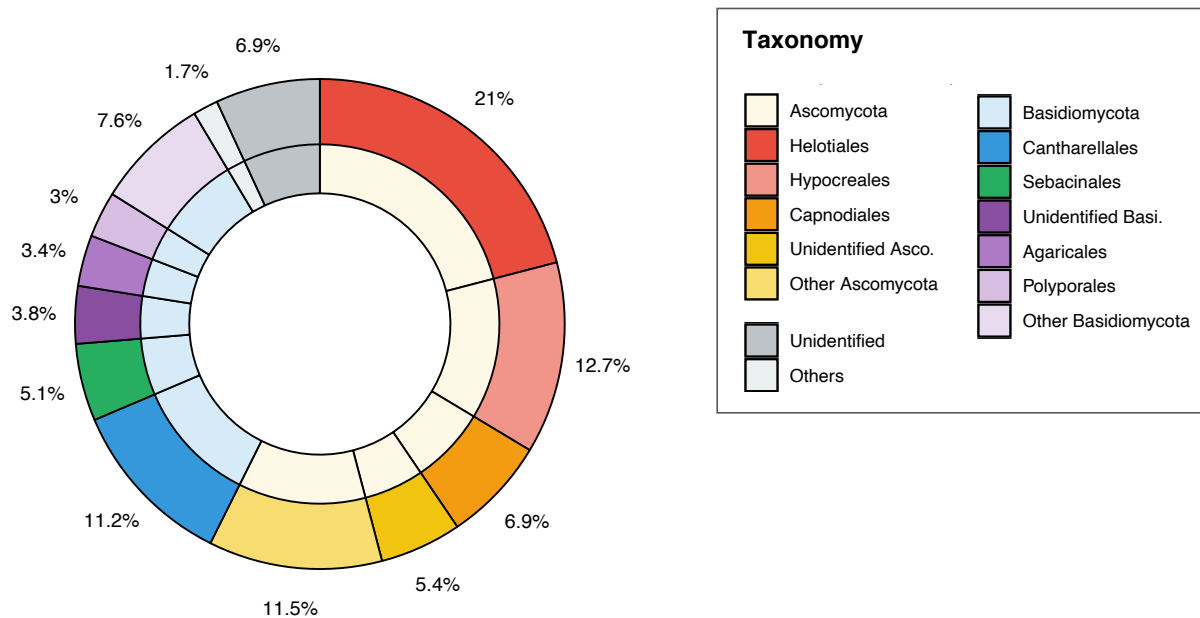


Figure 3 Fungal diversity as cumulative frequencies in the whole dataset. Basi., Basidiomycota.

Using a phylogenetic approach (Figs. S3-4), we found that OTU2 and OTU3 were identical to accessions JF691462 and JF691461-JF691456, respectively, which correspond to a Serendipitaceae and a Tulasnellaceae already detected in the roots of *B. variegatum* at the ML site by Martos et al., 2012. However, the OTU1 did not match any sequence previously identified on the island.

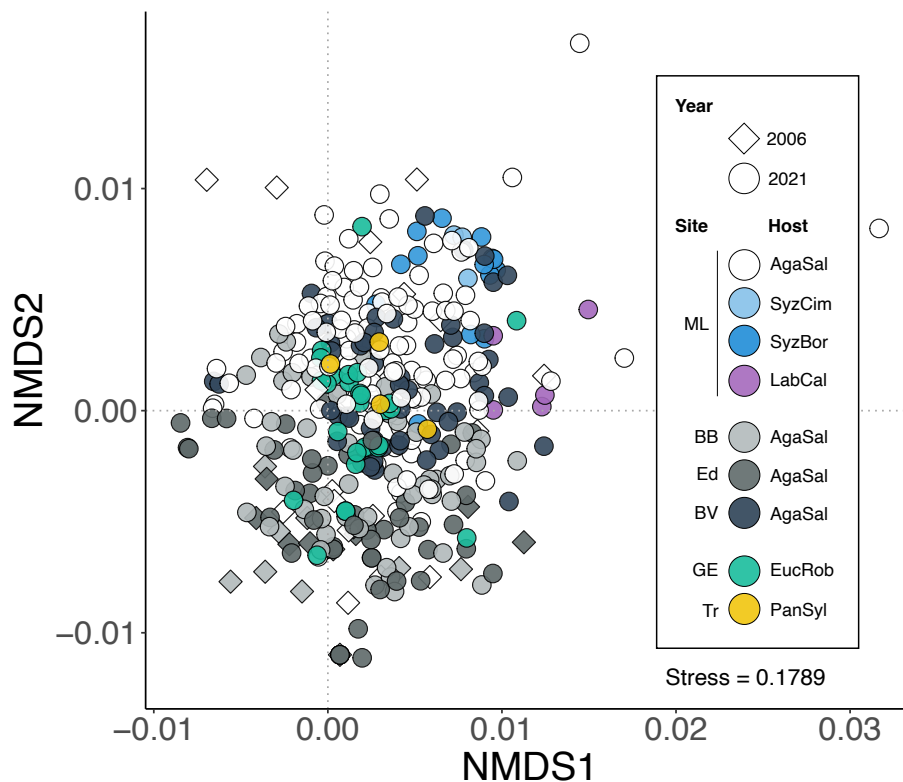


Figure 4 Non-metric multidimensional scaling (NMDS) of total fungal communities in the whole dataset. Two samples colonized by marginal OTUs only have been removed to allow a better visualization. AgaSal, *Agarista salicifolia*; SyzCim, *Syzigium cymosum*; SyzBor, *Syzigium borbonicum*; LabCal, *Labourdonnaisia callophyloides*; EucRob, *Eucalyptus robusta*; PanSyl, *Pandanus sylvestris*. ML, Mare Longue ; BB, Bassin Bœuf ; Ed, Eden ; BV, Basse Vallée ; GE, Grand Etang ; Tr, Tremblet.

Spatial turnover of fungal communities

The Non-Metric Multidimensional Scaling (NMDS) revealed slight differences of total fungal communities in the roots of *B. variegatum* between sites (Fig. 4), with largely overlapping communities. Statistical analyses revealed that total fungal communities statistically differed between sites (PERMANOVA, $F = 7.22$, $R^2 = 0.09$, $p = 0.001$), but more importantly between host tree individuals ($F = 3.99$, $R^2 = 0.36$, $p = 0.001$), suggesting that the largest part of the variation came from fungal differences between trees colonized by *B. variegatum* rather than between sites. While considering OMF communities only, NMDS analysis did not converged, indicating that the OMF communities were poorly variable among samples.

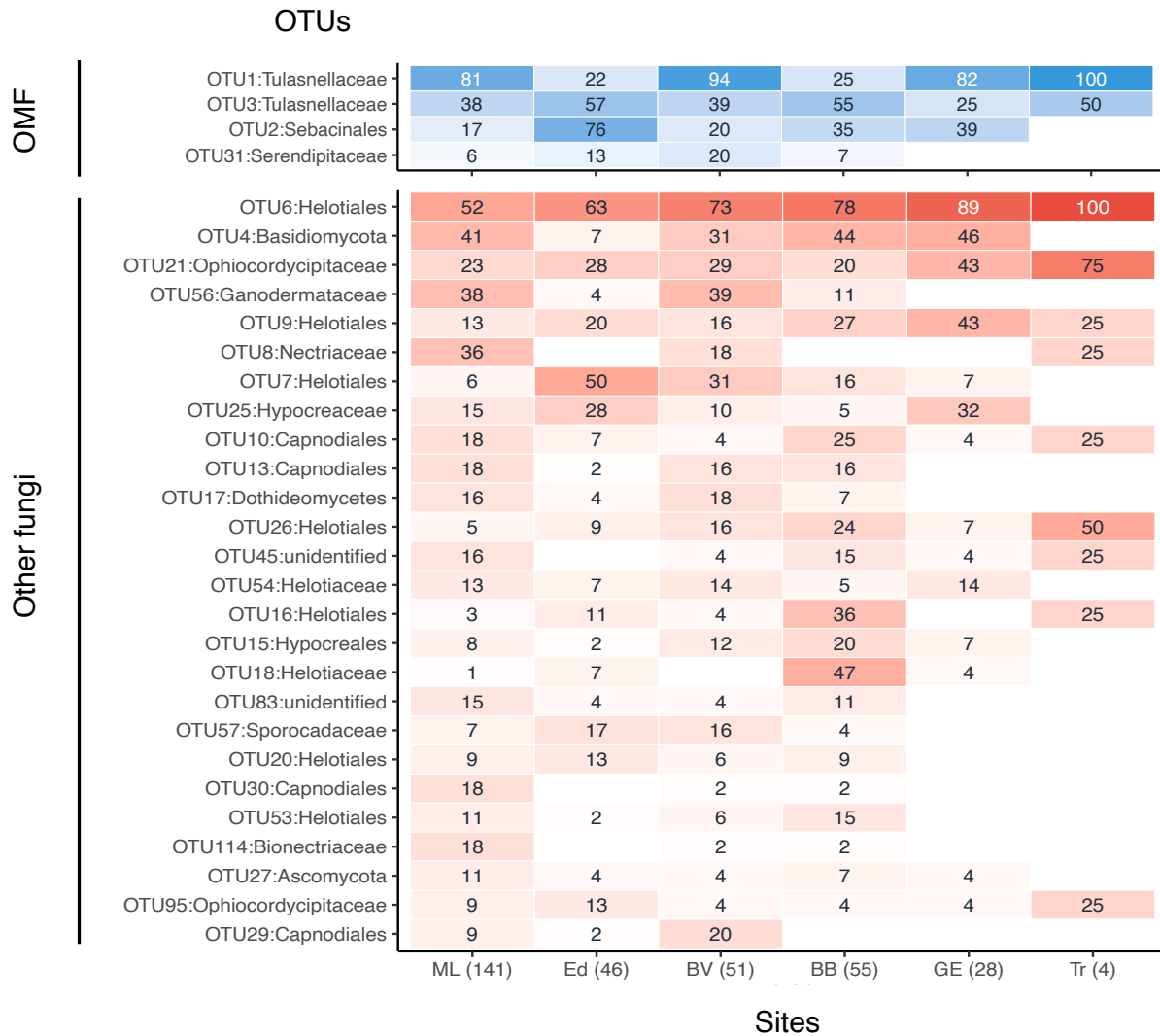


Figure 5 Heatmap of OTU's frequency in the roots of *Bulbophyllum variegatum* at different sites in 2021. The 30 most frequent OTUs are shown. Blue, OMF; red, other fungi. ML, Mare Longue; BB, Bassin Bœuf; Ed, Eden; BV, Basse Vallée; GE, Grand Etang; Tr, Tremblet.

We investigated the composition of samples at different sites considering the 30 most abundant OTUs and found that they were largely shared between sites (Fig. 5). In particular, the three main putative OMF OTUs, namely OTU1, OTU2 and OTU3, were found at nearly each sites in at least 17% of the samples. Overall, 92.9% of the investigated roots were colonized by at least one of these three OTUs, and 42.7% by at least two.

Some non-OMF OTUs were also frequent at all sites (Fig. 5) including members of the Helotiales (e.g., OTU6, OTU7, OTU9, OTU26), Hypocreales (e.g., OTU21, OTU25), Capnodiales (e.g., OTU10, OTU13) or non-identified Basidiomycota (OTU4).

Temporal turnover of fungal communities during ontogeny

We used the length of the longest leaf of each *B. variegatum* individual as a proxy of its age (see details in the *Materials and Methods* section). Since we suspected a fungal turnover during ontogeny, we investigated the evolution of the abundance of each OTUs during the plant growth (Figs 6, S5). We found 13 OTUs for which this evolution was significant ($p < 0.05$), with a positive evolution for 8 of them, and a negative evolution for the 5 remaining one. In the Tulasnellaceae, the three selected OTUs showed contrasting tendencies with two positive (OTU1 and OTU35) and one negative (OTU3) evolutions. The abundance of the OTU2 decreased during plant ontogeny.

When investigating in more details the composition of young seedlings (*i.e.*, with no root yet) of *B. variegatum* found at Ed site (Figs. 1, S6), we found that they were mainly colonized by the same OTUs of Tulasnellaceae and Serendipitaceae (OTU2, OTU3 and OTU1, in decreasing frequency order). They were only scarcely colonized by Helotiales and no other fungi was detected whereas they were detected in the roots of neighbouring seedlings.

The roots of the seedlings (*i.e.*, leaf length < 3 cm) found at different sites (*i.e.*, Ed, BB and Lg) were mainly colonized by OTU2 in the Serendipitaceae and OTU3 in the Tulasnellaceae (Fig. S6).

Isolations and germination experiment

We successfully isolated a total of 24 fungal strains, all from root sections (Table 2). In the Ascomycota (18 strains), we isolated a majority of Nectriaceae and Xylariales (inc. Xylariaceae and Hypoxylaceae), while in the Basidiomycota (6 strains) we isolated 5 strains of Tulasnellaceae and one strain of Hymenochaetales. Most of the isolated Tulasnellaceae belonged to the same clade as the OTU1 (Fig. S4), but one strain belonged to another clade in which we did not identify any OTU in the metabarcoding analysis.

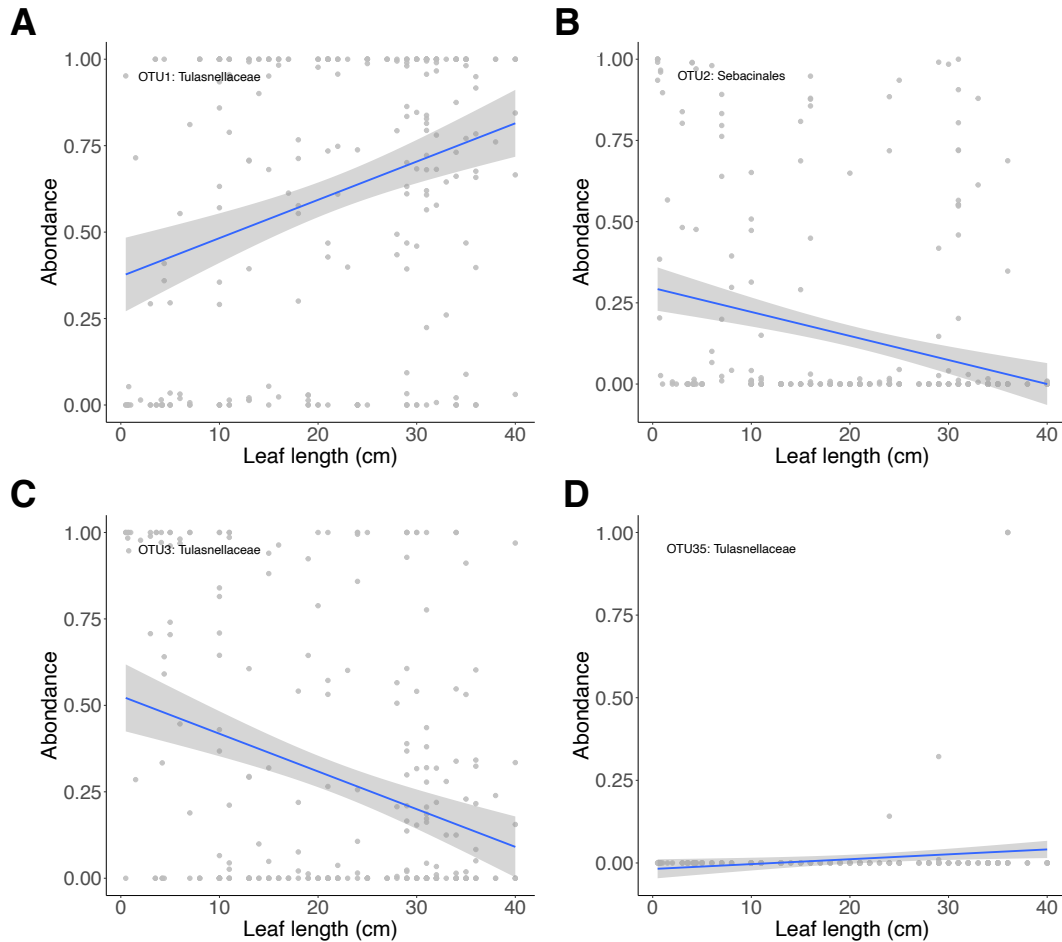


Figure 6 Turnover of OMF fungi during *Bulbophyllum variegatum* growth as estimated by leaf length. The abundances of (A) OTU1, (B) OTU2, (C) OTU3 and (D) OTU35 in root samples are plotted against the lengths of the longest leaf of the corresponding orchid individuals. Blue lines and associated 95% intervals represent the significant (p -value < 0.05) linear tendency according to a linear model ($y \sim x$).

Some of these strains, additionally with Tulasnellaceae isolated on other orchid species in La Réunion (ML site), were confronted to seeds of *B. variegatum* in *in vitro*, controlled conditions of light and temperature. After 69 days, the seeds were counted, and their growth stage recorded. None of the seeds investigated ($n = 6382$) developed further that stage 1, *i.e.*, swelling of the embryo, but before appearance of the rhizoids (Fig. S10). The positive controls (T+, P668) induced the germination of $32 \pm 7\%$ of the seeds. In the presence of Ascomycota strains, the number of seeds at stage 1 did not exceed 5% and was closed to the rate observed in the negative controls (no fungal strain) except with the *Fusarium* with which it reached 13%. Though some variation could be observed, all the Tulasnellaceae strains similarly induced the stage 1 (25-45%

of the seeds). After > 100 days of culture, only seeds in positive controls (T+) had reached stage 2 (*i.e.*, appearance of rhizoids; data not shown).

Long term temporal turnover of fungal communities

The NMDS analysis revealed that samples collected in 2006 harbored a fungal composition close to those collected at the same site in 2021 (Fig. 4, see also Fig. S7), yet significantly different, with little variation, as revealed by the PERMANOVA analysis ($F = 2.91$, $R^2 = 0.03$, $p < 0.001$). In total, 18.7% of the fungi retrieved in the sites ML, BB and Ed were identified at both dates, a tendency which was similar within each site (Fig. S8).

The three main OMF OTUs (*i.e.*, OTU1, OTU2 and OTU3) were all found in the roots of *B. variegatum* individuals sampled in 2006 at ML site, while only OTU2 and OTU3 were detected at other sites (Fig. S8). Chi-squared tests showed that their frequency in roots varied between 2006 and 2021 when considering all sites with an increase of OTU1 and OTU3 and a decrease of OTU2, while the tendencies were less significant considering sites separately (Table S1).

Variance partitioning

We used variance partitioning in order to assess which of the above investigated parameters played a major role in explaining both endophytic and OMF communities. The forward selection of variables led to two sets of variables. We first retained the leaf length as well as the host tree individual (Fig. 7). The analysis showed that the identity of the host tree explained most of the variance considering total fungal communities (16.0%) or OMF only (24.8%). When considering the second set of variables (*i.e.*, site, leaf length and height on the trunk), most of the variance was explained by the site but was limited to 3.3% regarding total fungal communities, and 9.6% regarding OMF communities (Fig. S9).

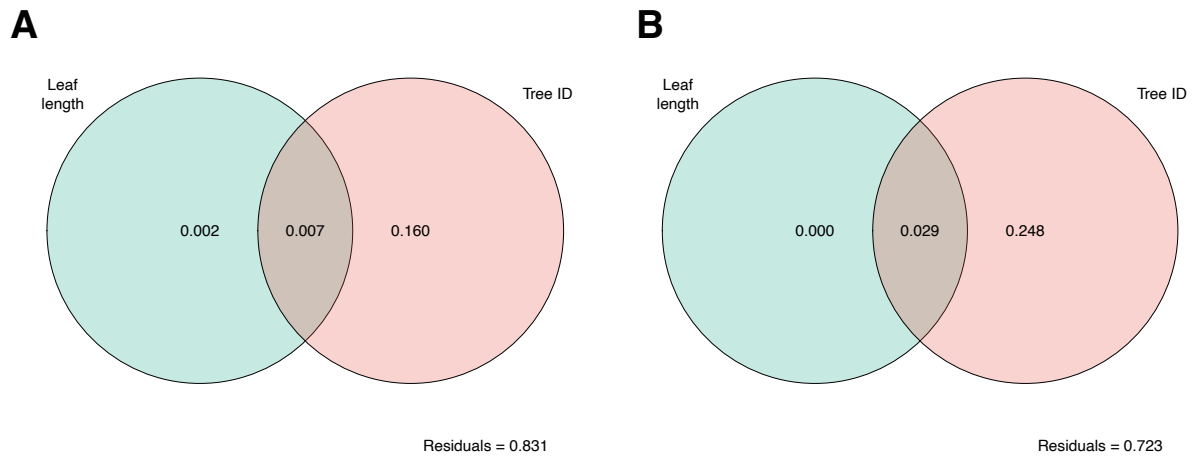


Figure 7 Variance partitioning of (A) total fungal communities and (B) OMF communities between the age of *Bulbophyllum variegatum* (as estimated by the length of the longest leaf, green) and the tree individual (Tree ID, red).

Discussion

Mycorrhizal specificity

Among the 932 fungal OTUs retrieved after the Illumina sequencing run and bioinformatics curation, 47 belonged to rhizoctonias fungi, *i.e.*, mainly Tulasnellaceae and Serendipitaceae, and few Ceratobasidiaceae. We also detected 10 putative orchid mycorrhizal fungi (OMF) belonging to other families (Dearnaley *et al.*, 2012), but none of them was abundant or frequent in the roots, and they may probably not be consistent mycorrhizal partners in this species. These findings confirm the work of Martos *et al.*, (2012) which showed that the main mycorrhizal partners of *B. variegatum* in La Réunion are rhizoctonias fungi belonging to Tulasnellaceae and Serendipitaceae, as already reported in other Australian *Bulbophyllum* species (Calvert, 2017). Among the different OTUs identified, three were largely prevalent in the data, representing 89.7% of the sequences amplified with the Tulasnellaceae-specific primers (OTU1 and OTU3), and 7.9% of the sequences amplified with the generalist primers (OTU2). These OTUs were consistently identified in the roots of *B. variegatum* at all sites on the island, including sites where it was growing on different host trees (*i.e.*, Tr, GE and some individuals at ML).

They were also detected at all dates (*i.e.*, 2006, 2020 and 2021), and two of them (OTU2 and OTU3) had been already identified in the roots of this species at ML site by [Martos et al., \(2012\)](#). OTU1 and OTU3 in the Tulasnellaceae increased in frequency in the roots between 2006 and 2021, while OTU2 in the Serendipitaceae showed the reverse tendency. However, these OTUs are associated with different ontogenic stages (see below), and the age of the *B. variegatum* individuals collected in 2006 could not be assessed. Furthermore, the limited number of samples collected in 2006 could explain some of these differences (*e.g.*, the absence of OTU1 at BB or Ed sites in 2006). Overall, these results suggest that there is little or no variation of the root colonization over years at the population scale. Seasonal variations (*i.e.*, dry *versus* wet season) could not be assessed because of the lack of data for samples collected in 2006, and because samples in 2020 and 2021 were collected at the same season.

Table 2 Fungal strains isolated from root sections of *Bulbophyllum variegatum* in La Réunion island (in 2021) and associated taxonomy BLAST on GenBank database. *Two strains were isolated from a previous sampling campaign in 2020 February at Langevin, near ML.

ID	Orchid individual	Site	Isolation date	Primers		Taxonomy		Genbank			
				ITS1/ITS4	ITS1/ITS4-Tul	Family (or Order)	Genus	Coverage	Identity	Accession	Geographical origin and source
SN1	Ind1	ML	April	x		Nectriaceae	<i>Thelonectria</i> sp.	83	92,2	MN108300.1	Or. India
SN2	Ind1	ML	April	x		Nectriaceae	<i>Thelonectria</i> sp.	100	92,13	MK656128.1	Or. South Africa
SN3	Ind1	ML	April	x		Nectriaceae	<i>Cylindrocarpon</i> sp.	100	100	HQ889717.1	Or. Asia, from <i>Cymbidium insigne</i> (Orchidaceae)
ST1	Ind1	ML	April		x	Tulasnellaceae	Tulasnellaceae sp.	95	87	JF691196.1	Or. La Réunion, from root of epiphytic orchids
SX1	Ind2	ML	August	x		Xylariaceae	<i>Nemania</i> sp.	100	99,77	MF770853.1	NA
SC1	Ind2	ML	August	x		Chaetomiaceae	<i>Chaetomium globosum</i>	100	100	ON712570.1	Airborne fungal strain
SHx1	Ind2	ML	August	x		Hypoxylaceae	<i>Hypoxylon hypomitum</i>	77	86,88	KY250380.1	Or. Gabon
SX2	Ind2	ML	August	x		Xylariaceae	<i>Muscodora</i> sp.	99	98,58	HM999898.1	Or. Ecuador, from <i>Tectaria incisa</i> (Tectariaceae, Polypodiales)
SD1	Ind2	ML	August	x		Dermataceae	<i>Pezicula rhizophila</i>	100	99,81	MN559706.1	NA
SD2	Ind3	ML	August	x		Dermataceae	<i>Mollisia asteliae</i>	100	100	NR_173037.1	Or. New Zealand, <i>Astelia chathamica</i> (Asteliaceae)
SO1	Ind3	ML	August	x		Ophiocordycipitaceae	<i>Hirsutella shenongiaensis</i>	65	96,12	KT390722.1	NA
ST2	Ind3	ML	August	x	x	Tulasnellaceae	Tulasnellaceae sp.	100	94,74	HM451790.1	From orchid root
ST3	Ind4	ML	August	x	x	Tulasnellaceae	Tulasnellaceae sp.	99	95,11	HM451790.1	From orchid root
SHe1	Ind4	ML	August	x		Hymenochaetales	Hymenochaetales sp.	98	98,98	JF691058.1	Or. La Réunion, from root of epiphytic orchids
SN4	Ind4	ML	August	x		Nectriaceae	<i>Comospora</i> sp.	95	97,41	MN602874.1	NA
SHx2	Ind5	ML	August	x		Hypoxylaceae	<i>Annulohyphosylon stygium</i>	100	99,27	MZ422893.1	NA
SN5	Ind6	ML	November	x		Nectriaceae	<i>Thelonectria</i> sp.	75	91,75	MK656128.1	Or. South Africa
SN6	Ind7	ML	November	x		Nectriaceae	<i>Thelonectria</i> sp.	74	91,71	MK656128.1	Or. South Africa
SN7	Ind8	ML	November	x		Nectriaceae	<i>Thelonectria</i> sp.	75	91,73	MK656128.1	Or. South Africa
SN8	Ind9	ML	November	x		Nectriaceae	<i>Thelonectria</i> sp.	75	91,69	MK656128.1	Or. South Africa
SS1	Ind10	ML	November	x		Saccharothecaceae	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	100	99,81	MN658859.1	Or. China
SHe1	Ind11	ML	November	x		Helotiales	Helotiales sp.	100	99,61	MG707597.1	From roots of <i>Pleione</i> sp. (Orchidaceae)
ST4	Ind12	Tr	August	x	x	Tulasnellaceae	Tulasnellaceae sp.	100	94,62	HM451790.1	From orchid root
ST5	Ind13	Tr	August	x	x	Tulasnellaceae	Tulasnellaceae sp.	100	95,31	HM451790.1	From orchid root
SN9	Ind14	Lg	February*	x		Nectriaceae	<i>Thelonectria pelargonii</i>	99	85,91	NR_161120.1	Or. South Africa, isolated from <i>Pelargonium</i> sp.
SN10	Ind15	Lg	February*	x		Nectriaceae	<i>Comospora</i> sp.	74	97,44	MN602874.1	NA

Overall, these results suggest that *B. variegatum* is a specialist in its mycorrhizal interactions, as already demonstrated for other epiphytic orchids (*e.g.*, [Rammitzu et al., 2019](#)). [Shefferson et al., \(2019\)](#) proposed that orchids are often *apparent generalists*, meaning that they specifically interact with few partners while interacting more opportunistically with other fungi. Here, some other rhizoctonias OTUs were detected in the roots of few individuals, such as OTU11 (Tulasnellaceae; 9 individuals), OTU31 (Serendipitaceae; 18 individuals), or OTU39 (Tulasnellaceae; 4 individuals), suggesting that less specific, opportunistic associations may be possible ([Rammitzu](#)

et al., 2020). For instance, the OTU39 belonged to a clade of Tulasnellaceae known to form mycorrhizas in several epiphytic orchids of lowland rainforests in La Réunion (Martos *et al.*, 2012), suggesting that it might be frequent in the environments where *B. variegatum* thrives.

Yet, the three main mycorrhizal partners identified in this study were not detected in the roots of other orchid species at the scale of the whole island by Martos *et al.*, (2012). Furthermore, only the OTU1 had been found to colonize the roots of few epiphytic orchids growing on a single tree (*Nuxia verticillata*) in the ML forest, among a total of 6 investigated trees (Petrolli *et al.*, 2022). This suggests that they might be a reciprocal specialization between the orchid and its mycorrhizal fungi, at least those colonizing the early developmental stages.

Root non-mycorrhizal endophytic fungi

Apart from mycorrhizal fungi, the roots of *B. variegatum* were mainly colonized by endophytic fungi belonging to Ascomycota, mainly Helotiales, Hypocreales and Capnodiales. Interestingly, some of them were consistently found at each site, suggesting that they could have a role, either positive or negative, for the plant. For instance, OTU6 in the Helotiales was found in at least 50% of the investigating roots at each site while OTU21, an Ophiocordycipitaceae (in the Hypocreales) was found in >20% of them.

Helotiales are current orchid root endophytes (e.g., Herrera *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2014; Cevallos *et al.*, 2018; see also Selosse *et al.*, 2022), including in *Bulbophyllum* species (Calvert, 2017) and are part of the dark septate endophytes (DSE; Mandyam & Jumpponen, 2005) complex. DSE are known to promote plant growth (Newsham, 2011), to mediate nutrient absorption by the roots (Wu *et al.*, 2021) as well as stress resistance (Li *et al.*, 2018) and often co-occur in plant roots with mycorrhizal fungi (Mandyam & Jumpponen, 2005), including in epiphytic plants (Leroy *et al.*, 2021). Very recently, a DSE strain has been demonstrated to form coiled structures in root cells of the epiphytic orchid *Coelogyne viscosa* and to enhance seedling's growth and resistance to drought *in vitro* (Liu *et al.*, 2022). While Helotiales are also frequent mycorrhizal partners in Ericaceae (Smith & Read, 2008), their ability to form proper mycorrhizas in orchids has yet to be proven. Still, whether DSE can act as frequent beneficial mycorrhizal or endophytic fungi in the roots of orchids, including in *B. variegatum*, should be investigated in the future (Liu *et al.*, 2022). Unfortunately, no fungal strain corresponding to an abundantly retrieved Helotiales could be isolated here and included in the germination experiment.

Ophiocordycipitaceae have also been found endophytically in other plants (Gazis *et al.*, 2014), including the OTU21 which was identical to a *Tolypocladium* sp. retrieved in the roots of *Dendrobium sinensis* by Wang *et al.*, (2017). Yet, their potential role in plant function have so far not been investigated.

Evolution of communities during ontogeny

In a recent study, Ventre Lespiaucq *et al.*, (2021) have demonstrated that the mycorrhizal composition of protocorms and young seedlings often differ from that of conspecific adults. Several patterns of evolution were documented, with both partner gains and losses. In this study, although we could not find any protocorm (*i.e.*, young seedlings with no leaf) *in situ*, we found very young leafy seedlings at one site, allowing us to investigate the mycorrhizal communities of this species at early developmental stages. Results showed that they were colonized by the same three OTUs of rhizoctonias (OTU1, OTU2 and OTU3) as adults, suggesting at first sight no turnover during ontogeny in this symbiosis, at least regarding key fungal partners (Rammitsu *et al.*, 2019). Yet, when investigating the evolution of their abundances in roots against the leaf length of their orchid's host as a proxy of their age, we found two distinct patterns. While the OTU1 was increasingly abundant in the roots of older *B. variegatum*, the OTU2 and OTU3 showed the opposite pattern. Accordingly, the youngest individuals were mainly colonized by OTU2 and OTU3. Even though this last tendency was observed considering a limited number of host trees, it was consistent between sites (Ed, Lg, but not BB), suggesting that it is robust. Therefore, OTU2 may be specifically necessary at the germinating stage, a pattern of specificity already observed in other orchid species (*e.g.*, Bayman *et al.*, 2016; McCormick *et al.*, 2021). OTU2 and OTU3 might be progressively lost after germination and replaced by OTU1 and less frequent OTUs. According to (Ventre Lespiaucq *et al.*, 2021), this scenario accounts for total or partial replacement of mycorrhizal partners.

Accordingly, we found no net positive effect of the strains ST3 and ST5 (similar to OTU1) on seed germination rates compared to other mycorrhizal fungi tested (*i.e.*, Tulasnellaceae isolated from other orchid species). This could suggest either that the early germination (*i.e.*, before appearance of rhizoids) is non-specific regarding members of the Tulasnellaceae or that these strains do not effectively promote the germination of *B. variegatum*'s seeds. Unfortunately, fungal strains corresponding to OTU2 and OTU3 could not be isolated on FIM medium despite several

attempts. Hence, given that the growth rate of the germinating seeds was very low (no leaf after > 100 days; data not shown) even in the positive controls, we hypothesize that we have not successfully isolated the mycorrhizal partners required for germination yet, and that mycorrhizal fungi isolated from adult roots do not necessarily promote seed germination (Meng *et al.*, 2019).

Considering other fungi, they were not or scarcely retrieved in the roots of young seedlings, but rapidly increased in frequency during ontogeny (especially Helotiales), suggesting that they are not necessary during germination (consistently with the germination experiment).

Despite this fungal turnover during ontogeny, variance partitioning showed that fungal communities were mainly explained by the identity of the host tree rather than by *Bulbophyllum*'s age. This suggests that apart from few fungal partners (including the main mycorrhizal ones) that are selected and/or retained by the plant, fungal communities rapidly become a subset of the fungi available on the bark of the host tree (with poor selection) during the growth of the seedlings.

Implications for the distribution of B. variegatum

Overall, these results suggest that endophytic fungal communities of *B. variegatum* are poorly variable across the island, especially regarding OMF. This suggests the presence of a core OTU inside the roots of this species (Cevallos *et al.*, 2017), which encompasses only three main mycorrhizal partners, but also endophytic fungi in the Helotiales. Accordingly, the distribution of OTU2 (Serendipitaceae) and perhaps OTU3 (Tulasnellaceae) should constrain the germination of *B. variegatum* seeds, even though their role during germination has to be confirmed.

Future studies could investigate the distribution of these OTUs on different tree species to see whether they are responsible for the host tree preference observed in this orchid species (Tremblay *et al.*, 1998; Gowland *et al.*, 2013; Pecoraro *et al.*, 2021).

Furthermore, *B. variegatum* is also found in Madagascar (env. 800 km from La Réunion). As orchids' preference for their host trees can be variable across regions (e.g., Mújica *et al.*, 2018),

future studies should also investigate the distribution of *B. variegatum* and its fungal partners in this island.

Acknowledgments

FM is financed by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-19-CE02-0002). We also would like to thank Claudine Ah-Peng for logistic support during the fieldwork, Soraya Chaouch from the “plateau technique de Cytométrie en flux et QPCR, Plateforme analytique du MNHN (UMR7245)”. The authors declare no conflict of interest regarding this work.

Author contributions

FM and RP designed the study. RP, EH and RK performed the molecular analyses. RP and RK performed the bioinformatics and statistical analyses.

References

- Albert S, Flores O, Michon L, Strasberg D. 2020. Dating young (<1000 yr) lava flow eruptions of Piton de la Fournaise volcano from size distribution of long-lived pioneer trees. *Journal of Volcanology and Geothermal Research* **401**: 106974.
- Bayman P, Mosquera-Espinosa AT, Saladini-Aponte CM, Hurtado-Guevara NC, Viera-Ruiz NL. 2016. Age-dependent mycorrhizal specificity in an invasive orchid, *Oeceoclades maculata*. *American Journal of Botany* **103**: 1880–1889.
- Bonnardeaux Y, Brundrett M, Batty A, Dixon K, Koch J, Sivasithamparam K. 2007. Diversity of mycorrhizal fungi of terrestrial orchids: compatibility webs, brief encounters, lasting relationships and alien invasions. *Mycological Research* **111**: 51–61.
- Brundrett MC, Tedersoo L. 2018. Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytologist* **220**: 1108–1115.
- Cadet LJT. 1977. La végétation de l'île de La Réunion : étude phytoécologique et phytosociologique. Thesis. Université Aix-Marseille 3.
- Calvert J. 2017. Mycorrhizal associations and phylogenetic relationships of south-east Queensland *Bulbophyllum* orchids. Thesis. University of Southern Queensland.
- Cameron DD, Johnson I, Leake JR, Read DJ. 2007. Mycorrhizal acquisition of inorganic phosphorus by the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. *Annals of Botany* **99**: 831–834.
- Cameron DD, Leake JR, Read DJ. 2006. Mutualistic mycorrhiza in orchids: evidence from plant-fungus carbon and nitrogen transfers in the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. *New Phytologist* **171**: 405–416.
- Cevallos S, Herrera P, Sánchez-Rodríguez A, Declerck S, Suárez JP. 2018. Untangling factors that drive community composition of root associated fungal endophytes of Neotropical epiphytic orchids. *Fungal Ecology* **34**: 67–75.
- Cevallos S, Sánchez-Rodríguez A, Decock C, Declerck S, Suárez JP. 2017. Are there keystone mycorrhizal fungi associated to tropical epiphytic orchids? *Mycorrhiza* **27**: 225–232.
- Christenhusz MJM, Byng JW. 2016. The number of known plants species in the world and its annual

increase. *Phytotaxa* 261: 201–217.

Davis B, Lim W-H, Lambers H, Dixon KW, Read DJ. 2022. Inorganic phosphorus nutrition in green-leaved terrestrial orchid seedlings. *Annals of Botany* 129: 669–678.

Davis NM, Proctor DM, Holmes SP, Relman DA, Callahan BJ. 2018. Simple statistical identification and removal of contaminant sequences in marker-gene and metagenomics data. *Microbiome* 6: 226.

