Réseaux mycorhiziens et endophytiques dans les écosystèmes tempérés et désertiques.

Liam Laurent-Webb

To cite this version:

Liam Laurent-Webb. Réseaux mycorhiziens et endophytiques dans les écosystèmes tempérés et désertiques.. Sciences de l'environnement. Museum national d'histoire naturelle - MNHN PARIS, 2024. Français. ⟨NNT : 2024MNHN0009⟩. ⟨tel-04704096v2⟩

HAL Id: tel-04704096

https://hal.science/tel-04704096v2

Submitted on 20 May 2025

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.

Distributed under a Creative Commons CC BY-NC-ND 4.0 - Attribution - Non-commercial use - No Derivative Works - International License

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

Année 2024

N°attribué par la bibliothèque
|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|

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

Liam Laurent-Webb

Le 9 avril 2024

Réseaux mycorhiziens et endophytiques en milieux tempérés et désertiques

---

Sous la direction de **:**

Marc-André SELOSSE, Professeur du MNHN

Marc DUCOUSSO, Directeur de Recherche du CIRAD

JURY :

M. BUEE, Marc	**Directeur de Recherche, INRAe, Nancy, France**	**Président**
Mme. LEROY, Céline	**Directrice de Recherche, IRD, Kourou, Guyane, France**	**Rapportrice**
M. PETER, Martina	**Directrice de Recherche, WSL, Birmensdorf, Suisse**	**Rapportrice**
Mme. ROY, Mélanie	**Maitresse de Conférences, Université Paul Sabatier, Toulouse, France**	**Examinatrice**
M. SELOSSE, Marc-André	**Professeur, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France**	**Directeur de Thèse**

Réseaux mycorhiziens et endophytes en milieux tempérés et désertiques

Mycorrhizal and endophytic networks in temperate and desertic ecosystems

Remerciements

La réalisation de ce travail n'aurait pas été possible sans la confiance, l'aide et l'enthousiasme de nombreuses personnes que je souhaite remercier chaleureusement ici.

Mes remerciements vont tout d'abord à Marc-André pour la confiance qu'il m'a accordé pendant ces années au Museum, et de m'avoir intégré dans cette belle équipe. Merci également à Marc de m'avoir accepté dans cette aventure, pour ces belles missions et ta bienveillance.

Je tiens à remercier Philippe, Amélia et Benoît, sans qui je n'aurais jamais pu mener à bien cette thèse. Je tiens également à remercier l'ensemble de l'équipe INEVEF que j'ai eu la chance de côtoyer au quotidien et avec qui j'ai passé quatre superbes années ; merci Géromine, Rémi, Eve, Mélanie, Pierre-Louis, Florent, Céline, Tomas et Chantal. Merci à Florent qui s'est toujours rendu disponible pour discuter de ma thèse. Merci à Pascaline pour son aide précieuse au BoEM.

J'ai eu le plaisir de travailler avec des membres de Valorhiz et du LSTM à Montpellier, avec qui j'ai réalisé (entre autres) plusieurs missions de terrain intenses mais toujours dans la bonne humeur : merci Kenji, Stéphane, Coraline, Alexandre, Jérôme et Hassan pour ces beaux moments dans le désert d'AlUla. Je tiens à remercier tout particulièrement Kenji pour ces trois années de collaborations fructueuses.

Merci à Laurent, Fred et André pour leur implication volontaire dans le projet de désherbage. Merci en particulier à Laurent pour son aide précieuse lors des missions de terrain à Gaillac.

Merci à Aurélie qui nous a accueilli avec Philippe à l'INRAe de Nancy pour nous former à la microscopie-FISH et à Claude de la même équipe qui a accepté de réaliser des essais de protocoles sur les truffes.

J'ai eu la chance de réaliser une partie de mes travaux avec Sarah, Élisa, Julie et Mattéo dans le cadre de stages que j'ai encadrés. Je les remercie chaleureusement pour leur curiosité et leur investissement et j'espère que cette expérience leur a été bénéfique. Je remercie Audrey qui a pensé à moi pour encadrer certains de ces stages et pour son accompagnement sans faille depuis le Master 2.

Je remercie Laure, qui a pavé la voie de cette thèse et qui qui m'a permis de me lancer dans mon stage de M2 et le début de cette thèse.

Je tiens à remercier les membres de mon Comité de Suivi de Thèse, Lucie Vincenot, Pierre-Emmanuel Courty et Jérôme Sueur pour leurs précieux retours et conseils. Merci également aux membres de mon jury de thèse, qui ont accepté de prendre le temps d'évaluer mon travail.

Merci à Léa et à mes amis, avec qui j'ai hâte de pouvoir passer un peu plus de temps.

Merci surtout à ma famille pour leur soutien sans faille et leurs regards quelques fois amusés sur ma thèse.

Table des matières

Chapitre I – Introduction. **11**

1. Un microbiote, des microbiotes ? Écologie des interactions plantes-microorganismes. **15**
2. Assemblage du microbiote et niches écologiques. **22**
3. Le microbiote fongique des plantes : mycorhizes et endophytes. **34**
4. Mycobiote et champignons mycorhiziens comestibles : le cas des truffes. **47**
5. Étudier la diversité microbienne : méthodes et limites. **56**

Chapitre II - Assemblage du microbiote fongique en milieu désertique. **76**

Article I - *Fertility islands, keys to the establishment of plant and microbial diversity in a highly alkaline hot desert.*

Article II - *Seed or soil: tracing back the plant mycobiota primary sources.*

Chapitre III - Ectomycorhizes et endophytisme : une double niche écologique négligée. **136**

Article III - *Endophytic and ectomycorrhizal, an overlooked dual ecological niche? Insights from natural environments and* Russula *species.*

Chapitre IV - Étude *in situ* des truffes et apports potentiels pour la production. **184**

1. Les truffes du désert : écologie *in situ* et microbiote de l'hôte *Helianthemum lippii* dans la région d'AlUla. **187**
2. Rôle des spores dans la reproduction sexuée de la truffe noire du Périgord (*Tuber melanosporum*). **203**

Chapitre V - Discussion générale. **212**

1. Biologie et écologie des truffes en milieux tempérés et désertiques. **214**
2. L'assemblage du mycobiote des plantes, un processus multifactoriel. **216**
3. Des niches mycorhiziennes préjugées ? **224**
4. Assemblage du mycobiote et évolution des interactions plantes-champignons. **230**

Chapitre VI – Annexes. **236**

Glossaire

Anthropique : résultant de l'activité humaine.

Ectomycorhize : type d'interaction mycorhizienne caractérisée par la formation d'un manteau d'hyphes entourant la racine et d'hyphes se développant dans l'apoplasme des cellules racinaires formant le réseau de Hartig.

Écosystème : ensemble formé par la biocénose (ensemble des êtres vivants dans un même espace) et le biotope (caractéristiques physico-chimiques de cet espace).

Endomycorhize/mycorhize à arbuscule : type d'interaction mycorhizienne caractérisée par la croissance intracellulaire des hyphes qui forment des structures d'échanges appelées arbuscules.

Endophyte : le terme endophyte désigne étymologiquement tout organisme se développant au sein des tissus d'un hôte vivant. Différentes définitions sont actuellement utilisées dans la communauté scientifique. Ici, nous nous réfèrerons à la définition de Wilson (1995) : micro-organismes colonisant un hôte sans former de lésions ni de structures différenciées.

Espèce exotique envahissante : espèce dont la présence dans une région peut être attribuée aux activités humaines, intentionnellement ou non, qui leur a permis de franchir leurs barrières biogéographiques et dont la présence menace les écosystèmes ou les espèces locales.

Holobionte : unité formée par un macro-organisme (*e.g.*, une plante) et l'ensemble des microorganismes que ses tissus abritent.

Hologénome : unité formée par l'ensemble des gènes d'un macroorganisme (*e.g.*, une plante) et de l'ensemble des gènes des microorganismes que ses tissus abritent.

Métabolome : ensemble des métabolites présents dans un échantillon (*e.g.*, un échantillon de racine).

Métatranscriptome : ensemble des ARNs issus de la transcription du génome présents dans un échantillon.

Métagénome : ensemble du contenu génétique (ADN) présent dans un échantillon.

Microbiome : ensemble formé par le microbiote et l'environnement qu'il occupe.

Microbiote : ensemble des micro-organismes présents dans un environnement donné.

Mycobiote : composante fongique du microbiote.

Mycorhize : symbiose racinaire complexe formée par un champignon mycorhizien et un hôte végétal.

Metabarcoding (ou séquençage de gènes marqueurs) : méthode moléculaire de description des communautés microbiennes sur la base du séquençage d'un gène de référence.

Polyphylétique : se dit d'un groupe d'organismes présentant des caractéristiques communes mais partageant

des histoires évolutives différentes (pas d'ancêtre commun).

***Pool* (ou librairie) :** mélange (souvent équimolaire) de produits PCR effectué avant séquençage de gène marqueur.

PCR : *Polymerase Chain Reaction*. Réaction enzymatique permettant d'amplifier de manière exponentielle une portion d'ADN ciblée, permettant ensuite de l'étudier plus aisément (par séquençage par exemple).

***Reads* :** séquences d'ADN obtenues grâce aux méthodes de séquençage à haut débit.

Rhizosphère : portion de sol directement sous influence des racines des plantes (*via* par exemple l'exsudation de molécules).

Symbiose : association intime et durable entre deux organismes.

Préambule

La biodiversité à l'échelle mondiale, c'est-à-dire la diversité de l'ensemble des êtres vivants sur Terre, connaît actuellement un déclin important, lié principalement aux activités humaines. Les pressions subies par les écosystèmes*[1] sont d'origines diverses. La « Plateforme intergouvernementale scientifique et politique sur la biodiversité et les services écosystémiques » (IPBES), dans un rapport intitulé « Rapport de l'évaluation mondiale de la biodiversité et des services écosystémiques », dresse une liste des principales pressions anthropiques*: les changements d'utilisation des terres/mers, l'exploitation directe (*e.g.*, pêche et agriculture), les changements climatiques, les pollutions et les espèces exotiques envahissantes* expliquent presque 90% de l'impact des activités humaines sur les écosystèmes à l'échelle mondiale. Il est ainsi estimé que 25% des espèces de la plupart des groupes d'animaux et de végétaux étudiés sont déjà menacées d'extinction ou encore que la biomasse des mammifères non-humains a chuté d'environ 80% depuis la Préhistoire. De surcroit, ce déclin est en augmentation : le taux d'extinction des principaux groupes de vertébrés connait une augmentation importante, en particulier depuis le début du XXe siècle. Ces phénomènes ne touchent pas uniquement les espèces en danger d'extinction mais également des espèces dont le statut de conservation n'est pas (encore) considéré comme inquiétant ; certaines connaissent en effet d'importants déclins populationnels (Ceballos *et al*., 2017). Ce fort déclin, caractérisé par son origine anthropique, a ainsi été qualifié de « sixième extinction de masse » (Barnosky *et al.*, 2011 ; Ceballos *et al.*, 2017).

Afin d'estimer avec précision le déclin des espèces, il est toutefois nécessaire de pouvoir en caractériser la diversité et l'abondance, présente et passée. Aussi, la synthèse des données présentées dans le rapport de l'IPBES se base principalement sur des groupes d'espèces pluricellulaires bien caractérisés tels que les amphibiens, les plantes à fleurs ou les libellules, voire uniquement sur les vertébrés pour certains indicateurs. Ce travail de synthèse a permis d'identifier un certain nombre de lacunes dans nos connaissances actuelles, dont la méconnaissance de la diversité des « espèces fongiques » et des « espèces microbiennes » (*sic*). Les micro-organismes (bactéries, champignons, archées, protistes, *etc*.) représentent pourtant une part importante de la biomasse à l'échelle mondiale (respectivement 70, 12, 7 et 4 GtC ; Bar-On *et al.*, 2018). La biomasse fongique, par exemple, est six fois plus élevée que la biomasse animale (citation précédente) ! La richesse taxonomique des microorganismes est

[1] Les mots présentant un astérisque (*) sont définis dans le glossaire p. 6-7.

bien plus importante que celle des organismes pluricellulaires : on estime que le nombre d'espèces procaryotes (bactéries et archées) et d'espèces fongiques est de l'ordre de plusieurs millions (voire milliard pour les bactéries), dont une faible proportion seulement est à ce jour décrite (moins de 10% ; Blackwell, 2011 ; Hawksworth & Lücking, 2017 ; Louca *et al.*, 2019 ; Wiens, 2021).

Depuis la théorisation du lien entre maladies et microorganismes par Louis Pasteur et Robert Koch au XIXe siècle (Koch, 1876 ; Pasteur, 1880), les microorganismes ont longtemps été associés à l'idée de maladie (Lederberg, 2000). Pourtant, à la même époque, Albert Bernhard Frank, botaniste allemand, interprétait pour la première fois la présence de champignons dans les racines d'arbres sains (et même producteurs de truffes !) non pas comme une invasion néfaste, mais comme une association courante et bénéfique : « *die Mycorhiza* ». A.B. Frank émet ainsi l'hypothèse que les microorganismes ne sont pas nécessairement néfastes pour leur hôte, mais qu'ils participent au contraire à son fonctionnement physiologique (Frank a décrit ce qui est actuellement nommé ectomycorhize* - **Chapitre I3.2**; Frank, 1885 ; Trappe, 2005). Nous savons aujourd'hui que les microorganismes remplissent une diversité de rôles fondamentaux dans tous les écosystèmes (biodiversité fonctionnelle) : certains ont un mode de vie libre (sans hôte) et produisent une grande partie du dioxygène atmosphérique que nous respirons, tels que le phytoplancton (Field *et al.*, 1998 ; Falkowski, 2012). D'autres participent à la dégradation de la matière organique en milieux terrestres, comme les champignons, dégradant le bois mort en forêt (Boddy & Watkinson, 1995). Un grand nombre de microorganismes forment également des associations symbiotiques* avec un hôte, et participent activement à la réalisation de ses fonctions vitales telles que la nutrition : c'est le cas des bactéries fixatrices d'azotes formant des nodules sur les racines des légumineuses (Fabaceae ; van Rhijn & Vanderleyden, 1995) et des champignons mycorhiziens* s'associant à environ 86% des espèces de plantes (Smith & Read, 2009 ; van der Heijden *et al.*, 2015 ; Brundrett & Tedersoo, 2018).

Les connaissances acquises au cours des dernières décennies concernant les microorganismes sont à l'origine d'un changement de paradigme majeur : les organismes (et les écosystèmes) ne sont plus considérés comme des entités stériles ponctuellement colonisées par des microorganismes néfastes, mais au contraire comme des entités abritant et interagissant avec une grande diversité de microorganismes indispensables à leur fonctionnement (Selosse *et al.*, 2004, 2014 ; McFall-Ngai *et al.*, 2013 ; Hacquard *et al.*, 2015). Cette diversité invisible est pourtant encore trop méconnue ; espérons que les pages qui suivent puissent convaincre les

lecteur.ices de se pencher sur un monde accessible à celleux qui prennent la peine de regarder au-delà des apparences.

Chapitre I – Introduction.

Il est de plus en plus courant de croiser, au détour d'une discussion ou d'un article de presse, le terme microbiote*, en particulier dans le cadre de la santé humaine (Marc, 2023 ; Granja, 2023 ; Maillot, 2023). Cet intérêt croissant est soutenu par une augmentation du nombre d'études scientifiques portant sur le sujet : le nombre de publications scientifiques présentant dans leur titre les mots « microbiote » ou « microbiome* » a par exemple augmenté de manière exponentielle depuis 1999 (**Figure I.1a**) avec un fort tropisme pour les sujets de santé humaine (**Figure I.1b**). Ces avancées scientifiques ont mis en évidence que le corps humain compte environ autant de cellules bactériennes que de cellules humaines (Sender *et al*., 2016), représentant jusqu'à 150 fois plus de gènes bactériens que de gènes humains (Qin *et al*., 2010). Mais si ces avancées révolutionnent notre compréhension du fonctionnement du corps humain et le domaine de la santé, elles ont surtout mis en évidence que l'ensemble des organismes pluricellulaires vivent associés à une multitude de microorganismes, tant au sein du règne animal que végétal (Selosse *et al.*, 2004 ; McFall-Ngai *et al.*, 2013 ; Hacquard *et al.*, 2015). Une grande partie des études sur le microbiote portent sur sa composante bactérienne : sur la période 1999-2022, 46% des publications sur le microbiote/biome portent sur les bactéries contre seulement 7% pour les champignons (**Figure I.1c**). Nous tâcherons de montrer dans ce chapitre introductif que le terme microbiote fait en réalité référence à une grande diversité d'organismes colonisant une diversité d'habitats avec des rôles variés et formant des réseaux d'interactions complexes. Au cours de cette introduction, nous nous appuierons principalement sur des exemples relatifs aux interactions plantes-microbiote qui seront notre objet d'étude principal tout au long de cette thèse. Notre attention se focalisera en particulier sur la composante fongique du microbiote, bien que nous évoquions également dans certaines parties le microbiote bactérien.

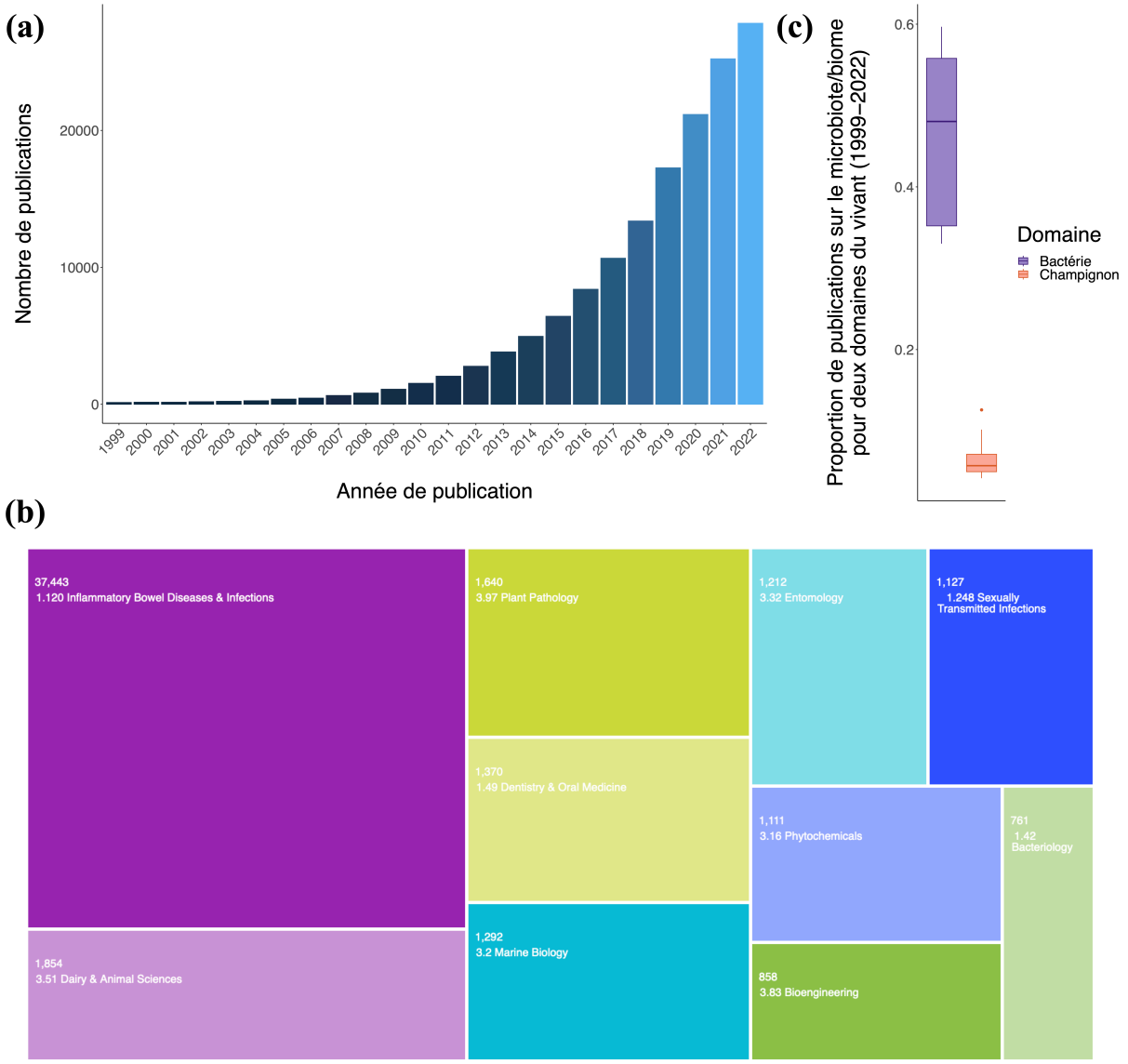


Figure I.1 Évolution et caractérisation thématique des publications scientifiques contenant les termes *microbiota* ou *microbiome* dans leur titre. (a) Évolution du nombre de publications dont le titre comprend les mots *microbiota* ou *microbiome* entre 1999 et 2022. **(b)** Distribution thématique des articles dont le titre comprend les mots *microbiota* ou *microbiome*. Seuls les 10 principaux thèmes (*Citation Topics Meso*) sont présentés. **(c)** Proportion de publications traitant des du microbiote/microbiome et des bactéries, ou du microbiote/microbiome et des champignons. Les données ont été extraites depuis l'outil d'analyse du site internet *Web of Science* (https://www.webofscience.com/wos/woscc/basic-search).

Organisation de l'introduction

Dans un premier temps, nous donnerons un aperçu de cette diversité, en nous demandant si derrière le terme microbiote (dont le singulier pourrait sous-entendre une certaine uniformité), ne se cachent pas en réalité des microbiotes (**Chapitre I.1**).

Nous nous interrogerons dans un second temps sur les facteurs pouvant influencer la composition du microbiote et les processus permettant son assemblage, en particulier les facteurs édaphiques et biotiques (**Chapitre I.2**).

Puis, notre attention se portera plus spécifiquement sur la composante fongique du microbiote des plantes, en particulier les champignons mycorhiziens et endophytes, qui sont impliqués dans de nombreuses fonctions vitales des plantes (**Chapitre I.3**).

Finalement, nous nous intéresserons à l'écologie et la biologie de certains champignons mycorhiziens comestibles et d'intérêts économique, les truffes (**Chapitre I.4**).

Finalement, nous présenterons quelques méthodes permettant l'étude du microbiote, et leurs limites potentielles (**Chapitre I.5**).

Plan détaillé de l'introduction

1. Un microbiote, des microbiotes ? Écologie des interactions plantes-microorganismes. 15
1.1. Le microbiote est constitué de microorganismes phylogénétiquement divers. 16
1.2. Les plantes offrent une diversité de niches écologiques aux microorganismes. 18
1.3. Un continuum d'interactions biotiques entre plantes et micro-organismes. 19
1.4. Interactions au sein du microbiome : des liaisons multipartites. 20

2. Assemblage du microbiote et niches écologiques. 22
2.1. Influence des facteurs édaphiques et biotiques sur l'assemblage du microbiote des plantes. 23
2.2. Transmission verticale et horizontale du microbiote 26
2.2.1. Transmission horizontale du microbiote
2.2.2. Transmission verticale du microbiote
2.2.3. Quantifier et comparer la transmission horizontale et verticale dans l'assemblage du microbiote fongique des plantes.

3. Le microbiote fongique des plantes : mycorhizes et endophytes. 34
3.1. De la conquête du milieu terrestre à nos jours : évolution des interactions plantes-champignons 34
3.2. Les mycorhizes. 36
3.2.1. Les principaux types de mycorhizes.
3.2.2. Rôles physiologiques des mycorhizes
3.3. Le continuum endophyte. 40
3.3.1. Définition de l'endophytisme.
3.3.2. Un groupe polyphylétique de champignons occupant diverses niches écologiques.
3.3.3. Nature des interactions plantes-endophytes : du mutualisme à l'antagonisme.
3.4. Plasticité et niches écologiques des champignons : un lien éco-évolutif entre endophytes et mycorhizes ? 44
3.4.1. Des niches écologiques multiples
3.4.2. Niches écologiques multiples et histoire évolutive : l'hypothèse de la salle d'attente.

4. Mycobiote et champignons mycorhiziens comestibles : le cas des truffes. 47
4.1. Diversité des champignons producteurs de truffes. 47
4.2. Des champignons mycorhiziens proto-domestiqués. 48
4.2.1. Les truffes sont formées par des champignons mycorhiziens.
4.2.2. Des espèces cultivées mais pas complètement domestiquées.
4.3. De l'écologie *in situ* à la production de truffes. 51

5. Étudier la diversité microbienne : méthodes et limites. 56
5.1. Petit historique des méthodes d'études des microorganismes. 56
5.2. L'ADN pour caractériser les populations et communautés microbiennes. 58
5.2.1. Étudier la diversité génétique des populations.
5.2.2. Étudier les communautés microbiennes par séquençage de gènes marqueurs (*metabarcoding*).
5.2.3. Les limites du séquençage de gènes marqueurs.
5.3. Vers une complémentarité des méthodes ? Apport de la microscopie. 72

1. Un microbiote, des microbiotes ? Écologie des interactions plantes-microorganismes.

Le mot « microbiote » trouve son étymologie dans le grec ancien : il s'agit de la combinaison des termes μικρος (petit) et βιοτα (la vie). Il désigne ainsi l'ensemble des microorganismes vivant à un endroit donné. Ce terme englobe de fait des réalités écologiques et évolutives très diverses, regroupant une grande diversité phylogénétique d'organismes (bactéries, champignons, protozoaires, *etc.*), une grande diversité d'habitats (hôtes, tissus colonisés, *etc.*), une grande diversité d'interactions (intra- ou inter-règne) ainsi qu'une grande diversité fonctionnelle (allant de la pathogénicité au mutualisme en passant par le commensalisme) bien supérieure à celle des macroorganismes. Avant de présenter plus en détail cette diversité, il convient de mieux définir ce terme et ceux qui en découlent, sujet qui a déjà fait l'objet de plusieurs articles (*e.g .*, Marchesi & Ravel, 2015 ; Berg *et al.*, 2020). La synthèse réalisée par Berg *et al.* (2020) est à ce jour une des plus complètes : elle inclut la définition des termes microbiote et microbiome et replace ces concepts dans des perspectives fonctionnelles (métagénome*, métatranscriptome*, métabolome*) et évolutives (holobionte*, hologénome*). Selon ces auteurs, le microbiote désigne l'ensemble des microorganismes occupant un écosystème. Le microbiome désigne pour sa part l'ensemble des microorganismes vivant dans cet écosystème ainsi que l'écosystème en lui-même, incluant donc par exemple l'hôte s'il y en a un, les conditions physico-chimiques du milieu, l'ensemble des molécules émises par les organismes présents dans cet écosystème, les virus *etc*. Ces définitions ne présupposent donc pas la fonction des microorganismes au sein de l'écosystème mais cherchent à décrire leur diversité (microbiote : « qui est là ? ») dans un écosystème donné (microbiome : « qui est là et où ? »).

Du fait de la diversité de microorganismes pouvant former le microbiote, des fonctions qu'ils peuvent réaliser et de la variété d'écosystèmes qu'ils peuvent occuper, nous nous demanderons dans cette première partie s'il ne serait pas plus juste de parler non pas **du** microbiote mais **des** microbiotes, afin de mettre en évidence que le terme microbiote peut désigner des sujets d'études très divers.

1.1. Le microbiote est constitué de microorganismes phylogénétiquement divers.

Les plantes s'associent et interagissent avec des microorganismes de tous les règnes du vivant : des bactéries (Bulgarelli *et al*., 2013), des archées (Taffner *et al*., 2018), des champignons « vrais » (eumycètes ; Rodriguez *et al.*, 2009 ; van der Heijden *et al.*, 2015), des oomycètes ou encore des protozoaires (Bonkowski, 2004 ; **Figure I.2**). Alors que le microbiote des mammifères (intestinal en particulier) est composé en très grande majorité de bactéries (Shapira, 2016 ; Perez-Lamarque & Morlon, 2019), toutes les plantes étudiées à ce jour sont colonisées par une grande diversité de champignons et de bactéries (Harrison & Griffin, 2020). En plus de représenter l'ensemble de l'arbre du vivant, les microorganismes colonisant les tissus des plantes présentent une grande diversité intra-règnes. Par exemple, le blé (*Triticum* spp.) et la féverole (*Vicia faba*) abritent des dizaines voire des centaines d'espèces de bactéries par échantillon de racines, même à une échelle millimétrique (Attia *et al*., 2022). Les racines des deux espèces présentent, en comparaison du sol, une forte proportion de Proteobacteria et de Bacteroidetes. Les racines des plantes peuvent également abriter des dizaines de champignons différents (Toju *et al.*, 2013 ; Dietrich *et al.*, 2022). Chez le hêtre (*Fagus sylvatica*), chaque racine est associée à 1 à 3 champignons mycorhiziens à la fois appartenant aux Agaricales, aux Pezizales ou aux Sebacinales mais présentent également une diversité de champignons ne formant pas de mycorhizes tels que les Helotiales (Dietrich *et al*., 2022). Il en va de même pour les parties aériennes des plantes : les feuilles, tiges et graines présentent une multitude de bactéries et champignons (Wearn *et al.*, 2012 ; Simonin *et al.*, 2022). Ainsi, Jumpponen & Jones (2009) ont identifié environ 700 espèces de champignons colonisant les feuilles du chêne *Quercus macrocarpa*, appartenant majoritairement aux genres *Microsphaeropsis et Alternaria*, des champignons Ascomycota. Les champignons du genre *Alternaria* sont également couramment détectés dans les graines de nombreuses plantes (Simonin *et al.*, 2022), de même que les champignons du genre *Cladosporium* et les bactéries des genres *Pseudomonas* et *Pantoea* par exemple.

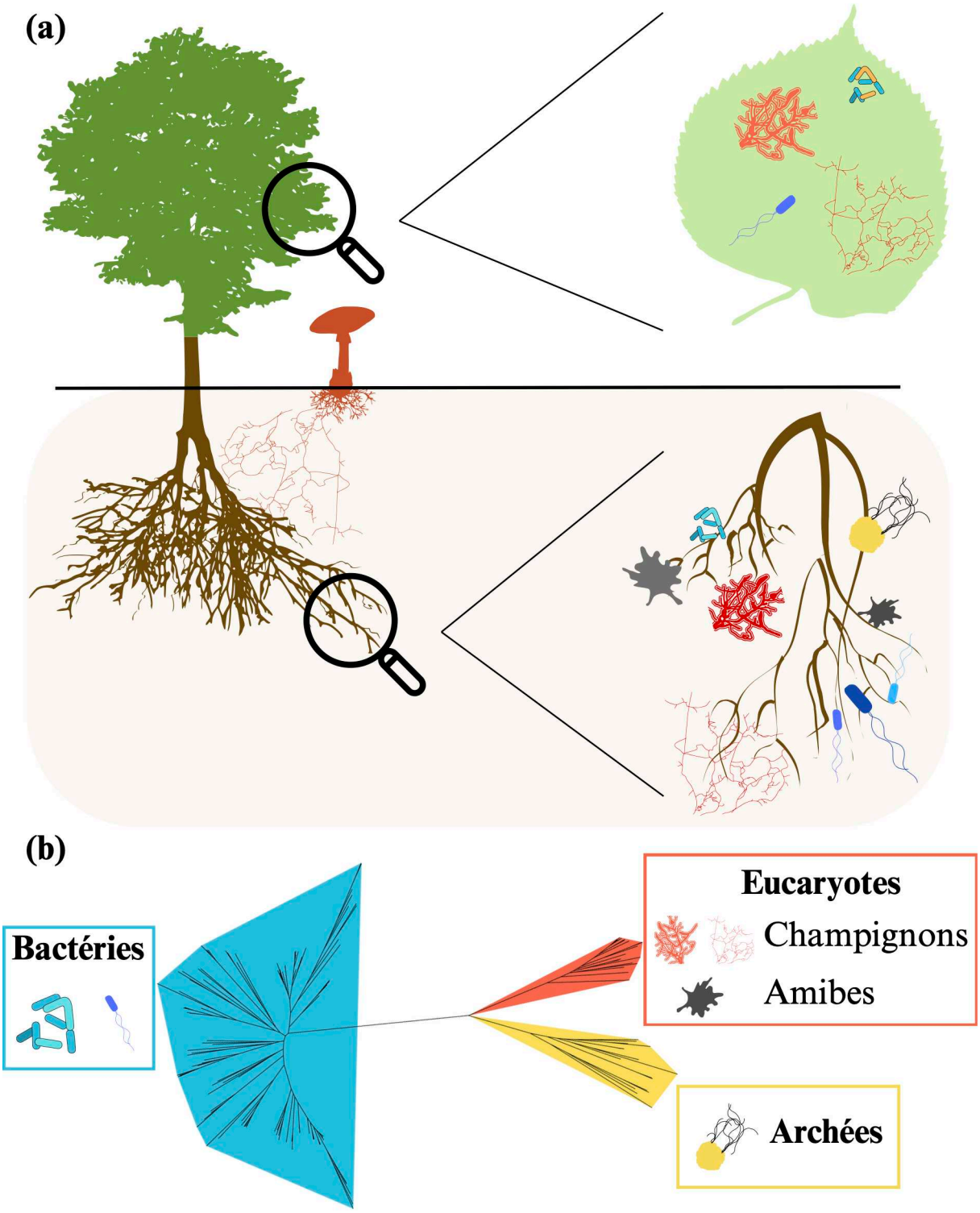


Figure I.2 Les tissus des plantes sont colonisés par une diversité de microorganismes à leur surface et au sein de leurs tissus. (a) Représentation schématique d'un arbre ectomycrhizien (par exemple ici le tilleul ; *Tilia tomentosa*) et d'un champignon ectomycorhizien (ici *Amanita muscaria* (L) Lam) colonisant ses racines. Les racines et les feuilles de l'arbre sont également colonisées par une diversité de microorganismes, tels que des bactéries, des champignons et des amibes. **(b)** Les microorganismes colonisant les tissus appartiennent aux principaux règnes du vivant (bactéries, archées, eucaryotes). L'arbre phylogénétique a été représenté en utilisant la version en ligne de iTOL (https://itol.embl.de/ ; Letunic & Bork, 2021).

1.2. Les plantes offrent une diversité de niches écologiques aux micro-organismes.

Les différents tissus des plantes sont colonisés par des microorganismes (Harrison & Griffin, 2020) et ils constituent ainsi une diversité de niches écologiques potentielles (**Figure I.2**). Cette diversité de niches peut être désignée selon une terminologie spécifique brièvement présentée ici. Le premier critère de différenciation entre ces niches potentielles consiste à déterminer si les microorganismes colonisent l'intérieur des tissus (ou endosphère) ou leur surface (épisphère ; Trivedi *et al.*, 2020). Cette différence est particulièrement importante car les plantes ont une influence majeure sur l'assemblage de leur microbiote à l'origine de différences entre épisphère et endosphère. Nous pouvons ainsi distinguer différents compartiments racinaires : la rhizosphère est la portion de sol autour des racines directement sous influence de la plante *via* par exemple la production d'exsudats racinaires (ions, oxygène, composés organiques *etc*. ; Bais *et al.*, 2006 ; Turner *et al.*, 2013) tandis que l'endosphère racinaire désigne les tissus internes à la racine. De manière similaire, il est possible de différencier la phyllosphère et l'endosphère foliaire (Nelson, 2018). Certains auteurs désignent la surface des tissus des plantes comme une niche potentielle à part faisant la transition entre les zones de l'environnement sous influence de la plante et les zones internes à la plante : ces zones sont par exemple qualifiées de phylloplan (surface foliaire) ou rhizoplan (surface racinaire ; Wang *et al.*, 2020 ; Attia *et al.*, 2022). Ces terminologies sont importantes pour définir le cadre d'étude du microbiote et discuter des potentielles différences entre compartiments (étudiées plus en détail dans la partie **I.2.1**). Toutefois, leur pertinence peut être réduite dans certains cas tels que l'étude des mycorhizes qui sont caractérisées par une colonisation endoracinaire et une croissance des hyphes dans la rhizosphère et le sol (Selosse & Le Tacon, 1998 ; **I.3.2**). Finalement, certains compartiments d'intérêt comme le sol sont souvent pris en compte dans l'étude du microbiote des plantes alors qu'il ne s'agit pas d'un compartiment de plantes à proprement parler mais qu'il présente une influence majeure sur leur microbiote comme réservoir potentiel de microorganismes (Tedersoo *et al.*, 2014 ; **I.2.1**).

1.3. Un continuum d'interactions biotiques entre plantes et micro-organismes.

Comme nous l'avons mentionné plus tôt, la définition du microbiote ne présume pas de fonctions *a priori* mais désigne uniquement l'ensemble des microorganismes présents dans un environnement donné (Berg *et al*., 2020). Ainsi, les interactions entre les plantes et leur microbiote comprennent un *continuum* d'interactions définies selon les conséquences qu'elles ont pour chacun des partenaires : ces interactions peuvent être bénéfiques pour les deux partenaires (mutualisme), bénéfique pour l'un mais délétère pour l'autre (antagonisme) et délétère pour les deux partenaires (compétition). Il existe également un ensemble d'interactions plus ou moins neutres pour les partenaires, à tendance plutôt bénéfiques pour un des partenaires mais neutres pour l'autre (commensalisme) ou délétères et neutres (amensalisme ; **Figure I.3**).

Ces interactions écologiques sont le fruit de fonctions dans lesquelles les microorganismes sont impliqués. Par exemple, divers microorganismes interviennent directement dans la nutrition des plantes et représentent des cas classiques de mutualismes. C'est le cas des rhizobiums, des bactéries qui forment une endosymbiose racinaire (nodule) permettant la réduction de l'azote atmosphérique (N_2) en ammonium utilisable par la plante (van Rhijn & Vanderleyden, 1995 ; Udvardi & Poole, 2013). Les champignons mycorhiziens participent également à la nutrition des plantes en fournissant des minéraux et de l'eau à leur plante hôte en échange de produits de la photosynthèse (Smith & Read, 2009 ; **I.3.2**). A l'inverse, un certain nombre de bactéries et champignons pathogènes sont des antagonistes de plantes (Dean *et al.*, 2012 ; Mansfield *et al.*, 2012) formant des lésions dans les tissus des plantes. Certains champignons mycorhiziens détournent une partie des produits de la photosynthèse de leur hôte et les transfèrent à une autre plante non-photosynthétique ou mixotrophe avec laquelle ils s'associent (Selosse *et al*., 2017). Ces cas de « tricherie » peuvent être considérés comme antagonistes pour l'hôte dont les ressources sont usurpées. La notion de compétition entre plantes et microorganismes est une notion plus discutée mais pourrait avoir lieu notamment pour l'accès à certains nutriments du sol tels que l'azote (expliquant les "faims d'azote" ; Kuzyakov & Xu, 2013). Finalement, un certain nombre d'associations ont des effets plus ou moins neutres pour les deux partenaires, comme c'est le cas pour divers champignons endophytes (partie **I.3.3**). Certains peuvent avoir un effet neutre pour les plantes (commensalisme), d'autre un effet positif permettant d'améliorer la résistance des plantes face à des stress environnementaux tandis que d'autres peuvent avoir des effets négatifs comme les

endophytes pathogènes latents (Rodriguez *et al*., 2009). Notons ici que le microbiome est un écosystème complexe au sein duquel l'ensemble de ces interactions écologiques peuvent se produire simultanément.

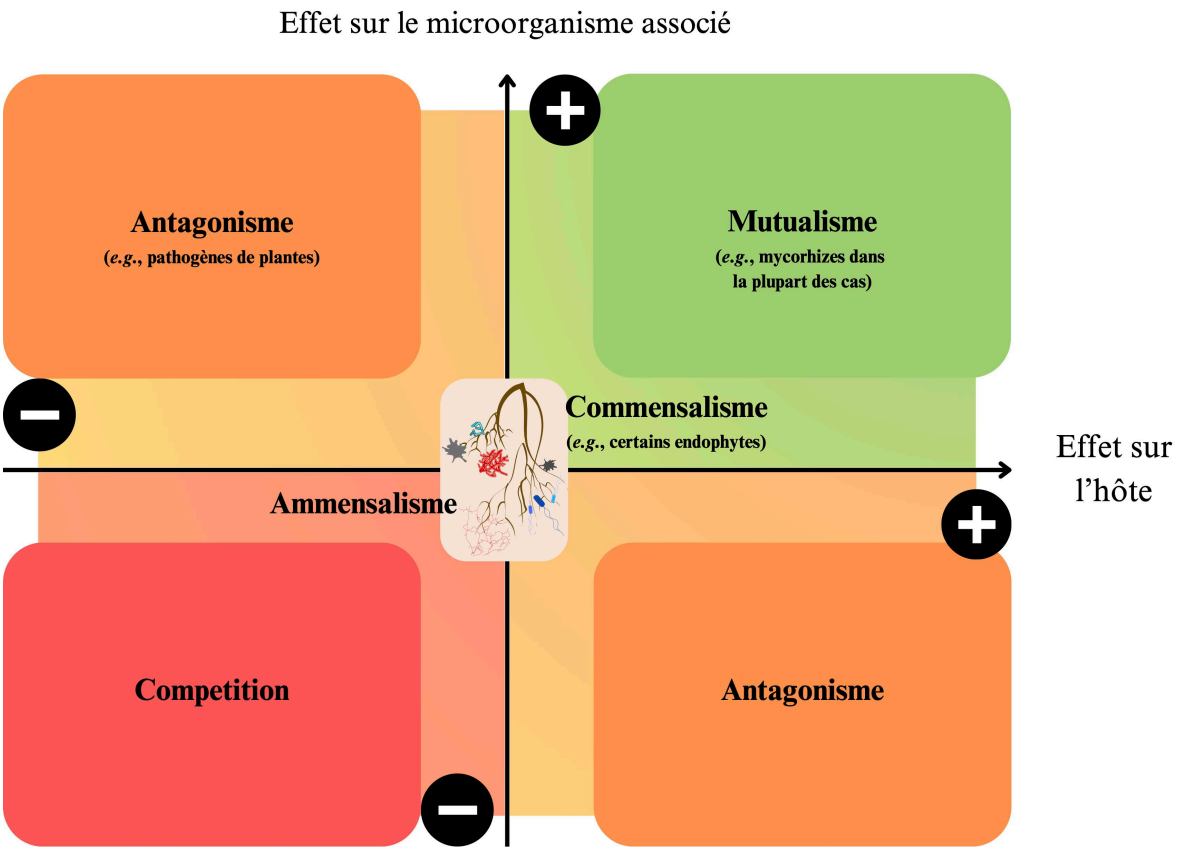


Figure I.3 Diversité des interactions écologiques entre plantes et microorganismes. Abscisse : effet sur l'hôte. Ordonnée : effet sur le microorganisme associé.

1.4. Interactions au sein du microbiome : des liaisons multipartites.

Les interactions au sein du microbiome ne sont pas limitées aux interactions bipartites microbiote-hôte. En effet, les membres du microbiote interagissent entre eux, au sein du même règne (*e.g.*, interactions champignons-champignons) ou entre règnes (*e.g.*, interactions champignons-bactéries). Le microbiome abrite donc un réel réseau d'interactions multipartites (**Figure I.4**). Ces interactions, au même titre que les interactions microbiote-hôte, couvrent une diversité d'interactions biotiques allant de la compétition au mutualisme (**Figure I.3**). Ainsi, différentes espèces de champignons ectomycorhiziens du genre *Rhizopogon* entrent en compétition pour la colonisation des racines de pins (*Pinus muricata* D. Don ; Kennedy *et al.*,

2009). Les auteurs de cette étude ont par ailleurs observé que pour la plupart des espèces de champignons étudiées, les premiers colonisateurs restaient dominants malgré l'introduction ultérieure d'autres espèces de *Rhizopogon*. Autrement dit, « j'y suis, j'y reste » : on parle d'un effet d'amorçage/fondateur (ou *priming effect*). En revanche, il est moins évident de déterminer la nature des interactions biotiques entre groupes de champignons phylogénétiquement éloignés colonisant les racines d'une même plante. Si la colonisation conjointe par des champignons endophytes et mycorhiziens peut avoir un effet bénéfique pour la plante (Zhou *et al.*, 2018 ; Xie *et al.*, 2021), des expériences en milieu contrôlé ont montré que la colonisation par des champignons endophytes diminuaient celle des mycorhiziens à arbuscules (Mack & Rudgers, 2008). Certaines bactéries facilitent le développement de champignons mycorhiziens (Frey-Klett *et al*., 2007), les *mycorrhizal helper bacteria* (bactéries facilitatrices de mycorhizes). D'autres ont des effets antifongiques limitant la prolifération de certains champignons pathogènes (Berg & Hallmann, 2006). La colonisation par les champignons peut également faciliter la colonisation par les bactéries (Palmieri *et al*., 2020). L'ensemble de ces interactions multipartites influencent donc l'assemblage du microbiote des plantes.

Finalement, les liens qu'entretiennent les microorganismes entre eux nous amènent à nous demander s'il n'existe pas un microbiote chez certains microorganismes. Des travaux ont en effet démontré que les champignons abritent un ensemble de bactéries, au sein de leurs hyphes mais également à leur surface (Bonfante & Anca, 2009 ; Naumann *et al.*, 2010 ; Bonfante *et al.*, 2019). Ces bactéries sont impliquées dans différents processus (Deveau *et al*., 2018) comme par exemple la production de composés volatiles organiques des fructifications des truffes (Splivallo *et al*., 2015).

2. Assemblage du microbiote et niches écologiques.

Les plantes sont associées à une diversité de microorganismes présents dans l'ensemble de leurs tissus et impliqués dans un grand nombre de fonctions. Une des questions fondamentales de l'écologie microbienne consiste à identifier les processus et facteurs à l'origine de cette diversité : **comment s'assemblent les microbiotes** ?

Au XXe siècle, le microbiologiste et botaniste Baas-Becking émet l'hypothèse que tous les microorganismes sont présents partout dans l'environnement sans que l'on puisse toujours les détecter mais ne se développent que lorsque les conditions environnementales leurs sont favorables : « Tout est partout, mais l'environnement sélectionne » (Baas-Becking, 1934 ; De Wit & Bouvier, 2006).

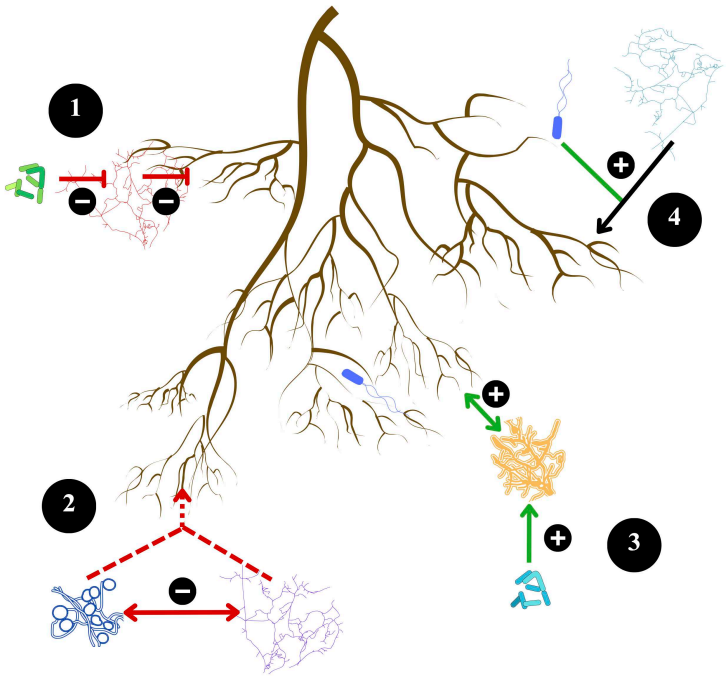


Figure I.4 Des interactions multipartites au sein du microbiome racinaire. Les membres du microbiote de la plante (racinaire par exemple) interagissent avec leur hôte mais également entre eux. Il en résulte une diversité d'interactions multipartites, intra-domaines (2) ou inter-domaines (bactéries champignons ; 1, 3, 4). Certaines bactéries limitent la prolifération de champignons pathogènes (1). Différentes espèces de champignons mycorhiziens peuvent entrer en compétition pour la colonisation des racines (2). Des espèces de bactéries favorisent le développement et le fonctionnement des mycorhizes (3). La colonisation des racines par un champignon facilite dans certains cas la colonisation par des bactéries (4).

Les nombreuses études menées au cours des dernières décennies ont remis en question cette affirmation : si l'environnement a bien une influence majeure sur le microbiote (van der Linde *et al*., 2018), d'autres facteurs entrent en jeux à différentes échelles spatiales et temporelles. A l'échelle globale, l'histoire biogéographique de la plante hôte et/ou des microorganismes la colonisant ont une influence sur la composition des microbiotes (Coleman-Derr *et al*., 2016). A l'échelle cellulaire, les voies de signalisation entre plantes et microorganismes sont directement impliquées dans le recrutement de certains partenaires fongiques **(Encadré 3** ; Kang *et al.*, 2020). Sur un temps long, l'histoire évolutive des partenaires influence l'assemblage des microbiotes (Perez-Lamarque & Morlon, 2019 ; Perez-Lamarque *et al.*, 2022) tandis qu'à plus court terme, le microbiote évolue en fonction de dynamiques temporelles, par exemple saisonnières (Vargas-Gastélum *et al.*, 2015 ; Almario *et al.*, 2022b).

2.1. Influence des facteurs édaphiques et biotiques sur l'assemblage du microbiote des plantes.

L'assemblage du microbiote des plantes est influencé par les facteurs abiotiques tels que le climat ou les conditions de sol et par des facteurs biotiques tels que les interactions entre plantes et microorganismes. Les facteurs abiotiques influençant l'assemblage des microbiotes sont nombreux et incluent, entre autres, les conditions climatiques et les facteurs édaphiques (Tedersoo *et al*., 2014). Nous nous concentrerons dans un premier temps sur l'influence des facteurs édaphique (*i.e.*, liés au sol) sur l'assemblage du microbiote.

Parmi les conditions environnementales ayant une influence sur l'assemblage du microbiote, les conditions édaphiques jouent un rôle majeur (*e.g.*, Tedersoo *et al.*, 2014 ; van der Linde *et al.*, 2018 ; Tkacz *et al.*, 2020). Parmi ces études, certaines ont étudié l'influence des facteurs édaphiques uniquement sur le microbiote du sol (une source potentielle majeure dans l'assemblage du microbiote des plantes, **I.2.2.1**), tandis que d'autres ont directement mis en lien les conditions édaphiques et le microbiote des plantes. Ces études ont permis de mettre en évidence des facteurs clés dans l'assemblage du microbiote comme par exemple l'influence majeure du pH (Lauber *et al.*, 2009 ; Tedersoo *et al.*, 2014 ; Thiergart *et al.*, 2020 ; Tkacz *et al.*, 2020), de la texture du sol (Tedersoo *et al.*, 2013 ; Prévost-Bouré *et al.*, 2014) ou de la concentration en cations (Tedersoo *et al.*, 2014 ; Nuccio *et al.*, 2016).

Les facteurs édaphiques peuvent contraindre fortement la distribution des microorganismes du sol et donc l'assemblage du microbiote des plantes. Par exemple, les milieux

désertiques présentent de nombreuses contraintes : faible pluviométrie, faible concentration de minéraux dans le sol, des sols potentiellement alcalins, forte exposition aux UVs (en particulier dans les déserts chauds), forte salinité, *etc*. Les populations microbiennes et végétales présentent de fait une structuration temporelle et spatiale. L'activité des microorganismes du sol en milieu désertique dépend largement des précipitations (Schulze-Makuch *et al.*, 2018 ; Araya *et al.*, 2020). Certaines espèces microbiennes sont adaptées aux conditions d'UVs et de dessiccation en surface (Makhalanyane *et al.*, 2015 ; Schulze-Makuch *et al.*, 2018) et peuvent donc se développer sur du sol nu, tandis que d'autres ne peuvent survivre que dans le sol ou dans un hôte, créant une structuration spatiale verticale des communautés microbiennes. Ces contraintes sont également à l'origine d'une structuration spatiale horizontale des populations (**Encadré 1**) souvent qualifiée de distribution en îlots de fertilité : les espèces végétales pérennes sont régulièrement espacées (souvent de plusieurs mètres), la concentration en minéraux du sol sous leur canopée et à leur proximité est alors plus élevée, pouvant favoriser le développement d'espèces microbiennes adaptées (Herman *et al.*, 1995 ; Bachar *et al.*, 2012 ; **Chapitre II, Article I**).

Encadré 1 Les écosystèmes désertiques, des modèles pour l'écologie* in situ *?

Les écosystèmes désertiques couvrent environ un tiers de la surface terrestre et devraient s'étendre du fait de la désertification en cours dans de nombreux écosystèmes (Intergovernmental Panel on Climate Change, 2022). Pourtant, la biodiversité de ces écosystèmes a reçu peu d'attention en comparaison aux autres biomes (Durant *et al.*, 2012 ; Harrison & Griffin, 2020).

Ils sont caractérisés par de faibles précipitations, une faible teneur en éléments minéraux et une faible diversité fongique et végétale comparée à d'autres biomes (Tedersoo *et al.*, 2014 ; Cai *et al.*, 2023). La végétation des déserts chauds est souvent discontinue dans l'espace et dans le temps. Les espèces pérennes présentent un espacement régulier de plusieurs mètres, séparées par du sol nu et formant ainsi un couvert peu dense. Sous leur canopée et à leur proximité, la concentration en minéraux du sol (carbone, azote, phosphore *etc*.) est plus élevée que dans le sol nu alentour (Schlesinger *et al*., 1996). Cette distribution spatiale est de fait souvent nommée distribution en îlots de fertilités (de Graaff *et al.*, 2014 ; Li *et al.*, 2023). Ces îlots de fertilités pourraient représenter des refuges pour la biodiversité microbienne (**Chapitre II, Article I**). Après les rares épisodes de pluie, différentes espèces éphémères germent et viennent couvrir une partie du sol nu le temps de réaliser leur cycle de vie qui est généralement court.

Ainsi, les déserts chauds présentent un couvert végétal peu diversifié, structuré dans le temps et dans l'espace. Nous pouvons supposer que l'effet réciproque des individus de la même espèce est limité, en particulier pour les espèces pérennes qui sont espacées de plusieurs mètres. Nous pensons que ces spécificités en font des modèles simples et donc d'intérêt pour l'écologie *in situ* (Fitzpatrick *et al.*, 2020).

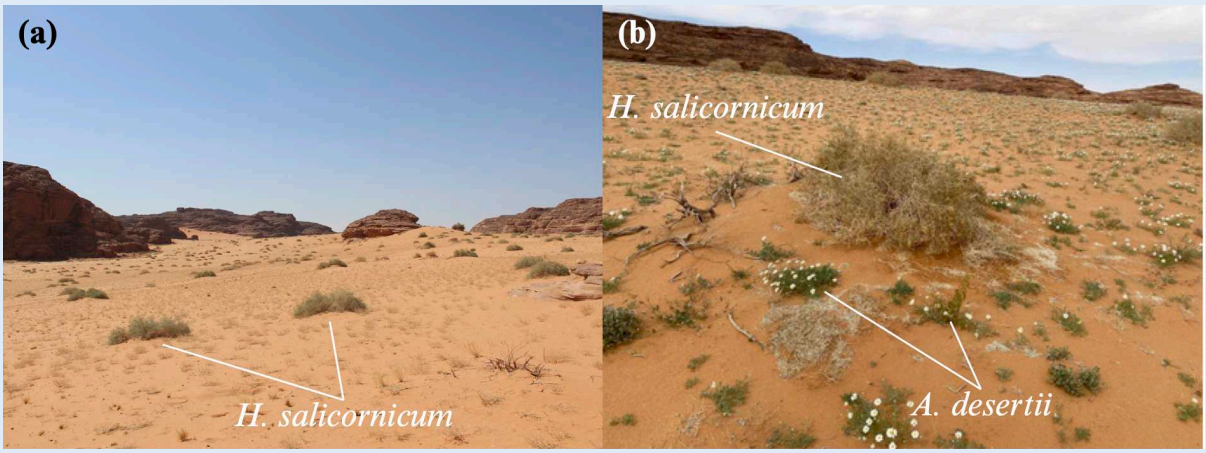


Figure I.5 Structuration spatiale et temporelle des communautés végétales en milieux désertiques : les « îlots de fertilité ». **(a)** Individus d'*Haloxylon salicornicum* régulièrement espacés de plusieurs mètres. **(b)** Présence de plantes éphémères (*Anthemis desertii*) entre les individus d'*H. salicornicum* quelques semaines après une pluie.

L'importance des facteurs biotiques dans l'assemblage du microbiote a été démontrée à de nombreuses reprises. Premièrement, l'identité des plantes hôtes est un des facteurs majeurs dans l'assemblage du microbiote en particulier à l'échelle locale (*e.g.*, Haichar *et al.*, 2008 ; Tedersoo *et al.*, 2013 ; Bonito *et al.*, 2014 ; Lugo *et al.*, 2015 ; Brigham *et al.*, 2023). Le compartiment de la plante (racines, feuilles, *etc.*) joue un rôle important dans la structuration du microbiote (Coleman-Derr *et al.*, 2016 ; Hacquard, 2016 ; Chen *et al.*, 2016 ; Fausto *et al.*, 2018). Les plantes semblent ainsi pouvoir filtrer les organismes de leur environnement direct (le sol en particulier) et donc contrôler au moins en partie l'assemblage de leur microbiote. Nous développerons ce point dans la partie **I.2.2.1**. Les facteurs biotiques ont également une influence sur les facteurs édaphiques. La production d'exsudats racinaires par la plante modifie son environnement proche, notamment la rhizosphère, ce qui provoque par exemple de modifications du pH et de la concentration en minéraux (Philippot *et al.*, 2013 ; Huang *et al.*, 2014 ; York *et al.*, 2016 ; Liu *et al.*, 2022). Dans les écosystèmes arides pauvres en nutriments, les modifications des conditions édaphiques par les organismes vivants et en particulier les plantes pourraient favoriser le développement d'autres espèces telles que les microorganismes et donc participer à la structuration du microbiote. Les plantes, et en particulier leur rhizosphère, pourraient donc être des refuges clés pour les bactéries et les champignons (Maldonado *et al.*,

2022). Il est toutefois nécessaire de noter ici que certains microorganismes du sol superficiel sont également des producteurs primaires importants (Makhalanyane *et al*., 2015) même en l'absence de plantes.

Les influences réciproques entre plantes, microorganismes et conditions édaphiques semblent donc fondamentales dans la structuration des écosystèmes (en particulier arides) et donc dans l'assemblage du microbiote des plantes. Nous étudierons comment les îlots de fertilité peuvent influencer l'assemblage des microbiotes en milieu aride (**Chapitre II, Article I**).

2.2. Transmission verticale et horizontale du microbiote

Certains symbiontes obligatoires sont transmis de génération en génération d'hôtes (transmission verticale), un phénomène documenté depuis longtemps par exemple chez les aphides et la bactérie endosymbiotique *Buchnera aphidicola* (Koga *et al*., 2012) ou encore chez les graminées et les endophytes foliaires du genre *Neoptyphytodium*. Ce mode de transmission a été proposé comme mode de transmission prédominant du microbiote intestinal des mammifères (Moeller *et al*., 2018). Un tel mode de transmission permettrait d'assurer la stabilité et la fidélité de l'interaction dans le temps (Wilkinson, 1997) et pourrait également favoriser la dépendance entre partenaires (Moran *et al*., 2019). Bien que la transmission verticale semble impliquée dans l'assemblage du microbiote de nombreux animaux (notamment le microbiote intestinal), certains symbiontes obligatoires sont recrutés dans l'environnement des hôtes végétaux (transmission horizontale) comme les champignons mycorhiziens à arbuscules qui colonisent les racines de la majorité des espèces de plantes et sont recrutés dans le sol (Kiers & van der Heijden, 2006). Finalement, le microbiote comprend une diversité de microorganismes dont les voies de transmission diffèrent. Ainsi, l'assemblage du microbiote résulte à la fois de transmissions verticales et de transmissions horizontales (Bright & Bulgheresi, 2010 ; **Figure I.6**) dans des proportions toutefois méconnues à ce jour.

2.2.1. Transmission horizontale du microbiote

Le sol présente une importante diversité de microorganismes. D'après un inventaire bibliographique récent, le sol abriterait environ 60% de la biodiversité à l'échelle globale (Anthony *et al*., 2023). Ce chiffre est variable entre groupes d'organismes : selon cette même étude, environ 90% des champignons passent tout ou partie de leur cycle de vie dans le sol

contre environ 50% des bactéries. Ainsi, le sol est un réservoir majeur de partenaires dans l'assemblage du microbiote des plantes, notamment pour les compartiments souterrains.

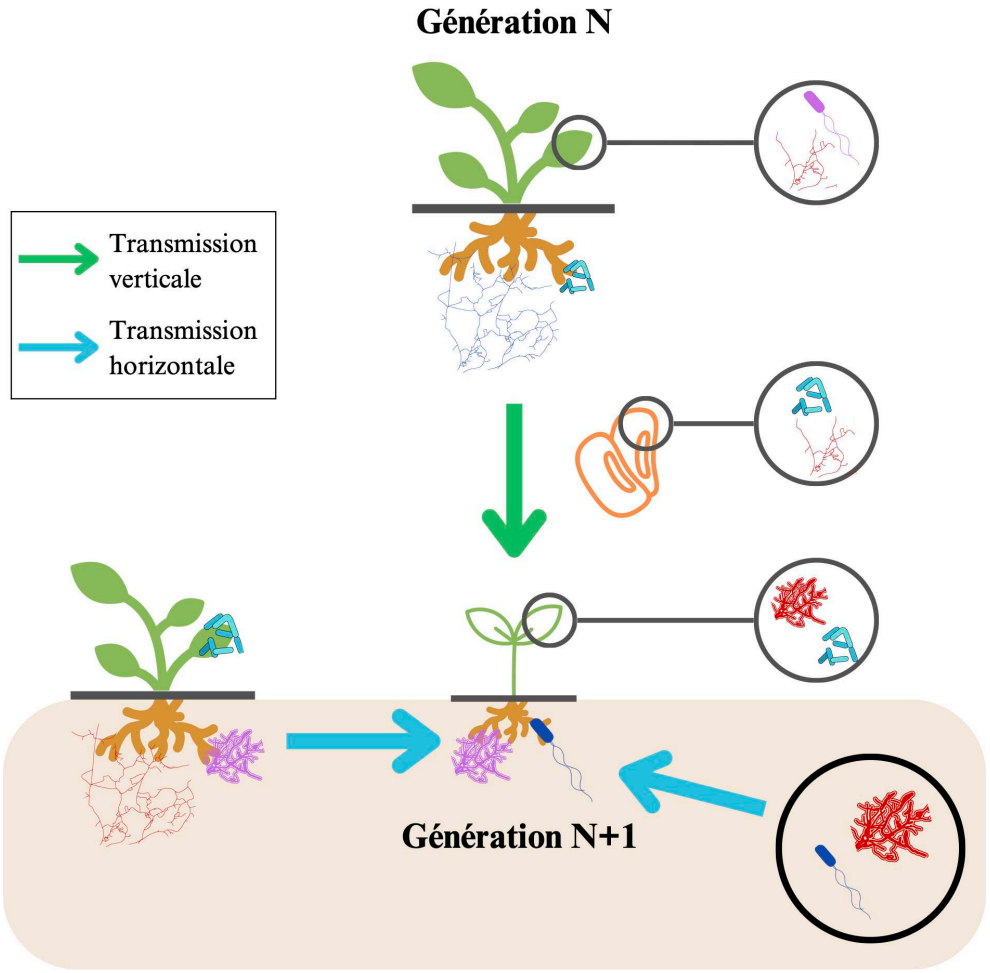


Figure I.6 Transmission horizontale et verticale du microbiote des plantes. Le microbiote peut être transmis de génération en génération de plantes, par les graines par exemple. Les microorganismes présents dans l'environnement (*e.g.*, le sol) peuvent également coloniser les tissus des plantes comme les racines ou les feuilles. Différents individus peuvent également partager une partie de leur microbiote au sein d'un même communauté (transmission horizontale).

Certains auteurs ont proposé que l'assemblage du microbiote racinaire s'opérait de manière horizontale, en plusieurs étapes : dans un premier temps, la plante recrute au sein de la rhizosphère une diversité de microorganismes, à l'origine d'une richesse localement plus importante dans ce compartiment. Un sous-ensemble est ensuite recruté au sein des tissus racinaires, le rhizoplan agissant comme barrière dans ce processus de filtrage (*two- /multi-step model* ; Bulgarelli *et al.*, 2012, 2013 ; Edwards *et al.*, 2015 ; Fournier *et al.*, 2015 ; Barajas *et*

al., 2020). Cette notion a principalement été étudiée pour le microbiome bactérien (citations précédentes) et ne se vérifie pas chez toutes les espèces de plantes étudiées : par exemple, les racines de plantes rudérales de l'expérience en pots de Barajas *et al.* (2020) présentent une diversité bactérienne supérieure à celle du sol. Quoiqu'il en soit, ces résultats indiquent que, pour les racines au moins, le sol est un réservoir important de bactéries. Une étude récente menée au champ a même démontré que le sol était un réservoir majeur pour l'assemblage du microbiote bactérien de la phyllosphère chez le maïs, le blé et l'orge, suggérant ainsi que le modèle d'assemblage par étapes depuis le sol pourrait s'étendre aux parties aériennes des plantes (Xiong *et al*., 2021).

Les champignons mycorhiziens sont également transmis horizontalement, principalement depuis le sol (Wilkinson & Sherratt, 2001 ; Kiers & van der Heijden, 2006). Diverses stratégies de dispersion permettent d'assurer cette transmission horizontale : croissance mycélienne asexuée permettant la colonisation de plusieurs hôtes (Roy *et al.*, 2008 ; Diédhiou *et al.*, 2010), fructifications permettant la dispersion de spores par des animaux (Borgmann-Winter *et al.*, 2023), dispersion de spores par le vent (Horton, 2017) et bien d'autres types de propagules (Paz *et al*., 2021). Le sol représente une banque de spores importante pour certains champignons comme suggéré par l'étude des truffes (Schneider-Maunoury *et al.*, 2019) ou encore la survie de spores de champignons ectomycorhiziens après plusieurs années passées dans le sol (Nguyen *et al.*, 2012 ; Shemesh *et al.*, 2023) mais ce n'est donc pas la seule source dans l'assemblage horizontal des communautés mycorhiziennes.