Dearnaley JDW, Martos F, Selosse MA. 2012. Orchid mycorrhizas: molecular ecology, physiology, evolution and conservation aspects. In: *Fungal Associations*, 2nd Edition The Mycota IX. B. Hock (Ed.). Springer Berlin Heidelberg, Germany, 207–230.

Fischer GA, Gravendeel B, Sieder A, Andriantiana J, Heiselmayer P, Cribb PJ, Smidt E de C, Samuel R, Kiehn M. 2007. Evolution of resupination in Malagasy species of *Bulbophyllum* (Orchidaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 45: 358–376.

Gazis R, Skaltsas D, Chaverri P. 2014. Novel endophytic lineages of *Tolypocladium* provide new insights into the ecology and evolution of *Cordyceps*-like fungi. *Mycologia* 106: 1090–1105.

Gowland KM, van der Merwe MM, Linde CC, Clements MA, Nicotra AB. 2013. The host bias of three epiphytic Aeridinae orchid species is reflected, but not explained, by mycorrhizal fungal associations. *American Journal of Botany* 100: 764–777.

Gowland KM, Wood J, Clements MA, Nicotra AB. 2011. Significant phorophyte (substrate) bias is not explained by fitness benefits in three epiphytic orchid species. *American Journal of Botany* 98: 197–206.

Van Der Heijden MGA, Martin FM, Selosse MA, Sanders IR. 2015. Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytologist* 205: 1406–1423.

Herrera P, Suárez JP, Kottke I. 2010. Orchids keep the ascomycetes outside: a highly diverse group of ascomycetes colonizing the velamen of epiphytic orchids from a tropical mountain rainforest in Southern Ecuador. *Mycology* 1: 262–268.

Herrera P, Suárez JP, Sánchez-Rodríguez A, Molina MC, Prieto M, Méndez M. 2019. Many broadly-shared mycobionts characterize mycorrhizal interactions of two coexisting epiphytic orchids in a high elevation tropical forest. *Fungal Ecology* 39: 26–36.

Humeau L, Micheneau C, Jacquemyn H, Gauvin-Bialecki A, Fournel J, Pailler T. 2011. Sapromyophily in the native orchid, *Bulbophyllum variegatum*, on Réunion (Mascarene Archipelago, Indian Ocean). *Journal of Tropical Ecology* 27: 591–599.

Jacquemyn H, Brys R, Lievens B, Wiegand T. 2012. Spatial variation in below-ground seed germination and divergent mycorrhizal associations correlate with spatial segregation of three co-occurring orchid species. *Journal of Ecology* 100: 1328–1337.

Lancaster N. 2004. A study of the distribution of orchids in the mascarene islands. *Thesis; MSc Plant Diversity, Reading University.*

Leroy C, Maes AQM, Louisanna E, Schimann H, Séjalon-Delmas N. 2021. Taxonomic, phylogenetic and functional diversity of root-associated fungi in bromeliads: effects of host identity, life forms and nutritional modes. *New Phytologist* 231: 1195–1209.

Li X, He X, Hou L, Ren Y, Wang S, Su F. 2018. Dark septate endophytes isolated from a xerophyte plant promote the growth of *Ammopiptanthus mongolicus* under drought condition. *Scientific Reports* 8: 7896.

Liu N, Jacquemyn H, Liu Q, Shao S, Ding G, Xing X. 2022. Effects of a dark septate fungal endophyte on the growth and physiological response of seedlings to drought in an epiphytic orchid. *Frontiers in Microbiology* 13: 961172.

Mandyam K, Jumpponen A. 2005. Seeking the elusive function of the root-colonising dark septate endophytic fungi. *Studies in Mycology* 53: 173–189.

Martin M. 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* 17: 10–12.

Martos F, Munoz F, Pailler T, Kottke I, Gonneau C, Selosse M-A. 2012. The role of epiphytism in architecture and evolutionary constraint within mycorrhizal networks of tropical orchids. *Molecular Ecology* 21: 5098–5109.

McCormick M, Burnett R, Whigham D. 2021. Protocorm-supporting fungi are retained in roots of mature *Tipularia discolor* orchids as mycorrhizal fungal diversity increases. *Plants* 10: 1251.

McCormick MK, Jacquemyn H. 2014. What constrains the distribution of orchid populations? *New*

Phytologist 202: 392–400.

Meng YY, Zhang WL, Selosse MA, Gao JY. 2019. Are fungi from adult orchid roots the best symbionts at germination? A case study. *Mycorrhiza* 29: 541–547.

Mújica EB, Mably JJ, Skarha SM, Corey LL, Richardson LW, Danaher MW, González EH, Zettler LW. 2018. A comparison of ghost orchid (*Dendrophylax lindenii*) habitats in Florida and Cuba, with particular reference to seedling recruitment and mycorrhizal fungi. *Botanical Journal of the Linnean Society* 186: 572–586.

Newsham KK. 2011. A meta-analysis of plant responses to dark septate root endophytes. *New Phytologist* 190: 783–793.

Nganou BK, Mpetga JDS, Selvaraj J, Mvnl C, Palanisamy D, Nkutea AH, Tane P. 2018. A brief review on *Agauria salicifolia*; a mediterranean plant species. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 10: 2428–2430.

Nilsson RH, Tedersoo L, Ryberg M, Kristiansson E, Hartmann M, Unterseher M, Porter TM, Bengtsson-Palme J, Walker DM, De Sousa F, *et al.* 2015. A comprehensive, automatically updated fungal ITS sequence dataset for reference-based chimera control in environmental sequencing efforts. *Microbes and Environments* 30: 145–150.

Oksanen J, F. Guillaume Blanchet RK, Legendre P, Minchin PR, O'Hara RB, Simpson GL, Solymos P, M. Henry H. Stevens HW. 2013. Vegan: Community Ecology Package. [WWWdocument] URL <http://cran.r-project.org/package=vegan>.

Oliveira SF, Bocayuva MF, Veloso TGR, Bazzolli DMS, da Silva CC, Pereira OL, Kasuya MCM. 2014. Endophytic and mycorrhizal fungi associated with roots of endangered native orchids from the Atlantic Forest, Brazil. *Mycorrhiza* 24: 55–64.

Otero JT, Ackerman JD, Bayman P. 2004. Differences in mycorrhizal preferences between two tropical orchids. *Molecular Ecology* 13: 2393–2404.

Pecoraro L, Rasmussen HN, Gomes SIF, Wang X, Merckx VSFT, Cai L, Rasmussen FN. 2021. Fungal diversity driven by bark features affects phorophyte preference in epiphytic orchids from southern China. *Scientific Reports* 11: 11287.

Perez-Lamarque B, Petrolli R, Strullu-Derrien C, Strasberg D, Morlon H, Selosse M-A, Martos F. 2022. Structure and specialization of mycorrhizal networks in phylogenetically diverse tropical communities. *Environmental Microbiome* 17: 38.

Petrolli R, Vieira CA, Jakalski M, Bocayuva MF, Vallé C, Cruz E da S, Selosse M, Martos F, Kasuya MCM. 2021. A fine-scale spatial analysis of fungal communities on tropical tree bark unveils the epiphytic rhizosphere in orchids. *New Phytologist* 231: 2002–2014.

Petrolli R, Zinger L, Perez-Lamarque B, Collobert G, Griveau C, Pailler T, Selosse M, Martos F. 2022. Spatial turnover of fungi and partner choice shape mycorrhizal networks in epiphytic orchids. *Journal of Ecology*. DOI: 10.1111/1365-2745.13986.

Phillips RD, Barrett MD, Dixon KW, Hopper SD. 2011. Do mycorrhizal symbioses cause rarity in orchids? *Journal of Ecology* 99: 858–869.

Pölme S, Bahram M, Jacquemyn H, Kennedy P, Kohout P, Moora M, Oja J, Opik M, Pecoraro L, Tedersoo L. 2018. Host preference and network properties in biotrophic plant – fungal associations. *New Phytologist* 217: 1230–1239.

Rammitsu K, Kajita T, Imai R, Ogura-Tsujita Y. 2021. Strong primer bias for Tulasnellaceae fungi in metabarcoding: specific primers improve the characterization of the mycorrhizal communities of epiphytic orchids. *Mycoscience* 62: 356–363.

Rammitsu K, Yagame T, Yamashita Y, Yukawa T, Isshiki S, Ogura-Tsujita Y. 2019. A leafless epiphytic orchid, *Taeniophyllum glandulosum* Blume (Orchidaceae), is specifically associated with the Ceratobasidiaceae family of basidiomycetous fungi. *Mycorrhiza* 29: 159–166.

Rammitsu K, Yukawa T, Yamashita Y, Isshiki S, Ogura-Tsujita Y. 2020. The mycorrhizal community of the epiphytic orchid *Thrixspermum japonicum* is strongly biased toward a single Ceratobasidiaceae fungus, despite a wide range of fungal partners. *American Journal of Botany* 107: 1654–1662.

Rasmussen HN. 1995. *Terrestrial Orchids - from seed to mycotrophic plant*. Cambridge, Great Britain: Cambridge University Press.

Rasmussen HN, Rasmussen FN. 2018. The epiphytic habitat on a living host: reflections on the orchid

- tree relationship. *Botanical Journal of the Linnean Society* 186: 456–472.
- Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahé F. 2016.** VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* 4: e2584.
- Selosse MA, Petrolli R, Mujica MI, Laurent L, Perez-Lamarque B, Figura T, Bourceret A, Jacquemyn H, Li T, Gao J, et al. 2022.** The Waiting Room Hypothesis revisited by orchids: were orchid mycorrhizal fungi recruited among root endophytes? *Annals of Botany* 129: 259–270.
- Shefferson RP, Bunch W, Cowden CC, Lee YI, Kartzinel TR, Yukawa T, Downing J, Jiang H. 2019.** Does evolutionary history determine specificity in broad ecological interactions? *Journal of Ecology* 107: 1582–1593.
- Smith SE, Read DJ. 2008.** *Mycorrhizal Symbiosis*. Cambridge, Great Britain: Elsevier Ltd., 2008.
- Strasberg D. 1994.** Dynamique des forêts tropicales de l'île de La Réunion : processus d'invasions et de régénération sur les coulées volcaniques. *PhD Thesis. Université de Montpellier II*.
- Swarts ND, Sinclair EA, Francis A, Dixon KW. 2010.** Ecological specialization in mycorrhizal symbiosis leads to rarity in an endangered orchid. *Molecular Ecology* 19: 3226–3242.
- Tremblay RL, Zimmerman JK, Lebrón L, Bayman P, Sastre I, Axelrod F, Alers-García J. 1998.** Host specificity and low reproductive success in the rare endemic Puerto Rican orchid *Lepanthes caritensis*. *Biological Conservation* 85: 297–304.
- Ventre Lespiaucq A, Jacquemyn H, Rasmussen HN, Méndez M. 2021.** Temporal turnover in mycorrhizal interactions: a proof of concept with orchids. *New Phytologist* 230: 1690–1699.
- Vogt-Schilb H, Těšitelová T, Kotlínek M, Sucháček P, Kohout P, Jersáková J. 2020.** Altered rhizoctonia assemblages in grasslands on ex-arable land support germination of mycorrhizal generalist, not specialist orchids. *New Phytologist* 227: 1200–1212.
- Wang X, Li Y, Song X, Meng Q, Zhu J, Zhao Y, Yu W. 2017.** Influence of host tree species on isolation and communities of mycorrhizal and endophytic fungi from roots of a tropical epiphytic orchid, *Dendrobium sinense* (Orchidaceae). *Mycorrhiza* 27: 709–718.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990.** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Shinsky JJ, White TJ, eds. *PCR Protocols : A Guide to Methods and Applications*. London, Great Britain: Academic Press, 315–322.
- Wu F lin, Qu D hui, Tian W, Wang M yun, Chen F yan, Li K ke, Sun Y dong, Su Y hua, Yang L na, Su H yan, et al. 2021.** Transcriptome analysis for understanding the mechanism of dark septate endophyte S16 in promoting the growth and nitrate uptake of sweet cherry. *Journal of Integrative Agriculture* 20: 1819–1831.
- Zotz G. 2016.** *Plants on Plants – The Biology of Vascular Epiphytes*. Heidelberg, Berlin, Germany: Springer International Publishing, 2016.

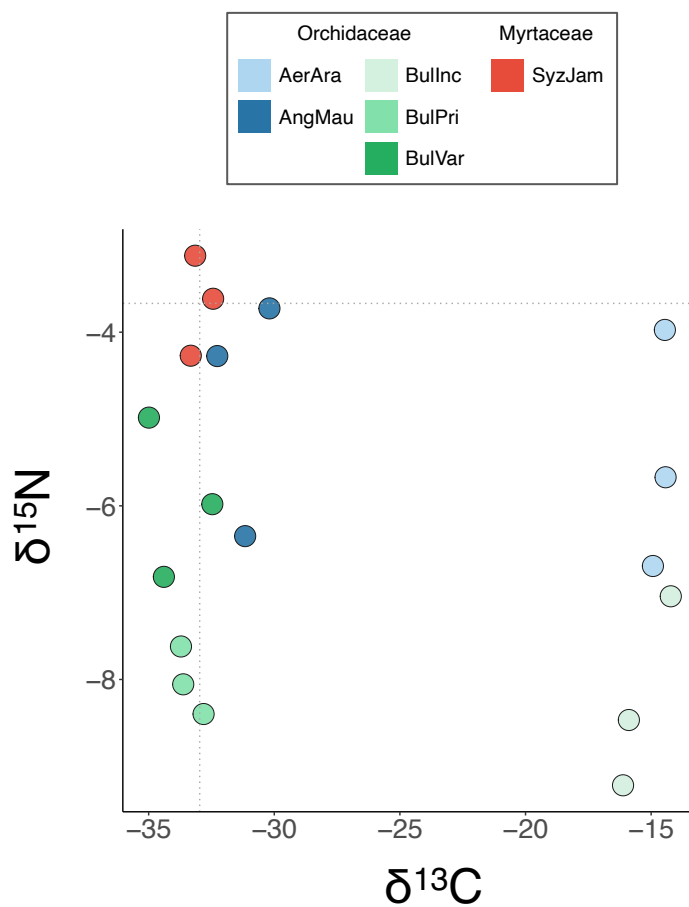
Supporting information

Supporting information of **Article III** can be accessed at the following link (GitHub):

https://github.com/PetrolliR/OrchMyco_SupMat.git

Article III – Figures annexes

Figure A7.1 Leaf isotopic content of *Bulbophyllum variegatum* and co-occurring species (three replicates each). All the leaves come from a single 10x10m plot at the ML site. The isotopic composition of *B. variegatum* is $\delta^{15}\text{N} = -5.93 \pm 0.92 \text{ ‰}$; $\delta^{13}\text{C} = -33.95 \pm 1.32 \text{ ‰}$). AerAra, *Aeranthus arachnites*; AngMau, *Angraecum mauritianum*; Bullnc, *Bulbophyllum incurvum*; BulPri, *B. prismaticum*; BulVar, *B. variegatum*; SyzJam, *Syzigium jambos*.



VIII. Application à la vanille cultivée

Article IV. *Mycorrhizal communities of Vanilla planifolia in an introduction area (La Réunion) under varying cultural practices*

Cet article présente les résultats de l'étude des communautés fongiques et mycorhiziennes de la vanille cultivée (*Vanilla planifolia* G. Jackson) à la Réunion où elle a été introduite il y a deux siècles et y est aujourd'hui largement cultivée. Ce travail répond à une demande des cultivateurs locaux d'explorer les communautés microbiennes de la vanille réunionnaise et constitue l'opportunité d'exporter les compétences acquises pendant la thèse au domaine plus appliqué de l'agriculture.

La vanille est une orchidée lianescente qui s'enracine à la fois dans le sol et sur l'écorce des arbres hôtes. Aussi, son étude dans le cadre de cette thèse permet également de faire le lien entre les espèces d'orchidées strictement épiphytes, et celles strictement terrestres peu abordées ici. L'échantillonnage réalisé permet de répondre à deux grandes questions concernant les communautés mycorhiziennes de la vanille : (i) quels sont les partenaires mycorhiziens de la vanille hors de son aire d'origine (Amérique Centrale) ? et (ii) qu'elle est l'influence des pratiques culturelles sur les communautés fongiques de la vanille ?

Les résultats montrent que la vanille (*Vanilla planifolia*, la principale espèce étudiée ici) s'associe principalement à des rhizoctonias (Tulasnellaceae et Ceratobasidiaceae) comme décrit en Amérique Centrale. Ceux-ci semblent constituer un assemblage entre des rhizoctonias également détectés en Amérique Centrale dans des racines de vanilles, des rhizoctonias généralistes d'orchidées indigènes de l'île de La Réunion, et des rhizoctonias non identifiés jusqu'alors. De plus, les pratiques culturelles étudiées ici ont une influence sur les communautés fongiques totales et mycorhiziennes, soulevant de nombreuses perspectives en termes d'aménagement des cultures.

Les données présentées ici reposent sur un échantillonnage effectué par Florent Martos en amont de la thèse (Août 2019). Les analyses moléculaires ont été réalisées par Chantal Griveau, Céline Bonillo et moi-même. J'ai enfin pris en charge l'analyse bio-informatique et statistique des données, ainsi que l'écriture du manuscrit, co-écrit avec Florent Martos.

Mycorrhizal communities of *Vanilla planifolia* in an introduction area (La Réunion) under varying cultural practices

Rémi Petrolli¹, Céline Bonillo¹, Chantal Griveau¹, Marc-André Selosse^{1,2}, G. Lalanne-Tisné³, Bertrand Comes⁴, Hippolyte Kodja³, Florent Martos¹

¹Institut de Systématique, Évolution, Biodiversité (ISYEB), Muséum national d'Histoire naturelle, CNRS, Sorbonne Université, EPHE, CP 39, 57 rue Cuvier, F-75005 Paris, France

²Department of Plant Taxonomy and Nature Conservation, University of Gdańsk, Wita Stwosza 59, 80-308, Gdańsk, Poland

³Département de Biologie, Université de La Réunion, Saint-Denis, France.

⁴Domaine La Vanilleraie, Sainte-Suzanne, La Réunion, France.

Abstract

The vanilla (*Vanilla* spp.) is one of the most valuable cultivated plants worldwide. As all orchids, vanillas form mycorrhizal associations with fungi in their roots, but their fungal partners have not been investigated outside their native geographic range in Central America. In this study, we investigated the whole fungal and mycorrhizal associations in *Vanilla* spp. plants (mainly *V. planifolia*, but also *V. pompona*), by sequencing the fungal ITS-2 marker in the terrestrial and aerial roots using a metabarcoding approach. We selected plants cultivated in three conditions (from low to high management) in one locality of La Réunion island (Indian Ocean), in order to test for a possible effect of cultivation practices on fungal communities. Results reveal that *Vanilla* spp. in La Réunion mainly associate with Tulasnellaceae and Ceratobasidiaceae but also with other putative mycorrhizal fungi such as *Resinicium*. Some of these fungi have been previously detected in Central America in the roots of vanilla plants, while some are also known to colonize the roots of several orchid species in La Réunion. Cultivation practices impacted both total fungal and mycorrhizal communities. Notably, mycorrhizal fungi were scarce in epiphytic roots, except in the more extensive cultivation mode (*i.e.*, traditional cultivation in the understorey). Finally, mycorrhizal fungi showed no negative patterns of co-occurrence with putative pathogens (*Fusarium*, *Colletotrichum*). Overall, these results pave the way for future studies on the mycorrhizal communities of vanilla plants in the Indian Ocean where they have hitherto received little consideration.

1. Introduction

Most plants associate with mutualistic fungi in their roots, forming chimeric organs called mycorrhizas (Brundrett & Tedersoo, 2018). Mycorrhizal associations allow nutrient exchanges between partners: plants provide carbon from photosynthesis to their fungal partner while the latter improve the hydro-mineral nutrition of their host (Smith & Read, 2008). In addition, mycorrhizal fungi enhance the plant defenses against biotic or abiotic stresses. Consequently, mycorrhizas are keystone associations in agricultural systems where they can increase yields (Zhang *et al.*, 2019), control diseases (Jung *et al.*, 2012) or even contribute to plant flavors (e.g. Copetta *et al.*, 2006; Saleh *et al.*, 2020).

The vanilla (*Vanilla* spp.) is cultivated in nearly all tropical areas worldwide for its valuable spice. It originates from Central America where it has been cultivated in Mexico since the 1760s, but the most producing areas are now South Asia and old French colonies in the Indian Ocean: Madagascar and Mascaraing islands, including La Réunion where it has been successfully introduced in 1822 from plants cultivated in Paris, France (Bory *et al.*, 2008a).

Vanilla is an herbaceous perennial vine, rooting both in the soil and on the bark of trees. The most cultivated species in the *Vanilla* genus is *Vanilla planifolia* G. Jackson, but other species have been selected, such as *V. tahitensis* J. W. Moore or *V. pompona* Schiede, for their flavor or resistance to pathogens.

The *Vanilla* genera belongs to the subfamily of the Vanilloideae, within the Orchidaceae family (Cameron & Molina, 2006; Givnish *et al.*, 2015). Most of orchids form mycorrhizal associations with a polyphyletic group of fungi in the Basidiomycota, called the rhizoctonias, which encompass Serendipitaceae in the Sebaciales, and Tulasnellaceae and Ceratobasidiaceae in the Cantharelalles (Dearnaley *et al.*, 2012). Additionally, numerous orchid species also interact with other Basidiomycota or to a lesser extent Ascomycota (Wang *et al.*, 2021; Selosse *et al.*, 2022). Orchid mycorrhizas are characterized by the presence of coiled, peloton-like structures formed by the fungi in the plant root cells. Notably, orchids produce minute seeds that lack reserve and can

only germinate with nutrient inputs provided in the nature by their mycorrhizal fungi (Smith & Read, 2008).

In *Vanilla*, mycorrhizal fungi are mainly members of the Tulasnellaceae and Ceratobasidiaceae families, which have been found to frequently colonize both their terrestrial and epiphytic roots (Porrás-Alfaro & Bayman, 2003, 2007; Johnson *et al.*, 2021).

Recent studies have also suggested novel mycorrhizal associations in *Vanilla*: González-Chávez *et al.* (2018) suggested that *Scleroderma* fungi, known as ectomycorrhiza (ECM)-forming fungi, could form pelotons in root cells of *V. planifolia* in Mexico. In the same species, Johnson *et al.*, (2021) revealed the presence of multiple fungal genera known to form mycorrhizal associations in other orchid species (Dearnaley *et al.*, 2012), including some ECM-forming genera such as *Inocybe* or *Russula*.

By contrast to other orchid subfamilies such as in the Epidendroideae or in the Orchidoideae, the mycorrhizal associations within the Vanilloideae have been poorly investigated. Several studies have demonstrated that mycoheterotrophic orchids in the Vanilleae tribe (within the Vanilloideae ; Givnish *et al.*, 2015) associate with ECM-forming species (Okayama *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2015; Ogura-Tsujita *et al.*, 2018). Additionally, the green orchid *Isotria medeoloides* in the Pogonieae tribe (Vanilloideae) has been found to be associated with fungi of the ECM-forming Russulaceae family (Rock-Blake *et al.*, 2017). In the evolutionary close Apostasioideae subfamily, association between the green orchid *Apostasia japonica* and ECM-related fungi in the Ceratobasidiaceae has also been demonstrated (Suetsugu & Matsubayashi, 2021). To what extent these patterns of associations with ECM-forming fungi are conserved within the basal families of orchids, including in the *Vanilla* genera, remains an open question.

Previous studies have focused on *Vanilla* spp. plants in Central America, and mycorrhizal communities of cultivated vanillas outside their native geographic range have been largely overlooked. In particular, to our knowledge the mycorrhizal partners of vanilla plants have so far never been investigated in the Indian Ocean where it is yet largely cultivated.

Yet, introduced plants may differ from natives in their mycorrhizal associations. Plant species that are generalist toward their mycorrhizal fungi may found new partners in the introduction area as hypothesized in orchids for *Eulophia graminea*. This species have a broad range of mycorrhizal fungi where it is invasive in Australia, while its fungal partners in China, where it originates, are unknown (Downing *et al.*, 2020). Alternatively, species can maintain their fungal partners if they

are widespread and already present in the introduction area, as has been hypothesized for the orchid species *Oeceoclades maculata* (at germination stage) in North America (Bayman *et al.*, 2016) or *Disa bracteata* in Australia (Bonnardeaux *et al.*, 2007), or if they are introduced alongside with the plants (via seeds, plant parts or soil, as well documented in ectomycorrhizal Pinaceae; Dickie *et al.*, 2010, 2017). Co-introduction of mycorrhizal partners with fruits have been described in other plant families (through natural, pseudo-vertical transmission, Séne *et al.*, 2018), but fruits of vanilla are assumed to be sterile and putative introduction of mycorrhizal partners in vanilla may more probably arise from vegetative plant part and/or substrate introduction. It has been hypothesized that *Vanilla* is a mycorrhizal generalist (Porrás-Alfaro & Bayman, 2007), but whether *Vanilla* plants were introduced with their own mycorrhizal fungi or lately found new mycorrhizal partners remains unknown.

Furthermore, cultivation practices of vanilla have been historically diversified (Hernández-Hernández, 2011), ranging from cultivation on living trees in natural to semi-natural understories (traditional, low-managed), to dense cultivation on non-alive supports (wood fence or cement) in highly managed farms.

In a recent study conducted in Mexico, Johnson *et al.* (2021) showed that mycorrhizal communities associated to *Vanilla* plants differed between cultivation practices (*i.e.*, highly managed, traditional and wild natural). However, the study was conducted in four different farms distant from >50 km from each other's, and these differences could have been due to spatial variations of fungal communities across the sites (Johnson *et al.*, 2021). Still, by modulating nutrients inputs and/or plant protection, fungal communities including mycorrhizal fungi could influence vanilla growth, survival, productivity and even flavor across the different cultivation practices.

Notably, vanilla is subjective to numerous plant diseases (Ab. Kadir *et al.*, 2019 ; Hernández-Hernández, 2011) including root and stem rot (by *Fusarium oxysporum*; Koyyappurath *et al.*, 2016) and anthracnose (by *Colletotrichum orchidophilum*.; Charron *et al.*, 2018). While several attempts of biocontrol of vanilla diseases by fungal strains have been made (*e.g.*, Sandheep & Jisha, 2013), it remains unknown whether mycorrhizal fungi can modulate the presence and/or the expanse of these pathogens (Bayman *et al.*, 2011). In a recent study, Mujica *et al.*, (2020) evidenced that pathogens abundance in roots of the orchid *Bipinnula fimbriata* was negatively correlated with mycorrhizal colonization. Indeed, mycorrhizal fungi could inhibit either directly (*e.g.*, through

allelopathy) or indirectly (e.g., through competition) other fungi including pathogens, as already documented in other mycorrhizal symbioses (Azcón-Aguilar & Barea, 1997). Members of the Ceratobasidiaceae family have also been shown to control the infection by *Fusarium oxysporum* in other plant crop systems (Muslim *et al.*, 2003) but it is unknown whether the orchid mycorrhizal fungi in this family can have similar effects in orchids (Bayman *et al.*, 2011).

Using a metabarcoding approach, we studied the fungal communities, with a focus on mycorrhizal fungi, of *Vanilla* spp. plants cultivated under several cultivation practices in one locality in La Réunion island. These cultivation practices included a traditional culture in the understory, an open-field culture with planted trees and an intensive culture under shade house using wood dead fence as support for vanilla growth.

Given that the majority of vanilla plants of La Réunion appear to come from a single introduction event from plants introduced and cultivated in Europe (Bory *et al.*, 2008b,a), we first hypothesized that *Vanilla* spp. in La Réunion should form mycorrhizal associations with fungi already present on the island. Second, according to the pioneer work of Johnson *et al.*, (2021) in Mexico, we hypothesized that these mycorrhizal communities should vary across cultivation mode, with a richer community in low managed *versus* highly managed practices. Third, we hypothesized that mycorrhizal fungi of *Vanilla* spp. should compete, and therefore negatively co-occur, with fungal pathogens such as *Fusarium* sp. or *Colletotrichum* sp.

2. Materials and Methods

Sampling sites

The study was conducted in Sainte-Suzanne, in the north of La Réunion French overseas island (Indian Ocean) and included three cultural practices. Two of them (shade house and openfield) are located within the same farm and the third one (understorey) is located at a spatially close site (<2.5 km; Fig. 1). In the farm, two experimental cultural practices have been set up. In the shade house (SH), vanilla accessions belonging to *V. planifolia* and *V. pompona* grow with either one of the two following sources of organic matter: bagasse (sugarcane waste material) or dead leaves collected in a litchi orchard. The supports for epiphytic roots are wood dead fences. In the openfield (OF), vanilla plants are densely and regularly planted without shading but they grow

on *Jatropha curcas* living trees whose leaves somewhat provide shade. At the base of the trees, vanilla plants root into coconut fibre covering the soil. Vanilla vines growing in the farm (i.e., SH and OF) are regularly controlled for pathogenic symptoms and managed to adopt a dense, 'looping' growth (Fouché & Jouve, 1999). The vanilla plants in the understory (US) grow on the riverbank in a secondary forest populated by various exotic trees including *Calophyllum* sp., *Cordyline* sp., *Dracaena* sp., *Psidium cattleianum* and *Mangifera indica*. These plants are poorly managed and not controlled for pathogenic symptoms.

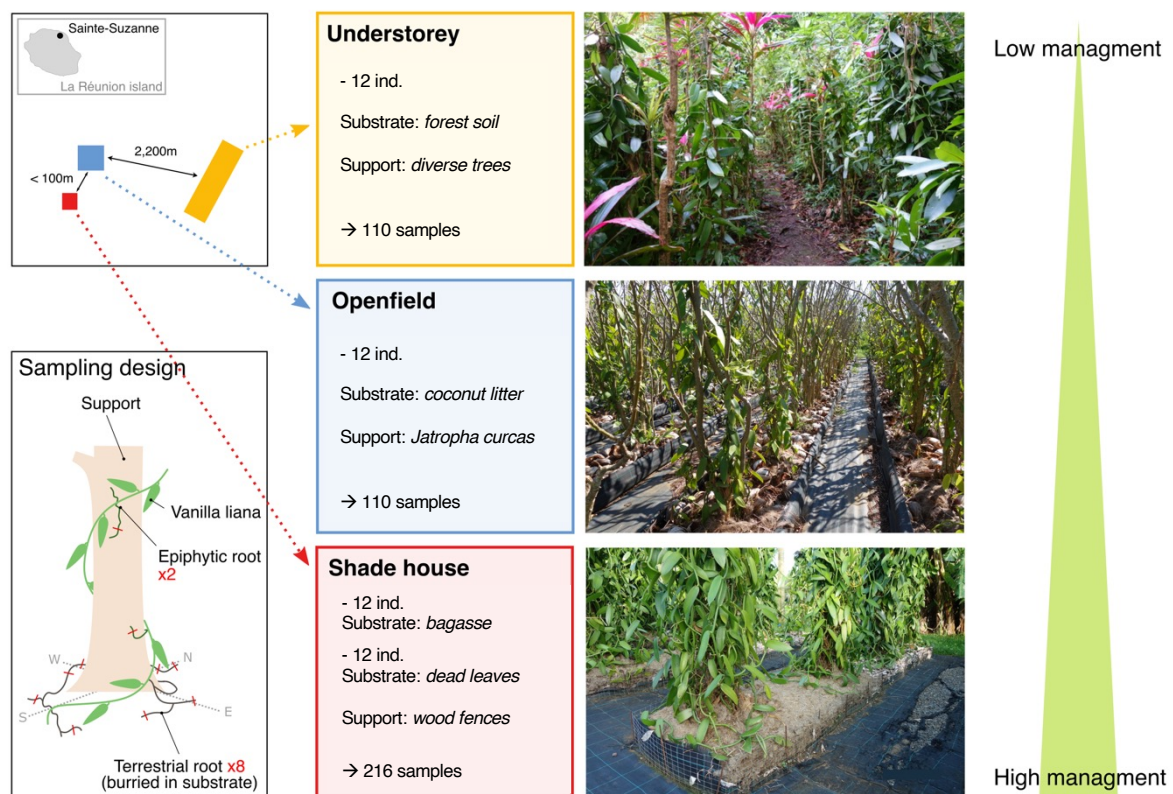


Figure 1 Experimental design. Sampling was performed in the Sainte-Suzanne, in the north of La Réunion island (top-left panel). On each vanilla vine (ind.) 8 terrestrial roots were analysed at four cardinal points, and when possible, 2 epiphytic roots were analysed at two heights on the support (bottom-left panel).

Root sampling procedure and molecular analyses

All the vanilla roots were collected in August 2019. A total of 24 individuals growing in the shade house were selected, half of them growing on bagasse and the other half growing on dead leaves. Sixteen (eight of which were fully processed) distant terrestrial roots were sampled in each individual (Fig. 1), and for 12 individuals (8 growing in bagasse and 4 growing in dead leaves),

four (two of which were fully processed) epiphytic roots in contact with the substrate were additionally sampled on wood fences. Eleven individuals were selected in the two remaining cultivation practices (*i.e.*, openfield and understory) and for each one of them, 8 terrestrial and 2 epiphytic roots were collected and fully processed as previously. This resulted in a total of 436 root samples (*i.e.*, 216 in the shade house, 110 in the openfield and 110 in the understory). The roots were conserved at 4°C until molecular analyses.

Each root (ca. 2 cm) was carefully cleaned using sterile water. For each one of them, a healthy, peloton-containing (when possible) portion was selected. The selected root portions were quickly frozen into liquid nitrogen and then grinded using a TissueLyser II (Qiagen) with one sterilized tungsten bead per tube, a small amount of grains of Fontainebleau's sand and the half volume (200 µL) of lysis buffer (DNeasy® Plant Mini Kit; Qiagen). Genomic DNA was then extracted using the same kit following the standard procedure. Each sample was amplified by PCR using two sets of primers amplifying the internal transcribed spacer 2 (ITS2) of the ribosomal DNA: the fungal generalist primers ITS86-F/ITS4 (White *et al.*, 1990) to amplify most of the Asco- and Basidiomycota and the specific primers 5.8S-OF/ITS4-Tul (Vogt-Schilb *et al.*, 2020) to specifically target the Tulasnellaceae family which is commonly found in association with vanilla roots (Porrás-Alfaro & Bayman, 2007) but does not amplify with generalist primers (Johnson *et al.*, 2021; Rammitsu *et al.*, 2021). Each PCR amplification was conducted with both forward and reverse tagged primers (Petrolli *et al.*, 2021). Positive (mock fungal community) and negative (ultrapure water) controls were included in the PCR plates, as well as tagging system negative controls to assess cross-contamination during PCR trials, library preparation, or sequencing (Hornung *et al.*, 2019; Zinger *et al.*, 2019). Each PCR was performed in 25 µL containing 0.2mM each dNTP, 0.4µM each primer, 1 unit AmpliTaq Gold® 360 DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific), 1X AmpliTaq Buffer supplied with MgCl₂ and 1.5µL template DNA, using the following program: initial denaturation 10 min at 95°C; 35 cycles of denaturation 30s at 95°C, annealing 30s at 56.5°C (ITS86-F/ITS4) or 52°C (5.8S-OF/ITS4-tul), and elongation 30s at 72°C; final elongation 12 min at 72°C. Each PCR was loaded on agarose gel for visualization of the amplicons, then purified using the NucleoMag® NGS Clean-up and Size Select (Macherey-Nagel) and quantified by fluorescence using the Qubit™ dsDNA High-Sensitivity (Invitrogen™). All amplicons were then mixed equimolarly in two pools (one for each set of primers) and then sequenced with an Illumina MiSeq platform at Fasteris (Geneva, Switzerland).

Bioinformatics and OTUs selection

Paired reads from 2*250bp Illumina sequencing were processed as in (Perez-Lamarque *et al.*, 2022) using a customized pipeline based on VSEARCH (Rognes *et al.*, 2016). Briefly, paired-end reads were assembled using the *fastq_mergepairs* function using default parameters. Assembled reads with more than two errors in the alignment were discarded. The resulting assembled reads were assigned to samples according to their tag+primer sequences using CUTADAPT (Martin, 2011) allowing zero discrepancies. Tag-jumps (Zinger *et al.*, 2019) was estimated at this step and represented less than 0.2% of the reads. Operational Taxonomic Units (OTUs) were clustered using a 97% similarity threshold with VSEARCH algorithm and chimeras were removed at this step using the *uchime_denovo* option of VSEARCH. OTUs were taxonomically assigned using the *usearch_global* option of VSEARCH with default parameters on the UNITE V8.3 (2021-05-10) eukaryotes reference database (Nilsson *et al.*, 2015) and named after their abundance in the global dataset. Singletons and short OTUs (< 200bp) were removed before OTU table building. Non-fungal OTUs and OTUs abnormally detected in the positive and negative controls were also discarded from the dataset, as well as OTUs identified as contaminants by the decontam R-package with frequency method (Davis *et al.*, 2018). Finally, based on the previously estimated tag-jumps rate, OTUs that represented less than 0.5% of the sample reads were set to 0, hence minimizing the impact of artefactual sequences and tag jumps. Samples with < 1000 reads were not considered in subsequent analyses.

Phylogenetic analyses

In order to compare the mycorrhizal (*i.e.*, in the Tulasnellaceae, Ceratobasidiaceae and Sebaciniales) and pathogenic (*i.e.*, *Fusarium* and *Colletotrichum*) OTUs of this study with fungi previously identified in the literature, including in vanilla plants, we used a phylogenetic approach using ITS sequences available on GenBank. As the representative sequences obtained in this study were short due to Illumina technology constrains (< 500bp), we first aligned the sequences from GenBank using MAFFT with default parameters and then added the representative sequences of OTUs using the same algorithm (--add option). The alignments were then trimmed using trimAl v1.2. in order to keep only informative regions. Trees were built using IQTREE 2.1.3 with standard model selection and using the first alignment as a constraint (-g

option) to add OTU representative sequences. Sequences from [Weiß et al., \(2016\)](#) were used to precise the phylogenetic position of OTUs in the Sebaciales. Sequences from [Veldre et al., \(2013\)](#), as well as few sequences manually selected were used to compare the phylogenetic position of our OTUs in the Ceratobasidiaceae with those from native orchids of La Réunion ([Martos et al., 2012](#)) and those from *Vanilla* spp. in Central America ([Porrás-Alfaro & Bayman, 2007](#)). For the Tulasnellaceae family, we compared our OTUs with those of [Martos et al., \(2012\)](#), [Porrás-Alfaro & Bayman \(2007\)](#) and sequences retrieved from GenBank (best BLAST hits of the main OTUs' sequences additionally with few other sequences manually selected). To determine the phylogenetic position of *Fusarium* and *Colletotrichum* OTUs, we used sequences from GenBank obtained from various plants including vanilla.

Statistical analyses

As they were amplified by two different pairs of primers, the read counts of the Tulasnellaceae and that of the other fungi were not comparable. Consequently, abundances were only considered for descriptive analyses, and presence/absence (1/0) data were rather used for the following statistical analyses.

Variation in fungal communities between cultural practices (*i.e.*, SH, OF and US) and root types (*i.e.*, terrestrial *versus* epiphyte) were assessed using beta-diversity analyses. Beta-diversities between pairs of samples were calculated using the Jaccard index of the *vegdist* function in the VEGAN R-package ([Oksanen et al., 2013](#)). Differences in fungal composition in the overall dataset were visually assessed through a Non-Metric Multidimensional Scaling (NMDS) using the *metaMDS* function of VEGAN. Statistical differences of fungal communities between the above-cited variables were tested using PERMANOVA (*adonis* function of VEGAN, 999 replications)

In order to further identify mycorrhizal OTUs specific of cultural practices and/or root types, we performed an analysis of specificity using the *multipatt* algorithm of the INDICESPECIES package, specifying “r.g” method (9999 permutations; [Dufrière & Legendre, 1997](#)). This function, based on correlation analyses, allows one to identify significant patterns of associations between species (*i.e.*, fungal OTUs) and sites (*i.e.*, cultural practices or root types).

The putative competition patterns between mycorrhizal fungi and pathogens were assessed using co-occurrence analyses. The network of co-occurrences was constructed by merging root samples of a same vanilla vine, keeping aerial and terrestrial roots separated. OTUs that were frequent in less than 20% of the resulting merged samples were discarded at this step. The frequency of each remaining OTU in the merged samples was used to evaluate patterns of co-occurrences using the spearman correlation index. P-values were computed by comparing each index with 1,000 additional calculations for the same OTU-OTU interaction using randomized matrices obtained with the *permatswap* function of VEGAN. Only correlation index with corresponding p-value ≤ 0.001 were considered as significant.

3. Results

3.1 Fungal communities of *Vanilla spp.* in La Réunion island

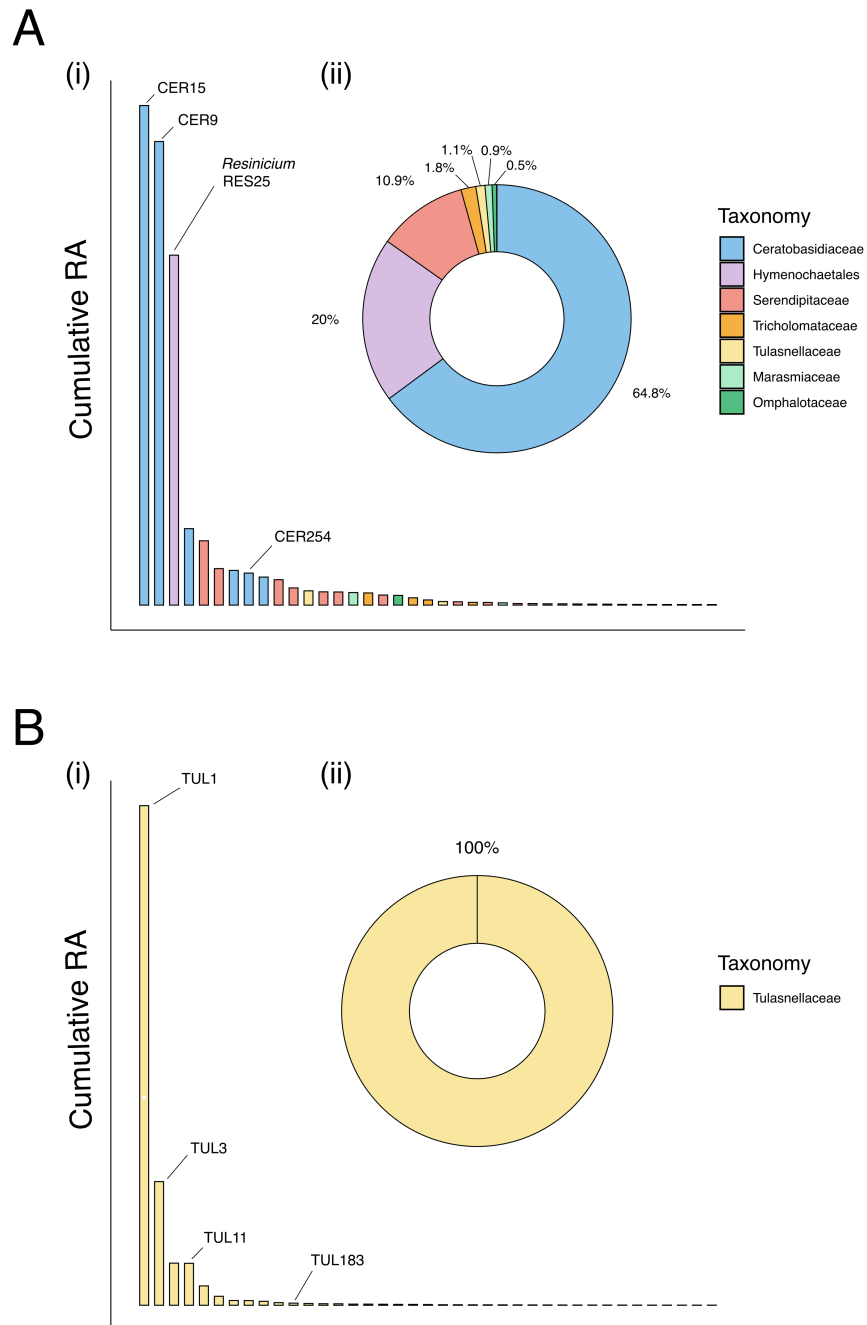
The MiSeq Illumina sequencing generated a total of 19,530,449 raw reads. Bioinformatics analyses and removal of non-fungal OTUs or putative contaminants yielded to a total of 3,421 fungal OTUs. After data filtering (*i.e.*, read counts representing $<0.5\%$ of the sequencing depth in each sample set to zero) all positive PCR controls only retained the expected OTUs of the mock community, indicating that no contaminant OTU remained in the data. This yielded to a final set of 1,237 OTUs. Despite our dense sampling of vanilla roots, none of the rarefaction curves reached a plateau in the three cultivation practices (Fig. S1).

The generalist ITS86-F/ITS4 set of primers yielded to a majority of Ascomycota (51.9%) and Basidiomycota (26.7%). Others OTUs (21.4%) were mainly unidentified fungi (Fig. S2A). The 5.8S-OF/ITS4-Tul set of primers only amplified Tulasnellaceae (Fig. S2B).

3.2 Mycorrhizal communities of *Vanilla spp.* in La Réunion island

A total of 110 OTUs were considered as putative OMF based on the list provided by [Dearnaley et al., \(2012\)](#). The most abundant OTUs were members of the Tulasnellaceae (75 OTUs) and of the Ceratobasidiaceae (8 OTUs; Fig. 2). The Ceratobasidiaceae belonged to different clades (see

below) and were all considered as putative OMF. Sebaciniales (14 OTUs) all belonged to the Serendipitaceae family.



Our phylogenetic analysis showed that the main OTUs of Tulasnellaceae belonged to different clades (Fig. S3). The TUL1 belonged to the same clade as Tulasnellaceae previously isolated from *Vanilla* spp. in Central America or sequenced in the roots of orchids in La Réunion, but the closest matches with the corresponding sequences were 72/99.62 (cover/id) and 87/99.68, respectively, showing high identity but low coverage. At the contrary, blasts on GenBank showed that TUL1 was identical to an OTU detected in the roots of the Epidendroid orchid *Geodorum eulophioides* in China (KX387593.1) and very close to OTUs detected in the roots of the Orchidoid orchid *Spiranthes sinensis* (LC175324.1; cover: 100%, id.: 99.17) and Epidendroid *Cymbidium goeringii* (AB506842.1; cover: 99%, id.: 99.44%), both in Japan. TUL3 did not match any sequence on GenBank at a threshold of 97% and was not close of any sequence in our phylogenetic analysis. Among abundant OTUs, only TUL11 was unambiguously (*i.e.*, with high coverage) close to sequences previously detected in La Réunion in the roots of terrestrial orchids, both epidendroid and orchidoid (JF691481.1; cover: 100%, id.: 99.45%). TUL11 and TUL14 both belonged to clades encompassing sequences of fungal strains isolated from *Vanilla* spp. in Central America and both OTUs showed high identity (id. > 98%) but low coverage (< 85%) compared to them. TUL19 formed a clade with sequences from La Réunion (*e.g.*, JF691532; cover: 100%, id: 97,16). Other less abundant OTUs such as TUL183 or TUL365 also clustered with sequences from La Réunion but TUL183 was only present in 4 samples of vanilla roots while TUL365, detected in 19 samples, was only found at very low read-count level in each one of them.

The two abundant OTUs of Ceratobasidiaceae (CER9 and CER15) were not detected in previous studies in La Réunion (Fig. S4). Only one Ceratobasidiaceae with scarce distribution (CER254) had been already detected in the roots of the terrestrial epidendroid orchid *Corymborkis corymbis* (JF691537; cover: 100, id.: 99.37) on this island. No OTU of Ceratobasidiaceae was found to be close (*i.e.*, id. > 97%) of sequence previously identified in vanilla plants in Puerto Rico.

Regarding other putative OMF OTUs, Serendipitaceae were not frequent in vanilla roots and only one scarce OTU (OTU243, detected in six samples) matched, at a threshold of 97%, an OTU already detected in orchid roots on the island (JF691296.1; cover: 100%, id.:100%). One OTU of *Resinicium* (RES25) was abundant in the terrestrial roots of vanilla plants cultivated in shade house (Fig. S6-S7), colonizing 19 root samples, among which 18 were terrestrial, and 17

were in the bagasse substrate, representing up to 67% of these sample's reads. It was identified as *R. saccharicola* (KY995328.1; cover: 100%, id.: 99.66%). Other putative OMF OTUs were scarce in samples and not abundant in the overall dataset.

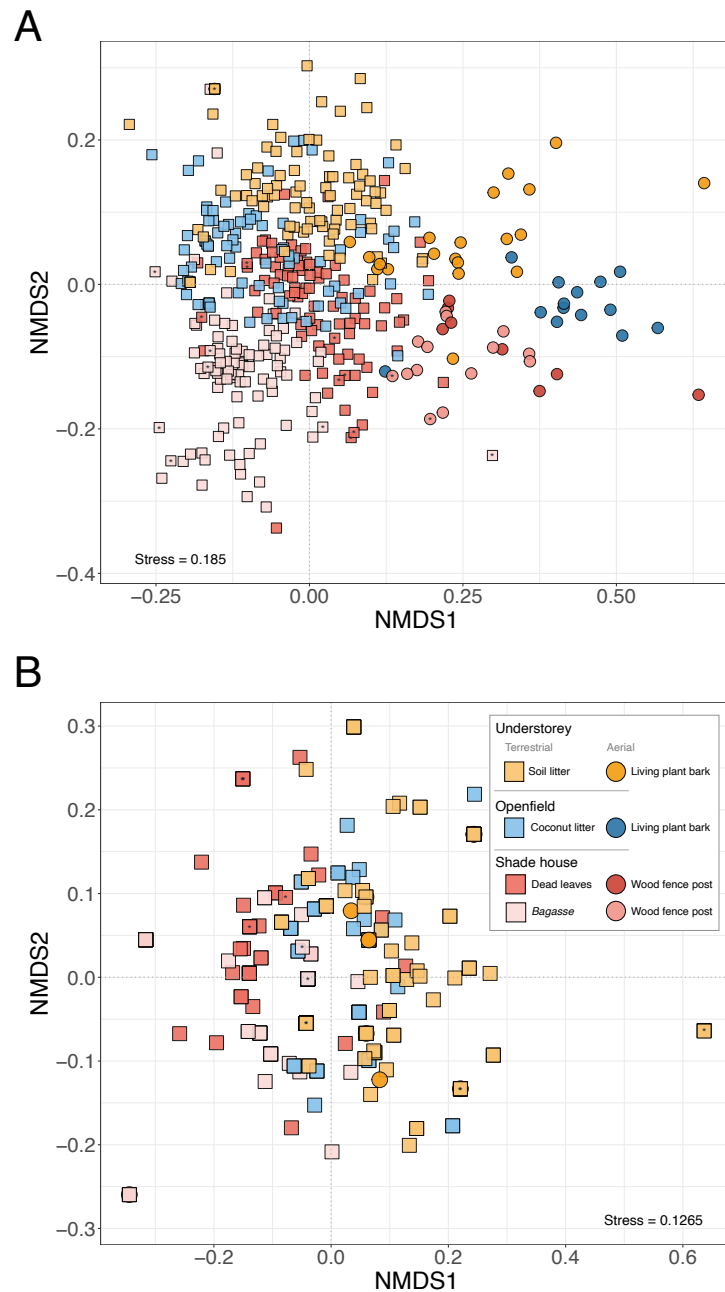


Figure 3 Non-Metric Multidimensional Scaling (NMDS) analysis of fungal communities colonizing the roots of *Vanilla* sp. considering (A) all OTUs and (B) putative OMF OTUs. Symbols are coloured according to the culture condition and shapes refer to the position of the sampled roots (terrestrial *versus* epiphytic). All roots belonged to *V. planifolia* except those marked by an asterisk which belonged to *V. pompona*. In panel B, four samples with distant OMF communities were removed to improve visualization.

3.3 Fungal communities across cultural modes and root types

Rarefaction curves showed that when considering equal sampling effort between cultural practices, vanilla roots in the understory harbored the richest overall fungal community while plants cultivated in the openfield or in the shade house showed equal fungal richness (Fig. S1). Total fungal communities segregated between cultural practices (PERMANOVA, $F = 9.686$, $R^2 = 0.043$, $p = 0.001$) and root type (terrestrial *versus* epiphytic; $F = 7.319$, $R^2 = 0.049$, $p = 0.001$; Fig. 3A and Table 1). Notably, roots of *V. pompona* and *V. planifolia*, both cultured in the shade house, did not segregate in the NMDS visualisation (Fig. 3A).

Contrary to the overall fungal communities, the roots of vanilla cultivated in the openfield harbored more diverse putative OMF communities than those cultivated in shade house or in the understory at equal sampling depth (Fig. S1). Considering OMF, samples still segregated by cultural practices ($F = 18.800$, $R^2 = 0.103$, $p = 0.001$) but not by root type probably due to low colonization of epiphytic roots ($F = 1.515$, $R^2 = 0.008$, $p = 0.093$; Fig. 3B and Table 1). Roots of *V. pompona* harbored the same main OMF OTUs than those of close individuals of *V. planifolia* in the shade house, and samples of the two species did not segregate in the NMDS visualization (Fig. 3B).

Table 1 PERMANOVA results for total and putative OMF fungal communities regarding cultivation mode (Cm) and root type (terrestrial *versus* epiphytic; Rt). The formula used in the models was: $X \sim Cm + (Cm / Rt)$ where Rt is nested into Cm. Significant p-values are bolded. Df, degree of freedom.

<i>Fungal guild</i>	<i>Variable</i>	<i>Df</i>	<i>F value</i>	<i>R²</i>	<i>P-value</i>
Total	Cultivation mode	2	9.686	0.043	0.001
	Cultivation mode : root type	3	7.319	0.049	0.001
Putative OMF	Cultivation mode	2	18.800	0.103	0.001
	Cultivation mode : root type	2	1.515	0.008	0.093

We observed no clear difference in rhizoctonia composition at the family level between cultural practices (Figs. 4, S6-7). At the OTU level, the analysis of specificity between OTUs and cultural practices showed that the main OTU of Tulasnellaceae (TUL1) was not specific of any cultural

condition whereas TUL3 specifically colonized the roots of vanilla plants in the understory (Fig. S8). The OTUs CER9 and CER15 were restricted to the understory and the shade house, respectively. The *Resinicium* OTU (RES25) was only found in the terrestrial roots or vanilla plants cultivated in the shade house especially in bagasse (Figs. S7-8).

The epiphytic roots of vanilla plants were hardly colonized by OMF OTUs in the shade house or in the openfield whereas an epiphytic OMF colonization was detected in the understory (Figs. 4, S1). Overall, only 5.5% of the OMF OTUs were specific to the epiphytic roots compared to the 21.8% of the overall fungal community (Chi-squared = 15.631, df = 1, $p < 0.001$; Fig. 5). Considering the understory only, OTUs specific to the epiphytic roots represented 20.0% of the OMF OTUs (Fig. S9) at this site.

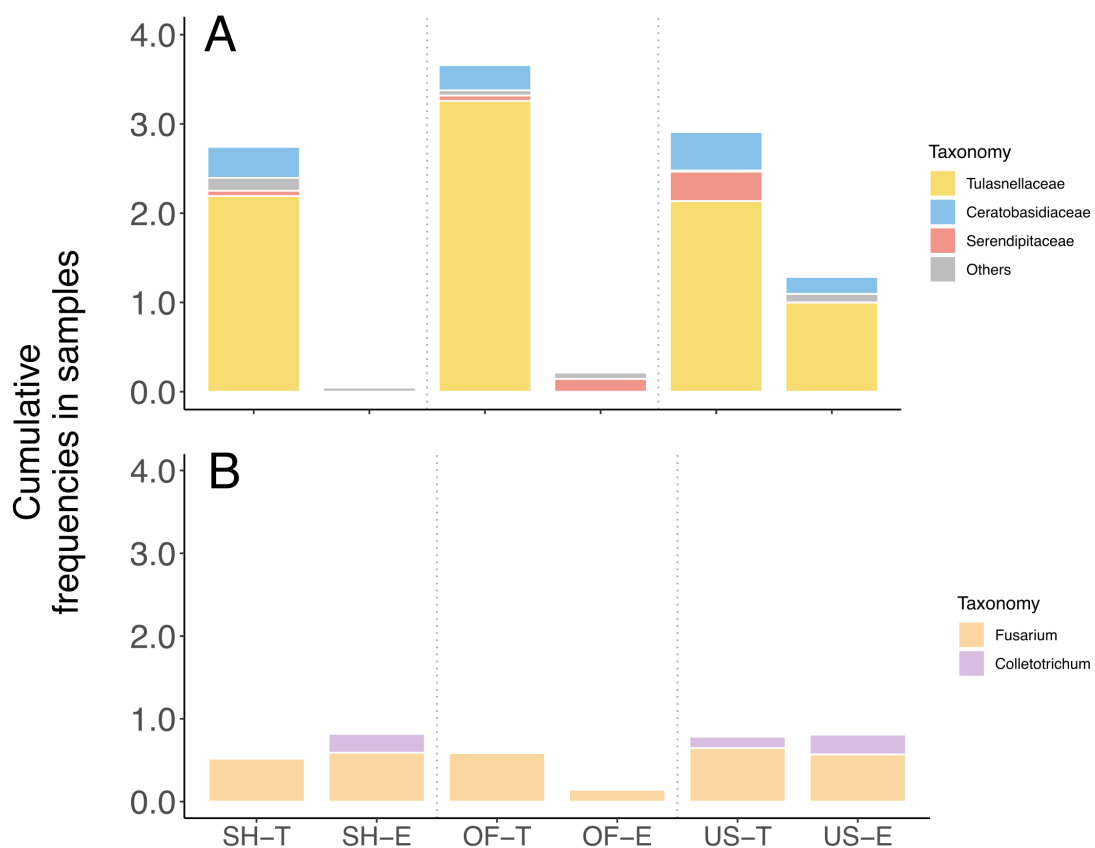


Figure 4 Fungal composition of *Vanilla* spp. roots considering (A) putative OMF families and (B) known pathogens. The height of each bar represents the cumulative frequencies of each OTUs in samples. SH, shade house; OF, openfield; US, understory; E, epiphytic; T, terrestrial.

3.4 Fungal pathogens of *Vanilla* spp. in La Réunion island

Fusarium fungi were abundant in the roots of *Vanilla* spp. led by one OTU (FUS2) representing 7.0% of the sequences retrieved with the ITS86-F/ITS4 primers and colonizing 38.6% of the root samples. Based on a phylogenetic approach, it was identified as *F. oxysporum* (Fig. S5). Other less abundant *Fusarium* OTUs belonged to the clades of *F. solani* (4 OTUs), *F. fukikuroi* (1 OTU) or unidentified clades (4 OTUs).

Although 5 OTUs of *Colletotrichum* could be detected in the dataset, they were all scarce and none of them was identified as *C. orchidophilum* (Fig. S5).

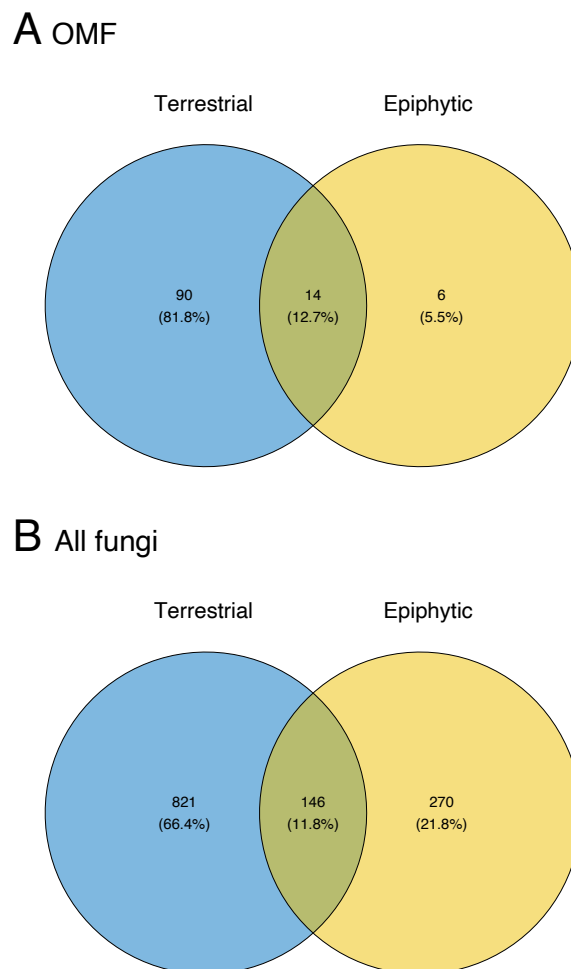


Figure 5 Venn diagrams showing the numbers of fungal OTUs exclusive or shared between terrestrial and epiphytic roots of *Vanilla* spp. in the whole dataset, considering (A) putative OMF families and (B) all fungi. The same tendencies were observed in each cultivation practice (Fig. S9).

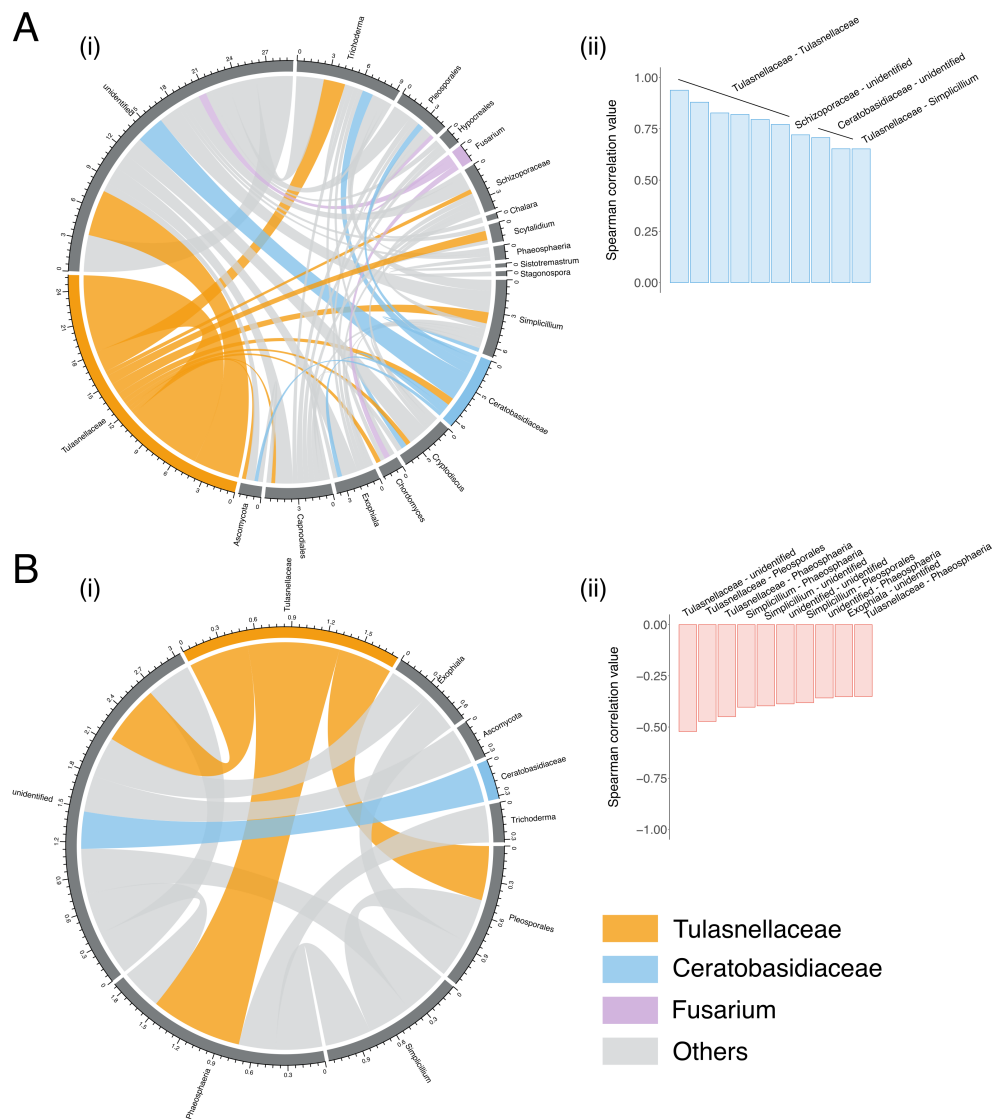


Figure 6 Fungal co-occurrences in *Vanilla* sp. roots. (i) Significant (A) positive or (B) negative co-occurrences are represented by links between fungal taxa. The width of each link is proportional to the number of co-occurring OTUs. (ii) Spearman values of the first ten (A) positively or (B) negatively co-occurring OTUs and associated taxonomy.

3.5 Fungal co-occurrence

No apparent sign of antagonism between putative OMF fungi and pathogens of vanilla plants were observed at the family level (Fig. 4) even when considering relative abundancies (Fig. S6). To investigate this tendency at the OTU's level, we analysed the co-occurrence of OTUs which showed that OMF OTUs significantly and positively (and to a lesser extent negatively; 14.8% of

the interactions) interacted with several fungal OTUs but not with *Fusarium* or *Colletotrichum* fungi (Fig. 6). Main significant positive co-occurrences were between Tulasnellaceae OTUs while no strong negative interaction (*i.e.*, < -0.6) was detected in the whole dataset.

4. Discussion

4.1 OMF communities of *Vanilla* spp. in La Réunion island

Using a high-throughput sequencing approach, we identified a total of 1,237 fungal OTUs in the roots of vanilla plants cultivated in La Réunion island (Sainte-Suzanne). Among them, 110 were identified as putative OMF. They were mainly represented by the Tulasnellaceae family (75 OTUs, 68%), which may be explained by the use of the specific primers 5.8S-OF/ITS4-Tul. However, specific primers are required to amplify this family (Rammitsu *et al.*, 2021), including in vanilla roots (Johnson *et al.*, 2021). The Ceratobasidiaceae were the second most frequent and abundant OMF (8 OTUs, 7%), and other putative OMF families were both less frequent and abundant in the vanilla roots investigated here. These results are in line with previous studies of the mycorrhizal communities of vanilla in Central America (Porrás-Alfaro & Bayman, 2003, 2007; Johnson *et al.*, 2021), and suggest that the main mycorrhizal partners of vanilla in La Réunion are also Tulasnellaceae and Ceratobasidiaceae. Additionally, given that OTUs of these two families both had large phylogenetic breadth, the assumption by Porrás-Alfaro & Bayman, (2007) that *Vanilla planifolia* is a mycorrhizal generalist seems confirmed in our study.

In addition with rhizoctonia fungi, orchids can form mycorrhizas with a large range of Asco- and Basidiomycota which may be saprotrophic or also form ectomycorrhizas in other plants (Dearnaley *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2021; Selosse *et al.*, 2022). Although a recent study conducted in Mexico by González-Chávez *et al.*, (2018) suggested that *Scleroderma* fungi could also form pelotons in the roots of *V. planifolia*, we did not find any *Scleroderma* in the investigated roots. In another study, Johnson *et al.*, (2021) detected in the roots of vanilla plants a large diversity of putative OMF, both saprotrophic (*e.g.*, *Mycena*) or ectomycorrhizal. In our study, we did not detect any ectomycorrhizal fungi according to previously identified ectomycorrhizal fungal genera or clades inside rhizoctonias families (Bidartondo *et al.*, 2003; Veldre *et al.*, 2013). Still, we cannot exclude that one or several of the OTUs detected in this study can, at least in certain habitats,

act as ectomycorrhizal fungi, including for those *a priori* classified as rhizoctonias (Yagame *et al.*, 2012; Suetsugu & Matsubayashi, 2021). Further studies are thus needed to assess whether the results of Johnson *et al.*, (2021) can be extended to La Réunion island.

Regarding saprotrophic fungi, we found a very scarce colonization of vanilla roots by *Mycena* fungi which was unlikely to form mycorrhiza in the plant cells. However, we also detected an OTU of *Resinicium* (RES25, Hymenochaetales) identified as *Resinicium saccharicola* Nakasone (Nakasone, 2000), which was abundant in the terrestrial roots of vanilla plants cultivated in shade house on bagasse substrate. *Resinicium* are leaf litter-decaying fungi, but some members are also known to form mycorrhizal associations in myco-heterotrophic orchids in the genus *Gastrodia*, including in La Réunion (Martos *et al.*, 2009). This is the first occurrence of *R. saccharicola* in La Réunion island which has probably been introduced with the bagasse substrate as this species is known to decompose sugarcane leaf litter in Asia (Miura *et al.*, 2015). Given that this substrate is commonly used to cultivate vanilla worldwide, the ability for *R. saccharicola* to form mycorrhizas in vanilla roots could have implications in vanilla cultivation. It will be necessary to verify whether this fungus is able to symbiotically associate with vanilla roots and transfer nutrients from sugarcane residues, or whether it colonizes the roots in a more passive way. Hence, future work should investigate the mycorrhizal status of *R. saccharicola* in vanilla roots using microscopic technics.

4.2 What is the origin of OMF fungi in *Vanilla* plants of La Réunion?

Studies on vanilla mycorrhizas have been mainly conducted in Central America (Porrás-Alfaro & Bayman, 2003, 2007; González-Chávez *et al.*, 2018; Johnson *et al.*, 2021) where the main cultivated *Vanilla* species originate. In our study conducted in La Réunion island (Indian Ocean), none of the Ceratobasidiaceae were close to mycorrhizal fungi previously identified in vanilla plants in Central America. At the contrary, the most abundant Tulasnellaceae (TUL1) belonged to the same clade as several sequences retrieved from Porrás-Alfaro & Bayman, (2007) in Central America. The coverage between our OTU's sequences and the sequences identified in the latter study was low due to the use of different reverse primers (ITS4-Tul in this study as in Martos *et al.*, 2012, and Tul4, located upstream of ITS-Tul, in Porrás-Alfaro & Bayman, 2007). Yet, the sequences only presented 1 mismatch in their overlapping region, suggesting that they are similar. Regarding TUL11 and TUL14, identities between sequences were low, suggesting that they are

different fungi from those identified in Central America. Overall, even though further studies are needed using full ITS sequencing, we propose that vanilla plants of La Réunion can form mycorrhizas with the at least some fungi (or closely relatives) also found in Central America. Whether these fungi were introduced alongside with vanilla plants or independently show a worldwide distribution remains in question. Only one successful introduction of vanilla plants in La Réunion has been documented (Bory *et al.*, 2008a), and even though other introduction events cannot be excluded, it may not have been sufficient to co-introduce all the fungal partners retrieved here.

Rather, the putative OMF identified here could be already present on the island. For instance, TUL1 or TUL11 both belonged to the same clades as sequences identified in orchids of La Réunion by Martos *et al.*, (2012). TUL1 was close to sequences of fungi retrieved in the roots of orchidoid, terrestrial orchids from the South of the island (*Habenaria*, *Platylophus*) while TUL11 was close to sequences previously identified in the roots of several terrestrial epidendroid and orchidoid orchid species distributed on the island, suggesting that they form a generalist fungal clade. By contrast, one OTU (TUL3) could not be related to any sequence from Genbank, suggested that the vanilla plants studied here could also be colonized by specific and so far unknown Tulasnellaceae. As La Réunion island does not host any endemic orchid within the Vanilloideae, future studies could verify whether such fungal partners also occur in the roots of other vanilloid orchids in the Indian Ocean (*e.g.*, in Madagascar).

4.3 Impact of cultural practices on fungal communities of vanilla

In a recent study conducted in Mexico, Johnson *et al.*, (2021) suggested that cultural practices could influence fungal communities of vanilla, including OMF. However, this study was conducted at four sites distant of > 50km from each other and the authors could not exclude that the observed differences were due to spatial effects. In our study conducted in an area of < 2.5km, we confirmed that cultural practices do influence fungal and mycorrhizal communities of vanilla plants.

Rarefaction curves showed that fungal communities were richer in the understorey (*i.e.*, low-managed farm) compared to shade house and openfield. Comparisons of richness between epiphytic and terrestrial roots were limited by different sampling sizes, but epiphytic roots in the understorey seem to host a richer fungal community than terrestrial roots.

When considering putative OMF only, epiphytic roots were hardly colonized except in the understory. However, vanilla plants growing in the shade house or in the openfield both rooted epiphytically on exotic trunks, *i.e.*, dead wood fence of Pinaceae and *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae) trees, respectively. The chemistry of these tutors (*e.g.*, latex produced by *J. curcas*; *e.g.*, [Igbinsa et al., 2009](#)) might be responsible for this low colonization. When considering all sites, the majority of OMF fungi detected in the epiphytic roots of vanilla plants (*i.e.*, in the understory) were also detected in terrestrial roots (including in the farm), meaning that they may not be specific of the epiphytic environment. Indeed, mycorrhizal fungi might grow from the soil onto the tutors' bark and colonize epiphytic roots. For instance, CER9 was shared between the terrestrial and epiphytic vanilla roots in the understory. As it was not similarly shared in other cultivation practices, it also suggests that the substrate could limit the growth of some fungi in aerial parts. Yet, the low colonization by OMF of vanilla epiphytic roots has already been demonstrated by using microscopy ([Porrás-Alfaro & Bayman, 2007](#)) or sequencing ([Johnson et al., 2021](#)) and might also be a property of this species.

The putative OMF communities also varied between cultivation practices, including between different substrate types in shade house, even though the composition at the family level was similar. For instance, the *Resinicium* RES25 was almost exclusively detected in the roots of vanilla in bagasse (see above). The putative OMF communities were richer in the openfield (coconut litter) compared to the shade house (bagasse or dead leaves litter) and understory (forest soil). The variation of cultivation practices could then favor OTUs with complementary niches as exemplified in the Ceratobasidiaceae family in which the two main OTUs were specific of the shade house and of the openfield and understory, respectively. Different mycorrhizal fungi could provide different services to plants, for instance by providing direct protection against pathogens (see next section). Alternatively, they could exploit different nitrogen sources ([Nurfadilah et al., 2013](#)), and participate to the diversification of vanilla's production systems. Hence, future works could aim at determining the ecological properties of these fungi, for instance by isolating them or by using *in situ* transcriptomic approaches. Here, we tested for a competition effect between the putative OMF and the fungal pathogens communities of vanilla plants.

4.4 Interactions between mycorrhizal fungi and other fungi

Fusarium and *Colletotrichum* fungi have been identified as vanilla pathogens in several countries worldwide (Koyyappurath *et al.*, 2016; Charron *et al.*, 2018; Ab. Kadir *et al.*, 2019).

C. orchidophilum is the causal agents of the Anthracnose and the black spot disease in vanilla (Charron *et al.*, 2018; Ab. Kadir *et al.*, 2019), and mainly affects leaves or fruits where it is often associated with *C. arxii* (Charron *et al.*, 2018). Indeed, many species of *Colletotrichum* can be both endophytes and pathogens in plants (e.g., Yang *et al.*, 2011). Here, based on a phylogenetic approach no OTU could be related to the pathogenic *C. orchidophilum* complex. Furthermore, we only detected very low-abundant *Colletotrichum* OTUs, suggesting that they may not substantially colonize the roots of vanilla plants.

F. oxysporum is the main pathogen affecting vanilla plants, causing the root and stem rot of vanilla (Koyyappurath *et al.*, 2016), but other *Fusarium* such as *F. solani* are also common pathogens (Ab. Kadir *et al.*, 2019). Other species can also be endophytic or beneficial for plants and at least one strain of *F. oxysporum* may even form mycorrhizas in orchids (e.g., in *Bletilla striata*; Jiang *et al.*, 2019). Here, the main OTU identified was part of the *F. oxysporum* pathogenic complex and was largely retrieved in all cultivation practices. Yet, no symptoms were observed in the cultivated vanilla plants and all the root portions sequenced were healthy and non-necrotic, suggesting that *Fusarium* fungi may grow as endophyte in plant roots (Wilson, 1995). Mesny *et al.*, (2021) have suggested that pathogenic fungi in *Arabidopsis thaliana* may be controlled by endophytic communities, avoiding symptoms. We tested the hypothesis that fungal pathogens of vanilla plants were controlled by the presence of OMF, as also previously suggested by Bayman *et al.*, (2011).