Contrairement aux champignons mycorhiziens, certains champignons endophytes colonisent également les parties aériennes des plantes (Rodriguez *et al*., 2009). Les auteurs de cette revue bibliographique ont classé les champignons endophytes en 4 groupes selon leur mode de transmission (horizontale et/ou verticale) et les compartiments qu'ils colonisent ; chacun des groupes comprend des champignons transmis horizontalement, tels que les *Dark Septate Endophytes* (endophytes septés à parois mélanisées). L'assemblage des communautés endophytes racinaires est significativement influencé par la phylogénie des plantes hôtes (Bonito *et al.*, 2014 ; Fitzpatrick *et al.*, 2018) mais également par les conditions environnementales (citations précédentes ; Glynou *et al.*, 2016 ; Thiergart *et al.*, 2020). Ces résultats suggèrent à nouveau que les endophytes sont transmis horizontalement et sont filtrés par les racines des plantes (bien que des différences métaboliques entre champignons puissent également expliquer ces observations). Des résultats similaires ont été obtenus en étudiant l'assemblage des communautés endophytes foliaires, mettant en avant un effet important de la phylogénie de l'hôte mais également une influence significative des paramètres

environnementaux et de la distribution spatiale des hôtes (Vincent *et al.*, 2016 ; U'Ren *et al.*, 2019 ; Donald *et al.*, 2020). Ces observations concordent également avec une transmission horizontale des champignon endophytes.

2.2.2. Transmission verticale du microbiote

La généralisation des techniques de séquençage a permis de mieux caractériser le microbiote de l'ensemble des compartiments des plantes dont les structures reproductives (Abdelfattah *et al*., 2022) et leur environnement direct tel que le sol (Tedersoo *et al*., 2014), permettant ainsi d'identifier les potentielles sources dans l'assemblage du microbiote. Cette caractérisation a entre autres permis de démontrer que les graines saines des plantes n'étaient pas stériles mais associées à un microbiote divers et dynamique (Klaedtke *et al.*, 2016 ; Nelson, 2018 ; Abdelfattah *et al.*, 2022). En particulier, une méta-analyse récente a permis de mettre en lumière la diversité du microbiote fongique et bactérien des graines chez une cinquantaine d'espèces de plantes de 14 familles différentes incluant les Brassicaceae et les Poaceae (Simonin *et al*., 2022), révélant d'une part leur omniprésence, et d'autre part des différences de composition entre espèces de plantes. Toutefois, certaines espèces bactériennes (*e.g.*, *Panthoea agglomerans* et *Pseudomonas viridiflava*) et fongiques (*e.g.*, *Alternaria* spp.) sont présentes dans une grande majorité des graines étudiées, quelle que soit l'espèce de plante.

Ainsi, la transmission verticale de bactéries et de champignons *via* les graines est *a priori* possible. Des exemples classiques de transmission verticale ont été documentés chez les champignons tels que les champignons des genres *Epichloe* et *Neoptyphytodium*, des endophytes foliaires de graminées dont la toxicité limite la prédation par les herbivores. Ces derniers sont transmis verticalement par les graines au cours de leur cycle asexué (Tintjer *et al.*, 2008 ; Rodriguez *et al.*, 2009). La transmission verticale a également été démontrée chez les champignons des genres *Alternaria* et *Cladosporium* dans différentes espèces de dicotylédones (*e.g.*, *Centaurea cyanus* et *Rumex acetosa* ; Hodgson *et al.*, 2014). Les spores de champignons ectomycorhiziens du genre *Scleroderma* sont transmises *via* les graines de l'essence tropicale *Coccoloba uvifera* (Polygonacaeae ; Séne *et al.*, 2018). Cette transmission est toutefois considérée comme pseudo-verticale car la colonisation des graines par le champignon se produit depuis l'environnement après dispersion.

2.2.3. Quantifier et comparer la transmission horizontale et verticale dans l'assemblage du microbiote fongique des plantes.

Le séquençage de communautés microbiennes totales a permis d'étudier plus en détail le rôle de la transmission verticale du microbiote des plantes dans son ensemble, avec toutefois une prédominance pour l'étude du microbiote bactérien. Différentes expérimentations *in vitro* ont permis de mettre en évidence une part de transmission verticale du microbiote chez différentes espèces de plantes. Johnston-Monje *et al.* (2016) ont ainsi montré que le microbiote bactérien du maïs était principalement transmis verticalement aux racines et aux feuilles des plants germés *in vitro*, tandis que le microbiote bactérien de la rhizosphère est à la fois transmis horizontalement et verticalement. Chez le chêne, Abdelfattah *et al.* (2021) ont montré une part significative de transmission verticale du microbiote fongique et bactérien, toutefois plus prépondérante dans la phyllosphère que dans les racines. Barret *et al.* (2015) ont observé une forte similarité entre le microbiote des graines avant et après germination puis une forte modification du microbiote des jeunes plants au cours du développement chez différentes espèces de Brassicacées (*e.g.*, *Brassica napus*, *Brassica rapa*). D'autres études ont tenté d'expliquer l'assemblage du microbiote des graines et mis en évidence que certaines bactéries et champignons étaient présents sur plusieurs générations (Hardoim *et al.*, 2012 ; Rezki *et al.*, 2018 ; Rodríguez *et al.*, 2020), suggérant une potentielle transmission verticale (ou pseudo-verticale, *i.e.*, une transmission par les graines de microorganismes de l'environnement). Toutefois, l'héritabilité du microbiote semble limitée et variable entre individus (Rezki *et al*., 2018). De plus, l'assemblage du microbiote des graines pourrait également être influencé par l'environnement, comme démontré par Rodríguez *et al.* (2020) qui ont observé que le microbiote du sol influençait la composition du microbiote des graines de *Setaria viridis*. La transmission verticale d'une partie du microbiote est donc possible mais cette voie de transmission n'a été étudiée que chez peu d'espèces de plantes, dont aucune de milieux désertiques.

La plupart des études menées à ce jour ont considéré séparément transmission horizontale et verticale (**I.2.2**). Notons ici toutefois trois études qui, à l'aide d'expérimentations *in vitro*, ont cherché à quantifier la contribution respective de ces deux voies de transmissions simultanément. Moroenyane *et al.* (2021) et Walsh *et al.* (2021) ont étudié l'assemblage du microbiote bactérien chez le soja et le blé respectivement, en comparant la contribution des graines et du sol, démontrant une influence majeure du microbiote des graines dans l'assemblage du microbiote des jeunes plants (14 jours de croissance dans les deux études). Des

différences entre les deux études sont toutefois notables : le sol a une influence quasi-nulle dans le cas du soja contrairement au blé, et la prévalence de transmission horizontale dépend du type de sol pour le blé. En étudiant l'assemblage des microbiotes bactériens et fongiques de *Brassica napus* (Brassicaceae), Rochefort *et al.* (2021) ont montré une influence prédominante du sol par rapport aux graines pour les jeunes plants, en particulier pour les champignons. Cette dernière étude est, à notre connaissance, la seule comparant ces deux voies de transmission pour l'assemblage du microbiote fongique.

Ces études se basent sur des expérimentations *in vitro*, ce qui présente deux limites principales dans la compréhension de l'assemblage du microbiote. Premièrement, elles ne considèrent que les premiers stades de vie de la plante alors même que des changements dynamiques se produisent très probablement au cours du développement (*e.g.*, Houlden *et al.*, 2008 ; Gao *et al.*, 2019 ; Bourceret *et al.*, 2022). Deuxièmement, les dispositifs expérimentaux *in vitro* ne permettent pas de reproduire la complexité des écosystèmes *in situ* (communautés de plantes complexes, influence du sol, du climat *etc*.). Combiner approches *in vitro* et *in situ* pourrait donc permettre de mieux appréhender l'assemblage des microbiotes (Fitzpatrick *et al*., 2020). Certains écosystèmes pourraient représenter des modèles intéressants pour l'écologie *in situ*, tels que les écosystèmes désertiques, qui présentent des communautés végétales peu diverses comparées à d'autres biomes et une forte structuration spatiale (**Encadré 1** ; **Chapitre II, Article II**).

La plupart des études cherchant à étudier la transmission horizontale et verticale n'ont pas quantifié directement ces voies de transmission mais plutôt mis en évidence des ressemblances entre microbiotes des sources potentielles et le microbiote du compartiment étudié (microbiotes de composition similaires, nombre d'OTUs partagés *etc*.) favorisant l'hypothèse d'une voie de transmission par rapport à une autre. Les méthodes statistiques permettant d'estimer la contribution de différentes sources potentielles à un microbiote d'intérêt sont en effet peu nombreuses, et ont souvent été mises au point pour déterminer des sources de contaminations potentielles (*e.g.*, Knights *et al.*, 2011) qui présentent *a priori* une contribution relativement faible au microbiote. Le développement récent de nouvelles méthodes permet d'estimer avec plus de précision la contribution d'un ensemble de sources potentielles au microbiote d'intérêt (Shenhav *et al.*, 2019 ; Briscoe *et al.*, 2023).

Encadré 2 Une théorie écologique de l'assemblage des microbiotes.

Nous avons vu qu'une grande diversité de facteurs influencent l'assemblage des microbiotes, tels que l'histoire évolutive des partenaires, leur biogéographie, les facteurs environnementaux, les voies de transmission du microbiote, *etc*. En 2010, Vellend propose un cadre conceptuel permettant d'unifier l'ensemble des nombreux facteurs écologiques qui influencent la composition des communautés, regroupés en quatre processus : la **sélection**, la **dérive**, la **spéciation** et la **dispersion**, par analogie aux principales forces évolutives. Ce cadre théorique de l'écologie des communautés peut également être appliqué aux communautés microbiennes. Le terme sélection regroupe l'ensemble des facteurs déterministes, tels que les interactions biotiques entre espèces ou l'effet de l'environnement abiotique. Le recrutement actif de microorganismes par voie de signalisation moléculaire permettant la formation de mycorhizes (**I.3.3, Encadré 3**) représente par exemple un cas de sélection. La dérive écologique correspond aux changements stochastiques (ou aléatoires) de la composition de la communauté tels que les naissances et les morts. La spéciation correspond à l'apparition de nouvelles espèces et fait le lien entre les processus évolutifs et biogéographiques et l'écologie des communautés. L'apparition de nouvelles espèces influence en effet indirectement l'assemblage de communautés microbiennes, en particulier lorsque l'on compare des régions très différentes (*e.g.*, deux continents) ou des gradients environnementaux. Dans le cadre des communautés microbiennes dont les membres ont des cycles de vie court, nous pouvons nous attendre à un rôle significatif de ce processus même à une échelle locale et relativement courte. Finalement, la dispersion correspond aux mouvements d'espèces entre communautés. Les différences de dispersion entre microorganismes ont une influence directe sur l'assemblage des microbiotes : des espèces à faible dispersion vont avoir tendance à avoir une distribution plus localisée tandis que des espèces à forte dispersion auront une distribution plus large. Bien entendu, ces processus ne sont pas indépendants et ont une influence réciproque entre eux.

Ce cadre théorique peut être appliqué à l'assemblage des microbiotes (Costello *et al.*, 2012 ; Dini-Andreote & Raaijmakers, 2018). Si les facteurs déterministes (*e.g.,* la sélection) peuvent expliquer une part significative de l'assemblage des microbiotes (**I.2.1** ; **Chapitre II, Article I**), les études ne considérant que des facteurs déterministes (même les plus complètes) n'expliquent qu'une part de la variabilité observée dans l'assemblage des microbiotes (les facteurs environnementaux et la sélection par les plantes hôtes par exemple ; van der Linde *et al.*, 2018 ; Thiergart *et al.*, 2020). Ainsi, la prise en compte de processus neutres tels que la dérive écologique ou la dispersion des microorganismes pourrait permettre de mieux comprendre l'assemblage des microbiotes.

Toutefois, l'étude de ces processus n'est pas toujours aisée, en particulier dans les études du microbiote du fait du grand nombre d'espèces en interaction (intra- et inter-règnes), de leur temps de génération court (surtout comparé à l'hôte) ou encore la difficulté de délimiter les espèces microbiennes (**Encadré 5**) et leurs fonctions (Koskella *et al*., 2017).

3. Le microbiote fongique des plantes : mycorhizes et endophytes.

Le microbiote des plantes abrite une part importante de champignons impliqués dans de nombreuses fonctions et collectivement appelés mycobiote*. Deux grandes catégories de champignons colonisant les plantes peuvent être définies selon leur type de colonisation : les champignons mycorhiziens d'une part colonisent abondamment les racines des plantes et forment des structures complexes. Les champignons endophytes d'autre part colonisent divers tissus des plantes de manière plus diffuse.

3.1. De la conquête du milieu terrestre à nos jours : évolution des interactions plantes-champignons

Comme nous l'avons vu plus haut (**I.1**) et comme nous le détaillerons ensuite pour les mycorhizes (**I.3.2**), les plantes dépendent d'un ensemble de partenaires symbiotiques pour réaliser l'ensemble de leurs fonctions. Par exemple, la quasi-totalité des espèces de plantes s'associent avec des champignons pour former des mycorhizes qui leur permettent entres autre d'assurer leur nutrition. Les associations plantes-champignons sont donc d'une importance majeure dans le fonctionnement des écosystèmes. Certains auteurs ont d'ailleurs émis l'hypothèse que la colonisation du milieu terrestre par les plantes vasculaires n'a été possible que par la mise en place de telles symbioses (Pirozynski & Malloch, 1975 ; Selosse & Le Tacon, 1998). La mycotrophie (*i.e.*, le fait de puiser ses ressources par le biais d'un partenaire fongique) aurait ainsi rendu la vie terrestre possible : « *mycotrophism made terrestrial plant life possible* » (Pirozynski & Malloch, 1975).

Les fossiles les plus anciens permettant de décrire l'interaction entre plantes et champignons ont été décrits dans la flore du chert de Rhynie, un dépôt sédimentaire du Dévonien dont l'âge estimé est de 407 millions d'années. Des associations similaires aux actuelles mycorhizes à arbuscules ont été observées dans les parties aériennes de plantes fossiles (*Horneophyton lignieri*) et sont attribuée à un champignon apparentant aux Glomeromycotina (**Figure I.7** ; Strullu-Derrien *et al.*, 2014). Par ailleurs, des pelotons formés par des champignons appartenant aux Mucoromycotina ont été observés dans les parties basales de ces plantes. Ces associations sont qualifiées de paramycorhizes car elles se produisent dans les rhizomorphes de ces plantes fossiles, qui ne possèdent pas de racines (Strullu-Derrien *et al.*, 2018)

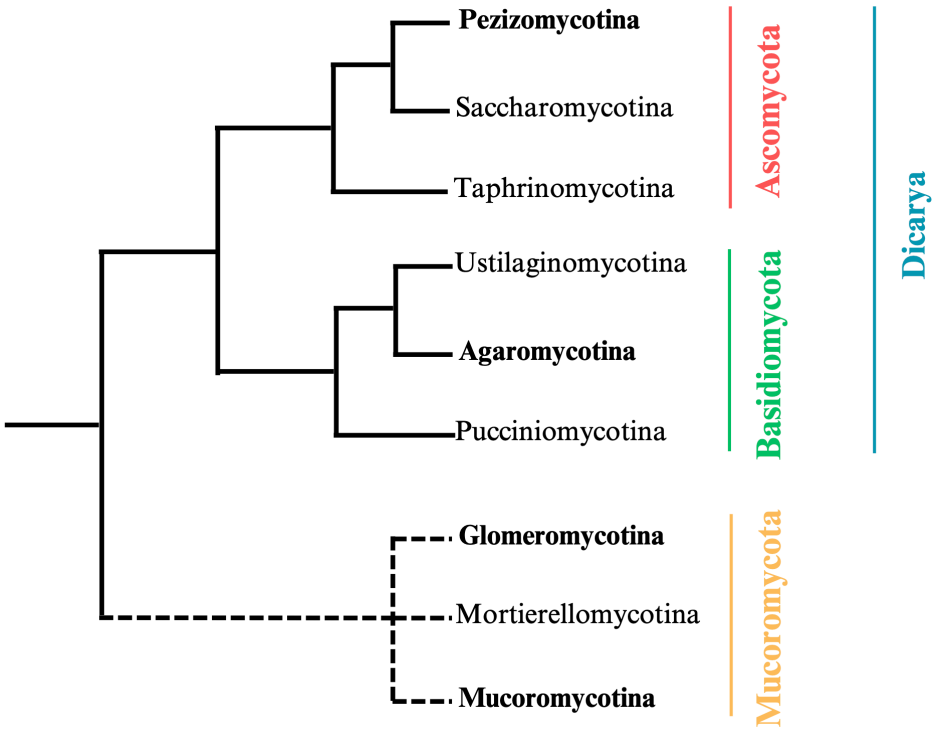


Figure I.7 Phylogénie simplifiée des principaux phylums de champignons comprenant des champignons mycorhiziens. Les liens en pointillé représentent des relations phylogénétiques incertaines. Les sous-divisions mentionnées dans ce travail apparaissent en gras. D'après Hoysted *et al.* (2018).

L'apparition de racines vraies s'est produite au sein de deux groupes de plantes vasculaires, les Lycophytes et les Euphyllophytes, mais il n'existe pas de traces fossiles d'associations mycorhiziennes racinaires connues. Les plus anciennes traces de mycorhizes racinaires datent de la fin du Carbonifère (315 Ma) : Krings *et al.* (2011) ont observé des mycorhizes arbusculaires dans les radicelles de *Lycopodiopsida*. Les observations fossiles de champignons mycorhiziens restent toutefois limitées dans le temps et dans la phylogénie des plantes : il n'existe à ce jour pas de fossiles connus d'endomycorhizes à arbuscules chez les angiospermes primitives (Strullu-Derrien *et al.*, 2018).

D'autres types mycorhiziens ont évolué plus récemment, tels que les ectomycorhizes, les mycorhizes d'orchidées et les mycorhizes d'éricacées (Selosse & Le Tacon, 1998). Les traces les plus anciennes d'ectomycorhizes ont été observées dans des fossiles de racines de *Pinus* spp. et chez des espèces tropicales dans des ambres datant respectivement de 48.7 et 52 Ma (début du Cénozoïque). Malgré le peu de fossiles disponibles, les analyses de reconstruction phylogénétique et de calibration permettent d'estimer que l'émergence de cette symbiose est plus ancienne que les fossiles observés, de manière toutefois assez imprécise (entre 270 et 174 Ma chez les Pinaceae ; Strullu-Derrien *et al.*, 2018). Cette association mycorhizienne a évolué

à de nombreuses reprises chez les plantes (chez 19 groupes d'angiospermes ; Koele *et al.*, 2012) et chez les champignons (entre 60 et 80 fois indépendamment ; Tedersoo & Smith, 2013). On retrouve des champignons ectomycorhiziens au sein de différents phylums fongiques, principalement chez les Ascomycota et Basidiomycota (Dikarya). Malgré leur diversité phylogénétique, les champignons ectomycorhiziens présentent des caractères communs. Les analyses de génomiques comparées ont par exemple permis de mettre en évidence leur origine saprotrophe (agents de pourritures blanches/brunes ; Kohler *et al.*, 2015). Les signatures génomiques des champignons ectomycorhiziens comprennent la perte de nombreux gènes impliqués dans la dégradation des parois de cellules végétales (*Plant Cell Wall Degrading Enzymes*, PCWDEs) ou encore la surexpression d'effecteurs protéiques sécrétés dans l'établissement de la symbiose (Kang *et al*., 2020 ; Peter *et al*., 2016). La perte plus ou moins complète de gènes permettant la dégradation des composés ligno-cellulosiques des cellules végétales et l'émergence de gènes impliqués dans la signalisation entre partenaires est également observée dans les champignons endomycorhiziens à arbuscules (Kloppholz *et al*., 2011), suggérant que ces caractéristiques génomiques sont une signature des associations mycorhiziennes.

Si l'origine saprotrophe des champignons ectomycorhiziens est bien attestée (Kohler *et al.*, 2015 ; Martin *et al.*, 2016), la trajectoire évolutive ayant permis le passage du mode de vie libre à l'établissement d'associations biotrophiques complexes et basées sur un dialogue moléculaire entre plantes et champignons telles que les ectomycorhizes n'est pas connue. L'endophytisme (**I.3.3**) a été proposé comme état de transition prédisposant à l'établissement d'une association plus spécifique et complexe entre la plante hôte et le champignon (hypothèse de la « salle d'attente » ; **I.3.4.2**).

3.2. Les mycorhizes.

3.2.1. Les principaux types de mycorhizes.

La plupart des espèces végétales s'associent à des champignons pour former des mycorhizes (environ 86% ; **Figure I.8a** ; van der Heijden *et al.*, 2015). Cette association symbiotique a été découverte par le botaniste allemand Albert Bernhard Frank en 1885, alors missionné par le ministre de l'agriculture prussien pour étudier le lien entre la production de truffes et la présence d'arbres (Frank, 1885 ; traduction de James M. Trappe, 2005).

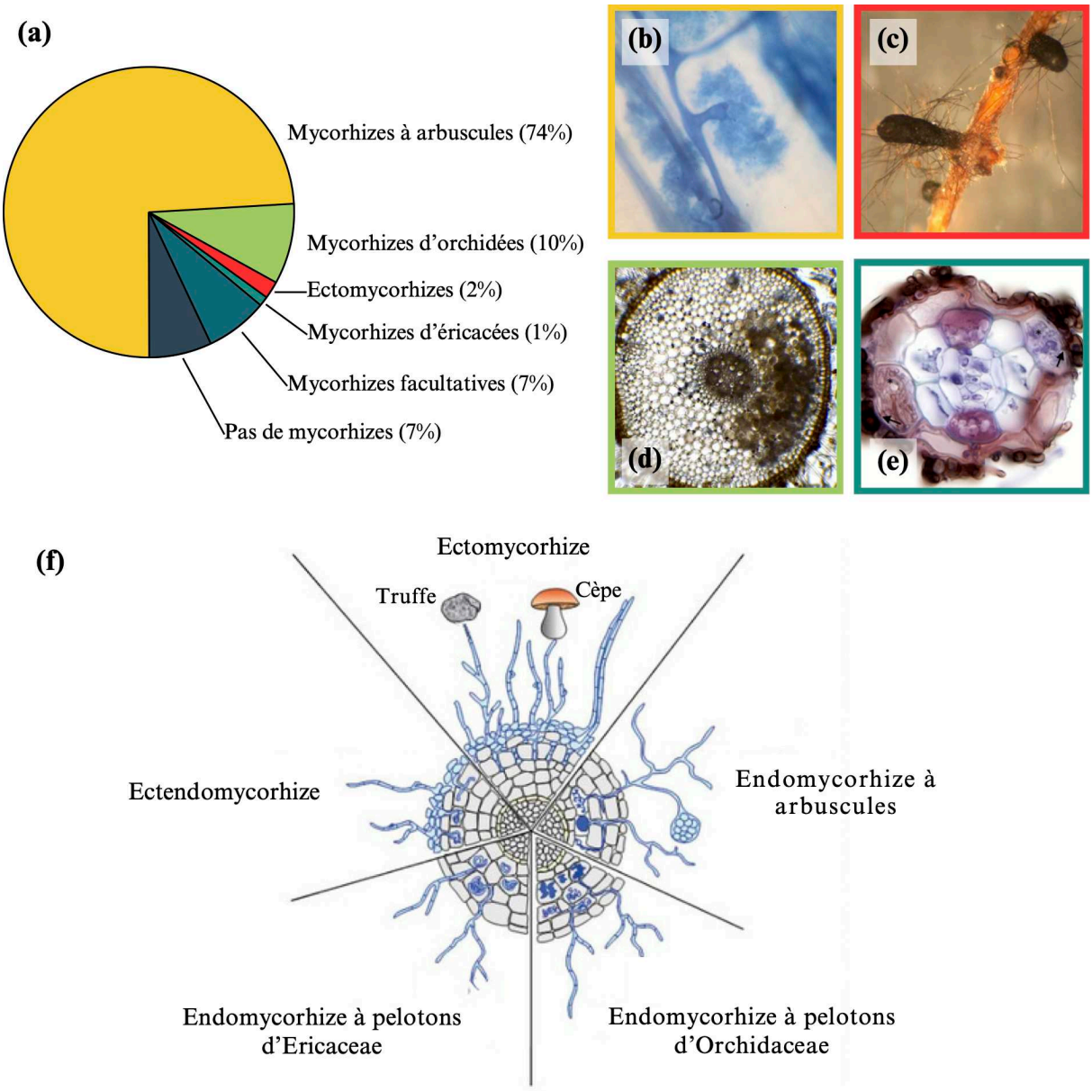


Figure I.8 Principaux types mycorhiziens. (a) Répartition des principaux types mycorhiziens chez les espèces végétales. Les pourcentages (%) indiquent le pourcentage d'espèces de plantes formant ce type d'association. D'après van der Heijden *et al.* (2015). **(b)** Arbuscule dans une cellule racinaire de maïs. P.-L. Alaux. **(c)** Ectomycorhize sur une racine de peuplier. F. Le Tacon. **(d)** Pelotons formés par un champignon mycorhizien d'orchidée (agrégats marrons). R. Petrolli. **(e)** Mycorhizes d'éricacée. **(f)** Représentation schématique de la morphologie des principaux types mycorhiziens. D'après Selosse & Le Tacon (1998).

Cette étude lui a permis de décrire une structure qu'il dénommera ectomycorhize, un type de mycorhize caractérisé par une colonisation extracellulaire du rhizoderme de la plante par des hyphes fongiques. Les différents types mycorhiziens ont historiquement été définis par leurs caractéristiques morphologiques (Selosse & Le Tacon, 1998 ; Smith & Read, 2009) et sont regroupés en quatre principaux groupes : les mycorhizes à arbuscules (AM, 74% des

espèces vasculaires), les ectomycorrhizes (EcM, 2%), les mycorhizes des éricacées (ErM, 1.5%) et les mycorhizes des orchidées (OrM, 10% ; van der Heijden *et al.*, 2015 ; Brundrett & Tedersoo, 2018). Les mycorhizes sont des organes mixtes caractérisés par une très forte densité de filaments fongiques et une structure complexe impliquant le tissu végétal et les hyphes (**Figure I.8b-f**). Certaines espèces et familles de plantes, telles que les Brassicacées ou les Amaranthacées, sont considérées comme non-mycorhiziennes et représenteraient 7% des espèces vasculaires, tandis que les 7% restant forment des associations facultatives ou incertaines. Toutefois, il existe de nombreux exemples de plantes considérées comme non-mycorhiziennes, ou appartenant à des familles considérées comme non-mycorhiziennes, pouvant en réalité s'associer à des champignons mycorhiziens de façon plus ou moins fonctionnelle comme discuté au sein des Brassicacées par Cosme *et al.* (2018).

Les mycorhizes à arbuscules sont définies par la colonisation intracellulaire des cellules végétales, avec formation de structures caractéristiques nommées arbuscules (**Figure I.8b, f**). Contrairement aux champignons ectomycorhiziens, les hyphes ne forment pas de manteau à la surface des racines. D'autres structures sont caractéristiques de certains groupes de champignons endomycorhiziens à arbuscules telles que les vésicules. Les ectomycorhizes présentent une morphologie très différente : les hyphes forment un manteau entourant la racine et colonisent l'apoplasme des cellules végétales sans colonisation intracellulaire, formant un réseau d'hyphes intercellulaire réseau de Hartig (**Figure I.8c, f**). Cette morphologie peut toutefois présenter une certaine variabilité. On observe en effet dans certains cas une colonisation intracellulaires des hyphes en plus de la formation du manteau et/ou du réseau de Hartig, une morphologie qualifiée d'ectendomycorhize et considérée comme un cas particulier des ectomycorhizes (Brundrett, 2004 ; Brundrett & Tedersoo, 2018). Ce type d'association est observée dans la symbiose mycorhizienne entre Cistaceae et champignons formant des truffes du désert (*e.g.*, *Helianthemum almeriense* et *Terfezia claveryi* ; Navarro-Rodenas *et al.*, 2012). Il existe finalement des types mycorhiziens spécifiques de certains groupes de plantes tels que les champignons mycorhiziens d'orchidées (Orchidaceae) qui colonisent les cellules végétales de manière intracellulaire et forment des pelotons (**Figure I.8d, f**) ou les mycorhiziens d'éricacées (Ericaceae ; **Figure I.8e, f**).

Nous nous intéresserons par la suite principalement aux ectomycorhizes, qui incluent le cas particulier des ectendomycorhizes. Cette symbiose mycorhizienne, fondamentale dans le fonctionnement des écosystèmes tempérés, est également observée en milieux désertiques. Nous emprunterons toutefois des connaissances acquises grâce à l'étude d'autres types mycorhiziens au besoin.

3.2.2. Rôles physiologiques des mycorhizes.

Les mycorhizes sont impliquées dans diverses fonctions vitales des plantes, au premier rang desquelles leur nutrition et elles améliorent ainsi, en général, la valeur adaptative des plantes hôtes (Hoeksema *et al*., 2010). Comme précédemment décrit, les hyphes fongiques colonisent à la fois l'intérieur des racines formant une surface d'échange importante entre la plante et le champignon mais également la rhizosphère et le sol environnant (**Figure I.8**). Du fait de leur mycélium, les champignons présentent une grande surface d'échange avec le sol ; dans le cadre de la symbiose mycorhizienne, le champignon alloue une partie de l'eau et des nutriments puisés dans le sol à la plante hôte, en échange d'une partie des produits de la photosynthèse (**Figure I.9** ; Duddridge *et al.*, 1980 ; Smith & Read, 2009 ; Bonfante & Genre, 2010). La plante transfère une part importante des produits de la photosynthèse à son partenaire fongique (jusqu'à 20% du carbone pour la symbiose ectomycorhizienne ; Hobbie & Hobbie, 2008 ; van der Heijden *et al.*, 2015 ; Hawkins *et al.*, 2023). Les champignons mycorhiziens sont donc un puit de carbone important (Hawkins *et al*., 2023). La part de minéraux du sol transféré du champignon à la plante semble plus importante, représentant environ 60% de l'azote assimilé depuis le sol (Hobbie & Hobbie, 2006). Contrairement aux champignons endomycorhiziens à arbuscules qui mobilisent l'azote inorganique du sol, les champignons ectomycorhiziens sont également capables de mobiliser la matière organique comme source d'azote (Turnbull *et al.*, 1995 ; Lindahl & Tunlid, 2015). Les champignons mycorhiziens sont aussi impliqués dans l'assimilation de phosphore, absorbé sous forme de phosphate inorganique depuis le sol voire, chez les ectomycorhiziens, mobilisé depuis la matière organique (Bonfante & Genre, 2010 ; Cairney, 2011).

Les mycorhizes ne sont pas uniquement impliquées dans la nutrition de leurs partenaires (van der Heijden *et al.*, 2015). En effet, elles procurent aux plantes une meilleure résistance face à divers stress biotiques et abiotiques, de manière directe et indirecte. L'association avec des champignons mycorhiziens améliore dans la plupart des cas la valeur adaptative des plantes (Hoeksema *et al*., 2010), permettant indirectement de résister de manière plus efficace aux divers stress. Les hyphes mycorhiziens forment également une barrière physique pouvant limiter l'infection par des pathogènes ou encore l'accumulation de métaux lourds (Branco *et al*., 2022) en particulier dans les ectomycorhizes qui forment un manteau entourant la racine. La colonisation par des champignons mycorhiziens augmente également la qualité de la réponse immunitaire de la plante : nous parlons alors d'immunité induite.

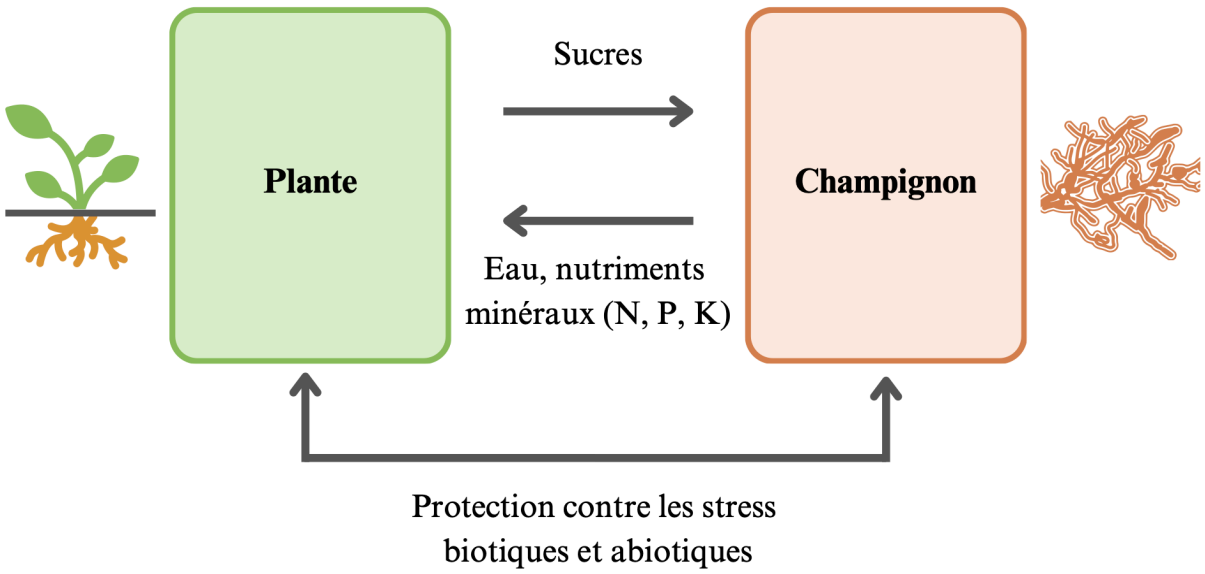


Figure I.9 La symbiose mycorhizienne permet le transfert d'eau et de nutriments du sol par le champignon à la plante en échange de sucres issus de la photosynthèse. Cette association est également impliquée dans la résistance à divers stress biotiques et abiotiques. N : azote ; P : phosphore ; K : potassium.

Cette dernière notion a principalement été discutée dans le cas de la symbiose mycorhizienne à arbuscule pour laquelle l'influence de la mycorhization sur la colonisation par des pathogènes et les mécanismes de régulation de la colonisation sont mieux connus (Pozo & Azcón-Aguilar, 2007 ; Jung *et al.*, 2012 ; **I.3.3**). Des études ont également montré que la colonisation par des champignons ectomycorhiziens limitait les effets délétères de certains pathogènes (Sinclair *et al.*, 1982 ; Gonthier *et al.*, 2019). Mieux comprendre les voies de signalisation permettant la colonisation des racines par les champignons ectomycorhiziens et divers champignons pathogènes phylogénétiquement proches (un cas de figure courant au sein des phylums Ascomycota et Basidiomycota) permettrait de mieux comprendre comment les mycorhizes peuvent moduler la virulence de certains pathogènes.

3.3. Le continuum endophyte.

3.3.1. Définition de l'endophytisme.

La grande majorité des espèces de plantes s'associent à des champignons mycorhiziens (**I.3.2**). Certaines espèces toutefois forment des associations mycorhiziennes de manière facultative tandis que d'autres semblent ne pas du tout en former (Brundrett, 2004). C'est le cas notamment de certaines espèces au sein des Brassicaceae et des Amaranthaceae (Brundrett,

2017 ; Cosme *et al*., 2018). Leurs tissus ne sont pas pour autant dépourvus de champignons. Un certain nombre de champignons forment en effet une association diffuse, sans trace apparente de parasitisme ni formation de structure complexe (**Figure I.10**) et sont appelés endophytes (du grec ἔνδον, à l'intérieur et φυτον, la plante). Wilson (1995) définit les endophytes de la sorte : « champignons ou bactéries qui, pour une partie ou tout leur cycle de vie, envahissent les tissus de plantes vivantes et causent des infections inapparentes et asymptomatiques entièrement à l'intérieur des tissus végétaux sans causer de symptômes ou de maladies ». Les interactions entre plantes et champignons endophytes peuvent aller du commensalisme au mutualisme, voire du parasitisme latent (Schulz *et al*., 2006) ; certains auteurs parlent ainsi d'un *continuum* endophyte (Schulz & Boyle, 2005). Bien que la délimitation morphologique entre mycorhize et endophytisme soit relativement claire, un grand nombre de fonctions sont communes (Brundrett, 2006 ; Rodriguez *et al.*, 2009). Certains endophytes, par exemple, sont impliqués dans la nutrition phosphatée des plantes non-mycorhiziennes telles que *Arabis alpina* L. (Almario *et al*., 2017).

Encadré 3 Dialogue moléculaire et mise en place de la symbiose mycorhizienne.

La colonisation des racines par les champignons nécessite un dialogue moléculaire en plusieurs étapes : premièrement, pour favoriser la rencontre physique entre les deux partenaires, puis deuxièmement pour assurer leur « reconnaissance » afin d'éviter la colonisation par des champignons pathogènes. Les mécanismes permettant la mise en place de la symbiose mycorhizienne sont toutefois mieux documentés pour les mycorhizes à arbuscules que pour les ectomycorhizes (cf. Bonfante & Genre, 2010 pour une revue des mécanismes impliqués dans la mycorhize à arbuscules et Garcia *et al.*, 2015 dans le cadre des ectomycorhizes).

La plante et le champignon émettent chacun des molécules dans leur environnement (ou exsudats) qui influencent le développement des deux partenaires réciproquement. Les hyphes de champignons ectomycorhiziens, tel que démontré chez l'espèce modèle *Laccaria bicolor*, émettent de l'auxine et des molécules modifiant la production d'auxine de la plante, favorisant la ramification des racines de plantes et la colonisation par le champignon (Felten *et al*., 2009). D'autres molécules peuvent être impliquées dans cette étape pré-symbiotiques, telles que l'éthylène et les sesquiterpènes (une classe de terpènes ; Ditengou *et al.*, 2015). Les plantes émettent également des molécules actives favorisant la ramification des hyphes fongiques telles que les strigolactones dans le cadre des mycorhizes à arbuscules (Bonfante & Genre, 2010) et divers flavonoïdes dans la symbiose ectomycorhizienne (Martin *et al*., 2016).

Ces flavonoïdes favorisent la production par le champignon ectomycorhzien de protéines de petites tailles, les *mycorrhiza-induced small secreted proteins* (MiSSPs). Certaines d'entre elles, comme l'effecteur MiSSP7 produit dans le cadre des ectomycorhizes modèles entre *L. bicolor* et le peuplier (*Populus* spp.), inhibent la voie jasmonique impliquée dans les défenses de la plante (Plett *et al.*, 2014 ; Daguerre *et al.*, 2020). Ce dialogue moléculaire permet ainsi d'éviter la suppression de la colonisation des racines par le champignon mycorhizien. Les MiSSPs pourraient permettre aux deux partenaires de se reconnaitre de manière spécifique du fait de leur diversité (en particulier le fait qu'un grand nombre d'entre elles sont taxon-spécifiques). Un tel mécanisme de reconnaissance spécifique entre partenaires pourrait permettre le recrutement de champignons dans le sol tels que les champignons mycorhiziens, assurant une stabilité de l'association dans le temps.

3.3.2. Un groupe polyphylétique de champignons occupant diverses niches écologiques.

Le terme endophyte étant défini par opposition à d'autres interactions mieux caractérisées (pathogènes, parasites, mycorhiziens), il est difficile d'établir des généralités concernant ce groupe de champignons. Tout d'abord, c'est un groupe polyphylétique* dont les représentants couvrent une large partie de la phylogénie des champignons. On retrouve par exemple des champignons endophytes dans les groupes basaux de champignons comme certaines espèces de Mucoromycotina (*fine root endophytes* ; Hoysted *et al.*, 2023).

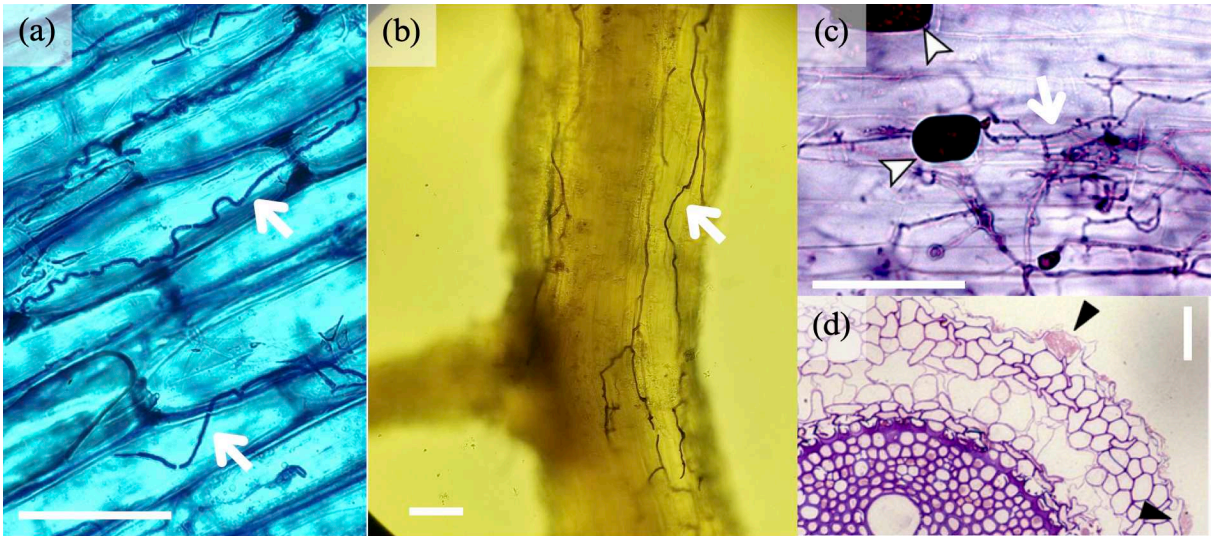


Figure I.10 (ci-dessus) Quelques exemples de champignons endophytes. (a) Hyphes de *Neotyphodium* sp. colonisant les tissus foliaires de *Festuca arundinacea* Schreb. Nick Hill. **(b)** Hyphes septés mélanisés (dark septate endophyte) dans des racines de *Poaceae* sp. **(c)** Vésicules et hyphes de Mucoromycotina colonisant les racines de *Trifolium* sp. (Hoysted *et al.*, 2023). **(d)** Hyphes de Sébacinales observés dans les racines de *Triticum aestivum* (flèches noires ; Weiß *et al*., 2011). Échelles : (a) x400. (b) 100 µm. (c) 50 µm. (d) 100 µm.

Certains groupes de champignons endophytes sont étudiés depuis longtemps, tels que les *dark septate endophytes* (Jumpponen & Trappe, 1998). Ces champignons endophytes appartiennent aux Ascomycota (Knapp *et al*., 2012) et présentent des hyphes septés et des parois mélanisées, ce qui les rend facilement détectables en microscopie optique. Les champignons endophytes peuvent être retrouvés dans de nombreux phylums (Ascomycota, Basidiomycota, Mucoromycota, Chytridiomycota), même s'ils ont été reportés plus fréquemment dans certains ordres de champignons tels que les Hypocreales, Pleosporales, Eurotiales, Helotiales et les Sordariales, quatre classes de champignons Ascomycota (Barberis *et al.*, 2021). Contrairement aux champignons mycorhiziens, les champignons endophytes ne sont pas limités à la colonisation du compartiment racinaire. Dans une revue récente, Harrison & Griffin (2020) ont mis en évidence que les champignons endophytes colonisent l'ensemble des tissus de plantes, des racines aux graines, couvrant l'ensemble de la phylogénie des plantes et l'ensemble des écosystèmes étudiés. Les communautés endophytes sont structurée en partie par l'espèce de plante et par les compartiments (Wearn *et al*., 2012) même si certains champignons endophytes sont capables de coloniser différentes espèces et différents tissus (Sánchez Márquez *et al*., 2008).

3.3.3. Nature des interactions plantes-endophytes : du mutualisme à l'antagonisme.

La notion de *continuum* endophyte a été proposée par Schulz & Boyle (2005) afin de rendre compte de la diversité des interactions entre plantes et champignons endophytes qui couvre du mutualisme à l'antagonisme. Certains endophytes colonisent les racines de plantes de manière intracellulaire et sont directement impliqués dans la nutrition de leur hôte ; ils sont de fait parfois considérés comme des *mycorrhizal-like endophytes* par certains auteurs (Almario *et al*., 2022). On retrouve parmi eux les endophytes Mucoromycotina (Sinanaj *et al*., 2021), les *dark septate endophytes* (Vergara *et al.*, 2017 ; Yakti *et al.*, 2018), certains membres de l'ordre des Sébacinales (*e.g.*, *Serendipita indica*), des Helotiales (Almario *et al*., 2017) et d'autres champignons Ascomycota (*e.g.*, *Colletotrichum tofieldiae* ; Hiruma *et al.*, 2016). Par exemple, la colonisation par les *dark septate endophytes* améliore en général la croissance des plantes

(Newsham, 2011). Les champignons endophytes semblent favoriser la croissance des plantes, en particulier dans des milieux très contraints : ils sont ainsi impliqués dans la résistance au stress (Gonzalez Mateu *et al*., 2020), favorisent la nutrition des plantes en milieux limités en azote et phosphore (Almario, *et al*., 2022) et limitent la croissance de certains pathogènes de plantes (Rodriguez Estrada *et al.*, 2012 ; González-Teuber, 2016 ; Busby *et al.*, 2016). L'effet des endophytes sur la plante peut varier selon la taxonomie des endophytes mais également au cours de leur cycle de vie et de leur niche écologique (Busby *et al.*, 2016 ; Ridout & Newcombe, 2018), démontrant une certaine plasticité dans leur écologie.

3.4. Plasticité et niches écologiques des champignons : un lien éco-évolutif entre endophytes et mycorhizes ?

3.4.1. Des niches écologiques multiples

L'écologie des champignons et en particulier des champignons mycorhiziens a souvent été étudiée au regard de leurs associations décrites historiquement. La possibilité d'étudier les communautés fongiques totales de plus en plus de niches écologiques différentes (différents biomes, différentes espèces, différents compartiments, *etc*.) a permis de mettre en évidence une plasticité écologique alors insoupçonnée chez certains champignons. Nous présenterons ici quelques exemples de niches écologiques doubles mises en évidence au sein de différents groupes de champignons, dont les niches endophytes et mycorhiziennes.

Pathogènes - endophytes Les champignons du genre *Fusarium* (Hypocreales, Ascomycota) sont en grande majorité considérés comme des champignons pathogènes de plantes (Ma *et al*., 2013). Toutefois, certains représentants de ce genre ont été isolés et détectés par séquençage à partir de tissus sains à de nombreuses reprises dans les racines de peuplier (*Populus* spp. ; Bonito *et al.*, 2016), dans les racines de plantes du genre non-mycorhizien *Microthlaspi* (Glynou *et al*., 2018) ou encore dans les graines, feuilles et fleurs de Poacées non cultivées en milieu naturel (en particulier une espèce pathogène, *Fusarium graminearum* ; Lofgren *et al.*, 2018).

Saprotrophes - endophytes L'endophytisme a également été documenté chez des champignons alors considérés saprotrophes. Smith *et al.* (2017) ont démontré en mésocosome que les racines de *Picea abies* et *Pinus sylvestris* pouvaient être colonisées par certaines espèces documentées comme saprotrophes en inoculant une variété de champignons saprotrophes

Basidiomycota, suggérant la possibilité d'établir des interactions biotrophiques avec la plante. Certaines espèces (*e.g.*, *Phellinus igniarius*) forment même des structures typiques des ectomycorrhizes tel qu'un réseau de Hartig, sans démonstration d'échanges nutritionnels. Certaines espèces du genre *Mycena* colonisent *in vitro* les racines de *Betula pendula*, forment un manteau et sont impliquées dans un transfert de phosphore (Thoen *et al*., 2020)

Saprotrophes - mycorhiziens Certains champignons mycorhiziens possèdent des traits proches de champignons saprotrophes. Cette potentielle niche écologique a été discutée à plusieurs reprises (*e.g.*, Lindahl & Tunlid, 2015 pour les champignons ectomycorhiziens). Chez ces derniers, la capacité à dégrader de la matière organique ne leur permet pas de vivre librement en tant que saprotrophe. En revanche, certains Leotiomycota (Ascomycota, mycorhiziens d'Ericaceae) sont également des saprotrophes (Martino *et al*., 2018). D'autres champignons appartenant à des genres supposés saprotrophes sont également capables de former des mycorhizes tels que certains représentants du genre *Mycena* (Basidiomycota) chez des Orchidées non-chlorophylliennes (Selosse *et al*., 2010) et chez plusieurs espèces d'Ericacées (Grelet *et al*., 2017).

Mycorhiziens – endophytes L'ordre des Sebacinales représente, à ce jour, l'exemple le plus détaillé de la double niche endophyte/mycorhiziens. *Serendipita indica* (Serendipitaceae) est un champignon mycorhizien d'orchidées retrouvé en tant qu'endophyte dans un grand nombre de plantes (Selosse *et al*., 2009). Il est également capable *in vitro* de se développer en tant que saprotrophe sur des racines mortes (Zuccaro *et al*., 2011). L'ordre des Sébacinales comprend une diversité de champignons mycorhiziens (ectomycorhiziens, mycorhiziens d'orchidées et d'éricacées), ainsi que des champignons endophytes phylogénétiquement proches, pouvant suggérer une double niche mycorhizienne/endophyte (Weiß *et al*., 2016). Des expériences *in vitro* ont également mis en évidence que le champignon ectomycorhizien *Tricholoma matsutake* (Basidiomycète) pouvaient coloniser de manière endophyte les racines de plantes non-ectomycorhiziennes tels que *Cedrela odorata* et *Prunus speciosa*, deux arbres connus pour former des mycorhizes à arbuscules (Murata *et al.*, 2013, 2014). Comme suspecté par Plattner & Hall (1995), il a été démontré plus récemment que certaines espèces du genre ectomycorhizien *Tuber* (Ascomycota) pouvaient également coloniser les racines de plantes non-ectomycorhiziennes (Gryndler *et al.*, 2014 ; Schneider-Maunoury *et al.*, 2018, 2020). Yung *et al.* (2021) ont également trouvé une forte proportion de séquences de champignons ectomycorhiziens (*Inocybe* spp., Basidiomycota) dans les racines d'orties (*Urtica dioica*, non-mycorhizienne) se développant sous des peupliers.

3.4.2. Niches écologiques multiples et histoire évolutive : l'hypothèse de la salle d'attente.

Comme nous l'avons vu plus haut (**I.3.2-3.4**), les champignons endophytes et mycorhiziens semblent capables de coloniser des niches écologiques variées dont certaines ont souvent reçu peu d'attention. Cette plasticité écologique pourrait donc être plus courantes qu'attendu. La capacité que présentent certaines espèces ou groupes d'espèces phylogénétiquement proches à coloniser plusieurs niches écologiques pourrait être héritée de l'histoire évolutive de ces champignons.

Brundrett (2006) a émis l'hypothèse selon laquelle l'endophytisme serait un prérequis à l'établissement de mycorhizes. Selosse *et al.* (2009) ont ensuite défini l'hypothèse évolutive de la « salle d'attente » (ou *waiting room hypothesis*) stipulant que l'endophytisme était l'une des interactions biotiques ayant permis le passage du mode de vie libre saprotrophe à l'association complexe et intime qu'est la mycorhize. En effet, si l'origine saprotrophe des champignons mycorhiziens (EcM, OM et ErM) est attestée (Kohler *et al*., 2015), les étapes ayant permis la mise en place de ces symbioses complexes ne sont à ce jour pas élucidées. La possibilité d'établir à la fois des associations mycorhiziennes et endophytes serait ainsi une trace de cette histoire évolutive (Selosse *et al*., 2018). Toutefois, cette double niche écologique potentielle n'a à ce jour reçu que peu d'attention, en particulier chez les champignons ectomycorhiziens. La symbiose ectomycorhizienne représente pourtant un modèle potentiel d'évolution convergente intéressant, ayant évolué au moins 70 fois de manière indépendante dans des groupes phylogénétiques très différents pouvant donc couvrir un large spectre de trajectoires évolutives.

4. Mycobiote et champignons mycorhiziens comestibles : le cas des truffes.

Certains champignons mycorhiziens produisent des carpophores (ou fructifications) comestibles et recherchés par les gourmets et amateurs (Zambonelli & Bonito, 2012). Parmi ces champignons, les truffes font figure d'emblèmes recherchées et appréciées depuis l'antiquité (Le Tacon, 2017). Dans cette partie, nous présenterons la diversité des champignons formant des truffes, puis nous expliquerons en quoi ce sont des espèces en cours de domestication (proto-domestication) et nous verrons pour finir comment l'étude de leur écologie *in situ* peut être utile dans une perspective de production.

4.1. Diversité des champignons producteurs de truffes.

Historiquement, le terme « truffe » désigne un ensemble de champignons produisant des carpophores (la structure permettant la production des spores méiotiques) hypogés et parfois semi-hypogés (*i.e.*, sous le sol ou à l'affleurement du sol ; Læssøe & Hansen, 2007) qui ont évolué des dizaines de fois indépendamment dans l'ensemble de l'arbre phylogénétique des champignons (Bonito & Smith, 2016). Les champignons produisant des truffes forment donc un groupe polyphylétique qui regroupe des taxons fongiques divers (**Figure I.11**). Toutefois, les truffes prisées par les consommateurs appartiennent surtout aux Ascomycota et en particulier aux Pezizales (Læssøe & Hansen, 2007). Dans la littérature scientifique, la dénomination truffe est principalement utilisée de deux manières :

- Les truffes au sens strict désignent les espèces du genre *Tuber* uniquement, dont certaines espèces sont emblématiques et très recherchées pour la consommation telles que la truffe noire du Périgord (*Tuber melanosporum*) ou la truffe blanche du Piémont (*Tuber magnatum* ; Zambonelli *et al.*, 2016). *Tuber* est le seul genre ne présentant que des espèces formant des truffes. Dans leur ouvrage de référence, Zambonelli *et al.* (2016) parlent de truffes « vraies ».
- Le terme truffes peut également désigner l'ensemble des espèces de champignons formant des carpophores hypogés ou semi-hypogés ; ce sens désigne donc un groupe polyphylétique (Bonito & Smith, 2016).

Dans ce travail, nous utiliserons le terme truffes pour désigner les champignons Ascomycota formant des carpophores hypogées, présents dans trois clades au sein de l'ordre

des Pezizales (**Figure I.11** ; Læssøe & Hansen, 2007). Notons ici que le terme truffe, qui désigne à proprement parler le carpophore, est quelque fois utilisé par extension pour désigner l'espèce de champignon produisant le carpophore.

Un grand nombre d'espèces fongiques forment des truffes. Le genre *Tuber*, par exemple, comprend à lui seul 180 espèces *a minima* produisant toutes des truffes (Bonito *et al.*, 2010 ; Bonito & Smith, 2016). Il n'y a à notre connaissance pas d'estimations du nombre d'espèces formant des truffes mais cette morphologie de carpophore ayant évolué au sein d'au moins 13 ordres de champignons, nous pouvons supposer que ce nombre est très élevé. On retrouve des champignons formant des truffes dans l'ensemble des écosystèmes terrestres, jusque dans les écosystèmes désertiques (Trappe *et al.*, 2008b ; Moreno *et al.*, 2014). Les Tuberaceae sont présents sur l'ensemble des continents, avec un taux d'endémisme en général élevé (Bonito *et al*., 2013). C'est le cas par exemple de *Tuber melanosporum*, qui est endémique des régions calcaires du sud de l'Europe (Murat *et al.*, 2004 ; García-Cunchillos *et al.*, 2014), quoique des introductions aient eu lieu hors de cette zone (**I.4.2**).

Le terme truffes du désert désigne un ensemble d'espèces se développant dans les milieux désertiques formant des carpophores hypogés et semi-hypogés appartenant à différents genres, dont les plus prisées pour la consommation sont les espèces des genres *Terfezia*, *Picoa* et *Tirmania* (Kagan-Zur *et al*., 2014). La distribution de l'ensemble de ces genres est large et on retrouve des truffes du désert dans l'ensemble des continents (Kagan-Zur *et al*., 2014). La formation de structures hypogées semble permettre au champignon de résister à la dessiccation, une adaptation particulièrement pertinente en milieu aride (Thiers, 1984) et donc représenter une adaptation intéressante en milieu désertique chaud.

4.2. Des champignons mycorhiziens proto-domestiqués.

4.2.1. Les truffes sont formées par des champignons mycorhiziens.

La quasi-totalité des espèces de Pezizales formant des truffes sont également mycorhiziennes, en particulier ectomycorhiziennes (Tedersoo *et al*., 2006). Les espèces du genre *Tuber*, par exemple, sont des champignons ectomycorhiziens communs des écosystèmes tempérés s'associant avec diverses essences d'arbres telles que les chênes, les noisetiers, divers pins et même avec des espèces arbustives de la famille des Cistaceae (Pacioni & Comandini, 1999 ; Frank, 2005 ; Le Tacon, 2017). Les truffes du désert forment également des associations

ectendomycorhiziennes avec différentes espèces de Cistaceae (Kovács & Trappe, 2014 ; Roth-Bejerano *et al.*, 2014), caractérisées par la formation d'un manteau plus ou moins dense selon les espèces (Roth-Bejerano *et al*., 2014). La morphologie des ectendomycorhizes varie en fonction des conditions abiotiques : Navarro-Ródenas *et al.* (2012) ont montré *in vitro* que la colonisation des racines d'*Helianthemum almeriense* par *Terfezia claveryi* était plus importante et principalement ectomycorhizienne en l'absence de source de phosphate, tandis que l'apport d'une source de phosphate inorganique diminuait la colonisation des racines et favorisait la pénétration intracellulaire. Le stress hydrique semble favoriser la mycorhization et le développement intracellulaire des hyphes (Navarro-Ródenas *et al*., 2013). Certains auteurs suggèrent donc de qualifier cette interaction de *continuum* ectendomycorhizien (Navarro-Ródenas *et al*., 2012).

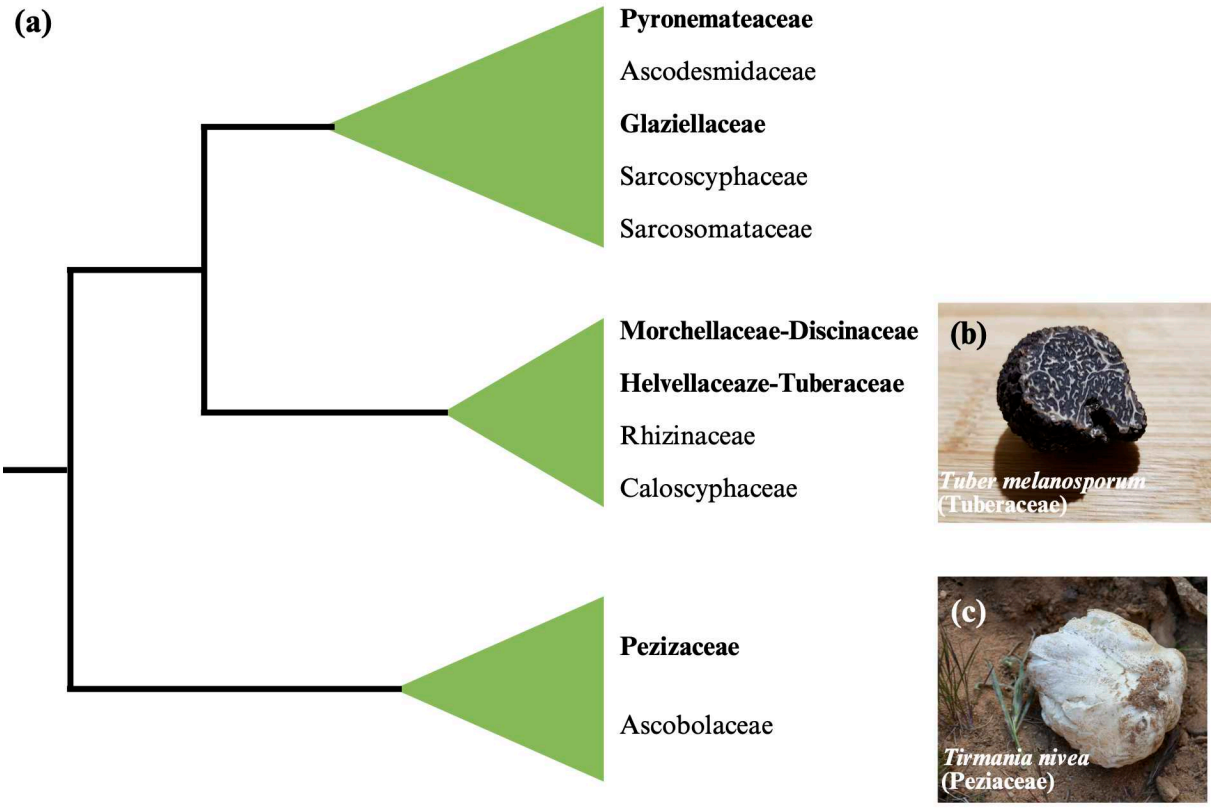


Figure I.11 Les truffes au sein des Pezizales. (a) Phylogénie simplifiée des Pezizales. Les familles comprenant des espèces formant des truffes sont en gras. Adapté d'après Læssøe & Hansen (2007). **(b)** Carpophores de *Tuber melanosporum* (Tuberaceae). M.-A. Selosse. **(c)** Carpophore semi-hypogé de *Tirmania nivea* (Peziaceae). M. Ducousso.

4.2.2. Des espèces cultivées mais pas complètement domestiquées.

Bien qu'historiquement récoltées dans des milieux naturellement producteurs (Trappe *et al.*, 2008a, 2008b ; Le Tacon, 2017), les truffes, notamment du genre *Tuber*, sont de nos jours majoritairement récoltées dans des plantations (Morte *et al.*, 2008 ; Murat, 2015). La culture de truffes en plantation a été grandement favorisée par le développement de méthodes d'inoculation des jeunes plants dans les années 1970 (cf. Murat, 2015, pour un historique du développement et de la commercialisation des plants mycorhizés par des espèces du genre *Tuber*). Cette méthode a notamment permis la culture de *Tuber melanosporum*, *Tuber aestivum*, et plus récemment de *Tuber magnatum* (Le Tacon, 2017 ; Bach *et al.*, 2021). La mycorhization de plants d'Hélianthèmes (*Helianthemum* spp., Cistaceae) a également permis le développement de plantations de *Terfezia* spp. (en particulier *T. claveryi* et *T. boudieri*) dans des régions arides de l'Espagne et de certains pays du pourtour méditerranéen (Morte *et al.*, 2012 ; Morte & Andrino, 2014). La possibilité de produire des plants mycorhizés a favorisé le développement de plantations hors de la zone d'endémisme des truffes, comme chez les truffes du genre *Tuber* dont certaines espèces sont également cultivées en Amérique, en Australie, en Chine ou en Nouvelle-Zélande (Hall *et al*., 2017 ; Le Tacon, 2017).

Si certaines espèces de truffes sont aujourd'hui principalement récoltées dans des truffières plantées (*e.g.*, *T. melanosporum*), ces espèces ne sont pas pour autant à proprement parler domestiquée : nous sommes en effet capables de favoriser leur production grâce à différentes méthodes culturales mais nous ne sommes pour autant pas encore capables d'en initier la (re)production (Selosse, 2020). Les espèces du genre *Tuber* sont hétéro-thalliques (hermaphrodite sans possibilité d'autogamie) : elles se reproduisent de manière sexuée, impliquant la fusion de deux individus haploïdes présentant des types sexuels différents (ou *mating types*, abrégés MAT ; **I.4.3** ; Riccioni *et al.*, 2008 ; Martin *et al.*, 2010). Malgré de nombreuses avancées sur la connaissance du cycle de vie de la truffe, notamment *Tuber melanosporum* (**Figure I.12**), les structures « paternelles » impliquées dans la reproduction sexuée n'ont toujours pas été identifiées formellement. Divers résultats suggèrent que les spores du sol pourraient germer de manière ponctuelle et agir comme individu paternel dans la reproduction (**I.4.3 ;** une présentation vulgarisée de ces résultats est également accessible en **Annexe 1**). Cette hypothèse n'a été évaluée expérimentalement qu'à une seule reprise par Taschen *et al.* (2022) chez *Tuber melanosporum*. En inoculant des spores autour d'arbres producteurs, les auteurs ont démontré que les spores avaient une contribution paternelle dans

un des trois sites étudiés. L'absence de lien génétique significatif entre les spores apportées et les truffes récoltées dans deux des sites pourrait être liée au faible contraste génétique entre les génotypes déjà présents avant inoculation et les spores apportées dans cette étude, limitant l'analyse statistique des relations de parentés. La démonstration expérimentale de la contribution paternelle des spores dans la reproduction sexuée de *Tuber melanosporum* nécessite donc d'autres travaux et fait l'objet de la partie 2 du **Chapitre IV** (**IV.2**) de cette thèse.