Analyses of co-occurrences at the OTU level revealed that OMF interacted largely with other fungi, but not with main vanilla pathogens. Indeed, the *Fusarium* OTU FUS2 was frequently found in the investigated roots, including alongside with putative OMF fungi. At the family level, there was no obvious negative correlation between the abundance of putative OMF and that of *Fusarium* and *Colletotrichum* fungi in the different cultivation practices. However, we cannot exclude that the expansion of pathogens in plant roots, rather than its sole presence, may be controlled by the OMF community, and experimental manipulation are required to test this hypothesis. Furthermore, OMF both negatively interacted with other putative fungal pathogens, such *Phaeosphaeria* sp. or fungi in the Pleosporales, and positively interacted with beneficial fungi

such as *Trichoderma* spp. (Sandheep & Jisha, 2013), showing that the fungal interactions inside vanilla roots might be more complex than expected.

Acknowledgments

FM is financed by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-19-CE02-0002). We also would like to thank Claudine Ah-Peng for logistic support during the fieldwork, Soraya Chaouch from the “plateau technique de Cytométrie en flux et QPCR, Plateforme analytique du MNHN (UMR7245)”. The authors declare no conflict of interest regarding this work.

Author contributions

FM and HK designed the study, FM performed the sampling. CB, CG and RP performed the molecular analyses, and RP performed the bioinformatics and statistical analyses. RP and FM wrote the manuscript.

References

- Ab. Kadir N, Naher L, Sidek N. 2019. Economical important phytopathogenic diseases in *Vanilla planifolia*: areview paper. *Journal of Tropical Resources and Sustainable Science* 7: 77–82.
- Azcón-Aguilar C, Barea JM. 1997. Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens - an overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza* 6: 457–464.
- Bayman P, Mosquera-Espinosa AT, Saladini-Aponte CM, Hurtado-Guevara NC, Viera-Ruiz NL. 2016. Age-dependent mycorrhizal specificity in an invasive orchid, *Oeceoclades maculata*. *American Journal of Botany* 103: 1880–1889.
- Bayman P, Mosquera-Espinosa T, Porrás-Alfaro A. 2011. Mycorrhizal relationships of *Vanilla* and prospects for biocontrol of root rots. In: *Handbook of vanilla science and technology*. Havkin-Frenkel D. & Belanger F. (Ed.), Wiley-Blackwell. pp 266-280.
- Bidartondo MI, Bruns TD, Weiß M, Read DJ. 2003. Specialized cheating of the ectomycorrhizal symbiosis by an epiparasitic liverwort. *Proc. R. Soc. Lond. B* 270: 835–842.
- Bonnardeaux Y, Brundrett M, Batty A, Dixon K, Koch J, Sivasithamparam K. 2007. Diversity of mycorrhizal fungi of terrestrial orchids: compatibility webs, brief encounters, lasting relationships and alien invasions. *Mycological Research* 111: 51–61.
- Bory S, Grisoni M, Duval MF, Besse P. 2008a. Biodiversity and preservation of vanilla: present state of knowledge. *Genetic Resources and Crop Evolution* 55: 551–571.
- Bory S, Lubinsky P, Risterucci AM, Noyer JL, Grisoni M, Duval MF, Besse P. 2008b. Patterns of introduction and diversification of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae) in Reunion Island (Indian Ocean). *American Journal of Botany* 95: 805–815.
- Brundrett MC, Tedersoo L. 2018. Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytologist* 220: 1108–1115.
- Cameron KM, Molina MC. 2006. Photosystem II gene sequences of psbB and psbC clarify the

- phylogenetic position of *Vanilla* (Vanilloideae, Orchidaceae). *Cladistics* 22: 239–248.
- Charron C, Hubert J, Minatchy J, Wilson V, Chrysot F, Gerville S, Ioos R, Jeandel C, Grisoni M.** 2018. Characterization of *Colletotrichum orchidophilum*, the agent of black spot disease of vanilla. *Journal of Phytopathology* 166: 525–531.
- Copetta A, Lingua G, Berta G.** 2006. Effects of three AM fungi on growth, distribution of glandular hairs, and essential oil production in *Ocimum basilicum* L. var. *Genovese*. *Mycorrhiza* 16: 485–494.
- Davis NM, Proctor DM, Holmes SP, Relman DA, Callahan BJ.** 2018. Simple statistical identification and removal of contaminant sequences in marker-gene and metagenomics data. *Microbiome* 6: 226.
- Dearnaley JDW, Martos F, Selosse MA.** 2012. Orchid mycorrhizas: molecular ecology, physiology, evolution and conservation aspects. In: *Fungal Associations*, 2nd Edition The Mycota IX. B. Hock (Ed.). Springer Berlin Heidelberg, Germany, 207–230.
- Dickie IA, Bolstridge N, Cooper JA, Peltzer DA.** 2010. Co-invasion by *Pinus* and its mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 187: 475–484.
- Dickie IA, Bufford JL, Cobb RC, Desprez-Loustau M-L, Grelet G, Hulme PE, Klironomos J, Makiola A, Nuñez MA, Pringle A, et al.** 2017. The emerging science of linked plant - fungal invasions. *New Phytologist* 215: 1314–1332.
- Downing JL, Liu H, McCormick MK, Arce J, Alonso D, Lopez-Perez J.** 2020. Generalized mycorrhizal interactions and fungal enemy release drive range expansion of orchids in southern Florida. *Ecosphere* 11: e03228.
- Dufrêne M, Legendre P.** 1997. Species assemblages and indicator species: the need for a flexible asymmetrical approach. *Ecological Monographs* 67: 345–366.
- Fouché JG, Jouve L.** 1999. *Vanilla planifolia*: history, botany and culture in Reunion island. *Agronomie* 19: 689–703.
- Givnish TJ, Spalink D, Ames M, Lyon SP, Hunter SJ, Zuluaga A, Iles WJD, Clements MA, Arroyo MTK, Leebens-Mack J, et al.** 2015. Orchid phylogenomics and multiple drivers of their extraordinary diversification. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 282: 20151553.
- González-Chávez M del CA, Torres-Cruz TJ, Sánchez SA, Carrillo-González R, Carrillo-López LM, Porrás-Alfaro A.** 2018. Microscopic characterization of orchid mycorrhizal fungi: *Scleroderma* as a putative novel orchid mycorrhizal fungus of *Vanilla* in different crop systems. *Mycorrhiza* 28: 147–157.
- Havkin-Frenkel D, Belanger FC (Eds.).** 2011. *Handbook of Vanilla science and technology*. Wiley-Blackwell.
- Hernández-Hernández J.** 2011. Mexican vanilla production. In: *Handbook of vanilla science and technology*. Havkin-Frenkel D. & Belanger F. (Ed.), Wiley-Blackwell. pp 3-25.
- Hornung BVH, Zwitter RD, Kuijper EJ.** 2019. Issues and current standards of controls in microbiome research. *FEMS Microbiology Ecology* 95: fiz045.
- Igbinosa OO, Igbinosa EO, Aiyegoro OA.** 2009. Antimicrobial activity and phytochemical screening of stem bark extracts from *Jatropha curcas* (Linn). *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 3: 58–62.
- Jiang J, Zhang K, Cheng S, Nie Q, Zhou S, Chen Q, Zhou J, Zhen X, Li X ting, Zhen T wen, et al.** 2019. *Fusarium oxysporum* KB-3 from *Bletilla striata*: an orchid mycorrhizal fungus. *Mycorrhiza* 29: 531–540.
- Johnson LJA, González-Chávez M del CA, Carrillo-González R, Porrás-Alfaro A, Mueller GM.** 2021. *Vanilla* aerial and terrestrial roots host rich communities of orchid mycorrhizal and ectomycorrhizal fungi. *Plants People Planet* 3: 541–552.
- Jung SC, Martínez-Medina A, López-Raéz JA, Pozo MJ.** 2012. Mycorrhiza-induced resistance

and priming of plant defenses. *Journal of Chemical Ecology* 38: 651–664.

Koyyappurath S, Atuahiva T, Le Guen R, Batina H, Le Squin S, Gautheron N, Edel Hermann V, Peribe J, Jahiel M, Steinberg C, *et al.* 2016. *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-vanillae* is the causal agent of root and stem rot of vanilla. *Plant Pathology* 65: 612–625.

Lee YI, Yang CK, Gebauer G. 2015. The importance of associations with saprotrophic non-*Rhizoctonia* fungi among fully mycoheterotrophic orchids is currently under-estimated: novel evidence from sub-tropical Asia. *Annals of Botany* 116: 423–435.

Martin M. 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* 17: 10–12.

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

Martos F, Munoz F, Pailler T, Kottke I, Gonneau C, Selosse M-A. 2012. The role of epiphytism in architecture and evolutionary constraint within mycorrhizal networks of tropical orchids. *Molecular Ecology* 21: 5098–5109.

Mesny F, Miyauchi S, Thiergart T, Pickel B, Atanasova L, Karlsson M, Hüttel B, Barry KW, Haridas S, Chen C, *et al.* 2021. Genetic determinants of endophytism in the *Arabidopsis* root mycobiome. *Nature Communications* 12: 7227.

Miura T, Niswati A, Swibawa IG, Haryani S, Gunito H, Shimano S, Fujie K, Kaneko N. 2015. Diversity of fungi on decomposing leaf litter in a sugarcane plantation and their response to tillage practice and bagasse mulching: implications for management effects on litter decomposition. *Microbial Ecology* 70: 646–658.

Mujica MI, Pérez MF, Jakalski M, Martos F, Selosse MA. 2020. Soil P reduces mycorrhizal colonization while favors fungal pathogens: observational and experimental evidence in *Bipinnula* (Orchidaceae). *FEMS Microbiology Ecology* 96: fiae178.

Muslim A, Horinouchi H, Hyakumachi M. 2003. Suppression of *Fusarium* wilt of spinach with hypovirulent binucleate *Rhizoctonia*. *Journal of General Plant Pathology* 69: 143–150.

Nakasone KK. 2000. Reexamination of *Odontia sacchari*, *O. saccharicola*, and *Corticium granulare*. *Karstenia* 40: 111–116.

Nilsson RH, Tedersoo L, Ryberg M, Kristiansson E, Hartmann M, Unterseher M, Porter TM, Bengtsson-Palme J, Walker DM, De Sousa F, *et al.* 2015. A comprehensive, automatically updated fungal ITS sequence dataset for reference-based chimera control in environmental sequencing efforts. *Microbes and Environments* 30: 145–150.

Nurfadilah S, Swarts ND, Dixon KW, Lambers H, Merritt DJ. 2013. Variation in nutrient-acquisition patterns by mycorrhizal fungi of rare and common orchids explains diversification in a global biodiversity hotspot. *Annals of Botany* 111: 1233–1241.

Ogura-Tsujita Y, Gebauer G, Xu H, Fukasawa Y, Umata H, Tetsuka K, Kubota M, Schweiger JMI, Yamashita S, Maekawa N, *et al.* 2018. The giant mycoheterotrophic orchid *Erythrorchis altissima* is associated mainly with a divergent set of wood-decaying fungi. *Molecular Ecology* 27: 1324–1337.

Okayama M, Yamato M, Yagame T, Iwase K. 2012. Mycorrhizal diversity and specificity in *Lecanorchis* (Orchidaceae). *Mycorrhiza* 22: 545–553.

Oksanen J, F. Guillaume Blanchet RK, Legendre P, Minchin PR, O'Hara RB, Simpson GL, Solymos P, M. Henry H. Stevens HW. 2013. Vegan: Community Ecology Package. [WWWdocument] URL <http://cran.r-project.org/package=vegan>.

Perez-Lamarque B, Petrolli R, Strullu-Derrien C, Strasberg D, Morlon H, Selosse M-A, Martos F. 2022. Structure and specialization of mycorrhizal networks in phylogenetically diverse tropical communities. *Environmental Microbiome* 17: 38.

- Petrolli R, Vieira CA, Jakalski M, Bocayuva MF, Vallé C, Cruz E da S, Selosse M, Martos F, Kasuya MCM. 2021. A fine-scale spatial analysis of fungal communities on tropical tree bark unveils the epiphytic rhizosphere in orchids. *New Phytologist* 231: 2002–2014.
- Porras-Alfaro A, Bayman P. 2007. Mycorrhizal fungi of *Vanilla* : diversity, specificity and effects on seed germination and plant growth. *Mycologia* 99: 510–525.
- Porras-Alfaro A, Bayman P. 2003. Mycorrhizal fungi of *Vanilla*: root colonization patterns and fungal identification. *Lankesteriana* 7: 147–150.
- Rammitsu K, Kajita T, Imai R, Ogura-Tsujita Y. 2021. Strong primer bias for Tulasnellaceae fungi in metabarcoding: specific primers improve the characterization of the mycorrhizal communities of epiphytic orchids. *Mycoscience* 62: 356–363.
- Rock-Blake R, McCormick MK, Brooks HEA, Jones CS, Whigham DF. 2017. Symbiont abundance can affect host plant population dynamics. *American Journal of Botany* 104: 72–82.
- Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahé F. 2016. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* 4: e2584.
- Saleh AM, Abdel-Mawgoud M, Hassan AR, Habeeb TH, Yehia RS, Abdelgawad H. 2020. Global metabolic changes induced by arbuscular mycorrhizal fungi in oregano plants grown under ambient and elevated levels of atmospheric CO₂. *Plant Physiology and Biochemistry* 151: 255–263.
- Sandheep A, Jisha MS. 2013. Screening of *Trichoderma* spp. and *Pseudomonas* spp. for their biocontrol potential against phytopathogens of *Vanilla*. *International Journal of Agriculture, Environment & Biotechnology* 6: 799–806.
- Selosse MA, Petrolli R, Mujica MI, Laurent L, Perez-Lamarque B, Figura T, Bourceret A, Jacquemyn H, Li T, Gao J, *et al.* 2022. The Waiting Room Hypothesis revisited by orchids: were orchid mycorrhizal fungi recruited among root endophytes? *Annals of Botany* 129: 259–270.
- Séne S, Selosse M-A, Forget M, Labourdière J, Cissé K, Diédhiou AG, Rivera-Ocasio E, Kodja H, Kameyama N, Nara K, *et al.* 2018. A pantropically introduced tree is followed by specific ectomycorrhizal symbionts due to pseudo-vertical transmission. *ISME Journal* 12: 1806–1816.
- Smith SE, Read DJ. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. Cambridge, Great Britain: Elsevier Ltd., 2008.
- Suetsugu K, Matsubayashi J. 2021. Evidence for mycorrhizal cheating in *Apostasia nipponica*, an early-diverging member of the Orchidaceae. *New Phytologist* 229: 2302–2310.
- Veldre V, Abarenkov K, Bahram M, Martos F, Selosse M-A, Tamm H, Kõljalg U, Tedersoo L. 2013. Evolution of nutritional modes of Ceratobasidiaceae (Cantharellales, Basidiomycota) as revealed from publicly available ITS sequences. *Fungal Ecology* 6: 256–268.
- Vogt-Schilb H, Těšitelová T, Kotlínek M, Sucháček P, Kohout P, Jersáková J. 2020. Altered rhizoctonia assemblages in grasslands on ex-arable land support germination of mycorrhizal generalist, not specialist orchids. *New Phytologist* 227: 1200–1212.
- Wang D, Jacquemyn H, Gomes SIF, Vos RA, S.F.T. Merckx V. 2021. Symbiont switching and trophic mode shifts in Orchidaceae. *New Phytologist* 231: 791–800.
- Weiß M, Waller F, Zuccaro A, Selosse M-A. 2016. Sebaciniales – one thousand and one interactions with land plants. *New Phytologist* 211: 20–40.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR protocols : a guide to methods and applications*. Innis MA, Gelfand DH, Shinsky JJ, White TJ, (Ed.). London, Great Britain: Academic Press, 315–322.
- Yagame T, Orihara T, Selosse MA, Yamato M, Iwase K. 2012. Mixotrophy of *Platanthera minor*, an orchid associated with ectomycorrhiza-forming Ceratobasidiaceae fungi. *New*

Phytologist 193: 178–187.

Yang Y, Cai L, Yu Z, Liu Z, Hyde KD. 2011. *Colletotrichum* species on Orchidaceae in Southwest China. *Cryptogamie, Mycologie* 32: 229–253.

Zhang S, Lehmann A, Zheng W, You Z, Rillig MC. 2019. Arbuscular mycorrhizal fungi increase grain yields: a meta-analysis. *New Phytologist* 222: 543–555.

Zinger L, Bonin A, Alsos IG, Bálint M, Bik H, Boyer F, Chariton AA, Creer S, Coissac E, Deagle BE, *et al.* 2019. DNA metabarcoding - Need for robust experimental designs to draw sound ecological conclusions. *Molecular Ecology* 28: 1857–1862.

Supporting information

Supporting information of **Article IV** can be accessed at the following link (GitHub):

https://github.com/PetrolliR/OrchMyco_SupMat.git

IX. Discussion générale

Plan détaillé

Préambule	185
9.1. Diversité des associations fongiques chez les orchidées épiphytes	186
9.1.1. Partenaires mycorhiziens d'orchidées en milieu épiphyte tropical	186
9.1.1.a Des orchidées épiphytes essentiellement à rhizoctonias	186
9.1.1.b Les associations chez les orchidées semi-épiphytes	187
9.1.1.c Des milieux épiphytes peu propices aux mycorhizes ?	188
9.1.2. L'importance des autres champignons endophytes	188
9.2. Quelle est la niche des rhizoctonias sur l'écorce des arbres tropicaux ?	190
9.2.1. Une question jusqu'ici peu abordée	190
9.2.2. Où se situent les champignons mycorhiziens d'orchidées sur l'écorce ?	190
9.2.3. Comment se nourrissent les rhizoctonias sur l'écorce ?	192
9.2.4. Vers une nouvelle niche des rhizoctonias épiphytes	194
9.2.5. Quelle dynamique temporelle des rhizoctonias en milieu épiphyte ?	196
9.2.5.a Dynamique successive	196
9.2.5.b Dynamique saisonnière	197
9.3. Influences réciproques entre les partenaires symbiotiques	198
9.3.1. L'importance des données spatialisées	198
9.3.2. L'influence des rhizoctonias sur la germination des graines	199
9.3.3. Les orchidées peuvent-elles influencer en retour leurs champignons ?	201
9.3.4. Vers des CMNs et un phénomène de facilitation en milieu épiphyte	202
9.3.5. Les rhizoctonias peuvent-ils influencer leur hôte à l'échelle de la forêt ?	204
9.4. Les méthodes employées et leurs limites	208
Bilan et perspectives	212
Encadré 8. Applications possibles en écologie de la conservation.	209

Préambule

Dans cette dernière partie, nous rappellerons et discuterons les grands résultats de la thèse afin d'en dresser un bilan et d'en dégager des perspectives pour des recherches futures. Nous aborderons dans un premier temps la diversité des champignons détectés durant la thèse pour tenter d'identifier les partenaires fongiques courants des orchidées dans l'environnement épiphyte tropical. Nous reviendrons dans un second temps sur la manière dont les travaux de la thèse pourraient améliorer notre compréhension de la niche des champignons mycorhiziens d'orchidées épiphytes, pour ensuite nous intéresser à la capacité des plantes épiphytes à influencer cette niche. Enfin, après avoir abordé les limites liées aux méthodes employées durant la thèse, nous ferons le bilan des perspectives entrevues à l'issue de celle-ci. Un bref bilan des possibles applications en écologie de la conservation sera également présenté (**Encadré 8**).

9.1. Diversité des associations fongiques chez les orchidées épiphytes

9.1.1. Partenaires mycorhiziens d'orchidées en milieu épiphyte tropical

9.1.1.a Des orchidées épiphytes essentiellement à rhizoctonias

Contrairement aux orchidées terrestres qui semblent capables de s'associer à une large gamme de partenaires fongiques (Dearnaley *et al.*, 2012), les orchidées épiphytes sont le plus souvent associées à des champignons du groupe des rhizoctonias, *i.e.*, familles des Tulasnellaceae, Ceratobasidiaceae et Serendipitaceae.

Sous les néotropiques, des associations fréquentes à des Pucciniomycètes du groupe des Atractiellales, des Basidiomycètes généralement considérés comme saprophytes, ont également été observées (Kottke *et al.*, 2010; Herrera *et al.*, 2019) mais peu caractérisées sur le plan fonctionnel. Ces champignons ont été détectés de manière sporadique à La Réunion par Martos *et al.*, (2012) et de manière très limitée également dans nos analyses sur cette même île (ou au Brésil), suggérant qu'ils ne sont pas les principaux partenaires mycorhiziens des espèces que nous avons étudiées. La capacité de ce groupe de champignons à former des structures mycorhiziennes chez des espèces d'orchidées épiphytes à La Réunion pourra être testée à l'avenir, par exemple par microscopie électronique ou par isolement de pelotons.

De même, les différents partenaires fongiques d'orchidées épiphytes identifiés dans le monde (*e.g.*, *Mycena* ou *Fusarium*) n'ont été détectés que sporadiquement dans nos analyses. Dans l'Article IV, les plants de vanille étudiés étaient abondamment colonisés par un *Fusarium* appartenant à un clade de pathogènes de la vanille (*F. oxysporum* s.l.). Ce clade inclut lui-même la souche mycorhizienne documentée par (Jiang *et al.*, 2019 ; données non présentées), mais de plus amples travaux sont nécessaires pour tester la véracité du statut mycorhizien des *Fusarium* chez les orchidées, notamment chez la vanille. Nos observations sont donc en accord avec une association prépondérante des orchidées épiphytes avec les trois familles de rhizoctonias citées précédemment, et ceux chez l'ensemble des espèces d'Epidendroideae étudiées, ainsi que chez la vanille cultivée (*Vanilla planifolia*, Vanilloideae).

D'un point de vue fonctionnel, ces associations restreintes aux rhizoctonias dans les environnements épiphytes semblent refléter une particularité de ces milieux : la matière organique y est limitée, ce qui ne favorise probablement pas les champignons à fort potentiel saprophytique (par exemple les pourritures blanches). De même, les champignons ectomycorhiziens (*Russula*, *Tuber* etc.) sont probablement limités au sol, où les racines de leurs plantes hôtes ectomycorhiziennes prospèrent. Nous avons cependant détecté l'un de ces champignons (*Pisolithus microcarpus*) sur l'écorce des deux arbres étudiés dans l'Article I, ainsi que

dans les racines des orchidées épiphytes associées (Selosse *et al.*, 2022), bien que de manière peu abondante, rendant peu probable une colonisation de type mycorhizienne. Si l'écorce semble être un environnement peu propice à la croissance des champignons ectomycorhiziens, certains auteurs ont documenté une colonisation ectomycorhizienne dans des racines adventives enfouies au sein de pseudo-sols épiphytes (sans confirmation microscopique toutefois ; Orlovich *et al.*, 2013) et il n'est pas à exclure que d'éventuelles orchidées associées à ces pseudo-sols puissent également interagir avec de tels champignons.

9.1.1.b Les associations à d'autres champignons chez les orchidées semi-épiphytes

La plupart des orchidées semi-épiphytes appartiennent aux Vanilloideae. Au sein de cette sous-famille, plusieurs représentants terrestres s'associent à des champignons saprophytes non-rhizoctonias ou ectomycorhiziens (voir **Article IV**).

Chez la vanille aromatique cultivée (*Vanilla planifolia*) des associations ectomycorhiziennes ont été suggérées mais celles-ci concernent uniquement (González-Chávez *et al.*, 2018) ou très largement (Johnson *et al.*, 2020) les racines terrestres. À La Réunion, nous avons détecté la présence d'un champignon saprophyte dans les racines de certains plants d'orchidées étudiés (*Resinicium saccharicola*), mais là encore la colonisation était restreinte aux racines terrestres. Ce champignon est retrouvé dans les plantations de canne à sucre dans d'autres parties du monde (Miura *et al.*, 2015) et, à La Réunion, il n'est connu que dans les racines de vanilles cultivées sur un compost de bagasse (résidus de canne à sucre ; **Article IV**).

Une orchidée semi-épiphyte mycohétérotrophe du Japon (*Erythrorchis altissima*) a été retrouvée associée (dans ses racines terrestres) à des champignons ectomycorhiziens du genre *Russula*, mais les plantes étudiées semblaient davantage dépendre de champignons décomposeurs du bois (*Microporus sp.*, *Trichaptum sp.*) pour assurer leur nutrition carbonée (Ogura-Tsujita *et al.*, 2018). Ces derniers ont été retrouvés à la fois dans des racines terrestres et épiphytes, malheureusement sans que les auteurs ne donnent davantage de détails sur leur localisation le long des troncs (distance par rapport au sol). Cependant, cette espèce croît essentiellement sur des arbres morts en cours de décomposition, et l'omniprésence de tels champignons décomposeurs serait moins attendue sur des arbres vivants et en bonne santé.

En conclusion, les orchidées épiphytes, ou les racines épiphytes des orchidées lianescentes, semblent bien limitées dans leurs choix de partenaires fongiques. Néanmoins, la grande famille des orchidées est encore très loin d'avoir livré tous ses secrets, et de très nombreuses espèces épiphytes ou semi-épiphytes n'ont pas encore été étudiées.

9.1.1.c Des milieux épiphytes peu propices aux associations mycorhiziennes ?

Chez les autres familles (*i.e.*, non orchidées), les statuts mycorhiziens des plantes épiphytes sont variables comme chez la famille des Broméliacées (voir [Leroy et al., 2021](#) ; et références associées), seconde famille épiphyte chez les Angiospermes. Par exemple, [Rowe & Pringle, \(2005\)](#) ont suggéré une colonisation endomycorhizienne (champignons du genre *Glomus*) chez l'espèce *Vriesea werkleana*, mais dans cette même étude, seulement quatre espèces parmi les 13 testées ont présenté des structures mycorhiziennes typiques des endomycorhizes arbusculaires (*i.e.*, des arbuscules). De plus, *V. werkleana* forme des pseudo-sols à la base de ses feuilles, favorisant probablement le développement des champignons mycorhiziens dans cet environnement épiphyte ([Rowe & Pringle, 2005](#)). Des signes de colonisation épiphyte ont également été détectés chez d'autres familles épiphytes comme chez les Aracées, (ex : *Anthurium pitteri*) ou les Clusiacées (ex : *Clusia rotundata*), mais là encore dans des pseudo-sols peu profonds ([Rains et al., 2003](#) ; et références associées). Les membres épiphytes de la famille des Éricacées semblent plus fréquemment colonisés par des champignons mycorhiziens ([Rowe & Pringle, 2005](#); [Kottke et al., 2013](#)) que les autres familles (hors orchidées). Comme les orchidées, les Éricacées forment des mycorhizes avec des champignons appartenant aux Asco- et Basidiomycètes. Ces associations sont plus récentes que celles, supposées ancestrales, chez les plantes à endomycorhizes arbusculaires ([Strullu-Derrien et al., 2018](#)), et les partenaires fongiques impliqués ont probablement conservé un appareil enzymatique plus adapté à la vie en milieu épiphyte que les champignons mycorhiziens arbusculaires, le plus souvent restreints aux sols ou pseudo-sols de canopée en milieu épiphyte. Néanmoins, très peu d'études sont disponibles sur ces Éricacées épiphytes (mais voir par exemple : [Setaro et al., 2006](#)), et de futurs travaux seront nécessaires pour appréhender la diversité des associations mycorhiziennes rencontrées chez ces espèces, ainsi que la capacité des champignons associés à coloniser l'écorce nue sans être restreints aux pseudo-sols épiphytes.

9.1.2. L'importance des autres champignons endophytes

Au travers des différentes études présentées dans ce manuscrit, de nombreuses associations orchidée-champignon non mycorhizien ont été mises en évidence. Les études menées sur l'orchidée *Bulbophyllum variegatum* (**Article III**) ou sur la vanille (**Article IV**) ont par ailleurs révélé la constance de certaines de ces associations (voir par exemple Figure 5 de l'**Article III**). L'importance pour les plantes des champignons endophytes non-mycorhiziens (que nous appellerons simplement endophytes dans la suite du texte) est depuis longtemps reconnue ([Rodriguez et al., 2009](#)) et connaît un gain d'intérêt majeur chez les orchidées (ex : [Sarsaiya et al., 2019](#)). Pourtant, en dépit d'un intérêt ancien pour ces champignons (voir [Bayman et al., 1997](#) ; et travaux associés), on en sait encore très peu sur les rôles qu'ils pourraient avoir sur

l'écophysiole des orchidées, notamment en milieu épiphyte (résistance aux stress abiotiques, aux pathogènes etc.).

De nombreux champignons endophytes racinaires identifiés chez les orchidées épiphytes sont des Ascomycètes, appartenant notamment aux ordres des Xylariales, Hypocreales, Pleosporales ou encore des Helotiales (Bayman *et al.*, 1997; Cevallos *et al.*, 2018; Novotná *et al.*, 2018). Certains Basidiomycètes sont également identifiés, notamment au sein des Agaricales (Cevallos *et al.*, 2018). Ces ordres regroupent des champignons à l'écologie peu connue et probablement très variable, certains étant pathogènes, d'autres saprophytes libres ou endophytes. Plus que leur capacité à coloniser certaines racines d'orchidées, c'est leur capacité à le faire à l'échelle de populations entières qui est frappante. Dans l'Article III par exemple, certains champignons de l'ordre des Helotiales ont été retrouvés dans toutes les populations de l'île et de manière très fréquente dans les racines de *B. variegatum*. Les Helotiales appartiennent au complexe des *Dark Septate Endophytes* (DSE) dont l'importance pour les orchidées a récemment été étudiée chez l'espèce *Coelogyne viscosa* (Liu *et al.*, 2022). Chez cette espèce, la souche fongique étudiée a conféré un avantage à la croissance des jeunes plantules, en condition de stress hydrique. Les rôles potentiels des endophytes d'orchidées pourraient être multiples : stimulation du système immunitaire, détoxification de l'environnement, lutte contre les pathogènes, nutrition hydrominérale, etc. Chez *B. variegatum*, ils pourraient être responsables de la tolérance de cette espèce vis-à-vis de l'écorce toxique de son arbre hôte, *A. salicifolia*. De futurs travaux seront nécessaires pour déterminer la manière dont les champignons endophytes non-mycorhiziens d'orchidées participent à leur écologie.

Chez d'autres plantes épiphytes, comme chez les Broméliacées, les communautés endophytes sont également riches en Ascomycètes (e.g., *Fusarium*, *Trichoderma* ; Leroy *et al.*, 2019). Dans cette même étude, les auteurs ont mis en évidence, par application d'un fongicide sur de jeunes plantules mises à germer sous serre, un rôle positif des communautés fongiques sur la croissance et les taux de survies de ces jeunes plants appartenant à deux espèces de broméliacées épiphytes du genre *Aechmea*. Une expérience comparable avait été menée *in situ* en 2002 chez l'orchidée épiphyte *Lepanthes rupestris*, montrant un rôle plus ambigu des communautés fongiques (Bayman *et al.*, 2002). En effet, l'application de différents fongicides (ciblant préférentiellement soit les Ascomycètes, soit les Basidiomycètes) avait alors provoqué à la fois une augmentation et une diminution de la mortalité des jeunes plantules, et le protocole expérimental ainsi employé ne permettait pas de discerner correctement l'effet d'une perte des champignons bénéfiques (dont les mycorhiziens) par rapport à une éventuelle augmentation des champignons pathogènes. De futurs travaux comparables à ceux de Liu *et al.*, (2022) pourront permettre de tester plus spécifiquement l'effet de champignons endophytes sur la germination, la croissance et la survie des orchidées épiphytes.

9.2. Quelle est la niche des rhizoctonias sur l'écorce des arbres tropicaux ?

9.2.1. Une question jusqu'ici peu abordée

On sait depuis de nombreuses années que les orchidées épiphytes, comme les terrestres, s'associent à des champignons rhizoctonias (voir par exemple : [Otero et al., 2002](#)). Pourtant, la présence de ces champignons sur l'écorce des arbres n'a été démontrée que très récemment. Le premier séquençage d'écorce d'arbre à proximité d'orchidées épiphytes (et dans le but d'en étudier les champignons mycorhiziens), à ma connaissance, a été mené en 2019 par [Izuddin et al.](#), à Singapour (bien que des isolements de souches fongiques à partir d'écorce aient été menés auparavant, avec toutefois de maigres résultats ; [Tremblay et al., 1998](#)). Celui-ci a permis de montrer (i) que les rhizoctonias (ici des Serendipitaceae et Ceratobasidiaceae uniquement) étaient bien capables de coloniser l'écorce des arbres autour des racines et (ii) que leur distribution n'était pas homogène sur l'arbre, avec une légère prépondérance de ces groupes aux embranchements et sur les branches par rapport au tronc (une tendance similaire, mais variable, a depuis également été mise en évidence par [Zarza et al., 2022](#)). Ce résultat n'est pas anodin car il suggère que ces champignons colonisant l'écorce pourraient en dégrader certains composés, participant éventuellement à la nutrition des orchidées hôtes, bien que ceci n'ait jusqu'ici jamais été prouvé ([Leake & Cameron, 2012](#)).

D'autre part, plusieurs études menées en Chine ([Xing et al., 2019](#)) ou dans l'Océan Indien (La Réunion ; [Martos et al., 2012](#)) ont permis de montrer que, de manière générale, les champignons mycorhiziens d'orchidées épiphytes sont différents de ceux associés aux orchidées terrestres, bien que de nombreux champignons soient en réalité retrouvés dans les deux types d'habitats ([Herrera et al., 2018](#), et références ci-dessus).

Pourtant, la distribution précise de ces champignons sur l'écorce des arbres n'avait à ce jour jamais été étudiée.

9.2.2. Où se situent les champignons mycorhiziens d'orchidées sur l'écorce ?

Les résultats obtenus durant la thèse montrent que l'ensemble des champignons de l'écorce (**Article I**), et en particulier les rhizoctonias (**Articles I et II**), présentent une structure spatiale marquée, et ce quels que soient les systèmes étudiés (*i.e.*, Brésil ou La Réunion). Dans chaque cas, la distribution des champignons n'est pas homogène mais présente une structure agrégée sur l'écorce. Par ailleurs, les résultats sont constants d'un système à l'autre avec une autocorrélation spatiale significative sur 10 à 30 cm dans chaque cas. L'**Article I**, publié au milieu de l'année 2021, a été suivi d'une étude similaire publiée par [Cook et al.](#), en 2022. Dans cette

étude menée au Costa Rica, les auteurs ont étudié la structure spatiale des champignons de l'écorce de trois arbres adjacents, en prélevant sur chacun d'eux plusieurs points distants sur 5 branches au total. Les résultats obtenus sont similaires aux nôtres, puisque l'autocorrélation spatiale des communautés y est limitée à de courtes distances, ici $< 1\text{m}$, et ce quel que soit le substrat considéré (*i.e.*, écorces ou mousses). L'ensemble de ces travaux révèle ainsi que les champignons de l'écorce, dont les rhizoctonias, ont plutôt tendance à recouvrir de petites zones de substrat.

Autre point intéressant de cette étude (Cook *et al.*, 2022), les communautés fongiques situées sur les différentes branches étudiées se sont révélées différentes entre elles. Malheureusement, toutes les branches étaient éloignées de $> 2\text{m}$ les unes des autres, ne permettant pas de vérifier si, en l'absence de continuité physique (*i.e.*, du support écorce), les communautés de champignons proches étaient similaires ou non. En d'autres termes, les mécanismes régissant la distribution spatiale des champignons de l'écorce, *i.e.*, croissance des hyphes ou dispersion de (dia)spores, sont difficilement étudiables ici. Toutefois, nous pouvons apporter un point d'éclairage grâce à l'étude des communautés fongiques de l'écorce de l'arbre F dans l'**Article II**. Celui-ci est constitué de deux branches parallèles et proches l'une de l'autre ($< 20\text{ cm}$). De manière surprenante, les communautés fongiques colonisant ces deux branches étaient différentes entre elles (visible par exemple sur la Fig. 6 de cet article, ainsi que via des analyses non publiées). Cela suggère que la majeure partie des champignons de l'écorce sporulent peu (ou à très faible distance ; Galante *et al.*, 2011) et se dispersent davantage, à faible distance, par croissance mycélienne. Concernant les champignons mycorhiziens d'orchidées, cela suggère une limite dispersive à faible distance sur l'écorce.

Dans l'étude de Cook *et al.*, (2022), les auteurs ne précisent pas la présence d'éventuelles plantes épiphytes, dont des orchidées, sur l'écorce des arbres étudiés. Dans les **Articles I et II** de ce manuscrit, nous avons mis en évidence l'importance de la présence des racines de ces plantes dans la structuration des communautés fongiques de l'écorce, en particulier celle des rhizoctonias. En effet, les mesures d'évolution des distances écologiques en fonction des distances spatiales (en anglais, *distance decay of similarity*) entre les racines d'orchidées et les points d'écorce voisins ont, dans chaque système étudié, révélé la prévalence des rhizoctonias à proximité de leur plante hôte. Néanmoins, il est nécessaire de noter que nos échantillonnages se sont centrés autour d'orchidées épiphytes, biaisant possiblement nos conclusions. De futures études seront nécessaires pour déterminer la structure spatiale des communautés épiphytes de rhizoctonias sur des écorces d'arbres dépourvues d'orchidées épiphytes (voir également partie 9.3.5).

9.2.3. Comment se nourrissent les rhizoctonias sur l'écorce ?

La détection fréquente, dans nos travaux et dans la littérature récente (Izuddin *et al.*, 2019; Cook *et al.*, 2022; Zarza *et al.*, 2022), de rhizoctonias sur l'écorce confirme leur capacité à croître sur ce substrat, et donc potentiellement à s'en nourrir. On connaît depuis de nombreuses années la capacité des rhizoctonias à dégrader la matière organique végétale, notamment la cellulose (ex : Otero *et al.*, 2004). Toutefois, les capacités enzymatiques de ces champignons n'ont été que très peu étudiées jusqu'ici, contrairement à celles des champignons ectomycorhiziens. Des études génomiques récentes suggèrent que trois rhizoctonias (appartenant aux trois familles) associés à des orchidées terrestres présentent en effet de fortes capacités de dégradation de la cellulose, mais pas de la lignine (Kohler *et al.*, 2015; Miyauchi *et al.*, 2020). Pourtant, l'écorce de certains arbres pourraient être enrichie en lignine par rapport à la litière du sol, plus riche en cellulose. D'autre part, Izuddin *et al.*, (2019) ont montré que les champignons mycorhiziens d'orchidées pourraient être favorisés par l'accumulation d'humus à certains microsites. Ces champignons sont-ils capables de dégrader l'écorce des arbres, ou sont-ils contraints de se nourrir des débris végétaux (cellulose, lignine etc.) ou animaux (chitine notamment) s'accumulant sur l'écorce de manière éparsée ou localisée dans certains microsites (au contact de racines épiphytes notamment) ? En d'autres termes, ces champignons (et donc potentiellement et indirectement, leurs plantes hôtes) subissent-ils la loi des environnements épiphytes soumis à des pulses plutôt qu'à un apport continu de nutriments (Zotz, 2016) ou, à l'inverse, leurs capacités de dégradation leur assurent-elles un apport nutritionnel stable dans le temps (Figure 20) ?