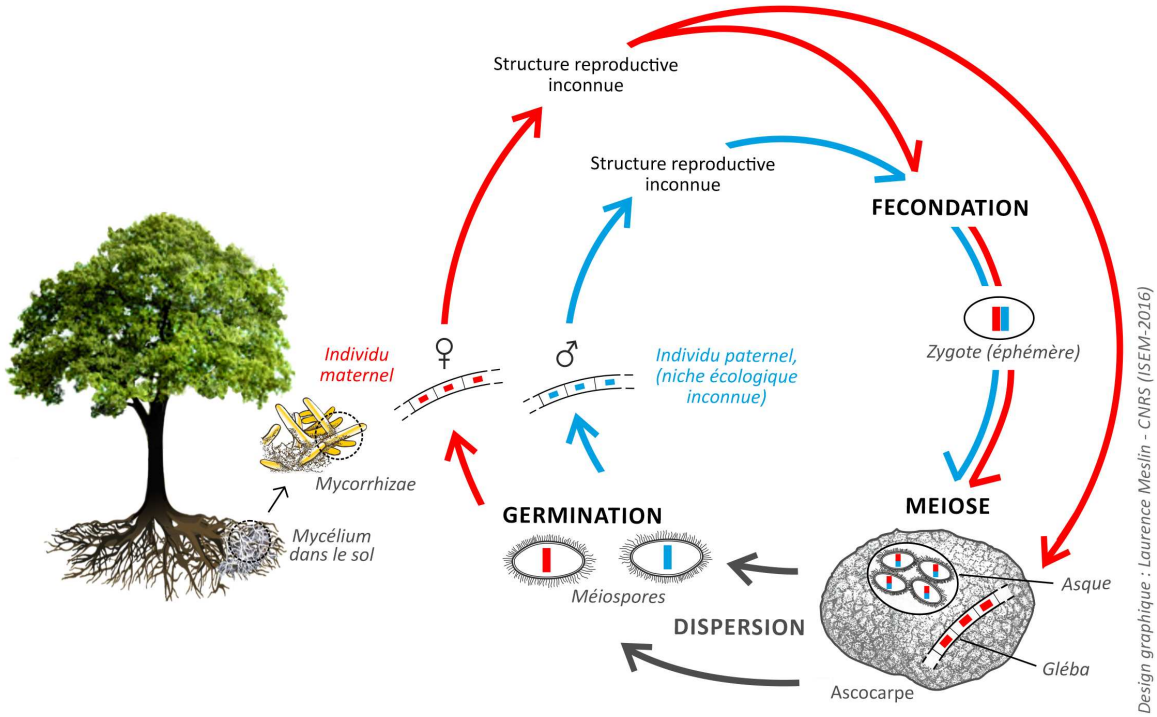


Figure I.12 Cycle de vie de *Tuber melanosporum*. D'après Selosse *et al.* (2017b).

4.3. De l'écologie *in situ* à la production de truffes.

L'étude de l'écologie et de la biologie des truffes dépend d'observations *in situ*. En effet, bien qu'il soit possible d'isoler du mycélium de truffes en culture (*e.g.*, Mischiati & Fontana, 1993 ; Murat, 2004 ; Morte *et al.*, 2008), la reproduction sexuée de ces champignons n'a pas pu être obtenue à ce jour en conditions *in vitro*. De fait, l'étude *in situ* est nécessaire à l'étude de ces champignons afin de comprendre leur écologie mais également leur biologie, en particulier reproductrice. Ces éléments de compréhension sont primordiaux pour la production de truffes. Trois principaux leviers interviennent en effet dans la production de truffes : (i)

favoriser l'établissement du champignon, (ii) initier ou favoriser sa reproduction, puis (iii) assurer le développement des fructifications jusqu'à maturité.

Encadré 4 La reproduction sexuée des champignons (en particulier des truffes).

Les champignons peuvent se reproduire de manière asexuée (*via* diverses propagules tels que des spores asexuées ; Taylor *et al.*, 2015), résultant en la production d'un clone (*i.e.*, un individu présentant le même contenu génétique que le parent).

D'autres espèces se reproduisent de manière sexuée, impliquant la fusion de deux cellules haploïdes (plasmogamie) et de leur noyau (caryogamie), suivie d'une méiose permettant la production de spores haploïdes recombinantes (*i.e.*, issue de la recombinaison du matériel génétique des deux partenaires haploïdes). Ce mode de reproduction est donc à l'origine d'un brassage génétique. On distingue deux types de reproduction sexuée chez les champignons : homothallique et hétérothallique (Ni *et al*., 2011). Chez les champignons homothalliques, la fécondation se produit au sein du clone (autofécondation ou croisement consanguin). Chez les champignons hétérothalliques, la fusion a lieu entre deux individus différents et est contrôlée par un système d'incompatibilité sexuelle, ou *mating type*. Les espèces présentent en général deux formes alternatives d'incompatibilité (quatre dans certains cas) que l'on qualifie d'idiomorphes car contrairement à des allèles, les gènes idiomorphes ne sont pas deux variants nucléotidiques d'un même gène mais deux ensembles de gènes différents codant pour deux protéines complémentaires impliquées dans la reconnaissance des types sexuels. La fusion des hyphes ne peut se produire qu'entre hyphes présentant des *mating types* différents. Chez les truffes, deux idiomorphes ont été identifiés, comme chez de nombreux Ascomycota : MAT1-1 et MAT1-2. L'identification d'un seul de ces gènes idiomorphes par haplotype (et dans certain cas des deux gènes dans les spores) a permis de confirmer une reproduction hétérothallique chez de nombreuses espèces de Pezizomycota : *Tuber melanosporum* (Martin *et al.*, 2010 ; Rubini *et al.*, 2011), *T. borchii* (Leonardi *et al.*, 2020), *T. aestivum*, (Molinier *et al.*, 2016 ; Staubli *et al.*, 2022) et plusieurs espèces de Pezizomycota (Murat *et al*., 2018). Récemment, le séquençage du génome d'espèces formant des truffes du désert a mis en évidence la présence de ces *mating types* chez *Terfezia claveryi*, *T. boudieri* et *Tirmania nivea* (Marqués-Gálvez *et al.*, 2021).

Indépendamment de l'incompatibilité sexuelle liée aux *mating types*, les partenaires impliqués dans la reproduction hétérothallique peuvent être caractérisés selon leur contribution respectives au cours de la reproduction (jamais observés mais supposés dans le genre *Tuber*) : un individu receveur (ou « femelle ») présente une structure fertile (ascogone) munie d'un

hyphe spécialisé (le trichogyne) qui capte les noyaux de l'individu donneur (ou « mâle »). Le zygote ainsi formé se développe alors sur le tissu receveur (ou « femelle »), comme c'est le cas chez *Tuber melanosporum*. En effet, l'individu « maternel » est impliqué dans la formation des tissus haploïdes de la fructification : le péridium qui est la couche protectrice extérieure et la gléba qui est le tissu matrice englobant les spores. Ces tissus maternels sont également impliqués dans la formation des ectomycorhizes environnantes (Selosse *et al*., 2017) et colonisent éventuellement en endophytes les racines de plantes herbacées non-hôtes (Schneider-Maunoury *et al*., 2020). Leurs hyphes sont également présents dans le sol environnant. Ces individus maternels persistent souvent sur plusieurs années, et ont tendance à s'agréger par types sexuels (De la Varga *et al*., 2017). La nature et le mode de vie de l'individu paternel sont en revanche à ce jour toujours inconnus. Les génotypes paternels sont plus rarement retrouvés d'une année sur l'autre et participent en général à la formation d'une seule fructification (Murat *et al.*, 2013 ; Taschen *et al.*, 2016). Finalement, les populations de truffes présentent souvent des patrons d'isolement par la distance de l'ordre du mètre et un fort taux de consanguinité, suggérant que les individus paternels sont proches génétiquement et spatialement des individus maternels. L'ensemble de ces observations génétiques, de pair avec la découverte d'une abondance importante de truffes immatures restant dans le sol (Schneider-Maunoury *et al*., 2019) suggèrent que les individus paternels pourraient être issus de spores germant ponctuellement (**Chapitre IV, partie IV.2**).

L'étude *in situ* de l'écologie des truffes a permis de mieux comprendre les conditions propices à leur développement, en particulier chez le genre *Tuber* : cela inclut par exemple la connaissance des conditions de sol nécessaires au développement du champignon et de l'hôte, les conditions climatiques requises pour le développement des fructifications et l'identification d'hôtes potentiels (Le Tacon, 2017). La distribution naturelle des espèces de truffes du désert et donc leurs exigences écologiques a reçu moins d'attention que celle des espèces du genre *Tuber*. La présence de truffes du désert est attestée sur l'ensemble des continents (Ammarellou *et al.*, 2014 ; Bradai *et al.*, 2014 ; Kagan-Zur *et al.*, 2014) et certaines espèces sont cultivées dans plusieurs pays du pourtour méditerranéen (Morte *et al*., 2008). La production de truffes du désert présente un potentiel de diversification agricole important en milieu aride, du fait de ses faibles besoins en irrigation (Morte *et al.*, 2010 ; Bonifacio & Morte, 2014) et la valeur ajoutée de ces mets recherchés. Mieux comprendre l'écologie des truffes et de leurs hôtes

potentiels *in situ* (en particulier leur microbiote) pourrait donc permettre de développer la culture de truffes du désert en milieu aride (**Chapitre IV, partie IV.1**).

L'écologie des espèces du genre *Tuber* est mieux documentée que pour les espèces formant des truffes du désert, ce qui a permis de développer leur culture en Europe mais également dans d'autres pays hors de leur zone d'endémisme (Murat, 2015 ; Hall *et al.*, 2017). Nous ne sommes toutefois pas capables d'initier la reproduction sexuée et donc la production de fructifications. Une pratique empirique courante consiste à inoculer le sol autour des arbres producteurs avec des spores du truffes mélangées à un substrat, le piégeage. Cette technique permet, selon les cas, d'améliorer la production de truffes (Taschen *et al.*, 2015 ; Murat *et al.*, 2016). Elle offre également un cadre expérimental permettant de contrôler l'apport du matériel génétique (ou inoculum) et donc de tester des hypothèses génétiques *in situ*. En particulier, Taschen *et al.* (2022) ont inoculé des truffes génotypées dans des pièges dans plusieurs truffières en France afin d'estimer leur potentielle contribution en tant qu'individu paternel et ont démontré, dans certains cas, une contribution des truffes inoculées en tant qu'individus paternels, mais jamais en tant qu'individus maternels, suggérant à nouveau que les spores pourraient agir comme individu paternel (**I.4.3**). Les résultats de cette étude sont toutefois contrastés. D'autres études *in situ* pourraient permettre de clarifier la contribution des truffes inoculées (**Chapitre IV, partie IV.2**).

Finalement, la réussite de la culture des truffes nécessite le maintien et le développement du mycélium de l'espèce d'intérêt (*e.g.*, *Tuber melanosporum*). Un ensemble de techniques culturales permettent de favoriser la production de carpophores telles que le choix du site d'implantation, la taille des arbres hôtes ou l'irrigation des truffières (Olivera *et al.*, 2011 ; Chevalier & Pargney, 2014 ; Le Tacon, 2017 ; Todesco *et al.*, 2019). Le désherbage de la zone herbacée autour des arbres mycorhizés est également une pratique courante qui pourrait limiter la concurrence hydrique entre l'arbre hôte et les plantes herbacées environnantes. Le désherbage peut être mécanique (labour superficiel, passage de herse étrille, bâchage, *etc*.) ou chimique (apport de produits herbicides tels que le glyphosate). Une étude menée par Olivera *et al.* (2011) suggère qu'un désherbage chimique modéré autour des arbres producteurs favorise le développement d'ectomycorhizes de *Tuber melanosporum*. Une autre étude de cette même équipe montre que le paillage favorise le développement de mycélium de *T. melanosporum* dans le sol (Olivera *et al*., 2014). Ces études suggèrent donc que le désherbage peut favoriser de développement de *T. melanosporum* dans des jeunes plantations, mais n'évaluent pas l'effet sur la production de carpophores. Dans une étude menée en serre, Gómez-Molina *et al.* (2020) ont pour leur part observé que l'apport de glyphosate pouvait limiter le pouvoir germinatif des

spores du sol et donc potentiellement limiter l'initiation de la reproduction et la production de truffes. Des expériences en mésocosmes démontrent au contraire que la croissance du mycélium de *Tuber melanosporum* augmente en présence de plantes herbacées (Taschen *et al*., 2020) et des observations *in situ* ont démontré que les hyphes pouvaient occasionnellement coloniser les racines des plantes herbacées autours des arbres producteurs (Schneider-Maunoury *et al*., 2018, 2020), suggérant que les truffes pourraient bénéficier de cette niche écologique. L'effet du désherbage sur la croissance du champignon et sur la production de truffes reste de fait encore incertain à ce jour. Conserver la végétation présente autour des arbres producteurs pourraient donc permettre de favoriser le développement du champignon, voire augmenter la production de truffes (**Annexe 2 et 3**).

5. Étudier la diversité microbienne : méthodes et limites.

Étudier la diversité microbienne représente un réel défi du fait de la taille et de la diversité des microorganismes. Les avancées scientifiques dans ce domaine sont souvent couplées à des avancées technologiques qui permettent de révéler ce qui nous serait autrement intangible. Dans cette partie, nous présenterons un aperçu des méthodes nous permettant de décrire la diversité microbienne, dont celles utilisées au cours de ce travail de thèse, et leurs intérêts ainsi que leurs limites.

5.1. Petit historique des méthodes d'études des microorganismes.

Les premières observations de microorganismes ont été réalisées à l'aide de microscopes optiques par Antonie van Leeuwenhoek au XVIIe siècle. Près de deux siècles plus tard, le développement de la mise en culture de bactéries a permis des avancées considérables telles que la mise au point des premiers vaccins par Louis Pasteur, le développement de processus de stérilisation ou encore la formulation du postulat de Koch théorisant l'implication des micro-organismes dans un certain nombre de maladies (Koch, 1876 ; Byrd & Segre, 2016). Diverses techniques de microscopies ont par la suite été développées dans la première moitié du XIXe siècle telles que la microscopie à fluorescence et la microscopie électronique (Berg *et al*., 2020). Ces dernières ont permis d'affiner la description morphologique des microorganismes.

La découverte de l'ADN comme support de l'information génétique (Avery *et al*., 1944) puis la théorisation de la structure en double hélice de cette molécule (Watson & Crick, 1953b, 1953a) ont été des étapes majeures pour la biologie et pour la microbiologie car l'ADN deviendra par la suite un outil indispensable pour l'étude des microorganismes. Cette avancée a rendu envisageable la lecture de l'information génétique. Ainsi, dans les décennies suivantes, les premières techniques de séquençage sont apparues et en premier lieu le séquençage Sanger (Sanger *et al*., 1977). Ces premiers protocoles de séquençage nécessitaient cependant des quantités d'ADN importantes, molécule naturellement présente en faible concentration dans l'environnement. L'application de réactions enzymatiques permettant d'augmenter exponentiellement la concentration d'ADN d'une portion ciblée, ou *Polymerase Chain Reaction* (PCR ; Saiki *et al.*, 1985 ; Mullis *et al.*, 1986) a étendu le champ d'application des techniques de séquençage. Toutefois, le séquençage Sanger ne permet la lecture que d'une séquence unique, rendant impossible la détection de différentes séquences en mélange dans un

même échantillon. Les évolutions rapides des techniques de séquençage ont permis de passer des caps de plus en plus ambitieux tel que le séquençage du premier génome bactérien (Fleischmann *et al*., 1995), puis plus tard celui du génome humain (Venter *et al*., 2001). La possibilité de séquencer l'ADN a ainsi permis de caractériser les microorganismes non pas sur la base de leurs traits morphologiques et physiologiques uniquement, mais également d'intégrer l'information génétique contenue dans un ou plusieurs fragments de leur génome, permettant par exemple de reconstruire des phylogénies moléculaires sur la base de séquences de l'opéron ribosomal bactérien (*e.g.*, Woese & Fox, 1977).

Avant le développement de la PCR, il était uniquement possible d'accéder au matériel génétique de microorganismes en culture pure ou formant des structures particulières telles que les fructifications de certains champignons. La possibilité d'accéder au matériel génétique d'individus différents présents dans un même échantillon *in situ* par amplification, de pair avec le développement de techniques de séquençage dites à haut-débit (ou de seconde génération) au début du XXIe siècle (Slatko *et al.*, 2018) ont permis de redécouvrir la diversité microbienne. La majorité des phylums bactériens avaient en effet échappé aux méthodes de culture (Rappé & Giovannoni, 2003) et ne sont détectés que par des techniques de séquençage de l'ADN environnemental (« *The Great Plate Anomaly* » ; Staley & Konopka, 1985 ; Epstein, 2013). Le séquençage de sols forestiers à l'aide de techniques de séquençage de seconde génération a par exemple permis de mettre en évidence une richesse fongique jusqu'alors inaccessible par les techniques de culture et séquençage Sanger et de découvrir des espèces nouvelles pour la science (Buée *et al*., 2009).

Le développement des techniques de séquençage à haut débit de deuxième génération, permettant d'acquérir des profondeurs de séquençage importantes à des coûts accessibles, ont permis la mise au point de différentes méthodes d'analyses des communautés de micro-organismes : la caractérisation de communautés microbiennes à l'aide de gènes marqueurs (ou *metabarcoding*), l'assemblage de metagénomes de la communautés (métagénomique) ou encore la caractérisation fonctionnelle par séquençage des ARN produits par la communauté microbienne (métatranscriptomique ; Knight *et al.*, 2018). Le développement de ces méthodes a permis de décrire la diversité microbienne présente dans les environnements terrestres (Thompson *et al*., 2017) et marins (Abreu *et al*., 2022), principalement sur la base de séquences environnementales, alimentant ainsi des bases de données publiques généralistes (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) ou plus spécifiques telles que SILVA (https://www.arb-silva.de/) ou UNITE (https://unite.ut.ee/). Si l'accumulation de ces données a permis de décrire une diversité microbienne insoupçonnée (on estime le nombre de bactéries et de champignons

dans le sol de l'ordre du milliard et du million respectivement ; Anthony *et al.*, 2023), un nouveau paradoxe en résulte : comment définir une espèce microbienne, lorsque l'on en connait que des fragments de séquences d'ADN (**Encadré 5**) ?

5.2. L'ADN pour caractériser les populations et communautés microbiennes.

La diversité microbienne peut s'étudier à différents niveaux : à l'échelle de la population au sein d'une même espèce (diversité génétique) ou à l'échelle de la communauté (diversité d'espèces ; **Figure I.13**). Tandis que l'analyse de la diversité génétique est l'objet de la génétique des populations, l'étude de la diversité des espèces est l'objet de l'écologie des communautés. Bien que souvent étudiées séparément, elles sont pourtant complémentaires, voire liées (Whitlock, 2014 ; Vincenot & Selosse, 2017). L'étude des populations et des communautés microbiennes sont donc différentes et complémentaires.

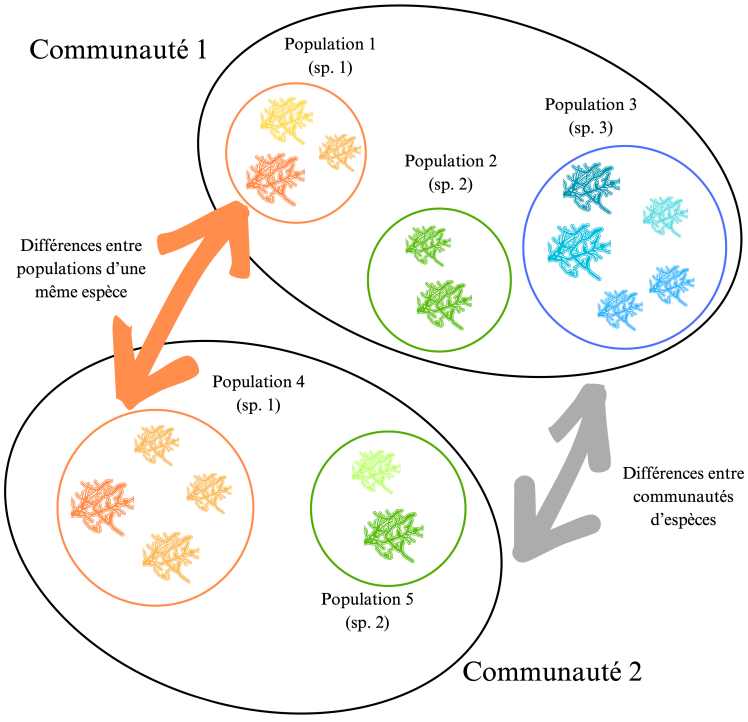


Figure I.13 Différents niveaux de diversité microbienne : des populations aux communautés. Il existe divers niveaux de diversité au sein des communautés microbiennes. Prenons pour exemple deux communautés fictives (1 & 2), composées d'espèces différentes (sp. 1 à 3). Ces espèces présentent une diversité à l'échelle de la population, comprenant un nombre variable d'individus, qui peuvent être différents (différentes nuances de couleurs) ou non (clones). Nous observons donc des différences de composition entre les deux communautés ainsi que des différences entre populations d'une même espèce (sp. 1 par exemple).

5.2.1. Étudier la diversité génétique des populations.

L'analyse de la diversité génétique des populations nécessite d'identifier les différents individus qui les composent et leur degré de similarité. Or, l'identification d'individus sur la base de critères morphologiques est particulièrement difficile chez les microorganismes tels que les champignons. Aussi, différentes méthodes de caractérisations génétiques ont été développées pour tenter de définir des individus génétiques (Vincenot & Selosse, 2017). Les techniques de caractérisation génétique des populations se basent sur un même principe : différents locus présentant un fort niveau de variabilité au sein de l'espèce d'intérêt sont identifiés et sont ensuite utilisés comme marqueurs génétique. Un individu génétique correspond alors à une combinaison unique d'allèles.

Les microsatellites sont couramment utilisés pour étudier la structure génétique des populations (Kim & Sappington, 2013 ; Vieira *et al.*, 2016). Les microsatellites (ou *Simple Sequence Repeats*, SSR) sont des séquences composées de courts motifs répétés (1-10 nucléotides ; *e.g.*, ATT) présentant des taux de mutations élevés (Ellegren, 2004). Les mutations des microsatellites consistent en général en l'ajout ou la perte d'une ou plusieurs répétitions du motif de nucléotides et entrainent des variations de taille. Cette propriété a permis de développer des méthodes de caractérisation génétique indépendantes du séquençage : différents microsatellites sont amplifiés par PCR à l'aide d'amorces couplées à un fluorochrome. Les fragments sont ensuite séparés par taille par migration (électrophorèse par capillarité) et les fluorochromes sont excités à l'aide d'un laser. Il résulte de l'excitation des fragments un profil de taille qui permet d'attribuer un allèle pour chaque marqueur. Chaque échantillon ainsi caractérisé présente une combinaison d'allèles pour différents sites polymorphiques, permettant de définir un génotype moléculaire (*multi locus genotype* ou MLG). La conception et le choix des marqueurs microsatellites sont réalisés de sorte à ce que chaque MLG corresponde à un clone (Murat *et al*., 2011). Ces données permettent par exemple de cartographier la répartition des individus autour d'un arbre producteur de truffes (De la Varga *et al*., 2017). Le génotypage microsatellite a notamment été utilisée pour mieux comprendre l'histoire biogéographique, l'écologie et la biologie des truffes du genre *Tuber* (Murat *et al.*, 2011 ; Bonito *et al.*, 2013 ; Taschen *et al.*, 2016 ; Schneider-Maunoury *et al.*, 2020 ; **I.4**).

5.2.2. Étudier les communautés microbiennes par séquençage de gènes marqueurs (*metabarcoding*).

Principe général

Comme nous l'avons brièvement rappelé plus haut (**I.5.1**), diverses techniques permettent de déterminer la diversité des espèces microbiennes dans un échantillon, de l'observation microscopique aux nombreuses techniques de séquençage existantes (**Encadré 6**). Si le séquençage Sanger (séquençage de séquences uniques) est encore largement utilisé pour déterminer l'identité taxonomique d'échantillons ne présentant qu'une seule espèce (fructification de champignon par exemple), les technologies de séquençage de seconde génération sont devenues un standard dans l'étude des communautés microbiennes (Knight *et al*., 2018). En particulier, le séquençage de gènes marqueurs (ou *metabarcoding*) est souvent utilisé pour identifier l'ensemble des microorganismes présents dans un échantillon et leur abondance relative (Thompson *et al*., 2017). Quelques soient les technologies de séquençage utilisées (454 pyroséquençage, Ion Torrent, Illumina, *etc*. ; Slatko *et al.*, 2018), le principe général est très similaire (**Figure I.14**).

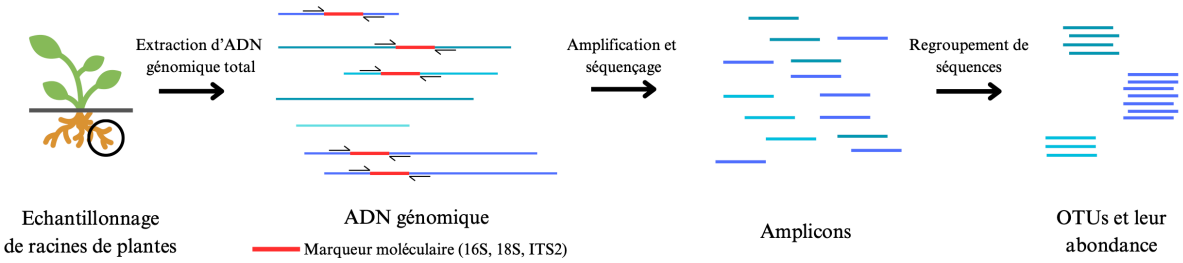


Figure I.14 Principe général des méthodes de *metabarcoding* permettant de caractériser les communautés microbiennes d'un échantillon. L'ADN génomique total d'un échantillon de plante (ici les racines) est extrait. Le marqueur d'intérêt (16S, ITS2, 18S, *etc*.) est ensuite amplifié par PCR avec un couple d'amorces permettant une amplification spécifique de ce marqueur. Un *tag* (courte séquence servant d'identifiant) est ensuite ajouté aux séquences de chaque échantillon afin de pouvoir les identifier au cours des étapes de traitement bio-informatique. Les séquences amplifiées de tous les échantillons sont ensuite regroupées et séquencées sur une plateforme dédiée (Ion Torrent, Illumina, *etc*.). L'ensemble des séquences ainsi obtenues sont regroupées informatiquement par similarité en Unités Taxonomiques Opérationnelles (OTUs) ou en Variant de Séquence d'Amplicon (ASV ; **Encadré 5**).

Dans un premier temps, l'ADN génomique total d'un échantillon est extrait et purifié. L'extrait d'ADN contient de nombreuses séquences appartenant à des espèces différentes, en nombre variable selon chaque espèce. Un gène marqueur d'intérêt (ARNr 16S, 18S, ITS2, *etc.*) est ensuite amplifié par PCR à l'aide d'un couple d'amorces spécifique à la région ciblée. Les études de communautés microbiennes se basent principalement sur des portions de l'ARN ribosomal, un opéron présent chez toutes les espèces (de constitution différente entre eucaryotes et procaryotes) et qui comprend des portions suffisamment variables pour assigner les séquences à des niveaux taxonomiques élevés (genre, voire espèce ; Tringe & Hugenholtz, 2008 ; Schoch *et al.*, 2012). Des portions de séquences uniques à chaque échantillon (ou *tags*) sont ajoutées aux séquences, soit directement au cours de la première PCR soit par un autre cycle d'amplification. L'ensemble des échantillons sont ensuite regroupés dans un ou plusieurs *pools* équimolaires. Ces pools sont séquencés grâce à la technologie choisie (*e.g.*, 454 pyroséquençage, Ion Torrent, Illumina). Différents témoins négatifs sont également inclus lors de la préparation des *pools* de séquençage : les témoins d'extraction correspondent à des extractions réalisées à partir d'eau stérile et permettent d'identifier les potentiels contaminants provenant du matériel utilisé lors de l'extraction d'ADN. De même, des témoins négatifs de PCRs sont réalisés en remplaçant l'ADN par l'eau stérile utilisée pour préparer les autres échantillons et permettent d'identifier les potentielles contaminations provenant du matériel et des réactifs utilisés pendant les PCRs.

L'ensemble des séquences obtenues peuvent ensuite être regroupées par similarité de séquence afin de former des Unités Taxonomiques Opérationnelles (OTUs, des proxys d'espèces à 97 % de similarités ; **Encadré 5**) ou des Variants de Séquence d'Amplicon (ASV ; séquences présentant 100% d'homologies aux erreurs de séquençage près). Les séquences sont réaffectées à leur échantillon d'origine grâce à leurs tags et le nombre de séquence par échantillon appartenant à chaque OTU/ASV est comptabilisé (on parle de *reads*), renseignant l'abondance de chaque OTU/ASV dans chaque échantillon. Il en résulte une table d'OTU/ASV, c'est-à-dire une matrice contenant le nombre de *reads* assignés à chaque OTU dans chaque échantillon.

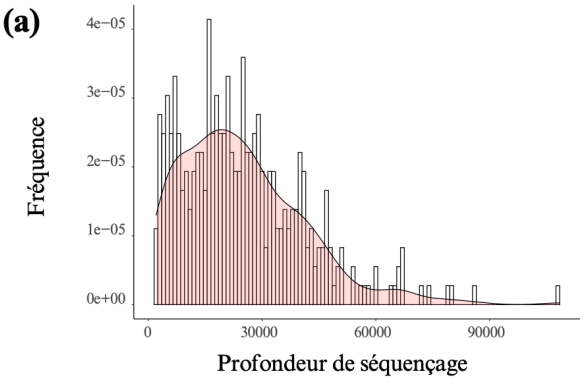
Spécificités des données de metabarcoding.

D'un point de vue statistique, les données de séquençage à haut débit telles que le *meta-barcoding* ont plusieurs particularités. Premièrement, elles sont compositionnelles, c'est-à-dire qu'elles renseignent sur l'abondance relative de chaque microorganisme (ou OTU/ASV) dans

un échantillon mais ne nous informent pas sur son abondance absolue dans l'échantillon étudié (Gloor *et al*., 2017). En effet, la profondeur de séquençage (*i.e.*, le nombre de séquences lues, ou *reads*, obtenus par échantillon dans un séquençage) n'est pas corrélée à la masse microbienne présente initialement dans l'échantillon (des corrélations existent toutefois pour certains groupes et amorces ; Wang *et al.*, 2023). En conséquence, les abondances relatives des OTUs ne sont pas indépendantes : augmenter le nombre de *reads* d'un OTU diminuera mécaniquement l'abondance relative des autres (Reimann *et al.*, 2012 ; Gloor *et al.*, 2017).

De plus, la profondeur de séquençage au sein d'un même *pool* (*i.e.*, l'ensemble des échantillons séquencés en même temps) est très variable (**Figure I.15a**) ce qui peut biaiser les estimations de diversité : un échantillon dont le séquençage a permis d'obtenir un total de 30 000 *reads* a de forte chance de couvrir une diversité microbienne plus large qu'un échantillon en présentant 2 000. Pour finir, ces données présentent une distribution particulière : elles présentent une très grande majorité d'OTUs rares, dont les moins abondants sont des artefacts liés aux PCR et au séquençage et doivent de fait être retirés (Tedersoo *et al*., 2022) et quelques OTUs très abondants (**Figure I.15b**). Du fait de leur nature, et du fait des différents biais pouvant intervenir lors des étapes de préparation des banques en amont du séquençage, les données de séquençage présentent une grande dispersion (Xia *et al*., 2018) nécessitant l'utilisation de méthodes statistiques adaptées qui peuvent différer selon les analyses (Knight *et al*., 2018). Afin de limiter l'impact de ces biais statistiques, différentes stratégies de normalisation des données ont été proposées, mais aucun consensus n'existe à ce jour et différentes méthodes de normalisation semblent appropriées selon les analyses réalisées.

(a)



(b)

	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon 3	Echantillon 4	
OTU1	1200	4	600	400	2204
OTU2	3	29	1100	702	1834
OTU3	600	900	47	18	1565
...	...	...	...	...	...
OTU60	3	0	0	0	3
OTU61	0	1	1	0	2
OTU62	0	1	0	0	1
P.S.	1806	935	1748	1120	

Figure I.15 Distribution des données de *metabarcoding*. (a) Distribution de la profondeur de séquençage (*i.e.*, le nombre de *reads* total par échantillon) au sein d'un même *run* de séquençage. **(b)** Table d'OTU hypothétique présentant quelques OTUs très majoritaires (OTU1-3) et un ensemble d'OTUs présentant peu de *reads* (OTU60-63).

Une approche commune consiste à normaliser la profondeur de séquençage de tous les échantillons par raréfaction : pour chaque échantillon, un sous-ensemble est tiré aléatoirement afin d'atteindre la profondeur de séquençage du plus petit échantillon du jeu de données (McKnight *et al*., 2019). Toutefois, cette méthode est à l'origine d'une perte importante des données de séquençage (jusque 90% des *reads*) et n'a pas de fondement statistique clair (McMurdie & Holmes, 2014). Certaines transformations permettent de limiter la disparité de profondeur de séquençage entre échantillons telles que la transformation d'Hellinger (Legendre & Gallagher, 2001). Diverses transformations visent à stabiliser la variance de la profondeur de séquençage entre échantillons mais surestiment parfois les différences de composition entre échantillons (McKnight *et al*., 2019). Dans certains cas, il est nécessaire de pouvoir d'identifier des OTUs significativement plus abondants dans une condition par rapport à une autre (abondances différentielles). Après avoir réalisé l'analyse comparative des méthodes existantes à ce jour, Lloréns-Rico *et al.* (2021) conseillent d'utiliser plusieurs méthodes de concert. Dans les différents chapitres de cette thèse, nous avons essayé de combiner plusieurs méthodes, prenant en compte les recommandations disponibles dans la littérature scientifique afin de limiter les biais potentiels propres à chaque analyse (analyses de diversité alpha et bêta, abondances différentielles, analyses de réseaux *etc*.).

Étude comparative de la structure des communautés microbiennes.

La diversité des communautés microbiennes se mesure à différents niveaux (**Figure I.16**). Chaque échantillon présente une diversité spécifique ou diversité alpha qui correspond à la richesse d'espèces présentes dans un échantillon. Différents échantillons peuvent présenter un nombre similaire d'espèces mais des communautés de composition différentes. Ces différences de communauté entre échantillons correspondent à la diversité bêta. Ainsi, ces deux mesures de diversité nous permettent de comparer les communautés microbiennes associées à différents échantillons, en particulier dans des conditions différentes (gradient environnemental, différents compartiments de plante, dynamiques temporelles *etc.*) : deux groupes d'échantillons diffèrent-ils en richesse d'espèces ? Ou en composition de communauté ?

Encadré 5 Comment définir les espèces microbiennes ?

La notion d'espèce est au cœur de l'analyse des communautés microbiennes mais également un concept fondamental pour l'étude de la biodiversité globale. Pourtant, il n'existe toujours pas de définition unique des espèces mais plutôt un ensemble de concepts (Mayden, 1999). De Queiroz (2007) souligne que l'ensemble de ces concepts peut être unifié en différenciant le concept d'espèce et les différents critères opérationnels permettant de les délimiter. Ainsi, une espèce pourrait être définie comment une « lignée de métapopulation évoluant séparément ». Différents critères permettraient donc de les définir, tels que l'isolement reproducteur ou la monophylie.

Définir la notion d'espèce microbienne est également un défi et ce à plusieurs égards. Selon le concept d'espèce biologique, des populations évolutivement éloignées présentent un isolement reproducteur. Or, un grand nombre de microorganismes se reproduisent asexuellement (Taylor *et al*., 2015). Même en cas de reproduction sexuée, l'incapacité de cultiver la plupart des espèces microbiennes empêche de tester un potentiel isolement reproducteur (Achtman & Wagner, 2008). De même, les critères morphologiques ne sont pas toujours fiables pour délimiter les espèces car certains microorganismes présentent des morphologies très similaires (Chethana *et al*., 2021). Les approches de reconstruction phylogénétiques peuvent permettre de délimiter plus précisément les espèces mais la forte prévalence des transferts latéraux de gènes limite leur résolution, en particulier chez les procaryotes (Fraser *et al*., 2009). Finalement, les études sur le microbiote se basent aujourd'hui principalement sur le séquençage de gènes marqueurs tels que le *metabarcoding* et un pourcentage de ressemblance. En conséquence, certaines espèces ne sont décrites que par des séquences environnementales courtes (Nilsson *et al*., 2016).

Il est donc nécessaire de définir des critères de délimitation des espèces basés sur les séquences obtenues par séquençage de gènes marqueurs. L'approche la plus courante consiste à regrouper les séquences par similarité, à l'aide d'un seuil global de similarité à partir duquel les séquences sont considérées comme provenant de la même espèce. Ces groupes de séquences similaires sont appelés Unités Taxonomiques Opérationnelles (OTUs). Le seuil le plus couramment utilisé pour les champignons est 97% : des séquences qui diffèrent de plus de 3% sont considérées comme appartenant à des espèces différentes (Nilsson *et al*., 2008). Ce seuil est toutefois imparfait car la variabilité des marqueurs utilisés peut être différente selon les taxons, comme c'est le cas pour l'ITS2, un marqueur couramment utilisé pour séquencer les communautés fongiques. D'autres approches permettent de regrouper les séquences non pas sur la base de seuils fixes, mais en utilisant des seuils locaux en regroupant les séquences de

manière itérative (Mahé *et al*., 2015). Plus récemment, le regroupement de variants de séquences d'amplicon (ASV) s'est popularisé, en particulier dans les études de microbiotes bactériens basées sur le marqueur 16S (SSU rRNA ; Callahan *et al.*, 2016) : seules les séquences considérées comme identiques aux erreurs de séquençage prêt sont regroupées de sorte que l'on obtienne des séquences uniques. D'autres approches permettent de délimiter les espèces par reconstruction phylogénétique sur la base des séquences obtenues et de celles disponibles dans les bases de données publiques. C'est le cas par exemple pour les Glomeromycotina détectés par séquençage de la portion 18S de l'ARN ribosomique et dont les séquences sont regroupées par reconstruction phylogénétique (Öpik *et al.*, 2010).

Comme nous pouvons le remarquer grâce aux exemples précédents, différentes méthodologies et différents standards peuvent être utilisés pour l'étude de groupes phylogénétiques différents. Si le séquençage de portions de la petite sous-unité ribosomale bactérienne (16S) est la méthode majoritairement utilisée dans les études de microbiote bactérien (Tringe & Hugenholtz, 2008), différents marqueurs sont couramment utilisés chez les champignons en fonction du groupe d'intérêt (18S pour les groupes de champignons basaux tels que les Glomeromycotina ; Öpik *et al.*, 2010 ; ITS2 pour les champignons Dikarya ; Schoch *et al.*, 2012). De plus, la délimitation d'espèces sur la base de séquences diffère selon les marqueurs et groupes étudiés. L'utilisation d'ASVs est devenue majoritaire chez les bactéries (Callahan *et al*., 2017) tandis que l'utilisation d'OTUs est recommandée chez les champignons (Tedersoo *et al*., 2022). En effet, les ASVs ont tendance à biaiser les estimations de richesse en surestimant la richesse de champignons communs (plusieurs ASVs par espèce), tout en sous-estimant la diversité des espèces rares (en supprimant des variants rares). Toutefois, ils peuvent renseigner sur les différences intraspécifiques et sur la distribution spatiale d'haplotypes (Petrolli *et al*., 2022).

Ces comparaisons se basent sur l'utilisation d'indicateurs classiques en écologie. La richesse en espèces des microbiotes peut être estimée en utilisant plusieurs indicateurs différents. Le nombre d'OTU/ASV n'est pas un indicateur préconisé du fait de la distribution très inégale des OTUs comprenant beaucoup d'espèces rares (Xia *et al*., 2018). D'autres indicateurs prenant en compte l'abondance de chaque espèce seront donc plus utiles tels que l'indicateur de Shannon ou l'indicateur de richesse Chao1. Des analyses multivariées sont également nécessaires pour déterminer les facteurs influençant la composition du microbiote (diversité bêta) tels que des paramètres environnementaux ou l'identité taxonomique de l'hôte

(Paliy & Shankar, 2016a). Ces analyses se basent en général sur l'analyse de matrices de similarités/dissimilarités qui comme leur nom l'indique mesurent la similitude/dissimilarité de composition des microbiotes entre échantillons. La distance de Bray-Curtis est souvent utilisée dans les analyses multivariées en écologie, et en particulier dans l'analyse des microbiotes (Paliy & Shankar, 2016b ; McKnight *et al.*, 2019). D'autres distances prenant en compte la phylogénie des microorganismes peuvent également être utilisées (UniFrac ; Lozupone *et al.*, 2011). Comme les données de *metabarcoding* ne respectent pas les hypothèses de normalité et d'uniformité des variances, les analyses multivariées se basent sur des méthodes non-paramétriques telles que l'analyse de variance multivariée par permutations (PERMANOVA ; Anderson, 2017). Les différences entre groupes d'échantillons peuvent être visualisées à l'aide de méthodes d'ordinations telles que les *Principal Coordinate Analysis* (PCoA) ou les *Non-metric MultiDimensional Scaling* (NMDS ; Legendre & Gallagher, 2001).

Il peut être nécessaire d'identifier des OTUs ou groupes d'OTUs caractéristiques d'une condition comparée aux autres : on parle alors d'OTUs différentiellement abondants. Différentes méthodes ont ainsi été développées pour déterminer si un OTU est surabondant dans une condition, telles que LEfSE (Segata *et al*., 2011), ANCOM-BC (Lin & Peddada, 2020) ou ALDEx (Fernandes *et al*., 2013). Une méta-analyse récente comparant l'ensemble de ces méthodes sur un grand nombre de jeux de données a mis en évidence certaines limites quand elles sont utilisées individuellement (notamment des proportions importantes de faux-positifs comparé aux méthodes d'abondance exacte) et suggère donc de combiner plusieurs approches (Lloréns-Rico *et al*., 2021).

Finalement, la comparaison de différents microbiotes peut nous permettre d'estimer la contribution respective de différents échantillons à la composition d'un microbiote d'intérêt : on distingue alors des sources potentielles et des puits, c'est-à-dire les microbiotes dont on cherche à expliquer la composition. Ces analyses sont dénommées *source tracking analysis*, et ont initialement été développées pour identifier les sources de contaminations (*e.g.*, *SourceTracker* ; Knights *et al.*, 2011). Ces méthodes ont été adaptées afin d'estimer la contribution d'un ensemble de sources à un microbiote d'intérêt de manière plus efficace, telle que la méthode FEAST (*fast expectation-maximization microbial source tracking* ; Shenhav *et al.*, 2019) : l'ensemble des sources potentielles sont mélangées itérativement afin d'estimer leur contribution. Les sources potentielles identifiées n'expliquent pas toujours la totalité du microbiote ; une source inconnue est donc également reportée. Notons ici qu'une version prenant en compte les ASV a récemment été développée (SNV-FEAST ; Briscoe *et al.*, 2023) et permet d'identifier avec une plus grande précision la contribution de chaque source en ne prenant

compte que des séquences identiques entre échantillons. L'analyse sur la base de séquences uniques permettrait de s'assurer que les mêmes haplotypes sont transmis d'une source à un puit (et non pas une espèce dans le cas de l'analyses d'OTUs).

Les réseaux d'interaction plantes-microorganismes.

Les microorganismes interagissent avec différentes espèces de plantes qui, elles aussi, interagissent avec une diversité de microorganismes. Il se forme ainsi des réseaux d'interactions complexes. Il est toutefois nécessaire à ce stade de préciser que le terme réseau peut désigner en écologie microbienne trois types de réseaux différents. Premièrement, le terme réseau peut désigner la capacité qu'ont certains champignons à s'associer avec plusieurs hôtes simultanément, formant ainsi un réseau physique partagé entre plantes voisines, ou réseaux mycorhiziens communs (*Common Mycorrhizal Network* ; Selosse *et al.*, 2006 ; Wipf *et al.*, 2019 ; Karst *et al.*, 2023). Dans cette partie méthodologique, nous n'aborderons que l'analyse de réseaux comme méthode d'analyse des interactions du microbiote.

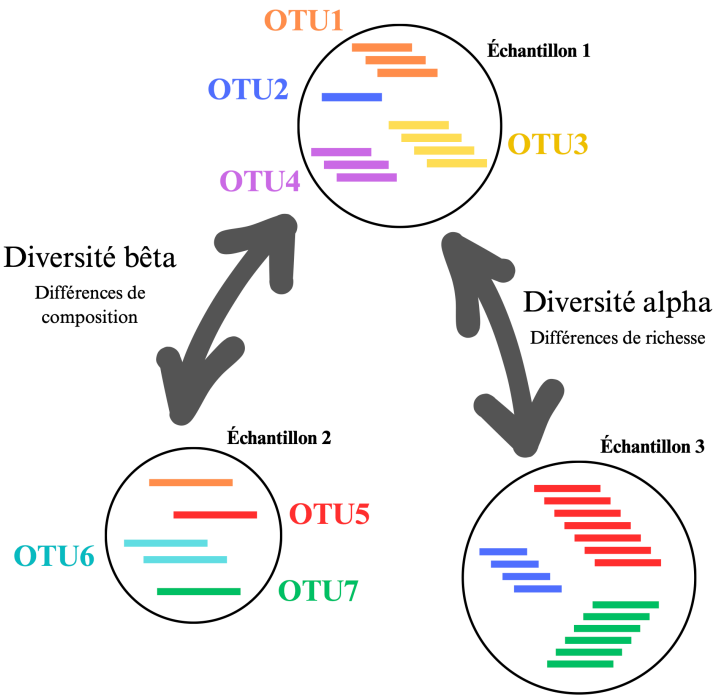


Figure I.16 La diversité est mesurée à différents niveaux : diversité alpha et bêta. La diversité est mesurée à différents niveaux. Le premier niveau est la diversité alpha, ou richesse spécifique, qui désigne le nombre d'espèces présentes dans un échantillon (qui peut être calculée de différentes manières). Toutefois, des communautés présentant des mêmes richesses spécifiques peuvent avoir des compositions différentes. Ces différences correspondent à la diversité bêta, correspondant aux différences entre échantillons.

L'utilisation de méthodes dérivées de la théorie des graphes est de plus en plus courante en écologie microbienne (Layeghifard *et al*., 2017) afin de mieux caractériser la complexité des interactions au sein du microbiome. Il est ainsi possible de représenter les interactions au sein du microbiote (*i.e.*, interactions entre microorganismes) ou entre hôtes et microorganismes comme un réseaux d'interactions. Deux types de réseaux peuvent alors être distingués : les réseaux de co-occurrence d'une part cherchent à identifier les liens entre membres du microbiote appartenant au même domaine (*e.g.*, bactéries-bactéries) ou non (*e.g.*, bactéries-champignons). Ces réseaux cherchent à identifier des patrons d'associations préférentielles entre microorganismes (co-occurrence et co-exclusion, quelle qu'en soit la base biologique) permettant par exemple d'identifier des groupes de microorganismes caractéristiques de certains environnements (Barberán *et al.*, 2012 ; Ma *et al.*, 2020).

D'autre part, les réseaux d'interaction bipartites sont utilisés pour caractériser les interactions écologiques entre groupes d'organismes différents tels que les réseaux d'interactions plantes/pollinisateurs ou plantes/disséminateurs de graines (Bascompte, 2010). Ces réseaux sont également utilisés pour étudier les associations entre plantes et microorganismes, en particulier entre plantes et champignons mycorhiziens (van der Heijden *et al*., 2015) afin de répondre à différentes questions : ces associations sont-elles spécialisées ou généralistes ? Peut-on identifier des groupes d'espèces interagissant préférentiellement ? Pour ce faire, différentes propriétés des réseaux bipartites peuvent être étudiées. La modularité et l'imbrication (*nestedness*) ont souvent été utilisées pour caractériser la topologie des réseaux bipartites. Un réseau est dit imbriqué (ou *nested*) lorsque les espèces spécialistes interagissent avec un sous-ensemble de partenaires avec lesquels des espèces généralistes interagissent également (Bascompte *et al*., 2003). Des travaux ont suggéré que cette structuration non-aléatoire des réseaux d'interactions pouvait être une signature des réseaux mutualistes (Bascompte *et al.*, 2003 ; Mariani *et al.*, 2019) principalement sur la base d'études de réseaux de plantes/pollinisateurs et plantes/disséminateurs de graines. Bien qu'également observée dans certains réseaux plantes/champignons mycorhiziens arbusculaires (Chagnon *et al.*, 2012 ; Montesinos-Navarro *et al.*, 2012), l'imbrication est pourtant rarement observée dans les réseaux plantes/champignons ectomycorhiziens (Bahram *et al.*, 2014 ; Toju *et al.*, 2014, 2018 ; Roy-Bolduc *et al.*, 2016) et les réseaux plantes/champignons mycorhiziens des orchdiées (Martos *et al.*, 2012 ; Petrolli *et al.*, 2022) ou des éricacées (Toju *et al*., 2016). De plus, la détection de l'imbrication est sensible au type de réseaux : elle est plus souvent détectée dans les réseaux binaires (présence/absence) que dans les réseaux pondérés (Staniczenko *et al*., 2013). Pour finir,

une étude récente a démontré que l'imbrication était un prédicteur peu fiable du mutualisme dans des réseaux d'interactions (Pichon *et al*., 2023).

La modularité est une autre propriété topologique souvent utilisée dans l'analyse des réseaux écologiques. Les analyses de modularité cherchent à identifier des sous-ensembles d'espèces interagissant de manière préférentielle (*i.e.*, plus d'interactions au sein des modules qu'entre les modules ; Olesen *et al.*, 2007). La modularité au sein d'un réseau dépend à la fois du type d'interaction écologique (mutualisme ou antagonisme) et de l'intimité de l'interaction (les associations symbiotiques durables et intimes sont souvent plus modulaire que les associations facultatives ; Fontaine *et al.*, 2011). Les mécanismes à l'origine de la modularité sont divers et peuvent refléter un isolement géographique des populations échantillonnées, des adaptations unilatérales ou encore des processus de coévolution (cf. Table 1 dans Dormann *et al.*, 2017). Les conséquences écologiques et évolutives d'une telle structuration ont été débattues à de nombreuses reprises. Certaines études ont démontré que la modularité au sein d'un réseau pouvait augmenter sa stabilité face à une perturbation (Grilli *et al*., 2016). A l'échelle individuelle, la spécialisation envers un hôte peut en revanche favoriser l'extinction d'un des deux partenaires en cas de déclin d'une des espèces. De plus, l'imbrication et la modularité sont corrélées (Fortuna *et al*., 2010) et dépendent de la taille du réseau étudié (Olesen *et al*., 2007). Les modules d'interactions préférentielles peuvent ainsi être des « briques » au sein de réseaux imbriqués (Olesen *et al*., 2007). Des mesures de spécialisation permettant la comparaison de réseaux de tailles différentes ont également été développées, se basant sur la spécialisation des espèces plutôt que sur la topologie du réseau, tel que l'indice de spécialisation H_2' (Blüthgen *et al*., 2006).

Il est nécessaire de déterminer si les propriétés observées dans un réseau d'interaction (*e.g.*, modularité, imbrication, spécialisation) ne sont pas liées à un assemblage aléatoire des espèces. Une méthode courante consiste alors à simuler à partir du réseau observé un grand nombre de réseaux aléatoires (modèles nuls) et de déterminer si la structure observée diffère significativement des réseaux aléatoires simulés. Différents types de modèles nuls existent et ils diffèrent selon leur niveau de contrainte, afin de simuler des réseaux plausibles par rapport aux réseaux observés. Au cours de ce travail, nous avons utilisé des modèles nuls conservant les sommes marginales afin de conserver la structure du réseau. De nombreuses propriétés du réseau sont corrélées à la proportion de liens réalisés, aussi appelée connectance (nombre de liens réalisés/nombre de liens possibles ; Dormann *et al.*, 2009). Il est donc possible de contraindre plus encore les modèles nuls en conservant la connectance constante.

Encadré 6 L'écologie microbienne à l'ère du séquençage à haut débit

La baisse du coût des techniques de séquençage de seconde génération et l'apparition des techniques de séquençage de troisième génération a permis de développer diverses méthodes utilisées dans l'étude des microorganismes.

A l'échelle des communautés de microorganismes, le séquençage de gènes marqueurs (*metabarcoding*) est très couramment utilisé pour identifier les espèces présentes au sein d'un échantillon (cf. partie **I.5.2.2**). Les techniques de séquençage à haut débit sont également utilisées pour caractériser l'activité métabolique des communautés microbiennes par séquençage d'ARN (métatranscriptomique ; *e.g.*, RNA-Seq, Illumina). Les ARNs produits peuvent en effet être utilisés comme proxys des gènes exprimés dans un échantillon au moment du prélèvement (Schneider *et al*., 2021) et donc des fonctions réalisées par les microorganismes présents dans l'échantillon. Les techniques de métatranscriptomique peuvent également être utilisées pour décrire les communautés microbiennes actives (Gonzalez *et al*., 2018 ; Schneider *et al*., 2021). Finalement il est possible d'assembler des métagénomes à partir d'échantillons *in situ* (Bahram *et al*., 2021) : l'ADN total d'un échantillon est fragmenté et séquencé de manière aléatoire (*shotgun sequencing*). Les séquences ainsi obtenues sont ensuite réassemblées afin de reconstruire les génomes microbiens de la communauté (métagénomes). Cette technique est couramment utilisée dans l'étude de communautés bactériennes car le génome de ces dernières est généralement de taille modérée (en moyenne autour de 5 Mpb ; Land *et al.*, 2015), contrairement aux champignons dont les génomes sont de taille bien supérieure (médiane de 35 Mpb ; Stajich, 2017). Toutefois, la reconstruction de génomes fongiques à partir de données de séquençage *shotgun* est possible (Donovan *et al*., 2018). Les métagénomes ainsi assemblés permettent de décrire une partie de la diversité microbienne d'un échantillon et l'identification de groupes de gènes qui les constituent afin déterminer les fonctions potentielles dans lesquelles les microorganismes sont impliqués.

Le séquençage de génomes d'individus cultivés *in vitro* permet de mieux caractériser leur mode de vie et apporte donc des informations clés sur leurs rôles potentiels dans les écosystèmes, en particulier dans les associations symbiotiques. Depuis le séquençage du premier génome de champignon mycorhizien (*Laccaria bicolor* ; Martin *et al.*, 2008), des initiatives de grandes ampleurs ont permis de séquencer un nombre croissant de génomes fongiques (Grigoriev *et al*., 2014). En plus de clarifier l'histoire évolutive des champignons (Merényi *et al*., 2023), le séquençage de génomes et leur comparaison permet d'émettre des hypothèses quant aux gènes impliqués dans les différentes fonctions de ces champignons (Murat *et al*., 2018).

Le développement de techniques de séquençage dites de troisième génération (*e.g.*, PacBio, Nanopore), permettant le séquençage de fragments d'ADN plus longs (de 3 à 10 kpb environ respectivement), ouvre de nouvelles possibilités pour ces différentes approches : une meilleure résolution phylogénétique dans les approches de *metabarcoding* en séquençant des régions de l'opéron ribosomal de plus grande taille (Tedersoo *et al*., 2018) ou encore d'assembler des métagénomes de manière plus efficace grâce à la grande taille des fragments obtenus (Liu *et al*., 2022).

5.2.3. Les limites du séquençage de gènes marqueurs.

Le séquençage de gènes marqueurs présente plusieurs limites qui doivent être considérées dans l'analyse des résultats des chapitres suivants. Nous en présenterons ici quelques-unes :

- Une des limites principales du *metabarcoding* est l'universalité des marqueurs utilisés. En effet, la conception et le choix des marqueurs utilisés résulte d'un compromis entre deux critères : ils doivent couvrir la diversité du groupe d'intérêt tout en étant suffisamment variables pour permettre l'identification la plus précise possible de l'affiliation des séquences. Ainsi, il n'existe à ce jour pas de marqueur parfait, c'est-à-dire permettant l'identification de toutes les espèces de champignons (par exemple) précisément. Dans l'étude des communautés fongiques, l'*Internal Transcribed Spacer 2* (ITS2), est couramment utilisé et favorise la détection de champignons appartenant au Dikarya (Ascomycota et Basidiomycota ; Op De Beeck *et al.*, 2014 ; Tedersoo *et al.*, 2022), tandis que les domaines variables du 18S sont plus propices à la détection des champignons basaux tels que les Glomeromycotina ou Mucoromycotina (Banos *et al*., 2018 ; Berruti *et al*., 2017). Aussi, si l'utilisation systématique d'un marqueur pour un groupe d'étude donné (*e.g.*, le 18S chez les champignons mycorhiziens à arbuscules) peut empêcher la détection d'autres champignons inattendus, l'utilisation d'un marqueur donné peut en revanche favoriser la détection d'espèces rares dans un échantillon.

- Les données de *metabarcoding* ne nous informent que sur l'abondance relative des microorganismes au sein des communautés. Cela peut mener à surestimer la présence de micro-organismes, comme cela a pu être le cas dans des tissus qui semblent en réalité stériles ou presque (Kennedy *et al*., 2023).

- Les marqueurs utilisés sont présents en de multiples copies : ils présentent un nombre variable de copies du même marqueur dans leur génome. Cette variabilité diffère entre groupes

d'organismes : le nombre de copies de l'opéron ribosomal chez les bactéries peut varier de 1 à 15 copies par génome (Perisin *et al.*, 2016) contre 14 à 1442 copies par génome chez les champignons (Lofgren *et al.*, 2019). Ces différences peuvent donc fausser l'estimation de l'abondance relative des groupes présentant des nombres de copies différentes.

- Le choix des protocoles utilisés dans la préparation des banques de séquençage (prélèvement des échantillons, conditionnement, extraction d'ADN, amplification PCR) peut influencer les résultats obtenus (Lindahl *et al*., 2013). De même, le choix des méthodes d'analyses bio-informatiques des séquences peut influencer le profil des communautés (Pauvert *et al*., 2019). Cela peut limiter les comparaisons entre résultats d'études différentes.

- L'inférence fonctionnelle des microorganismes est limitée. Les fonctions des microorganismes peuvent être inférées grâce à des bases de données (*e.g.*, FUNGuild pour les champignons ; Nguyen *et al.*, 2016 ou Tax4Fun pour les bactéries ; Aßhauer *et al.*, 2015). Ces bases de données ne couvrent toutefois pas l'ensemble des taxons, en particulier dans des écosystèmes moins étudiés (*e.g.*, les écosystèmes désertiques étudiés au cours de ce travail). De plus, les assignations taxonomiques réalisées à l'aide de bases de données ne renseignent que sur la fonction possible des microorganismes dans l'échantillon étudié : l'observation de champignons mycorhiziens dans des racines par exemple ne nous assure pas qu'il y a un transfert effectif de nutriments au moment du prélèvement de l'échantillon.

Nous avons ici cité des exemples principalement liés à l'analyse des communautés fongiques qui seront notre sujet d'étude principal au cours de cette thèse mais ces mêmes limites s'appliquent également à l'analyse des communautés bactériennes (Yang *et al.*, 2016 ; Pollock *et al.*, 2018).

5.3. Vers une complémentarité des méthodes ? Apport de la microscopie.

Les approches de *metabarcoding* ont permis une vraie révolution dans l'études des communautés microbiennes, en particulier en milieu naturel. Leur interprétation présente toutefois plusieurs limites pouvant mener à la détection de faux-positifs. De plus, la détection même avérée d'une espèce *par metabarcoding* n'assure pas forcément sa présence effective (détection de séquences mais pas de l'organisme), ni son intégrité comme en atteste la proportion importante d'ADN extracellulaire dans le sol (Carini *et al.*, 2016). Finalement, le *metabarcoding* ne nous permet pas de décrire les structures morphologiques présentes au sein de l'échantillon (hyphes, spores, vésicules, colonisation extra- ou intracellulaire, *etc*.).

La microscopie optique permet de décrire certaines structures caractéristiques comme les mycorhizes et donc de pouvoir prélever spécifiquement ces structures (*e.g.*, observation de pelotons d'espèces mycorhiziennes dans les racines ; Petrolli *et al.*, 2022). Toutefois, certains microorganismes ne forment pas de structures facilement identifiables en microscopie optique comme les champignons endophytes non-mélanisés qui colonisent de manière diffuse les racines (**I.3.3**). L'hybridation *in situ* à fluorescence (FISH) couplée à des observations microscopiques (*e.g.*, microscopie confocale à laser) peut être utilisée pour détecter de manière spécifique des groupes d'intérêts (Pernthaler *et al.*, 2001 ; Vági *et al.*, 2014) : l'ARN et les tissus de l'échantillon (*e.g.*, une racine de plante) sont dans un premier temps fixés chimiquement afin d'éviter leur dégradation. Une sonde à ARN, spécifique du microorganisme d'intérêt et couplée à un fluorochrome est ensuite hybridée. La racine de plante est observée à l'aide d'un microscope confocal équipé de lasers, qui émettent dans la longueur d'onde du fluorochrome. Si la sonde s'est hybridée au microorganisme d'intérêt, le fluorochrome excité émet de la fluorescence dans la longueur d'onde complémentaire qu'il est possible de détecter spécifiquement (**Figure I.17**). Cette méthode est régulièrement utilisée pour l'observation de procaryotes dans les environnements naturels (Pernthaler *et al*., 2001) mais a également été utilisée pour observer des organismes Eucaryotes. Elle a permis de confirmer la colonisation des racines de plantes non-ectomycorhiziennes par des espèces du genre *Tuber* (champignons ectomycorhiziens) en tant qu'endophytes (**I.3.4** ; Schneider-Maunoury *et al.*, 2020). L'hybridation à des molécules d'ARN permet en plus d'assurer que les hyphes observés sont métaboliquement actifs au moment du prélèvement, car l'ARN est une molécule peu stable dégradée rapidement.

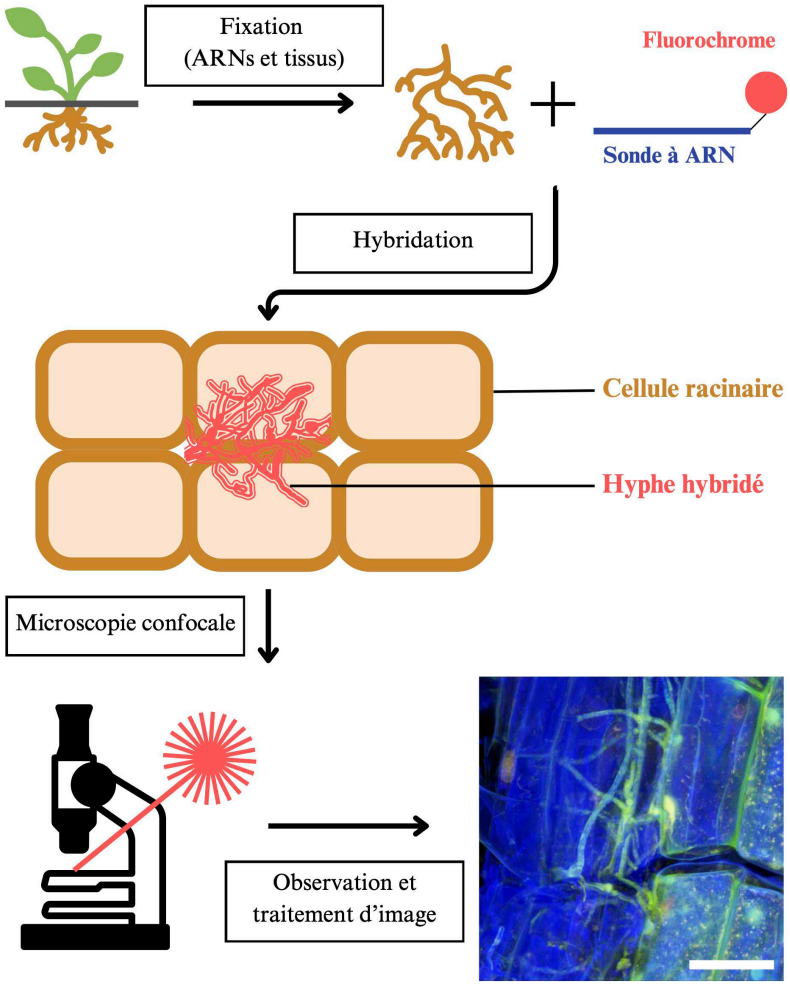


Figure I.17 Principe général de l'hybridation *in situ* à fluorescence (*fluorescence* in situ *hybridization*, FISH). L'échantillon d'intérêt (*e.g.*, une racine de plante) est fixé à l'aide de paraformaldéhyde, permettant de conserver les tissus et les ARNs. Une sonde à ARN spécifique du champignon d'intérêt, couplée à un fluorochrome, est ensuite hybridée à l'échantillon. La racine est observée en microscopie confocale, et les fluorochromes excités à l'aide de lasers aux longueurs d'ondes spécifiques du fluorochrome. La fluorescence émise est captée et permet de visualiser des hyphes (en vert) dans des racines de plantes (dont les parois sont marquées en bleu à l'aide d'un marqueur pariétal). Barre d'échelle : 30 µm.

Objectifs de la thèse

Les plantes interagissent avec une grande diversité de champignons, collectivement nommés mycobiote, qui jouent un rôle fondamental leur établissement et leur développement. Pourtant, les processus et facteurs expliquant l'assemblage du mycobiote sont encore mal connus. Au cours de cette thèse, nous chercherons à mieux comprendre l'influence de certains facteurs et processus sur l'assemblage du mycobiote.

Nous tâcherons dans un premier temps de déterminer comment, en milieu désertique, le mycobiote du sol est influencé par la présence d'espèces pérennes, suivant l'hypothèse de la distribution en îlots de fertilité (**Chapitre II, Article I**). Nous prendrons ensuite pour modèle une espèce pérenne arbustive commune dans la péninsule arabique pour déterminer la contribution respective de la transmission verticale et horizontale dans l'assemblage du mycobiote (**Chapitre II, Article II**).

Dans un deuxième temps, nous chercherons à déterminer si, dans des communautés végétales plus complexes en milieu tempéré, les champignons ectomycorhiziens sont également capables de coloniser, en tant qu'endophytes, les herbacées à proximité d'hôtes ecto-mycoriens (**Chapitre III, Article III**). Cette seconde niche écologique potentielle suggérerait d'une part l'influence des plantes voisines dans l'assemblage du mycobiote, et d'autre part un potentiel lien évolutif entre colonisation mycorhizienne et endophyte.

Finalement, nous nous focaliserons sur certains champignons mycorhiziens d'intérêts, les truffes. Nous montrerons comment l'étude de leur écologie et leur biologie *in situ* peut faciliter le développement de leur culture. Nous étudierons leur écologie en milieu naturel, en particulier celle des truffes du désert et le microbiote de leurs hôtes potentiels (**Chapitre IV, partie 1**). Nous tenterons de mieux comprendre la biologie reproductive de la truffe noire *Tuber melanosporum* (**Chapitre IV, partie 2**), notamment pour clarifier le rôle des spores dans la reproduction.