Des études comparatives de génomes de souches de champignons mycorhiziens épiphytes et terrestres pourraient permettre d'améliorer nos connaissances sur la diversité des répertoires enzymatiques de ces champignons rhizoctonias. De plus, elles pourraient apporter des éléments explicatifs sur la capacité de certains champignons à coloniser à la fois le sol (en profondeur, mais aussi la litière en surface ou les rochers) et l'écorce des arbres (voir par exemple un membre des Ceratobasidiaceae chez la vanille ; Article IV) tandis que d'autres sont restreints à l'un de ces deux milieux uniquement.

De manière alternative, il a été proposé que certains rhizoctonias pourraient être parasites des arbres sur lesquels ils poussent (Leake & Cameron, 2012 ; mais voir aussi Benzing, 1979). Cette hypothèse n'a été testée qu'une seule fois par Eskov *et al.*, (2020) qui ont montré à l'aide d'un marquage ¹³C de la photosynthèse des arbres hôtes que ce carbone n'était pas transmis aux orchidées épiphytes qu'ils portent, sur des temps très courts cependant (jusqu'à 12 jours post-marquage). Toutefois, aucune expérience sur le temps long, ni aucun marquage d'autres isotopes (ex : ¹⁵N de la sève de l'arbre) n'ont été réalisés. En outre, l'hypothèse d'un parasitisme de l'arbre par les rhizoctonias va à l'encontre de résultats récents montrant que les champignons de l'écorce sont situés davantage dans l'écorce externe que dans l'écorce interne (Cook *et al.*, 2022), ce qui

suggère qu'ils n'ont pas accès aux tissus vasculaires de l'arbre hôte, au moins dans les systèmes déjà étudiés.

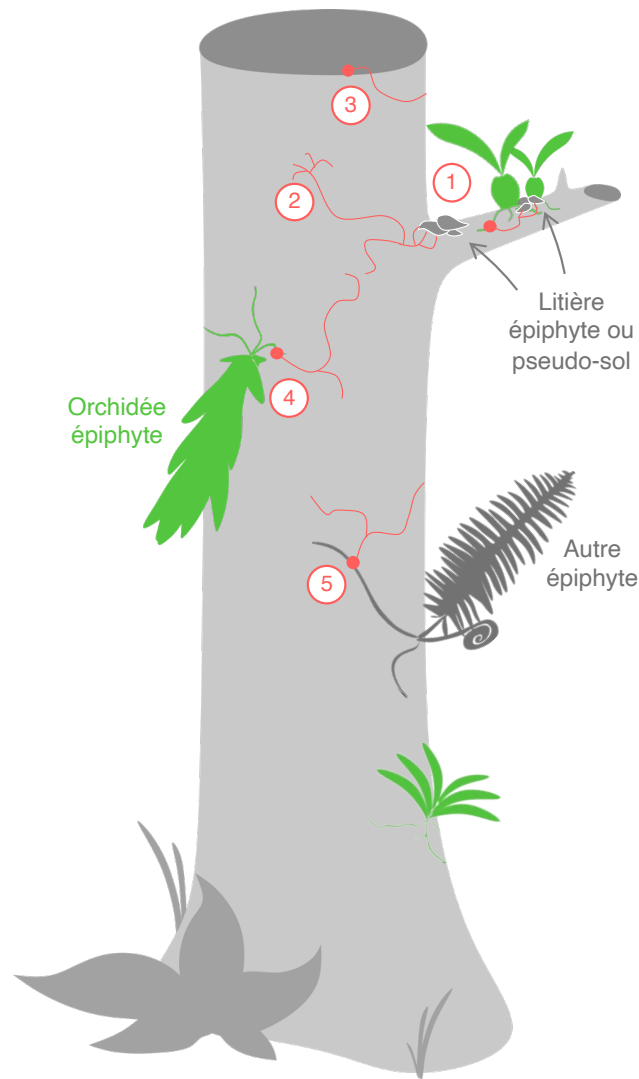


Figure 20 Niches potentielles des rhizotomias sur l'écorce. (1) Rhizotomias colonisant et dégradant la litière épiphyte, riche en matière organique, mais souvent éphémère. L'implantation de celle-ci peut être favorisée par la présence de plantes épiphytes (droite) ou par l'architecture de l'arbre hôte (gauche). (2) Rhizotomias colonisant et dégradant l'écorce. (3) Rhizotomias parasite de l'arbre hôte, éventuellement de manière superficielle. (4-5) Rhizotomias colonisant les racines de plantes épiphytes et y absorbant une partie de leurs nutriments.

Plus généralement, la question de l'importance des champignons mycorhiziens dans le cycle de vie des orchidées épiphytes peut se poser. En effet les embryons de nombreuses espèces épiphytes (sous famille des Epidendroideae) multipliés *in vitro* deviennent rapidement verts au cours de leur développement, suggérant une phase d'hétérotrophie initiale plus courte (mais pas absente puisque les graines sont non-chlorophylliennes) que chez les orchidées terrestres tubéreuses (sous-famille des Orchidoideae). Pourtant, ces embryons chlorophylliens pourraient tout de même dépendre des champignons pour d'autres nutriments comme l'azote ou le phosphore (par exemple, *Bulbophyllum variegatum* dont le taux de croissance *in vitro* est très faible en l'absence de champignon mycorhizien compatible ; voir **Article III**). De futurs marquages de l'écorce aux isotopes stables (ex : ^{15}N) seront nécessaires afin de mettre en évidence l'importance des champignons mycorhiziens dans la nutrition de leurs orchidées épiphytes hôtes. Concernant le carbone, de nombreuses espèces d'orchidées épiphytes présentent une signature $\delta^{13}\text{C}$ spécifique d'un métabolisme CAM (c'est-à-dire un enrichissement en ^{13}C par rapport aux plantes en C3 ; exemple *Aeranthus arachnites*, **Figure A7.1**, page 154 ; [Winter et al., 1983](#)), et celle-ci pourraient dans certains cas masquer une éventuelle origine fongique du carbone de la plante (le carbone d'origine fongique étant lui-même enrichi en ^{13}C par rapport au carbone issu de la photosynthèse ; [Eskov et al., 2020](#)). Durant la thèse, nous avons testé, puis réfuté, cette hypothèse dans le cas de *B. variegatum* qui apparaît comme une orchidée C3, ce qui est cohérent avec la présence de cette orchidée dans les niches épiphytes du sous-bois ombragé (**Figure A7.1**). A l'avenir de plus amples travaux seront nécessaires pour répondre à la question suivante¹ : les orchidées épiphytes adaptées au sous-bois, ou celles adaptées à des niches épiphytes plus exposées en sommet de canopée, sont-elles dépendantes de leurs champignons au moins durant les premiers stades du cycle de vie ?

9.2.4. Vers une nouvelle niche des rhizoctonias dans l'environnement épiphyte

Outre la capacité des rhizoctonias à coloniser l'écorce des arbres, cette thèse a également permis de mettre en évidence la capacité de ces champignons à coloniser des racines de plantes épiphytes non-orchidées (voir Annexes de l'**Article II** et **Figure 20**). Dans cette étude, pour chaque arbre étudié (uniquement les arbres numérotés B à F), 2/10, 4/6, 6/16, 8/12 et 4/9 des racines de plantes non-orchidées prélevées ont présenté une colonisation par des rhizoctonias (Tulasnellaceae et Serendipitaceae), soit en moyenne 53% des racines investiguées. Cette colonisation a concerné à la fois des racines de fougères épiphytes (ex : *Grammitis obtusa*), des racines de Pipéracées (*Piper borbonense*), ou des racines d'épiphytes facultatifs enracinés ici dans un pseudo-sol au sein d'un renforcement de l'écorce (*Clidemia hirta*, Melastomatacées ;

¹ Voir également partie 9.3 ci-dessous

Figure 21). Les structures formées par ces champignons dans les racines n'ont pas encore été étudiées, mais il est probable que ceux-ci soient seulement endophytes dans les racines, c'est-à-dire qu'ils n'y forment pas de symptôme ni de structure particulière (Wilson, 1995). Cette niche potentielle des rhizoctonias reste à ce jour encore peu explorée, mais vient compléter en milieu épiphyte des observations déjà effectuées chez ces champignons en milieu terrestre (Girlanda *et al.*, 2011; Selosse *et al.*, 2022) ainsi que chez d'autres types de champignons mycorhiziens (des ectomycorhiziens comme la Truffe, *Tuber melanosporum*) en milieu terrestre également (Schneider-Maunoury *et al.*, 2018). Pour les champignons mycorhiziens, les racines de plantes non-orchidées pourraient constituer un refuge, voire une source nutritive supplémentaire. De plus, des transferts de molécules (nutritives ou non) de plantes non-orchidées vers des orchidées via ces filaments mycéliens ne sont pas à exclure (voir partie 9.3.4). A l'inverse, il pourrait s'agir d'une colonisation précoce des racines avant que celles-ci ne meurent et ne se fasse dégrader par ces champignons alors déjà en place et donc compétitifs vis-à-vis de saprophytes plus efficaces.

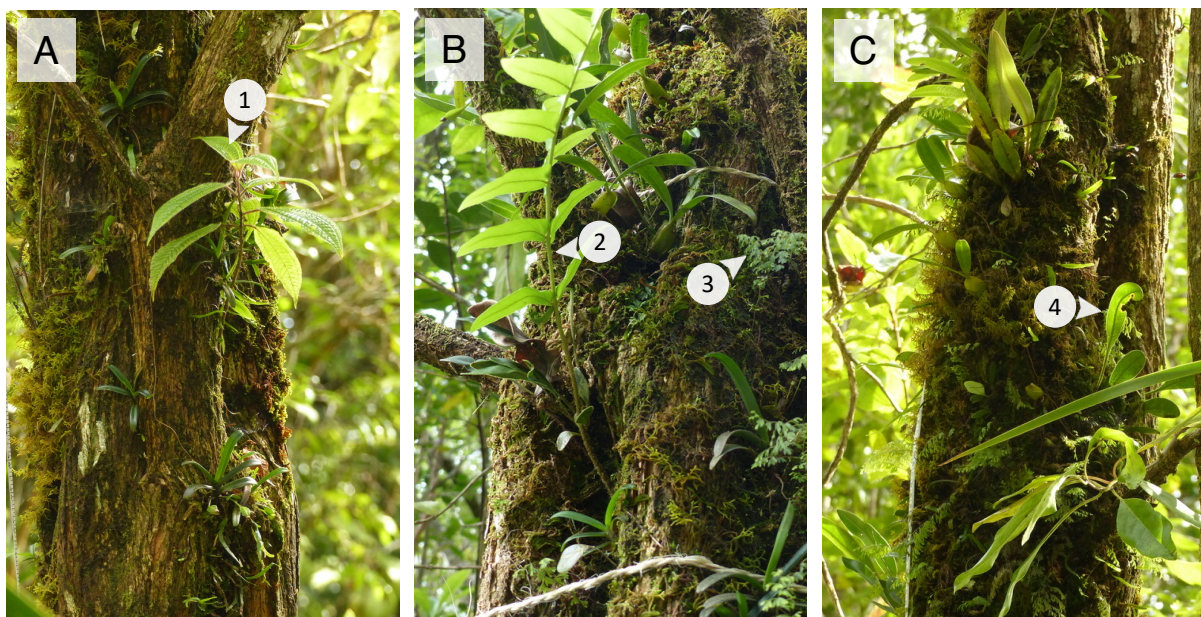


Figure 21 Proximité spatiale entre des orchidées épiphytes et d'autres plantes épiphytes. (A) Colonie de l'orchidée *Angraecum cucullatum* proches de (1) *Clidemia hirta* (Melastomataceae). (B) Colonies de *A. cucullatum* et *Bulbophyllum prismaticum* proches de (2) *Nephrolepis bicerata* et (3) *Hymenophyllaceae* sp. (C) Colonie de *B. prismaticum* proche de *Elaphoglossum* sp. Arbres hôtes : *Nuxia verticillata*. Site : forêt humide de basse altitude, Mare Longue, La Réunion. Photographies : R. Petrolli.

9.2.5. Quelle dynamique temporelle des rhizoctonias en milieu épiphyte ?

9.2.5.a Dynamique successive

Dans l'**Article III** de ce manuscrit, nous avons entrevu, via une approche synchronique, la dynamique temporelle des communautés mycorhiziennes de l'orchidée épiphyte *Bulbophyllum variegatum*. Nous avons montré que deux partenaires mycorhiziens étaient préférentiellement liés aux stades de croissance précoces de l'orchidée, tandis qu'un troisième intervenait davantage aux stades de croissance plus avancés. L'évolution des communautés mycorhiziennes au cours du développement des orchidées a déjà été documentée à plusieurs reprises (Ventre Lespiaucq *et al.*, 2021). Toutefois, il serait intéressant de relier cette évolution des communautés racinaires avec celles des communautés de l'écorce, dans le cadre d'une dynamique de succession écologique (Rasmussen & Rasmussen, 2018).

Dans notre étude menée sur *B. variegatum*, nous avons prélevé des racines d'individus poussant sur des arbres de différents diamètres, mais ces derniers n'ont pas influencé de manière significative les communautés fongiques racinaires de l'orchidée. Toutefois, tous ces arbres étaient de large diamètre, et probablement tous âgés de plusieurs centaines d'années (ils constituent les arbres pionniers de la forêt étudiée, âgée de 400 ans environ). Pourtant, les communautés fongiques de l'écorce, notamment celles des rhizoctonias, pourraient être amenées à évoluer au cours de la croissance des arbres hôtes, de manière similaire à celle des communautés mycorhiziennes du sol évoluant lors des successions écologiques (ex : Nara *et al.*, 2003; Oehl *et al.*, 2011; Blaali *et al.*, 2012). Le cas d'*A. salicifolia* est un cas d'intérêt² puisque cette espèce pionnière germe en milieu ouvert en début de succession primaire (coulées de lave à La Réunion) : son écorce, encore jeune et non terrigène, accueille-t-elle alors déjà les champignons mycorhiziens propices à la croissance de *B. variegatum* ?

Dans un article paru en 2013, Chagnon *et al.*, transposent les stratégies compétitives (C), d'adaptation aux stress (S) et rudérales (R) proposées par Grime (1979), à celles de champignons endomycorhiziens arbusculaires. Ils montrent que certains de ces champignons pourraient adopter l'une ou l'autre de ces stratégies, expliquant leur prévalence dans certains écosystèmes. Par exemple, des champignons endomycorhiziens arbusculaires à stratégie C optimiseraient la captation de carbone issu de la plante hôte, lui fournissant en retour un bon apport en éléments minéraux issus d'une bonne exploration de l'environnement (Chagnon *et al.*, 2013). Chez les orchidées, cette stratégie pourrait être retrouvée chez des champignons colonisant des plantes adultes photosynthétiques (*i.e.*, pouvant leur fournir du carbone), tandis que des stratégies S

² Malheureusement difficilement étudiable pour les raisons évoquées dans l'**Encadré 8**.

seraient davantage attendues chez des champignons intervenant aux stades précoces, non chlorophylliens, du développement de la plante.

Toutefois, à l'inverse des champignons endomycorhiziens arbusculaires, les champignons mycorhiziens d'orchidées devraient être capables de vivre à l'état libre sur l'écorce. Cela soulève notamment les questions suivantes : les stratégies écologiques des communautés fongiques de l'écorce évoluent-elles au cours de la croissance de l'arbre, et existe-t-il un lien entre l'évolution de ces communautés et la probabilité de germination des graines d'orchidées d'une espèce donnée sur cette écorce ?

Dans l'**Article III** de ce manuscrit, les trois champignons mycorhiziens de *B. variegatum* ont été retrouvés dans des racines d'individus colonisant des arbres âgés, mais leur capacité à coloniser les écorces n'a pas encore pu être étudiée. Nous pouvons émettre l'hypothèse ici que l'OTU1 (Tulasnellaceae) de cette étude, retrouvé essentiellement dans des racines de plantes adultes (stratégie C), est capable de coloniser activement l'écorce d'*A. salicifolia*, notamment celle des arbres âgés. A l'inverse, les OTU2 et OTU3 (respectivement Serendipitaceae et Tulasnellaceae) pourraient être davantage présents sur des écorces jeunes (mais pas absents d'écorces plus âgées, comme montré au site de Langevin par exemple).

De manière plus générale, l'évolution des cortèges mycorhiziens de certaines écorces pourraient expliquer, au moins en partie, les dynamiques successives (Woods, 2017) des plantes épiphytes qui s'y trouvent (et/ou inversement, voir partie 9.3.3). Il serait notamment intéressant d'étudier ces dynamiques sur différentes espèces d'arbres, afin de tester l'effet éventuel du type d'écorce sur la dynamique des champignons la colonisant (Rasmussen & Rasmussen, 2018). Dans l'**Article II**, nous avons montré des structures spatiales de communautés mycorhiziennes variables entre deux espèces d'arbres aux structures d'écorces très différentes (*Labourdonnaisia calophylloides* versus *N. verticillata*), et une telle tendance pourra être testée à plus large échelle et en considérant d'avantage d'espèces d'arbres.

9.2.5.b Dynamique saisonnière

La dynamique saisonnière des rhizoctonias épiphytes a été jusqu'ici peu étudiée. En 2014, Bertolini *et al.*, ont montré chez trois espèces d'orchidées épiphytes présentes au Mexique que le taux de colonisation des racines (en % de la zone du cortex racinaire colonisée) était bien supérieur en saison humide qu'en saison sèche. En particulier, les jeunes racines ayant émergée en fin de saison sèche étaient très peu colonisées, suggérant une quasi-absence et/ou dynamique des champignons mycorhiziens de l'écorce à cette période. En outre, ces résultats suggèrent que les champignons mycorhiziens d'orchidées peuvent survivre à la saison sèche à l'intérieur des racines (bien que leur taux de colonisation y soit alors faible), mais le rôle éventuel de celles-ci dans leur persistance dans l'environnement reste à ce jour totalement inconnu. Chez les

orchidées terrestres, une étude récente a également suggéré la possible persistance des rhizoctonias dans les racines ou autres parties de la plante hôte (Calevo *et al.*, 2021). Néanmoins, les comportements des rhizoctonias pourraient être différents selon les espèces considérées ou celles de leurs plantes hôtes, comme suggéré par (Bertolini *et al.*, 2014). De futurs travaux seront donc nécessaires pour mieux appréhender leur dynamique saisonnière, notamment via le spectre de la persistance des réseaux mycorhiziens épiphytes (voir partie 9.3.4) en saison sèche. Ces travaux pourraient être réalisés au sein de la forêt de Mare Longue, dont les communautés de rhizoctonias de l'écorce ont été (Article II), et sont encore en cours de description (analyse en cours).

9.3. Influences réciproques entre les partenaires symbiotiques

9.3.1. L'importance des données spatialisées

Lors des travaux réalisés durant la thèse, nous nous sommes attachés à déterminer la distribution spatiale des communautés fongiques épiphytes, autour des plantes épiphytes mais aussi entre les différentes espèces d'arbres. L'hétérogénéité spatiale des symbiotes, souvent non prise en compte ou réduite à un effet « site » dans la plupart des études (parfois à juste titre) est pourtant essentielle pour expliquer les patrons d'interactions observés entre les orchidées et leurs partenaires fongiques.

L'Article II a notamment mis en évidence l'importance de la composante spatiale pour expliquer (i) la structure des réseaux d'interactions bipartites ou encore (ii) la spécificité mycorhizienne de certaines orchidées. Dans le premier cas (i), la modularité et l'anti-emboîtement (*anti-nestedness* en anglais) significatifs observés sur chacun des six arbres étudiés résultaient en partie de l'hétérogénéité spatiale des communautés fongiques mycorhiziennes sur l'écorce, certains champignons interagissant avec différents hôtes proches spatialement, créant des modules d'interactions. Dans le second cas (ii), les mécanismes de spécificité mycorhizienne pourraient être en partie expliqués par la structure spatiale des champignons mycorhiziens de l'écorce. L'orchidée *Beclardia macrostachya*, par exemple, semble capable de sélectionner ses partenaires mycorhiziens, témoignant ainsi d'une forte fidélité pour un Ceratobasidiaceae. À l'inverse, des orchidées spatialement proches de *B. macrostachya* dans notre étude comme plusieurs individus d'*Angraecum cucullatum*, se sont retrouvées associées à ce champignon sur cet arbre probablement du fait de sa présence sur l'écorce voisine. Ainsi, notre étude spatialisée nous permet de suggérer que certaines espèces d'orchidées sont capable de filtrer et de sélectionner les

champignons mycorhiziens de l'écorce tandis que d'autres, plus opportunistes, interagissent avec ceux déjà présents sur l'écorce.

L'analyse spatiale permet ainsi d'apporter des éléments de compréhension à l'existence de certaines interactions. Dans le modèle proposé par [Shefferson et al., \(2019\)](#), les orchidées seraient, au moins pour les espèces étudiées, des « généralistes apparents », c'est-à-dire qu'en plus d'interagir de manière spécifique avec un nombre réduit de champignons mycorhiziens, elle établiraient également des interactions peu spécifiques et moins constantes avec d'autres champignons. Ces interactions peu spécifiques pourraient s'expliquer en partie par la disponibilité des champignons mycorhiziens dans l'environnement, c'est-à-dire par leur distribution spatiale, et non par des processus de sélection active des partenaires mycorhiziens.

9.3.2. L'influence des rhizoctonias sur la germination des graines à proximité des adultes

Nos travaux menés au Brésil (**Article I**) puis à La Réunion (**Article II**) ont tous deux mis en évidence l'existence d'une zone d'influence des racines d'orchidées épiphytes sur les communautés fongiques de l'écorce, en particulier sur les rhizoctonias. En partant de la définition d'une rhizosphère comme étant « une zone d'influence des racines », nous avons ainsi mis en évidence l'existence, et introduit le terme de « rhizosphère épiphyte » qui, bien qu'attendue, n'avait jusque-là jamais été démontrée. D'autres termes ont été précédemment introduits afin de décrire la zone rhizosphérique liée aux champignons mycorhiziens comme la mycorhizosphère (= zone sous l'influence des racines mycorhizées) ou l'hyphosphère (= zone sous l'influence des hyphes mycorhiziens extra-racinaires ; [Prescott & Grayston, 2013](#)). Néanmoins, ces notions étant peu utilisées et difficilement discernables de la première, il me semble plus simple, et tout aussi juste, de s'en tenir à la notion de rhizosphère épiphyte. De futurs travaux seront nécessaires afin de vérifier si cette dernière existe aussi chez les autres microorganismes de l'écorce (bactéries, archées, etc.).

Outre les aspects liés à sa nomination, on peut légitimement se questionner sur ses rôles dans les écosystèmes épiphytes, et notamment : quels peuvent-être les effets de la rhizosphère épiphyte sur la dynamique des plantes épiphytes mycorhiziennes ?

Comme vu en introduction (voir **Figure 11**) les partenaires mycorhiziens des orchidées de prairies sont plus fréquents et abondants dans le sol à proximité des racines de ces dernières. Cette distribution agrégée entraîne une augmentation de la probabilité de germination des graines d'orchidées à proximité des orchidées adultes, conduisant à la mise en place de patchs d'orchidées

à l'échelle de la prairie (Jacquemyn *et al.*, 2007, 2012a). Ce mécanisme de facilitation peut-il également avoir lieu en milieu épiphyte ?

Tout d'abord, dans le sol, les distances d'autocorrélation spatiale des communautés fongiques mycorhiziennes d'orchidées pourraient être plus importantes (jusqu'à 2m ; Voyron *et al.*, 2017) que celles observées sur l'écorce (< 1m, voir ci-dessus), suggérant une colonisation du sol par les mycorhiziens d'orchidées sur des distances plus élevées. Pourtant, dans les travaux de Voyron *et al.*, (2017), certains champignons colonisant les racines n'ont pas été retrouvés dans le sol adjacent, un résultat également mis en évidence dans d'autres types de sols (Egidi *et al.*, 2018). À l'inverse, nous avons éprouvé peu de difficultés à détecter les champignons mycorhiziens présents dans les racines d'orchidées sur l'écorce adjacente. Aussi, il est possible que malgré des distances couvertes plus faibles, les champignons mycorhiziens de l'écorce y soient présents de manière plus dense (peut-être due à la faible épaisseur du substrat « écorce » comparé au sol qui, lui, est composé de plusieurs horizons ; Bahram *et al.*, 2015), même si des mesures d'abondance (par exemple par qPCR) seraient nécessaires afin de tester cette hypothèse. Ainsi, il serait légitime de s'attendre à une favorisation de la germination des graines d'orchidées à proximité des plantes épiphytes adultes au moins aussi importante que celle observée dans le sol (Jacquemyn *et al.*, 2012).

Il existe à ma connaissance deux études ayant abordé ces questions en milieu épiphyte. En 2013, Kartzinel *et al.*, ont étudié la probabilité de germination des graines de l'orchidée épiphyte *Epidendrum firmum* au contact ou à 20-50 cm des racines de plantes adultes de la même espèce, sans trouver de différence significative dans les taux de germination à ces deux distances (germinations identiques à proximité ou à 20-50 cm des racines). Néanmoins, des distances supérieures à 50 cm n'ont pas été testées. Dans une seconde étude plus récente, Yang *et al.*, (2017) ont montré que les graines de l'orchidée épiphyte *Dendrobium sinense* germaient d'autant mieux qu'elles étaient situées proches des individus adultes, avec un optimum de germination compris entre 0 et 30-40cm à distance des racines, et une nette diminution au-delà de 50 cm. L'ensemble des résultats présentés jusqu'ici semblent donc cohérents avec une augmentation de la probabilité de germination des graines d'orchidées épiphytes à proximité des adultes (*i.e.*, dans la rhizosphère épiphyte, entre 0 et ~ 0.5m des racines adultes), de manière comparable au phénomène observé dans le sol (Figure 22).

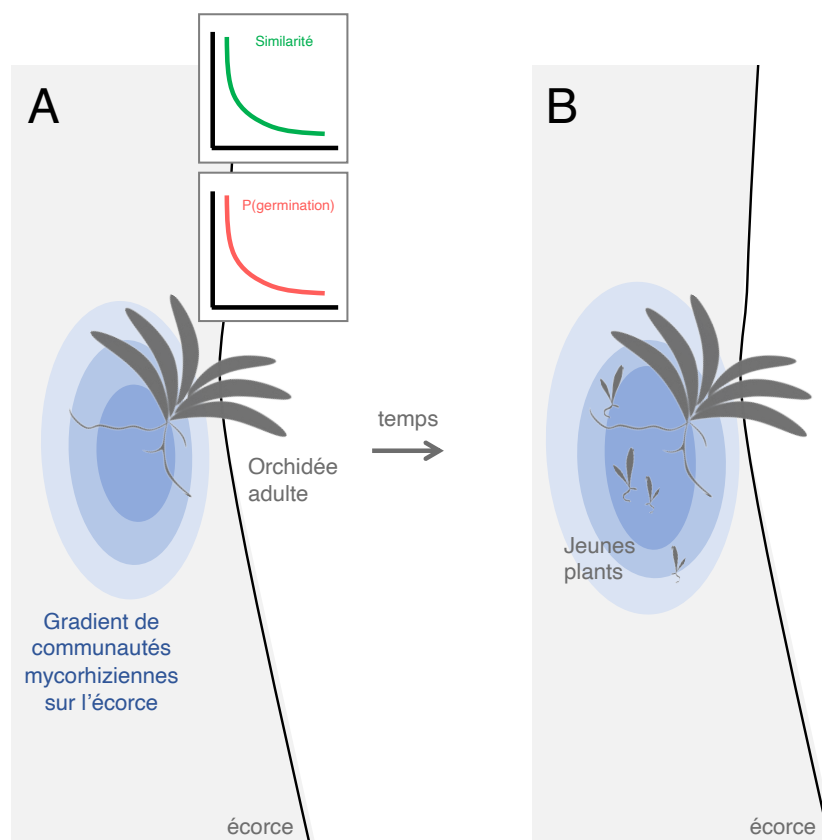


Figure 22 Dynamique d'une population d'orchidées épiphytes sur une écorce d'arbre. (A) Les communautés mycorrhiziennes (en bleu) sont localisées à proximité des plantes adultes. La probabilité de germination des graines est d'autant plus élevée que l'abondance relative en champignons mycorrhiziens compatibles est élevée. (B) Cela conduit à la germination de jeunes plants à proximité des adultes sur un même arbre, pouvant appartenir ou non à la même espèce d'orchidée.

9.3.3. Les orchidées peuvent-elles influencer en retour la distribution de leurs partenaires fongiques ?

Si l'existence d'une rhizosphère épiphyte semble avérée, la question de sa mise en place reste, elle, en suspend. Le champignon réparti sous la forme d'un patch sur l'écorce était-il présent avant la germination des graines d'orchidées qui, une fois germées, se sont établies dans sa zone d'influence ? Ou à l'inverse, la germination d'une graine d'orchidée avec un champignon spatialement limité sur l'écorce a-t-elle favorisé sa persistance et sa croissance sur ce substrat, favorisant par la suite la germination de nouvelles graines ?

Ces interrogations peuvent être reformulées de la manière suivante : les orchidées peuvent-elles influencer en retour la distribution de leurs symbiotes fongiques ? Cette question, bien que posée par différents auteurs (McCormick & Jacquemyn, 2014; Waud *et al.*, 2016a; Li *et al.*, 2021a), est restée jusqu'ici peu étudiée. En effet, il s'agit ici de s'éloigner de la considération phylo-centrée de la symbiose mycorrhizienne pour considérer un éventuel bénéfice de la symbiose pour la survie du champignon.

Pour tenter de répondre à cette question, il serait par exemple possible d'étudier la distribution spatiale des champignons mycorhiziens sur des écorces d'arbres dépourvues d'orchidées, puis de semer des graines sur ces écorces, pour enfin observer, ou non, une croissance et/ou une implantation desdits champignons mycorhiziens. Cependant, une telle étude serait rendue compliquée par la perturbation induite lors du premier échantillonnage, qui pourrait modifier les communautés fongiques de manière artificielle sur l'écorce.

En l'absence de tels travaux en milieu épiphyte, retournons plus près du sol, pour nous intéresser à une récente étude menée par [McCormick et al. \(2021\)](#). Les auteurs de cette étude se sont intéressés à la colonisation mycorhizienne de l'orchidée terrestre *Tipularia discolor*. Cette orchidée de sous-bois germe toujours sur du bois en décomposition, mais des adultes sont retrouvés sur le sol, même en l'absence de bois mort (et donc probablement après sa décomposition complète). À la germination, les graines de cette espèce reposent sur la présence d'un champignon qui est – logiquement – retrouvé plus abondant dans le bois mort en décomposition que dans le sol alentour. Cependant, ce champignon est parfois maintenu dans les racines des plantes adultes, et ce indépendamment de la présence, ou non, de bois mort. Aussi, les auteurs suggèrent que la plante pourrait favoriser la persistance du champignon dans le sol (après décomposition du bois) en offrant un abri racinaire à ce dernier. Cet exemple est, à ma connaissance, le seul argument tangible à une favorisation des champignons mycorhiziens d'orchidées par la plante.

Dans l'**Article II** de ce manuscrit, l'OTU CER4 (Ceratobasidiaceae) a été retrouvé uniquement sur l'écorce des arbres colonisés par l'orchidée *B. macrostachya* (associée à ce champignon sur toute son aire de distribution sur l'île ; [Martos et al., 2012](#)), et uniquement dans les racines d'orchidées spatialement proches de cette dernière. Cette observation suggère que *B. macrostachya* est capable de stabiliser la présence de ce champignon mycorhizien sur l'écorce, bien que de plus amples travaux soient nécessaires pour le prouver.

9.3.4. Vers des réseaux mycorhiziens communs et des phénomènes de facilitation en environnements épiphytes

Dans l'**Article II**, nous avons également mis en évidence la présence d'un même champignon (*i.e.*, d'un même haplotype de Ceratobasidiaceae) dans les racines d'orchidées adultes (*Beclardia macrostachya*, *Angraecum ramosum*) et dans certaines plantules et certains protocormes de l'espèce *A. cucullatum*, spatialement proches (< 50 cm). Les graines ainsi germées ont probablement bénéficié d'un apport nutritif de la part de ce champignon, mais la source initiale de ces nutriments reste, elle, encore inconnue. Ceux-ci pourraient provenir (i) de la dégradation de molécules organiques par le mycélium saprotrophe (ex : de l'écorce environnante, voir 9.2.3), mais également (ii) de flux de nutriments carbonés des orchidées adultes vers les graines au cours

de la germination, via un mycélium symbiotique partagé. Dans ce second cas, nous aurions affaire à un réseau mycorhizien commun (CMN) dans sa version épiphyte.

L'importance écologique de tels réseaux a plusieurs fois été remise en question (mais voir [Hoeksema, 2015](#)). Toutefois, le cas des orchidées semble à part. Tout d'abord, il est largement admis que la nutrition de la plupart des orchidées mycohétérotrophes repose sur ces CMNs, puisque les espèces associées à des champignons eux-mêmes ectomycorhiziens d'arbres voisins tirent leur carbone de ces arbres, via leurs champignons partagés. De plus, étant donné l'existence d'une phase de mycohétérotrophie initiale chez la majorité des orchidées, de tels réseaux pourraient en réalité concerner la plupart des espèces de cette famille.

Chez les orchidées épiphytes, il a souvent été considéré que les protocormes, plus rapidement chlorophylliens que ceux des orchidées géophytes, sont moins dépendants de leurs associations fongiques mycorhiziennes. Cependant, plusieurs études montrent que certaines espèces au moins dépendent d'un apport nutritionnel d'origine fongique (e.g., [Zettler et al., 1998](#)). De plus, de nombreuses orchidées épiphytes sont aphyllées (ex : *Taeniophyllum glandulosum*, [Rammitu et al., 2019](#), ou *Dendrophylax lindenii*, [Mújica et al., 2018](#)), et la chlorophylle contenue dans les racines pourrait ne pas suffire à assurer une nutrition carbonée suffisante pour assurer un cycle de vie complet de ces espèces. Par ailleurs, outre le carbone *a priori* peu limitant pour des organismes photosynthétiques, l'eau, ainsi que l'azote et le phosphore pourraient être limitants en particulier dans les environnements épiphytes ([Zotz, 2016](#)).

D'avantages de travaux seront nécessaires pour identifier la source du carbone fongique, notamment via des marquages au ^{13}C et au ^{15}N de l'écorce (par exemple en fournissant aux champignons des morceaux d'écorce artificiellement enrichis en isotopes lourds) ou au ^{13}C de la photosynthèse des orchidées adultes. En plus de la détection d'éventuels flux, il sera nécessaire de tester la réponse (biomasse, vitesse de croissance, survie etc.) de jeunes plantules en autorisant ou non l'accès au réseau mycorhizien (par exemple en isolant *in situ* une partie de l'écorce grâce à des cylindres hermétiques, coupant les filaments fongiques du reste du réseau) à proximité d'individus adultes (voir [Hoeksema, 2015](#)).

Dans le cas d'un flux nutritionnel des orchidées adultes vers les graines via un champignon symbiotique commun (i.e., CMN fonctionnel), comme dans le cas d'une nutrition des graines entièrement assurée par un champignon saprophyte lui-même favorisé sur l'écorce par l'interaction avec des plantes adultes voisines (sans CMN), il semble qu'un phénomène de facilitation puisse avoir lieu en milieu épiphyte, de manière similaire à celui observé dans le sol en prairie tempérée.

Enfin, les réseaux épiphytes pourraient également inclure des plantes non-orchidées. Des travaux préliminaires menés en 2008 par [Kottke et al.](#), ont montré que les orchidées épiphytes ne

partageaient pas de champignons mycorhiziens avec les hépatiques ou les Éricacées, mais ces dernières étaient terrestres, enracinées au sol, et non situées à proximité des orchidées. Dans l'Article III, nous avons mis en évidence un partage de champignons rhizoctonias entre plantes orchidées et non-orchidées voisines, et bien que chez ces dernières, la colonisation fongique soit probablement endophyte (sans interface d'échanges particulière), des flux de nutriments entre ces plantes ne sont pas à exclure et mériteraient d'être testés.

9.3.5. Les rhizoctonias peuvent-ils influencer la distribution spatiale de leur hôte à l'échelle de la forêt ?

Comme la plupart des plantes épiphytes, les orchidées ne sont pas réparties de manière homogène sur les arbres hôtes disponibles dans une forêt (Zotz, 2016). Toutefois, les préférences d'hôtes observées sont généralement peu marquées ou trouvent leur explication dans des biais statistiques (diamètre ou taux de croissance de l'arbre modulant la probabilité d'une graine d'atterrir puis de germer sur le tronc ; Wagner & Zotz, 2020) mais également dans des processus physico-chimiques (structure ou composition chimique de l'écorce par exemple ; Wagner *et al.*, 2015). Dans certains cas, l'hypothèse d'un rôle des communautés fongiques mycorhiziennes pour expliquer la préférence d'hôte d'une orchidée épiphyte a été formulée, mais jamais démontrée (Gowland *et al.*, 2013; Pecoraro *et al.*, 2021).