Chapitre II - Assemblage du microbiote fongique en milieu désertique.

Identifier les facteurs impliqués dans l'assemblage du microbiote des plantes est fondamental pour mieux comprendre d'une part leur écologie, et d'autre part l'évolution des interactions entre plantes et microorganismes. L'association avec des microorganismes permet aux plantes de coloniser des milieux présentant de fortes contraintes écologiques tels que les régions polaires (Newsham *et al*., 2009), le milieu épiphyte (Petrolli *et al*., 2021) et les déserts chauds (Maldonado *et al.*, 2022 ; ce chapitre). En effet, le microbiote des plantes participe à la réalisation de fonctions vitales comme la nutrition (Newsham, 2011 ; Almario *et al.*, 2022) et permet aux plantes de s'adapter à diverses contraintes environnementales telles que la sécheresse (Marasco *et al.*, 2012 ; Hosseyni Moghaddam *et al.*, 2021) ou la salinité (Asghari *et al.*, 2005 ; Dastogeer *et al.*, 2020 ; Gupta *et al.*, 2021), des caractéristiques courantes des déserts chauds. Ces derniers représentent presque un tiers de la surface du globe et leur surface devrait augmenter du fait du réchauffement climatique (Intergovernmental Panel on Climate Change, 2022). La biodiversité des déserts chauds reste pourtant peu étudiée en comparaison d'autres biomes (Durant *et al.*, 2012 ; Harrison & Griffin, 2020). Mieux comprendre comment les plantes s'adaptent à ces conditions extrêmes, en particulier par le recrutement de partenaires microbiens, pourrait permettre :

- D'améliorer la protection des espaces naturels en milieux désertiques.
- De lutter plus efficacement contre la désertification par le maintien et la restauration des populations de plantes.
- D'identifier des stratégies d'adaptation aux fortes contraintes environnementales (sécheresse, salinité *etc*.) potentiellement transposables à d'autre systèmes naturels et cultivés (*e.g.*, résistance à la sécheresse de plantes cultivées).

L'assemblage des microbiotes est un processus complexe qui dépend de facteurs ayant une influence à des échelles de temps et d'espace variables. Dans ce chapitre, nous nous concentrerons sur des facteurs influençant l'assemblage du microbiote à l'échelle locale, à savoir les conditions édaphiques (**Article I**) et les voies de transmission du microbiote (**Article II**). Ces deux études ont été menées dans la région d'AlUla (Arabie Saoudite), un désert hyper-aride de la péninsule arabique caractérisé par de faibles précipitations annuelles (entre 25-230 mm par an) et un pH des sols hyper-alcalin (**Article I**). Nous avons dans un premier temps

cherché à évaluer l'impact de la distribution des plantes en îlots de fertilité sur le microbiote du sol et le microbiote racinaire. Cette étude nous a permis de mettre en évidence que l'établissement d'îlots de fertilité est caractérisé par une modification des conditions physico-chimiques du sol (baisse du pH, augmentation de la concentration en éléments tels que le magnésium, le phosphore e let potassium) et une augmentation de la diversité microbienne du sol. La diversité microbienne racinaire en revanche est plus faible que dans le sol, suggérant un filtre racinaire important. Le sol dans les îlots de fertilité pourrait ainsi être une source majeure dans l'assemblage du microbiote des plantes en conditions désertiques.

Dans un second temps (**Article II**), nous avons étudié plus précisément la contribution respective du sol (transmission horizontale) et des graines (transmission verticale) dans l'assemblage du microbiote fongique, moins décrites que chez les bactéries. Nous avons choisi *Haloxylon saliconicum* (Amaranthaceae) comme plante modèle, une espèce arbustive courante dans la péninsule arabique (Al Salameen *et al*., 2018) et qui présente des potentiels pour la restauration des écosystèmes désertiques (Rathore *et al*., 2015). Afin d'évaluer la contribution respective du sol et des graines dans l'assemblage du mycobiote d'*H. salicornicum*, nous avons d'une part caractérisé le mycobiote des différents compartiments d'individus adultes *in situ* (sol, rhizosphère, racines, feuilles et graines) et d'autre part mis à germer *in vitro* des graines sur du substrat autoclavé ou non. Nous avons ainsi mis en évidence que le mycobiote était partiellement transmis verticalement *via* les graines aux feuilles et racines des plantes *in vitro*, sans contribution du sol. En revanche, le mycobiote des racines et de la rhizosphère des plantes adultes *in situ* provient principalement du sol (transmission horizontale). Les feuilles des plantes adultes *in situ* présentent un assemblage mixte, provenant principalement des graines avec une contribution plus faible du sol.

Les deux articles présentés dans ce chapitre sont le fruit d'une collaboration étroite avec Kenji Maurice, doctorant au CIRAD. L'article I est publié dans la revue *Journal of Arid Environments* (co-premiers auteurs). L'article II est accepté dans la revue *Environmental Microbiology Reports* et peut être également être consulté sous forme de *pre-print* (premier auteur).

Article I - Fertility islands, keys to the establishment of plant and microbial diversity in a highly alkaline hot desert

Auteurs :

Kenji Maurice[1]*, Liam Laurent-Webb[2]*, Adeline Dehail[1], Amélia Bourceret[2], Stéphane Boivin[1], Hassan Boukcim[3], Marc-André Selosse[2,4,5], Marc Ducousso[1]

[1] CIRAD, UMR082 LSTM, Montpellier Cedex 5, 34398, France.

[2] Institut de Systématique, Évolution, Biodiversité (ISYEB), Muséum National d'Histoire Naturelle, CNRS, Sorbonne Université, EPHE, 57 Rue Cuvier, CP39, 75005 Paris, France.

[3] Department of Research and Development, VALORHIZ, 1900, Boulevard de la Lironde, PSIII, Parc Scientifique Agropolis, F34980 Montferrier sur Lez, France.

[4] Institut Universitaire de France, France.

[5] University of Gdańsk, Faculty of Biology, ul. Wita Stwosza 59, 80-308, Gdańsk, Poland.

* Co-premier auteurs.

Résumé/abstract :

La distribution des communautés végétales dans les déserts chauds est discontinue et suit la modèle d'îlots de fertilité du fait de la distribution hétérogène des ressources du sol. La compréhension des facteurs qui permettent aux plantes de s'établir dans ces conditions, ainsi que la diversité microbienne qui leur est associée, est cruciale pour la compréhension et la préservation de ces écosystèmes. L'Arabie Saoudite, dans la péninsule arabique, est l'une des régions les plus arides du monde, avec un régime hydrique très faible et de faibles teneurs en nutriments dans le sol. L'établissement d'écosystèmes dans ces conditions arides est donc

soumis à de nombreuses contraintes. Comprendre les facteurs biotiques et abiotiques liés à la formation d'îlots de fertilité, tels que la composition du sol et du microbiome associé, à la fois dans le sol et dans les racines de la communauté végétale, est donc un enjeu fondamental pour la préservation de ces écosystèmes. Dans cette étude, nous avons analysé la composition du sol entre un îlot de fertilité et un sol nu. Les proportions de micro- et macro-éléments importants pour la nutrition des plantes, à savoir le magnésium, le phosphore, le potassium et le fer, étaient plus élevées dans l'îlot de fertilité. Nous avons également observé que la diversité bactérienne et fongique du sol était plus importante dans l'îlot de fertilité. Des taxons clés appartenant aux Rhizobia et Glomeraceae, qui jouent un rôle important dans le fonctionnement de l'écosystème, ont été identifiés à la fois dans le sol de l'îlot de la fertilité et dans les racines de la communauté végétale établie. Ces résultats confirment que l'établissement des plantes est lié aux conditions du sol, conformément à l'hypothèse de l'îlot de fertilité, et que la communauté microbienne de l'îlot de fertilité diffère à la fois en diversité et en composition de celle du sol nu. Le sol des îlots de fertilité et les racines des communautés végétales abritent un microbiome potentiellement crucial pour le fonctionnement de l'écosystème, et présentent un intérêt majeur pour les programmes de conservation et de production agricole.

The distribution of plant communities in hot desert ecosystems is discontinuous and resembles the pattern of heterogeneous resource patches, known as "fertility islands". Understanding the key factors that allow plants to establish in these conditions, as well as their associated microbial diversity, is crucial to the comprehension and preservation of these ecosystems. Saudi Arabia in the Arabian Peninsula, is one of the driest regions in the world, with a very low water regime and low soil nutrient contents. The establishment of ecosystems in these arid desert conditions is therefore subject to numerous constraints. Understanding the biotic and abiotic factors linked to the formation of fertility islands, from the perspective of soil composition and its associated microbiome, both in the soil and in the roots of associated plant community, is therefore a fundamental issue for the preservation of these ecosystems. In this study, we analyzed the soil composition between a fertility island and bare soil. The pro portions of micro- and macro-elements important for plant nutrition, namely magnesium, phosphorus, potassium and iron were higher in the fertility island. We also observed that soil bacterial and fungal diversity increased in the fertility island. Key taxa such as Rhizobia and Glomeraceae which play important roles in ecosystem functioning were identified in both the fertility island soil and in the roots of the established plant community. These results confirm that plant establishment is linked to soil conditions, in line with the fertility island hypothesis, and that

the microbial community in the fertility island differs both in diversity and in composition from that of the bare soil. Fertility islands soils and the roots of established plant community harbor a microbiome potentially crucial to ecosystem functioning, and are of major interest for conservation and agronomy programs.

Citation :

Maurice K, Laurent-Webb L, Dehail A, Bourceret A, Boivin S, Boukcim H, Selosse M-A, Ducousso M. 2023. Fertility islands, keys to the establishment of plant and microbial diversity in a highly alkaline hot desert. *Journal of Arid Environments* 219: 105074. https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2023.105074

Introduction

Arid deserts and semi-arid deserts account for more than a third of the world's land surface, with 15% classified as arid and 4% as hyperarid (Meigs, 1953). These ecosystems host 20% of global plant diversity, play a significant role in carbon storage (Pravalie, 2016) as well as in net primary production (Millennium Ecosystem Assessment, 2005). In these nutrient-depleted ecosystems, microbial and plant distribution is highly heterogeneous, mirroring the pattern of 'resource islands' or 'fertility islands' (Schlesinger *et al.,* 1995). Plants promote microbial community heterogeneity by improving fertility under their cover (Herman *et al.,* 1995) as they buffer changes in soil temperature and evaporation (Kidron, 2009). By foraging for water deep in the soil, their roots influence the global water cycle and promote inputs of organic matter and nitrogen through litter decomposition and rhizodeposition. The composition of plant communities and their functional traits, such as specific leaf area (SLA) and height, have both direct and indirect ef- fects on the formation of these 'fertility islands', in which microorgan- isms also play a facilitating role (Ochoa-Hueso *et al.,* 2018). As a result, microbial communities differ in diversity and abundance across these heterogeneous, discontinuous resource patches (Herman *et al.,* 1995; Ochoa-Hueso *et al.,* 2018). A study in the Negev desert found that in relatively alkaline soil (pH≈8), bacterial biomass, as revealed by bacterial phospholipid fatty acids, was higher in the soil under shrubs (Bachar *et al.,* 2012). Another study in the Negev desert also reported higher bacterial richness and diversity under shrubs (Berg *et al.,* 2015), whereas another in the Mu us desert in China found no difference in bacterial diversity and richness in soil patches under and between shrubs, despite a difference in composition (Sun *et al.,* 2017). Arid conditions stimulate the selection of bacteria that improve plant resistance to abiotic stresses (e.g., drought, water limitation, solar radiation). For example, Marasco *et al*. (2012) isolated plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) strains in the roots of pepper plants in Egypt that were able to enhance photosynthetic activity and biomass synthesis under drought stress. In 2014, Timmusk *et al.* inoculated wheat with rhizospheric PGPR from harsh environments, and reported five times higher survival rates and 78% more biomass in inoculated plants under drought stress (Timmusk *et al.,* 2014). The aforementioned phenomenon is particularly true for fertility islands, where microorganisms are key to relieving plant abiotic stress. As these microorganisms have coevolved with their host plant in a harsh environment, they are expected to harbor traits that improve plant fitness under local environmental stress (Marasco *et al.,* 2012). Fungal communities, particularly mycorrhizae, can

also enhance water uptake, stabilize soil, and provide a wide hyphal network that guarantees water and nutrients are available to all the plants in a specific community (Allen, 2007). Overall, microorganisms in fertility islands directly and indirectly affect the ability of plant communities to recycle nutrients through litter decomposition, rhizodeposition and mineralization of organic matter. Selecting microbial communities that are capable of establishing and interacting positively with plant communities is thus crucial for ecosystem functioning (Alsharif *et al.,* 2020), particularly in arid environments. The extent to which fertility islands affect microbial communities in different eco- systems has been little studied to date.

The Arabian Peninsula is characterized by extreme hot arid desert conditions, including marked temperature fluctuations, scarce rainfall with an annual precipitation range from 25 to 230 mm, and high solar radiation. The arid soils in this region have low organic matter and nitrogen content (Yasir *et al.,* 2015) and higher evapotranspiration than precipitation leads to soil salinization (Shahid *et al.,* 2018). These abiotic stresses are obstacles to the establishment of vegetation and the net primary productivity of the ecosystem. In these conditions, microorganisms play a key role in ecosystem functioning as they are the first soil colonizers (Borin *et al.,* 2010) and control both nutrient cycling and organic matter decomposition (Delgado-Baquerizo *et al.,* 2016). Identifying microbial communities in the context of land aridification and climate change is a major issue as increasing aridity is already reducing both the diversity and abundance of soil microbial communities in drylands (Maestre, *et al.,* 2015). While the number of studies on microbial communities of fertility islands is increasing in hot arid ecosystems (Ewing *et al.,* 2007; Goberna *et al.,* 2007; Li *et al.,* 2021), the identification of the microbial diversity in highly alkaline arid ecosystems is still lacking (Tedersoo *et al.,* 2014).

Despite the harsh conditions, some plant communities are able to establish and form fertility islands, providing favorable microenvironments for microorganisms. The aim of the present study was to identify bacterial and fungal diversity in a ‘fertility island’ related to a topo- logical micro-environment in a highly alkaline arid natural desert ecosystem, and to test microbial community assembly across bare soil, fertility island soil and roots. We hypothesize that in this highly con- strained ecosystem, both microbial diversity and identity are impacted by the soil conditions found in ‘fertility islands’ and that the response of fungal and bacterial diversity and richness will differ in magnitude be- tween bare soil, fertility island soil and roots. We also hypothesize that the harsh environmental conditions that prevail in this ecosystem result in the selection of potentially highly functional microorganisms for overall ecosystem functioning.

Material and methods

Sampling site

The study site is AlUla, an oasis in north-west Saudi Arabia, 300 km from Medina (GPS coordinates: 26.6922637 N; 37.8687903 E). We studied a plant community in a temporary water flow zone, where water flows only during heavy rainfall events, on average two to four times a year. This flow zone is located at the base of a sandstone rock formation. We compared it to the bare soil outside the flow zone, 10 m from the rock formation, which contained no visible vegetation at the time of sampling (Fig. 1). We sampled soil from: 1) Soil beneath shrubs, where a plant community is established, hereafter termed 'fertility island soil' (FIS), and 2) a sandy zone with no visible vegetation at the time of sampling termed 'bare soil' (BS). A total of 32 samples were taken, nine of which were soil samples, six from the unvegetated dune area (BS) and three from the vegetated fertility island soil (FIS). All soil samples were taken at 30 cm depth and samples for X-ray fluorescence analysis (XRF) consisted of a pool of 4 × 25g samples for each point. Twenty-six root samples that were representative of the plant community were collected from the FIS zone. The plant community mainly comprised *Stipagrostis plumose* Munro ex T. Anderson, *Pergularia tomentosa* L., *Helianthemum lippii* (L.) Dum. Cours. and *Vachellia tortilis* (Forssk.) Galasso & Banfi. All soil samples were sieved to 2 mm and the root samples were stored in a 2% cetrimonium bromide solution. All samples were stored at 4 ◦C until laboratory analysis.

Soil chemical composition and pH

The relative abundance of the chemical elements (ranging from magnesium to uranium) in the soil was measured by XRF. Triplicates of each soil sample were pressed at 20 tons for 2 min with 1:3 v:v of Spectroblend (SCP Science). Each pellet was then analyzed in triplicate using an XRF S1 Titan (Bruker). The nine measurements were then averaged and calibrated according to the limit of optical detection (LOD) of each element analyzed (provided by Bruker). The pH was measured using a Knick 766 pH-meter in 1:5 v:v of H2O and KCl (1 $mol.L^{-1}$). The difference between the two measurements is an indication of the cation or anion exchange capacity, depending on whether the difference is positive or negative.

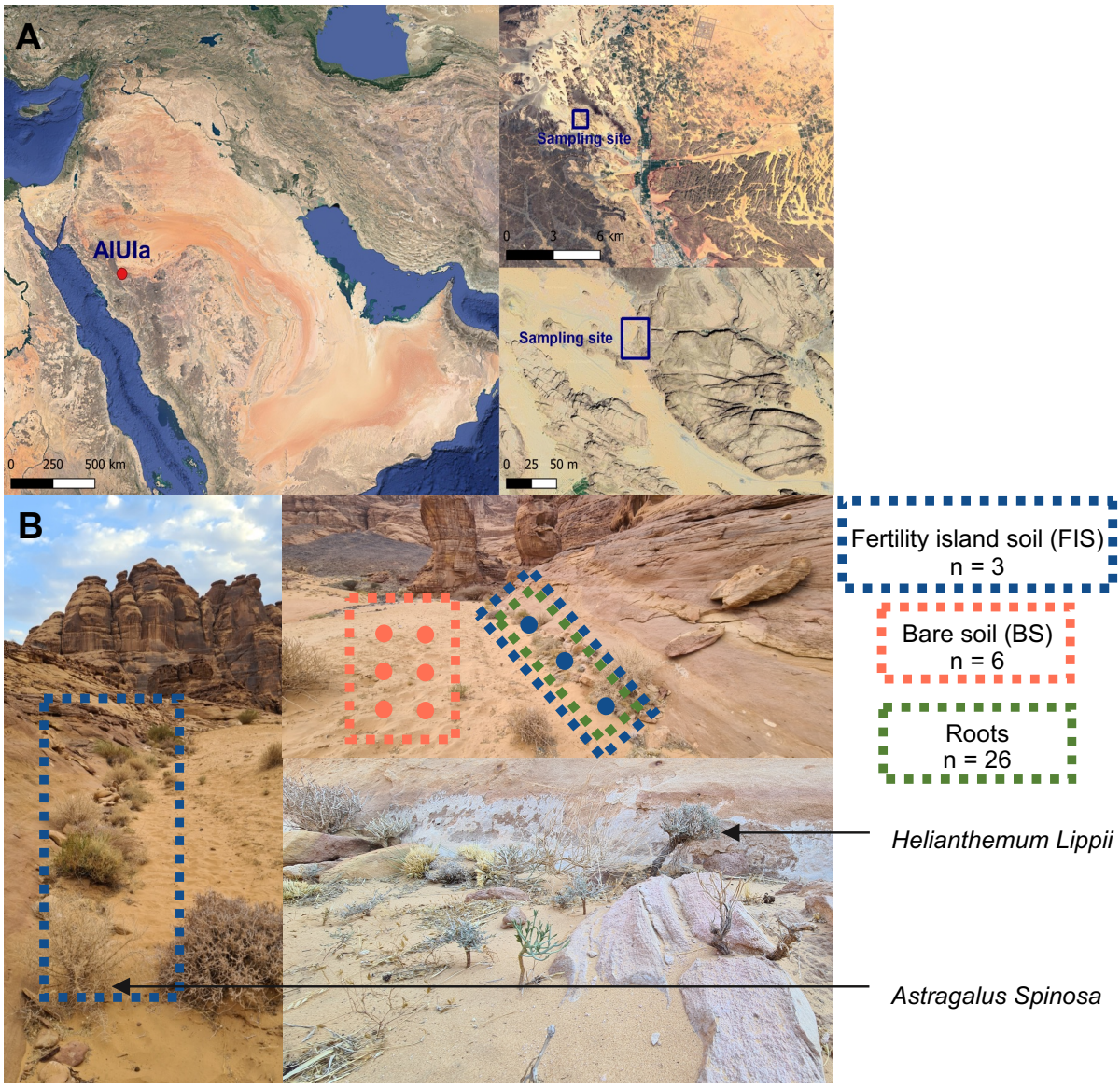


Figure 1: A. Sampling site located in the hot arid desert of Saudi Arabia near AlUla oasis (26.6922637 N; 37.8687903 E). **B.** Sampling site of the fertility island microenvironment. The different sampling conditions (fertility island soils=FIS, bare soil=BS, and Roots=roots from the plant community established in the fertility island), and the fertility island associated plant community are shown.

Molecular methods and Illumina MiSeq Sequencing

Soil DNA was extracted with the FastDNA Spin kit for soil (MP Biomedicals, Solon, USA), and blank extractions were added as negative controls. The DNA concentrations were assayed by fluorescence with the Picogreen fluorophore (Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kits, ThermoFisher scientific, USA). This assay was used to normalize the DNA concentrations to 0.3 ng μL^{-1} before PCR amplification. The primers 479F (5′-CAGCMGCYGCNGTAANAC-3′) and R888 (5′-CCGYCAATTCMTTTRAGT-3′) were used

to amplify the V3–V4 hypervariable region of the 16S rRNA gene (Terrat *et al.,* 2015). Primers ITS86F (5′-GTGAATCATCGAATCTTTGAA-3′) and ITS4 (5′-TCCTCCGCTTATTGA-TATGC-3′) were used to amplify the fungal ITS2 region (Op De Beeck *et al.,* 2014). AMADf (5′-GGGAGGTAGTGACAATAAATAAC-3′) and AMADGr (5′-CCCAAC-TATCCCTATTAATCAT-3′) were used to amplify the 18S rRNA gene, which is the most suitable for a cross-compartment, survey focused on arbuscular mycorrhizal fungi e.g., soil vs root (Berruti *et al.,* 2017). Reactions were performed in a volume of 20 µL consisting of 10 µL of Buffer Master mix containing Thermo Scientific Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (ThermoFisher scientific™, USA), 0.5 µL of DMSO, 4.5 µL of DNAse-free water, 3 µL of DNA (0.3 ng μL^{-1}), 1 µL of forward primer and 1 µL of reverse primer, tagged with a short nucleotide sequence. Amplifications were performed with the following conditions: initial denaturation for 10 min, 35 denaturation cycles at 94°C for 10 s, annealing at 55°C for 20s, extension at 72°C for 20s and a final polymerization extension at 72°C for 7 min. All the reactions were performed in triplicate with an associated negative control, then pooled before deposition on 2% agarose gel for quality control of the amplifications. Amplifications of ITS and 18S regions were purified with AMPure XP beads (Beckman Coulter, USA) on a magnetic rack with a 1:1 ratio of AMPure XP for each PCR product. For 16S purification, an additional step of migration of the PCR products on a 2% agarose gel (at 80 V, for 90 min) was performed to separate and recover the band specific to bacterial 16S, and to eliminate the plant chloroplastic 16S DNA (co-amplified during the PCR).

MetaFast library preparation and sequencing were performed on an Illumina 2 × 250 bp MiSeq platform by Fasteris SA (Switzerland). A pipeline based on VSEARCH (Rognes *et al.,* 2016) was used for data processing (Perez-Lamarque *et al.,* 2022). The merged reads were then demultiplexed (assigned to respective samples based on tagged primers) with 0 error accepted in primers or tag sequences, using cutadapt (Martin, 2011). Sequences were clustered into operational taxonomic units (OTUs) with 97% similarity using the VSEARCH algorithm. Chimeras were removed de novo (uchime_denovo option of VSEARCH) and the taxonomic assignment of the OTUs was performed (usearch_global option, default parameters) using UNITE V8.3 (Nilsson *et al.,* 2019) and Silva 138.1 (Quast *et al.,* 2012), for ITS2 and for 16S and 18S marker genes, respectively. The OTU tables were filtered to remove contaminants based on comparison with negative controls (blank DNA extractions) using the R package *DECONTAM* (prevalence method; Davis *et al.,* 2018). Only OTUs with long sequences (>200 bp), assigned to the fungal kingdom and presenting acceptable abundance (≥10 reads) were kept for downstream analyses.

Statistical analyses

Soil variables measured by XRF are compositional, in percentage, and thus, enclosed in a compositional space called a simplex, where Euclidean distances are not meaningful. To be able to map data into a Euclidean space and perform a multivariate visualization using principal component analysis (PCA) and statistical tests, we applied a centered log ratio transformation (clr) following the recommendations from Reimann *et al*. (2012). To test for differences of chemical elements composition between fertility island soils and bare soils, we first tested variance equality using F-tests and performed Welch two-sample t-tests on equal variances and t-tests on unequal variances soil variables. Illumina MiSeq sequencing yielded 631,253 sequences that were clustered into 4276 OTUs for 16S, 15,247,324 sequences that were clustered into 266 OTUs for ITS, and 232,727 sequences that were clustered into 121 OTUs for 18S. Sequencing data were studied using the *microeco* (Liu *et al.,* 2021), *phyloseq* (McMurdie and Holmes, 2013) and vegan (Oksanen *et al.,* 2013) packages in R (Team, R. C, 2013). Data were rarefied to 1000 for 16S and 18S and to 20,000 for ITS. To study diversity at the sample level, alpha diversity analyses were performed with the Shannon index and Chao1 estimator. Differences in alpha diversity between bare soil (BS), fertility island soils (FIS) and roots were tested with a Wilcoxon test. Finally, to describe the fungal communities in more detail, we used the FUNGuild database which assigned each out to a trophic type (Nguyen *et al.,* 2016), and Tax4Fun for functional annotation of the bacterial communities. A non-metric multidimensional scaling (NMDS) ordination based on Bray-Curtis dissimilarity distances was performed for each amplicon.

In order to test the differences in the structure of the microbial communities between BS, FIS and roots, we performed Permanovas on Bray-Curtis distances matrix. In order to identify differentially abundant taxa between bare soil, fertility island soil and plant roots in the fertility island, we used differential abundance analyses using the LEfSe algorithms for bacteria and fungi identified with the ITS region of rRNA (Segata *et al.,* 2011), and Metastat (White *et al.,* 2009) for fungi identified with the 18S region of rRNA. These algorithms, developed in the context of compositional sequencing data, identify which taxa or taxonomic levels are differentially expressed in each condition. The use of two different algorithms is justified by the different number of samples between each amplicon. We reported the LDA score (log of model selection in the linear discriminant analysis of LEfSe) and the relative abundance differences to express the differences in expression between each of our conditions. The higher the LDA score, the more significant the difference.

Results

Soil chemistry in fertility island support plant establishment and nutrition

Table 1: Fertility islands soils and bare soils have distinct chemistry, where fertility island soils have higher proportion of micro- and macro-elements that support plant nutrition. Mean relative abundance, in percentage (%), and standard deviation for each element is presented according to BS and FIS soils with the associated *p*-value from *t*-tests (samples with equal variances) or Welch tests (samples with unequal variances). Tests for micro- and macro-elements (from Si to Al) were performed on centered log ratio transformed values. The difference between pH H_2O and pH KCl correspond to the acidification potential (AP).

	Condition					
	BS		FIS			
	Mean (%)	SD	Mean (%)	SD	Test type	*p*
Si	93.9	1.01	82.08	2.94	*t*-test	<.001***
Mg	1.25	0.24	2.09	0.44	*t*-test	<.001***
Mn	0.01	0	0.02	0.01	*t*-test	<.001***
Fe	0.47	0.12	1.53	0.51	*t*-test	<.001***
P	0.02	0.01	0.05	0.01	Welch	<.001***
K	0.13	0.04	0.6	0.16	Welch	<.001***
Ca	0.64	0.23	0.56	0.29	Welch	<.001***
Al	3.33	0.52	12.56	2	Welch	<.001***
pH (KCl)	8.82	0.07	7.79	0.33	*t*-test	<.001***
pH (H_2O)	9.23	0.06	8.61	0.2	*t*-test	<.001***
AP	0.42	0.1	0.81	0.39	Welch	0.217

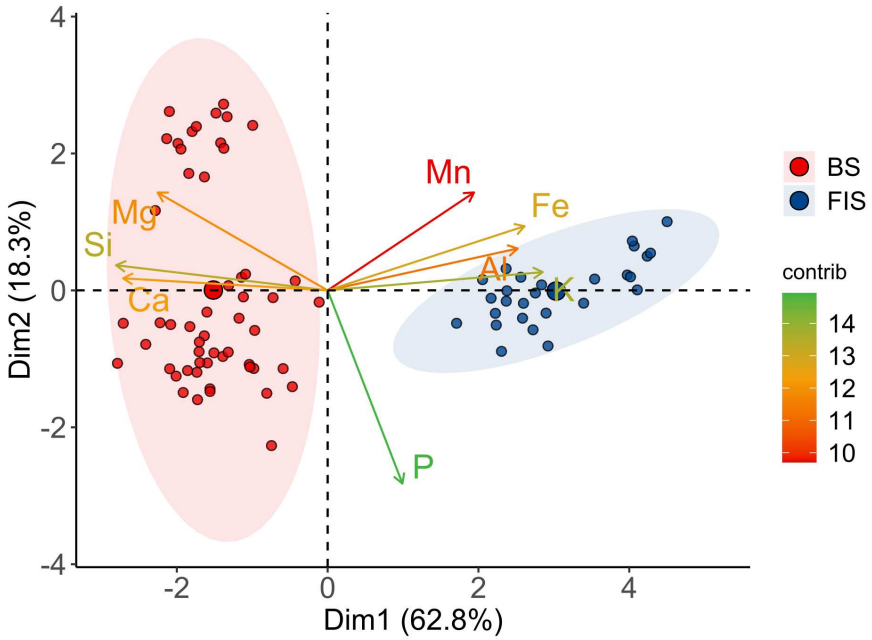


Figure 2: Fertility island soil is distinct from bare soil and is enriched in micro- and macro-elements that support plant nutrition. Biplot of Principal Component Analysis (PCA) on soil clr transformed XRF technical replicates, dots colors represent the bare soils (BS) and fertility island soils (FIS). The barycenter of the groups is

(continued) represented by a larger dot. Dimension 1 explains 62.8% of total variation, dimension 2 explains 18.3% of total variation. Vectors are colored according to their relative contribution to the dimensions (contrib).

Overall, our soil samples were characterized by high pH, where fertility island soils were less alkaline (9.23±0.06% for BS and 8.61±0.20% for FIS) and silica content (93.9±1.01% for BS and 82.08±2.94%), reflecting the high proportion of sand in the soil (Table 1, Fig. 2). The main differences between FIS and BS were in the proportion of macro-elements, particularly phosphorus and potassium and micro- elements such as iron and manganese, that were higher in the FIS. The relative proportion of aluminum, which has been shown to be representative of the proportion of clay in the soil, was also higher in the FIS.

A microbial composition distinct between bare soils, fertility island soils and roots

The fungal communities in the soils and roots were dominated by Ascomycota, representing the majority of OTUs at 94%, 90.7% and 79.6% of relative abundance in the bare soil, FIS, and roots respectively, followed by Basidiomycota (2.1%, 3.6% and 10.5%) (Fig. 3). Amplification of the 18S gene revealed a high proportion of Glomeromycetes in the roots, as high as 57.5%, and in the FIS (25.5%), while they represent only 11.8% in the bare soil. ITS rRNA differential abundances revealed the high specificity of OTUs in the FIS. For example, the genus *Archeotomium* and *Naganishia* were significantly more abundant in FIS (Fig. 4). Major bacterial phylums were represented by Actinobacteriota with a mean proportion of 40.0%, 40.2% and 48.7% in the bare soil, FIS and roots, respectively, and Proteobacteria (20.0%, 20.2%, 33.1%). Bacillales were specific to the bare soil, while Thermoleophilia, Gaiellales, Solirubrobacterales and Gemmatimonadota were specific to the FIS.

Unlike bacteria, the fungal trophic type identified depends on the fertility island effect

Overall, a significant proportion of saprotrophic, symbiotrophic, and pathotrophic fungi, were specific to bare soils, roots, and FIS, respectively. The fungal diversity detected by amplification of the 18S region revealed a high proportion of symbiotrophs in the roots, as high as 60.7%. The potential functions of bacterial communities were mainly linked to metabolism (60.4–60.7%), environmental information processing (20.6–21.5%), genetic information processing (10.6–11.2%), cellular processes (4.6–5.1%) and human diseases (1.8–2.1%), and their proportions remained relatively unchanged (Fig. 5).

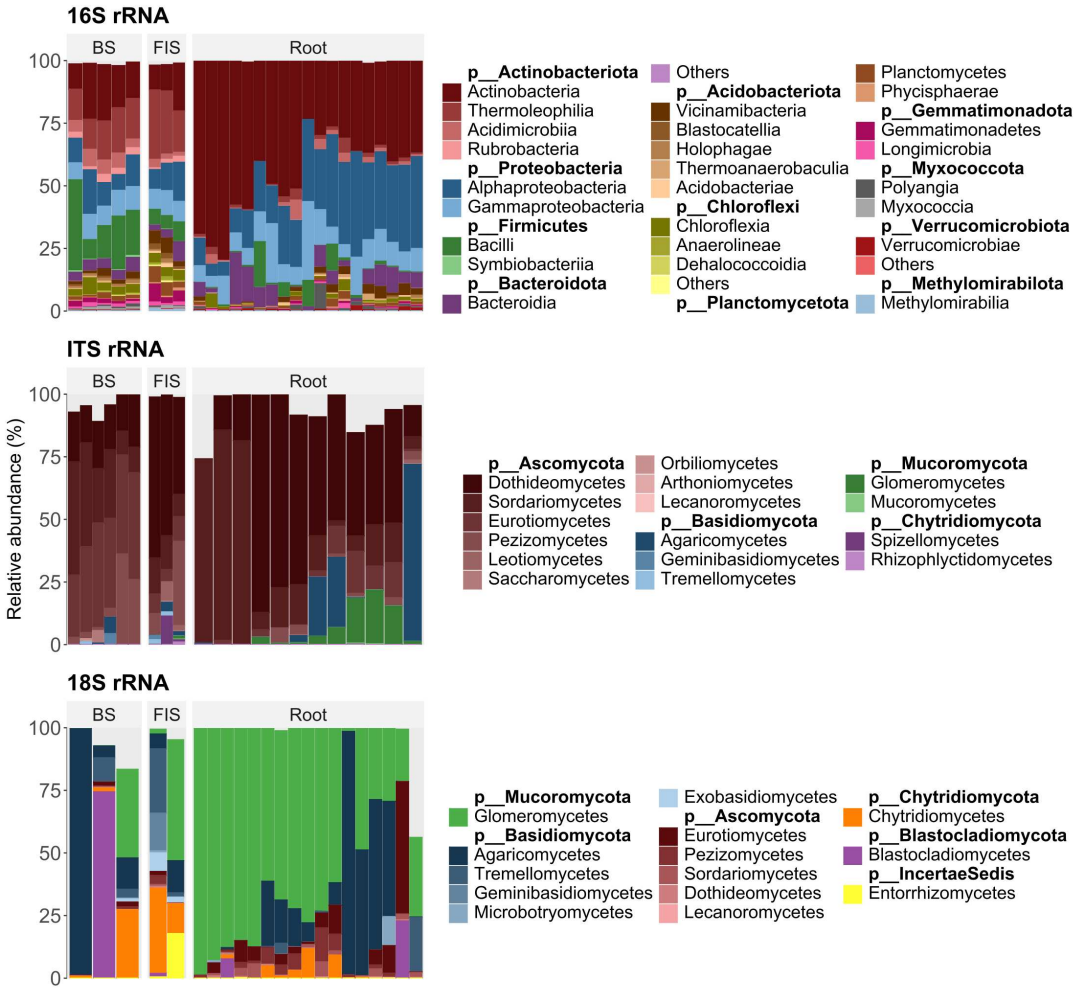


Figure 3: Fertility islands influence soil microbial compositions, and enrich the proportion of mycorrhizal fungi in the roots of the associated plant community when compared to bare soil. Differences in averaged relative abundances according to the bare soil (BS), fertility island soil (FIS) and, roots of the fertility island plant community (Root) are presented for each amplicon (16S rRNA=bacterial community, ITS rRNA=fungi community, 18S rRNA=mycorrhizal community). Different colors represent different classes (for 16r RNA) and families (for ITS rRNA and 18S rRNA) according to each phylums (p_). Relative abundances were computed after rarefaction of samples to 20,000 reads for ITS rRNA and to 1000 reads for 16S rRNA and 18S rRNA amplicon datasets.

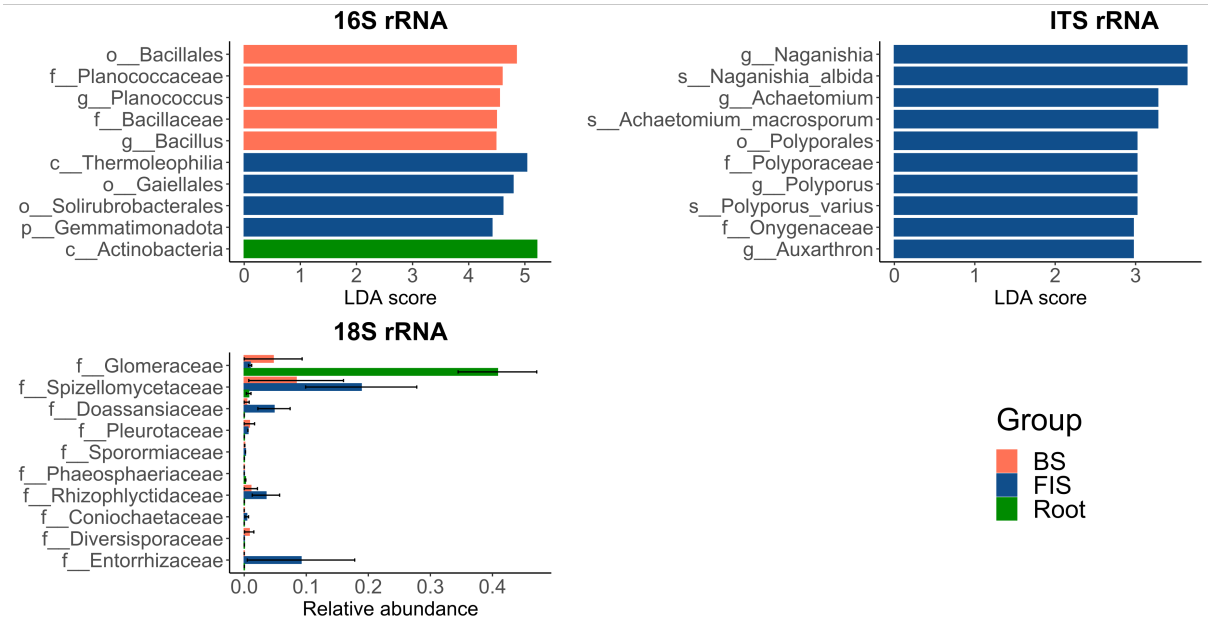


Figure 4: Differential abundance analysis reveals the specific communities associated to each condition (BS, FIS or Root). LEfSe was run with an alpha threshold of 0.01 for bacterial (16s rRNA) and fungal communities (ITS rRNA), and the LDA score (as the log value of significant taxonomic level identified by the linear discriminant analysis model) is reported for the top 10 differentially abundant taxonomical level (p_=phylum; c_=class; o_=order; f_=family; s_=species) at each condition. The higher the LDA score, the higher the significance. For mycorrhizal communities (18S rRNA), significant differential abundances correspond to the Metastat method according to each condition at the family level.

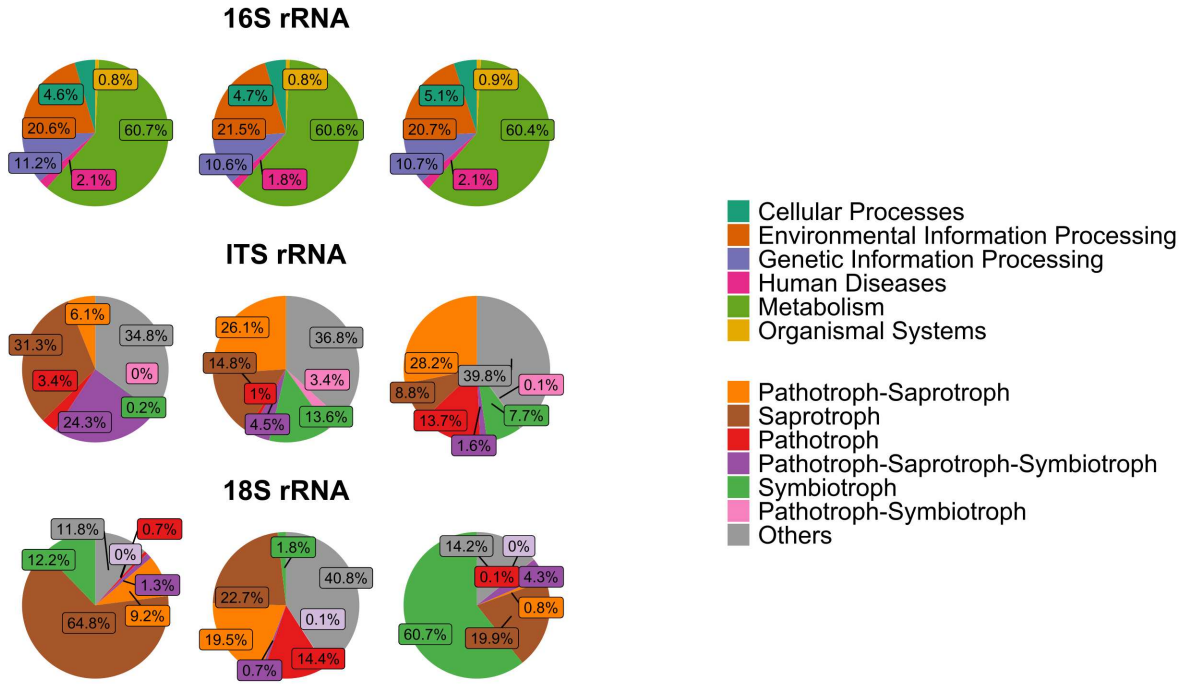


Figure 5: Root of plants established in the fertility island are enriched with symbiotrophic fungi. Functional assignment from Tax4Fun with the SILVA database for bacteria (16S rRNA) and trophic mode assignment from FunGuild for fungi (ITS rRNA and 18S rRNA) according to the bare soil (BS), fertility island soil (FIS) and, roots of the fertility island plant community (Root) are shown with the associated percentages.

Fertility island soils exhibit higher microbial diversity than bare soils and roots

Shannon diversity and richness were significantly lower in roots for both fungi (ITS rRNA) and bacteria (16S rRNA) while the FIS had significantly higher alpha diversity than bare soil for bacteria, and higher richness for fungi (Fig. 6). Differences in alpha diversity were not significant for 18S. The bacterial and fungal community assemblages were visualized with NMDS, which all clustered according to the three conditions. A clear distinction was observed between soil samples and root samples for bacterial communities, and to a lower extent between FIS and bare soil. The distinction between FIS and bare soils was stronger in the fungal communities highlighted by the ITS rRNA. Overall, bacterial and fungal communities formed distinct clusters ac- cording to the soils and roots, as shown in NMDS (Fig. 6), with greater dissimilarity for bacteria than for fungi, as highlighted by ITS and finally by 18S (Permanova 16S, R^2=0.279, p<0.001***; Permanova ITS, R^2=0.26, *p*<0.001***; Permanova 18S, R^2=0.159, *p*<0.002**).

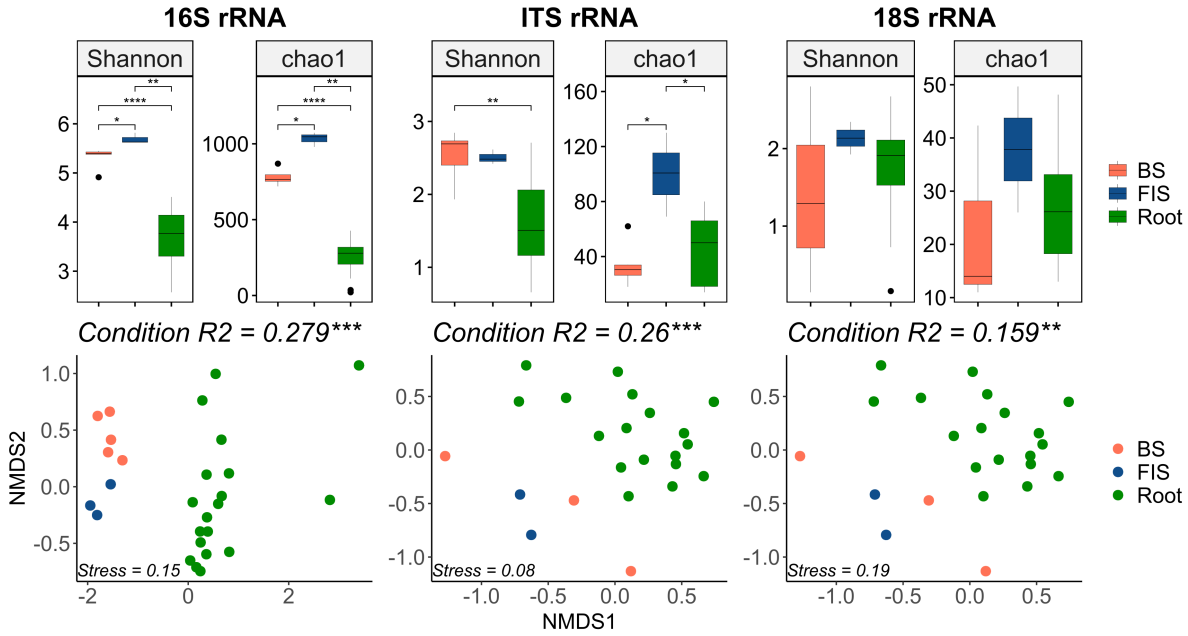


Figure 6: Microbial communities' compositions are different across soils and roots and alpha diversity is higher in fertility island soils. Alpha diversity indexes are presented for bare soil (BS), fertility island soil (FIS) and roots of the fertility island plant community (Root) according to each amplicon (16S rRNA = bacterial community, ITS rRNA = fungi community, 18S rRNA = mycorrhizal community). Chao1 is the specific richness and Shannon is a species diversity index that considers both richness and evenness. Beta diversity is presented with non-metric multidimensional scaling (NMDS), stress is reported, as well as Permanova of communities' composition with the associate R2 and stars for p-value significance. Samples with less than 1000 reads were discarded and rarefaction was performed at 1000 reads for 16S rRNA and 18S rRNA and 20,000 reads for ITS rRNA.

Discussion

The aim of this study was to investigate differences in soil composition and the associated fungal and bacterial microbiome between a microenvironment called a "fertility island" and the surrounding bare soil in hot arid and highly alkaline desert. We also studied the diversity and composition of the microbiome in the roots of the fertility island's plant community in order to identify putative functional taxa essential to ecosystem functioning and plant development. Our results showed that the fertility island was characterized by changes in soil conditions, such as increased acidity, higher proportions of micro- and macro-elements, and greater water availability and retention reflected by a higher proportion of clay. These parameters probably contributed to the local survival of the plant community. The fertility island also had an effect on the composition and diversity of the microbiome, where the soil associated with plants and their roots hosted a microbiome with a central role in ecosystem functioning.

A micro-environment within a sand dune

The studied site, with vegetated soil along a topological water flow zone within a dune, exhibits the characteristics of a fertility island, namely an area with, in our case, a greater proportion of micro- and macro-elements that favors plant nutrition. Runoff from the sandstone slab above likely favors the formation of alluvium and colluvium of fine particles loaded with clays and minerals resulting from the degradation of the parent rock. The proportion of Si and Al can be linked to soil texture, as XRF analysis is used to predict soil properties such as texture in a homogeneous environmental setting (Zhu *et al.,* 2011). In our case, higher clr or percentage values of Si corresponded to a higher proportion of sand, and higher clr or percentage values of Al corresponded to a higher proportion of clay. Although the proportion of macro-elements such as P was higher in FIS, phosphorus is mainly available to plants in the form of orthophosphates (HPO^{2-} or HPO^{-}), which in our study, were not directly measured by XRF. On the other hand, the higher clay content found in FIS soils may support higher nutrition of plants in this ecosystem. Nitrogen-containing organic matter is bound chemically to clay minerals, thereby stabilizing soil organic matter (Kome *et al.,* 2019). Clay minerals also influence soil physical properties, where a functional attribute of clay minerals in soil is linked to the formation of microaggregates, which affect phosphorus adsorption and availability (Siebers *et al.,* 2018). A higher proportion of clay in soil also increases soil stability and water retention

capacity, favoring seed germination and plant establishment. However, the aforementioned phenomena, along with the assumption that these micro-nutrients are the result of colluvium during rainfall events and accumulate by gravitation, need to be considered from the point of view of the grazing history of the study site. In this micro-environment, the presence of livestock like camels and goats, puts significant herbivory pressure on the ecosystem, and in this case, the fertility island phenomenon could be a byproduct of this herbivory history. Based on 99 case studies in arid or semi-arid ecosystems, Allington and Valone (2014) linked the presence of livestock grazing to the fertility island effect. These authors showed that in cases where herbivory pressure was reported, the presence of livestock grazing was linked to the fertility island pattern with at least one soil nutrient among phosphorus, nitrogen or organic matter. This pattern was inconsistent or non-existent when the zone had not been grazed for more than 30 years. In our case, we assume that the pressure of grazing was less than the pressure caused by soil and climatic conditions, and that the microenvironment is characterized to a greater extent, by the topology-facilitated water flow.

Microbial life in a desert: a microbiome composition to alleviate stress

The diversity found in this hot desert microenvironment was characterized by the ubiquitous bacterial phylums typically found in other environmental studies *i.e.*, dominance of Actinobacteria, Proteobacteria and Firmicutes (Drees *et al.,* 2006; Makhalanyane *et al.,* 2015). The dominance of Actinobacteria is a common feature in desert ecosystems, probably due to their adaptive functional traits that fit desert abiotic stresses such as a mechanism for UV repair, sporulation and competitive advantages (Gao and Garcia-Pichel, 2011). The roots of the plant community were characterized by a high proportion of Rhizobiales that included functional taxa linked to soil fertility and that could play an important role in these nutrient-depleted environments by improving soil fertility (Miao *et al.,* 2020). Proteobacteria may also be functionally indispensable in the desert environment, with taxa involved in bacteriochlorophyll-independent photosynthesis (Boldareva-Nuianzina *et al.,* 2013). The fungi we found in the soils were mainly saprotrophs, mostly represented by Pleosporales, which are key players in recycling organic matter. There was also a high proportion of arbuscular mycorrhizal fungi, represented by the family Glomeraceae, specific to the roots of FIS plants. In these soils with major water and nutrient deficits, enrichment of symbiotic mycorrhizal fungi in roots could therefore be an advantage for plant tolerance and survival (Tedersoo *et al.,* 2020).

Microbial communities as a resource for agriculture and land restoration

Our results show that fertility islands harbor specific and enriched microbial communities, essential for ecosystem functioning. They represent unique patches of microbial resources with functional adaptation to extreme local conditions that are crucial for plant community assembly. These results highlight the potential for isolating the local microbiome in order to harness its plant growth promoting properties as part of the agronomic transition and improve sustainability in the context of increasing desertification and climate change. This is of particular importance in Saudi Arabia and Gulf countries, where water resource is jeopardized. Desert microbial strains can also play an instrumental role in land restoration, and could be a key resource for desert reforestation and desert vegetation programs (Bashan and de-Bashan, 2010). This unique ecological niche is a reservoir of micro- organisms with potential agronomic applications were new plant growths promoting strains from arid ecosystems can be isolated (Alsharif *et al.,* 2020). For example, bacteria isolated from the rhizosphere of date palm in Tunisia showed a high potential for promoting plant growth in a large proportion of isolated strains, as they featured auxin production, ammonia synthesis, solubilization of phosphates and siderophore production functional traits (Ferjani *et al.,* 2015). In Saudi Arabia, El-Sayed *et al*. (2014), isolated plant growth promoting rhizobacteria from 11 local plant species. Among these, several strains of *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Enterobacter* exhibited plant growth promoting traits such as siderophore production, Nitrogen-fixation, mineral phosphate and zinc solubilization. Lytic enzyme traits associated with mitigation of fungal pathogen growth were also identified through the production of protease, chitinase and cellulase. Bacteria belonging to the genus *Bradyrhizobium*, which are abundant in roots, *Azospirillum* in soils, and *Nitrospira* and Nitrosomonas were also found in our study. These bacteria play key roles in the nitrogen cycle, and even though their abundances were low, they can be considered as key taxa in ecosystem functioning and can be targeted in agronomical research. However, it is important to note that soil microbial communities are also influenced by plants through their root exudates (Zhalnina *et al.,* 2018) and microbial symbionts (Uroz *et al.,* 2019). Such plant-soil feedback can influence population dynamics and plant identity and phenology should be taken into consideration in future research. In conclusion, future research will benefit from investigating the ability of microbial communities belonging to fertility islands in extreme environments to alleviate abiotic stress, such as drought and low soil nutrient. The unique microbial diversity of this habitat should be considered when developing new

agronomic and adaptation strategies, and in conservation programs designed to cope with climate change and prevent desertification.

Credit author statement

Study conception and design: KM, LLW; Sampling: KM, LLW; Laboratory experiments and data collection: KM, AB, SB; Formal analysis: KM, AD; Writing - original draft KM; Writing - review & editing: KM, AB, LLW, SB, HB, MD; Funding acquisition and project supervision: MD, HB, MAS. All the authors discussed the results, contributed to the final manuscript, and approved submission of the final version of the manuscript.

Funding

This work was supported by the SoFunLand project, part of the Oasis program funded under the partnership between the RCU (Royal Commission for AlUla) and AFALULA (Agence Française pour le development d'AlUla).

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper

Data availability

Data will be made available on request.

References

Allen, M.F., 2007. Mycorrhizal fungi: highways for water and nutrients in arid soils. Vadose Zone J. 6 (2), 291–297. https://doi.org/10.2136/vzj2006.0068.

Allington, G.R.H., Valone, T.J., 2014. Islands of fertility: a byproduct of grazing? Ecosystems 17 (1), 127–141. https://doi.org/10.1007/s10021-013-9711-y.

Alsharif, W., Saad, M.M., Hirt, H., 2020. Desert microbes for boosting sustainable agriculture in extreme environments. Front. Microbiol. 11, 1666. https://doi.org/ 10.3389/fmicb.2020.01666.

Bachar, A., Soares, M.I.M., Gillor, O., 2012. The effect of resource islands on abundance and diversity of bacteria in arid soils. Microb. Ecol. 63, 694–700. https://doi.org/ 10.1007/s00248-011-9957-x.

Bashan, Y., de-Bashan, L.E., 2010. Microbial populations of arid lands and their potential for restoration of deserts. In: Dion, P. (Ed.), Soil Biology and Agriculture in the Tropics, vol. 21. Springer Berlin Heidelberg, pp. 109–137. https://doi.org/10.1007/ 978-3-642-05076-3_6.

Berg, N., Unc, A., Steinberger, Y., 2015. Examination of biotic and abiotic controls of soil bacterial diversity under perennial shrubs in xeric soils. Catena 127, 124–128. https://doi.org/10.1016/j.catena.2014.12.029.

Berruti, A., Desiro`, A., Fisentin, 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: ITS fungal barcoding versus 18S AMF- specific primers. Environmental Microbiology Reports 9 (5), 658–667. https://doi. org/10.1111/1758-2229.12574.

Boldareva-Nuianzina, E.N., Bl´ahova´, Z., Sobotka, R., Koblí˘zek, M., 2013. Distribution and origin of oxygen-dependent and oxygen-independent forms of Mg-protoporphyrin monomethylester cyclase among phototrophic Proteobacteria. Appl. Environ.

Microbiol. 79, 2596–2604. https://doi.org/10.1128/AEM.00104-13.

Borin, S., Ventura, S., Tambone, F., Mapelli, F., Schubotz, F., Brusetti, L., Scaglia, B., D'Acqui, L.P., Solheim, B., Turicchia, S., Marasco, R., Hinrichs, K.-U., Baldi, F., Adani, F., Daffonchio, D., 2010. Rock weathering creates oases of life in a High Arctic desert. Environ. Microbiol. 12, 293–303. https://doi.org/10.1111/j.1462- 2920.2009.02059.x.

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 (1), 226. https://doi.org/10.1186/s40168-018-0605-2.

Delgado-Baquerizo, M., Maestre, F.T., Reich, P.B., Jeffries, T.C., Gaitan, J.J., Encinar, D., Berdugo, M., Campbell, C.D., Singh, B.K., 2016. Microbial diversity drives multifunctionality in terrestrial ecosystems. Nat. Commun. 7, 10541 https://doi.org/ 10.1038/ncomms10541.

Drees, K.P., Neilson, J.W., Betancourt, J.L., Quade, J., Henderson, D.A., Pryor, B.M., Maier, R.M., 2006. Bacterial community structure in the hyperarid core of the atacama desert, Chile. Appl. Environ. Microbiol. 72, 7902–7908. https://doi.org/ 10.1128/AEM.01305-06.

El-Sayed, W.S., Akhkha, A., El-Naggar, M.Y., Elbadry, M., 2014. In vitro antagonistic activity, plant growth promoting traits and phylogenetic affiliation of rhizobacteria associated with wild plants grown in arid soil. Front. Microbiol. 5 https://doi.org/ 10.3389/fmicb.2014.00651.

Ewing, S.A., Southard, R.J., Macalady, J.L., Hartshorn, A.S., Johnson, M.J., 2007. Soil microbial fingerprints, carbon, and nitrogen in a mojave desert creosote-bush ecosystem. Soil Sci. Soc. Am. J. 71, 469–475. https://doi.org/10.2136/ sssaj2005.0283.

Ferjani, R., Marasco, R., Rolli, E., Cherif, H., Cherif, A., Gtari, M., Boudabous, A., Daffonchio, D., Ouzari, H.-I., 2015. The date palm tree rhizosphere is a niche for plant growth promoting

bacteria in the oasis ecosystem. BioMed Res. Int. 1–10. https://doi.org/10.1155/2015/153851, 2015.

Gao, Q., Garcia-Pichel, F., 2011. Microbial ultraviolet sunscreens. Nat. Rev. Microbiol. 9, 791–802. https://doi.org/10.1038/nrmicro2649.

Goberna, M., Pascual, J.A., García, C., S´anchez, J., 2007. Do plant clumps constitute

microbial hotspots in semiarid Mediterranean patchy landscapes? Soil Biol. Biochem. 39, 1047–1054. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.11.015.

Herman, R.P., Provencio, K.R., Herrera-Matos, J., Torrez, R.J., 1995. Resource islands predict the distribution of heterotrophic bacteria in chihuahuan desert soils. Appl. Environ. Microbiol. 61, 1816–1821. https://doi.org/10.1128/aem.61.5.1816-1821.1995.

Kidron, G.J., 2009. The effect of shrub canopy upon surface temperatures and evaporation in the Negev Desert. Earth Surf. Process. Landforms 34, 123–132. https://doi.org/10.1002/esp.1706.

Kome, G.K., Enang, R.K., Tabi, F.O., Yerima, B.P.K., 2019. Influence of clay minerals on some soil fertility attributes: a review. Open J. Soil Sci. 9 (9), 155–188. https://doi.org/10.4236/ojss.2019.99010.

Li, S., Chen, W., Li, Zubing, Bu, L., Jin, Z., Wei, G., Li, Zhefei, 2021. Fertile islands lead to more conspicuous spatial heterogeneity of bacteria than soil physicochemical properties in a desert ecosystem. Catena 206, 105526. https://doi.org/10.1016/j. catena.2021.105526.

Liu, C., Cui, Y., Li, X., Yao, M., 2021. *Microeco* : an R package for data mining in microbial community ecology. FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Microbiol. Ecol. 97 https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa255 fiaa255.

Maestre, F.T., Delgado-Baquerizo, M., Jeffries, T.C., Eldridge, D.J., Ochoa, V., Gozalo, B., Quero, J.L., García-Go´mez, M., Gallardo, A., Ulrich, W., Bowker, M.A.,

Arredondo, T., Barraza-Zepeda, C., Bran, D., Florentino, A., Gait´an, J., Guti´errez, J. R., Huber-Sannwald, E., Jankju, M., Mau, R.L., Miriti, M., Naseri, K., Ospina, A., Stavi, I., Wang, D., Woods, N.N., Yuan, X., Zaady, E., Singh, B.K., 2015. Increasing aridity reduces soil microbial diversity and abundance in global drylands. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 112, 15684–15689. https://doi.org/10.1073/pnas.1516684112.

Makhalanyane, T.P., Valverde, A., Gunnigle, E., Frossard, A., Ramond, J.-B., Cowan, D. A., 2015. Microbial ecology of hot desert edaphic systems. FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Microbiol. Rev. 39, 203–221. https://doi.org/10.1093/femsre/ fuu011.

Marasco, R., Rolli, E., Ettoumi, B., Vigani, G., Mapelli, F., Borin, S., Abou-Hadid, A.F., El- Behairy, U.A., Sorlini, C., Cherif, A., Zocchi, G., Daffonchio, D., 2012. A drought resistance-promoting microbiome is selected by root system under desert farming. PLoS One 7, e48479. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048479.

Martin, M., 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. EMBnet.journal 17 (1), 10. https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200.

McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. Phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. PLoS One 8, e61217. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217.

Meigs, P., 1953. World distribution of arid and semi-arid homoclimates. In: Reviews of Research on Arid Zone Hydrology. UNESCO, Paris, pp. 203–210.

Miao, L., Feng, W., Zhang, Y., Bai, Y., Sun, Y., She, W., Mao, H., Lai, Z., Qin, S., 2020. Chemoheterotrophic diazotrophs contribute to nitrogen incorporation in a semi-arid desert. Biol. Fertil. Soils 56 (8), 1165–1176. https://doi.org/10.1007/s00374-020-01492-7.

Millennium Ecosystem Assessment, 2005. Ecosystems and Human Well-Being: Biodiversity Synthesis. Island Press, Washington, DC.

Nguyen, N.H., Song, Z., Bates, S.T., Branco, S., Tedersoo, L., Menke, J., Schilling, J.S., Kennedy, P.G., 2016. FUNGuild: an open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild. Fungal Ecology 20, 241–248. https://doi. org/10.1016/j.funeco.2015.06.006.

Nilsson, R.H., Larsson, K.-H., Taylor, A.F.S., Bengtsson-Palme, J., Jeppesen, T.S., Schigel, D., Kennedy, P., Picard, K., Glo¨ckner, F.O., Tedersoo, L., Saar, I., Ko˜ljalg, U., Abarenkov, K., 2019. The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. Nucleic Acids Res. 47 (D1), D259–D264. https://doi.org/10.1093/nar/gky1022.

Ochoa-Hueso, R., Eldridge, D.J., Delgado-Baquerizo, M., Soliveres, S., Bowker, M.A., Gross, N., Le Bagousse-Pinguet, Y., Quero, J.L., García-Go´mez, M., Valencia, E., Arredondo, T., Beinticinco, L., Bran, D., Cea, A., Coaguila, D., Dougill, A.J., Espinosa, C.I., Gait´an, J., Guuroh, R.T., Guzman, E., Guti´errez, J.R., Hern´andez, R. M., Huber-Sannwald, E., Jeffries, T., Linst¨adter, A., Mau, R.L., Monerris, J., Prina, A., Pucheta, E., Stavi, I., Thomas, A.D., Zaady, E., Singh, B.K., Maestre, F.T., 2018. Soil fungal abundance and plant functional traits drive fertile island formation in global drylands. J. Ecol. 106, 242–253. https://doi.org/10.1111/1365-2745.12871.

Oksanen, J., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P.R., O'hara, R.B., *et al.,* 2013. Package 'vegan'. Community ecology package, version 2 (9), 1–295.

Op De Beeck, M., Lievens, B., Busschaert, P., Declerck, S., Vangronsveld, J., Colpaert, J. V., 2014. Comparison and validation of some ITS primer pairs useful for fungal metabarcoding studies. PLoS One 9 (6), e97629. https://doi.org/10.1371/journal. pone.0097629.

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. https://doi.org/10.1186/s40793-022-00434-0.

Pravalie, R., 2016. Drylands extent and environmental issues. A global approach. Earth Sci. Rev. 161, 259–278. https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2016.08.003.

Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glo¨ckner, F.O., 2012. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. Nucleic Acids Res. 41 (D1), D590–D596. https://doi.org/10.1093/nar/gks1219.

Reimann, C., Filzmoser, P., Fabian, K., Hron, K., Birke, M., Demetriades, A., Dinelli, E., Ladenberger, A., 2012. The concept of compositional data analysis in practice—total major element concentrations in agricultural and grazing land soils of Europe. Sci. Total Environ. 426, 196–210. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.02.032.

Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., Mah´e, F., 2016. VSEARCH: a versatile open-source tool for metagenomics. PeerJ 4, e2584. https://doi.org/10.7717/ peerj.2584.

Shahid, S.A., Zaman, M., Heng, L., 2018. Soil salinity: historical perspectives and a world overview of the problem. In: Guideline for Salinity Assessment, Mitigation and Adaptation Using Nuclear and Related Techniques. Springer International Publishing, Cham, pp. 43–53. https://doi.org/10.1007/978-3-319-96190-3_2.

Schlesinger, W.H., Raikes, J.A., Hartley, A.E., Cross, A.F., 1995. On the spatial pattern of soil nutrients in desert ecosystems: ecological archives E077-002. Ecology 77, 364–374. https://doi.org/10.2307/2265615.

Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W.S., Huttenhower, C., 2011. Metagenomic biomarker discovery and explanation. Genome Biol. 12, R60. https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-6-r60.

Siebers, N., Bauke, S.L., Tamburini, F., Amelung, W., 2018. Short-term impacts of forest clear-cut on P accessibility in soil microaggregates: an oxygen isotope study. Geoderma 315, 59–64. https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2017.11.024.