Nous avons travaillé durant la thèse sur l'orchidée épiphyte *Bulbophyllum variegatum*, une espèce atypique puisqu'elle montre une forte préférence pour l'espèce d'arbre *Agarista salicifolia* à l'échelle de son aire de distribution à La Réunion (Lancaster, 2004). *B. variegatum* peut coloniser de manière très dense les troncs et les fourches d'*A. salicifolia* en zone de sous-bois, lesquels n'accueillent en comparaison qu'un nombre limité d'autres orchidées épiphytes. Ce cas de préférence d'hôte est particulièrement intéressant car il ne semble (*a priori*, voir ci-dessous) pas expliqué par des facteurs physiques, tels que la structure de l'écorce, ou statistiques, tels que le diamètre des arbres hôtes (Lancaster, 2004). En particulier, une autre espèce d'arbre localement abondante (*Nuxia verticillata*), au diamètre comparable à *A. salicifolia* dans la forêt étudiée, et à l'écorce présentant des caractéristiques similaires (bonne capacité de rétention d'eau, bien que non testée), n'accueille pas d'individus de *B. variegatum*. Pourtant, elle est par ailleurs colonisée par quasiment toutes les autres orchidées épiphytes de cette forêt (Lancaster, 2004). Un des objectifs de la thèse était d'étudier le rôle potentiel de la préférence mycorhizienne de *B. variegatum* sur ce biais de distribution entre les espèces d'arbres hôtes. Pour cela, nous avons entrepris (i) d'étudier la spécificité mycorhizienne de cette espèce à l'échelle de l'île de La Réunion ; puis (ii) d'étudier dans la population de la forêt de Mare-Longue la corrélation entre la distribution de l'orchidée sur *Agarista* et celle de ses champignons mycorhiziens sur les différents hôtes ligneux disponibles pour l'orchidée.

Les résultats présentés dans l'**Article III** mettent en évidence une forte spécificité mycorhizienne de cette orchidée épiphyte qui s'associe préférentiellement, et de manière quasi constante, à trois OTUs de champignons mycorhiziens (deux Tulasnellaceae et un Serendipitaceae). Ces champignons n'ont pas été retrouvés chez d'autres espèces d'orchidées de l'île par [Martos et al., \(2012\)](#), ouvrant la voie à une potentielle influence des communautés fongiques sur la distribution de *B. variegatum*.

Depuis, l'étude des communautés mycorhiziennes d'orchidées épiphytes de la forêt de Mare Longue sur 6 arbres hôtes (**Article II**) a révélé que seul l'un de ces champignons (l'OTU1, Tulasnellaceae) a été détecté dans les racines d'orchidées (3 espèces) toutes localisées sur une même zone du tronc de *N. verticillata*. Ni l'OTU2 (Serendipitaceae), ni l'OTU3 (Tulasnellaceae) n'ont été identifiés dans cette étude. Ces résultats préliminaires suggèrent que les OTUs associés aux stades de développement précoces (*i.e.*, OTU2 et OTU3) pourraient être distribués sur certaines espèces d'arbres uniquement, contraignant ainsi la distribution de leur hôte *B. variegatum*.

Pour le vérifier, il sera nécessaire de poursuivre cette étude en réalisant l'axe (ii), qui n'a malheureusement pas pu être finalisé dans l'échéance de la thèse. Pour cause, le séquençage d'un grand nombre d'échantillons provenant d'écorces de dizaines d'espèces d'arbres différentes s'est avéré techniquement plus compliqué que ceux réalisés à partir d'un nombre équivalent d'échantillons de racines d'orchidées épiphytes mycorhizées (présence de composés polyphénoliques suspectée). Toutefois, nous pouvons ici discuter brièvement des différents cas de figures que nous pourrions rencontrer lors de cette étude.

Dans une étude menée en 2013, [Gowland et al.](#), ont mis en évidence un lien entre spécificité mycorhizienne et préférence d'hôte chez les trois espèces d'orchidées épiphytes étudiées. Cependant, les analyses de cortèges fongiques se sont uniquement basées sur les champignons présents dans les racines (communautés déjà filtrées et sélectionnées par la plante), et non sur les communautés de champignons présentes sur les écorces, c'est-à-dire celles pouvant potentiellement contraindre la germination puis la croissance de l'orchidée (voir **Figure 22**). Dans notre étude en cours, nous avons fait le choix d'échantillonner également l'écorce d'arbres hôtes (*A. salicifolia*) et non-hôtes (12 autres espèces) de *B. variegatum*, afin de déterminer leur capacité à accueillir les champignons mycorhiziens de cette espèce. L'échantillonnage, spatialisé à l'échelle de la forêt et sur l'écorce, a été fait de manière à réduire au maximum un éventuel biais spatial dans la distribution de *B. variegatum* dans la forêt et/ou de ses champignons sur l'écorce (**Figure 23**).

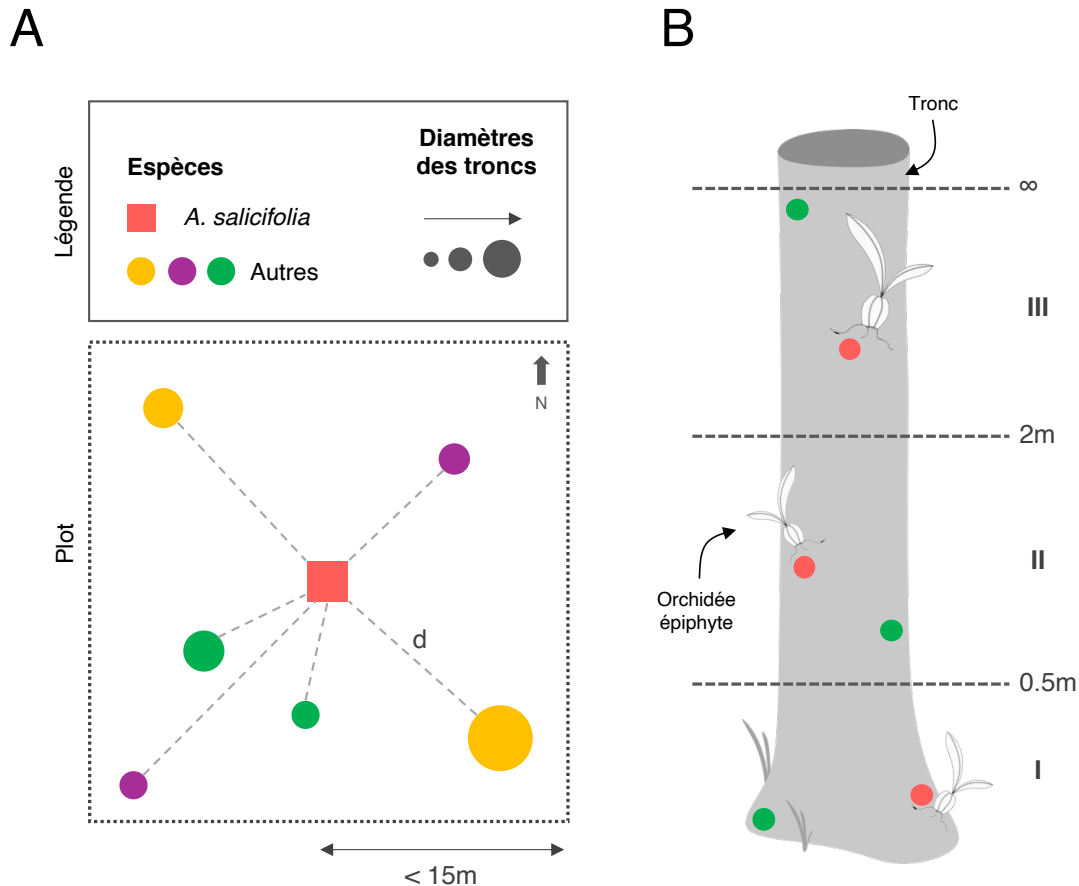


Figure 23 Plan d'échantillonnage des écorces d'arbres dans la forêt de Mare Longue, La Réunion. Au total, 15 plots répartis dans la forêt ont été échantillonnés et localisés spatialement au sein de cette forêt, correspondant à un total de 100 arbres et 601 échantillons. (A) Exemple de plot échantillonné. Chaque plot comporte un arbre central (*A. salicifolia*) lui-même échantillonné et autour duquel différents arbres appartenant à d'autres espèces, et de diamètre similaire ont également été échantillonnés. La distance (d) et la position de chacun de ces arbres par rapport à l'arbre central ont été mesurées. De cette manière, chaque arbre peut être localisé au sein de la forêt. (B) Schéma de prélèvement des écorces (ronds colorés) sur chaque arbre (*A. salicifolia* ou autre espèce). Les morceaux d'écorces ont été prélevés à trois hauteurs (zones) sur l'arbre (zone I, 0-0.5m ; zone II, 0.5-2m ; zone III, > 2m, et jusqu'à 5m). Dans chaque zone, deux morceaux d'écorces ont été prélevés, l'un à proximité (< 10 cm) des racines d'une orchidée épiphyte (*B. variegatum* sur *A. salicifolia* ou autre espèce sur les autres arbres ; zone rhizosphérique, ronds rouges), et l'autre le plus loin possible des racines d'orchidées épiphytes (> 30 cm, zone non-rhizosphérique, ronds verts).

Nous avons fait l'hypothèse de détecter ces champignons de manière très préférentielle sur l'écorce d'*A. salicifolia* par rapport aux autres espèces d'arbres, et ce même à distance d'individus de *B. variegatum* déjà enracinés sur l'écorce. Nous disposons par ailleurs de résultats préliminaires montrant que les OTUs mycorhiziens de *B. variegatum* pouvaient bien être amplifiés et séquencés à partir d'échantillons d'écorce d'*A. salicifolia*.

Si cette hypothèse est validée, il sera ensuite nécessaire de vérifier si ces champignons sont capables ou non de faire germer les graines de *B. variegatum* sur d'autres arbres, par exemple à

l'aide de semis expérimentaux *in situ* des graines de cette espèce pré-inoculées avec les souches fongiques d'intérêt. Dans le cas d'un rôle des communautés fongiques de *B. variegatum* dans sa préférence d'hôte, l'on s'attend à une germination symbiotique des graines sur *A. salicifolia* mais pas sur d'autres espèces arbres.

Dans le cas où notre hypothèse de départ ne serait pas validée, il nous faudrait sans doute considérer en plus des variables chimiques et/ou physiques pour expliquer ce biais de distribution de *B. variegatum* sur l'île de La Réunion. *A. salicifolia* présente une écorce spongieuse qui pourrait offrir un environnement favorable à la germination de *B. variegatum*, comme documenté chez d'autres espèces (Zarate-García *et al.*, 2020). Toutefois, d'autres arbres poussant aux mêmes sites et accueillant une forte diversité d'orchidées épiphytes mais pas *B. variegatum* (e.g., *N. verticillata*), semblent présenter une écorce aux capacités de rétention d'eau similaires, bien que des mesures soient nécessaires pour quantifier ces tendances. Plus probablement, *A. salicifolia* présente une écorce au pH faible (pH < 4.5, observation personnelle) qui pourrait expliquer au moins en partie ce biais de distribution de l'orchidée et/ou de ses champignons (Pecoraro *et al.*, 2021). De même, son écorce réputée toxique (Nganou *et al.*, 2018) pourrait inhiber, de manière préférentielle, la germination de la plupart des espèces d'orchidées (Frei & Dodson, 1972) mais pas de *B. variegatum* (inhibition potentiellement médiée par les partenaires fongiques).

En conclusion, la question de l'influence des communautés mycorhiziennes sur la distribution des orchidées épiphytes à l'échelle d'une forêt reste encore largement en suspens. Le cas de *B. variegatum* étudié dans le cadre de cette thèse offre une excellente opportunité d'en comprendre davantage sur les mécanismes impliqués, qui sont probablement d'ordre multifactoriel, incluant des facteurs abiotiques en plus des facteurs biotiques testés. D'un point de vue plus général, le second volet de cette étude (axe ii ci-dessus) permettra de mieux comprendre la distribution des champignons mycorhiziens d'orchidées entre les écorces d'arbres tropicaux, y compris en l'absence d'orchidées. Si ceux-ci semblent bien capables de coloniser des portions de l'écorce dépourvues ou pauvres en orchidées, ou les racines des plantes épiphytes associées, leur abondance y semble limitée (ex : Leroy *et al.*, 2022), une tendance qu'il nous faudra tester lors de futures analyses.

9.4. Les méthodes employées et leurs limites

L'essentiel des travaux de cette thèse repose sur des outils de séquençage de courts fragments d'ADN (par *metabarcoding*), essentiellement du marqueur ITS-2 séquencé par la méthode Illumina. La méthode de *metabarcoding* offre l'avantage de pouvoir détecter de nombreux groupes fongiques en un seul séquençage, et permet en outre la détection de champignons pas ou difficilement cultivables. Cependant, l'un des principaux problèmes liés à cette technique est le biais d'amplification lié aux amorces utilisées lors de l'étape de PCR, celles-ci étant de spécificités et d'affinités variables. Dans le cadre de cette thèse, l'une des familles de champignons ciblées, la famille des Tulasnellaceae, nécessite justement l'usage de couples d'amorces spécifiques. Plus compliqué encore, cette famille très diversifiée en termes de séquences ITS comporte plusieurs grands clades phylogénétiques qui n'amplifient pas tous de la même manière avec les amorces spécifiques ou universelles employées (Vogt-Schilb *et al.*, 2020). Aussi, constatant que le couple d'amorces ITS86-F/ITS4-Tul (permettant d'amplifier les Tulasnellaceae épiphytes au Brésil ; **Article I**) ne permettait aucune amplification d'ADN sur des échantillons épiphytes récoltés à La Réunion, nous avons dû faire le pari d'utiliser un nouveau couple jamais utilisé jusqu'ici à cette échelle, le couple 5.8S-OF/ITS4-Tul, pari qui s'est *a priori* révélé gagnant par la suite (cf. **Articles II à IV**).

Cette première « victoire » contre les Tulasnellaceae met en lumière une limite importante liée à l'amplification de fragments par PCR : on ne trouve souvent que ce que l'on cherche. Aussi, nous ne sommes pas à l'abri d'avoir raté un groupe de champignons (mycorhiziens ou non) bien représenté dans les environnements épiphytes tropicaux. A l'inverse, on peut parfois trouver plus que ce que l'on cherche. Les champignons recherchés peuvent par exemple posséder plusieurs copies intra-génomiques des séquences ITS (voir **Encadré 5**), voire plusieurs noyaux. Avec de tels outils, il est difficile de faire autrement que d'interpréter ces différentes séquences comme étant plusieurs champignons (voir par exemple les OTU61 et OTU62 dans la Fig. 2 de l'**Article II** de ce manuscrit).

D'autre part, après amplification et détection de ces champignons échappant aux amorces classiques, une question a rapidement émergé lors des analyses : *qu'est-ce qu'un Tulasnellaceae ?* Plus généralement, que se cache-t-il derrière ces familles de champignons que l'on nomme (plus ou moins précisément) à l'issue du séquençage, mais dont on ignore souvent l'écologie. À titre d'exemple, la famille des Ceratobasidiaceae, autre famille connue pour former des mycorhizes chez les orchidées, regroupe des endophytes racinaires, des mycorhiziens d'orchidées mais aussi des ectomycorhiziens et des pathogènes, sans que leurs clades ne soient clairement délimités dans la phylogénie (Veldre *et al.*, 2013). Que faire dès lors que l'on identifie l'un de ses membres dans une racine d'orchidée, sans être certain qu'il forme bien les pelotons observés (voir par exemple **Article IV**) ?

Bien sûr, le problème se pose dès lors que l'on décide de s'intéresser aux microorganismes. Les champignons mycorhiziens d'orchidées, cependant, ont l'avantage de pouvoir se cultiver seuls sur milieu de culture. Aussi, je suis bien heureux d'avoir pu m'atteler à cette (fastidieuse) tâche qui, je pense, ouvre la voie à de nombreuses perspectives. En effet, l'isolement d'une souche fongique permet, outre la satisfaction de constater qu'il se cache un organisme bien réel derrière les séquences d'ADN qui s'affichent à l'écran, de réaliser de multiples expérimentations qui permettent, elles, de mieux comprendre l'écologie trophique de ces organismes et leur manière d'interagir avec les plantes. Chez les orchidées, il est possible d'effectuer des expériences de germination symbiotique, *in vitro* mais aussi *in-* et *ex situ*, et d'essayer de mieux cerner les capacités enzymatiques de ces champignons par métabolomique ou transcriptomique. Aussi, l'isolement de ces souches pourra conduire, je l'espère, à de plus amples travaux sur la caractérisation de leur génome, de leurs capacités enzymatiques, et de leur importance pour les plantes et les écosystèmes qu'elles occupent.

Encadré 8. Applications possibles en écologie de la conservation.

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont une portée essentiellement fondamentale, et ont pour vocation de décrire et d'explorer les rôles possibles des associations mycorhiziennes chez les orchidées épiphytes. Toutefois, je ne saurais espérer que vivement qu'ils puissent avoir, d'une manière ou d'une autre, des retombées positives sur les mesures de protections des espèces étudiées et, plus largement, des forêts qui les accueillent.

L'essentiel de nos travaux ont été menés dans la forêt de Mare Longue (voir **Encadré 7**), forêt humide de basse altitude relativement bien préservée et située au sud-est de l'île de La Réunion. De nombreuses espèces de cette forêt sont endémiques de l'île ou de l'archipel des Mascareignes, et il était dès lors évident que notre impact sur le terrain se devait d'être limité afin de ne pas menacer les populations en place. Pour cela, nous avons mené nos échantillonnages de manière à garder vivants les plantes échantillonnées (sélection de portion de racines seulement, maintien de l'ancrage des individus sur le support), sauf lorsque celles-ci étaient de taille trop réduite (ex : protocormes). Nous avons pu revenir sur une partie des arbres échantillonnés en 2020 un an après collecte, et avons constaté que les orchidées en place y avaient survécu. D'autre part, l'ensemble des espèces échantillonnées l'ont été sous autorisation du Parc National de La Réunion, et celles-ci étaient toutes classées *Low Concern* ou *Data Deficient* par l'Union Internationale de Conservation pour la Nature (UICN). Sur le long terme, j'espère que nos travaux pourront permettre de mieux préserver ces espèces, notamment via les leviers identifiés ci-dessous.

Les travaux de la thèse m'ont amené à isoler des souches mycorhiziennes de plusieurs espèces d'orchidées terrestres et épiphytes indigènes à La Réunion (voir par exemple **Annexe 2** ; pour celles exploitées dans ce manuscrit : *Angraecum pectinatum*, *A. cucullatum*, *A. mauritianum*, *Bulbophyllum variegatum*, *Phaius tetragonum*). Ces souches, conservées de manière pérenne au sein du laboratoire et déposées dans la collection de Souches Fongiques du MNHN, pourront peut-être permettre, à l'avenir, de réaliser des germinations *in vitro* de graines de ces orchidées, voire d'effectuer des semis *in situ* de ces graines en présence des souches fongiques compatibles.

Ces semis pourront être effectués à proximité des plants adultes (Yang *et al.*, 2017), dans la zone rhizosphérique que nous avons pu mettre en évidence dans les travaux ci-dessus, ou sur des arbres hôtes favorables que nous identifierons peut-être à l'issue du séquençage des écorces d'arbres dans la forêt de Mare Longue (Axe iii de la thèse).

Figure E8.1 Jeune plantule de l'orchidée *Bulbophyllum variegatum* établie dans un couvert bryophytique sur l'écorce d'*Agarista salicifolia*. Pourra-t-on encore observer de jeunes individus comme celui-ci dans quelques années, lorsque les derniers vieux troncs d'*A. salicifolia* auront tous plié sous les assauts répétés des cyclones ? Photographie : Géromine Collobert, avec son aimable autorisation.



Nos travaux nous ont en particulier amené à étudier le cas de *Bulbophyllum variegatum*, orchidée épiphyte des Mascareignes et de Madagascar (**Figure E8.1**). Cette orchidée n'est retrouvée à La Réunion presque qu'exclusivement sur une seule espèce d'arbre hôte, *Agarista salicifolia*. Si cette orchidée ne semble actuellement pas menacée (population importante et renouvellement fréquemment observé sur certains sites), sa forte préférence d'hôte pourrait à terme la

condamner. En effet, *A. salicifolia* est un arbre pionnier des coulées de laves qui ne se renouvèle pas en milieu forestier, et dont le renouvellement en basse altitude sur l'île est fortement impacté par la prolifération d'espèces exotiques envahissantes comme *Casuarina*, *Bohemeria* etc. L'étude et l'isolement de ses champignons mycorhiziens, ainsi que l'identification des mécanismes sous-jacents à sa préférence d'hôte, pourraient permettre, à termes, de protéger cette espèce sur l'île.

Bilan et perspectives

Les travaux de cette thèse ont permis de mieux appréhender la distribution des champignons, dont les mycorhiziens d'orchidées, dans l'environnement épiphyte, contribuant ainsi à l'amélioration des connaissances sur l'écologie de ces champignons (ex : niches endophytique, mycorhizienne, saprotrophe libre sur l'écorce etc.). Néanmoins, ces connaissances restent encore très limitées, ce qui constitue à mon sens un verrou à une meilleure compréhension de ces symbioses mycorhiziennes d'orchidées et à terme, de l'écologie des espèces épiphytes.

Les résultats obtenus durant la thèse ouvrent notamment la voie à deux grandes perspectives de recherches :

- (1) Les réseaux mycorhiziens épiphytes mis en évidence (**Article II**) pourront être étudiés de manière fonctionnelle à l'aide de marquages isotopiques ($^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ notamment) et de suivis de croissance à distance ou à proximité des adultes. Ces travaux pourront être menés au sein de la forêt de Mare Longue à La Réunion où ces réseaux ont été caractérisés et où les associations mycorhiziennes des orchidées épiphytes sont connues.
- (2) Les rhizoctonias associés aux orchidées épiphytes pourront être étudiés d'un point de vue plus fonctionnel à partir des souches fongiques isolées durant la thèse et maintenues en culture. Ce travail pourra reposer sur des approches « omics » (études transcriptomiques et/ou métabolomiques des souches dans différentes conditions de culture, séquençage des génomes ; [Fochi et al., 2017a,b](#) ; [Miyachi et al., 2020](#)) mais aussi sur des suivis *in vitro* de croissance des champignons sur différents substrats (variation des sources de matière organique ; [Nurfadilah et al., 2013](#)).

À plus long terme, les résultats de la thèse offrent un point de départ pour de futures études qui pourront permettre d'apporter des éléments de réponse aux grandes problématiques suivantes :

- (1) **Quelles sont les niches trophiques des champignons mycorhiziens d'orchidées en milieu épiphyte ?**
 - (a) Quelles sont leurs capacités enzymatiques ? Quelles sont leurs capacités de dégradation des écorces (point 2 ci-dessus) ?
 - (b) Quelle est leur persistance dans l'environnement, notamment durant les saisons sèches lorsque le stress hydrique est le plus important (voir [Bertolini et al., 2014](#)) ?

- (c) L'écologie de ces champignons diffère-t-elle selon les taxa et selon les différents habitats épiphytes (gradient climatique, ex : forêt humide *versus* forêt sèche ou semi-sèche ; ou gradient vertical sur l'arbre, ex : base *versus* sommet de la canopée) ?
- (2) **Comment les réseaux mycorhiziens communs aux plantes épiphytes peuvent-ils influencer la biologie de leurs hôtes ?**
- (a) Existe-t-il des flux d'eau et/ou de nutriments entre plantes épiphytes médiés par les communautés fongiques mycorhiziennes et/ou endophytiques (point 1 ci-dessus) ?
- (b) Quelle est la stabilité de ces réseaux en fonction des conditions environnementales (notamment saison sèche *versus* humide en région tropicale, ou encore l'altitude ; voir [Cevallos et al., 2018](#)) ?
- (3) **Plus globalement, qu'est-ce qui caractérise le milieu épiphyte d'un point de vue fongique ?**
- (a) Les champignons associés aux orchidées favorisent-ils la coexistence des orchidées entre elles mais aussi avec d'autres espèces de plantes épiphytes ?
- (b) Comment se mettent en place ces communautés fongiques (dispersion des spores, croissance des hyphes, transmission verticale médiée par les plantes ou encore inoculation par des vecteurs externes ; [Leroy et al., 2022](#)) ?
- (c) Quelles sont les dynamiques successives de ces communautés fongiques sur les écorces d'arbres au cours de la croissance d'un arbre hôte (en lien notamment avec la germination puis la croissance de plantes épiphytes) ?

J'espère que certaines de ces questions motiveront un jour quelques scientifiques curieux d'en découvrir davantage sur ces symbioses encore méconnues.

Car à la croisée des chemins entre deux domaines largement inexplorés, celui des champignons d'une part, et celui de l'habitat épiphyte d'autre part, les associations mycorhiziennes en milieux épiphytes sont un monde qu'il nous reste à découvrir. Des sous-bois sombres et humides jusqu'aux sommets des canopées, il ne tient qu'à nous de partir l'explorer.

Annexe 1 – Communautés mycorhiziennes du *Liparis de loesel*

En début de thèse, j'ai participé à la finalisation d'un projet de conservation autour d'une orchidée terrestre menacée sur toute son aire de distribution, le *Liparis de loesel* (*Liparis loeselii*, (L.) Rich.). Ce projet, porté par le Conservatoire Botanique National Alpin (CBNA) en collaboration avec le Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN) avait été initié quelques années auparavant, et je me suis chargé du traitement moléculaire (PCR et préparation des banques) puis informatique (bioinformatique et analyse des données de séquençage) du volet « fongique » de l'étude. Les données acquises rejoignent un ensemble de résultats portant sur l'écologie particulière de cette orchidée dans les Alpes françaises, et sont incluses dans un article soumis au journal *Acta Oecologica* (Maris L., Petrolli R. *et al.*, *in prep.*). Elles ont également fait l'objet d'une restitution orale lors du séminaire « *Liparis* » à Grenoble en Janvier 2020. Le contexte et les principaux résultats sont résumés ci-dessous.

Introduction – Le *Liparis de loesel* (*Liparis loeselii*) est une petite orchidée terrestre à pseudobulbes présentant deux écotypes distincts : *L. loeselii* var. *ovata* pousse dans les dépressions d'arrière-dune de certaines côtes européennes, tandis que *L. loeselii* var. *loeselii* colonise les marais continentaux d'Europe Centrale (Pillon *et al.*, 2007). En Europe continentale, le *Liparis* s'associe de manière spécifique à des Tulasnellaceae et Ceratobasidiaceae (Illyés *et al.*, 2005; Illyes *et al.*, 2009) tandis que les populations dunaires semblent capables de s'associer à des communautés plus diverses incluant des champignons ectomycorhiziens (Thelephoraceae, Inocybaceae ; Waud *et al.*, 2017). Les partenaires mycorhiziens des populations alpines (*L. loeselii* var. *loeselii*) demeuraient inconnues avant la mise en place de cette étude. De même, le lien entre état de conservation des populations d'orchidées et communautés fongiques n'avait à ce jour pas été étudié.

Méthodes – Une analyse des communautés fongiques du *Liparis de loesel* a été réalisée par métabarcoding de l'ITS-2 fongique. Deux couples d'amorces ont été utilisés afin de décrire la communauté fongique globale (ITS86-F/ITS4) incluant la famille des Tulasnellaceae (ITS86-F/ITS4-Tul). Cette espèce étant protégée, les prélèvements se sont limités à 5 individus provenant de deux sites d'échantillonnages, et la colonisation fongique a été étudiée dans les racines (*roots*),

dans les pseudobulbes (*pseudobulb*) ou dans la partie supérieure des pseudobulbes (*base stem*) pour un total de 15 échantillons. De plus, des échantillons de sols provenant de différents sites colonisés par des populations de *Liparis* en bon ou en mauvais état de conservation (état et persistance des populations) ont été prélevés et analysés de la même manière (12 échantillons).

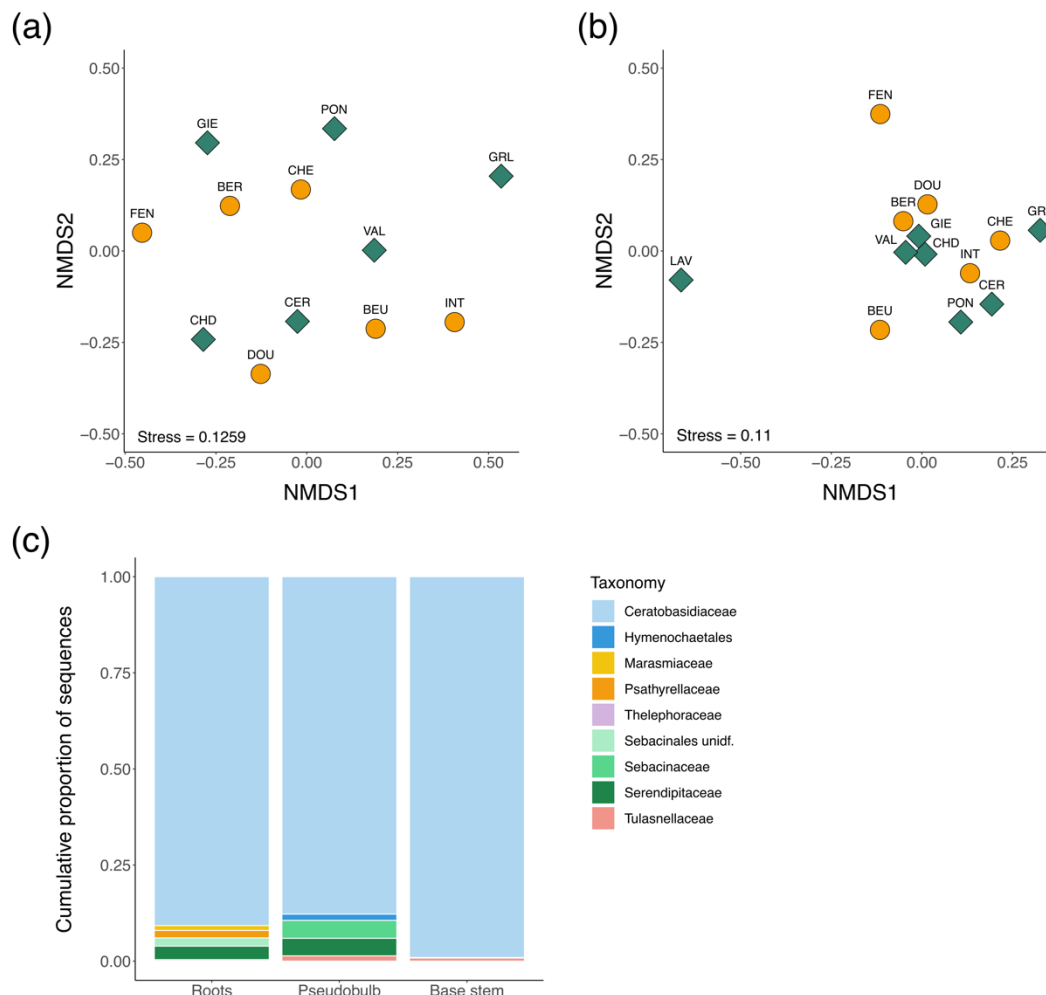


Figure A10.1 Communautés fongiques du *Liparis* de loesel et des habitats associés. (A-B) *Non-metric multidimensional scaling* (NMDS) montrant l'influence du statut de conservation de l'habitat sur (A) les communautés fongiques mycorhiziennes supposées et (B) les communautés fongiques totales du *Liparis* de loesel. Les sites sont colorés selon leur état de conservation : vert, bon état de conservation ; orange, état de conservation dégradé. (C) Proportion cumulée des séquences des champignons mycorhiziens potentiels chez 5 individus de *L. loeselii* (3 provenant du site du Vallin, et 2 provenant du site du Pontet), rassemblés par organes échantillonnés. « Sebacinales unidf. » fait référence à une assignation taxonomique limitée à l'ordre des Sebacinales dans la base de données UNITE. Les champignons correspondants peuvent donc appartenir soit aux Sebacinaceae soit aux Serendipitaceae, deux familles à l'écologie différente.

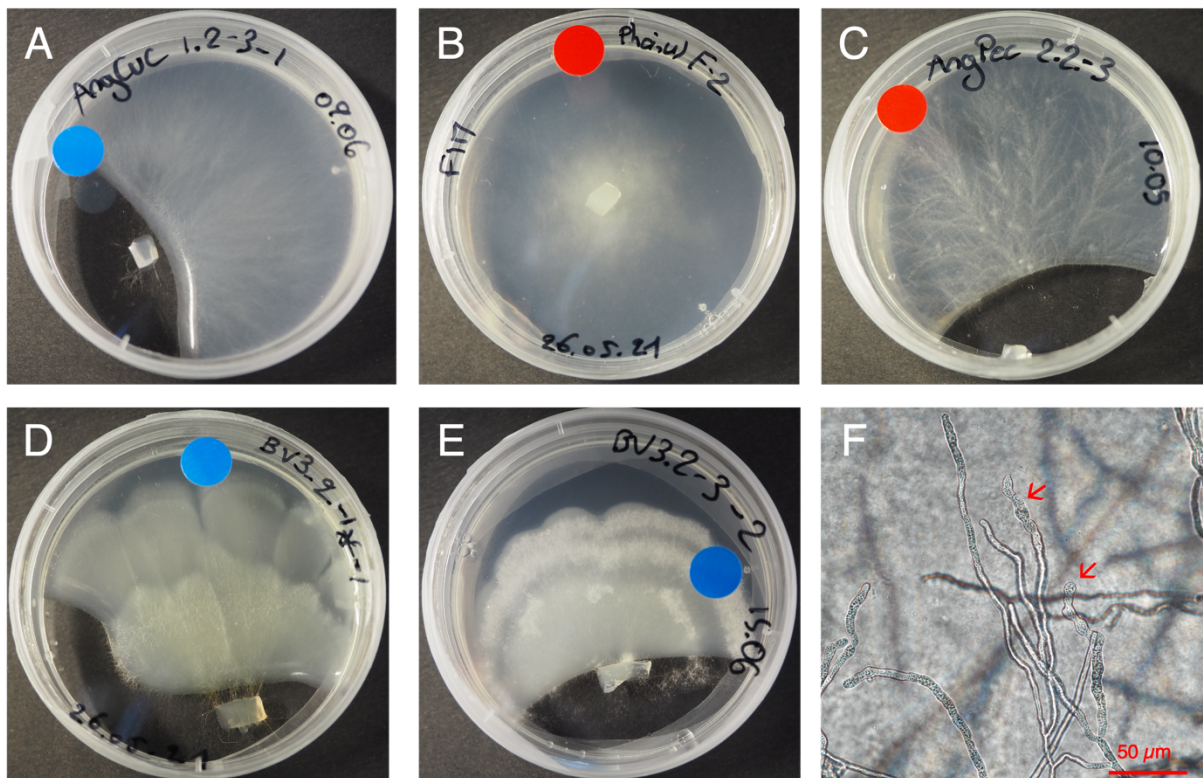
Résultats – Aucun des échantillons prélevés n'a amplifié avec les amorces spécifiques ITS86-F/ITS4-Tul. Les échantillons de sol n'ont pas montré de ségrégation des communautés fongiques mycorhiziennes (Fig. A10.1-A ; PERMANOVA, $F = 0.271$, $p = 0.461$) ou totales (Fig. A10.1-B ; $F = 0.089$, $p = 0.240$) en fonction de l'état de conservation des sites. Un total de 20 OTUs de champignons mycorhiziens potentiels ont été détectés, avec une très large prévalence d'un OTU appartenant à la famille des Ceratobasidiaceae (Fig. A10.1-C).

Discussion – Les résultats du séquençage montrent une prévalence des Ceratobasidiaceae dans le cortège fongique mycorhizien du *Liparis de loesel*. Des travaux menés en parallèle dans l'équipe ont permis d'isoler certaines souches mycorhiziennes du *Liparis* aux mêmes sites que ceux étudiés ici, appartenant toutes à la famille des Tulasnellaceae. Ces résultats confirment la prévalence de ces deux familles chez la sous-espèce *L. loeselii* var. *loeselii* (Illyés *et al.*, 2005; Illyés *et al.*, 2009), mais suggèrent que les amorces spécifiques utilisées (ITS86-F/ITS4-Tul) ne nous ont pas permis de détecter les Tulasnellaceae lors du séquençage. En effet, des travaux récents ont mis en évidence la faible complémentarité entre l'amorce sens ITS86-F et les séquences ITS-2 de plusieurs souches de Tulasnellaceae (Vogt-Schilb *et al.*, 2020), et les futures études de ces communautés mycorhiziennes devront employer une autre amorce, comme l'amorce sens 5.8S-OF (Vogt-Schilb *et al.*, 2020) également utilisée dans les **Articles II à IV** de ce manuscrit.

D'autre part, les communautés de champignons à la fois totales et mycorhiziennes ne semblent pas différer selon l'état de conservation des populations. Des résultats présentés dans l'article final tendent à montrer que l'hygrométrie du site, plus que tout autre facteur, semble être un bon indicateur de l'état de conservation des populations du *Liparis de loesel* dans les Alpes françaises.

Annexe 2 – Souches fongiques

Figure A10.2 Parmi les > 100 souches fongiques isolées durant la thèse, 5 sont illustrées ici afin de rendre compte de leur variabilité de forme de croissance. (A-C) Tulasnellaceae isolés de (A) *Angraecum cucullatum*, (B) *Phaius tetragonus* et (C) *Angraecum pectinatum* dans la forêt de Mare Longue à La Réunion. (D) *Cylindrocarpon* sp. et (E) *Theleonectria* sp. (Nectriaceae) isolés de *Bulbophyllum variegatum* dans la même forêt. Milieu de culture : *Fungal isolation medium*, FIM. (F) Microscopie optiques d'hyphes de Tulasnellaceae (boîte C) en culture montrant les cellules monilioïdes (propagules asexuées ; flèches) typiques des rhizoctonias (Taylor et al., 2002).



Annexe 3 – Expérience de germination *in vitro*

Figure A10.3 Montage expérimental de l'expérience de germination symbiotique *in vitro* des graines de *B. variegatum*. L'étuve a été maintenue à 25°C avec un cycle lumière/obscurité 12h/12h, et les boîtes ont été redistribuées aléatoirement dans l'étuve toutes les 1,5 semaines pour pallier les variations locales de luminosité (500 lux en moyenne).