Sun, Y., Zhang, Y., Feng, W., Qin, S., Liu, Z., Bai, Y., Yan, R., Fa, K., 2017. Effects of xeric shrubs on soil microbial communities in a desert in northern China. Plant Soil 414 (1–2), 281–294. https://doi.org/10.1007/s11104-016-3111-y.

Tedersoo, L., Bahram, M., Po˜lme, S., Ko˜ljalg, U., Yorou, N.S., Wijesundera, R., Ruiz, L.V.,

Vasco-Palacios, A.M., Thu, P.Q., Suija, A., Smith, M.E., Sharp, C., Saluveer, E., Saitta, A., Rosas, M., Riit, T., Ratkowsky, D., Pritsch, K., Po˜ldmaa, K., *et al.,* 2014. Global diversity and geography of soil fungi. Science 346 (6213), 1256688. https:// doi.org/10.1126/science.1256688.

Tedersoo, L., Bahram, M., Zobel, M., 2020. How mycorrhizal associations drive plant population and community biology. Science 367 (6480). https://doi.org/10.1126/ science.aba1223 eaba1223.

Terrat, S., Dequiedt, S., Horrigue, W., Lelievre, M., Cruaud, C., Saby, N.P.A., Jolivet, C., Arrouays, D., Maron, P.-A., Ranjard, L., Chemidlin Pr´evost-Bour´e, N., 2015. Improving soil bacterial taxa–area relationships assessment using DNA meta- barcoding. Heredity 114 (5), 468–475. https://doi.org/10.1038/hdy.2014.91.

Timmusk, S., Abd El-Daim, I.A., Copolovici, L., Tanilas, T., Ka¨nnaste, A., Behers, L., Nevo, E., Seisenbaeva, G., Stenstro¨m, E., Niinemets, Ü., 2014. Drought-tolerance of wheat improved by rhizosphere bacteria from harsh environments: Enhanced biomass production and reduced Emissions of stress volatiles. PLoS One 9 (5), e96086. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096086.

Uroz, S., Courty, P.E., Oger, P., 2019. Plant symbionts are Engineers of the plant- associated microbiome. Trends Plant Sci. 24 (10), 905–916. https://doi.org/ 10.1016/j.tplants.2019.06.008.

White, J.R., Nagarajan, N., Pop, M., 2009. Statistical methods for detecting differentially abundant features in clinical metagenomic samples. PLoS Comput. Biol. 5, e1000352 https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000352.

Yasir, M., Azhar, E.I., Khan, I., Bibi, F., Baabdullah, R., Al-Zahrani, I.A., Ghamdi, A., 2015. Composition of soil microbiome along elevation gradients in southwestern highlands of Saudi Arabia. BMC Microbiol. 15 (65) https://doi.org/10.1186/ s12866-015-0398-4.

Zhalnina, K., Louie, K.B., Hao, Z., Mansoori, N., da Rocha, U.N., Shi, S., Cho, H., Karaoz, U., Loqu´e, D., Bowen, B.P., Firestone, M.K., Northen, T.R., Brodie, E.L., 2018. Dynamic root exudate chemistry and microbial substrate preferences drive patterns in rhizosphere microbial community assembly. Nature Microbiology 3 (4), 470–480. https://doi.org/10.1038/s41564-018-0129-3.

Zhu, Y., Weindorf, D.C., Zhang, W., 2011. Characterizing soils using a portable X-ray fluorescence spectrometer: 1. Soil texture. Geoderma 167–168, 167–177. https:// doi.org/10.1016/j.geoderma.2011.08.010.

Article II - Seed or soil: tracing back the plant mycobiota primary sources

Auteurs :

Liam Laurent-Webb[1]*, Kenji Maurice[2]*, Benoît Perez-Lamarque[3], Amélia Bourceret[1], Marc Ducousso[2], Marc-André Selosse[1,4,5]

[1] Institut de Systématique, Évolution, Biodiversité (ISYEB), Muséum national d'Histoire naturelle, CNRS, Sorbonne Université, EPHE, A, 57 rue Cuvier, 75005 Paris, France.

[2] CIRAD, UMR082 LSTM, Montpellier Cedex 5, 34398, France.

[3] Institut de biologie de l'École normale supérieure (IBENS), École normale supérieure, CNRS, INSERM, Université PSL, 46 rue d'Ulm, 75005 Paris, France.

[4] Institut Universitaire de France, France.

[5] University of Gdańsk, Faculty of Biology, ul. Wita Stwosza 59, 80-308, Gdańsk, Poland.

* Co-premier auteurs.

Résumé/abstract :

Les plantes hébergent diverses communautés de champignons (le mycobiote), qui jouent un rôle crucial dans leur développement. Les processus d'assemblage du mycobiote restent cependant mal compris. Plus particulièrement, nous ne savons pas si le mycobiote est transmis par les parents aux jeunes plants *via* les graines (transmission verticale) ou recruté dans l'environnement (transmission horizontale). Nous tentons ici de quantifier la contribution relative de la transmission horizontale et verticale dans l'assemblage du mycobiote d'une plante arbustive désertique, *Haloxylon salicornicum*, en comparant le mycobiote du sol nu et des graines prélevés *in situ* à celui (i) d'individus adultes prélevés *in situ* et (ii) à celui de plantules germées *in vitro* dans du sol prélevé *in situ*. Nous montrons que le mycobiote est partiellement

transmis verticalement *via* les graines aux jeunes plants, alors que le sol a une contribution limitée dans l'assemblage de leur mycobiote. Chez les adultes, le mycobiote des racines et du sol tendent à se ressembler, ce qui suggère un changement de la composition du mycobiote des plantes au cours de leur développement lié à la transmission horizontale. Ainsi, le mycobiote est transmis à la fois horizontalement et verticalement en fonction du compartiment de la plante et du stade de développement. Comprendre la contribution respective de ces voies de transmission dans l'assemblage du mycobiote des plantes est fondamental pour déterminer les processus potentiels de coévolution entre plantes et champignons. Nos résultats soulignent en particulier l'importance de la transmission verticale dans les écosystèmes désertiques.

Plants host diverse communities of fungi (the mycobiota), playing crucial roles in their development. The assembly processes of the mycobiota, however, remain poorly understood, in particular, whether it is transmitted by parents through the seeds (vertical transmission) or recruited in the environment (horizontal transmission). Here we attempt to quantify the relative contributions of horizontal and vertical transmission in the mycobiota assembly of a desert shrub, *Haloxylon salicornicum*, by comparing the mycobiota of in situ bulk soil and seeds to that of (i) *in situ* adult individuals and (ii) *in vitro*-germinated seedlings in soil collected in situ. We show that the mycobiota is partially vertically transmitted through the seeds to seedlings, whereas bulk soil has a limited contribution to the seedling's mycobiota. In adults, root and bulk soil mycobiota tend to resemble each other, suggesting a compositional turnover in plant mycobiota during plant development due to horizontal transmission. Thus, the mycobiota is transmitted both horizontally and vertically depending on the plant tissue and developmental stage. Understanding the respective contribution of these transmission pathways to the plant mycobiota is fundamental to deciphering potential coevolutionary processes between plants and fungi. Our findings particularly emphasize the importance of vertical transmission in desert ecosystems.

Citation :

Laurent-Webb L, Maurice K, Perez-Lamarque B, Bourceret A, Ducousso M, Selosse M-A. 2023. Seed or soil: tracing back the plant mycobiota primary sources. bioRxiv DOI: 10.1101/2023.08.04.551828.

Introduction

All plants are colonized on their surface and in their tissues by diverse communities of microorganisms, such as bacteria (Bulgarelli *et al.,* 2013) and fungi (Selosse *et al.,* 2004; Rodriguez *et al.,* 2009). Collectively, these microorganisms are referred to as the microbiota (Berg *et al.,* 2020) for which plants tend to have developed functional dependency (Selosse *et al.,* 2014). Among the plant microbiota, fungi form the mycobiota which play key roles in the plant life cycle as they interact with their plant host in various manners, ranging from parasitic to mutualistic (Trivedi *et al.,* 2020). Though fungi are well-known to have deleterious effects on plant fitness (e.g., pathogenic fungi), it has been recognized over the past decades that they are also involved in many crucial plant functions such as nutrition (Smith and Read, 2009; Yakti *et al.,* 2018) or defense against pathogens (Rodriguez Estrada *et al.,* 2012). Some fungi also improve plant tolerance to various stresses such as drought (Li *et al.,* 2018; Hosseyni Moghaddam *et al.,* 2021) and soil salinity (Dastogeer *et al.,* 2020; Gonzalez Mateu *et al.,* 2020; Gupta *et al.,* 2021). As a result, plant associated fungi increase plants' ecological success (Selosse *et al.,* 2014). To achieve those roles, some fungi form specialized structures with their plant host such as mycorrhizae (van der Heijden *et al.,* 2015), but others colonize their hosts with no apparent symptoms, such as endophytic fungi (*sensu* Wilson, 1995). Plants and their microbiota are sometimes referred to as 'holobionts' (*e.g.*, Vandenkoornhuyse *et al.,* 2015), a theoretical framework stipulating that the accumulation of the plant organism and its microbiota (holobiont) form a unit of selection. This notion is still subject to debate as it implies fidelity between the partners; yet, mutualistic associations tend to be generalist and in most cases are not vertically transmitted across generations (Bright and Bulgheresi, 2010; Douglas and Werren, 2016).

Partners' fidelity may be guaranteed by vertical transmission of the mycobiota (Wilkinson, 1997), *i.e.*, if the plant-associated fungi are transmitted from generation to generation by way of seeds (Bright and Bulgheresi, 2010) and/or during vegetative multiplication (Vannier *et al.,* 2018). Thanks to novel DNA sequencing and barcoding technologies, healthy seeds are no longer considered sterile, as they generally present a diverse and dynamic microbiota at their different developmental stages (Klaedtke *et al.,* 2016; Nelson, 2018; Abdelfattah *et al.,* 2022; Simonin *et al.,* 2022), so that fungal vertical transmission through the seeds is possible. However, the sources and mechanisms of acquisition of plant-associated fungi are still poorly understood. Recent findings suggest that fungi may be acquired

by the plant (i) directly from their environment (horizontal transmission, from the soil for instance; Bonito *et al.,* 2014) or (ii) from their parents (vertical transmission) through the seeds (Gundel *et al.,* 2011; Shade *et al.,* 2017) or clonal structures (e.g., aerial stolons; Vannier *et al.,* 2018). Most fungi colonizing belowground tissues (rhizosphere, roots) are considered to be mainly horizontally transmitted from the soil (Lundberg *et al.,* 2012; Bonito *et al.,* 2014). However, vertical transmission was also confirmed *in vitro* demonstrating that both bacterial and fungal microbiota may be partially transmitted from seeds to seedlings, sometimes over several plant generations (Hardoim *et al.,* 2012; Rezki *et al.,* 2018; Rodríguez *et al.,* 2020). Available knowledge therefore suggests that seedling's mycobiota originate from both seeds and soil in proportions that vary between aerial and belowground tissues. The respective contribution of vertical and horizontal transmission to the microbiota is, however, often considered separately. Yet, taking both pathways into account is crucial to detect potential ubiquitous fungi that could be transmitted both from seeds and soil and thus bias estimations of the contribution of one pathway studied alone. Furthermore, changes in mycobiota composition during plant development (Houlden *et al.,* 2008; Gao *et al.,* 2019) may reflect changes in patterns of horizontal and vertical transmission. To date, only a few studies have comparatively quantified the vertical and horizontal transmission of the microbiota (see Moroenyane *et al.,* 2021 and Walsh *et al.,* 2021 for bacteria), especially in fungi (but see Rochefort *et al.,* 2021). The latter study highlights that soil is the main source of seedling mycobiota in *Brassica napus* but only considers early developmental stages. Moroenyane *et al.* (2021), Rochefort *et al.* (2021) and Walsh *et al.* (2021) only used *in vitro* experimental designs, which may not reflect *in situ* conditions (*e.g.*, complex plant communities, differences in microbiota composition between substrates used *in vitro* and soil *in situ*…). Conversely, samplings only performed *in vivo* cannot distinguish horizontal from vertical transmission (Perez-Lamarque *et al.,* 2023). Thus, to the best of our knowledge, no studies have compared vertical and horizontal transmission of the mycobiota at different development stages.

Desert ecosystems represent one-third of the world's land surface (Prăvălie, 2016) and their area is expected to increase under climate change (Intergovernmental Panel on Climate Change, 2022). They are characterized by low precipitations and nutrient availability resulting in lower fungal (Tedersoo *et al.,* 2014) and plant (Cai *et al.,* 2023) diversity compared to other biomes. In hot deserts, vegetation is often discontinuous and patchy, with perennial species regularly spaced and separated by bare soil (de Graaff *et al.,* 2014). This patchy distribution of shrubs is referred to as 'fertility islands' or 'resource islands': soil nutrient concentrations (*i.e.*, C, N, P) close to shrubs are higher than in surrounding bare soils (Schlesinger and Pilmanis,

1998). These fertility islands are therefore hotspots of microbial diversity, including fungi (Ochoa-Hueso *et al.,* 2018; Maurice, Laurent-Webb, *et al.,* 2023a). The patchy distribution of shrubs may limit the impact of other neighboring plant species on their mycobiota and in particular the influence of conspecific individuals (Schneider-Maunoury *et al.,* 2020; Brigham *et al.,* 2023). As they display rather simple and spatially structured plant communities, desert ecosystems are interesting models for *in situ* ecological research. Furthermore, harsh environmental conditions may limit microbial availability in soil (Maldonado *et al.,* 2022) and we could consequently expect that vertical transmission is favored. However, decreased vertical transmission has been observed in leaves endophyte *Epichloë* spp. under drought conditions (Cavazos *et al.,* 2018). Untangle vertical and horizontal transmission pathways in such constrained environments will therefore provide insights on the mycobiota assembly strategies under stress conditions such as drought.

Here, we take advantage of a desert ecosystem to quantify both vertical and horizontal transmission pathways during mycobiota assembly. We hypothesize that (i) plant mycobiota are mainly influenced by the soil mycobiota with a low contribution of seeds, even at early development stages, and that (ii) different compartments (especially aerial and underground ones) show contrasted patterns of colonization from seeds and soil. We studied *Haloxylon salicornicum* (Amaranthaceae) as a model, a common desert shrub of the Eastern Arabian flora (Al Salameen *et al.,* 2018) with potential for restoration and protection of arid lands (Rathore *et al.,* 2015). We comprehensively assessed the contribution of both horizontal (soil) and vertical (seeds) transmission in the mycobiota assembly of *Haloxylon salicornicum* through the comparison of mycobiota compositions obtained (i) by sampling *in situ* bulk soil and the different compartments of adult individuals (rhizosphere, roots, leaves, and seeds) and (ii) by germinating seeds *in vitro* in non-processed or autoclaved bulk soil collected *in situ*. This is, to our knowledge, the first study to date comparing vertical and horizontal transmission at several developmental stages, and the first time that mycobiota assembly strategies are investigated in a desert plant.

Material & Methods

In situ sampling of bulk soil, rhizosphere, roots, leaves and seeds from *H. salicornicum* adult individuals

Five sites, representative of the different type of soils in which *H. salicornicum* flourishes in the Sharaan Natural Reserve, were selected for in situ sampling of bulk soil and *H. salicornicum* adult individuals (Province of Medina, AlUla, Saudi Arabia; *Fig.* 1; Supp. *Table 1*). Soil in these sites ranged from sandy soils with no clay to sandy soils with indurations and higher clay content (Maurice *et al.,* 2023). Soil properties of each site were measured from five bulk soil samples per site (Celesta lab, Mauguio, France) and are reported in Supp. Table 2. All sites are characterized by alkaline soils (pH H_2O ranges from 8.58 ± 0.58 to 9.14 ± 0.17), low organic matter (0.46 ± 0.05 to 0.7±0.12 % of dried soil), low total nitrogen ($2x10^{-2} \pm 3x10^{-3}$ to $3x10^{-2} \pm 3x10^{-3}$ %) and low soil humidity (0.18 ± 0.08 to 2.06 ± 0.8 2% of humidity) (Supp. Table 2). In each site, five bulk soil samples were collected along with rhizosphere, roots and leaves of 13 individuals for molecular analysis (Table 1; Fig. 1). Bulk soil, rhizosphere and root samples were collected in March 2022. Roots and rhizosphere samples were collected from the same individual each time. Soil samples (bulk and rhizosphere) were sieved to 2 mm and root samples were stored in a 2% CTAB solution. All samples were stored at 4°C until molecular analyses. In May 2022, we collected phyllosphere of the same individuals than in March 2022. As *H. salicornicum* harbors small reduced leaves on green photosynthetic stems (Singh *et al.,* 2015), we sampled both stems and leaves together and will refer to them as leaves. Sampled leaves were dried using silica gel and kept dry until molecular analyses. We studied both epiphytic and endophytic leaf mycobiota. We also collected additional bulk soil from sites n°4 and n°5 (which showed no apparent influence of human activities) for the in vitro experiment (3 bulk soil samples per site, pooled together). Bulk soil collected for the in vitro experiment was dry at sampling time. They were unprocessed and kept dry for one week before setting up the in vitro experiment. Finally, seeds were collected during spring 2022 on H. salicornicum individuals from previously studied sites before contact with soil. We randomly sampled 20 pools of 9 seeds from this seed collection for molecular analysis and randomly sampled ca. 200 additional seeds for the in vitro germination experiment.

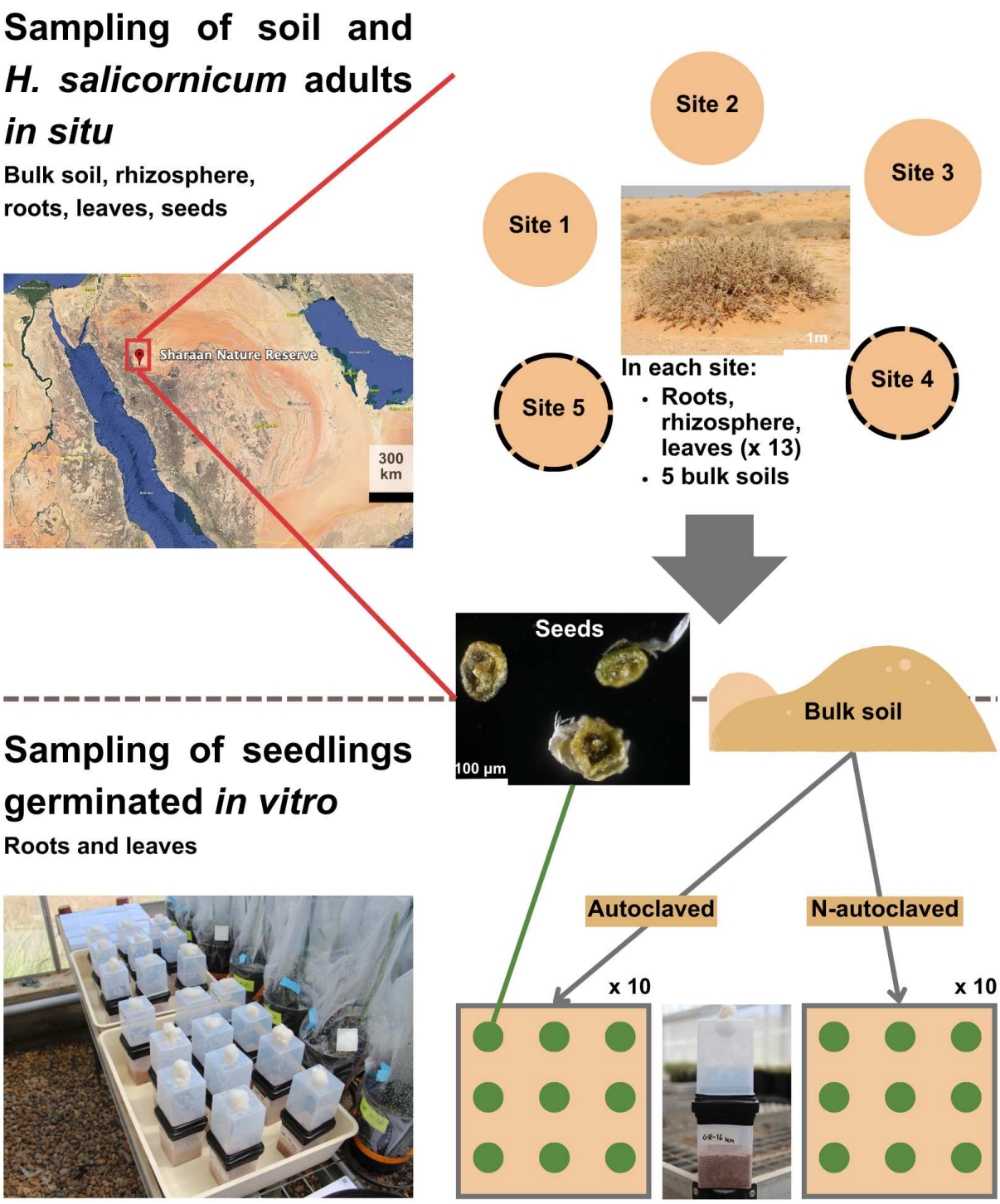


Figure 1: *In situ* sampling of soil and *H. salicornicum* adults' compartments and *in vitro* seedlings germination experiment. To characterize the mycobiota of adults *H. salicornicum*, bulk soil along with rhizosphere, roots, leaves and seeds were sampled from 13 individuals in each of the five sites located in the Sharaan Nature Reserve, AlUla Province, Saudi Arabia. Seeds were collected in the study sites during spring 2022. Additional bulk soil samples in sites n°4 and n°5 were collected to set up an in vitro germination experiment. In a heated green house, *H. salicornicum* seeds were planted in soil collected in situ that was either autoclaved or not (10 pots with 9 seeds in each substrate condition). At 2-leaves stage, roots and leaves of seedlings that successfully germinated were sampled.

In vitro experiment

In order to quantify the contribution of seeds and soil to seedlings' mycobiota, we germinated *H. salicornicum* seeds in a heated glass house with a mean temperature of 25°C-28°C, low humidity, and day/night alternations of 16h and 8h, respectively. We used unprocessed bulk soil collected *in situ* as substrate (see above for soil characteristics; Fig. 1). Bulk soil was either autoclaved (30 min at 120°C) or not, leading to the two conditions of the *in vitro* experiment, that is, autoclaved and non-autoclaved. We expect the autoclaved condition to eliminate most of the fungi present in bulk soil (although some might resist; Wolf *et al.,* 1989). For each condition, 10 Magenta boxes (Merck, Germany) were filled in sterile condition with 250g of bulk soil as substrate. Before planting, we removed petals and sepals' fragments from seeds with sterile tweezers. Nine seeds per Magenta box were planted at equal distance using sterile tweezers (Fig. 1). Substrate was irrigated with sterile Milli-Q water (40 mL/box). Boxes were closed with another Magenta box, with a 1 cm diameter hole filled with cotton to allow gas exchange and limit aerial contaminants from the glass house. Of the 180 seeds initially planted, 13 reached the 2-leaf stage in the autoclaved condition and 7 in the non-autoclaved condition (Table 1; differences in germination rate were not significant, χ^2 test: p=0.24). As the germination rate was low and because we experienced some damping-off at a later stage during previous trials (data not shown), leaves and roots of seedlings were collected after 7 days (2-leaf growth stage) under sterile conditions. Neither roots nor leaves showed signs of infection or disease. Roots were washed with sterile water and all were flash-frozen with liquid nitrogen. Samples were kept at -20°C until molecular analyses.

Molecular analyses

Bulk soil, rhizosphere and roots collected *in situ* were processed as in (Maurice, *et al.,* 2023). Leaves and seeds (*in situ*) and seedling's compartments were processed following the same protocol than roots in Maurice *et al.* (2023) with slight modifications. Briefly, samples were ground using two sterile stainless-steel beads in a Tissue Lyzer II (Qiagen, Germany) for 3x30s at 30Hz. DNA extraction of all samples was performed with the FastDNA Spin Kit for soil (MP Biomedicals™, Solon, USA) following the manufacturer's instructions. DNA concentration of extracts was measured with the PicoGreen fluorophore (Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kits, Thermo Fisher Scientific, USA).

Table 1: Soil and *H. salicornicum* compartments samples collected for mycobiota sequencing. We sampled bulk soil along with rhizosphere, roots, leaves and seeds from adult *H. salicornicum* individuals in situ to characterize their mycobiota. In vitro, we germinated *H. salicornicum* seeds in soil collected in situ that was either autoclaved or not. At 2-leaves stage, we sampled roots and leaves of seedlings successfully germinated in vitro. The left number in brackets is the number of samples in the autoclaved condition, and the right number (underlined) is the number of samples in the non-autoclaved condition. Differences in germination rate were not significant (χ^2 test: p=0.24).

		Bulk soil	**Rhizosphere**	**Roots**	**Leaves**	**Seeds**
Collected samples	***In situ***	25	65	65	65	20 (pools of 9 seeds)
	In vitro	-	-	20 (13 + 7)	20 (13 + 7)	-

DNA concentrations of seedlings' roots were normalized to 0.5 ng.µL^{-1} as in Maurice *et al.* (2023). Seed and leaf extracts showed higher DNA concentrations (up to 150 ng.µL^{-1}; data not shown); we therefore diluted these extracts to 3.5 ng.µL^{-1}. The ITS2 region of the fungal ribosomal operon was amplified for all samples with tagged primers ITS86F (5′-GTGAATCATCGAATCTTTGAA-3′) and ITS4 (5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′; White *et al.,* 1990; Op De Beeck *et al.,* 2014). Reactions were performed using the Thermo Scientific Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, USA). All reactions were performed in pseudo-triplicate. Triplicates were then pooled and checked on 2% agarose gel. PCR products were purified using Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter Inc., Indianapolis, IN, USA) and their concentrations were measured with PicoGreen. We built two equimolar pools for sequencing: (1) PCR products from *in situ* samples of bulk soil, rhizosphere, and roots were mixed in one equimolar pool whereas (2) samples of leaves *in situ* and *in vitro*, roots *in vitro*, and seeds were pooled in another equimolar pool. The two pools were purified twice with AMPure XP beads. Each pool was sequenced independently using *MetaFast* library preparation and sequencing (performed by Fasteris SA, Switzerland) on an Illumina platform using the 2x250 pb Miseq technology.

Bioinformatic analysis

A pipeline based on VSEARCH (Rognes *et al.,* 2016) and available on GitHub (https://github.com/BPerezLamarque/Scripts/) was used for data processing (Perez-Lamarque, *et al.,* 2022). Briefly, paired-end reads were merged and quality checked. Merged reads were then demultiplexed using *cutadapt* (Martin, 2011) with 0 error accepted in primer or tag sequences. Reads from all samples were dereplicated and clustered as classical 97% sequence similarity Operational Taxonomic Units (OTUs) using VSEARCH as recommended in Tedersoo *et al.* (2022). All sequences were checked for the presence of chimeras. The taxonomy of these OTUs was assigned with VSEARCH against the UNITE v9.0 database (Nilsson *et al.,* 2019). Reads were filtered to keep only non-chimeric sequences of > 200 pb and with a total abundance of at least 10 (see Supp. Methods 1 for details on the functions and parameters used). We used the *decontam* algorithm (Susana Rivera *et al.,* 2011) to remove potential contaminants, using both *prevalence* and *frequency* algorithms (Supp. Methods 1). Samples with less than 1,000 fungal reads were discarded. After filtering, we obtained the mycobiota composition of 259 samples (96% of all collected samples; Supp. Table 1), with a mean sequencing depth of 21,013 reads per sample (ranging from 1,041 to 130,227; Supp. Fig. 1 & 2). In order to compute UniFrac distances, we reconstructed the fungal phylogenetic trees as in Perez-Lamarque *et al.* (2022) (Supp. Methods 1).

Statistical analysis

OTU tables were processed using the *phyloseq* package (McMurdie and Holmes, 2013) in R (R Core Team, 2023).

Richness and diversity analysis. We computed the richness (Chao1 estimator) and diversity (Shannon index) of each sample based on actual counts using the *vegan* R package (Oksanen *et al.,* 2013). In order to test the significance of differences between experimental designs (*in situ* and *in vitro*), compartments (bulk soil, rhizosphere, roots, leaves, and seeds) and substrate conditions *in vitro* (non- and autoclaved bulk soil), we used linear regression and Tukey's post hoc pairwise test (Supp. Methods 2).

Assessing differences in community structure. In order to test for differences in mycobiota composition between experimental designs, compartments and substrate conditions,

we performed β-diversity analyses. We computed Bray-Curtis distances using either relative abundances (as they may perform better for community comparisons; Gloor *et al.,* 2017; McKnight *et al.,* 2019) or Hellinger-transformed data to correct for variability in sampling depth (Legendre and Gallagher, 2001). We also computed UniFrac distances in order to account for the phylogenetic relatedness between OTUs in our community composition and clustering analyses. Bray-Curtis distances were computed using the *vegan* package (Oksanen *et al.,* 2013) while UniFrac distances were computed using the *phyloseq* package. We visualized community composition differences using principal component analysis (PCoA). As both transformations (relative abundance and Hellinger transformation) and both distances (Bray-Curtis and UniFrac) showed similar results, we only report results from Bray-Curtis distances computed using relative abundances in the main text. The significance of differences in mycobiota composition between the two experimental designs and between compartments was tested using *PERMANOVA* (10,000 permutations) with all samples using the following model: *distance~exp. design*compartment* (where *exp. design* corresponds to *in situ* or *in vitro*). Then, to test whether the two substrate conditions *in vitro* led to different mycobiota composition and to test for differences in composition between above- and belowground compartments, we used a second *PERMANOVA* (10,000 permutations) with only leaves and roots of individuals germinated *in vitro* using the following model: *distance~compartment*substrate condition*.

Construction of plant/fungal bipartite networks to assess the sharing of OTUs. To further assess the sharing of OTUs between compartments (in particular between bulk soil, seeds, and other plant tissues), we constructed bipartite networks using the *igraph* R package (Csardi and Nepusz, 2006). Indeed, if the mycobiota of a plant compartment (*e.g.*, roots) mainly assembles from bulk soil (horizontal transmission), samples from that compartments should share more fungal OTUs with the soil samples than with the seed samples. We therefore aim at identifying the pairs of compartments that share many fungal OTUs. Bipartite networks are visualized using the Fruchterman-Reingold algorithm (Fruchterman and Reingold, 1991), such that samples sharing many OTUs tend to cluster together. We built one network with all samples and a subnetwork to give a clearer representation of the *in vitro* experiment (including seedlings, seeds, and bulk soils used for this experiment). In order to test whether OTUs are shared preferentially between samples from the same compartment or not, we built one network for each compartment of the *in situ* dataset and one network by compartment x substrate condition combinations in the *in vitro* experiment. For each network, we consider an interaction with a fungal OTU as long as the latter represents at least 0.5% of the reads to avoid rare interactions

that may be spurious. We computed the connectance C (*i.e.*, the number of realized links divided by the number of potential links) and the network specialization index H_2' (degree of specialization of the entire network) of each network. Connectance ranges from 0 to 1; values close to 1 indicate that a high proportion of potential links are realized. H_2' also ranges from 0 to 1, 0 indicating a strong generalization and 1 that the network is highly specialized. H_2' is robust against differences in sampling size and is therefore suited for network comparisons (Blüthgen *et al.,* 2006). Significance of both connectance (C) and specialization (H_2') was tested using null models (Supp. Methods 2).

Source tracking analysis. To estimate the respective contributions of seeds (vertical transmission) and bulk soil (horizontal transmission) to the *H. salicornicum* mycobiota, we used the *fast expectation-maximization for microbial source tracking* (FEAST) algorithm developed by Shenhav *et al.* (2019) and implemented in R. This algorithm estimates the fraction of a microbial community (the 'sink') that can be explained by potential microbial sources (the 'sources'). The algorithm also reports an unexplained fraction referred to as the 'unknown' source. Here, seeds and bulk soil samples were defined as 'sources' whereas roots, rhizosphere, and leaves were defined as 'sinks'. We ran the procedure twice: first, on the *in situ* adult individuals compartments (with *in situ* seeds and bulk soil as sources) and, a second time on seedlings from the *in vitro* experiment (with *in situ* seeds and bulk soil samples used for the germination experiment as sources). In order to test whether differences in contribution from bulk soil and seeds were significant, we used linear regressions and Tukey's post-hoc test (Supplementary Methods 2).

Identifying potentially transmitted OTUs. We identified OTUs potentially transmitted from the sources (bulk soil and seeds) to the compartments (or sinks), using a 'strict' and a 'loose' definition. With our strict definition, a potentially transmitted OTU is an OTU shared between one source and one sink (e.g., between bulk soil and rhizosphere), but absent from the other source (seeds in this example). This definition ensures that the OTUs identified as potentially transmitted can only be transmitted from one of the two sources. With our loose definition, potentially transmitted OTUs are OTUs shared between one source and one sink (e.g., bulk soil and rhizosphere) but not necessarily absent from the other source (here seeds). This second definition allows us to identify ubiquitous OTUs that may be transmitted both horizontally and vertically. For each definition, we represented the composition of the fraction of the mycobiota explained by potentially transmitted OTUs, that is, the mycobiota composition

when considering only potentially transmitted OTUs. We also computed the mean share of the mycobiota they represent.

Results

We successfully sequenced the fungal ITS2 region of 259 samples, including roots, rhizosphere, and leaves of *in situ H. salicornicum* individuals and their associated bulk soil (*i.e.*, with no apparent vegetation). We also characterized the mycobiota of seeds collected in the same area and leaves and roots of *H. salicornicum* seedlings germinated *in vitro* in non- and autoclaved soil (see Supp. Table 1 for details on successfully processed samples). The mean sequencing depth for these samples was 21,013 reads (ranging from 1,041 to 130,227; Supp. Figure 1 & 2) after removing extraction and PCR contaminants. Rarefaction curves tended to reach a plateau for most of the samples (Supp. Fig. 2), suggesting that our sampling properly encompasses the mycobiota diversity of soil and *H. salicornicum* tissues.

H. salicornicum displays contrasted mycobiota diversity between compartments in adults *in situ* but not in seedlings *in vitro*

Adult individuals *in situ* harbored contrasted mycobiota compositions depending on the studied compartment, in particular between above- and belowground compartments, whereas seedlings *in vitro* displayed similar leaf and root mycobiota in the two substrate conditions (non- and autoclaved; Fig. 2).

In situ, soil compartments (bulk soil, rhizosphere, and roots) were characterized by a greater proportion of Eurotiales and Sordariales compared to aerial compartments (leaves and seeds) which were mainly colonized by Pleosporales (representing almost 50% of the mycobiota for both aerial compartments) and to a smaller extent by Mycosphaerellales (Fig 2a). Adult roots were also characterized by a larger share of Xylariales (Fig. 2a) compared to other compartments. The share of Botryosphaeriales was higher in leaves than in seeds. *In vitro*, we observed small differences between seedling roots and leaves and between substrate conditions (Fig 2a). Seedlings *in vitro* harbored a small share of Pleosporales compared to *in situ* leaves

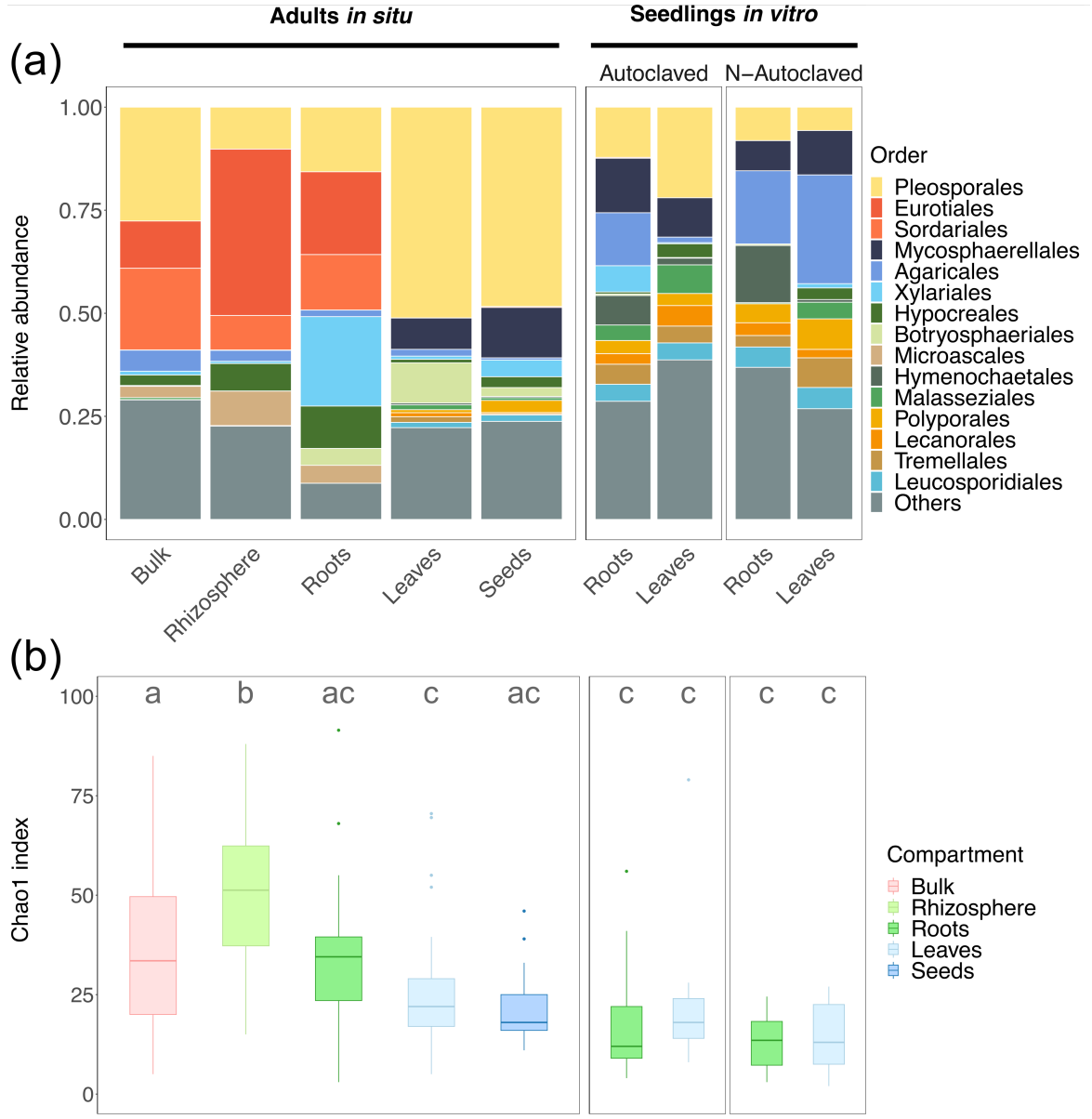


Figure 2: *H. salicornicum* mycobiota varies according to the compartment in adults *in situ* but not between compartments or substrate condition in seedlings *in vitro*. Both composition **(a)** and richness **(b)** varied according to the compartment in adults *in situ* while no differences seemed to occur between compartments nor substrate conditions in seedlings *in vitro*. **(a)** Mycobiota composition (in relative abundance) of *H. salicornicum* compartments *in situ* and *in vitro* at the order level. Bar plots represent the mean proportion of each fungal order by compartment, experimental design, and substrate condition *in vitro*. For *in vitro* samples, both substrate conditions (non- and autoclaved) are shown. For readability purposes, only the main 15 orders are shown, while the rest are aggregated in the 'Others' category. **(b)** Fungal richness (Chao1 index) in the different compartments, experimental designs (*in situ* and *in vitro*) and substrate conditions *in vitro*. Different letters indicate significant differences (p<0.05; Tukey's post hoc pairwise test).

and seeds but similar proportions of Mycosphaerellales. Contrary to adult roots *in situ*, roots of seedlings *in vitro* harbored almost no Eurotiales or Sordariales and a small share of Xylariales. Interestingly, despite similar mycobiota composition at the order level, the top 5 OTUs were quite different between compartments and substrate conditions *in vitro*, except for *Mycosphaerella asteroma* which was ubiquitous (Supp. File 1).

The highest fungal richness was observed in the rhizosphere of adults *in situ* (*chao1*=49±17; Fig. 2b), followed by bulk soil and roots *in situ* (37±22 and 33±15, respectively). Among samples *in situ*, seedling leaves and seeds harbored the lowest richness (25±13 and 22±11 respectively). All *in vitro* samples had lower richness compared to samples *in situ* (ranging from 13±8.1 for roots in the non-autoclaved condition to 22±18 for leaves in the autoclaved condition; *ANOVA*: $p<10^{-15}$; Supp. Table 3). Differences in richness were not significant between substrate conditions *in vitro*. Similarly, differences in richness between roots and leaves *in vitro* were not significant (p=0.54, *ANOVA*; Supp. Table 3), though leaves tended to harbor a slightly higher richness (Fig. 2b; Supp. Table 3). The Shannon diversity index revealed similar trends (Supp. Fig 3; Supp. Table 4). Diversity and richness therefore displayed similar patterns: in seedlings *in vitro*, no significant differences between roots and leaves and substrate conditions were identified (Supp. Fig. 3; Supp. Table 3; Supp. Table 4), while in adults *in situ*, compartments differed significantly in richness and diversity.

Mycobiota communities are highly structured in two main groups

As revealed by β-diversity and bipartite network analyses, two groups of samples tend to have similar mycobiota composition and to share more fungal OTUs, that is: bulk soil, rhizosphere and roots of adults *in situ* on the one hand, and leaves, seeds and seedlings' roots and leaves on the other hand (Fig. 3; Fig. 4).

As illustrated by the principal coordinate analysis (PCoA; Fig. 3), samples from the same compartment tended to cluster together. Differences in mycobiota composition between compartments were significantly distinct (*PERMANOVA*: R^2=0.15, $p<10^{-4}$; Fig. 3a). Significant differences between *in situ* and *in vitro* fungal communities were also observed (R^2=0.03, $p<10^{-4}$; Fig 3b). Globally, *in situ* soil compartments tended to cluster together, while *in situ* aerial compartments and *in vitro* samples tended to cluster in a second group (Fig. 3a, b). We performed the analysis with only *in vitro* samples in order to test for differences between compartments and substrate conditions (non- and autoclaved soil) and we observed no

significant influence of the compartment nor substrate condition (p>0.1 for both variables and their interaction term; Fig. 3c, d). These results were consistent when using Hellinger-transformed data instead of relative abundances and when using UniFrac distances instead of Bray-Curtis distances (Supp. Fig. 4).

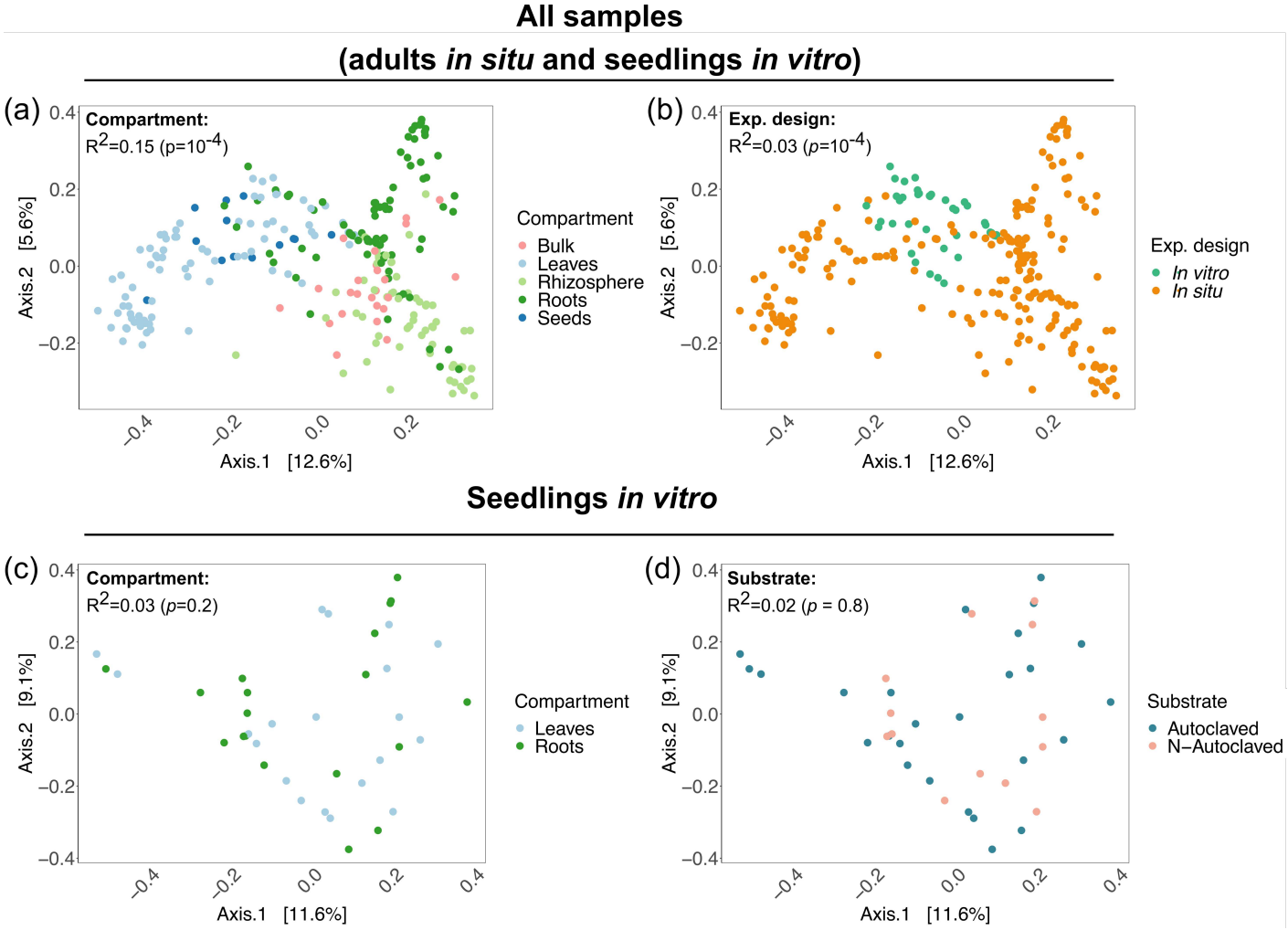


Figure 3: *H. salicornicum* fungal communities significantly differ between compartments and experimental design (*in situ* vs. *in vitro*). Principal coordinate analysis (PCoA) of the mycobiota composition, based on Bray-Curtis distances computed using relative abundances. The influence of the variables on Bray-Curtis distance matrices was tested using *PERMANOVA* (10 000 permutations). **(a), (b)** All samples. **(c), (d)** Seedlings' roots and leaves (*in vitro*). **(a)** The compartment explains a large share of the differences in mycobiota composition between all samples. **(b)** The experimental design also has a significant influence on the mycobiota composition. **(c), (d)** When considering only *in vitro* samples, neither compartment **(c)** nor substrate condition **(d)** has a significant influence on the mycobiota.

We also constructed two bipartite networks to compare the structure of the fungal communities and assess the sharing of OTUs between compartments, experimental design and substrate condition. When considering the total network (Fig. 4a), we identified two main modules: one with *in situ* soil compartments (bulk soil, rhizosphere, roots) and another one with samples *in vitro*, seeds, and leaves *in situ*. More OTUs were shared within than between the modules, despite some OTUs with high betweenness centrality (that is central OTUs that link many nodes of the network) linking them. The total network had a low connectance (C=0.06), meaning that a low proportion (6%) of all possible interactions between OTUs and samples was observed, which is significantly lower than expected based on our null model (p<0.025). Furthermore, the specialization of the network was significantly higher than expected by chance (H_2'=0.71; p<0.025). Altogether, these results suggest a limited sharing of OTUs between samples. When focusing on the network of the *in vitro* experiment (formed by seeds and bulk soils used as substrate for the *in vitro* experiment and seedlings' leaves and roots; Fig. 4b), we observe that plant tissues tended to cluster together while bulk soils were more peripheral (Fig. 4b). Samples from the non- and autoclaved conditions did not seem to form specific groups, a result consistent with the *PERMANOVA* analysis (R^2=0.02, p=0.8; Fig. 3c, d). When considering each compartment separately (in each substrate condition for seedlings *in vitro*), we observed that the connectance of the networks was ca. 4 times higher compared to the total network (Supp. Fig. 5), suggesting that the low connectance of the networks in Fig. 4 is linked to a low sharing of OTUs between compartments compared to the sharing within compartments. *In situ*, soil compartment networks tended to be more specialized (bulk: H_2'=0.7; rhizosphere: H_2'=0.61; roots: H_2'=0.75; Supp. Fig. 5a) compared to aerial compartments (leaves: H_2'=0.46; seeds: H_2'=0.58; Supp. Fig. 5a).

Soil contributes to adults' root and rhizosphere mycobiota *in situ*, while seeds contribute to adults' leaf mycobiota *in situ* and seedlings' leaf and root mycobiota *in vitro*.

The source tracking algorithm *FEAST* and the identification of potentially transmitted OTUs revealed variable contributions of seeds (vertical transmission) and bulk soil (horizontal transmission) as potential fungal sources to *H. salicornicum* mycobiota (Fig. 5; Fig .6). *In vitro*, both leaf and root mycobiota in the two substrate conditions (non- and autoclaved) were mainly explained by seed mycobiota (ranging from 16% to 33%; Fig. 5; Supp. Table 5), whereas the bulk soil contribution was very low (ranging from 0.1% for leaves in the non-autoclaved condition to 4.0% for leaves in the autoclaved condition).

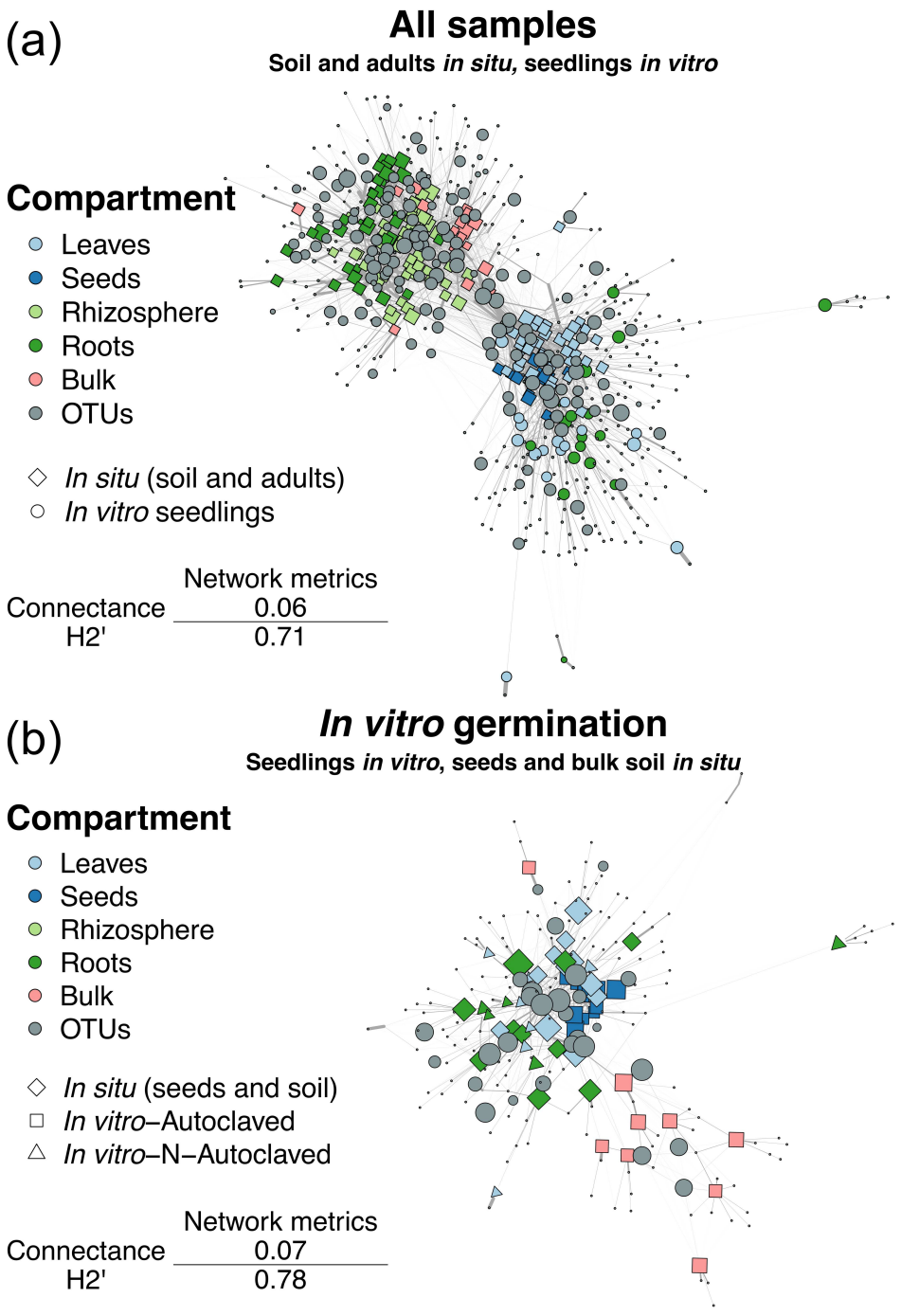


Figure 4: Bipartite networks are structured in two groups preferentially sharing fungal OTUs. (a) Bipartite network of all samples reveals two groups of samples sharing more fungal OTUs: bulk soil, adults' rhizosphere and roots *in situ* form one group whereas adults' leaves and seeds *in situ* and seedlings' roots and leaves *in vitro* form a second one. **(b)** When focusing on samples of the *in vitro* germination experiment (that is, adults' seeds collected *in situ*, bulk soil used as substrate and seedlings' leaves and roots), we confirm that seedlings' leaves and roots share more OTUs with seeds than with bulk soils used as substrate. No differences between substrate conditions are observed. Weighted bipartite networks (based on relative abundances of OTUs) are visualized using the Fruchterman–Reingold layout algorithm which allow better readability. Grey nodes represent OTUs and colored ones represent samples. Node diameter is proportional to the betweenness centrality. Width of the edges is proportional to the relative abundance of an OTU in a sample. See Supp. Methods 2 for connectance (C) and specialization (H_2') calculation and significance tests.

The contribution of seeds was significantly greater than the contribution of bulk soil *in vitro* in both compartments and substrate conditions (with the exception of leaves of the non-autoclaved condition; Fig. 5), suggesting a predominance of vertical transmission in seedlings *in vitro*. Both compartment and substrate condition variables had no significant effect on the proportions of the mycobiota explained by the source contributions *in vitro* (p>0.5 for both variables, *ANOVA*; Supp. Table 6; Supp. Fig. 6). In contrast, for adults *in situ*, we observed different transmission pathways: roots and rhizosphere mycobiota originates mainly from bulk soil (mean contribution of respectively 39 and 32%), while seeds contribute significantly less (respectively 2.0 and 0.8%; Fig. 5; Supp. Table 5). Conversely, *in situ,* leaf mycobiota were mostly explained by the seeds (mean contribution of 48%) with a minor contribution from the bulk soil (12%).

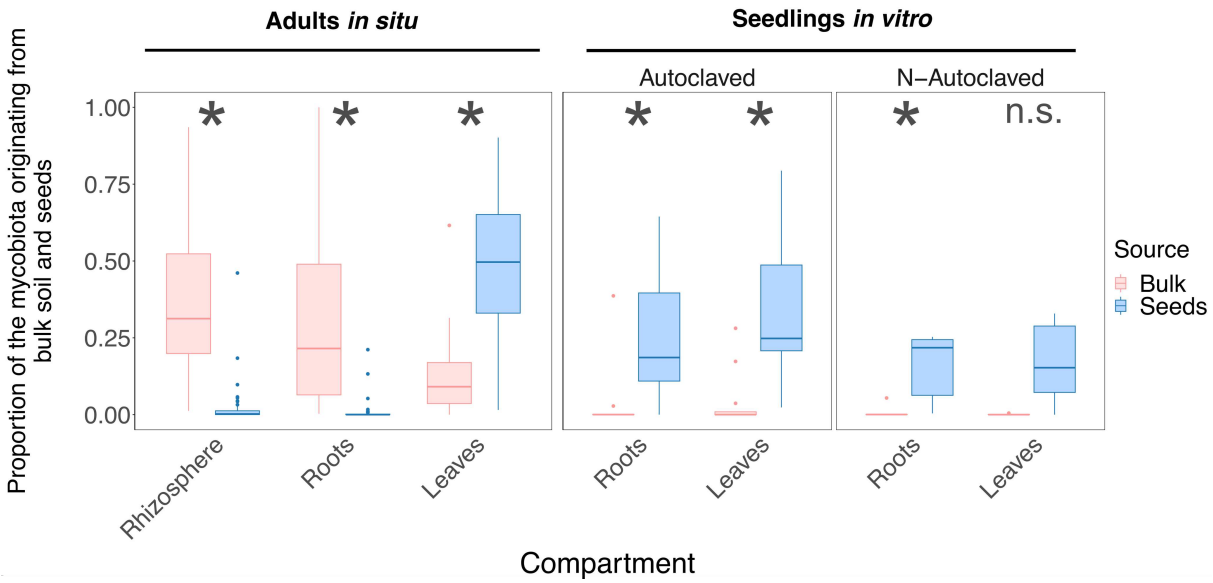


Figure 5: Vertical and horizontal transmission differ between adults *in situ* and seedlings *in vitro* and between compartments according to the source tracking analysis. The proportion of the mycobiota originating from bulk soil and seeds varies between compartments and experimental design. Bulk soil is the main source of mycobiota for rhizosphere and roots *in situ* while seeds explain most of the mycobiota of leaves *in situ* and of seedlings' leaves and roots *in vitro*. Proportions were estimated using the *fast expectation-maximization for microbial source tracking* (FEAST) algorithm. Asterisks indicate significant differences between the proportions of the two sources, based on Tukey's post hoc pairwise test (see Supp. Methods 2 & Supp. Fig. 6).

We identified fungal candidates for transmission using a strict and loose definition of potentially transmitted OTUs. Using the strict definition, we confirmed the prevalence of OTUs sharing between seeds and seedlings: between 22 and 59 OTUs were shared between seeds and seedlings *in vitro*, representing 30 to 43% of their mycobiota (Fig. 6, Supp. Table 7). In

particular, *Mycosphaerella* and *Leucosporidium* OTUs were shared between seeds and roots/leaves in the two substrate conditions (Fig. 6). Conversely, seedlings *in vitro* shared very few OTUs with the bulk soil (Fig. 6), representing a null (or close to) contribution of their mycobiota (Supp. Table 7). This markedly contrasts with the rhizosphere and roots of adults *in situ* that shared a high number of OTUs with the bulk soil (respectively, 226 and 159; Fig. 6), representing a large share of their mycobiota (43 and 40%, respectively; Supp. Table 7). Among candidates for transmission between bulk soil and rhizosphere/roots, we mainly identified OTUs belonging to the *Penicillium*, *Chaetomium*, and *Eutypella* genera (Fig. 6). A very small number of OTUs were shared between seeds and rhizosphere/roots *in situ*, representing a small share of their mycobiota (Supp. Table 7). Bulk soil and leaves of adults *in situ* shared 46 OTUs, which represent 6.8% of the leaf mycobiota. This percentage is similar to the sharing between seeds and leaves *in situ* (54 OTUs, 7.9% of the mycobiota); this contrasts with the results from the source tracking analysis which indicated that the seeds contributed 48% of the leaf mycobiota *in situ* (Fig. 5; Supp. Table 5). The apparent contradiction between the two methods was overcome when using our loose definition of potentially transmitted OTUs as we observed that some ubiquitous fungi (such as fungi from the genus *Alternaria*; Supp. Fig. 7) may be transmitted by both seeds and bulk soil to rhizosphere, roots, and leaves *in situ*. With this loose definition, potentially transmitted OTUs from seeds and bulk soil represented almost 40% of leaves *in situ* (Supp. Fig. 7).

Altogether, the source tracking analysis and the identification of potentially transmitted OTUs were consistent, as the number of potentially transmitted OTUs (and their share of the mycobiota) was correlated (Supp. Fig. 8). They suggested a predominance of vertical transmission from seeds to seedlings *in vitro* (regardless of the compartment) and a predominance of horizontal transmission in soil compartments of adults *in situ*. Leaves of adults *in situ* displayed a mixed pattern, with a predominance of vertical transmission but a significant share of horizontal transmission.

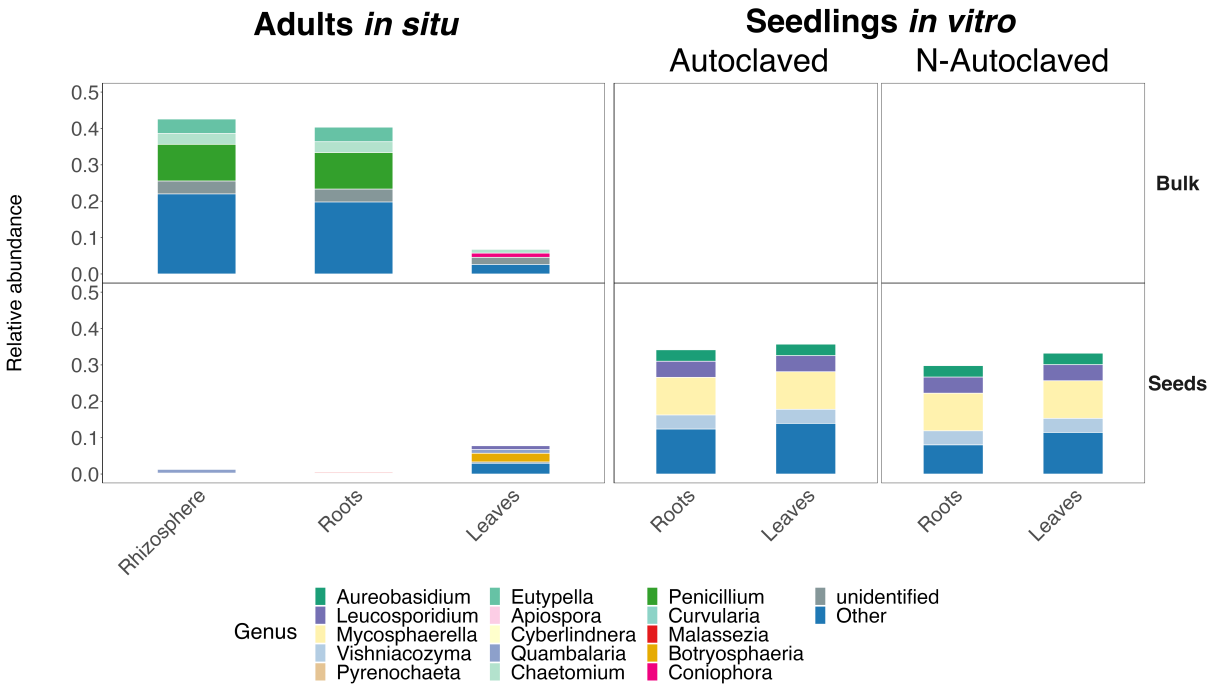


Figure 6: Different fungal genera are potentially transmitted from bulk soil and seeds to *H. salicornicum* compartments. We identified potentially transmitted OTUs from sources (bulk soil and seeds) to *H. salicornicum* compartments for adults *in situ* and seedlings *in vitro* (in both substrate conditions) using a strict definition: OTUs are considered potentially transmitted if they are shared between a source (*e.g.*, bulk soil) and the studied compartment (*e.g.*, roots) but not with seeds (in this example). We then represented the share of the mycobiota (at the genus level) of each plant compartment when considering only potentially transmitted OTUs with bulk soil or seeds. See Supp. Figure 7 for similar plots using the loose definition of potentially transmitted OTUs.

Discussion

We comprehensively quantified the respective contribution of vertical (seeds) and horizontal (bulk soil) transmission pathways to *H. salicornicum* mycobiota in seedlings *in vitro* and fully developed individuals *in situ*, for aerial and underground compartments. It is, to our knowledge, the first time that both transmission pathways were simultaneously quantified at different development stages, in particular in desert ecosystems. We showed that roots and rhizosphere mycobiota of adult individuals *in situ* are mainly explained by bulk soil (horizontal transmission) with almost no contribution of seeds, whereas roots and leaves of seedlings *in vitro* are mainly explained by the seeds (vertical transmission) with almost no contribution from the soil (Fig. 7). Only leaves of adults *in situ* display a mixed pattern with a predominance of vertical transmission.

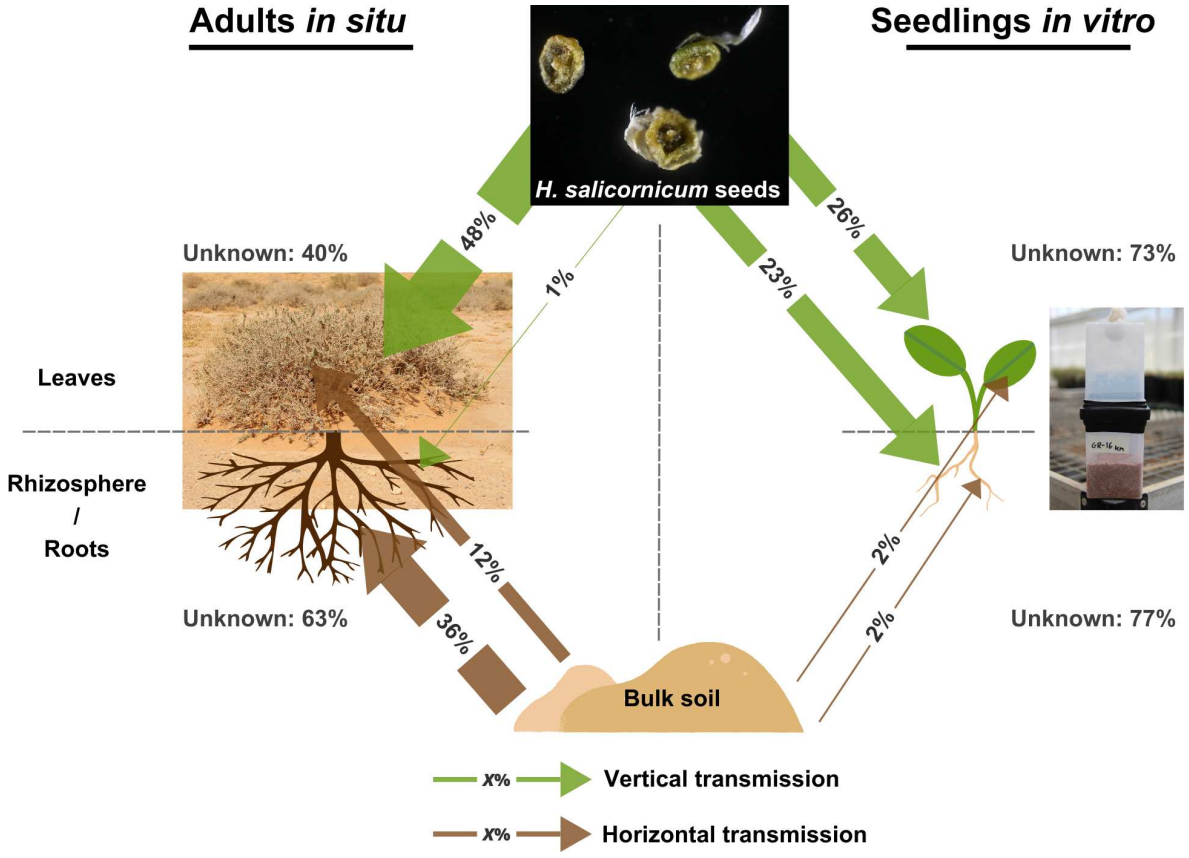


Figure 7: Root and rhizosphere mycobiota of adults *in situ* are mainly explained by the bulk soil (horizontal transmission), whereas adults' leaf mycobiota *in situ* and seedlings' leaf and root mycobiota *in vitro* are mainly explained by seeds (vertical transmission).
Graphical summary of the estimated contribution of seeds and bulk soil to *Haloxylon salicornicum* mycobiota in each compartment using the *FEAST* source tracking algorithm. Vertical transmission (through seeds) explains most of the mycobiota of adults' leaves *in situ* and seedlings' roots and leaves *in vitro*. Horizontal transmission (bulk soil) is the main source of roots and rhizosphere mycobiota of adults *in situ* but also contributes to leaves mycobiota. Arrows width is proportional to the estimated contribution. For readability purposes, the contributions of bulk soil to roots and rhizosphere mycobiota of adults *in situ* were averaged as they are not significantly different (Fig. 5). Similarly, as the contribution of both seeds and bulk soil to leaf and root mycobiota in seedlings *in vitro* are not significantly different (Fig. 5), they were averaged. The unexplained contribution to the mycobiota of adults *in situ* and seedlings *in vitro* is also reported.

Vertical transmission is predominant in *H. salicornicum* seedlings' mycobiota *in vitro* while bulk soil has a quasi-null influence.

Both leaves and roots of seedlings germinated *in vitro* in (non-)autoclaved soil collected *in situ* display similar mycobiota composition resembling that of seeds, suggesting a predominance of vertical transmission. Due to a low germination rate and events of damping off in previous trials, we collected seedlings *in vitro* at an early development stage (2-leaf, 7 days). Despite a limited number of seedlings, we observed strong patterns across samples. First,

the mycobiota of seedling roots and leaves *in vitro* were almost undifferentiated. Yet, compartment is known to be a strong factor of differentiation of the mycobiota, especially between above- and belowground compartments (Wearn *et al.,* 2012; Martins *et al.,* 2016; Harrison and Griffin, 2020), even though differences at juvenile stages may be lower as distance between compartments is reduced. Second, both substrate conditions (non- and autoclaved) used in the *in vitro* experiment resulted in similar mycobiota composition after 7 days, suggesting a low influence of this reservoir on seedling mycobiota. As further evidenced by bipartite networks, source tracking analysis and the identification of potentially transmitted OTUs from seeds to seedlings (leaves and roots), vertical transmission predominates in seedlings mycobiota assembly, contrary to our hypothesis. Our results are at odds with those of Rochefort *et al.* (2021) as they observed, in *Brassica napus* (Brassicaceae), that differences in the initial quantity of soil microorganisms in the germination substrate led to distinct fungal communities at 7 and 14 days suggesting that soil microbiota has a significantly greater influence on seedling mycobiota than seeds. These differences may be linked to differences in *in vitro* experimental settings as Rochefort *et al*. (2021) used gamma-irradiated soil inoculated with 'active' soil suspensions, or differences of mycobiota assembly strategies between species. Other studies have also shown that bacterial microbiota is vertically transmitted to seedlings by seeds (Moroenyane *et al.,* 2021 on soybean; Walsh *et al.,* 2021 on wheat) using inoculated seeds germinated *in vitro*. In our experiment, we used as substrate soil collected *in situ* which was unprocessed as much as possible before setting up the *in vitro* experiment. Though sampling may have altered the physiological condition and colonization capacity of soil fungi by breaking hyphae and limiting access to water, fungi in desert ecosystems have developed adaptations to these harsh conditions (sandy soil, nutrition depletion, low water availability, heat…), such as resistant spores, melanized hyphae, or biofilm formation with other organisms such as bacteria (Sterflinger *et al.,* 2012; Ameen *et al.,* 2021). We therefore hypothesize that soil sampling only had a limited effect on the colonization capacity of soil fungi in our experiment. These experimental biases could be overcome by sampling seedlings *in situ* (when possible) in addition to *in vitro* experiments. A large share of seedling mycobiota *in vitro* is not explained by seeds nor soil (75% in average). Rarefaction curves of both sources (bulk soil and seeds) tend to reach a plateau for most of the samples, suggesting that our sampling properly describes their fungal diversity. Furthermore, we used extraction and PCR negative controls along with stringent filtering in order to limit the presence of contaminants from molecular analysis. Unexplained fungal transmission may thus occur from other sources of contamination such as air born fungi from the growth room (Zhou *et al.,* 2021), water used for watering of the Magenta

boxes, or contaminations from human manipulations. Our *in vitro* experimental setup should however limit these (Material & Methods) as we used closed Magenta boxes to avoid contaminants from the growth room, sterilized water and sterilized tweezers for seeds and sample manipulation. Finally, seedlings were collected and processed under a laminar flow cabinet to avoid contaminations. Despite these precautions, contaminations from sources cited above may have occurred.

Fungi potentially transmitted from seeds to seedlings were similar in the two compartments (roots and leaves) and substrate conditions (non- and autoclaved), and were mainly *Mycosphaerella asteroma* (ca. 10% of the seedling mycobiota). *Mycosphaerella* spp. have been mainly reported as plant pathogens (Hunter *et al.,* 2011), yet we did not find any visual traces of plant diseases on seedlings at sampling time. Indeed, some *Mycosphaerella* species occur as symptomless endophytes (Kaneko *et al.,* 2003; González-Teuber, 2016) and shift from pathogenic to endophytic, a behavior which is common among fungi (Selosse *et al.,* 2018). These endophytic fungi may therefore be either harmless or latent pathogens. Other fungi belong to the yeast genera *Leucosporidium*, the genus *Vishniacozyma*, and *Aureobasidium* (*A*. *pullulans*), which has anti-fungal activities (Wachowska and Głowacka, 2014). Their roles as seed and seedling endophytes are poorly understood and deserve further attention. As shown in previous studies, the initial mycobiota may impact the recruitment of fungi after germination by either limiting the development of other species or facilitating their establishment in plant tissues, a phenomenon called priority/priming effect (Ridout *et al.,* 2019; Debray *et al.,* 2022). Fungi pseudo-vertically transmitted may therefore play a crucial role in the mycobiota assembly by facilitating or limiting the colonization of other soil fungi. Such priming effects may be of great importance in desertic ecosystems where (1) harsh soil conditions may limit microbial availability (Maldonaduo *et al.,* 2022) and (2) large distances between conspecific individuals may limit fungal sharing (Brigham *et al.,* 2023). In particular, seeds may not directly benefit from the higher microbial diversity of fertility islands when dispersed far from *H. salicornicum* individuals (Maurice, *et al.,* 2023b). Vertical transmission of fungi in desert ecosystems may thus improve seedlings settling by increasing access to the low water and nutrients (Yakti *et al.,* 2018) and therefore be favored against horizontal transmission, explaining differences of patterns with other studies (Rochefort *et al.,* 2021). Mycobiota assembly strategies in desert ecosystem, and in particular the high importance of vertical transmission, deserve further attention as they can provide information on plant adaptation to harsh conditions, with potential applications in restauration and desertification mitigation.

Rhizosphere and root mycobiota of adults *in situ* are mainly obtained by horizontal transmission, while leaf mycobiota are acquired by both vertical and horizontal transmission.

Contrary to seedlings *in vitro*, adult individuals *in situ* display contrasted mycobiota composition according to the compartment studied. The main differences were observed between above- and belowground plant compartments (rhizosphere and roots vs. leaves and seeds). These observations are consistent with the source tracking analysis as both rhizosphere and root mycobiota are mainly explained by the bulk soil (39 and 33%, respectively), while the contribution of seeds is quasi-null. These results suggest that the mycobiota of belowground tissues of adults *in situ* are mainly transmitted horizontally, as hypothesized in this study. Potentially transmitted OTUs have similar taxonomy and are mainly affiliated to *Penicillium oxalicum* (ca. 10% of the root and rhizosphere mycobiota), *Eutypella* sp. (4%), Pleosporaceae sp. (3.5%), and *Chaetomium* sp. (3%). *P. oxalicum* is commonly found in the rhizosphere and was reported as a plant growth-promoting fungus which could limit the development of some pathogens such as *Fusarium* spp. (Murali and Amruthesh, 2015), while the others may be plant pathogens (esp. *Eutypella* sp.) or endophytes (such as *Chaetomium* sp.; FUNGuild online database, Nguyen *et al.,* 2016).

Leaf mycobiota of adult individuals *in situ* display a mixed pattern of colonization. Their composition is similar to seeds which are the main contributor to their mycobiota (48%). This contribution is mainly supported by ubiquitous fungi such as *Alternaria consortialis* which represent a large share of leaf mycobiota *in situ* (10%) when using the loose definition of potentially transmitted OTUs. Notably, bulk soil has a non-null contribution to leaf mycobiota (12%), also characterized by the contribution of *A. consortialis*. Species from the *Alternaria* genus are common seed endophytes (Simonin *et al.,* 2022) and have also been reported as widespread saprotroph and plant pathogens in leaves and shoots (Dang *et al.,* 2015). *Alternaria* spp. have already been isolated from desert soils in the Arabian desert (Ameen *et al.,* 2021) and our results suggest that they may have been recruited from both bulk soil and seeds *in situ*. Contribution from soil to phyllosphere mycobiota has already been shown for bacteria (Xiong *et al.,* 2021), but the mechanisms of transmission from soil to phyllosphere are poorly described. Some authors suggest that soilborne microbes may be transmitted by air (Zhou *et al.,* 2021) or within plant tissues (Vandenkoornhuyse *et al.,* 2015) and indeed desert soils are poorly covered by vegetation, allowing transfer of dust to air. Our results support transmission of soil fungi to the phyllosphere, but do not allow us to draw conclusions regarding the

pathways followed by these fungi. Our results emphasize the importance of considering both vertical and horizontal transmission simultaneously to identify ubiquitous fungi that may be transmitted both vertically and horizontally and therefore avoiding over- or underestimation of their respective contribution.

As for seedlings *in vitro*, a large share of *in situ* adult mycobiota is not explained by seeds or bulk soil. Contrary to the *in vitro* experiment, sources of contaminations *in situ* may be more diverse, including fungi dispersed by wind and small mammals (Zhou *et al.,* 2021; Borgmann-Winter *et al.*), or even plant debris from the litter (Christian *et al.,* 2017). Though fungi may be transmitted by wind (e.g., spores), the low density of plant individuals (in particular *H. salicornicum* individuals; fertility islands hypothesis) may limit their dispersion and therefore favor the withholding of vertically-transmitted fungi in *H. salicornicum* leaves, while the mycobiota of belowground tissues are more likely to be influenced by the environment (horizontal transmission).

Vertical and horizontal transmission during microbiota assembly of a desert shrub.

Here, transmission from seeds may be pseudo-vertical as we investigated the total seed mycobiota (epiphyte and endophyte) collected on *H. salicornicum* individuals (before falling on the ground) and germinated them without surface sterilization. Vertical transmission *sensu stricto* describes the transmission of microorganisms strictly to the progeny, i.e., with no contamination from the environment (Bright and Bulgheresi, 2010; Truyens *et al.,* 2015). However, seeds are exposed to several environmental contaminations over their life cycle from the early development stage to maturation and germination (Abdelfattah, *et al.,* 2022; Nelson, 2018), resulting in modified microbiota/mycobiota which are also transmitted to seedlings. Once pseudo-vertical transmission is ensured, it may allow a partner fidelity sufficient to ensure the evolution of important functions for the host plant (Séne *et al.,* 2018).

Differences in vertical and horizontal transmission observed between seedlings *in vitro* and adults *in situ* may be linked not only to differences in life conditions (*in situ* vs. *in vitro*) but also to age, and reflect the juvenile mycobiota, which may change during *H. salicornicum* development from the establishment of seedlings to adult individuals, as often reported (Houlden *et al.,* 2008; Han *et al.,* 2017; Gao *et al.,* 2019; Liu and Howell, 2021). In the latter case, our results suggest a secondary colonization of roots and rhizosphere by soil fungi, replacing fungi vertically transmitted to seedlings. Plants can indeed recruit fungal partners actively by emitting signal molecules (Daguerre *et al.,* 2020), while some fungi colonize

compartments without any active recruitment from the plant (Gao *et al.,* 2020), leading to changes in mycobiota composition with age (ecological recruitment process). Differences in horizontal and vertical transmission between *in situ* adults and *in vitro* seedlings are less contrasted in leaf mycobiota as in both cases, seeds (vertical transmission) are the main contributor to their mycobiota. However, we identified a significant share of horizontal transmission from the soil to leaves of adults *in situ* but none in seedlings *in vitro*. Furthermore, fungi potentially transmitted from seeds to leaves differ between adults *in situ* and seedlings *in vitro*. Again, these differences may be linked to differences between environmental conditions, but also to changes in mycobiota composition of aerial compartments during plant development (Maignien *et al.,* 2014).

Finally, understanding whether fungi are transmitted horizontally or vertically has crucial ecological implications over short timescales, but may also help us to understand phenomena occurring over long timescales such as phylosymbiosis patterns (i.e., phylogenetically close individuals tend to associate preferentially with related hosts), which have been observed in plants with fungi (Perez-Lamarque *et al.,* 2020) and bacteria (Abdelfattah, *et al.,* 2022), interactions suggesting preferential associations between plants and fungi and/or bacteria. Some authors suggest that such evolutionary patterns are testimony of microbiota transmission from one generation to the other (Abdelfattah, *et al.,* 2022), reflecting the relevance of our findings, although host filtering from the environment may be the main mechanism at stake (Mazel *et al.,* 2018).

Conclusion

Through a combination of *in situ* sampling and *in vitro* experiment, we have comprehensively described and quantified vertical (from seeds) and horizontal transmission (from bulk soil) of *H. salicornicum* mycobiota (Fig. 7). We show *in vitro* that the mycobiota are partially transmitted to seedlings by seeds (vertical transmission) while soil does not influence their mycobiota, contrary to our hypothesis and previous results. The mycobiota of belowground compartments of *in situ* adult individuals display an opposite pattern as the contribution of seeds is almost null: rhizosphere and root mycobiota are mainly explained by the bulk soil (horizontal transmission). Leaves of adult individuals display a mixed pattern as their mycobiota are mainly explained by seeds, with a significant contribution of bulk soil. However, fungi transmitted from seeds to leaves differ between adults and seedlings.

Differences in transmission pathways between adults *in situ* and seedlings *in vitro* may be linked to differences in experimental designs, but also to differences between developmental stages. Taking dynamic changes in the mycobiota and the transmission pathways into account would improve our understanding of mycobiota assembly. Finally, we show that some fungi are specifically shared between a source and a compartment (e.g., bulk soil and roots sharing *P. oxalicum*), while some ubiquitous fungi (such as *A. consortialis*) may be transmitted by both seeds and soil. The role of these fungi needs further attention, in particular, to decipher whether fungi transmitted by seeds are beneficial or deleterious for the host. A better understanding of the mycobiota assembly processes under strong environmental constrains will be of great importance for natural environment protection and restauration in hot deserts but also to develop new strategies to tackle drought stress in crops or in natural environments facing desertification.

Acknowledgments

We would like to thank Dr. Sami YOUSSEF and the company Valorhiz (Montpellier, France) for providing the Haloxylon salicornicum seeds. We thank the Editor and reviewer for constructive comments that greatly improved our manuscript. We also thank David Marsh for English editing. We thank Pierre-Yves CANTO, head of the Molecular Ecology Technical Platform at IEES Paris.

CRediT (Contribution Roles Taxonomy; https://credit.niso.org/)

L. L.-W., K. M., M. D. & M.-A. S.: Conceptualization.
L. L.-W., K. M. & A. B.: Lab work & data curation.
L. L.-W., B. P.-L.: Formal Analysis.
L. L.-W.: Visualization.
L. L.-W.: Writing – original draft.
All authors: Writing – review & editing.

Data availability statement

Sequencing data are publicly available in GenBank (accession number: PRJNA1028866 for bulk soil, rhizosphere and roots in situ and PRJNA1035432 for leaves, seeds in situ and seedling's leaves and roots). The bio-informatic pipeline can be found at: https://github.com/BPerezLamarque/Scripts/.

Funding statement

This work was supported by the SoFunLand project, part of the Oasis program funded under the partnership between the RCU (Royal Commission for AlUla) and AFALULA (Agence Française pour le development d'AlUla).

Conflict of interest disclosure

We declare no conflict of interest.

Ethics approval statement

All prevailing local, national and international regulations and conventions, and normal scientific ethical practices, have been respected.

Supporting information

Supporting information can be found at: https://github.com/liamlaurentwebb/SeedOrSoil.git

References

Abdelfattah, A., Tack, A.J.M., Lobato, C., Wassermann, B., and Berg, G. (2022) From seed to seed: the role of microbial inheritance in the assembly of the plant microbiome. *Trends Microbiol*.

Abdelfattah, A., Tack, A.J.M., Wasserman, B., Liu, J., Berg, G., Norelli, J., *et al*. (2022) Evidence for host–microbiome co-evolution in apple. *New Phytol* **234**: 2088–2100.

Al Salameen, F., Habibi, N., Kumar, V., Al Amad, S., Dashti, J., Talebi, L., and Al Doaij, B. (2018) Genetic diversity and population structure of Haloxylon salicornicum moq. in Kuwait by ISSR markers. *PLOS ONE* **13**: e0207369.

Ameen, F., Stephenson, S.L., Al Nadhari, S., and Yassin, M.A. (2021) A review of fungi associated with Arabian desert soils. *Nova Hedwig* 173–195.

Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Vergès, M.-C.C., Charles, T., *et al*. (2020) Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome* **8**: 103.

Blüthgen, Nico, Menzel, F., and Blüthgen, Nils (2006) Measuring specialization in species interaction networks. *BMC Ecol* **6**: 9.

Bonito, G., Reynolds, H., Robeson II, M.S., Nelson, J., Hodkinson, B.P., Tuskan, G., *et al*. (2014) Plant host and soil origin influence fungal and bacterial assemblages in the roots of woody plants. *Mol Ecol* **23**: 3356–3370.

Borgmann-Winter, B.W., Stephens, R.B., Anthony, M.A., Frey, S.D., D'Amato, A.W., and Rowe, R.J. Wind and small mammals are complementary fungal dispersers. *Ecology* **n/a**: e4039.

Brigham, L.M., Bueno de Mesquita, C.P., Spasojevic, M.J., Farrer, E.C., Porazinska, D.L., Smith, J.G., *et al*. (2023) Drivers of bacterial and fungal root endophyte communities: understanding the relative influence of host plant, environment, and space. *FEMS Microbiol Ecol* **99**: fiad034.

Bright, M. and Bulgheresi, S. (2010) A complex journey: transmission of microbial symbionts. *Nat Rev Microbiol* **8**: 218–230.

Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., van Themaat, E.V.L., and Schulze-Lefert, P. (2013) Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants. *Annu Rev Plant Biol* **64**: 807–838.

Cai, L., Kreft, H., Taylor, A., Denelle, P., Schrader, J., Essl, F., *et al*. (2023) Global models and predictions of plant diversity based on advanced machine learning techniques. *New Phytol* **237**: 1432–1445.

Cavazos, B.R., Bohner, T.F., Donald, M.L., Sneck, M.E., Shadow, A., Omacini, M., *et al*. (2018) Testing the roles of vertical transmission and drought stress in the prevalence of heritable fungal endophytes in annual grass populations. *New Phytol* **219**: 1075–1084.

Christian, N., Herre, E.A., Mejia, L.C., and Clay, K. (2017) Exposure to the leaf litter microbiome of healthy adults protects seedlings from pathogen damage. *Proc R Soc B Biol Sci* **284**: 20170641.

Csardi, G. and Nepusz, T. (2006) The igraph software package for complex network research. *InterJournal Complex Syst* **1695**: 1–9.

Daguerre, Y., Basso, V., Hartmann-Wittulski, S., Schellenberger, R., Meyer, L., Bailly, J., *et al*. (2020) The mutualism effector MiSSP7 of Laccaria bicolor alters the interactions between the poplar JAZ6 protein and its associated proteins. *Sci Rep* **10**: 20362.

Dang, H.X., Pryor, B., Peever, T., and Lawrence, C.B. (2015) The Alternaria genomes database: a comprehensive resource for a fungal genus comprised of saprophytes, plant pathogens, and allergenic species. *BMC Genomics* **16**: 239.

Dastogeer, K.M.G., Zahan, M.I., Tahjib-Ul-Arif, Md., Akter, M.A., and Okazaki, S. (2020) Plant Salinity Tolerance Conferred by Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Associated Mechanisms: A Meta-Analysis. *Front Plant Sci* **11**:.

Debray, R., Herbert, R.A., Jaffe, A.L., Crits-Christoph, A., Power, M.E., and Koskella, B. (2022) Priority

effects in microbiome assembly. *Nat Rev Microbiol* **20**: 109–121.

Douglas, A.E. and Werren, J.H. (2016) Holes in the Hologenome: Why Host-Microbe Symbioses Are Not Holobionts. *mBio* **7**: e02099-15.

Gao, C., Montoya, L., Xu, L., Madera, M., Hollingsworth, J., Purdom, E., *et al*. (2020) Fungal community assembly in drought-stressed sorghum shows stochasticity, selection, and universal ecological dynamics. *Nat Commun* **11**: 34.

Gao, C., Montoya, L., Xu, L., Madera, M., Hollingsworth, J., Purdom, E., *et al*. (2019) Strong succession in arbuscular mycorrhizal fungal communities. *ISME J* **13**: 214–226.

Gloor, G.B., Macklaim, J.M., Pawlowsky-Glahn, V., and Egozcue, J.J. (2017) Microbiome Datasets Are Compositional: And This Is Not Optional. *Front Microbiol* **8**:.

Gonzalez Mateu, M., Baldwin, A.H., Maul, J.E., and Yarwood, S.A. (2020) Dark septate endophyte improves salt tolerance of native and invasive lineages of Phragmites australis. *ISME J* **14**: 1943–1954.

González-Teuber, M. (2016) The defensive role of foliar endophytic fungi for a South American tree. *AoB PLANTS* **8**: plw050.

de Graaff, M.-A., Throop, H.L., Verburg, P.S.J., Arnone, J.A., and Campos, X. (2014) A Synthesis of Climate and Vegetation Cover Effects on Biogeochemical Cycling in Shrub-Dominated Drylands. *Ecosystems* **17**: 931–945.

Gundel, P.E., Rudgers, J.A., and Ghersa, C.M. (2011) Incorporating the process of vertical transmission into understanding of host–symbiont dynamics. *Oikos* **120**: 1121–1128.

Gupta, S., Schillaci, M., Walker, R., Smith, P.M.C., Watt, M., and Roessner, U. (2021) Alleviation of salinity stress in plants by endophytic plant-fungal symbiosis: Current knowledge, perspectives and future directions. *Plant Soil* **461**: 219–244.

Han, L.-L., Wang, J.-T., Yang, S.-H., Chen, W.-F., Zhang, L.-M., and He, J.-Z. (2017) Temporal dynamics of fungal communities in soybean rhizosphere. *J Soils Sediments* **17**: 491–498.

Hardoim, P.R., Hardoim, C.C.P., Overbeek, L.S. van, and Elsas, J.D. van (2012) Dynamics of Seed-Borne Rice Endophytes on Early Plant Growth Stages. *PLOS ONE* **7**: e30438.

Harrison, J.G. and Griffin, E.A. (2020) The diversity and distribution of endophytes across biomes, plant phylogeny and host tissues: how far have we come and where do we go from here? *Environ Microbiol* **22**: 2107–2123.

van der Heijden, M.G.A., Martin, F.M., Selosse, M.-A., and Sanders, I.R. (2015) Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytol* **205**: 1406–1423.

Hosseyni Moghaddam, M.S., Safaie, N., Soltani, J., and Hagh-Doust, N. (2021) Desert-adapted fungal endophytes induce salinity and drought stress resistance in model crops. *Plant Physiol Biochem* **160**: 225–238.

Houlden, A., Timms-Wilson, T.M., Day, M.J., and Bailey, M.J. (2008) Influence of plant developmental stage on microbial community structure and activity in the rhizosphere of three field crops. *FEMS Microbiol Ecol* **65**: 193–201.

Hunter, G.C., Crous, P.W., Carnegie, A.J., Burgess, T.I., and Wingfield, M.J. (2011) Mycosphaerella and Teratosphaeria diseases of Eucalyptus; easily confused and with serious consequences. *Fungal Divers* **50**: 145–166.

Intergovernmental Panel on Climate Change ed. (2022) Desertification. In *Climate Change and Land: IPCC Special Report on Climate Change, Desertification, Land Degradation, Sustainable Land Management, Food Security, and Greenhouse Gas Fluxes in Terrestrial Ecosystems*. Cambridge: Cambridge University Press, pp. 249–344.

Kaneko, R., Kakishima, M., and Tokumasu, S. (2003) The seasonal occurrence of endophytic fungus, Mycosphaerella buna, in Japanese beech, Fagus crenata. *Mycoscience* **44**: 277–281.

Klaedtke, S., Jacques, M.-A., Raggi, L., Préveaux, A., Bonneau, S., Negri, V., *et al*. (2016) Terroir is a

key driver of seed-associated microbial assemblages. *Environ Microbiol* **18**: 1792–1804.

Legendre, P. and Gallagher, E.D. (2001) Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. *Oecologia* **129**: 271–280.

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

Liu, D. and Howell, K. (2021) Community succession of the grapevine fungal microbiome in the annual growth cycle. *Environ Microbiol* **23**: 1842–1857.

Lundberg, D.S., Lebeis, S.L., Paredes, S.H., Yourstone, S., Gehring, J., Malfatti, S., *et al*. (2012) Defining the core Arabidopsis thaliana root microbiome. *Nature* **488**: 86–90.

Maignien, L., DeForce, E.A., Chafee, M.E., Eren, A.M., and Simmons, S.L. (2014) Ecological Succession and Stochastic Variation in the Assembly of Arabidopsis thaliana Phyllosphere Communities. *mBio* **5**: e00682-13.

Maldonado, J.E., Gaete, A., Mandakovic, D., Aguado-Norese, C., Aguilar, M., Gutiérrez, R.A., and González, M. (2022) Partners to survive: Hoffmannseggia doellii root-associated microbiome at the Atacama Desert. *New Phytol* **234**: 2126–2139.

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

Martins, F., Pereira, J.A., Bota, P., Bento, A., and Baptista, P. (2016) Fungal endophyte communities in above- and belowground olive tree organs and the effect of season and geographic location on their structures. *Fungal Ecol* **20**: 193–201.

Maurice, K., Bourceret, A., Youssef, S., Boivin, S., Laurent-Webb, L., Damasion, C., *et al*. (2023) Anthropic disturbances impact the soil microbial network structure and stability to a greater extent than natural disturbances in an arid ecosystem.

Maurice, K., Laurent-Webb, L., Dehail, A., Bourceret, A., Boivin, S., Boukcim, H., *et al*. (2023a) Fertility Islands, Keys to the Establishment of Plant and Microbial Diversity in a Highly Alkaline Hot Desert.

Maurice, K., Laurent-Webb, L., Dehail, A., Bourceret, A., Boivin, S., Boukcim, H., *et al*. (2023b) Fertility islands, keys to the establishment of plant and microbial diversity in a highly alkaline hot desert. *J Arid Environ* **219**: 105074.

Mazel, F., Davis, K.M., Loudon, A., Kwong, W.K., Groussin, M., and Parfrey, L.W. (2018) Is Host Filtering the Main Driver of Phylosymbiosis across the Tree of Life? *mSystems* **3**: e00097-18.

McKnight, D.T., Huerlimann, R., Bower, D.S., Schwarzkopf, L., Alford, R.A., and Zenger, K.R. (2019) Methods for normalizing microbiome data: An ecological perspective. *Methods Ecol Evol* **10**: 389–400.

McMurdie, P.J. and Holmes, S. (2013) phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLOS ONE* **8**: e61217.

Moroenyane, I., Tremblay, J., and Yergeau, É. (2021) Soybean Microbiome Recovery After Disruption is Modulated by the Seed and Not the Soil Microbiome. *Phytobiomes J* **5**: 418–431.

Murali, M. and Amruthesh, K.N. (2015) Plant Growth-promoting Fungus Penicillium oxalicum Enhances Plant Growth and Induces Resistance in Pearl Millet Against Downy Mildew Disease. *J Phytopathol* **163**: 743–754.

Nelson, E.B. (2018) The seed microbiome: Origins, interactions, and impacts. *Plant Soil* **422**: 7–34.

Nguyen, N.H., Song, Z., Bates, S.T., Branco, S., Tedersoo, L., Menke, J., *et al*. (2016) FUNGuild: An open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild. *Fungal Ecol* **20**: 241–248.

Nilsson, R.H., Larsson, K.-H., Taylor, A.F.S., Bengtsson-Palme, J., Jeppesen, T.S., Schigel, D., *et al*. (2019) The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and

parallel taxonomic classifications. *Nucleic Acids Res* **47**: D259–D264.

Ochoa-Hueso, R., Eldridge, D.J., Delgado-Baquerizo, M., Soliveres, S., Bowker, M.A., Gross, N., *et al*. (2018) Soil fungal abundance and plant functional traits drive fertile island formation in global drylands. *J Ecol* **106**: 242–253.

Oksanen, J., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P.R., O'hara, R.B., *et al*. (2013) Package 'vegan.' *Community Ecol Package Version* **2**: 1–295.

Op De Beeck, M., Lievens, B., Busschaert, P., Declerck, S., Vangronsveld, J., and Colpaert, J.V. (2014) Comparison and Validation of Some ITS Primer Pairs Useful for Fungal Metabarcoding Studies. *PLoS ONE* **9**: e97629.

Perez-Lamarque, B., Krehenwinkel, H., Gillespie, R.G., and Morlon, H. (2022) Limited Evidence for Microbial Transmission in the Phylosymbiosis between Hawaiian Spiders and Their Microbiota. *mSystems* **7**: e01104-21.

Perez-Lamarque, B., Laurent-Webb, L., Bourceret, A., Maillet, L., Bik, F., Cartier, D., *et al*. (2023) Fungal microbiomes associated with Lycopodiaceae during ecological succession. *Environ Microbiol Rep* **15**: 109–118.

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

Perez-Lamarque, B., Selosse, M.-A., Öpik, M., Morlon, H., and Martos, F. (2020) Cheating in arbuscular mycorrhizal mutualism: a network and phylogenetic analysis of mycoheterotrophy. *New Phytol* **226**: 1822–1835.

Prăvălie, R. (2016) Drylands extent and environmental issues. A global approach. *Earth-Sci Rev* **161**: 259–278.

R Core Team (2023) R: A Language and Environment for Statistical Computing, Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.

Rathore, V.S., Singh, J.P., Bhardwaj, S., Nathawat, N.S., Kumar, M., and Roy, M.M. (2015) Potential of Native Shrubs Haloxylon salicornicum and Calligonum Polygonoides for Restoration of Degraded Lands in Arid Western Rajasthan, India. *Environ Manage* **55**: 205–216.

Rezki, S., Campion, C., Simoneau, P., Jacques, M.-A., Shade, A., and Barret, M. (2018) Assembly of seed-associated microbial communities within and across successive plant generations. *Plant Soil* **422**: 67–79.

Ridout, M.E., Schroeder, K.L., Hunter, S.S., Styer, J., and Newcombe, G. (2019) Priority effects of wheat seed endophytes on a rhizosphere symbiosis. *Symbiosis* **78**: 19–31.

Rochefort, A., Simonin, M., Marais, C., Guillerm-Erckelboudt, A.-Y., Barret, M., and Sarniguet, A. (2021) Transmission of Seed and Soil Microbiota to Seedling. *mSystems* **6**: e00446-21.

Rodríguez, C.E., Antonielli, L., Mitter, B., Trognitz, F., and Sessitsch, A. (2020) Heritability and Functional Importance of the Setaria viridis Bacterial Seed Microbiome. *Phytobiomes J* **4**: 40–52.

Rodriguez Estrada, A.E., Jonkers, W., Corby Kistler, H., and May, G. (2012) Interactions between Fusarium verticillioides, Ustilago maydis, and Zea mays: An endophyte, a pathogen, and their shared plant host. *Fungal Genet Biol* **49**: 578–587.

Rodriguez, R.J., Jr, J.F.W., Arnold, A.E., and Redman, R.S. (2009) Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytol* **182**: 314–330.

Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., and Mahé, F. (2016) VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* **4**: e2584.

Schlesinger, W.H. and Pilmanis, A.M. (1998) Plant-soil Interactions in Deserts. *Biogeochemistry* **42**: 169–187.

Schneider-Maunoury, L., Deveau, A., Moreno, M., Todesco, F., Belmondo, S., Murat, C., *et al*. (2020)

Two ectomycorrhizal truffles, *Tuber melanosporum* and *T. aestivum* , endophytically colonise roots of non-ectomycorrhizal plants in natural environments. *New Phytol* **225**: 2542–2556.

Selosse, M.-A., Baudoin, E., and Vandenkoornhuyse, P. (2004) Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants. *C R Biol* **327**: 639–648.

Selosse, M.-A., Bessis, A., and Pozo, M.J. (2014) Microbial priming of plant and animal immunity: symbionts as developmental signals. *Trends Microbiol* **22**: 607–613.

Séne, S., Selosse, M.-A., Forget, M., Lambourdière, J., Cissé, K., Diédhiou, A.G., *et al*. (2018) A pantropically introduced tree is followed by specific ectomycorrhizal symbionts due to pseudo-vertical transmission. *ISME J* **12**: 1806–1816.

Shade, A., Jacques, M.-A., and Barret, M. (2017) Ecological patterns of seed microbiome diversity, transmission, and assembly. *Curr Opin Microbiol* **37**: 15–22.

Shenhav, L., Thompson, M., Joseph, T.A., Briscoe, L., Furman, O., Bogumil, D., *et al*. (2019) FEAST: fast expectation-maximization for microbial source tracking. *Nat Methods* **16**: 627–632.

Simonin, M., Briand, M., Chesneau, G., Rochefort, A., Marais, C., Sarniguet, A., and Barret, M. (2022) Seed microbiota revealed by a large-scale meta-analysis including 50 plant species. *New Phytol* **234**: 1448–1463.

Singh, J.P., Rathore, V.S., and Roy, M.M. (2015) Notes about Haloxylon salicornicum (Moq.) Bunge ex Boiss., a promising shrub for arid regions. *Genet Resour Crop Evol* **62**: 451–463.

Smith, S.E. and Read, D.J. (2009) Mycorrhizal symbiosis, 3. ed., Repr. Amsterdam: Elsevier/Acad. Press.

Sterflinger, K., Tesei, D., and Zakharova, K. (2012) Fungi in hot and cold deserts with particular reference to microcolonial fungi. *Fungal Ecol* **5**: 453–462.

Susana Rivera, C., Eugenia Venturini, M., Oria, R., and Blanco, D. (2011) Selection of a decontamination treatment for fresh Tuber aestivum and Tuber melanosporum truffles packaged in modified atmospheres. *FOOD CONTROL* **22**: 626–632.

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

Tedersoo, L., Bahram, M., Zinger, L., Nilsson, R.H., Kennedy, P.G., Yang, T., *et al*. (2022) Best practices in metabarcoding of fungi: From experimental design to results. *Mol Ecol* **31**: 2769–2795.

Trivedi, P., Leach, J.E., Tringe, S.G., Sa, T., and Singh, B.K. (2020) Plant–microbiome interactions: from community assembly to plant health. *Nat Rev Microbiol* **18**: 607–621.

Truyens, S., Weyens, N., Cuypers, A., and Vangronsveld, J. (2015) Bacterial seed endophytes: genera, vertical transmission and interaction with plants. *Environ Microbiol Rep* **7**: 40–50.

Vandenkoornhuyse, P., Quaiser, A., Duhamel, M., Van, A.L., and Dufresne, A. (2015) The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytol* **206**: 1196–1206.

Vannier, N., Mony, C., Bittebiere, A.-K., Michon-Coudouel, S., Biget, M., and Vandenkoornhuyse, P. (2018) A microorganisms' journey between plant generations. *Microbiome* **6**: 79.

Wachowska, U. and Głowacka, K. (2014) Antagonistic interactions between Aureobasidium pullulans and Fusarium culmorum, a fungal pathogen of winter wheat. *BioControl* **59**: 635–645.

Walsh, C.M., Becker-Uncapher, I., Carlson, M., and Fierer, N. (2021) Variable influences of soil and seed-associated bacterial communities on the assembly of seedling microbiomes. *ISME J* **15**: 2748–2762.

Wearn, J.A., Sutton, B.C., Morley, N.J., and Gange, A.C. (2012) Species and organ specificity of fungal endophytes in herbaceous grassland plants. *J Ecol* **100**: 1085–1092.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. (1990) AMPLIFICATION AND DIRECT SEQUENCING OF FUNGAL RIBOSOMAL RNA GENES FOR PHYLOGENETICS. In *PCR Protocols*. Elsevier, pp. 315–322.

Wilkinson, D.M. (1997) The Role of Seed Dispersal in the Evolution of Mycorrhizae. *Oikos* **78**: 394–

396.

Wilson, D. (1995) Endophyte: The Evolution of a Term, and Clarification of Its Use and Definition. *Oikos* **73**: 274.

Wolf, D.C., Dao, T.H., Scott, H.D., and Lavy, T.L. (1989) Influence of Sterilization Methods on Selected Soil Microbiological, Physical, and Chemical Properties. *J Environ Qual* **18**: 39–44.

Xiong, C., Zhu, Y.-G., Wang, J.-T., Singh, B., Han, L.-L., Shen, J.-P., *et al*. (2021) Host selection shapes crop microbiome assembly and network complexity. *New Phytol* **229**: 1091–1104.

Yakti, W., Kovács, G.M., Vági, P., and Franken, P. (2018) Impact of dark septate endophytes on tomato growth and nutrient uptake. *Plant Ecol Divers* **11**: 637–648.

Zhou, S.-Y.-D., Li, H., Giles, M., Neilson, R., Yang, X., and Su, J. (2021) Microbial Flow Within an Air-Phyllosphere-Soil Continuum. *Front Microbiol* **11**:.

Chapitre III - Ectomycorhizes et endophytisme : une double niche écologique négligée.

Si nous pouvons supposer que l'influence des individus de plantes voisines sur l'assemblage du mycobiote est faible en milieu désertique du fait de la distribution en îlots de fertilité, il en va différemment au sein de communautés végétales plus denses et complexes comme en milieux tempérés. Les plantes voisines semblent en effet avoir une influence significative sur l'assemblage du mycobiote, en particulier racinaire comme cela a pu être démontré en mésocosme (Mony *et al.*, 2021 ; Hu *et al.*, 2022, 2023). Il est de plus fréquent d'observer *in situ* un certain niveau de partage du mycobiote racinaire entre individus spatialement proches au sein d'une même communauté végétale (*e.g.*, Diédhiou *et al.*, 2010 ; Toju *et al.*, 2013 ; Hewitt *et al.*, 2017 ; Yung *et al.*, 2021 ; Petrolli *et al.*, 2022 ; Perez-Lamarque *et al.*, 2022). Différents individus (conspécifiques ou non) proches spatialement peuvent être colonisés par des mêmes espèces de champignons (Diédhiou *et al.*, 2010 ; Toju *et al.*, 2013 ; Hewitt *et al.*, 2017 ; Yung *et al.*, 2021 ; Petrolli *et al.*, 2022 ; Perez-Lamarque *et al.*, 2022), voire par des mêmes haplotypes fongiques (Beiler *et al*., 2012). Cette connexion physique par des champignons du sol permet dans certains cas un transfert de nutriments entre plantes *via* le mycélium (*Common Mycorrhizal Network* ; dont nous discuterons partie **V.3.1.2**). L'ensemble de ces résultats suggère donc que la composition des communautés végétales a un effet significatif sur l'assemblage du mycobiote.

Étudier le mycobiote racinaire de plantes voisines a également permis de mettre en évidence des écologies inhabituelles chez certains champignons. C'est le cas par exemple chez certaines espèces de genre *Tuber* (Ascomycota), des champignons ectomycorhiziens également détectés dans les racines de plantes non-ectomycorhiziennes. *Tuber aestivum* a par exemple été détecté en quantité importante dans les racines de plantes herbacées autour d'arbres producteurs de truffes en milieu naturel (PCR quantitative ; Gryndler *et al.*, 2014). Schneider-Maunoury *et al.* (2018, 2020) ont également mis en évidence, en couplant plusieurs approches moléculaires et microscopiques, que *Tuber melanosporum* pouvait coloniser les racines de plantes non-ectomycorhiziennes et que le champignon présentait une activité métabolique. Cette capacité à coloniser plusieurs niches écologiques a été démontrée chez d'autres champignons ectomycorhiziens (**I.3.4.1**) et est à l'origine de l'hypothèse de la « salle d'attente » : l'endophytisme aurait permis la transition entre le mode de vie libre des champignons saprotrophes et la symbiose ectomycorhizienne. L'endophytisme observé chez certains champignons ectomycorhiziens

serait ainsi un trait conservé, témoin de cette trajectoire évolutive (Selosse *et al*., 2009, 2018). Si des résultats récents viennent étayer cette hypothèse (Schneider-Maunoury *et al.*, 2018, 2020 ; Yung *et al.*, 2021), les preuves d'endophytisme par des champignons ectomycorhiziens sont encore rares.

L'article présenté dans ce chapitre s'inscrit dans la continuité des travaux de thèse de Laure Schneider-Maunoury qui a couplé des méthodes moléculaires et microscopiques pour confirmer l'endophytisme chez *Tuber melanosporum*. Des travaux préliminaires réalisés au cours de sa thèse ont également permis d'émettre l'hypothèse que les champignons du genre *Russula* (Basidiomycota), des champignons ectomycorhiziens communs en milieux tempérés (Looney *et al.*, 2018 ; Buyck *et al.*, 2018), sont également capables de coloniser en tant qu'endophyte les racines de plantes non-ectomycorhiziennes (Schneider-Maunoury, 2019). Ici (**Article III**), nous avons (i) évalué l'ubiquité de la double niche écologique ectomycorhize/endophytisme en décrivant le mycobiote racinaire de plantes non-ectomycorhiziennes prélevées dans plusieurs sites en France, (ii) caractérisé le filtre racinaire dans la colonisation endophyte des champignons ectomycorhiziens en comparant le mycobiote rhizosphérique et racinaire de plusieurs espèces d'herbacées non-ectomycorhiziennes et (iii) combiné des approches de séquençage (*metabarcoding*) et d'hybridation *in situ* à fluorescence (FISH) + microscopie confocale pour évaluer l'endophytisme des champignons ectomycorhiziens du genre *Russula*. Ce travail a permis de mettre en évidence que :

(i) La colonisation endophyte par des champignons ectomycorhiziens est couramment détectée mais présente une forte variabilité entre sites et plus encore entre espèces de plantes étudiées, suggérant un potentiel filtre par la plante. De plus, la proximité avec des arbres ectomycorhiziens semble favoriser la colonisation endophyte.

(ii) Les racines de plantes non-ectomycorhiziennes présentent une faible proportion de champignons ectomycorhiziens en comparaison du sol rhizosphérique, mais de composition similaire, suggérant une faible capacité de colonisation des champignons et un filtre racinaire faible.

(iii) Finalement, nous avons confirmé l'endophytisme au sein du genre *Russula* dans des sites présentant une forte concentration de carpophores appartenant aux espèces *Russula delica* et *R. maculata*.

Ces résultats confirment à nouveau que l'endophytisme est une niche secondaire potentielle pour les champignons ectomycorhiziens et viennent ainsi étayer l'hypothèse de la « salle d'attente ». Nous avons également montré que les réseaux bipartites d'interactions entre

champignons ectomycorhiziens et plantes non-ectomycorhiziennes sont fortement modulaires et spécialisés, même à l'échelle du site, une structure pouvant être liée à une adaptation unilatérale d'un des groupes de partenaires, ou à des processus de coévolution entre plantes non-ectomycorhziennes et champignons ectomycrhiziens (Dormann *et al*., 2017).

Mentionnons ici également ma contribution à une revue bibliographique réalisée au sein de l'équipe INEVEF (équipe d'accueil) qui explore l'hypothèse de la « salle d'attente » chez les Orchidées (Selosse *et al.*, 2021, co-auteur).

Article III – Endophytic and ectomycorrhizal, an overlooked dual ecological niche? Insights from natural environments and *Russula* species.

Auteurs :

Liam Laurent-Webb[1], Philippe Rech[1], Amélia Bourceret[1], Chloé Chaumeton[2], Aurélie Deveau[3], Laurent Genola[4], Mélanie Januario[1], Rémi Petrolli[1], Marc-André Selosse[1,5,6]

[1] Institut de Systématique, Évolution, Biodiversité (ISYEB), Muséum national d'Histoire naturelle, CNRS, Sorbonne Université, EPHE, UA, 57 rue Cuvier, 75005 Paris, France.

[2] Sorbonne Université, Institute of Biology Paris-Seine, Paris 75005, France.

[3] UMR IAM, Université de Lorraine, INRAE, 54280, Champenoux, France.

[4] Station Trufficole du Montant, EPLEFPA Cahors-LeMontat, 422 Lacoste, 46090, Le Montat.

[5] Faculty of Biology, University of Gdansk, ul. Wita Stwosza 59, 80-308 Gdansk, Poland.

[6] Institut Universitaire de France.

*** Corresponding authors:**
Liam LAURENT-WEBB (liam.laurent@cirad.fr; ORCID: 0000-0003-1156-6432)
Marc-André SELOSSE (ma.selosse@wanadoo.fr; ORCID: 0000-0003-3471-9067)

Résumé/abstract :

Les champignons ectomycorhiziens jouent un rôle clé dans les écosystèmes tempérés. Des découvertes récentes suggèrent qu'ils peuvent également coloniser de manière endophyte les racines de plantes non-ectomycorhiziennes. Ici, nous cherchons à (i) démontrer davantage la colonisation d'hôtes non-ectomycorhiziens par des champignons ectomycorhiziens, (ii) explorer les facteurs conduisant à cette colonisation, et (iii) fournir des preuves microscopiques directes de l'endophytisme. En utilisant le *metabarcoding* (ITS2), nous avons décrit les

communautés fongiques racinaires de 42 espèces végétales sur neuf sites en France. Dans deux de ces sites, nous avons comparé les communautés fongiques de la rhizosphère et des racines afin d'identifier un potentiel filtre racinaire. Enfin, nous avons étudié l'endophytisme chez *Russula* spp. en utilisant l'hybridation *in situ* par fluorescence couplée à la microscopie confocale. Nous avons trouvé une proportion importante mais variable de séquences de champignons ectomycorhiziens dans les racines d'espèces de plantes non-ectomycorhiziennes, en particulier à proximité d'hôtes ectomycorhiziens et nous avons détecté un faible filtre racinaire pour les champignons ectomycorhiziens. En outre, nous avons observé des hyphes métaboliquement actifs de *Russula* spp. colonisant de manière endophyte les racines de plantes non-ectomycorhiziennes. Nos résultats démontrent une fois de plus la double niche écologique ectomycorhizienne/endophyte, en particulier chez *Russula* spp. Les conséquences écologiques de cette dualité doivent encore être explorées. La capacité à coloniser deux niches écologiques peut être un trait conservé par les champignons ectomycorhiziens qui ont évolué à partir des champignons endophytes, comme le stipule l'hypothèse de la "salle d'attente".

Ectomycorrhizal fungi play key roles in temperate ecosystems. Recent findings suggest that they can endophytically colonize the roots of non-ectomycorrhizal plants. Here, we aim at (i) further demonstrating the colonization of non-ectomycorrhizal hosts by ectomycorrhizal fungi, (ii) exploring factors driving this colonization, and (iii) providing direct microscopical evidence for endophytism. Using metabarcoding (ITS2), we described the root fungal communities of 42 plant species at nine locations in France. In two sites, we compared rhizosphere and root fungal communities to identify a potential root filter. Finally, we investigated endophytism in Russula spp. using fluorescence in situ hybridization paired with confocal microscopy. We found a large but variable share of ectomycorrhizal fungi sequences in roots of non-ectomycorrhizal plant species, in particular nearby ectomycorrhizal hosts, and detected a poor root filter for ectomycorrhizal fungi. Furthermore, we observed metabolically active hyphae of Russula spp. endophytically colonizing the roots of non-ectomycorrhizal plant species. Our results further demonstrate the dual ectomycorrhizal/endophytic ecological niche, in particular for Russula spp. The ecological consequences of this duality still need to be addressed. The ability to colonize two ecological niches may be a trait kept by ectomycorrhizal fungi which evolved from endophytic fungi, as stipulated by the “waiting room hypothesis”.

Key words: ectomycorrhiza, endophytism, *Russula*, metabarcoding, FISH microscopy.

Most plant species form root mutualistic associations with soil fungi, the mycorrhizas (van der Heijden *et al.*, 2015), where water and nutrient foraged in soil by fungi are exchanged for plant photosynthates (Smith and Read, 2009). Ectomycorrhizal (EcM) fungi form a hyper-diverse, polyphyletic group of great importance especially for trees in temperate forest ecosystems (Tedersoo & Brundrett, 2017). Beyond mycorrhizal fungi, roots are also loosely colonized by various biotrophic fungi, which, unlike mycorrhizas, do not form a well-structured and elaborated interface of exchanges. These so-called endophytes range from latent pathogens to true mutualists (Wilson, 1995; Rodriguez *et al.*, 2009).

There is scattered, but increasing evidence that some EcM fungi colonize endophytically the roots of non-ECM plant species (*i.e.*, which are either non-mycorrhizal or mycorrhizal with arbuscular mycorrhizal fungi). For instance, EcM Sebacinaceae species are common plant endophytes (Selosse *et al*., 2009; Weiß *et al*., 2016), EcM *Tricholoma matsutake* endophytically colonize roots of non-EcM plants *in vitro* (Murata *et al*., 2013, 2014), and EcM *Inocybe* spp. can abound in roots of nettle (*Urtica dioica*) growing under poplar trees (Yung *et al.*, 2021). Barcoding, gene expression and FISH microscopical analyses support endophytic growth of truffles in non-EcM plants (*Tuber* spp.; Schneider-Maunoury *et al.*, 2018; 2020), perhaps with slightly deleterious effects on these host (Taschen *et al.*, 2020). Finally, many EcM species are phylogenetically intermingled with endophytic species, *e.g.* in the Trechisporales (Vanegas-León *et al*., 2019), Helotiales (Wang *et al*., 2006), Pyronemataceae (Hansen *et al*., 2013; Hughes *et al*., 2020), Hygrophoraceae (Halbwachs *et al*., 2018) or Hymenochaetales (Korotkin *et al*., 2018). Here, we aim at (i) providing new evidence of colonization of non-EcM host by EcM fungi, (ii) exploring factors driving the colonization of non-EcM plants by EcM fungi (plant identity, site, root filter), and (iii) providing direct microscopical evidences for endophytism.

Detection of EcM fungi in roots of non-EcM plants.

We harvested healthy roots from non-EcM plants in France at four locations distant from 20 to 450 km (three forest sites and one meadow) and five neighboring sites distant from 10 to 800 m (two forest sites, one close meadow and two intermediate edge sites, near Gaillac city; Fig. S1 and Methods S1). From these nine sites, we barcoded the root mycobiota of 433 non-EcM plant individuals belonging to 42 species (557 root samples; Fig. S2; Table S1; see molecular methods in Methods S2). We detected molecular barcodes of EcM fungi in roots of non-EcM plants (Fig. 1) in 69% of investigated plant individuals, in which > 1% of reads

belonged to EcM fungi. They accounted for 2.1 to 35% of the reads in forest/edges sites *versus* 0.37 to 1.1% in meadows, suggesting that the presence of EcM plant host favored the settlement or the competitivity of EcM fungi in adjacent non-EcM hosts. EcM fungal community composition varied significantly between sites (Table S3; see Methods S3 for statistical methods), even at meter scale (*e.g.*, MF1 and F4 sites separated by 10 meters; Fig. 1b). Such spatial turnover was often reported for EcM fungi colonizing EcM hosts (*e.g.*, Richard *et al.*, 2005). In particular, Fabaceae and Cyperaceae were abundantly colonized in edges and forest sites but not in meadows (Fig. S3b), suggesting again that the presence of EcM hosts enhances their colonization.

The abundance of EcM fungi varied between families, with no clear taxonomic signal, and none of them was completely devoid of EcM fungi (Fig. 1c; Fig. S3). EcM community composition displayed significant differences between plant families: depending on the statistical method used, 12%-13% of the variability was explained by plant families in Gaillac sites, and 34-36% in other sites across France (Table S2). Therefore, the ability to host EcM fungi may not be equally distributed among plants, deserving further study. We noted that the two forest edges (MF1 and MF2) sites in Gaillac displayed a high abundance of *Russula* spp. (Fig. S4), respectively accounting for 59 and 50 % of EcM reads in these sites, and contrasting with the forest sites where *Sebacina* are overrepresented. This parallels the fact that the forest edges sites displayed abundant *Russula maculata* and *R. delica* fruitbodies (our personal observations).

The bipartite networks of interactions between non-EcM plants and EcM fungi (either in Gaillac sites, or across France, Fig. 1c and Fig. S5 respectively) harbor similar characteristics in comparison to available knowledge on true EcM interactions (van der Heijden *et al*., 2015). Indeed, the Gaillac network (local scale) was moderately modular (Q=0.33) and specialized (H_2'=0.53; Table S3; see Methods S3.3 for null models) compared to the network of sites across France (regional scale) which was highly modular (Q=0.59) and specialized (H_2'=0.81). Patterns of nestedness were contrasted: the network of sites across France was significantly anti-nested while the Gaillac one was significantly nested (Table S3). Nestedness in bipartite networks analysis is thought to be characteristic of mutualistic interactions (Bascompte *et al*., 2003), but recent approaches showed that it is a poor predictor of mutualism (Pichon *et al.*, 2023; see Discussion S1). Thus, EcM fungi are ubiquist in non-EcM plants but display high levels of network modularity and specialization, two correlated network properties (Dormann & Strauss, 2014) which may result from one-sided or reciprocal adaptation between EcM fungi and non-EcM plants (Dormann *et al.*, 2017; see Discussion S1).

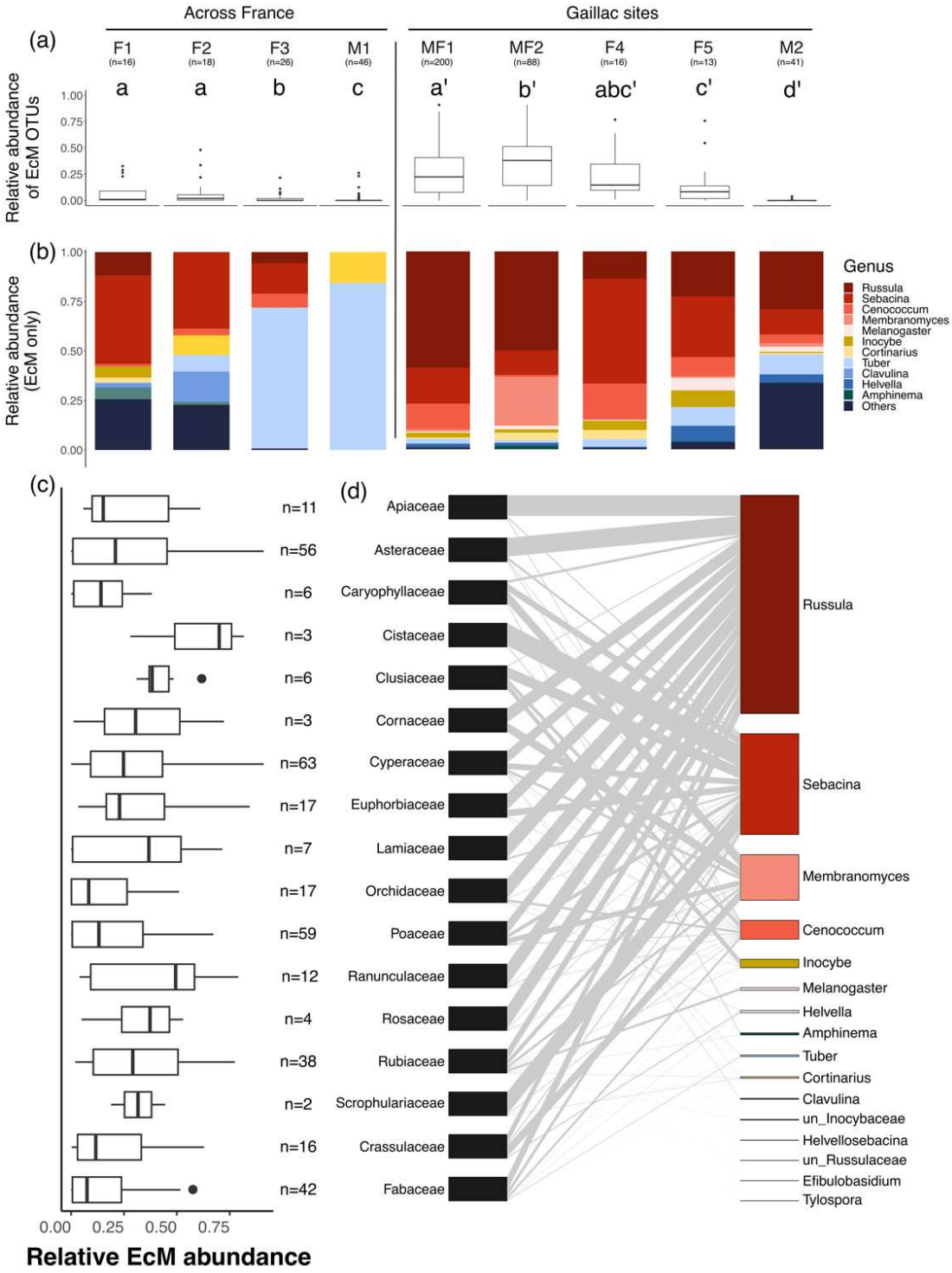


Figure 1: Ectomycorrhizal fungi are found as endophytes in roots of non-EcM plants across sites and plant families. (a) Relative abundance (proportion of reads) of EcM fungi in the total fungal community. Different letters indicate significant differences (pairwise Wilcoxson test, $p<0.05$) between sites across France or between Gaillac sites, separately. Tests were performed separately for sites across France and Gaillac sites. **(b)** Composition of the EcM community in roots of non-EcM plants at the genus level in the 9 sites. **(c)** Relative abundance of EcM fungi per plant family at Gaillac sites. The number of samples considered for each family is indicated at the right of each boxplot. **(d)** Bipartite network of interactions between plant families and EcM genera at Gaillac sites.

Non-EcM roots poorly filter EcM fungi.

In two forest sites (F1 and F2), rhizospheric soils paired with previously described non-EcM roots of seven species were additionally collected and barcoded (Fig. S6a). EcM reads were 3 to 135 times more abundant in rhizosphere than in the roots (Fig. 2a), suggesting that rhizosphere is a more propitious niche than roots for EcM fungi. The percentage of EcM OTUs simultaneously found in both roots and rhizosphere varied across plant species (26%-65% of OTUs, which represented 66%-99% of the total EcM reads Table S4). On the contrary, rhizospheric EcM OTUs undetected in roots (25-73% of OTUs) were lower in abundance (<1 to 34% of EcM reads; Table S4). The EcM diversity in roots and rhizosphere was not significantly different (Fig. S6b). While the EcM fungal community composition did not differ significantly between roots and rhizosphere (Fig. 2c; Table S6), the whole community of fungi, whatever their ecology, significantly differed between the two compartments (*PERMANOVA*; $p<10^{-4}$ Fig. 2b; Table S6), as often reported due to root filtering (Bourceret *et al*., 2022; Gottel *et al*., 2011; Maciá-Vicente *et al*., 2020). The filtering of EcM fungi is thus lower than that of the total fungal community, which is a strong biological signal that non-EcM plants poorly filter EcM fungi.

Though total root and rhizosphere EcM communities are not significantly different, some EcM genera are significantly differentially abundant in the two compartments (Fig. S7). *Cenococcum*, *Lactarius* and unidentified Cortinariaceae are more abundant in roots while some genera are more abundant in the rhizosphere (*e.g.*, *Inocybe*, *Clavulina*; Fig. S7). However, the main EcM genera in these sites did not display significant differences between roots and rhizosphere (*e.g.*, *Sebacina*). Whether the differences between EcM fungi are linked to their niche preferences between compartments and/or to root filtering deserves further studies. Differences in colonization success observed between EcM fungi may be linked to species-specific genomic features, in particular Plant Cell Wall Degrading Enzymes (PCWDE) as observed for endophytes (Mesny *et al*., 2021). Though *Inocybe* spp. are significantly more abundant in rhizospheres compared to roots in our study, some authors found that they colonize non-EcM species (Yung *et al.*, 2021).

Overall, this low filtering may explain the limited differences in EcM fungal community observed between rhizosphere and roots in the plant species from our study. Though we observed a low root-filtering of rhizospheric EcM fungi, EcM root communities are mainly explained by host identity: this apparent discrepancy suggests that host filtering already occurs in both rhizosphere and roots (Discussion S2).

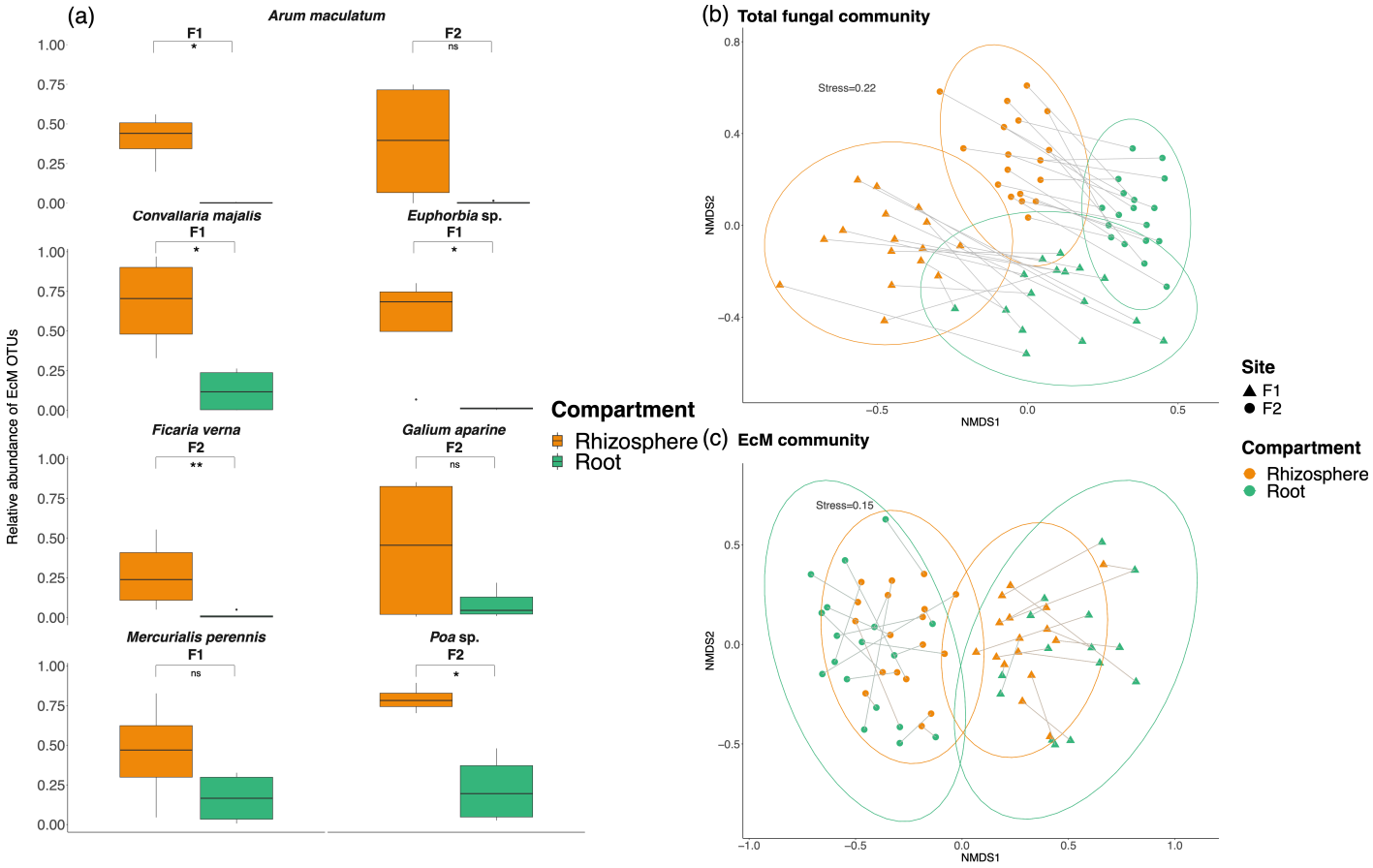


Figure 2: The EcM fungi colonizing roots of non-EcM plants are scarce, but of similar composition compared to rhizospheric soil. (a) Boxplot of the total relative abundance in rhizosphere (orange) and roots (green) of EcM fungi by plant host species in the sites F1 and F2. Significant differences between rhizosphere and roots were tested using a Wilcoxson test. n.s: p>0.05; *: p<0.05, **: p<0.00. **(b)**, **(c)** NMDS of the Bray-Curtis distance matrix (based on relative abundances) for the total fungal community **(b)** and the EcM community only **(c)**. Circles represent the normal distribution of the data. NMDS stresses are indicated on the top left of each NMDS. Pairs of samples are connected by grey lines.