Références

- Abadie JC, Püttsepp Ü, Gebauer G, Faccio A, Bonfante P, Selosse MA. 2006. *Cephalanthera longifolia* (Neottieae, Orchidaceae) is mixotrophic: a comparative study between green and nonphotosynthetic individuals. *Canadian Journal of Botany* 84: 1462–1477.
- Adamo M, Chialva M, Calevo J, de Rose S, Girlanda M, Perotto S, Balestrini R. 2020. The dark side of orchid symbiosis: can *Tulasnella calospora* decompose host tissues? *International journal of molecular sciences* 21: 3139.
- Albert S, Flores O, Michon L, Strasberg D. 2020. Dating young (<1000 yr) lava flow eruptions of Piton de la Fournaise volcano from size distribution of long-lived pioneer trees. *Journal of Volcanology and Geothermal Research* 401: 106974.
- Alexander C, Hadley G. 2022. Carbon movement between host and mycorrhizal endophyte during the development of the orchid *Goodyera repens*. *New Phytologist* 101: 657–665.
- Anderson MJ, Tolimieri N, Millar RB. 2013. Beta diversity of demersal fish assemblages in the North-Eastern Pacific: interactions of latitude and depth. *PLoS ONE* 8: e57918.
- APG. 2016. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical journal of the Linnean Society*. 181: 1-20.
- Arditti J, Ghani AKA. 2000. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytologist* 145: 367–421.
- Augé RM. 2001. Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 11: 3–42.
- Bahram M, Peay KG, Tedersoo L. 2015. Local-scale biogeography and spatiotemporal variability in communities of mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 205: 1454–1463.
- de Bary A. 1879. De la symbiose. *Revue internationale des sciences*, III : 301 -309.
- Bascompte J, Jordano P. 2007. Plant-animal mutualistic networks: the architecture of biodiversity. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 38: 567–593.
- Bayman P, González EJ, Fumero JJ, Tremblay RL. 2002. Are fungi necessary? How fungicides affect growth and survival of the orchid *Lepanthes rupestris* in the field. *Journal of Ecology* 90: 1002–1008.
- Bayman P, Lebrón LL, Tremblay RL, Lodge DJ. 1997. Variation in endophytic fungi from roots and leaves of *Lepanthes* (Orchidaceae). *New Phytologist* 135: 143–149.
- Bayman P, Mosquera-Espinosa AT, Saladini-Aponte CM, Hurtado-Guevara NC, Viera-Ruiz NL. 2016. Age-dependent mycorrhizal specificity in an invasive orchid, *Oeceoclades maculata*. *American Journal of Botany* 103: 1880–1889.
- Benzing DH. 1979. Alternative interpretations for the evidence that certain orchids and bromeliads act as shoot parasites. *Selbyana* 5: 135–144.
- Bernard N. 1899. Sur la germination du *Neottia nidus-avis*. *C.R Hebd. Sc. Acad. Sci.* 128:1253–1255.
- Bertolini V, Cruz-Blasi J, Damon A, Mora JV. 2014. Seasonality and mycorrhizal colonization in three species of epiphytic orchids in southeast Mexico. *Acta Botanica Brasiliica* 28: 512–518.
- Bever JD, Dickie IA, Facelli E, Facelli JM, Klironomos J, Moora M, Rillig MC, Stock WD, Tibbett M, Zobel M. 2010. Rooting theories of plant community ecology in microbial interactions. *Trends in Ecology and Evolution* 25: 468–478.
- Beyrle HF, Smith SE, Peterson RL, Franco CMM. 1995. Colonization of *Orchis morio* protocorms by a mycorrhizal fungus: effects of nitrogen nutrition and glyphosate in modifying the responses. *Canadian Journal of Botany* 73:1128-1140.
- Bidartondo MI, Bruns TD, Weiß M, Read DJ. 2003. Specialized cheating of the ectomycorrhizal symbiosis by an epiparasitic liverwort. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270: 835–842.
- Bidartondo MI, Burghardt B, Gebauer G, Bruns TD, Read DJ. 2004. Changing partners in the dark: isotopic and molecular evidence of ectomycorrhizal liaisons between forest orchids and trees. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 271: 1799–1806.
- Bidartondo MI, Read DJ, Trappe JM, Merckx V, Ligrone R, Duckett JG. 2011. The dawn of symbiosis between plants and fungi. *Biology Letters* 7: 574–577.
- Bingham MA, Simard SW. 2011. Do mycorrhizal network benefits to survival and growth of interior Douglas-fir seedlings increase with soil moisture stress? *Ecology and Evolution* 1: 306–316.
- Bingham MA, Simard S. 2012. Ectomycorrhizal networks of *Pseudotsuga menziesii* var. *glauca* trees facilitate establishment of conspecific seedlings under drought. *Ecosystems* 15: 188–199.
- Birch JD, Simard SW, Beiler KJ, Karst J. 2020. Beyond seedlings: ectomycorrhizal fungal networks and growth of mature *Pseudotsuga menziesii*. *Journal of Ecology* 109: 806-818.
- Björkman E. 1960. *Monotropa Hypopitys* L. - an epiparasite on tree roots. *Physiologia Plantarum* 13: 308–327.
- Blaalid R, Carlsen T, Kumar S, Halvorsen R, Ugland KI, Fontana G, Kauserud H. 2012. Changes in the root-associated fungal communities along a primary succession gradient analysed by 454 pyrosequencing. *Molecular Ecology* 21: 1897–1908.
- Blanchet FG, Legendre P, Borcard D. 2008. Forward selection of explanatory variables. *Ecology* 89: 2623–2632.
- Bonfante P. 2018. The future has roots in the past: the ideas and scientists that shaped mycorrhizal research. *New Phytologist* 220: 982–995.

- Bonfante P, Genre A.** 2008. Plants and arbuscular mycorrhizal fungi: an evolutionary-developmental perspective. *Trends in Plant Science* 13: 492–498.
- Bonfante P, Genre A.** 2010. Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature Communications* 1: 48.
- Bonfante P, Genre A.** 2015. Arbuscular mycorrhizal dialogues: do you speak ‘plantish’ or ‘fungish’? *Trends in Plant Science* 20: 150–154.
- Bonnardeaux Y, Brundrett M, Batty A, Dixon K, Koch J, Sivasithamparam K.** 2007. Diversity of mycorrhizal fungi of terrestrial orchids: compatibility webs, brief encounters, lasting relationships and alien invasions. *Mycological Research* 111: 51–61.
- Booth MG.** 2004. Mycorrhizal networks mediate overstorey-understorey competition in a temperate forest. *Ecology Letters* 7: 538–546.
- Booth MG, Hoeksema JD.** 2010. Mycorrhizal networks counteract competitive effects of canopy trees on seedling survival. *Ecology* 91: 2294–2302.
- Boudier E.** 1876. Du parasitisme probable de quelques espèces du genre *Elaphomyces* et de la recherche de ces Tubéracées. *Bull. Soc. Bot. Fr.* 23:115–119.
- Bougoure JJ, Brundrett MC, Grierson PF.** 2010. Carbon and nitrogen supply to the underground orchid, *Rhizanthella gardneri*. *New Phytologist* 186: 947–956.
- Bougoure J, Ludwig M, Brundrett M, Grierson P.** 2009. Identity and specificity of the fungi forming mycorrhizas with the rare mycoheterotrophic orchid *Rhizanthella gardneri*. *Mycological Research* 113: 1097–1106.
- Brundrett MC, Tedersoo L.** 2018a. Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytologist* 220: 1108–1115.
- Brundrett M, Tedersoo L.** 2018b. Misdiagnosis of mycorrhizas and inappropriate recycling of data can lead to false conclusions. *New Phytologist* 221: 18–24.
- Bueno CG, Aldrich-Wolfe L, Chaudhary VB, Gerz M, Helgason T, Hoeksema J, Klironomos J, Lekberg Y, Leon D, Maherali H, et al.** 2019. Misdiagnosis and uncritical use of plant mycorrhizal data are not the only elephants in the room: a response to Brundrett & Tedersoo (2019) ‘Misdiagnosis of mycorrhizas and inappropriate recycling of data can lead to false conclusions’. *New Phytologist* 224: 1415–1418.
- Calevo J, Voyron S, Adamo M, Alibrandi P, Perotto S, Giralanda M.** 2021. Can orchid mycorrhizal fungi be persistently harbored by the plant host? *Fungal Ecology* 53: 101071.
- Cameron DD, Johnson I, Leake JR, Read DJ.** 2007. Mycorrhizal acquisition of inorganic phosphorus by the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. *Annals of Botany* 99: 831–834.
- Cameron DD, Johnson I, Read DJ, Leake JR.** 2008. Giving and receiving: measuring the carbon cost of mycorrhizas in the green orchid, *Goodyera repens*. *New Phytologist* 180: 176–184.
- Cameron DD, Leake JR, Read DJ.** 2006. Mutualistic mycorrhiza in orchids: evidence from plant-fungus carbon and nitrogen transfers in the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. *New Phytologist* 171: 405–416.
- Castañó C, Berlin A, Brandström Durling M, Ihrmark K, Lindahl BD, Stenlid J, Clemmensen KE, Olson Å.** 2020. Optimized metabarcoding with Pacific biosciences enables semi-quantitative analysis of fungal communities. *New Phytologist* 228: 1149–1158.
- Cevallos S, Herrera P, Sánchez-Rodríguez A, Declerck S, Suárez JP.** 2018. Untangling factors that drive community composition of root associated fungal endophytes of Neotropical epiphytic orchids. *Fungal Ecology* 34: 67–75.
- Chagnon PL, Bradley RL, Maherali H, Klironomos JN.** 2013. A trait-based framework to understand life history of mycorrhizal fungi. *Trends in Plant Science* 18: 484–491.
- Chen L, Wang YC, Qin LY, He HY, Yu XL, Yang MZ, Zhang HB.** 2019. Dynamics of fungal communities during *Gastrodia elata* growth. *BMC Microbiology* 19: 158.
- Christenhusz MJM, Byng JW.** 2016. The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa* 261: 201–217.
- Close RC, Moar NT, Tomlinson AI, Lowe AD.** 1978. Aerial dispersal of biological material from Australia to New Zealand. *Int. J. Biometeor.* 22: 1–19.
- Cook K, Sharma J, Taylor AD, Herriott I, Taylor DL.** 2022. Epiphytic fungal communities vary by substrate type and at submetre spatial scales. *Molecular Ecology* 31: 1879–1891.
- Courty PE, Buée M, Diedhiou AG, Frey-Klett P, Le Tacon F, Rineau F, Turpault MP, Uroz S, Garbaye J.** 2010. The role of ectomycorrhizal communities in forest ecosystem processes: new perspectives and emerging concepts. *Soil Biology and Biochemistry* 42: 679–698.
- Darwin C.** 1862. The various contrivances by which Orchids are fertilized by insects. London, UK: John Murray.
- Davis B, Lim W-H, Lambers H, Dixon KW, Read DJ.** 2022. Inorganic phosphorus nutrition in green-leaved terrestrial orchid seedlings. *Annals of Botany* 129: 669–678.
- Davis BJ, Phillips RD, Wright M, Linde CC, Dixon KW.** 2015. Continent-wide distribution in mycorrhizal fungi: implications for the biogeography of specialized orchids. *Annals of Botany* 116: 413–421.
- Davison J, Moora M, Öpik M, Adholeana A, Ainsaar L, Bâ A, Burla S, Diedhiou AG, Hiiesalu I, Jairus T, et al.** 2015. Global assessment of arbuscular mycorrhizal fungus diversity reveals very low endemism. *Science* 349: 970–973.

- Dearnaley JDW, Cameron DD.** 2017. Nitrogen transport in the orchid mycorrhizal symbiosis – further evidence for a mutualistic association. *New Phytologist* 213: 10–12.
- Dearnaley JDW, Martos F, Selosse MA.** 2012. Orchid mycorrhizas: molecular ecology, physiology, evolution and conservation aspects. In: *Fungal Associations*, 2nd Edition The Mycota IX. B. Hock (Ed.). Springer Berlin Heidelberg, Germany, 207–230.
- Dearnaley J, Perotto S, Selosse MA.** 2016. Structure and development of orchid mycorrhizas. In: *Molecular Mycorrhizal Symbiosis*. Martin F. (Ed.). John Wiley & Sons, 63–86.
- Diez JM.** 2007. Hierarchical patterns of symbiotic orchid germination linked to adult proximity and environmental gradients. *Journal of Ecology* 95: 159–170.
- Ducouso M, Béna G, Bourgeois C, Buyck B, Eyssartier G, Vincelette M, Rabevohitra R, Randrihasipara L, Dreyfus B, Prin Y.** 2004. The last common ancestor of Sarcolaenaceae and Asian dipterocarp trees was ectomycorrhizal before the India-Madagascar separation, about 88 million years ago. *Molecular Ecology* 13: 231–236.
- Duffy KJ, Waud M, Schatz B, Petanidou T, Jacquemyn H.** 2019. Latitudinal variation in mycorrhizal diversity associated with a European orchid. *Journal of Biogeography* 46: 968–980.
- Egidi E, May TW, Franks AE.** 2018. Seeking the needle in the haystack: undetectability of mycorrhizal fungi outside of the plant rhizosphere associated with an endangered Australian orchid. *Fungal Ecology* 33: 13–23.
- Ercole E, Adamo M, Rodda M, Gebauer G, Girlanda M, Perotto S.** 2015. Temporal variation in mycorrhizal diversity and carbon and nitrogen stable isotope abundance in the wintergreen meadow orchid *Anacamptis morio*. *New Phytologist* 205: 1308–1319.
- Eriksson O, Kainulainen K.** 2011. The evolutionary ecology of dust seeds. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 13: 73–87.
- Eskov AK, Voronina EY, Tedersoo L, Tiunov AV, Manh V, Prilepsky NG, Antipina VA, Elumeeva TG, Abakumov EV, Onipchenko VG.** 2020. Orchid epiphytes do not receive organic substances from living trees through fungi. *Mycorrhiza* 30: 697–704.
- Fan X-L, Chomicki G, Hao K, Liu Q, Xiong Y-Z, Renner SS, Gao J-Y, Huang S-Q.** 2020. Transitions between the terrestrial and epiphytic habit drove the evolution of seed-aerodynamic traits in orchids. *The American Naturalist* 195: 275–283.
- Favre-Godal Q, Gourguillon L, Lordel-Madeleine S, Gindro K, Choisy P.** 2020. Orchids and their mycorrhizal fungi: an insufficiently explored relationship. *Mycorrhiza* 30: 5–22.
- Field KJ, Rimington WR, Bidartondo MI, Allinson KE, Beerling DJ, Cameron DD, Duckett JG, Leake JR, Pressel S.** 2015. First evidence of mutualism between ancient plant lineages (Haplomitriopsida liverworts) and Mucoromycotina fungi and its response to simulated Palaeozoic changes in atmospheric CO₂. *New Phytologist* 205: 743–756.
- Fochi V, Chitarra W, Kohler A, Voyron S, Singan VR, Lindquist EA, Barry KW, Girlanda M, Grigoriev IV, Martin F, et al.** 2017a. Fungal and plant gene expression in the *Tulasnella calospora*–*Serapias vomeracea* symbiosis provides clues about nitrogen pathways in orchid mycorrhizas. *New Phytologist* 213: 365–379.
- Fochi V, Falla N, Girlanda M, Perotto S, Balestrini R.** 2017b. Cell-specific expression of plant nutrient transporter genes in orchid mycorrhizae. *Plant Science* 263: 39–45.
- Fortin MJ, Dale MRT, ver Hoef J.** 2002. Spatial analysis in ecology. *Encyclopedia of Environmetrics* 4: 2051–2058.
- Francis R, Read DJ.** 1984. Direct transfer of carbon between plants connected by vesicular-arbuscular mycorrhizal mycelium. *Nature* 307: 53–56.
- Frank B.** 2005. On the nutritional dependence of certain trees on root symbiosis with belowground fungi (an English translation of A.B. Frank's classic paper of 1885). *Mycorrhiza* 15: 267–275.
- Frank AB.** 1885. Ueber die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze. *Ber Dtsch Bot Ges* 3: 128–145.
- Frank AB.** 1877. Über die biologischen Verhältnisse des Thallus einiger Krustenflechten. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen, II* :123–200.
- Frei JK, Dodson CH.** 1972. The chemical effect of certain bark substrates on the germination and early growth of epiphytic orchids. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 99: 301–307.
- Freitas EFS, da Silva M, Cruz ES, Mangaravite E, Bocayuva MF, Gomes T, Veloso R, Selosse MA, Kasuya MCM.** 2020. Diversity of mycorrhizal *Tulasnella* associated with epiphytic and rupicolous orchids from the Brazilian Atlantic Forest, including four new species. *Scientific Reports* 10: 7069.
- Fritsche Y, Lopes ME, Selosse MA, Stefenon VM, Guerra MP.** 2021. *Serendipita restingae* sp. nov. (Sebacinales): an orchid mycorrhizal agaricomycete with wide host range. *Mycorrhiza* 31: 101007.
- Galante TE, Horton TR, Swaney DP.** 2011. 95% of basidiospores fall within 1 m of the cap: a field- and modeling-based study. *Mycologia* 103: 1175–1183.
- Garnica S, Riess K, Schön ME, Oberwinkler F, Setaro SD.** 2016. Divergence times and phylogenetic patterns of Sebacinales, a highly diverse and widespread fungal lineage. *PLoS ONE* 11: e0149531.
- Gebauer G, Meyer M.** 2003. ¹⁵N and ¹³C natural abundance of autotrophic and myco-heterotrophic orchids provides insight into nitrogen and carbon gain from fungal association. *New Phytologist* 160: 209–223.

- Gebauer G, Preiss K, Gebauer AC. 2016. Partial mycoheterotrophy is more widespread among orchids than previously assumed. *New Phytologist* 211: 11–15.
- Ghirardo A, Fochi V, Lange B, Witting M, Schnitzler JP, Perotto S, Balestrini R. 2020. Metabolomic adjustments in the orchid mycorrhizal fungus *Tulasnella calospora* during symbiosis with *Serapias vomeracea*. *New Phytologist* 228: 1939–1952.
- Gigord LDB, Macnair MR, Smithson A. 2001. Negative frequency-dependent selection maintains a dramatic flower color polymorphism in the rewardless orchid *Dactylorhiza sambucina* (L) Soò. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 6253–6255.
- Girlanda M, Segreto R, Cafasso D, Liebel HT, Rodda M, Ercole E, Cozzolino S, Gebauer G, Perotto S. 2011. Photosynthetic Mediterranean meadow orchids feature partial mycoheterotrophy and specific mycorrhizal associations. *American Journal of Botany* 98: 1148–1163.
- Givnish TJ, Spalink D, Ames M, Lyon SP, Hunter SJ, Zuluaga A, Iles WJD, Clements MA, Arroyo MTK, Leebens-Mack J, et al. 2015. Orchid phylogenomics and multiple drivers of their extraordinary diversification. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 282: 20151553.
- González-Chávez M del CA, Torres-Cruz TJ, Sánchez SA, Carrillo-González R, Carrillo-López LM, Porrás-Alfaro A. 2018. Microscopic characterization of orchid mycorrhizal fungi: *Scleroderma* as a putative novel orchid mycorrhizal fungus of *Vanilla* in different crop systems. *Mycorrhiza* 28: 147–157.
- Gowland KM, van der Merwe MM, Linde CC, Clements MA, Nicotra AB. 2013. The host bias of three epiphytic Aeridinae orchid species is reflected, but not explained, by mycorrhizal fungal associations. *American Journal of Botany* 100: 764–777.
- Green J, Bohannan BJM. 2006. Spatial scaling of microbial biodiversity. *Trends in Ecology and Evolution* 21: 501–507.
- Green JL, Holmes AJ, Westoby M, Oliver I, Briscoe D, Dangerfield M, Gillings M, Beattie AJ. 2004. Spatial scaling of microbial eukaryote diversity. *Nature* 432: 747–750.
- Grime JP. 2006. *Plant strategies, vegetation processes, and ecosystem properties*. John Wiley & Sons.
- Grippa CR, Hoeltgebaum MP, Stürmer SL. 2007. Occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi in bromeliad species from the tropical Atlantic forest biome in Brazil. *Mycorrhiza* 17: 235–240.
- Guillot G, Rousset F. 2013. Dismantling the Mantel tests. *Methods in Ecology and Evolution* 4: 336–344.
- Hadley G. 1969. Cellulose as a carbon source for orchid mycorrhiza. *New Phytologist* 68: 933–939.
- Hadley G, Purves S. 1974. Movement of ¹⁴carbon from host to fungus in orchid mycorrhiza. *New Phytologist* 73: 475–482.
- Hadley G, Williamson B. 1971. Analysis of the post-infection growth stimulus in orchid mycorrhiza. *New Phytologist* 70: 445–455.
- Hanson CA, Fuhrman JA, Horner-Devine MC, Martiny JBH. 2012. Beyond biogeographic patterns: processes shaping the microbial landscape. *Nature Reviews Microbiology* 10: 497–506.
- Hartig T. 1840. *Vollständige Naturgeschichte der forstlichen Culturpflanzen Deutschlands*. Förstner'sche Verlagsbuchhandlung, Berlin.
- van der Heijden MGA, Horton TR. 2009. Socialism in soil? The importance of mycorrhizal fungal networks for facilitation in natural ecosystems. *Journal of Ecology* 97: 1139–1150.
- van der Heijden MGA, Martin FM, Selosse MA, Sanders IR. 2015. Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytologist* 205: 1406–1423.
- Helme-Guizon A, Selosse MA. 2010. Coloration des mycorrhizes. *Biologie, Géologie* n°4: 1-6. Accessible en ligne (<https://isymb.mnhn.fr/sites/isymb/files/documents/65-helme-sellosemyco-1.pdf>).
- Herrera P, Kottke I, Molina MC, Méndez M, Suárez JP. 2018. Generalism in the interaction of Tulasnellaceae mycobionts with orchids characterizes a biodiversity hotspot in the tropical Andes of Southern Ecuador. *Mycoscience* 59: 38–48.
- Herrera P, Suárez JP, Sánchez-Rodríguez A, Molina MC, Prieto M, Méndez M. 2019. Many broadly-shared mycobionts characterize mycorrhizal interactions of two coexisting epiphytic orchids in a high elevation tropical forest. *Fungal Ecology* 39: 26–36.
- Hietz P, Hietz-Seifert U. 1995. Intra- and interspecific relations within an epiphyte community in a mexican humid montane forest. *Selbyana* 16: 135–140.
- Hobbie JE, Hobbie EA. 2006. ¹⁵N in symbiotic fungi and plants estimates nitrogen and carbon flux rates in arctic tundra. *Ecology* 87: 816–822.
- Hoeksema JD. 2015. Experimentally testing effects of mycorrhizal networks on plant-plant interactions and distinguishing among mechanisms. In: *Mycorrhizal networks* Horton TR (Ed.). Springer, 255–277.
- Hoeksema JD, Chaudhary VB, Gehring CA, Johnson NC, Karst J, Koide RT, Pringle A, Zabinski C, Bever JD, Moore JC, et al. 2010. A meta-analysis of context-dependency in plant response to inoculation with mycorrhizal fungi. *Ecology Letters* 13: 394–407.
- Hornung BVH, Zwitterink RD, Kuijper EJ. 2019. Issues and current standards of controls in microbiome research. *FEMS Microbiology Ecology* 95: fuz045.
- Hynson NA, Madsen TP, Selosse M, Adam IKU, Ogura-Tsujita Y, Roy M, Gebauer G. 2013. The physiological ecology of mycoheterotrophy. In:

- Mycoheterotrophy: the biology of plants living on fungi*. Merckx V (Ed.). Berlin, Heidelberg: Springer, 297–342.
- Illyés Z, Halasz K, Rudnoy S, Ouanphanivanh N, Garay T, Bratek Z. 2009. Changes in the diversity of the mycorrhizal fungi of orchids as a function of the water supply of the habitat. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 83: 28–36.
- Illyés Z, Rudnóy S, Bratek Z. 2005. Aspects of *in situ*, *in vitro* germination and mycorrhizal partners of *Liparis loeselii*. *Acta Biologica Szegediensis* 49: 137–139.
- Izuddin M, Srivathsan A, Lee AL, Yam TW, Webb EL. 2019. Availability of orchid mycorrhizal fungi on roadside trees in a tropical urban landscape. *Scientific Reports* 9: 19528.
- Jacquemyn H, Brys R, Lievens B, Wiegand T. 2012a. Spatial variation in below-ground seed germination and divergent mycorrhizal associations correlate with spatial segregation of three co-occurring orchid species. *Journal of Ecology* 100: 1328–1337.
- Jacquemyn H, Brys R, Merckx VSFT, Waud M, Lievens B, Wiegand T. 2014. Coexisting orchid species have distinct mycorrhizal communities and display strong spatial segregation. *New Phytologist* 202: 616–627.
- Jacquemyn H, Brys R, Waud M, Busschaert P, Lievens B. 2015. Mycorrhizal networks and coexistence in species-rich orchid communities. *New Phytologist* 206: 1127–1134.
- Jacquemyn H, Brys R, Waud M, Evans A, Figura T, Selosse MA. 2021. Mycorrhizal communities and isotope signatures in two partially mycoheterotrophic orchids. *Frontiers in Plant Science* 12: 618140.
- Jacquemyn H, Deja A, De hert K, Cachapa Bailarote B, Lievens B. 2012b. Variation in mycorrhizal associations with tulasnelloid fungi among populations of five *Dactylorhiza* species. *PLoS ONE* 7: e42212.
- Jacquemyn H, Duffy KJ, Selosse MA. 2017a. Biogeography of orchid mycorrhizas. In: *Biogeography of mycorrhizal symbiosis*. Tedersoo L. (Ed.). Springer International Publishing, Cham, Switzerland, 159–177.
- Jacquemyn H, Honnay O, Cammue BPA, Brys R, Lievens B. 2010. Low specificity and nested subset structure characterize mycorrhizal associations in five closely related species of the genus *Orchis*. *Molecular Ecology* 19: 4086–4095.
- Jacquemyn H, Merckx VSFT. 2019. Mycorrhizal symbioses and the evolution of trophic modes in plants. *Journal of Ecology* 107: 1567–1581.
- Jacquemyn H, Merckx V, Brys R, Tyteca D, Cammue BPA, Honnay O, Lievens B. 2011. Analysis of network architecture reveals phylogenetic constraints on mycorrhizal specificity in the genus *Orchis* (Orchidaceae). *New Phytologist* 192: 518–528.
- Jacquemyn H, Rein B, Katrien V, Olivier H, Isabel RR, Thorsten W. 2007. A spatially of seedling recruitment in analysis explicit the terrestrial orchid *Orchis purpurea*. *New Phytologist* 176: 448–459.
- Jacquemyn H, Waud M, Brys R, Lallemand F, Courty PE, Robionek A, Selosse MA. 2017b. Mycorrhizal associations and trophic modes in coexisting orchids: an ecological continuum between auto- and mixotrophy. *Frontiers in Plant Science* 8: 1497.
- Jacquemyn H, Waud M, Merckx VSFT, Brys R, Tyteca D, Hedrén M, Lievens B. 2016. Habitat-driven variation in mycorrhizal communities in the terrestrial orchid genus *Dactylorhiza*. *Scientific Reports* 6: 37182.
- Jakobsen I, Gazey C, Abbott LK. 2001. Phosphate transport by communities of mycorrhizal fungi in intact soil cores. *New Phytologist* 149: 95–103.
- Jersáková J, Johnson SD, Kindlmann P. 2006. Mechanisms and evolution of deceptive pollination in orchids. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 81: 219–235.
- Jiang J, Zhang K, Cheng S, Nie Q, Zhou S, Chen Q, Zhou J, Zhen X, Li XT, Zhen TW, *et al.* 2019. *Fusarium oxysporum* KB-3 from *Bletilla striata*: an orchid mycorrhizal fungus. *Mycorrhiza* 29: 531–540.
- Johnson L JAN, González-Chávez M del CA, Carrillo-González R, Porras-Alfaro A, Mueller GM. 2020. *Vanilla* aerial and terrestrial roots host rich communities of orchid mycorrhizal and ectomycorrhizal fungi. *Plants, People, Planet* 3: 541–552.
- Julou T, Burghardt B, Gebauer G, Berveiller D, Damesin C, Selosse MA. 2005. Mixotrophy in orchids: insights from a comparative study of green individuals and nonphotosynthetic individuals of *Cephalanthera damasonium*. *New Phytologist* 166: 639–653.
- Jung SC, Martinez-Medina A, Lopez-Raez JA, Pozo MJ. 2012. Mycorrhiza-induced resistance and priming of plant defenses. *Journal of Chemical Ecology* 38: 651–664.
- Jungk A, Claassen N. 1989. Availability in soil and acquisition by plants as the basis for phosphorus and potassium supply to plants. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 152: 151–157.
- Kaling M, Schmidt A, Moritz F, Rosenkranz M, Witting M, Kasper K, Janz D, Schmitt-Kopplin P, Schnitzler JP, Polle A. 2018. Mycorrhiza-triggered transcriptomic and metabolomic networks impinge on herbivore fitness. *Plant Physiology* 176: 2639–2656.
- Karst SM, Ziels RM, Kirkegaard RH, Sørensen EA, McDonald D, Zhu Q, Knight R, Albertsen M. 2021. High-accuracy long-read amplicon sequences using unique molecular identifiers with Nanopore or PacBio sequencing. *Nature Methods* 18: 165–169.
- Kartzinel TR, Trapnell DW, Shefferson RP. 2013. Critical importance of large native trees for conservation of a rare neotropical epiphyte. *Journal of Ecology* 101: 1429–1438.

- Kiers ET, Duhamel M, Beesetty Y, Mensah JA, Franken O, Verbruggen E, Fellbaum CR, Kowalchuk GA, Hart MM, Bago A, *et al.* 2011. Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis. *Science* 333: 880–883.
- Kiers ET, Rousseau RA, West SA, Denison RF. 2003. Host sanctions and the legume–*rhizobium* mutualism. *Nature* 425: 78–81.
- Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, Stalpers JA. 2008. *Dictionary of the Fungi*. (10th edition). Wallingford, UK.
- Kivlin SN, Hawkes CV, Treseder KK. 2011. Global diversity and distribution of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry* 43: 2294–2303.
- Klein T, Siegwolf RTW, Körner C. 2016. Belowground carbon trade among tall trees in a temperate forest. *Science* 352: 342–344.
- Kohler A, Kuo A, Nagy LG, Morin E, Barry KW, Buscot F, Canbäck B, Choi C, Cichocki N, Clum A, *et al.* 2015. Convergent losses of decay mechanisms and rapid turnover of symbiosis genes in mycorrhizal mutualists. *Nature Genetics* 47: 410–415.
- Koleff P, Gaston KJ, Lennon JJ. 2003. Measuring beta diversity for presence–absence data. *Journal of Animal Ecology* 72: 367–382.
- Kottke I, Beiter A, Weiss M, Haug I, Oberwinkler F, Nebel M. 2003. Heterobasidiomycetes form symbiotic associations with hepatics: Jungermanniales have sebacinoid mycobionts while *Aneura pinguis* (Metzgeriales) is associated with a *Tulasnella* species. *Mycological Research* 107: 957–968.
- Kottke I, Haug I, Setaro S, Suárez JP, Weiß M, Preußing M, Nebel M, Oberwinkler F. 2008. Guilds of mycorrhizal fungi and their relation to trees, ericads, orchids and liverworts in a neotropical mountain rain forest. *Basic and Applied Ecology* 9: 13–23.
- Kottke I, Setaro S, Haug I, Herrera P, Cruz D, Fries A, Gawlik J, Homeier J, Werner FA, Gerique A, Suárez JP. 2013. Mycorrhiza networks promote biodiversity and stabilize the tropical mountain rain forest ecosystem: perspectives for understanding complex communities. In: Ecosystem services, biodiversity and environmental change in a tropical mountain ecosystem of South Ecuador. Bendix J, Beck E, Bräuning A, Makeschin F, Mosandl R, Scheu S, Wilcke W (Ed.). Berlin, Germany, 187–203.
- Kottke I, Suárez JP. 2009. Mutualistic, root-inhabiting fungi of orchids. *Proceedings of the Second Scientific Conference on Andean Orchids*: Loja, Ecuador: Universidad Técnica Particular de Loja. pp. 84–99.
- Kottke I, Suárez JP, Herrera P, Cruz D, Bauer R, Haug I, Garnica S. 2010. Atractiellomycetes belonging to the ‘rust’ lineage (Pucciniomycotina) form mycorrhizae with terrestrial and epiphytic neotropical orchids. *Proceedings of the Royal Society B* 277: 1289–1298.
- Kristiansen KA, Freudenstein JV, Rasmussen FN, Rasmussen HN. 2004. Molecular identification of mycorrhizal fungi in *Neuwiedia veratrifolia* (Orchidaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 33: 251–258.
- Kuga Y, Sakamoto N, Yurimoto H. 2014. Stable isotope cellular imaging reveals that both live and degenerating fungal pelotons transfer carbon and nitrogen to orchid protocorms. *New Phytologist* 202: 594–605.
- Lallemand F, Martin-Magniette ML, Gilard F, Gakière B, Launay-Avon A, Delannoy É, Selosse MA. 2019. *In situ* transcriptomic and metabolomic study of the loss of photosynthesis in the leaves of mixotrophic plants exploiting fungi. *The Plant Journal* 98: 826–841.
- Lallemand F. 2018. Évolution des interactions mycorrhiziennes et de la mycohétérotrophie chez les orchidées. *PhD Thesis, Muséum National d’Histoire Naturelle*.
- Lancaster N. 2004. A study of the distribution of orchids in the mascarene islands. Thesis; MSc Plant Diversity, Reading University.
- Látalová K, Baláž M. 2010. Carbon nutrition of mature green orchid *Serapias strictiflora* and its mycorrhizal fungus *Epulorhiza* sp. *Biologia Plantarum* 54: 97–104.
- Lavrinenko A, Jernfors T, Koskimäki JJ, Pirttilä AM, Watts PC. 2021. Does intraspecific variation in rDNA copy number affect analysis of microbial communities? *Trends in Microbiology* 29: 19–27.
- Leake JR. 1994. The biology of myco-heterotrophic (‘saprophytic’) plants. *New Phytologist* 127: 171–216.
- Leake JR, Cameron DD. 2012. Untangling above- and belowground mycorrhizal fungal networks in tropical orchids. *Molecular Ecology* 21: 4921–4924.
- Leroy C, Maes AQM, Louisanna E, Carrias JF, Céréghino R, Corbara B, Séjalón-Delmas N. 2022. Ants mediate community composition of root-associated fungi in an ant-plant mutualism. *Biotropica* 54: 645–655.
- Leroy C, Maes AQM, Louisanna E, Schimann H, Séjalón-Delmas N. 2021. Taxonomic, phylogenetic and functional diversity of root-associated fungi in bromeliads: effects of host identity, life forms and nutritional modes. *New Phytologist* 231: 1195–1209.
- Leroy C, Maes AQM, Louisanna E, Séjalón-Delmas N. 2019. How significant are endophytic fungi in bromeliad seeds and seedlings? Effects on germination, survival and performance of two epiphytic plant species. *Fungal Ecology* 39: 296–306.
- Li T, Shimao W, Yang W, Selosse MA, Gao J. 2021a. How mycorrhizal associations influence orchid distribution and population dynamics. *Frontiers in Plant Science* 12: 647114.
- Li T, Yang W, Shimao W, Selosse MA, Gao J. 2021b. Progress and prospects of mycorrhizal fungal diversity in orchids. *Frontiers in Plant Science* 12: 646325.