Direct evidence for endophytism in *Russula* spp.

Barcoding is sensitive to contamination, although the various signals reported above advocates against general contamination. In addition, EcM fungi rarely produce asexual spores, and thus scarcely contaminate samples. Yet, the reads of EcM fungi reported above in roots may result from surface colonization of roots rather than internal, true endophytism. We took profit of sites MF1 and MF2 abundantly colonized by *Russula* spp., a common EcM genus (Hackel *et al*., 2022), to directly visualize and confirm the root-mycelial interactions *in situ*, as in Schneider-Maunoury *et al.* (2020). We investigated the presence of *Russula* spp. in non-EcM roots by fluorescence *in situ* hybridization (FISH), paired with confocal microscopy. We designed two probes specifically targeting *Russula* spp. 18S rRNA based on sequences publicly available and sequences from fruitbodies harvested in the Gaillac sites MF1 and MF2 (Material S4.1). *In silico* and *in vitro* controls confirmed that (i) the probe RUS899 hybridizes with *Russula* spp. (Table S6) but also with the closely related EcM *Lactarius* spp., while (ii) the probe RUS101 is specific for *Russula* spp. although it does not hybridize with all species (Fig. S8-9). As no *Lactarius* sequences occurred in Gaillac barcoding results, both probes are suitable to visualize *Russula* spp. In 32 samples from 5 non-EcM plant species (Table S7) we revealed all hyphae based on cell wall coloration by SR2000 and the generalist fungal probe EUK516 (Fig. 3a; Material S4), as well as *Russula* spp. hyphae with our specific probes. We observed *Russula* spp. hyphae in the roots of two species, *Carduus pycnocephalus* (Asteraceae; Fig. 3b-d; Fig. S10) and *Ranunculus bulbosus* (Ranunculaceae; Fig. S11), which both are arbuscular mycorrhizal (Mullen and Schmidt, 1993; Torrecillas *et al.*, 2012). Hyphae are observed on the root surface, intimately anchored to the epidermis cell walls, and some are clearly situated within the apoplast of root cortical cells (*e.g.*, Fig. 3b-d). No signs of necrosis, parasitism, nor apparent tissue differentiation were observed in investigated roots. The colonization by *Russula* spp. is thus endophytic (*sensu* Wilson, 1995). The observed hyphae are alive and metabolically active since we labelled their rDNA, but we also observed inactive hyphae (*i.e.*, with cell wall stained but without cytoplasmic labelling; Fig. 3a).

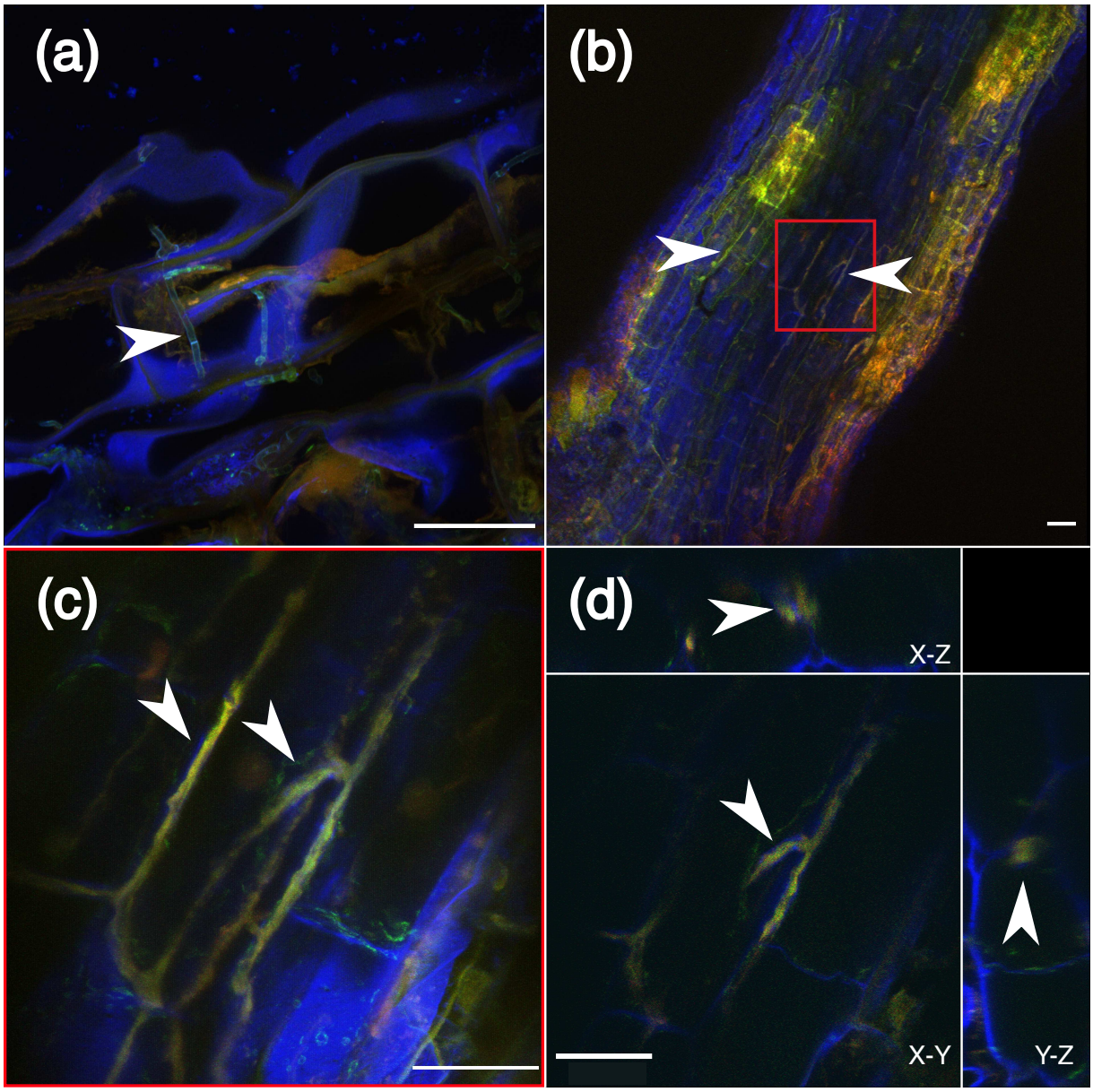


Figure 3: Hyphae of *Russula* spp. colonize roots of non-EcM plant species. (a) Fungal hyphae stained with the cell wall marker SR2000 (blue signal) in a negative control (no probes). Green and red signals correspond to autofluorescence produced mainly by cell walls of fungi (white arrow) and plant. **(b)** Fungal hyphae only hybridized with the generalist probe (EUK516-ATTO565) (left arrow) and *Russula* spp. hyphae hybridized with the generalist and *Russula* specific (RUS101-ATTO633) probes (co-hybridization appears in orange) in roots of *Carduus pycnocephalus*. **(c)** Red area from (b) magnified (63x) to show *Russula* spp. hyphae inside the roots of a *C. pycnocephalus* individual collected in MF1 site (Gaillac). Hyphae colonize the apoplast of plant cells. Maximum intensity projection of a z-stack. **(d)** Orthogonal representation of the same area. Scale bars: 30 µm.

Conclusion and perspectives

Our results further support that EcM fungi can colonize roots of non-EcM plants, especially in the vicinity of EcM trees. Bipartite networks analyses reveal high levels of modularity and specialization, which may arise from one-sided adaptation or co-evolution processes (Dormann *et al*., 2017). Finally, we visually confirm endophytism in non-EcM roots for *Russula* species.

The physiological role of EcM fungi in roots of non-EcM plants is yet to be determined, especially whether they are parasitic, commensal or mutualistic, given that hyphae are metabolically active (Schneider-Maunoury *et al.*, 2018; 2020 for *Tuber;* this work for *Russula*). Taschen *et al.* (2020) showed in mesocosms that the development of non-EcM plants was lower when colonized by *Tuber melanosporum*, either due to parasitism of non-EcM plants, or to a competition for root colonization between EcM fungi and the root mutualists (*e.g.*, arbuscular mycorrhizal fungi). Deleterious effects of EcM fungi on non-EcM plants partially explain patches of reduced vegetation observed around trees producing EcM fruitbodies of *Tuber* (Splivallo *et al*., 2012), which was also observed in this study for the *Russula*-rich sites (our personal observations at MF1 and MF1 2; Fig. S1c). Different EcM species may differ in their effects on plants, if any. From a fungal point of view, non-EcM roots could provide resources to EcM fungi. Indeed mycelium development of *T. melanosporum* is favored by non-EcM plants (Taschen *et al*., 2020). Yet, the low abundance of EcM fungi in meadow sites suggest that this ecological niche is hardly sufficient, and at most adds up to the resources from EcM roots. One may even speculate that their abundance at edge sites (MF1 and 2) may be one player in the replacement of non-EcM plants by EcM trees in ecological successions.

The colonization of non-EcM plants by EcM fungi illustrates an example of ecological plasticity increasingly acknowledged in fungi (Selosse *et al.*, 2018). Such plasticity could be inherited from the evolution processes called the ‘waiting-room hypothesis’ (van der Heijden *et al.*, 2015; Selosse *et al.*, 2021) which stipulates that the ectomycorrhizal association evolved from endophytism. Indeed, some fungi may have retained endophytic abilities while developing complex mutualistic interactions such as ectomycorrhizas, leading to such dual endophytic + EcM ecological niche. Be it vestigial or not, this endophytism deserves further studies addressing its ecological importance as well as its potential to shape functional networks created between EcM and non-EcM plants.

Acknowledgements

M-A.S. acknowledges the Institut Universitaire de France for financial support. Molecular work was performed at the BoEM laboratory (MNHN). The authors thank Laure Schneider-Maunoury and Bastien Bennetot for their help with samples collection and molecular processing.

Authors contribution

M-A.S. designed and supervised the work; L.L.-W. performed the experimental work, analyzed the data and drafted the manuscript with M-A.S.; A.B. supervised the molecular work with L.L.-W.; P.R., C.C. and A.D. supervised the microscopy work that also involved M.J. for acquisition and L.L-W. for acquisition and images analysis; R.P. helped in experimental work and analysis and L.G. provided access to the Gaillac sites; all authors corrected the final manuscript.

Data availability

18S sequences of *Russula* spp. fruitbodies harvested *in situ* are available at NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) under accession numbers OR910623-OR910639. *Metabarcoding* data are also available at NCBI under SRA project number PRJNA1067284.

Competing interests

No competing interests.

Supporting information

Supporting information can be found at: https://github.com/liamlaurentwebb/Russules.git

References

Bascompte J, Jordano P, Melián CJ, Olesen JM. **2003**. The nested assembly of plant–animal mutualistic networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**: 9383–9387.

Bourceret A, Guan R, Dorau K, Mansfeldt T, Omidbakhshfard A, Medeiros DB, Fernie AR, Hofmann J, Sonnewald U, Mayer J, *et al.* 2022. Maize Field Study Reveals Covaried Microbiota and Metabolic Changes in Roots over Plant Growth. *mBio* **13**: e02584-21.

Buyck B, Zoller S, Hofstetter V. **2018**. Walking the thin line… ten years later: the dilemma of above-versus below-ground features to support phylogenies in the Russulaceae (Basidiomycota). *Fungal Diversity* **89**: 267–292.

Dormann CF, Fründ J, Schaefer HM. **2017**. Identifying Causes of Patterns in Ecological Networks: Opportunities and Limitations. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **48**: 559–584.

Dormann CF, Strauss R. **2014**. A method for detecting modules in quantitative bipartite networks. *Methods in Ecology and Evolution* **5**: 90–98.

Gottel NR, Castro HF, Kerley M, Yang Z, Pelletier DA, Podar M, Karpinets T, Uberbacher E, Tuskan GA, Vilgalys R, *et al.* 2011. Distinct Microbial Communities within the Endosphere and Rhizosphere of Populus deltoides Roots across Contrasting Soil Types. *Applied and Environmental Microbiology* **77**: 5934–5944.

Hackel J, Henkel TW, Moreau P-A, De Crop E, Verbeken A, Sà M, Buyck B, Neves M-A, Vasco-Palacios A, Wartchow F, *et al.* 2022. Biogeographic history of a large clade of ectomycorrhizal fungi, the Russulaceae, in the Neotropics and adjacent regions. *New Phytologist* **236**: 698–713.

Halbwachs H, Easton GL, Bol R, Hobbie EA, Garnett MH, Peršoh D, Dixon L, Ostle N, Karasch P, Griffith GW. **2018**. Isotopic evidence of biotrophy and unusual nitrogen nutrition in soil-dwelling Hygrophoraceae. *Environmental Microbiology* **20**: 3573–3588.

Hansen K, Perry BA, Dranginis AW, Pfister DH. **2013**. A phylogeny of the highly diverse cup-fungus family Pyronemataceae (Pezizomycetes, Ascomycota) clarifies relationships and evolution of selected life history traits. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **67**: 311–335.

van der Heijden MGA, Martin FM, Selosse M-A, Sanders IR. **2015**. Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytologist* **205**: 1406–1423.

Hughes KW, Case A, Matheny PB, Kivlin S, Petersen RH, Miller AN, Iturriaga T. **2020**. Secret lifestyles of pyrophilous fungi in the genus Sphaerosporella. *American Journal of Botany* **107**: 876–885.

Korotkin HB, Swenie RA, Miettinen O, Budke JM, Chen K-H, Lutzoni F, Smith ME, Matheny PB. **2018**. Stable isotope analyses reveal previously unknown trophic mode diversity in the Hymenochaetales. *American Journal of Botany* **105**: 1869–1887.

Maciá-Vicente JG, Nam B, Thines M. **2020**. Root filtering, rather than host identity or age, determines the composition of root-associated fungi and oomycetes in three naturally co-occurring Brassicaceae. *Soil Biology and Biochemistry* **146**: 107806.

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.

Mullen RB, Schmidt SK. **1993**. Mycorrhizal infection, phosphorus uptake, and phenology in Ranunculus adoneus: implications for the functioning of mycorrhizae in alpine systems. *Oecologia* **94**: 229–234.

Murata H, Yamada A, Maruyama T, Endo N, Yamamoto K, Ohira T, Shimokawa T. **2013**. Root endophyte interaction between ectomycorrhizal basidiomycete Tricholoma matsutake and

arbuscular mycorrhizal tree Cedrela odorata, allowing in vitro synthesis of rhizospheric “shiro”. *Mycorrhiza* **23**: 235–242.

Murata H, Yamada A, Yokota S, Maruyama T, Endo N, Yamamoto K, Ohira T, Neda H. **2014**. Root endophyte symbiosis in vitro between the ectomycorrhizal basidiomycete Tricholoma matsutake and the arbuscular mycorrhizal plant Prunus speciosa. *Mycorrhiza* **4**: 315–321.

Pichon B, Goff RL, Morlon H, Perez-Lamarque B. **2023**. Telling mutualistic and antagonistic ecological networks apart by learning their multiscale structure. : 2023.04.04.535603.

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.

Rodriguez RJ, Jr JFW, Arnold AE, Redman RS. **2009**. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist* **182**: 314–330.

Schneider-Maunoury L, Deveau A, Moreno M, Todesco F, Belmondo S, Murat C, Courty P, Jąkalski M, Selosse M. **2020**. Two ectomycorrhizal truffles, *Tuber melanosporum* and *T. aestivum* , endophytically colonise roots of non-ectomycorrhizal plants in natural environments. *New Phytologist* **225**: 2542–2556.

Schneider-Maunoury L, Leclercq S, Clément C, Covès H, Lambourdière J, Sauve M, Richard F, Selosse M-A, Taschen E. **2018**. Is Tuber melanosporum colonizing the roots of herbaceous, non-ectomycorrhizal plants? *Fungal Ecology* **31**: 59–68.

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

Selosse M-A, Petrolli R, Mujica MI, Laurent L, Perez-Lamarque B, Figura T, Bourceret A, Jacquemyn H, Li T, Gao J, *et al.* 2021. The Waiting Room Hypothesis revisited by orchids: were orchid mycorrhizal fungi recruited among root endophytes? *Annals of Botany*: mcab134.

Selosse M-A, Schneider-Maunoury L, Martos F. **2018**. Time to re-think fungal ecology? Fungal ecological niches are often prejudged. *New Phytologist* **217**: 968–972.

Smith SE, Read DJ. **2009**. *Mycorrhizal symbiosis*. Amsterdam: Elsevier/Acad. Press.

Splivallo R, Valdez N, Kirchhoff N, Ona MC, Schmidt J, Feussner I, Karlovsky P. **2012**. Intraspecific genotypic variability determines concentrations of key truffle volatiles. *New Phytologist* **194**: 823–835.

Taschen E, Sauve M, Vincent B, Parladé J, van Tuinen D, Aumeeruddy-Thomas Y, Assenat B, Selosse M-A, Richard F. **2020**. Insight into the truffle brûlé: tripartite interactions between the black truffle (Tuber melanosporum), holm oak (Quercus ilex) and arbuscular mycorrhizal plants. *Plant and Soil* **446**: 577–594.

Tedersoo L, Brundrett MC. **2017**. Evolution of Ectomycorrhizal Symbiosis in Plants. In: Tedersoo L, ed. Ecological Studies. Biogeography of Mycorrhizal Symbiosis. Cham: Springer International Publishing, 407–467.

Torrecillas E, Alguacil MM, Roldán A. **2012**. Host Preferences of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Colonizing Annual Herbaceous Plant Species in Semiarid Mediterranean Prairies. *Applied and Environmental Microbiology* **78**: 6180–6186.

Vanegas-León ML, Sulzbacher MA, Rinaldi AC, Roy M, Selosse M-A, Neves MA. **2019**. Are Trechisporales ectomycorrhizal or non-mycorrhizal root endophytes? *Mycological Progress* **18**: 1231–1240.

Wang Z, Binder M, Schoch CL, Johnston PR, Spatafora JW, Hibbett DS. **2006**. Evolution of helotialean fungi (Leotiomycetes, Pezizomycotina): A nuclear rDNA phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **41**: 295–312.

Weiß M, Waller F, Zuccaro A, Selosse M-A. **2016**. Sebacinales – 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.

Yung L, Bertheau C, Tafforeau F, Zappelini C, Valot B, Maillard F, Selosse M-A, Viotti C, Binet P, Chiapusio G, *et al.* 2021. Partial overlap of fungal communities associated with nettle and poplar roots when co-occurring at a trace metal contaminated site. *Science of The Total Environment* **782**: 146692.

Supplementary information for:

Endophytic and ectomycorrhizal, an overlooked dual ecological niche? Insights from natural environments and *Russula* species.

Authors:

Liam LAURENT-WEBB[1]*, Philippe RECH[1], Amélia BOURCERET[1], Chloé CHAUMETON[2], Aurélie DEVEAU[3], Laurent GENOLA[4], Mélanie JANUARIO[1], Rémi PETROLLI[1], Marc-André SELOSSE[1,5,6]*

[1] Institut de Systématique, Évolution, Biodiversité (ISYEB), Muséum national d'Histoire naturelle, CNRS, Sorbonne Université, EPHE, UA, 57 rue Cuvier, 75005 Paris, France.

[2] Sorbonne Université, Institute of Biology Paris-Seine, Paris 75005, France.

[3] UMR IAM, Université de Lorraine, INRAE, 54280, Champenoux, France.

[4] Station Trufficole du Montant, EPLEFPA Cahors-LeMontat, 422 Lacoste, 46090, Le Montat.

[5] Faculty of Biology, University of Gdansk, ul. Wita Stwosza 59, 80-308 Gdansk, Poland.

[6] Institut Universitaire de France.

*** Corresponding authors:**

Liam LAURENT-WEBB (liam.laurent@cirad.fr; ORCID: 0000-0003-1156-6432)

Marc-André SELOSSE (ma.selosse@wanadoo.fr; ORCID: 0000-0003-3471-9067)

Other authors information (e-mail; ORCID):

Amélia BOURCERET: amelia.bourceret@mnhn.fr

Chloé CHAUMENTON: chloe.chaumeton@sorbonne-universite.fr; 0009-0005-7926-3261

Aurélie DEVEAU: aurelie.deveau@inrae.fr; 0000-0001-6266-5241

Laurent GENOLA: laurent.genola08@gmail.com

Mélanie JANUARIO: melanie.januario@mnhn.fr

Rémi PETROLLI: remi.petrolli@mnhn.fr

Philippe RECH: philippe.rech@mnhn.fr; 0000-0002-6631-9888

Key words: ectomycorrhizae, endophytes, *Russula*, metabarcoding, FISH microscopy.

Supplementary Methods (1-4)

Supplementary Methods 1: Study sites and sampling.

This study encompasses results from nine sampling sites presented below (Fig. S1; Table S1).

Methods S1.1: *Endophytism of EcM fungi in non-EcM plant species in several sites across France*

We sampled non-EcM plant individuals in three forest sites (F1, F2 and F3) and one meadow (M1) across France in order to test whether the dual endophyte/EcM niche is a common feature observed in sites separated by 20 to 450km (Fig. S1). These samples were collected between May 2016 and April 2019 in four locations (Table S1). We sampled roots of non-EcM plants in two forests characterized by an acidic soil dominated by chestnut trees (*Castanea sativa*; F1 and F2 sites). At both sites, the four most abundant herbaceous species were selected and several individuals were sampled (Table S1). Four root tips per individual were pooled. We additionally collected rhizospheric soil in order to characterize a potential root filter on rhizosphere EcM fungi. Rhizospheric soil of each individual was collected by gently shaking the soil closely attached to roots. Root samples of the F3 site were collected on a calcareous field in Corrèze, near but outside a productive *Tuber melanosporum* orchard. M1 samples were collected in a meadow in a closed botanical garden of the National Museum of Natural History in Paris and 4 root tips per non-EcM plant individual were collected and treated individually (i.e., no pooling). All collected root tips (F1, F2, F3 and M1 sites) were selected based on their apparent good health and checked for the absence of ectomycorrhizae (especially root tips of ligneous species). They were surface sterilized as follows: root tips were washed three time in 70% ethanol (3x5min) and in 0.9% bleach. They were then rinsed three times in sterile water and stored at -20°C before molecular analysis.

Methods S1.2: *Detection of EcM fungi in roots of non-EcM plants by amplicon sequencing and fluorescence* in situ *hybridization in Gaillac sites*

In order to investigate the variability of the dual EcM/endophyte niche at smaller scale, we sampled roots from non-EcM plants species in 5 sites near Gaillac in South-West of France, distant from 10 to 800m. The sites are characterized by a calcareous soil. We collected samples in (i) two forests dominated by oaks, where fruitbodies of *Russula* spp. and other EcM fungi have been observed (F4 and F5), (ii) a meadow where no fruitbodies were observed (M2), and (iii) areas at the edge of the forests with only non-EcM plant species but producing a large number *Russula* spp. fruitbodies (MF1 and MF2; Fig. S1; Table S1).

Samples were collected at different times: in June 2021, we collected roots only for amplicon sequencing (Methods S2) in the five sites (MF1, MF2, F3, F5 and M2). The sampling was representative of the plant community within each site, and therefore varied between them. We sampled individuals of the same species in the different sites whenever possible. For each plant individual, three root tips were collected, carefully washed in sterile Mili-Q water, pooled and kept dried in silica-gel. Samples were kept dry until molecular work. We also collected *Russula* spp. fruitbodies in the forest edge site MF1 for molecular identification and fluorescence *in situ* hybridization probe design (see Methods S4.1 for probe design). In September 2021, we collected plant individuals for both amplicon sequencing and fluorescent *in situ* hybridization (*FISH*) microscopy in both edges sites (MF1 and MF2). We carefully dug up individuals in order to keep the roots in their surrounding soil. Samples were kept at 4°C in

individual zip-locks. The next day in the laboratory, we removed the rhizospheric soil and selected three root tips per individual. Each root tip was cut in two pieces: one piece was carefully washed in sterile water, flash-frozen in nitrogen and kept at -20°C before molecular analysis. The other half was washed in PBS 1% and fixed in PFA 4% to fix RNAs overnight at 4°C before *FISH* and microscopy observations (Methods S4). Fixed samples were kept at -20°C before hybridization. In September 2021, one *Russula* sp. fruitbodie was also collected and processed for *FISH* in order to test our newly designed probes (see Methods S4). Finally, we sampled individuals of two plant species (*Ranunculus bulbosus* and *Pilosella officinarum*) for *FISH* in July 2023 and processed them as described above.

Supplementary Methods 2: Sequencing of fruitbodies and amplicon sequencing of root/rhizospheric fungal communities.

Methods S2.1: *Fruitbodies gDNA extraction and 18S/ITS2 rRNA PCR.*

We sequenced the 18S and ITS region of the ribosomal operon of *Russula* spp. fruitbodies harvested in Gaillac sites to design fluorescence *in situ* hybridization probes (18S) and for taxonomic identification (ITS). 20 to 80 mg of dried (in silica-gel) fruitbodies were used to extract gDNA. Samples were mechanically disrupted 3 times at 30 hz in a TissueLyser II (Qiagen, USA) during 30 sec with 2 grinding steel balls (Retsch, Luxembourg). gDNA was extracted using the commercial DNeasy Plant Mini kit (Qiagen, USA) according to the manufacturer's instructions, and eluted in 100µl of TE buffer. Extracted gDNA was quantified using Qubit™ fluorometer (Life Technologies, Singapore) and Qubit™ (1X dsDNA High Sensitivity Assay Kit, Invitrogen). 18S rDNA was amplified from each fungal gDNA extraction by PCR using the universal fungal primers NS1 (3'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-5') and NS8 (3'- TCCGCAGGTTCACCTACGGA-5'; White *et al.*, 1990). The ITS1-5.8S-ITS2 rDNA region was amplified using primers ITS5 (3'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-5') and ITS4 (3'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-5'; White *et al.*, 1990). PCR reaction was performed by mixing 3ng of gDNA, 7.5pmole of each primer, 2U DFS-Taq DNA Polymerase (Bioron Life Science, Germany), 75µg Bovine Serum Albumin (Sigma, USA), 200µM of each dNTP (New England Biolabs), and 1x Incomplete NH4 (Bioron Life Science, Germany). The optimal conditions for PCR amplification of 18S rDNA segments with these primers were 95°C 10min, followed by 30 cycles at 95°C 30 sec, 53°C 30 sec, 72°C 2 min, and a final elongation step at 72°C 10 min. The PCR products were subjected to Sanger sequencing from both directions using the same set of primers (Eurofins Genomics, Germany). Additionally, a couple of internal primers were designed specifically on conserved regions with the free software Primer3 (Untergasser *et al.*, 2012) to sequence the extremities of each 18S PCR fragments. The obtained electropherograms were checked, sequences were corrected and submitted to GenBank under the accession number OR910623-OR910639. ITS sequences taxonomy was assigned against the UNITE online database using BLAST tool (https://unite.ut.ee/analysis.php#).

Methods S2.2: *Amplicon sequencing of the fungal communities.*

Root and rhizosphere samples from the F1, F2, F3 and M1 sites were processed as in Schneider-Maunoury *et al.* (2018, 2020). Briefly, the ITS2 region of the ribosomal operon was amplified using the primers ITS86-F (3'-GTGAATCATCGAATCTTTGAA-5') and ITS4 (see above) which favor the detection of Ascomycota and Basidiomycota (the two phylums containing ectomycorrhizal fungi) over Glomeromycota (Waud *et al.*, 2014; Op De Beeck *et al.*, 2014). PCR products were purified, pooled in equimolar pools and sequenced with an Ion Torrent sequencer (Life Technologies, Carlsbad, USA).

Samples from Gaillac sites were disrupted with a TissueLyser II using two inox beads (3x30s at 30 Hz). Total gDNA was then extracted using the Qiagen Plant Kit following the manufacturer instructions and stored at -20°C. We also performed extractions with no root samples as negative controls. All gDNA extracts were purified to remove potential PCR inhibitors. To do so, gDNA was mixed with Ampure XP (Beckman Coulter Inc., USA) solution in a 1 (gDNA) : 1.8 (Ampure) (v:v) ratio. The reaction plate was then placed on a magnetic plate to separate beads from the solution. The supernatant was removed and beads were washed with 70% EtOH two times. gDNA was then resuspended in EB buffer. Purified gDNA concentrations were measured with PicoGreen and all gDNAs were diluted to 3.5 ng/µL. The ITS2 region of the risobomal operon was amplified using barcoded ITS286-F/ITS4 primers in triplicate with the DFS-Taq (Bioron Life Science, Germany). The PCR mixture consisted in 2.5 µL of Incomplete Buffer (10x), 0.5 µL of $MgCl_2$, 2.5 µL of 3% BSA, 0.5 µL dNTPs (10 mM each), 0.75 µL of each primer (at 10 µM), 2U of Bioron DFS-Taq, 3 µL of DNA (3.5 ng/µL) and 14.1 µL of H_2O. The cycling conditions were as follow: 10 min at 95°C (initial denaturation), 35 steps of denaturation (95°C, 30s), annealing (56.5°C, 30s), elongation (72°C, 30s) and a final elongation at 72°C for 10 min. We also added PCR negative controls for which DNA was replaced by water. PCRs products were then checked on a 2% agarose gel and purified using AMpure XP solution with a 1:1 (v:v) ratio as described before. Purified PCRs products concentration was measured with PicoGreen and pool in equimolar quantity. Equimolar pool was also purified. Sample pools were sequenced using a 2x250 Miseq technology on an Illumina platform by Fasteris SA (Switzerland).

Methods S2.2: ***Bioinformatic analysis of amplicon sequences.***

As fungal communities of samples from sites across France (F1, F2, F3 and M1) and Gaillac sites (MF1, MF2, F4, F5, M2) were obtained using two different sequencing technologies, the first processing steps were slightly different. Samples from the first four sites were sequenced in distinct IonTorrent runs. Reads were then assembled and demultiplexed on the IonTorrent platform. Sequences were quality checked, with less stringent parameters in order to keep a large sequencing depth (--*fastq_maxns* 1, --*fastq_maxee* 3, --*fastq_minlen* 200). For samples from Gaillac sites, paired-end reads were assembled and quality checked (--*fastq_maxns* 0, --*fastq_maxee* 2) using cutadapt (Martin, 2011) and then demultiplexed (keeping only sequences longer than 200 pb).

Assembled and demultiplexed reads of the 9 sites were then processed altogether. Reads were dereplicated and clustered as classical 97% sequence similarity Operational Taxonomic Units (OTUs) using VSEARCH (Rognes *et al.*, 2016). Sequences were checked for the presence of chimeras (--*uchime_denovo*). The taxonomy was assigned with VSEARCH against the UNITE v8.3 database (Nilsson *et al.*, 2019). Reads were filtered in order to keep only non-chimeric sequences of > 200 pb, with a total abundance of at least 10 and a spread (i.e., the number of samples where the read is present) superior or equal to 1. We used the *decontam* algorithm Rivera *et al.*, 2011) to remove the potential contaminants in the Gaillac samples, using both algorithms (*prevalence* and *frequency*). First, we used the *prevalence* algorithm using the negative extraction and PCR controls with a stringent threshold of 0.5. We then used the *frequency* algorithm using default parameters. A few more filters were applied to all datasets: we removed samples less than 2 000 fungal reads, OTUs with less than 5 reads per sample and OTUs representing less than 0.5% of the reads per sample.

We inferred functional fungal traits using the FUNGuild database (Nguyen *et al.*, 2016). We only considered “Probable” and “Highly Probable” assignations and classified the others as “Unknown”. OTUs assigned to multiple trophic guilds (e.g., Saprotroph-Plant Pathogen) were grouped in the category “Others”.

Supplementary Methods 3: Statistical analysis of fungal communities.

Amplicon sequencing data were processed using the R software (R Core Team, 2023) and the package *phyloseq* (McMurdie and Holmes, 2013).

Methods S3.1: *Influence of the sites and plant host on fungal communities.*

In order to test for differences in EcM relative abundance between sites, we used pairwise Wilcoxson rank test (*pairwse_wilcoxson_test*, rstatix package; Kassambara, 2023). We used β-diversity metrics to determine the influence of the location and the plant host family on total and EcM fungal communities. To do so, we computed Bray-Curtis distances from both relative abundances, as they may perform better for community comparisons (Gloor *et al.*, 2017; McKnight *et al.*, 2019), and Hellinger-transformed data to correct for variability in sampling depth (Legendre & Gallagher, 2001). We computed PERMANOVA with 10,000 permutations using the *adonis2* function of the *vegan* R package (Oksanen *et al.*, 2013). The formula used was: *distance matrix ~ site* x *family*. Analyses were run separately for the four sites across France and Gaillac sites as fungal communities were sequenced with different technologies.

Methods S3.2: *Differential abundances analyses of OTUs between environment types in Gaillac sites.*

In order to test whether some fungal OTUs were significantly more abundant in one of the three environments of the Gaillac sites (*i.e.*, forest, meadow and forest edge), we ran several differential abundances analysis as advised in Nearing *et al.* (2022): *LEfSE* (Segata *et al.*, 2011), *ANCOM-BC* (Lin & Peddada, 2020) and *ALDEx* (Fernandes *et al.*, 2013). OTUs were considered differentially abundant in one environment only if they were identified as differentially abundant with the three methods. We represented differentially abundant OTUs based on the Linear Discriminant Analysis score (LDA) computed in the *LEfSE* procedure.

Methods S3.3: *Constructing and characterizing bipartite networks of interactions between EcM fungi and non-EcM plants* .

We built bipartite networks in order to search for patterns of associations between EcM fungi and non-EcM-plants and to compare their structure to available knowledge on true mycorrhizal associations. We used the *bipartite* R package (Dormann *et al.*, 2008) to build plant/EcM fungi bipartite networks. We built the networks at both fungal genera/plant family and fungal OTUs/plant species levels to see if observed patterns were consistent across different taxonomic levels. We built one network for the four sites across France (regional scale) and one for Gaillac sites (local scale). Furthermore, we built one network for each site separately to ensure that observed patterns are not linked to differences between sites, in particular modularity and specialization which can be linked to differences between habitats. We plotted the bipartite graphs using the *plotweb* function (*bipartite* package). To characterize the networks' structure, we computed several metrics: (i) nestedness (weighted NODF, *networklevel* function), (ii) modularity (Q, Beckett's algorithm from the *computeModules* function) and (iii) specialization (H_2'; *H2fun* function). (i) In nested networks, specialists interact mainly with generalists and *vice versa* (Bascompte *et al.*, 2003). (ii) Modularity arises from subsets of preferential associations, which may be linked to reciprocal adaptations within modules (Dormann *et al.*, 2017). (iii) Finally, H_2' measures the level of specialization in interactions among plant and fungus and allows comparisons

between networks of different size (Blüthgen *et al.*, 2006). H_2' varies between 0 (no network specialization) to 1 (network fully specialized). In order to test whether the properties of the bipartite networks were significantly different than expected by chance (that is, different from random patterns of associations), we generated, for each network, 1,000 random networks using the *quasiswap* null model algorithm (*permatswap* function), a stringent algorithm that keeps both connectance and marginal sums of the original network constant. Networks are considered nested (or anti-nested) if more than 97.5% of the generated networks have a lower (resp. higher) weighted NODF than the real network (p<0.025). Similarly, networks are considered significantly modular and specialized if more than 97.5% of the generated networks have lower Q and H_2' values, respectively (p<0.025).

Methods S3.4: ***Comparisons of rhizosphere and root EcM fungal communities.***

In order to quantify and characterize a potential root filter applied to rhizospheric EcM fungi, we compared the EcM α-diversity between compartments for each species by computing the Shannon index and tested for significant differences between compartments using Tukey's Honest Significant Differences after running the following linear regression: *Shannon index ~ plant species* x *compartment*. Normality and homoscedasticity of the Shannon index were checked using diagnostic plots. We also compared the composition of the total and EcM fungal communities in the two compartments using PERMANOVA (*adonis2* function of the *vegan* R package, 10,000 permutations) with the following model: *distance matrix ~ compartment* x *plant species*. As detailed before, distance matrices were computed using the Bray-Curtis distance based on both relative abundances and Hellinger-transformed data. Differences in composition were represented using Non-Metric Multidimensional Scaling (NMDS). Pairs of samples are connected by a grey line. For each species, we identified the number of OTUs shared (or not) between the two compartments and computed their relative read abundance in the EcM community (threshold of one read). Finally, we assessed if some EcM fungal genera are significantly more abundant (or not) in one of the two compartments using differentially abundant analysis. To do so, we used the Linear Discriminant Analysis Effect Size procedure (*LEFsE*; Segata *et al.*, 2011).

Supplementary Methods 4: Fluorescence *in situ* hybridization (*FISH*) and microscopy detection of *Russula* hyphae.

Methods S4.1: ***Design of rRNA probes specific to*** **Russula** ***spp. for*** **FISH and** ***microscopy observations.***

Oligonucleotide probes were designed to target the 18S rRNA of *Russula* genus including the *Russula* fruitbodies harvested in areas producing *Russula* capropohores in the Gaillac sites. *Russula* 18S ribosomal DNA (rDNA) sequences were obtained from fruitbodies harvested on and outside productive areas and from genomic data published in NCBI GenBank or Mycocosm databases (The Fungal Genomics Resource-JGI) (cf. Supp. File 1 to see accessions used). *Russula* 18S rRNA sequences were aligned using the free Multalin algorithm (Corpet, 1988) along with 18S rRNA sequences of a selection of several orders in Agaromycetes and Russulaceae family. The alignment was scanned visually to detect regions of sequence homology suitable for *Russula* genus-specific probes, i.e., conserved within the *Russula* genus but with differences (mismatches) compared to other genera. We identified 6 regions exhibiting polymorphisms which could therefore be used as a basis for designing probes targeting

Russula spp. (or including closely related genera in the Russulaceae family). Physical accessibility of probes to these regions was assessed using reference maps of probe accessibility and sensitivity available in *Prymenisum parvum* (Metfies and Medlin, 2008). The specificity of potential probes was tested *in silico* using iterative BLAST searches with low stringency algorithm parameters in the GenBank and SILVA databases. Taking into account the number of mismatches of the designed probes and the *in silico* accessibility and specificity, we selected 2 probes: RUS899 and RUS101 (see table below for sequences). *FISH*-probes were commercially synthesized by Biomers (Biomers.net, Ulm/Donau, Germany) including 5′-end labeled with ATTO fluorochromes and stored in sterile DNA-grade water at -20°C.

Name	**Sequence**	**Fluorescent dye**
EUK516	ACCAGACTTGCCCTCC	ATTO565
NON-EUK516	GGAGGGCAAGTCTGGT	ATTO565
RUS101	ATGTAGAAAGGTATCATCAAAT	ATTO633
RUS899	CGCAATAGTTTGTCTTGCGTAAAT	ATTO633
NON-RUS899	ATTTACGCAAGACAAACTATTGCG	ATTO633

Methods S4.2: In vitro *specificity test of the newly designed probes.*

Strains of *Phanerochaete chrysosporium* RP78, *Lactarius quietus* S05C, *Russula luteotacta* 201811 RL, *Russula* sp. AT 0111 were cultivated on P5 medium (Paschelwski agar medium 5, Di Battista *et al.*, 1996) in order to test probes' sensitivity and specificity *in vitro* and to set up confocal acquisition parameters. All strains were supplied by the UMR IAM 1136 isolates collection grown for several days in P5 medium at 25°C. When fungal elements became visible by eye, the hyphae were harvested, washed with PBS 1x, fixed in the 3% PFA fungi fixation solution for 24 h (see Supp. File 2 for details on all reagents used), washed in PBS and finally stored at -20°C in 50% ethanol-PBS 1x until use. Moreover, different part of fruitbodies harvested *in situ* (cape and/or stipe) of *Russula* spp. and two other undetermined fungi species (C1 and C2) harvested on and outside forest edges were included in the specificity test. *Russula* sp. (stipe and cape), and undetermined fungi C1 and C2 were razor blade cut, rinsed in PBS 1x and fixed in the fungi fixation solution as for pure culture fungi. For *FISH*, fruitbodies and mycelium samples were gradually dehydrated in an ethanol series prepared in sterile ultrapure water (50%, 70%, 96% and 100%) 5 min each and rehydrated in an ethanol series (70%, 50%, 30%, 10%) prepared in PBS-T 5 min each before a last PBS-T bath. Samples were treated for 15 min at 30°C with FCWE digestion solution to weaken fungal cell walls before prehybridization at 46°C during 10 min. The prehybridization buffer was then replaced with a hybridization buffer containing the probe(s) (0.35pmol/µL of hybridization solution each) during 2h at 46°C. After a stringent wash in the washing solution during 10 min at 46°C followed by PBS 1x bath, sample were mounted in antifade solution, and visualized on a laser scanning confocal microscope (Zeiss LSM980; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) equipped with an Airyscan2 detector and coupled to ZEN Blue 3.3 software (Carl Zeiss). In some cases, the cultivated hyphae have been placed and fixed on Poly-L-lysine coated slides (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) before applying the *FISH* protocol. Fungal samples were co-hybridized with either the universal eukaryote probe EUK516 and with one of the following probes: sense *Russula* probes (RUS899/RUS101), non-sense *Russula* probe (NonRUS899) or none sense EUK516 probe, using a combination of distinct fluorescent dyes.

Methods S4.3: ***Hybridization and observation of*** **Russula** ***spp. hyphae in roots of non-EcM plant species.***

To visualize *Russula* fungi within non-EcM plant roots, we set up a *FISH* experiment. Roots samples harvested in September 2021 and July 2023 (Table S1) were washed carefully several times in water and PBS 1x in order to eliminate the rhizospheric soil. Root pieces collected were cut into two consecutive segments of 1-cm long. One was immediately immersed in the plant fixation solution (PFA 4%) and incubated overnight at 4°C to fix RNAs. Samples were then rinsed three times in PBS 1x and progressively dehydrated in a series of ethanol solutions (10%, 30% and 50%) during 15 min each. The root segments were stored in the sample storage solution and kept at -20°C for further analyses. Segments for which *Russula* sequences were detected (Methods S2) were used for *FISH* experiments. We used two types of probes, both targeting 18S rRNA. One is the universal eukaryote probe EUK516, which targets the 18s rRNA of eukaryotic cells (Amann *et al.*, 1990; see above for probes sequences) coupled with ATTO-565 dye (Biomers, Germany), hereafter called "EUK565". The other probe was either one of the two newly designed probes targeting specifically *Russula* 18S rRNA (RUS889 and RUS101, Methods S4.1) coupled with ATTO-633 dye (Biomers, Germany). As in Schneider-Maunoury *et al.* (2020), fluorochromes were chosen to minimize the autofluorescence of the fungi and plant root tissues. In order to visualize plant and fungal cell walls, the dye SR2000 (Renaissance Chemicals) was added to the hybridization buffer.

Selected samples were treated for 1h at 30°C with PCWE digestion cocktail 1x mixed with FCWE digestion solution 1x to weaken plant and fungal cell walls. After rinsing them into PBS-T, samples were then treated with 0.08µg/µl of Proteinase K during 30min at 37°C. The proteinase K reaction was stopped by replacing the solution by Glycine working buffer during 2 min and the samples were incubated 30 min in the post fixative solution, rinsed and prehybridized at 46°C during 30 min. The prehybridization buffer was replaced with hybridization buffer containing the probe(s) (0.35pmol/µL of hybridization solution each) during 2h at 46°C. After a stringent wash in the washing solution during 10 min at 46°C, sample were mounted in antifade solution mixed with 0.1% of SR2000 (Renaissance Chemicals).

The *FISH*-stained root samples were further mounted with Slowfade Diamond Antifadent (Molecular Probes, Eugene, OR, USA, Thermofisher, cat. no. S36963) and stored at 4°C over night until observation with a laser scanning confocal microscope (LSM 980 Zeiss microscope) equipped with an EC-Plan Neofluar 10x/0.3 dry objective, a W Plan-Apochromat 20x/1.0 water and a Plan-Apochromat 63x/1.4 oil objective. The Airyscan 2 module was used for acquisitions using the multiplex 4Y mode. Probes labelled with ATTO565 or ATTO633 dyes were excited at 568nm or 647 nm wavelengths respectively and detected with a bandpass filter (570-630 nm and 660-720 nm). The cell wall fluorescent dye SR2000 was visualized with a laser excitation at 405 nm wavelength and recorded with a bandpass filter (420-477nm). For each field of view, an appropriate number of optical sections were acquired with a Z-step of 0.15 to 1 µm. Airyscan images were reconstructed and analysed using ZEN Blue 3.5, ZEN 2.1 LITE black software (Zeiss), the Vision4D 3.0.1 software (arivis AG, Germany) or the free software FIJI-ImageJ. Hybridization signals obtained on non-ECM roots samples were successfully and specifically detected for EUK516 and the sense *Russula* probes and the same parameters (laser power and gain of detector) were used to image the control samples: samples without any probe or samples hybridized with the non-sense probes.

Supplementary discussions (1-2)

Supplementary discussion 1: The structure of mutualist interactions' bipartite networks.

In order to further characterize the interactions between EcM fungi and non-EcM plants, we constructed the network of interactions between EcM fungi and non-EcM plants in Gaillac sites (local scale; Fig. 1d), in sites across France (regional scale; Fig. S5), and in each site individually. We assessed the topological properties of the networks by computing the commonly used modularity and nestedness (here weighted nestedness; Bascompte *et al.*, 2003; Olesen *et al.*, 2007). Modularity (that is, groups of species that interact preferentially) may arise in intimate interactions such as symbiotic mutualism or parasitism, resulting in reciprocal specialization (Olesen *et al.*, 2007) but may also be linked to environmental or geographic factors. Nestedness was thought to be a characteristic of mutualistic networks (Bascompte *et al.*, 2003) providing stability in the community. In a nested network, generalists tend to associate with specialists and *vice versa*. However, recent results show that nestedness is not reliable to predict if a network is mutualist (Pichon *et al.*, 2023 and citations hereafter).

Here, we show that the colonization of EcM fungi in roots of non-EcM plants results in a modular network in both Gaillac sites (Fig. 1d; Table S3) and sites across France (Fig. S5; Table S3). At the site level, modularity was frequently observed especially in networks at the fungal OTUs/plant species level (Table S3). Patterns of nestedness, non- and anti-nestedness were observed across sites with no clear tendency. The network of Gaillac sites was significantly nested (Table S3) while the network of sites across France was significantly anti-nested. Different mycorrhizal types tend to have contrasted network structures. For instance, arbuscular mycorrhizal fungi and plants tend to form nested networks (Chagnon *et al.*, 2012; Montesinos-Navarro *et al.*, 2012) with intermediate modularity (Toju *et al.*, 2014; Põlme *et al.*, 2018). EcM interactions on the contrary are often reported to form non- or anti-nested networks (Bahram *et al.*, 2014; Toju *et al.*, 2014; Roy-Bolduc *et al.*, 2016) though nestedness was observed in some cases (Peay *et al.*, 2007). Modularity was sometimes observed in EcM/plant networks but is not systematic (see previous studies). Anti-nestedness and modularity were also observed in epiphytic orchids mycorrhizal interaction networks (Martos *et al.*, 2012; Petrolli *et al.*, 2022) and in ericaceous plant fungus networks (Toju *et al.*, 2016). Thus, mutualistic mycorrhizal associations result in diverse networks topologies depending on the mycorrhizal type (van der Heijden *et al.*, 2015). In this work, we find that EcM fungi colonizing non-EcM plants result in modular bipartite networks, with contrasted patterns of nestedness, fitting observations in true EcM fungi.

Furthermore, we assessed the specialization of EcM fungi and non-EcM plants networks using the H_2', allowing comparisons between networks of different sizes (Blüthgen *et al.*, 2006). We found high degrees of specialization in both Gaillac sites and sites across France (Table S3). As with modularity, specialization was often observed at the individual site level, in particular at the fungal OTUs/plant species level. Observed specialization was greater than in some mycorrhizal associations (Toju *et al.*, 2014; Perez-Lamarque *et al.*, 2022) but similar to that observed in grasses root endophytes (Kivlin *et al.*, 2022).

In this study, bipartite networks of interactions between non-EcM plant roots by EcM fungi are both modular and specialized, two correlated network properties (Dormann & Strauss, 2014). These properties were also observed within sites suggesting that they are not only linked to differences between sites but rather to preferential interactions between plants and fungi (Dormann *et al.*, 2017). These patterns may arise from several process such as one-sided adaptation or co-evolution (Dormann *et al.*, 2017).

Supplementary discussion 2: A rhizospheric host filtering of EcM fungi by non-EcM plants?

We assessed the EcM community of roots of non-EcM plants from several families in different sites. Comparisons of EcM communities show significant differences between plant families (Fig. 1c; Fig. S3; Supp Table 2c,d). Furthermore, bipartite networks of interactions between non-EcM plants and EcM fungi are highly specialized and modular (Fig. 1d; Fig. S5; Table S3), even at the site level (Table S3), suggesting preferential interactions between groups of EcM fungi and non-EcM plants. Altogether, these results suggest a host filtering of EcM fungi. However, the comparison of rhizosphere and roots EcM communities in paired samples revealed no significant differences in EcM community composition between the two compartments (Fig. 2; Fig. S6; Table S5), though EcM fungi were much less abundant in roots than in rhizosphere (Fig. 2a).

This apparent discrepancy suggests that host filtering of EcM communities by non-EcM plants may occur both in rhizosphere and in roots. First, root exudates may shape EcM community composition in the rhizosphere. Knowledge acquired in true EcM associations demonstrate that plant exudates such as flavonoids or abietic acid may participate to EcM development and spores' germination in the rhizosphere (as reviewed in Garcia *et al.*, 2015; Martin *et al.*, 2016). In this study, we investigated roots (and rhizosphere) of plants forming arbuscular mycorrhizae (AM) or no mycorrhizae (NM) for which molecular dialogue with EcM fungi has not been investigated. As EcM plants, AM plants produce root exudates such as strigolactones that participate to AM fungal partners' recruitment (Bonfante & Genre, 2010), and thus shape the rhizosphere microbiome (Uroz *et al.*, 2019). It has been hypothesized that strigolactones may also be involved in EcM molecular dialogue (Garcia *et al.*, 2015) despite conclusive evidence. The rhizosphere is a complex and dynamic compartment within which root and fungal exudates are likely to influence the development of fungi (*e.g.*, EcM fungi) and thus influence root mycobiota assembly, leading to differences between plant species.

Second, the ability of EcM fungi to colonize non-EcM roots may be limited, leading to a low abundance of EcM fungi in non-EcM roots compared to the rhizosphere (Fig. 2a). The fungal colonization in true mycorrhizal associations usually requires an important root remodeling to ensure access of root tissues to the fungal partner and reduced plant defenses. Reduction of plant defense during colonization is modulated by fungal exudates (*e.g.*, Small Secreted Proteins in EcM associations; Plett *et al.*, 2014; Martin *et al.*, 2016) ensuring a specific recognition of mycorrhizal fungi. The endophytic niche may facilitate and predispose plant and fungal adaptations allowing more specialized and complex interactions such as mycorrhizae, as stipulated by the 'waiting-room' hypothesis (Selosse *et al.*, 2009, 2021).

Supplementary Tables (1-7)

Supplementary Table 1: Details on samples collected.
Location, number of root samples, number of individuals, number of plant species/family and their corresponding analysis.

Location	Name	Date	Nb. root samples	Nb. individuals	Nb. species	Nb. family	Rhizospheric soil	Analysis
Orry-la-Ville (ORY)	Forest 1 (**F1**)	April 2019	18	18	4	3	18	Ion Torrent sequencing (ITS2)
Orsay (ORS)	Forest 2 (**F2**)	March 2019	16	16	4	4	16	Ion Torrent sequencing (ITS2)
Corrèze (TMEL)	Forest 3 (**F3**)	May 2016	59	59	7	7	-	Ion Torrent sequencing (ITS2)
Jardin des Plantes (JE)	Meadow 1 (**M1**)	June 2017	48 + 42	46	11	10	-	Ion Torrent sequencing (ITS2)
Gaillac	Edge 1 (**MF1**)	June 2021	141	141	30	13	-	Illumina sequencing (ITS2)
		September 2021	59	21	7	6	-	Illumina sequencing (ITS2) + *FISH*-microscopy
		July 2023	4 root systems	4	2	2	-	*FISH*-microscopy
	Edge 2 (**MF2**)	June 2021	38	38	10	7	-	Illumina sequencing (ITS2)
		September 2021	50	17	7	6	-	Illumina sequencing (ITS2) + *FISH*-microscopy
	Forest 4 (**F4**)	June 2021	16	16	4	4	-	Illumina sequencing (ITS2)
	Forest 5 (**F5**)		13	13	7	4	-	
	Meadow 2 (**M2**)		41	41	10	6	-	
Total			**557**	**433**	**42**	**17**	**34**	

Supplementary Table 2: Plant host family and site of sampling influence both the total root mycobiota composition and the EcM mycobiota composition of non-EcM plants.
Outputs of the PERMANOVA analysis (*adonis2* function *vegan* R package), performed using the Bray-Curtis distances computed from both relative abundance and Hellinger transformed data of the total fungal community (**a**, **b**) or the EcM community (**c**,**d**) only with 10 000 permutations. The analyses were performed on the samples collected in **(a), (c)** the areas producing *Russula* spp. fruitbodies and the adjacent forest and meadow and in **(b), (d)** four natural environments across France. *family* corresponds to the plant host family. *environment* corresponds to the area where samples from (a), (c) were collected (areas producing *Russula* fruitbodies, forest or meadow). *location* corresponds the four natural environments of (b), (d) (cf. Table S1).

	Total fungal community						
(a)	**Variable**	**R^2**	**p-value**	**(b)**	**Variable**	**R^2**	**p-value**
Relative abundance	family	0.15	10^{-3} (***)	Relative abundance	family	0.32	10^{-4} (***)
	site	0.06	10^{-3} (***)		site	0.05	10^{-4} (***)
	interaction	0.06	10^{-4} (***)		interaction	0.01	$6x10^{-4}$ (***)
	Residuals	0.73	-		Residuals	0.63	-
Hellinger transformation	family	0.17	10^{-4} (***)	Hellinger transformation	family	0.37	10^{-4} (***)
	site	0.08	10^{-4} (***)		site	0.06	10^{-4} (***)
	interaction	0.06	10^{-4} (***)		interaction	0.01	$1.9x10^{-3}$ (***)
	Residuals	0.69	-		Residuals	0.57	-
	EcM fungal community						
(c)		**R^2**	**p-value**	**(d)**		**R^2**	**p-value**
Relative abundance	family	0.12	10^{-4} (***)	Relative abundance	family	0.34	10^{-4} (***)
	site	0.03	10^{-4} (***)		site	0.08	10^{-4} (***)
	interaction	0.04	10^{-4} (***)		interaction	0.01	0.09
	Residuals	0.82	-		Residuals	0.57	-
Hellinger transformation	family	0.13	10^{-4} (***)	Hellinger transformation	family	0.36	10^{-4} (***)
	site	0.04	10^{-4} (***)		site	0.09	10^{-4} (***)
	interaction	0.04	10^{-4} (***)		interaction	0.01	0.05
	Residuals	0.78	-		Residuals	0.57	-

Supplementary Table 3: Bipartite networks metrics and significance.
We constructed bipartite networks of interactions between EcM fungi and non-EcM plants at two taxonomic levels: fungal genera and plant families **(a)** fungal OTUs and plant species **(b)**. At each taxonomic level, we constructed one network for the Gaillac sites (local scale), one network for the sites across France (regional scale), and one network per site. We characterized their structure using several network metrics (specialization, modularity and weighted nestedness) computed with the *bipartite* R package. We then tested whether obtained values are significantly different than expected by chance using null models (Methods S3.3).

(a)	Genera/Families			
	H_2'	Q	wNODF	C
France	**0.80***	**0.56***	**14.6* (-)**	0.27
M1	0.89	0.35	1.35	0.67
F1	**0.87***	**0.59***	36.7	0.63
F2	0.59	0.41	45.5	0.52
F3	0.88	0.48	**32.2* (+)**	0.39
Gaillac	**0.44***	**0.33***	**47.5* (+)**	0.43
M2	**0.53***	**0.45***	51.6	0.60
F4	**0.50***	**0.41***	44.5	0.68
F5	**0.85***	**0.45***	**30.9* (-)**	0.63
MF1	**0.43***	**0.27***	**51.3* (+)**	0.49
MF2	0.38	0.26	40.6	0.47

(b)	OTUs/Species			
	H_2'	Q	wNODF	C
France	**0.85***	**0.73***	2.94	0.10
M1	**0.82***	**0.58***	19.9	0.37
F1	0.65	0.43	5.12	0.48
F2	**0.77***	**0.51***	5.64	0.47
F3	**0.82***	0.52	5.71	0.32
Gaillac	**0.64***	**0.55***	**22.1* (+)**	0.20
M2	**0.73***	**0.59***	8.32	0.28
F4	**0.77***	**0.52***	9.83	0.52
F5	**0.89***	**0.72***	4.75	0.30
MF1	**0.71***	**0.62***	**19.7* (+)**	0.25
MF2	**0.69***	**0.58***	**22.7* (+)**	0.40

Supplementary Table 4: Percentage of OTUs shared (or not) between rhizosphere and roots per species and their contribution to the EcM community.

For each species, we determined the percentage of OTUs found only in rhizosphere samples, shared between rhizosphere and roots and found only in roots (number on the left). We also computed the proportion of the EcM community that these represent (number on the right). For instance, 26% of EcM OTUs are shared between rhizosphere and roots samples of *A. maculatum*, but these represent 66% of the total EcM reads.

	Rhizosphere (%)	Shared (%)	Roots (%)	Total number of EcM OTUs
Arum maculatum	73 / 34	26 / 66	1.3 / <1	74
Convallaria majalis	29 / 20	60 / 80	10 / <1	48
Euphorbia sp.	49 / 7	49 / 93	2.3 / <1	43
Ficaria verna	30 / 31	62 / 69	8 / <1	37
Galium aparine	51 / 8	38 / 81	11 / 11	37
Mercurialis perennis	47 / 15	50 / 85	2.8 / <1	36
Poa sp.	25 / <1	65 / 99	10 / <1	40

Supplementary Table 5: Rhizosphere and roots have similar EcM mycobiota composition.
Outputs of the PERMANOVA analysis (*adonis2* function *vegan* R package) performed using both relative abundance and Hellinger transformed data with 10 000 permutations. The analyses were performed on the samples collected in the ORS and ORY sites. (a) Analysis of the total fungal community. (b) Analysis of the EcM fungal community. *species* corresponds to the plant host species and *compartment* to the plant compartment (rhizosphere or root). *interaction* is the interaction term between the two variables (*species* x *compartment*).

(a)	Variable	R^2	p-value	(b)	Variable	R^2	p-value
Relative abundance	species	0.16	10^{-4} (***)	**Relative abundance**	species	0.27	10^{-4} (***)
	compartment	0.06	10^{-4} (***)		compartment	0.02	0.12
	interaction	0.12	10^{-4} (***)		interaction	0.06	0.88
	Residuals	0.66	-		Residuals	0.65	-
Hellinger transformation	species	0.22	10^{-4} (***)	**Hellinger transformation**	species	0.23	10^{-4} (***)
	compartment	0.10	10^{-4} (***)		compartment	0.01	0.75
	interaction	0.10	10^{-4} (***)		interaction	0.06	0.98
	Residuals	0.57	-		Residuals	0.70	-

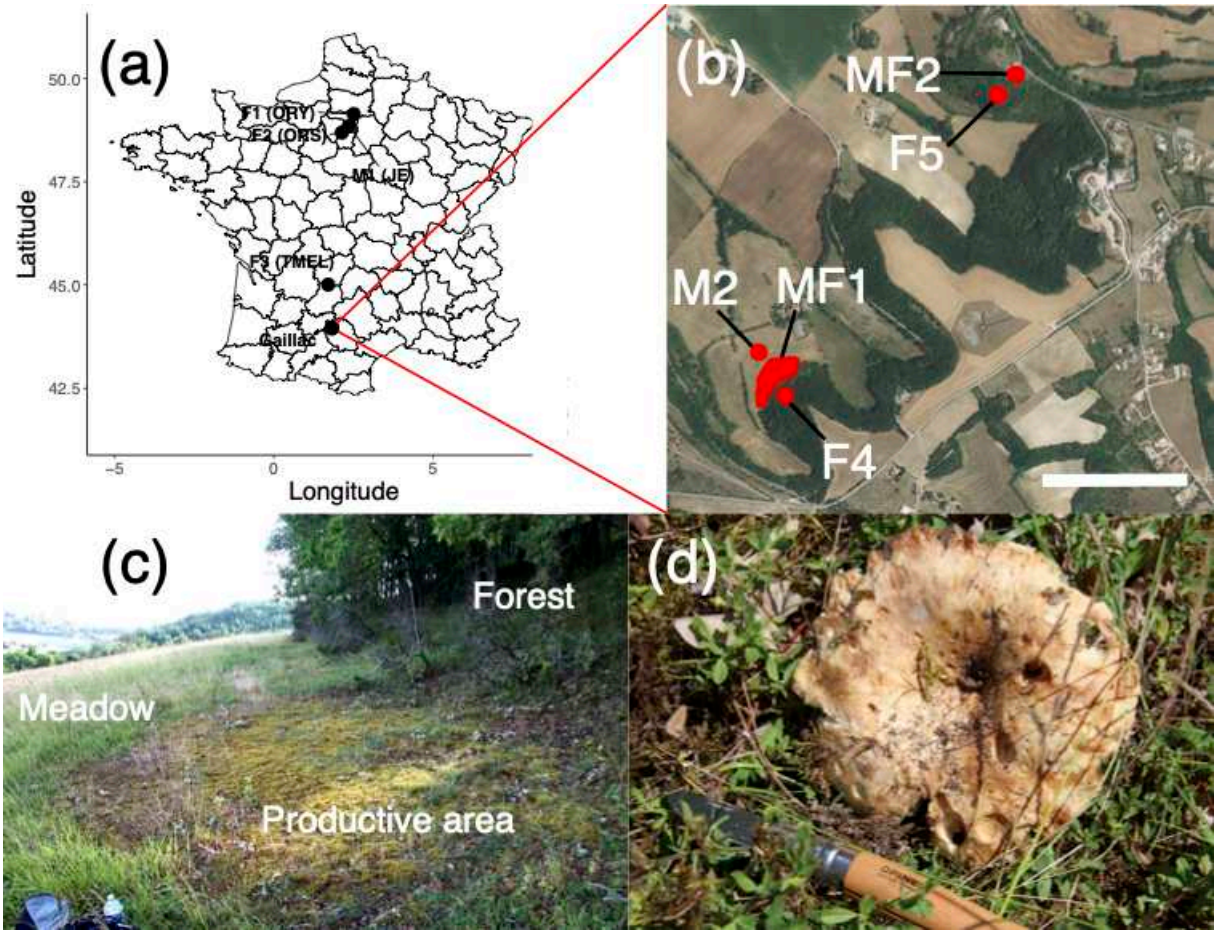
Supplementary Table 6: Results of the sensitivity and specificity test of the newly designed probes RUS899 and RUS101.
In order to test for the sensitivity and specificity of the newly designed probes RUS101 and RUS899, we hybridized fungi collected from pure cultures or from samples collected *in situ*. + and – signs characterize the intensity of the fluorescence signal.