- Liang M, Johnson D, Burslem DFRP, Yu S, Fang M, Taylor JD, Taylor AFS, Helgason T, Liu X. 2020. Soil fungal networks maintain local dominance of ectomycorrhizal trees. *Nature Communications* 11: 2636.
- Liebel HT, Bidartondo MI, Preiss K, Segreto R, Stöckel M, Rodda M, Gebauer G. 2010. C and N stable isotope signatures reveal constraints to nutritional modes in orchids from the Mediterranean and Macaronesia. *American Journal of Botany* 97: 903–912.
- Lilleskov EA, Fahey TJ, Horton TR, Lovett GM. 2002. Belowground ectomycorrhizal fungal community change over a nitrogen deposition gradient in Alaska. *Ecology* 83: 104–115.
- Linde CC, Phillips RD, Crisp MD, Peakall R. 2014. Congruent species delineation of *Tulasnella* using multiple loci and methods. *New Phytologist* 201: 6–12.
- Lindner DL, Carlsen T, Nilsson RH, Davey M, Schumacher T, Kauserud H. 2013. Employing 454 amplicon pyrosequencing to reveal intragenomic divergence in the internal transcribed spacer rDNA region in fungi. *Ecology and Evolution* 3: 1751–1764.
- Liu N, Jacquemyn H, Liu Q, Shao SC, Ding G, Xing X. 2022. Effects of a dark septate fungal endophyte on the growth and physiological response of seedlings to drought in an epiphytic orchid. *Frontiers in Microbiology* 13: 961172.
- Lofgren LA, Uehling JK, Branco S, Bruns TD, Martin F, Kennedy PG. 2019. Genome-based estimates of fungal rDNA copy number variation across phylogenetic scales and ecological lifestyles. *Molecular Ecology* 28: 721–730.
- Maillet F, Poinso V, André O, Puech-Pagés V, Haouy A, Gueunier M, Cromer L, Giraudet D, Formey D, Niebel A, *et al.* 2011. Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature* 469: 58–64.
- Mant J, Peakall R, Weston PH. 2005. Specific pollinator attraction and the diversification of sexually deceptive *Chiloglottis* (Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution* 253: 185–200.
- Martin F, Kohler A, Murat C, Veneault-Fourrey C, Hibbett DS. 2016. Unearthing the roots of ectomycorrhizal symbioses. *Nature Reviews Microbiology* 14: 760–773.
- Martino E, Morin E, Grelet GA, Kuo A, Kohler A, Daghino S, Barry KW, Cichocki N, Clum A, Dockter RB, *et al.* 2018. Comparative genomics and transcriptomics depict ericoid mycorrhizal fungi as versatile saprotrophs and plant mutualists. *New Phytologist* 217: 1213–1229.
- Martos F, Dulormne M, Pailler T, Bonfante P, Faccio A, Fournel J, Dubois MP, Selosse MA. 2009. Independent recruitment of saprotrophic fungi as mycorrhizal partners by tropical achlorophyllous orchids. *New Phytologist* 184: 668–681.
- Martos F, Munoz F, Pailler T, Kottke I, Gonneau C, Selosse MA. 2012. The role of epiphytism in architecture and evolutionary constraint within mycorrhizal networks of tropical orchids. *Molecular Ecology* 21: 5098–5109.
- May M, Jąkalski M, Novotná A, Dietel J, Ayasse M, Lallemand F, Figura T, Minasiewicz J, Selosse MA. 2020. Three-year pot culture of *Epipactis helleborine* reveals autotrophic survival, without mycorrhizal networks, in a mixotrophic species. *Mycorrhiza* 30: 51–61.
- McCormick M, Burnett R, Whigham D. 2021. Protocorm-supporting fungi are retained in roots of mature *Tipularia discolor* orchids as mycorrhizal fungal diversity increases. *Plants* 10: 1251.
- McCormick MK, Jacquemyn H. 2014. What constrains the distribution of orchid populations? *New Phytologist* 202: 392–400.
- McCormick MK, Taylor DL, Whigham DF, Burnett RK. 2016. Germination patterns in three terrestrial orchids relate to abundance of mycorrhizal fungi. *Journal of Ecology* 104: 744–754.
- McCormick MK, Whigham DF, Canchani-Viruet A. 2018. Mycorrhizal fungi affect orchid distribution and population dynamics. *New Phytologist* 219: 1207–1215.
- McKendrick SL, Leake JR, Taylor DL, Read DJ. 2002. Symbiotic germination and development of the myco-heterotrophic orchid *Neottia nidus-avis* in nature and its requirement for locally distributed *Sebacina* spp. *New Phytologist* 154: 233–247.
- McKnight DT, Huerlimann R, Bower DS, Schwarzkopf L, Alford RA, Zenger KR. 2019. Methods for normalizing microbiome data: an ecological perspective. *Methods in Ecology and Evolution* 10: 389–400.
- McMurdie PJ, Holmes S. 2014. Waste not, want not: why rarefying microbiome data is inadmissible. *PLoS computational biology* 10: e1003531.
- Meng YY, Fan XL, Zhou LR, Shao SC, Liu Q, Selosse MA, Gao JY. 2019a. Symbiotic fungi undergo a taxonomic and functional bottleneck during orchid seeds germination: a case study on *Dendrobium moniliforme*. *Symbiosis* 79: 205–212.
- Meng YY, Zhang WL, Selosse MA, Gao JY. 2019b. Are fungi from adult orchid roots the best symbionts at germination? A case study. *Mycorrhiza* 29: 541–547.
- Merckx VSFT. 2013. *Mycoheterotrophy: the biology of plants living on fungi*. VSFT Merckx, (Ed.). Berlin, Heidelberg: Springer.
- Millar RB, Anderson MJ, Tolimieri N. 2011. Much ado about nothings: using zero similarity points in distance-decay curves. *Ecology* 92: 1717–1722.
- Miura T, Niswati A, Swibawa IG, Haryani S, Gunito H, Shimano S, Fujie K, Kaneko N. 2015. Diversity of fungi on decomposing leaf litter in a sugarcane plantation and their response to tillage practice and bagasse mulching: implications for management

- effects on litter decomposition. *Microbial Ecology* 70: 646–658.
- Miura C, Yamaguchi K, Miyahara R, Yamamoto T, Fuji M, Yagame T, Imaizumi-Anraku H, Yamato M, Shigenobu S, Kaminaka H. 2018. The mycoheterotrophic symbiosis between orchids and mycorrhizal fungi possesses major components shared with mutualistic plant-mycorrhizal symbioses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 31: 1032–1047.
- Miyauchi S, Kiss E, Kuo A, Drula E, Kohler A, Sánchez-García M, Morin E, Andreopoulos B, Barry KW, Bonito G, *et al.* 2020. Large-scale genome sequencing of mycorrhizal fungi provides insights into the early evolution of symbiotic traits. *Nature Communications* 11: 5125.
- Mrak T, Kühdorf K, Grebenc T, Straus I, Münzenberger B, Kraigher H. 2017. *Scleroderma areolatum* ectomycorrhiza on *Fagus sylvatica* L. *Mycorrhiza* 27: 283–293.
- Mühlmann O, Bacher M, Peintner U. 2008. *Polygonum viviparum* mycobionts on an alpine primary successional glacier forefront. *Mycorrhiza* 18: 87–95.
- Mújica EB, Mably JJ, Skarha SM, Corey LL, Richardson LW, Danaher MW, González EH, Zettler LW. 2018. A comparison of ghost orchid (*Dendrophylax lindenii*) habitats in Florida and Cuba, with particular reference to seedling recruitment and mycorrhizal fungi. *Botanical Journal of the Linnean Society* 186: 572–586.
- Mujica MI, Pérez MF, Jakalski M, Martos F, Selosse MA. 2020. Soil P reduces mycorrhizal colonization while favors fungal pathogens: observational and experimental evidence in *Bipinnula* (Orchidaceae). *FEMS Microbiology Ecology* 96: fiae178.
- Münzbergová Z, Herben T. 2005. Seed, dispersal, microsite, habitat and recruitment limitation: identification of terms and concepts in studies of limitations. *Oecologia* 145: 1–8.
- Nara K, Nakaya H, Hogetsu T. 2003. Ectomycorrhizal sporocarp succession and production during early primary succession on Mount Fuji. *New Phytologist* 158: 193–206.
- Newsham KK, Fitter AH, Watkinson AR. 1995. Arbuscular mycorrhiza protect an annual grass from root pathogenic fungi in the field. *Journal of Ecology* 83: 991–1000.
- Nganou BK, Mpetga JDS, Selvaraj J, Mvnl C, Palanisamy D, Nkuetea AH, Tane P. 2018. A brief review on *Agauria salicifolia*; a mediterranean plant species. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 10: 2428–2430.
- Novotná A, Benítez Á, Herrera P, Cruz D, Filipczyková E, Suárez JP. 2018. High diversity of root-associated fungi isolated from three epiphytic orchids in southern Ecuador. *Mycoscience* 59: 24–32.
- Nurfadilah S, Swarts ND, Dixon KW, Lambers H, Merritt DJ. 2013. Variation in nutrient-acquisition patterns by mycorrhizal fungi of rare and common orchids explains diversification in a global biodiversity hotspot. *Annals of Botany* 111: 1233–1241.
- Oehl F, Schneider D, Sieverding E, Burga CA. 2011. Succession of arbuscular mycorrhizal communities in the foreland of the retreating Morteratsch glacier in the Central Alps. *Pedobiologia* 54: 321–331.
- Ogura-Tsujita Y, Gebauer G, Xu H, Fukasawa Y, Umata H, Tetsuka K, Kubota M, Schweiger JMI, Yamashita S, Maekawa N, *et al.* 2018. The giant mycoheterotrophic orchid *Erythrorchis altissima* is associated mainly with a divergent set of wood-decaying fungi. *Molecular Ecology* 27: 1324–1337.
- Oja J, Vahtra J, Bahram M, Kohout P, Kull T, Rannap R, Kõljalg U, Tedersoo L. 2016. Local-scale spatial structure and community composition of orchid mycorrhizal fungi in semi-natural grasslands. *Mycorrhiza* 27: 355–367.
- Öpik M, Davison J, Moora M, Zobel M. 2014. DNA-based detection and identification of Glomeromycota: the virtual taxonomy of environmental sequences. *Botany* 92: 135–147.
- Orlovich DA, Draffin SJ, Daly RA, Stephenson SL. 2013. Piracy in the high trees: ectomycorrhizal fungi from an aerial ‘canopy soil’ microhabitat. *Mycologia* 105: 52–60.
- Otero JT, Ackerman JD, Bayman P. 2002. Diversity and host specificity of endophytic *Rhizoctonia*-like fungi from tropical orchids. *American Journal of Botany* 89: 1852–1858.
- Otero JT, Ackerman JD, Bayman P. 2004. Differences in mycorrhizal preferences between two tropical orchids. *Molecular Ecology* 13: 2393–2404.
- Pecoraro L, Rasmussen HN, Gomes SIF, Wang X, Merckx VSFT, Cai L, Rasmussen FN. 2021. Fungal diversity driven by bark features affects phorophyte preference in epiphytic orchids from southern China. *Scientific Reports* 11: 11287.
- Perez-Lamarque B, Petrolli R, Strullu-Derrien C, Strasberg D, Morlon H, Selosse MA, Martos F. 2022. Structure and specialization of mycorrhizal networks in phylogenetically diverse tropical communities. *Environmental Microbiome* 17: 38.
- Perotto S, Daghino S, Martino E. 2018. Ericoid mycorrhizal fungi and their genomes: another side to the mycorrhizal symbiosis? *New Phytologist* 220: 1141–1147.
- Perotto S, Rodda M, Benetti A, Sillo F, Ercole E, Rodda M, Girlanda M, Murat C, Balestrini R. 2014. Gene expression in mycorrhizal orchid protocorms suggests a friendly plant-fungus relationship. *Planta* 239: 1337–1349.
- Perru O. 2006. Aux origines des recherches sur la symbiose vers 1868-1883. *Revue d'histoire des sciences* 59: 5–27.

- Phillips RD, Barrett MD, Dixon KW, Hopper SD. 2011. Do mycorrhizal symbioses cause rarity in orchids? *Journal of Ecology* 99: 858–869.
- Pillon Y, Qamaruz-Zaman F, Fay MF, Hendoux Frederic, Piquot Y. 2007. Genetic diversity and ecological differentiation in the endangered fen orchid (*Liparis loeselii*). *Conservation Genetics* 8: 177–184.
- Plett JM, Daguerre Y, Wittulsky S, Vayssières A, Deveau A, Melton SJ, Kohler A, Morrell-Falvey JL, Brun A, Veneault-Fourrey C, Martin F. 2014. Effector MiSSP7 of the mutualistic fungus *Laccaria bicolor* stabilizes the *Populus* JAZ6 protein and represses jasmonic acid (JA) responsive genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111: 8299–8304.
- Pölme S, Bahram M, Jacquemyn H, Kennedy P, Kohout P, Moora M, Oja J, Öpik M, Pecoraro L, Tedersoo L. 2018. Host preference and network properties in biotrophic plant - fungal associations. *New Phytologist* 217: 1230–1239.
- Porrás-Alfaro A, Bayman P. 2007. Mycorrhizal fungi of *Vanilla*: diversity, specificity and effects on seed germination and plant growth. *Mycologia* 99: 510–525.
- Prescott CE, Grayston SJ. 2013. Tree species influence on microbial communities in litter and soil: current knowledge and research needs. *Forest Ecology and Management* 309: 19–27.
- Pujasatria GC, Nishiguchi I, Miura C, Yamato M, Kaminaka H. 2022. Orchid mycorrhizal fungi and ascomycetous fungi in epiphytic *Vanda falcata* roots occupy different niches during growth and development. *Mycorrhiza*. <https://doi.org/10.1007/s00572-022-01089-y>
- Rabatin SC, Stinner BR, Paoletti MG. 1993. Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi, particularly *Glomus tenue*, in Venezuelan bromeliad epiphytes. *Mycorrhiza* 4: 17–20.
- Rains KC, Nadkarni NM, Bledsoe CS. 2003. Epiphytic and terrestrial mycorrhizas in a lower montane Costa Rican cloud forest. *Mycorrhiza* 13: 257–264.
- Rammitsu K, Kajita T, Imai R, Ogura-Tsujita Y. 2021. Strong primer bias for Tulasnellaceae fungi in metabarcoding: specific primers improve the characterization of the mycorrhizal communities of epiphytic orchids. *Mycoscience* 62: 356–363.
- Rammitsu K, Yagame T, Yamashita Y, Yukawa T, Isshiki S, Ogura-Tsujita Y. 2019. A leafless epiphytic orchid, *Taeniophyllum glandulosum* Blume (Orchidaceae), is specifically associated with the Ceratobasidiaceae family of basidiomycetous fungi. *Mycorrhiza* 29: 159–166.
- Rasmussen HN. 1995. *Terrestrial Orchids - from seed to mycotrophic plant*. Cambridge, Great Britain: Cambridge University Press.
- Rasmussen HN, Rasmussen FN. 2018. The epiphytic habitat on a living host: reflections on the orchid - tree relationship. *Botanical Journal of the Linnean Society* 186: 456–472.
- Read DJ, Leake JR, Perez-Moreno J. 2004. Mycorrhizal fungi as drivers of ecosystem processes in heathland and boreal forest biomes. *Canadian Journal of Botany* 82: 1243–1263.
- Reess M. 1880. Ueber den Parasitismus von *Elaphomyces granulatus*. *Bot. Ztg.* 38: 729-733.
- Remy W, Taylor TN, Hass H, Kerp H. 1994. Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 11841–11843.
- Rimington WR, Duckett JG, Field KJ, Bidartondo MI, Pressel S. 2020. The distribution and evolution of fungal symbioses in ancient lineages of land plants. *Mycorrhiza* 30: 23–49.
- Rimington WR, Pressel S, Duckett JG, Bidartondo MI. 2015. Fungal associations of basal vascular plants: reopening a closed book? *New Phytologist* 205: 1394–1398.
- Rinaldi AC, Comandini O, Kuyper TW. 2008. Ectomycorrhizal fungal diversity: separating the wheat from the chaff. *Fungal Diversity* 33: 1–45.
- Rodríguez RJ, White JF, Arnold AE, Redman RS. 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist* 182: 314–330.
- Rog I, Rosenstock NP, Körner C, Klein T. 2020. Share the wealth: trees with greater ectomycorrhizal species overlap share more carbon. *Molecular Ecology* 29: 2321–2333.
- Rowe AR, Pringle A. 2005. Morphological and molecular evidence of arbuscular mycorrhizal fungal associations in Costa Rican epiphytic bromeliads. *Biotropica* 37: 245–250.
- Roy M, Gonneau C, Rocheteau A, Berveiller D, Thomas JC, Damesin C, Selosse MA. 2013. Why do mixotrophic plants stay green? A comparison between green and achlorophyllous orchid individuals *in situ*. *Ecological Monographs* 83: 95–117.
- Roy M, Yagame T, Yamato M, Iwase K, Heinz C, Faccio A, Bonfante P, Selosse MA. 2009. Ectomycorrhizal *Inocybe* species associate with the mycoheterotrophic orchid *Epipogium aphyllum* but not its asexual propagules. *Annals of Botany* 104: 595–610.
- Sarsaiya S, Shi J, Chen J. 2019. A comprehensive review on fungal endophytes and its dynamics on Orchidaceae plants: current research, challenges, and future possibilities. *Bioengineered* 10: 316–334.
- Schadt CW, Rosling A. 2015. Comment on ‘Global diversity and geography of soil fungi’. *Science* 348: 1438.
- Schiebold JMI, Bidartondo MI, Karasch P, Gravendeel B, Gebauer G. 2017. You are what you get from your fungi: nitrogen stable isotope patterns in *Epipactis* species. *Annals of Botany* 119: 1085–1095.

- Schiebold JMI, Bidartondo MI, Lenhard F, Makiola A, Gebauer G. 2018. Exploiting mycorrhizas in broad daylight: partial mycoheterotrophy is a common nutritional strategy in meadow orchids. *Journal of Ecology* 106: 168–178.
- Schiestl FP, Peakall R, Mant JG, Ibarra F, Schulz C, Franke S, Francke W. 2003. The chemistry of sexual deception in an orchid-wasp pollination system. *Science* 302: 437–438.
- Schneider-Maunoury L, Leclercq S, Clément C, Covès H, Lambourdière J, Sauve M, Richard F, Selosse MA, Taschen E. 2018. Is *Tuber melanosporum* colonizing the roots of herbaceous, non-ectomycorrhizal plants? *Fungal Ecology* 31: 59–68.
- Schützendübel A, Polle A. 2002. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany* 53: 1351–1365.
- Schwery O, Onstein RE, Bouchenak-Khelladi Y, Xing Y, Carter RJ, Linder HP. 2015. As old as the mountains: the radiations of the Ericaceae. *New Phytologist* 207: 355–367.
- Selosse MA. 2014. The latest news from biological interactions in orchids: in love, head to toe. *New Phytologist* 202: 337–340.
- Selosse MA, Boullard B, Richardson D. 2011. Noël Bernard (1874-1911): orchids to symbiosis in a dozen years, one century ago. *Symbiosis* 54: 61–68.
- Selosse M, Faccio A, Scappaticci G, Bonfante P. 2004. Chlorophyllous and achlorophyllous specimens of *Epipactis microphylla* (Neottieae, Orchidaceae) are associated with ectomycorrhizal Septomycetes, including truffles. *Microbial Ecology* 47: 416–426.
- Selosse MA, Martos F. 2014. Do chlorophyllous orchids heterotrophically use mycorrhizal fungal carbon? *Trends in Plant Science* 19: 683–685.
- Selosse MA, Minasiewicz J, Boullard B. 2017. An annotated translation of Noël Bernard's 1899 article 'On the germination of *Neottia nidus-avis*'. *Mycorrhiza* 27: 611–618.
- Selosse MA, Petrolli R, Mujica MI, Laurent L, Perez-Lamarque B, Figura T, Bourceret A, Jacquemyn H, Li T, Gao J, et al. 2022. The Waiting Room Hypothesis revisited by orchids: were orchid mycorrhizal fungi recruited among root endophytes? *Annals of Botany* 129: 259–270.
- Selosse MA, Richard F, He X, Simard SW. 2006. Mycorrhizal networks: des liaisons dangereuses? *Trends in Ecology and Evolution* 21: 621–628.
- Selosse MA, Rousset F. 2011. The plant-fungal marketplace. *Science* 333: 828–829.
- Selosse MA, Roy M. 2009. Green plants that feed on fungi: facts and questions about mixotrophy. *Trends in Plant Science* 14: 64–70.
- Selosse MA, Setaro S, Glatard F, Richard F, Urcelay C, Weiß M. 2007. Sebacinale are common mycorrhizal associates of Ericaceae. *New Phytologist* 174: 864–878.
- Selosse MA, Strullu-Derrien C. 2015. Origins of the terrestrial flora: a symbiosis with fungi? *BIO Web of Conferences* 4: 00009.
- Selosse MA, Le Tacon F. 1998. The land flora: a phototroph–fungus partnership? *Tree* 13: 15–20.
- Selosse MA, Weiß M, Jany JL, Tillier A. 2002. Communities and populations of sebacinoïd basidiomycetes associated with the achlorophyllous orchid *Neottia nidus-avis* (L.) L.C.M. Rich. and neighbouring tree ectomycorrhizae. *Molecular Ecology* 11: 1831–1844.
- Selosse M-A. 2000. *La symbiose, structures et fonctions, rôle écologique et évolutif*, Vuibert.
- Selosse M-A. 2017. *Jamais seul. Ces microbes qui construisent les plantes, les animaux et les civilisations*, Actes Sud.
- Setaro S, Kottke I, Oberwinkler F. 2006. Anatomy and ultrastructure of mycorrhizal associations of neotropical Ericaceae. *Mycological Progress* 5: 243–254.
- Shefferson RP, Bunch W, Cowden CC, Lee YI, Kartzinel TR, Yukawa T, Downing J, Jiang H. 2019. Does evolutionary history determine specificity in broad ecological interactions? *Journal of Ecology* 107: 1582–1593.
- Simard SW, Durall DM. 2004. Mycorrhizal networks: a review of their extent, function, and importance. *Canadian Journal of Botany* 82: 1140–1165.
- Simard SW, Perry DA, Jones MD, Myrold DD, Durall DM, Molina R. 1997. Net transfer of carbon between ectomycorrhizal tree species in the field. *Nature* 388: 579–582.
- Smith SE. 1966. Physiology and ecology of orchid mycorrhizal fungi with reference to seedling nutrition. *New Phytologist* 65: 488–499.
- Smith SE, Read DJ. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. Cambridge, Great Britain: Elsevier Ltd.
- Spatafora JW, Aime MC, Grigoriev IV, Martin F, Stajich JE, Blackwell M. 2017. The fungal tree of life: from molecular systematics to genome-scale phylogenies. *Microbiology Spectrum* 5: 3–34.
- Stöckel M, Těšitelová T, Jersáková J, Bidartondo MI, Gebauer G. 2014. Carbon and nitrogen gain during the growth of orchid seedlings in nature. *New Phytologist* 202: 606–615.
- Strasberg D. 1994. Dynamique des forêts tropicales de l'île de La Réunion : processus d'invasions et de régénération sur les coulées volcaniques. *PhD Thesis. Université de Montpellier II*.
- Strullu-Derrien C, Selosse MA, Kenrick P, Martin F. 2018. The origin and evolution of mycorrhizal symbioses: from palaeomycology to phylogenomics. *New Phytologist* 220: 1012–1030.
- Suárez JP, Weiß M, Abele A, Garnica S, Oberwinkler F, Kottke I. 2006. Diverse tulasnelloid fungi form mycorrhizas with epiphytic orchids in an

- Andean cloud forest. *Mycological Research* 110: 1257–1270.
- Suetsugu K, Haraguchi TF, Tayasu I. 2022. Novel mycorrhizal cheating in a green orchid: *Cremastra appendiculata* depends on carbon from deadwood through fungal associations. *New Phytologist* 235: 333–343.
- Suetsugu K, Matsubayashi J. 2021. Evidence for mycorrhizal cheating in *Apostasia nipponica*, an early-diverging member of the Orchidaceae. *New Phytologist* 229: 2302–2310.
- Swarts ND, Sinclair EA, Francis A, Dixon KW. 2010. Ecological specialization in mycorrhizal symbiosis leads to rarity in an endangered orchid. *Molecular Ecology* 19: 3226–3242.
- Taberlet P, Coissac E, Pompanon F, Brochmann C, Willerslev E. 2012. Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Molecular Ecology* 21: 2045–2050.
- Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S, Kasuga T, Geiser DM, Hibbett DS, Fisher MC. 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics and Biology* 31: 21–32.
- Taylor DL, Bruns TD, Leake JR, Read DJ. 2002. Mycorrhizal specificity and function in myco-heterotrophic plants. In: *Mycorrhizal ecology, Ecological studies, Vol 157*. van der Heijden M, Sanders I (Ed.). Springer-Verlag, Berlin, pp 375–413.
- Tedersoo L & Brundrett MC. 2017. Evolution of ectomycorrhizal symbiosis in plants. *Ecological Studies* 230: 407–467.
- Tedersoo L, Anslan S, Bahram M, Põlme S, Riit T, Liiv I, Kõljalg U, Kisand V, Nilsson RH, Hildebrand F, et al. 2015a. Shotgun metagenomes and multiple primer pair-barcode combinations of amplicons reveal biases in metabarcoding analyses of fungi. *MycKeys* 10: 1–43.
- Tedersoo L, Bahram M, Põlme S, Anslan S, Riit T, Kõljalg U, Nilsson RH, Hildebrand F, Abarenkov K. 2015b. Response to Comment on ‘Global diversity and geography of soil fungi’. *Science* 349: 936.
- Tedersoo L, Bahram M, Põlme S, Kõljalg U, Yorou NS, Wijesundera R, Ruiz LV, Vasco-palacios AM, Thu PQ, Suija A, et al. 2014. Global diversity and geography of soil fungi. *Science* 346: 1256688.
- Tedersoo L, Bahram M, Zinger L, Nilsson H, Kennedy P, Yang T, Anslan S, Mikryukov V. 2022. Best practices in metabarcoding of fungi: from experimental design to results. *Molecular Ecology* 31: 2769–2795.
- Těšitelová T, Kotlínek M, Jersáková J, Joly FX, Košnar J, Tatarenko I, Selosse MA. 2015. Two widespread green *Neottia* species (Orchidaceae) show mycorrhizal preference for Sebaciales in various habitats and ontogenetic stages. *Molecular Ecology* 24: 1122–1134.
- Trapnell DW, Hamrick JL, Nason JD. 2004. Three-dimensional fine-scale genetic structure of the neotropical epiphytic orchid, *Laelia rubescens*. *Molecular Ecology* 13: 1111–1118.
- Trappe JM. 2005. A.B. Frank and mycorrhizae: the challenge to evolutionary and ecologic theory. *Mycorrhiza* 15: 277–281.
- Tremblay RL, Zimmerman JK, Lebrón L, Bayman P, Sastre I, Axelrod F, Alers-García J. 1998. Host specificity and low reproductive success in the rare endemic Puerto Rican orchid *Lepanthes caritensis*. *Biological Conservation* 85: 297–304.
- Tremble K, Suz LM, Dentinger BTM. 2019. Lost in translation: population genomics of porcini (*Boletus edulis*) challenges use of ITS for DNA barcoding in Fungi. bioRxiv.
- Treseder KK. 2004. A meta-analysis of mycorrhizal responses to nitrogen, phosphorus, and atmospheric CO₂ in field studies. *New Phytologist* 164: 347–355.
- Turnbull MH, Goodall R, Stewart GR. 1995. The impact of mycorrhizal colonization upon nitrogen source utilization and metabolism in seedlings of *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden and *Eucalyptus maculata* Hook. *Plant, Cell & Environment* 18: 1386–1394.
- Union Internationale pour la Conservation de la Nature (IUCN). Red list – IUCN. <https://www.iucnredlist.org>. Accès le 13 Juin 2022.
- Valadares RBS, Marroni F, Sillo F, Oliveira RRM, Balestrini R, Perotto S. 2021. A transcriptomic approach provides insights on the mycorrhizal symbiosis of the mediterranean orchid *Limodorum abortivum* in nature. *Plants* 10: 251.
- Valadares RBS, Perotto S, Santos EC, Lambais MR. 2014. Proteome changes in *Oncidium sphacelatum* (Orchidaceae) at different trophic stages of symbiotic germination. *Mycorrhiza* 24: 349–360.
- Veldre V, Abarenkov K, Bahram M, Martos F, Selosse MA, Tamm H, Kõljalg U, Tedersoo L. 2013. Evolution of nutritional modes of Ceratobasidiaceae (Cantharellales, Basidiomycota) as revealed from publicly available ITS sequences. *Fungal Ecology* 6: 256–268.
- Ventre Lespiaucq A, Jacquemyn H, Rasmussen HN, Méndez M. 2021. Temporal turnover in mycorrhizal interactions: a proof of concept with orchids. *New Phytologist* 230: 1690–1699.
- Vogt-Schilb H, Těšitelová T, Kotlínek M, Sucháček P, Kohout P, Jersáková J. 2020. Altered rhizoctonia assemblages in grasslands on ex-arable land support germination of mycorrhizal generalist, not specialist orchids. *New Phytologist* 227: 1200–1212.
- Vohník M, Sadowsky JJ, Kohout P, Lhotáková Z, Nestby R, Kolařík M. 2012. Novel root-fungus symbiosis in Ericaceae: sheathed ericoid mycorrhiza formed by a hitherto undescribed Basidiomycete with affinities to Trechisporales. *PLoS ONE* 7: e39524.
- Vohník M. 2020. Ericoid mycorrhizal symbiosis: theoretical background and methods for its comprehensive investigation. *Mycorrhiza* 30: 671–695.

- Volpin H, Phillips DA, Okon Y, Kapulnik Y. 1995. Suppression of an isoflavonoid phytoalexin defense response in mycorrhizal alfalfa roots. *Plant Physiology* 108: 1449–1454.
- Voyron S, Ercole E, Ghignone S, Perotto S, Girlanda M. 2017. Fine-scale spatial distribution of orchid mycorrhizal fungi in the soil of host-rich grasslands. *New Phytologist* 213: 1428–1439.
- Wagner K, Mendieta-leiva G, Zotz G. 2015. Host specificity in vascular epiphytes: a review of methodology, empirical evidence and potential mechanisms. *AoB PLANTS* 7: plu092.
- Wagner K, Zotz G. 2020. Including dynamics in the equation: tree growth rates and host specificity of vascular epiphytes. *Journal of Ecology* 108: 761–773.
- Wang D, Jacquemyn H, Gomes SIF, Vos RA, Merckx VSFT. 2021. Symbiont switching and trophic mode shifts in Orchidaceae. *New Phytologist* 231: 791–800.
- Waterman RJ, Bidartondo MI, Stofberg J, Combs JK, Gebauer G, Savolainen V, Barraclough TG, Pauw A. 2011. The effects of above- and belowground mutualisms on orchid speciation and coexistence. *The American Naturalist* 177: 54–68.
- Waud M, Brys R, Van Landuyt W, Lievens B, Jacquemyn H. 2017. Mycorrhizal specificity does not limit the distribution of an endangered orchid species. *Molecular Ecology* 26: 1687–1701.
- Waud M, Busschaert P, Lievens B, Jacquemyn H. 2016a. Specificity and localised distribution of mycorrhizal fungi in the soil may contribute to coexistence of orchid species. *Fungal Ecology* 20: 155–165.
- Waud M, Busschaert P, Ruyters S, Jacquemyn H, Lievens B. 2014. Impact of primer choice on characterization of orchid mycorrhizal communities using 454 pyrosequencing. *Molecular Ecology Resources* 14: 679–699.
- Waud M, Wiegand T, Brys R, Lievens B, Jacquemyn H. 2016b. Nonrandom seedling establishment corresponds with distance-dependent decline in mycorrhizal abundance in two terrestrial orchids. *New Phytologist* 211: 255–264.
- Weiß M, Waller F, Zuccaro A, Selosse MA. 2016. Sebacinale - one thousand and one interactions with land plants. *New Phytologist* 211: 20–40.
- Wilson D. 1995. Endophyte - the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos* 73: 274–276.
- Winter K, Wallace BJ, Stocker GC, Roksandic Z. 1983. Crassulacean acid metabolism in australian vascular epiphytes and some related species. *Oecologia* 57: 129–141.
- Woods CL. 2017. Primary ecological succession in vascular epiphytes: the species accumulation model. *Biotropica* 49: 452–460.
- Xing X, Gai X, Liu Q, Hart MM, Guo S. 2014. Mycorrhizal fungal diversity and community composition in a lithophytic and epiphytic orchid. *Mycorrhiza* 25: 289–296.
- Xing X, Gao Y, Zhao Z, Waud M, Duffy KJ, Selosse MA, Jakalski M, Liu N, Jacquemyn H, Guo S. 2020a. Similarity in mycorrhizal communities associating with two widespread terrestrial orchids decays with distance. *Journal of Biogeography* 47: 421–433.
- Xing X, Jacquemyn H, Gai X, Gao Y, Liu Q, Zhao Z, Guo S. 2019. The impact of life form on the architecture of orchid mycorrhizal networks in tropical forest. *Oikos* 128: 1254–1264.
- Xing X, Liu Q, Gao Y, Shao S, Guo L, Jacquemyn H, Zhao Z, Guo S. 2020b. The architecture of the network of orchid - fungus interactions in nine co-occurring *Dendrobium* species. *Frontiers in Ecology and Evolution* 8: 130.
- Yagame T, Orihara T, Selosse MA, Yamato M, Iwase K. 2012. Mixotrophy of *Platanthera minor*, an orchid associated with ectomycorrhiza-forming Ceratobasidiaceae fungi. *New Phytologist* 193: 178–187.
- Yamamoto K, Endo N, Degawa Y, Fukuda M, Yamada A. 2017. First detection of *Endogone* ectomycorrhizas in natural oak forests. *Mycorrhiza* 27: 295–301.
- Yang RH, Su JH, Shang JJ, Wu YY, Li Y, Bao DP, Yao YJ. 2018. Evaluation of the ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS), specifically ITS1 and ITS2, for the analysis of fungal diversity by deep sequencing. *PLoS ONE* 13: e0206428.
- Yang F, Sun A, Zhu J, Downing J, Song X, Liu H. 2017. Impacts of host trees and sowing conditions on germination success and a simple *ex situ* approach to generate symbiotic seedlings of a rare epiphytic orchid endemic to Hainan Island China. *Bot. Rev.* 83: 74–86.
- Yuan Y, Jin X, Liu J, Zhao X, Zhou J, Wang X, Wang D, Lai C, Xu W, Huang J, *et al.* 2018. The *Gastrodia elata* genome provides insights into plant adaptation to heterotrophy. *Nature Communications* 9: 1615.
- Yukawa T, Ogura-Tsujita Y, Shefferson RP, Yokoyama J. 2009. Mycorrhizal diversity in *Apostasia* (Orchidaceae) indicates the origin and evolution of orchid mycorrhiza. *American Journal of Botany* 96: 1997–2009.
- Zarate-García AM, Noguera-Savelli E, Andrade-Canto SB, Zavaleta-Mancera HA, Gauthier A, Alatorre-Cobos F. 2020. Bark water storage capacity influences epiphytic orchid preference for host trees. *American Journal of Botany* 107: 726–734.
- Zarza E, López-Pastrana A, Damon A, Guillén-Navarro K, García-Fajardo LV. 2022. Fungal diversity in shade-coffee plantations in Soconusco, Mexico. *PeerJ* 10: e13610.
- Zettler LW, Delaney TW, Sunley JA. 1998. Seed propagation of epiphytic green-fly orchid, *Epidendrum*

- conopseum* R. Brown, using its endophytic fungus. *Selbyana* **19**: 249–253.
- Zhang L, Chen J, Lv Y, Gao C, Guo S.** 2012. *Mycena* sp., a mycorrhizal fungus of the orchid *Dendrobium officinale*. *Mycological Progress* **11**: 395–401.
- Zhao X, Zhang J, Chen C, Yang J, Zhu H, Liu M, Lv F.** 2014. Deep sequencing-based comparative transcriptional profiles of *Cymbidium hybridum* roots in response to mycorrhizal and non-mycorrhizal beneficial fungi. *BMC Genomics* **15**: 747.
- Zhao MM, Zhang G, Zhang DW, Hsiao YY, Guo SX.** 2013. ESTs analysis reveals putative genes involved in symbiotic seed germination in *Dendrobium officinale*. *PLoS ONE* **8**: e72705.
- Zinger L, Bonin A, Alsos IG, Bálint M, Bik H, Boyer F, Chariton AA, Creer S, Coissac E, Deagle BE, et al.** 2019. DNA metabarcoding - Need for robust experimental designs to draw sound ecological conclusions. *Molecular Ecology* **28**: 1857–1862.
- Zotz G.** 2016. *Plants on Plants – The Biology of Vascular Epiphytes*. Heidelberg, Berlin, Germany: Springer International Publishing.
- Zotz G, Schultz AES.** 2008. The vascular epiphytes of a lowland forest in Panama - species composition and spatial structure. *Plant Ecology* **195**: 131–141.

Résumé

Près de 90% des plantes terrestres forment des associations symbiotiques avec des champignons au niveau de leurs racines, appelées mycorrhizes. Les mycorrhizes ont une fonction essentiellement nutritive : les champignons améliorent les capacités d'absorption en eau et en nutriments de la plante et reçoivent en retour des sucres issus de sa photosynthèse. Les orchidées forment des symbioses mycorrhiziennes avec un groupe polyphylétique de champignons au sein des Basidiomycètes dont l'écologie reste encore mal connue. Elles ont la particularité de former des graines microscopiques et dépourvues de réserves, qui nécessitent la présence d'un champignon compatible pour germer. Ainsi, le modèle mutualiste orchidée-champignon mycorrhizien est particulièrement intéressant car la distribution des champignons peut influencer celle de leurs plantes hôtes, et réciproquement.

Ces symbioses ont été essentiellement étudiées en milieux tempérés et terrestres ; pourtant la majorité des orchidées sont épiphytes et vivent sur l'écorce des arbres tropicaux. Leurs champignons mycorrhiziens colonisent alors l'écorce, mais leur écologie reste également mal connue.

Les travaux de cette thèse visent à mieux comprendre les relations entre les orchidées épiphytes et leurs partenaires fongiques. Nous avons étudié les communautés fongiques de racines d'orchidées épiphytes et de l'écorce environnante par des méthodes de *metabarcoding* environnemental (amplification et séquençage des communautés microbiennes) et d'isolements de souches fongiques. Ces travaux portent sur diverses espèces d'orchidées épiphytes de forêts tropicales humides au Brésil et sur l'île de La Réunion.

Les questions abordées sont les suivantes : où sont distribués les champignons mycorrhiziens sur l'écorce des arbres tropicaux ? Existe-t-il des réseaux d'interactions entre plantes épiphytes médiés par les partenaires fongiques ? La distribution spatiale d'une espèce d'orchidée peut-elle être expliquée par celle de ses champignons ?

Enfin, les outils et méthodes d'analyses sont appliqués au cas de la vanille cultivée, de manière à décrire, pour la première fois, les communautés mycorrhiziennes de cette espèce sur l'île de La Réunion.

Abstract

Almost 90% of terrestrial plants associate with mutualistic fungi in their roots, forming symbiotic associations called mycorrhizas. Mycorrhizas have a nutritional role for both partners: fungi improve the hydro-mineral nutrition of their host and obtain in return sugars from the plant photosynthesis. Orchids form mycorrhizal symbioses with a polyphyletic group of fungi in the Basidiomycota whose ecology is far from being well understood. Orchids have the particularity to produce microscopic, dust-like seeds which do not contain reserve and therefore need the presence of a compatible fungus to germinate. Thus, the orchid-mycorrhizal fungus interaction is of particular interest since the distribution of the fungal partners can influence those of their plant hosts, and conversely.

These symbioses have been mainly investigated in temperate, terrestrial ecosystems. Yet, the majority of orchid species are epiphytic, meaning that they germinate and root on the bark of tropical trees. Their mycorrhizal fungi colonize the surrounding bark, but their ecology needs further investigations.

This thesis aims to better understand the relationships between epiphytic orchids and their fungal partners. For this purpose, we studied fungal communities in the roots of epiphytic orchids and in the surrounding bark by metabarcoding approaches (*i.e.*, amplification and sequencing of microbial communities) and isolation of fungal strains. We studied several species of epiphytic orchids thriving in tropical rainforests of Brazil and of La Réunion. We address the following questions: what is the distribution of mycorrhizal fungi on the bark of tropical trees? Can the fungal partners mediate indirect plant-plant interactions, forming epiphytic mycorrhizal networks? Can the mycorrhizal fungi explain the spatial distribution of a given orchid species?

Finally, the analytic tools and methods are applied to the study of the cultivated vanilla in order to describe, for the first time, its mycorrhizal communities in La Réunion island.