Tested probes	***Phanerochaete* sp.**	***Lactarius quietus***	***Russula luteotacta***	***Russula* sp. *in vitro***	***Russula* sp. *in situ***	***Fungi* sp. 2 C2**	***Fungi* sp. 1 C1**
	Pure cultivated hyphae	Pure cultivated hyphae	Pure cultivated hyphae	Pure cultivated hyphae	Harvested ascocarp (cape)	Harvested Ascocarp	Harvested Ascocarp
EUK516	++	++	++	++	++	++	++
RUS101	-	+/-	+	-	+	NA	NA
RUS899	-	+(+)	+	+(+)	++	-	-
NONRUS506	NA	NA	NA	NA	-	-	-/+

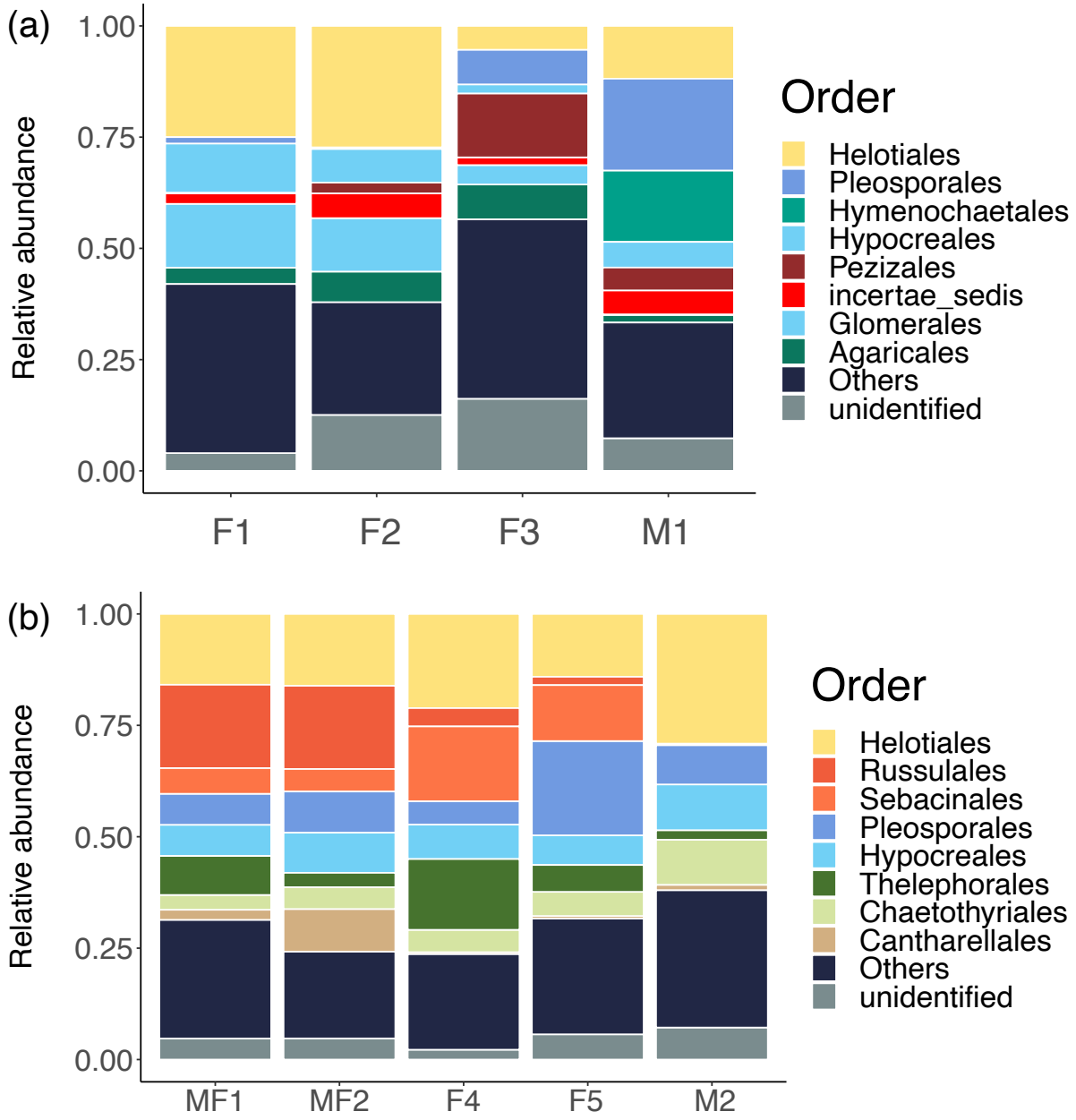
Supplementary Table 7: Details on plant host investigated for *FISH* detection collected.
Information regarding potential plant host investigated for the presence of *Russula* spp. hyphae. Plant species, sampling date, probes used for hybridization are given and whether *Russula* spp. hyphae could be identified within the roots.

Plant species	**Sampling date**	**Probes**	**Detection of *Russula* spp. hyphae (Y/N)**
Ranunculus bulbosus	Sept. 2021	Rus899-ATTO633/Euk51-ATTO565 & Rus101-ATTO633/Euk51-ATTO565	Y
***Carex* sp.**	Sept. 2021	Rus899-ATTO633/Euk51-ATTO565	N
E. amygdaloides	Sept. 2021	Rus899-ATTO633/Euk51-ATTO565	N
P. officinarium	Sept. 2021	Rus899-ATTO633/Euk51-ATTO565	N
	July 2023	Rus101-ATTO633/Euk51-ATTO565	Y/N
Carduus pycnocephalus	July 2023	Rus101-ATTO633/Euk51-ATTO565	Y

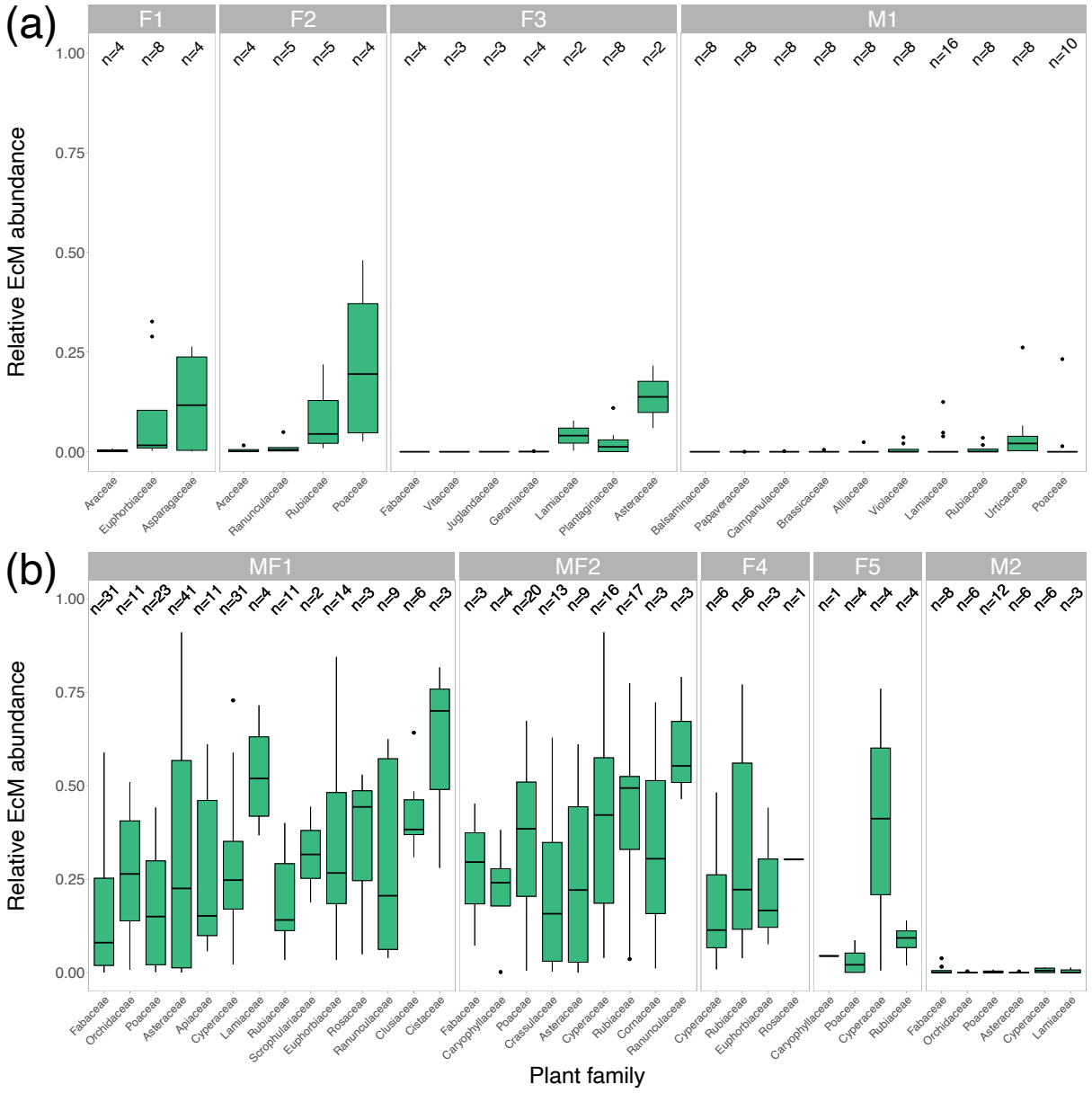
Supplementary Figures (1-11)



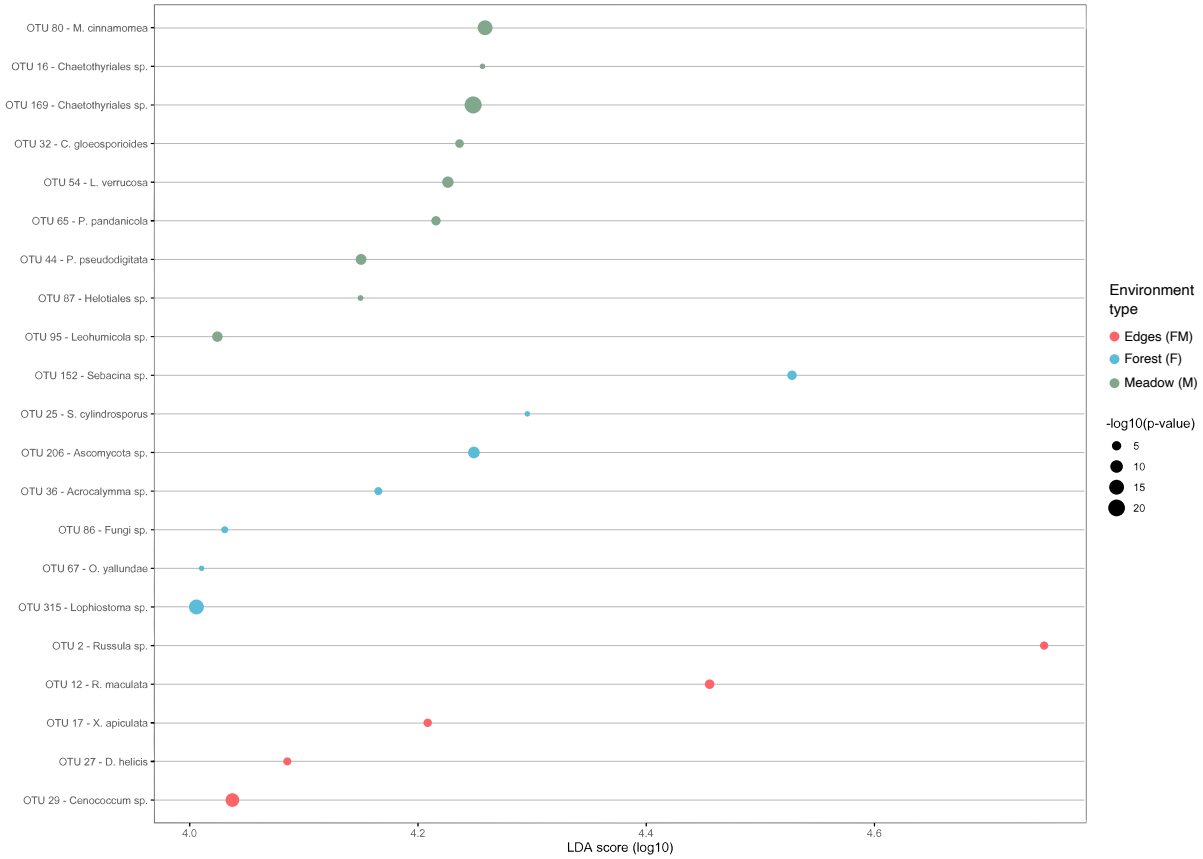
Supplementary Figure 1: Location of the sampling sites and details of the Gaillac sites. We sampled roots of non-EcM plant species in areas in several sites across France in forests (F) and meadows (M). In Gaillac, we also collected plants in edges of forests where abundant fruitbodies of *Russula* spp. were observed (MF). **(a)** Location of the sites in France. **(b)** Details on the location of the five Gaillac sites. Scale bar: 400 m. © IGN. **(c)** Area producing *Russula* spp. fruitbodies (MF) and the adjacent forest (F) and meadow (M). **(d)** *Russula* sp. fruitbodies observed in June 2021 when sampling non-EcM roots. F: Forest; M: Meadow; MF: forest edge.



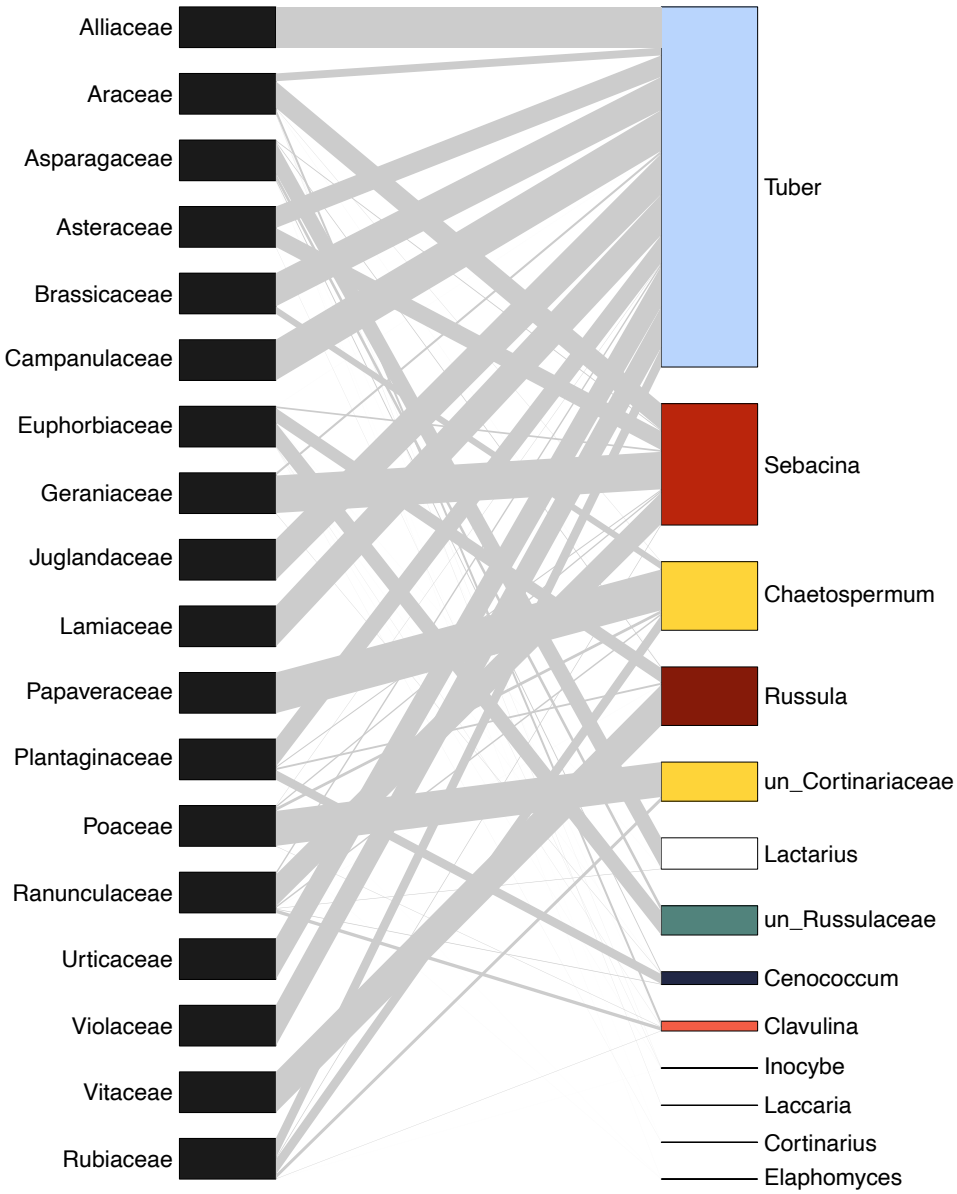
Supplementary Figure 2: Total root mycobiota of non-EcM plants harvested in several sites in France. We described the root mycobiota of several non-EcM plants species in 9 sites across France using ITS2 amplicon sequencing. **(a)** Root mycobiota of plants collected in four sites across France. F: forest; M: meadow. **(b)** Root mycobiota of plants collected in five sites near Gaillac, France. MF: sites at the edge of the forest; F: forest; M: meadow.



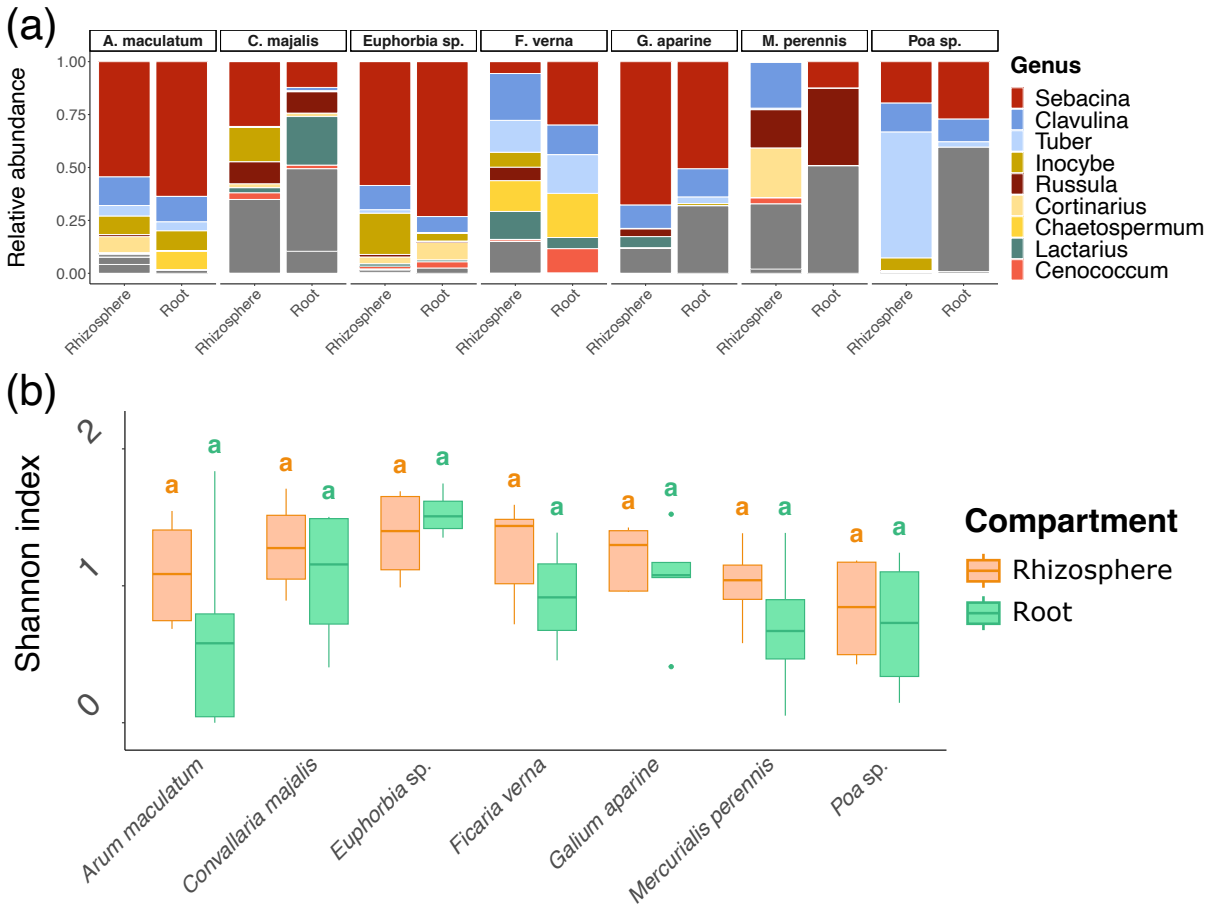
Supplementary Figure 3: The proportion of EcM fungi in roots of non-EcM plant roots varies according to the plant host family and site. Boxplot of the proportion of EcM fungi by host family and by location. **(a)** Non-EcM plants collected in the four sites across France. **(b)** Plants collected in the five Gaillac sites.



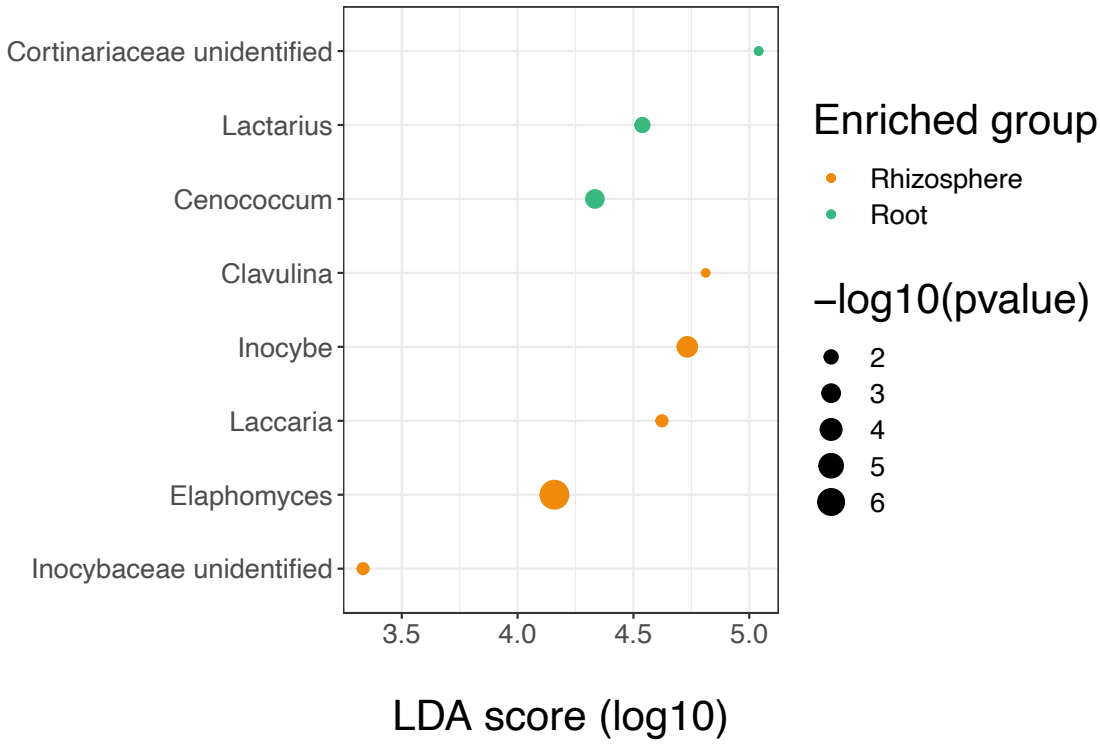
Supplementary Figure 4: Forests, meadow and forest edges from Gaillac sites are characterized by OTUs differentially abundant. Differentially abundant OTUs between the three environment types of Gaillac sites: forest, meadow and forest edges. The x-axis corresponds to the Linear Discriminant Analysis score (LDA score) computed with the LEfSE method, and the size of the dots is proportional to the p-value: -log(p-value).



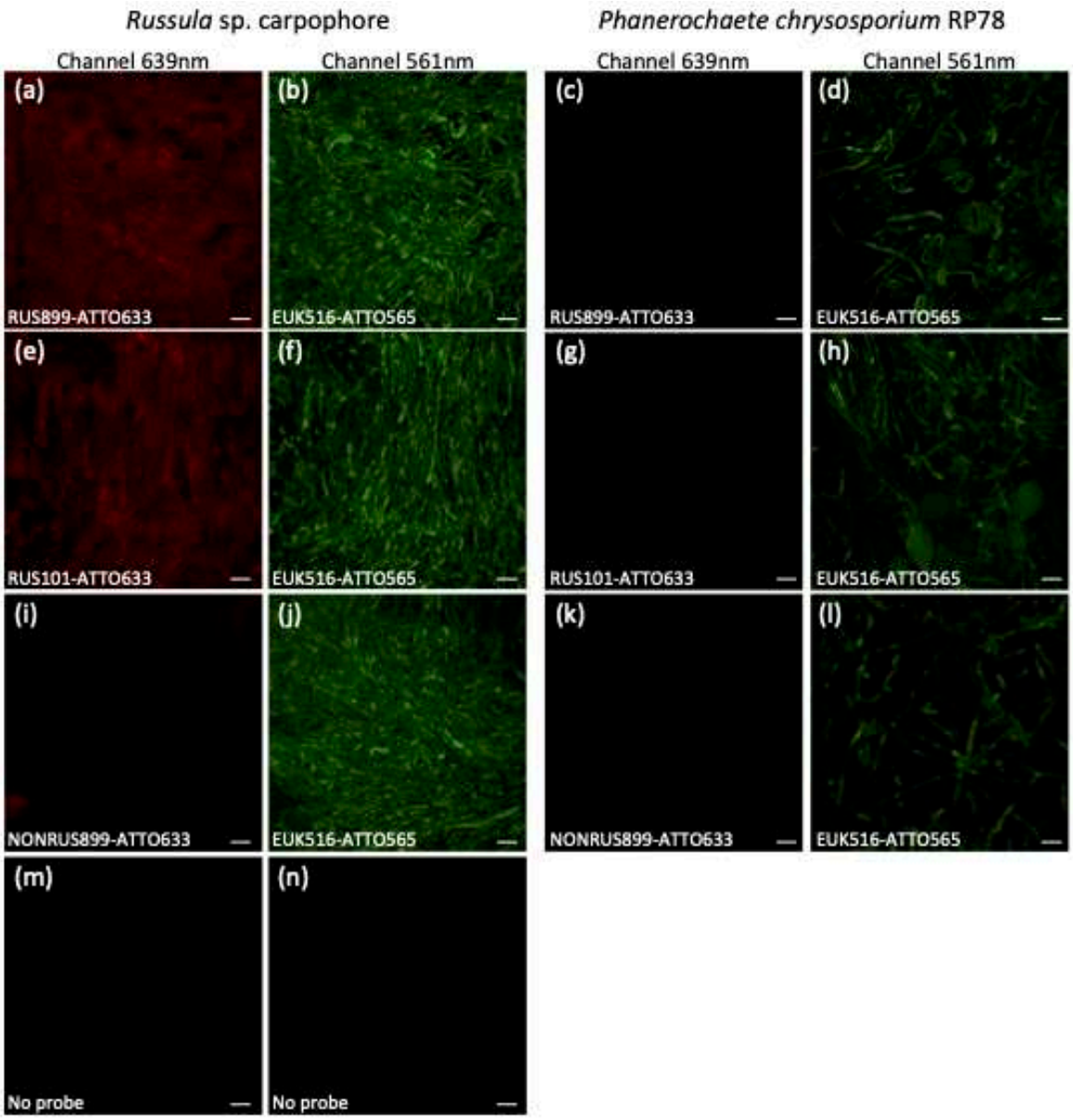
Supplementary Figure 5: Bipartite network of interactions between plant families and fungal EcM genera across the four sites in France (F1, F2, F3 and M1).



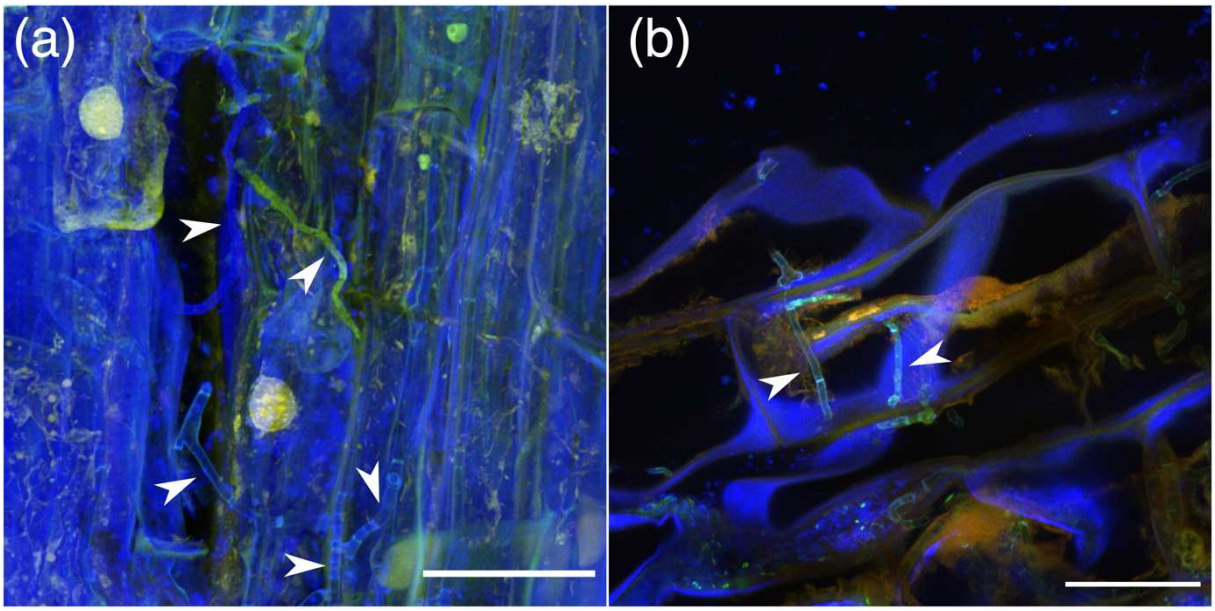
Supplementary Figure 6: Root and rhizosphere have similar EcM community composition and diversity. **(a)** EcM community composition of the rhizosphere and the roots of species collected in the F1 and F2 sites. **(b)** Shannon index of rhizosphere and root EcM community for the seven species collected in F1 and F2 sites. Different letters indicate significant differences in EcM diversity (*post-hoc* Tukey's test).



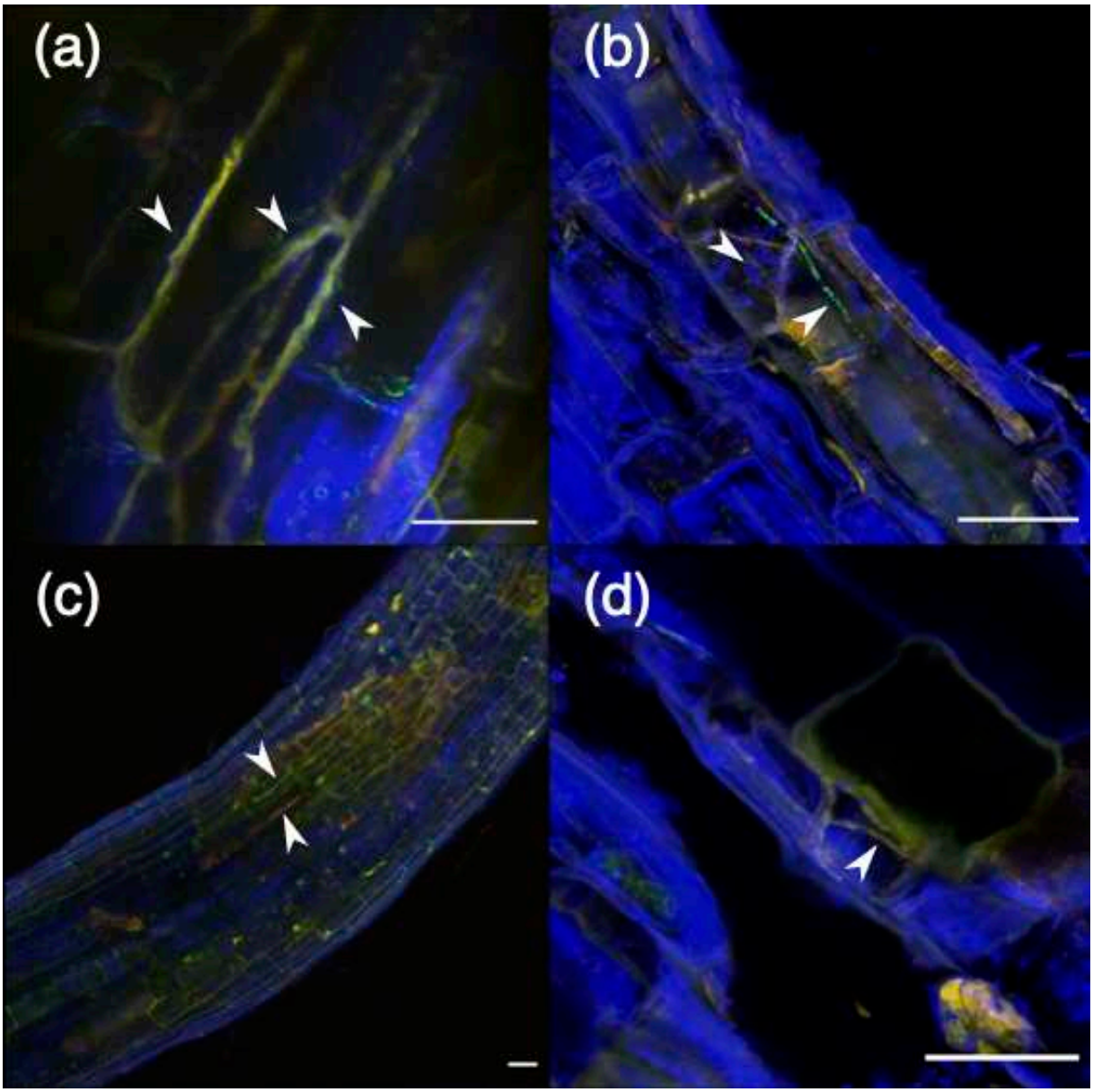
Supplementary Figure 7: Some EcM genera are differentially abundant in roots and rhizosphere. EcM genera significantly more abundant in roots or rhizosphere as computed using LEFsE procedure and their associated Linear Discriminant Analysis score (LDA; x-axis). The size of the dots corresponds to the log10 of the p-value computed by LEFsE.



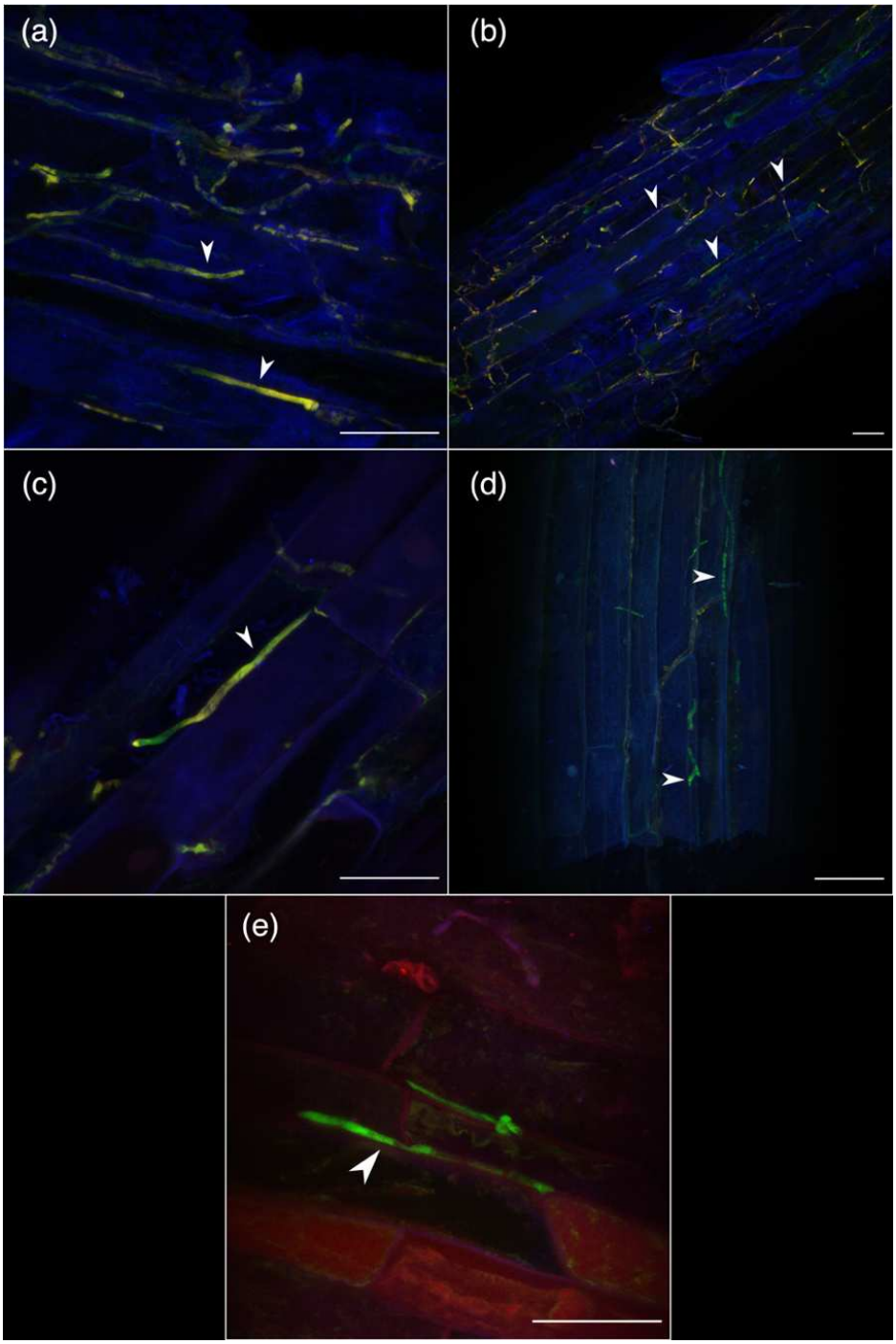
Supplementary Figure 8: The newly designed probes Rus889 and Rus101 hybridize *in situ* with fungi from the genus *Russula*. Evaluation of *FISH* probes targeting *Russula* 18S ribosomal RNA with ascocarps or cultivated hyphae fixed from *Russula* sp. (left panel) or *Phanerochaete* sp. (right panel), respectively. Co-hybridization experiments with (1) a non-specific probe targeting eukaryotic cells (EUK516, second column of each panel) as a positive control with high signal intensity in the cytoplasm of fungal hyphae in combination with (2) *Russula* probes; RUS899 (**a**-**b** and **c**-**d**) or RUS101 (**e**-**f** and **g**-**h**). For each co-detection, 2D images obtained from each single channel are presented. Hybridization with *Russula* probes (RUS899 or RUS101) showed selective hybridization on *Russula* ascocarp with a good signal intensity in fungal cytoplasm comparable to the positive probe EUK516, but not on hyphae from *Phanerochaete* culture. Hybridization with a nonsense probe (NonRUS899, **i**-**j** and **k**-**l**) or with a hybridization buffer without any *FISH* probe (**m** and **n**) demonstrates the absence of any fluorescence signal in the cytoplasm of fungal hyphae. *Russula* sense and nonsense probes are coupled with ATTO633 dye and EUK516 is coupled with ATTO565 dye. Identical laser power and gain detector were used for each image. Scale bars: 10µm.



Supplementary Figure 9: Observation of fungal hyphae in roots of *Carduus pycnocephalus* not hybridized with any *FISH* probe. (a), **(b)** Negative controls to evaluate auto-fluorescence. Samples were processed with the same protocol of hybridization (Methods S4) but probes were replaced by sterile water (only the SR2000 fluorescent dye was kept). Most of the hyphae observed had no cytoplasmic autofluorescence in the ranges of the generalist probe EUK516 (561 nm, green signal) and the *Russula* probes RUS899/101 (639 nm, red signal), except in few cases where we could observe a fluorescent signal in the range of the EUK516 probe (green), as in (a). In (b), the red signal corresponds to plant tissues' autofluorescence at 639 nm. Scale bars: 30 µm.



Supplementary Figure 10: Observation of *Russula* spp. hyphae in the roots of *Carduus pycnocephalus* and of hyphae of other fungal species with the sense and nonsense probes (controls). (a), **(c)** Roots of *C. pycnocephalus* harboring *Russula* sp. hyphae co-hybridized with the *Russula*-specific probe RUS101-ATTO633 (red signal) and with the generalist probe EUK516-ATTO565 (green signal). Co-hybridization appears in yellow/orange. **(a)** Co-hybridized hyphae in the apoplast of plant cells. **(c)** Fungal hyphae only hybridized with the generalist probe (green; top arrow) and *Russula* sp. co-hybridized hyphae (bottom arrow). **(b)**, **(d)** Nonsense controls: roots of *C. pycnocephalus* hybridized with the nonsense *Russula* probe NonRUS899-ATTO633 and the generalist probe EUK516-565. **(b)** We detected hyphae hybridized with the generalist probe (green signal, bottom arrow) and not hybridized at all (blue signal, top arrow). (d) Autofluorescence in the red spectrum was sometimes observed (green signal from the generalist probe + red autofluorescence; white arrow). Scale bars: 30 µm.



Supplementary Figure 11: Observation of *Russula* spp. hyphae in the roots of Ranunculus bulbosus and of hyphae of other fungal species with the sense and nonsense probes (controls). (a), **(b)** Roots of R. bulbosus harboring *Russula* sp. hyphae hybridized with the *Russula*-specific probe RUS899-ATTO633 (red) and with the generalist probe EUK516-565 (green). Co-hybridization therefore appears yellow. **(c)** Roots of R. bulbosus harboring *Russula* sp. hyphae hybridized with the *Russula*-specific probe RUS101-ATTO633 (red) and with the generalist probe EUK516-565 (green). Co-hybridization therefore appears yellow. **(d)** Roots of R. bulbosus harboring a fungal hypha hybridized with the EUK516-565 (green) probe but not with the *Russula*-specific probe RUS101-ATTO633 (red). **(e)** Nonsense control: fungal hyphae in the roots of R. bulbosus hybridized with the nonsense *Russula* probe NonRUS899-ATTO633 (red signal) and the generalist probe EUK516-565 (green signal). Hyphae do not display any red signal (NonRUS899-ATTO633), showing that there is no unspecific binding from the probe. The red signal corresponds to plant cell wall autofluorescence. Scale bar: 30 µm.

References

Amann RI, Binder BJ, Olson RJ, Chisholm SW, Devereux R, Stahl DA. **1990**. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology* **56**: 1919–1925.

Bahram M, Harend H, Tedersoo L. **2014**. Network perspectives of ectomycorrhizal associations. *Fungal Ecology* **7**: 70–77.

Bascompte J, Jordano P, Melián CJ, Olesen JM. **2003**. The nested assembly of plant–animal mutualistic networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**: 9383–9387.

Blüthgen N, Menzel F, Blüthgen N. **2006**. Measuring specialization in species interaction networks. *BMC Ecology* **6**: 9.

Chagnon P-L, Bradley RL, Klironomos JN. **2012**. Using ecological network theory to evaluate the causes and consequences of arbuscular mycorrhizal community structure. *New Phytologist* **194**: 307–312.

Di Battista C, Selosse M-A, Bouchard D, Stenström E, Le Tacon F. **1996**. Variations in symbiotic efficiency, phenotypic characters and ploidy level among different isolates of the ectomycorrhizal basidiomycete Laccaria bicolor strain S 238. *Mycological Research* **100**: 1315–1324.

Dormann CF, Fründ J, Schaefer HM. **2017**. Identifying Causes of Patterns in Ecological Networks: Opportunities and Limitations. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **48**: 559–584.

Dormann CF, Gruber B, Fründ J. **2008**. Introducing the bipartite package: analysing ecological networks. *interaction* **1**: 8–11.

Dormann CF, Strauss R. **2014**. A method for detecting modules in quantitative bipartite networks. *Methods in Ecology and Evolution* **5**: 90–98.

Fernandes AD, Macklaim JM, Linn TG, Reid G, Gloor GB. **2013**. ANOVA-Like Differential Expression (ALDEx) Analysis for Mixed Population RNA-Seq. *PLOS ONE* **8**: e67019.

Garcia K, Delaux P-M, Cope KR, Ané J-M. **2015**. Molecular signals required for the establishment and maintenance of ectomycorrhizal symbioses. *New Phytologist* **208**: 79–87.

Gloor GB, Macklaim JM, Pawlowsky-Glahn V, Egozcue JJ. **2017**. Microbiome Datasets Are Compositional: And This Is Not Optional. *Frontiers in Microbiology* **8**.

van der Heijden MGA, Martin FM, Selosse M-A, Sanders IR. **2015**. Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytologist* **205**: 1406–1423.

Kivlin SN, Mann MA, Lynn JS, Kazenel MR, Taylor DL, Rudgers JA. **2022**. Grass species identity shapes communities of root and leaf fungi more than elevation. *ISME Communications* **2**: 1–11.

Legendre P, Gallagher ED. **2001**. Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. *Oecologia* **129**: 271–280.

Lin H, Peddada SD. **2020**. Analysis of compositions of microbiomes with bias correction. *Nature Communications* **11**: 3514.

Martin F, Kohler A, Murat C, Veneault-Fourrey C, Hibbett DS. **2016**. Unearthing the roots of ectomycorrhizal symbioses. *Nature Reviews Microbiology* **14**: 760–773.

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.

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.

Montesinos-Navarro A, Segarra-Moragues JG, Valiente-Banuet A, Verdú M. **2012**. The network structure of plant–arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **194**: 536–547.

Nearing JT, Douglas GM, Hayes MG, MacDonald J, Desai DK, Allward N, Jones CMA, Wright RJ, Dhanani AS, Comeau AM, *et al.* 2022. Microbiome differential abundance methods produce different results across 38 datasets. *Nature Communications* **13**: 342.

Nguyen NH, Song Z, Bates ST, Branco S, Tedersoo L, Menke J, Schilling JS, Kennedy PG. **2016**. FUNGuild: An open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild. *Fungal Ecology* **20**: 241–248.

Nilsson RH, Larsson K-H, Taylor AFS, Bengtsson-Palme J, Jeppesen TS, Schigel D, Kennedy P, Picard K, Glöckner FO, Tedersoo L, *et al.* 2019. The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. *Nucleic Acids Research* **47**: D259–D264.

Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, Minchin PR, O'hara RB, Simpson GL, Solymos P, Stevens MHH, Wagner H. **2013**. Package 'vegan'. *Community ecology package, version* **2**: 1–295.

Olesen JM, Bascompte J, Dupont YL, Jordano P. **2007**. The modularity of pollination networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**: 19891–19896.

Op De Beeck M, Lievens B, Busschaert P, Declerck S, Vangronsveld J, Colpaert JV. **2014**. Comparison and Validation of Some ITS Primer Pairs Useful for Fungal Metabarcoding Studies (B Neilan, Ed.). *PLoS ONE* **9**: e97629.

Peay KG, Bruns TD, Kennedy PG, Bergemann SE, Garbelotto M. **2007**. A strong species–area relationship for eukaryotic soil microbes: island size matters for ectomycorrhizal fungi. *Ecology Letters* **10**: 470–480.

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, 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* **110**: 2568–2584.

Pichon B, Goff RL, Morlon H, Perez-Lamarque B. **2023**. Telling mutualistic and antagonistic ecological networks apart by learning their multiscale structure. : 2023.04.04.535603.

Plett JM, Daguerre Y, Wittulsky S, Vayssières A, Deveau A, Melton SJ, Kohler A, Morrell-Falvey JL, Brun A, Veneault-Fourrey C, *et al.* 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* **111**: 8299–8304.

Põlme 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.

Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahé F. **2016**. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* **4**: e2584.

Roy-Bolduc A, Laliberté E, Hijri M. **2016**. High richness of ectomycorrhizal fungi and low host specificity in a coastal sand dune ecosystem revealed by network analysis. *Ecology and Evolution* **6**: 349–362.

Schneider-Maunoury L, Deveau A, Moreno M, Todesco F, Belmondo S, Murat C, Courty P, Jąkalski M, Selosse M. **2020**. Two ectomycorrhizal truffles, *Tuber melanosporum* and *T. aestivum* , endophytically colonise roots of non-ectomycorrhizal plants in natural environments. *New Phytologist* **225**: 2542–2556.

Schneider-Maunoury L, Leclercq S, Clément C, Covès H, Lambourdière J, Sauve M, Richard F,

Selosse M-A, Taschen E. **2018**. Is Tuber melanosporum colonizing the roots of herbaceous, non-ectomycorrhizal plants? *Fungal Ecology* **31**: 59–68.

Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, Huttenhower C. **2011**. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biology* **12**: R60.

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

Selosse M-A, Petrolli R, Mujica MI, Laurent L, Perez-Lamarque B, Figura T, Bourceret A, Jacquemyn H, Li T, Gao J, *et al.* 2021. The Waiting Room Hypothesis revisited by orchids: were orchid mycorrhizal fungi recruited among root endophytes? *Annals of Botany*: mcab134.

Susana Rivera C, Eugenia Venturini M, Oria R, Blanco D. **2011**. Selection of a decontamination treatment for fresh Tuber aestivum and Tuber melanosporum truffles packaged in modified atmospheres. *FOOD CONTROL* **22**: 626–632.

Toju H, Guimarães PR, Olesen JM, Thompson JN. **2014**. Assembly of complex plant–fungus networks. *Nature Communications* **5**: 5273.

Toju H, Tanabe AS, Ishii HS. **2016**. Ericaceous plant–fungus network in a harsh alpine–subalpine environment. *Molecular Ecology* **25**: 3242–3257.

Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. **2012**. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* **40**: e115.

Uroz S, Courty PE, Oger P. **2019**. Plant Symbionts Are Engineers of the Plant-Associated Microbiome. *Trends in Plant Science* **24**: 905–916.

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.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. **1990**. AMPLIFICATION AND DIRECT SEQUENCING OF FUNGAL RIBOSOMAL RNA GENES FOR PHYLOGENETICS. In: PCR Protocols. Elsevier, 315–322.

Chapitre IV - Étude *in situ* des truffes et apports potentiels pour la production.

Si les champignons ont une importance majeure dans le fonctionnement des écosystèmes, certains sont également prisés pour leurs qualités organoleptiques. C'est le cas des truffes, des champignons ectomycorhiziens formant des carpophores prisés en gastronomie (Zambonelli & Bonito, 2012). Les champignons producteurs de truffes sont dits proto-domestiqués car nous sommes capables de favoriser leur production mais ne maîtrisons pas à ce jour leur reproduction (**I.4.2**). La compréhension des interactions entre la plante hôte et le champignon dépend fortement de l'étude *in situ* ou en plantations car nous ne sommes à ce jour pas capables de reproduire les conditions favorables à la reproduction sexuée du champignon *in vitro*, ni en mésocosme. Si les truffes étaient historiquement récoltées dans des zones spontanément productives, la mise en place de cultures se développe fortement, comme en atteste la croissance des ventes de plants mycorhizés (Murat, 2015). Ainsi, la production de truffes est à ce jour principalement réalisée dans des truffières (*e.g.*, *Tuber melanosporum*, *Tuber aestivum*) bien que le suivi de la production reste encore à ce jour un défi dans une filière peu organisée. Dans les zones arides du pourtour méditerranéen, la production de truffes du désert se développe également en plantation (en particulier des espèces des genres *Terfezia*, *Picoa* et *Tirmania* ; Morte *et al.*, 2021 ; Ferreira *et al.*, 2023). La réussite de la culture de truffes (du désert ou du genre *Tuber*) dépend de trois principaux groupes de facteurs : (i) l'établissement du champignon et de son hôte, (ii) la favorisation de la reproduction sexuée et (iii) le maintien dans le temps du champignon et de son hôte. La connaissance de l'écologie *in situ* du champignon d'intérêt et de ses hôtes potentiels est fondamentale pour déterminer les conditions favorables à sa production.

Les conditions édaphiques des sites naturellement productifs et les associations plantes-champignons naturellement observées *in situ* sont des informations clés pour identifier de futurs sites propices à la production et déterminer les hôtes favorables pour la production de plants mycorhizés. Afin d'évaluer le potentiel que présente la région d'AlUla pour le développement de la culture de truffes du désert, une culture nécessitant des apports hydriques limités (Morte *et al.*, 2021 ; Ferreira *et al.*, 2023), nous avons caractérisé le microbiote racinaire de populations d'*Helianthemum lippii* (Cistaceae) naturellement établies dans cette région. Nous avons également identifié des carpophores de *Tirmania nivea* dans certains de ces sites.

Tuber melanosporum est cultivée dans de nombreux pays d'Europe mais également hors de cette zone d'endémisme (Reyna & Garcia-Barreda, 2014 ; Hall *et al.*, 2017). Nous ne savons pourtant pas, à ce jour, initier la reproduction de ce champignon, mécanisme pourtant à l'origine de la production de carpophores (**I.4.2.2**). Les études de génétique des populations, de génomique, ou encore le suivi morphologique des structures potentiellement impliquées dans la reproduction ont permis de clarifier une partie du cycle de vie du champignon (Selosse *et al*., 2017) et d'émettre l'hypothèse que les spores présentes dans le sol sont impliquées dans la fécondation des individus dits maternels déjà en place. Cette hypothèse n'a été évaluée expérimentalement qu'à une seule reprise (Taschen *et al.*, 2022), démontrant un lien génétique entre spores apportées et truffes récoltées mais seulement dans un des trois sites étudiés. Au cours de cette thèse, nous avons analysé les résultats d'un dispositif expérimental similaire à celui de Taschen *et al.* (2022). Le dispositif étudié a été mis en place en 2018 au cours de la thèse de Laure Schneider-Maunoury : les truffes ont été récoltées au début du présent travail (saison 2019/2020). Cependant, les difficultés d'accès aux plateformes d'analyses biomoléculaires du Museum National d'Histoire Naturelle (en particulier durant la pandémie de COVID-19) ainsi que des difficultés techniques au cours des analyses moléculaires rendent ce travail très lacunaire. Nous discuterons toutefois des méthodes expérimentales afin d'améliorer la mise en place de futurs dispositifs similaires.

Finalement, comme nous l'avons vu au cours du **Chapitre III**, certains champignons ectomycorhiziens dont *T. melanosporum* sont capables de coloniser en tant qu'endophytes les racines des plantes herbacées présentent à proximité de l'hôte ectomycorhizien en tant qu'endophytes. Cette niche écologique secondaire semble favoriser le développement mycélien comme démontré en mésocosme par Taschen *et al.* (2020) : la présence de plantes non-ectomycorhiziennes autour de plants de chêne mycorhizés par *T. melanosporum* favorise le développement du champignon, suggérant que ce dernier peut puiser une partie de ses nutriments grâce à l'interaction endophyte. Le couvert végétal présent autour des arbres producteurs pourrait donc constituer une niche écologique secondaire favorable au développement de *Tuber melanosporum* et ainsi favoriser la production de truffes. Toutefois, le désherbage du pourtour des arbres est une pratique courante qui pourrait également favoriser le développement du mycélium durant les premières années de plantation (Olivera *et al*., 2011, 2014). Une expérimentation en partenariat avec des trufficulteurs bénévoles, l'IRTA (Espagne) et l'Instituto de Ciencias Agrarias (Espagne) a été initiée en 2019 afin d'évaluer l'impact de la végétation autour des arbres sur le développement du mycélium dans le sol et sur la production

de carpophores (**Annexes 2**). Cette expérience est toujours en cours, et quelques résultats préliminaires sont présentés en **Annexes 3**.

Si je dois aux truffes la découverte des interactions plantes-champignons et donc ma motivation pour la réalisation de cette thèse, leur étude a également été à l'origine des principales difficultés rencontrées au cours de ce travail. L'étude de la biologie reproductive de *Tuber melanosporum* a fait l'objet du stage de Master 2 réalisé par Julie Muller dans l'équipe INEVEF et que j'ai encadré. Je tiens à la remercier ici pour sa persévérance face aux difficultés rencontrées dans l'analyse moléculaire des truffes (**IV.2**), indépendantes de la qualité de son travail et de son investissement.

1. Les truffes du désert : écologie *in situ* et microbiote de l'hôte *Helianthemum lippii* dans la région d'AlUla.

1.1. Contexte et problématique de l'étude.

Les espèces de champignons formant des truffes du désert dont celles appartenant aux genres les plus prisés (*Terfezia*, *Picoa* et *Tirmania*) forment des ectendomycorhizes avec différentes espèces de Cistaceae, en particulier du genre *Helianthemum* (Díez *et al.*, 2002 ; Kovács & Trappe, 2014 ; Morte & Andrino, 2014). La culture de truffes du désert mise en place en Espagne depuis 1999 et dans d'autres pays du pourtour méditerranéen (*e.g.*, Israël, Tunisie) se base ainsi principalement sur la plantation de plants d'Hélianthèmes mycorhizés en pépinière (Morte *et al.*, 2008 ; Morte & Andrino, 2014). La culture des truffes du désert est adaptée aux conditions arides et semi-arides car elle peut se réaliser dans des sols pauvres en nutriments et nécessite des apports hydriques limités (Morte *et al*., 2021). Elle représente donc une alternative intéressante aux cultures irriguées, en particulier dans les régions où la consommation d'eau douce par l'agriculture est forte et amenuise les réserves naturelles, comme en Arabie Saoudite (Odnoletkova & Patzek, 2023). La région d'AlUla, au Nord-Ouest de l'Arabie Saoudite, est une oasis dans laquelle la culture de dattes est prédominante. Or, la culture de dattes est la première dépense en eau pour l'agriculture d'Arabie Saoudite, représentant 38% du volume d'eau agricole (Odnoletkova & Patzek, 2023). Le développement de telles cultures alternatives pourrait ainsi permettre de diversifier la production agricole dans la région d'AlUla tout en limitant l'utilisation d'eau douce. La production spontanée de truffes du désert, dans des populations naturelles d'Hélianthèmes, est attestée depuis longtemps dans la péninsule arabique (Bokhary & Parvez, 1992 ; Ammarellou *et al.*, 2014 ; Hashem *et al.*, 2018). Elle représente donc *a priori* une région propice pour le développement de la culture de truffes du désert.

Afin d'évaluer le potentiel de la région d'AlUla pour la production de truffes du désert, nous avons étudié l'écologie de populations naturelles d'*Helianthemum lippii*, en particulier la constitution de leur microbiote et les conditions édaphiques dans lesquelles elles se développaient. L'étude du microbiote racinaire des Hélianthèmes visait d'une part à déterminer si les populations d'Hélianthèmes locales étaient naturellement associées à des champignons formant des truffes du désert (et si oui lesquels), et d'autre part à identifier des membres du microbiote fongique et bactérien associés à la présence de truffes du désert. Afin de compléter ces données moléculaires, des observations microscopiques des racines ont été effectuées sur

racines entières d'Hélianthèmes. Nous avons finalement effectué un suivi sur certaines stations naturelles d'Hélianthèmes afin de déterminer si ces sites produisaient spontanément des carpophores de truffes du désert et si oui, de quelle(s) espèce(s).

1.2. Matériel et méthodes.

Nous avons identifié quatre populations spontanées d'Hélianthèmes dans la région d'AlUla (**Tableau IV.1**). Nous avons prélevé des racines et du sol rhizosphérique de plusieurs individus dans chacun des sites afin de caractériser leur microbiote par *metabarcoding* (**Tableau IV.1**). Nous avons séquencé l'ITS2 fongique afin de caractériser les communautés fongiques car ce marqueur favorise la détection des Dikarya (Ascomycota + Basidiomycota ; Op De Beeck *et al.*, 2014) dont font partie les genres de truffes du désert déjà observés dans la péninsule arabique (les genres *Terfezia, Picoa* et *Tirmania* appartiennent aux Ascomycota). D'autres travaux menés dans la région d'AlUla ont mis en évidence que certaines espèces supposées non-mycorhiziennes étaient potentiellement colonisées par des champignons mycorhiziens arbusculaires (Robin-Soriano *et al.*, en préparation). Nous avons de fait séquencé les communautés fongiques en utilisant le marqueur 18S pour identifier la présence de champignons basaux appartenant au sous-phylum Glomeromycotina (champignons mycorhiziens à arbuscules) ou encore des champignons ectomycorhiziens appartenant aux Endogonales (Mucoromycotina). Finalement, nous avons utilisé le marqueur 16S pour caractériser les communautés bactériennes associées aux Hélianthèmes. Les bactéries peuvent en effet améliorer le développement de la plante hôte (Gaiero *et al*., 2013), favoriser le développement de la symbiose mycorhizienne (Frey-Klett *et al*., 2007) ou encore participer à la production d'arômes par le carpophore (Splivallo *et al*., 2015). Navarro-Ródenas *et al.* (2016) ont ainsi isolé des souches bactériennes favorisant le développement d'*Helianthemum almeriense* et la mycorhization de *Terfezia claveryi* en pépinière. Les analyses moléculaires ont été réalisées comme présenté dans l'**Article I** (Maurice *et al.*, 2023).

Tableau IV.1 (ci-dessous) Prélèvements effectués pour caractériser le microbiote racinaire d'*Helianthemum lippii* dans quatre sites naturels de la région d'AlUla. Les analyses moléculaires et microscopiques réalisées sont indiquées. *Site sur lequel des carpophores apparentés à *Tirmania nivea* ont été observés.

Site	Nombre d'individus	Date de prélèvement	Marqueurs moléculaires	Nb. d'observations microscopiques
Sharaan*	15 (+ 5 sols nus)	Août 2021	ITS2	5
Sahary	10 (+ 5 sols nus)	Août 2021	ITS2	4
Al Buriekah	7	Mai 2022	ITS2 + 16S + 18S	-
Harrat	12	Mai 2022	ITS2 + 16S + 18S	-

Des observations microscopiques ont également été réalisées sur certains individus (**Tableau IV.1**) afin de déterminer leur statut mycorhizien. Le taux de mycorhization a été calculé comme suivant : *Nb. fragments mycorhizés*/*Nb. fragments total* x 100. L'intensité de mycorhization est calculée selon Trouvelot *et al.* (1986). Les caractéristiques physico-chimiques du sol ont été déterminées par fluorescence X (XRF) comme indiqué dans Maurice *et al.* (2023 ; **Article I**).

1.3. Résultats.

1.3.1. Caractérisation du mycobiote racinaire d'*Helianthemum lippii* par *metabarcoding*.

Nous avons caractérisé le mycobiote racinaire et rhizosphérique à l'aide du marqueur ITS2 pour 44 individus et à l'aide du marqueur 18S pour 19 d'entre eux (**Tableau IV.1**). Les communautés fongiques déterminées sur la base de l'ITS2 sont caractérisées par une forte proportion de Pezizales et Pleosporales, en particulier dans la rhizosphère et les racines (**Figure IV.1a**). Les échantillons de sol (nu et rhizosphérique) semblent présenter une part plus importante d'Eurotiales dans les sites de Sahary et Sharaan comparés aux sites d'Al-Buriekah et d'Harrat (**Figure IV.1**a). Dans ces deux derniers sites, nous avons également caractérisé le mycobiote racinaire et rhizosphérique à l'aide du marqueur 18S, révélant une part importante de Rhizophlyctidales (Chytridiomycota) dans le sol rhizosphérique et une forte proportion de Glomerales dans les racines d'*H. lippii* (**Figure IV.1**b).

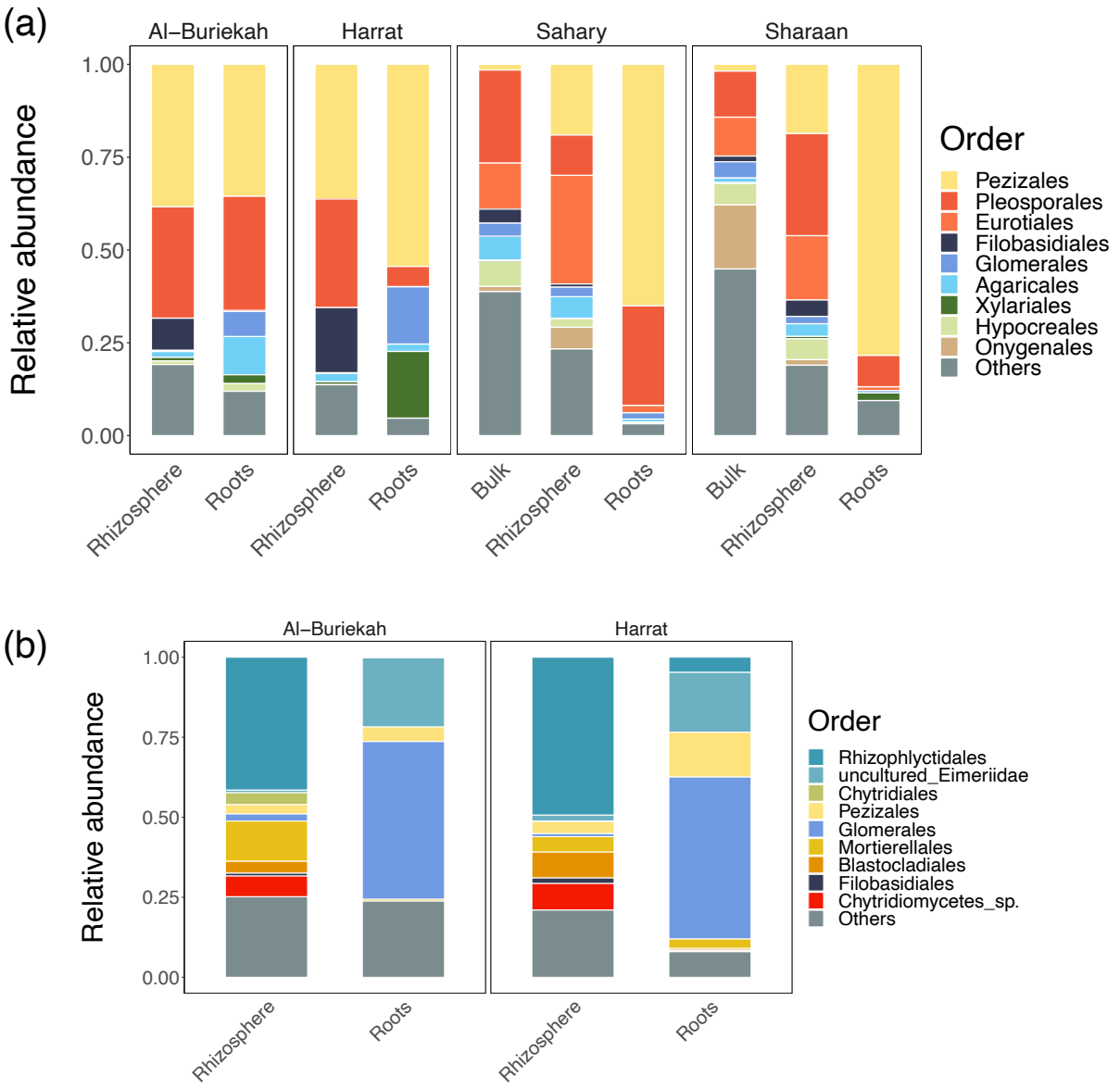


Figure IV.1 Composition du mycobiote racinaire de différents individus d'*Helianthemum lippii* prélevés dans des environnements naturels dans la région d'AlUla (Arabie Saoudite). (a) Composition du mycobiote déterminée par séquençage du marqueur ITS2, favorisant la détection de Diakary (Ascomycota + Basidiomycota). **(b)** Composition du mycobiote déterminée par séquençage du marqueur 18S, favorisant la détection de champignons basaux tels que les Glomeromycotina.

Afin d'évaluer l'influence du site et du compartiment sur la composition du mycobiote, nous avons réalisé des analyses de variances par permutation (PERMANOVA), en nous basant d'une part sur les abondances relatives des OTUs car cette méthode produit dans certains cas des résultats plus précis que la plupart des méthodes de transformation (McKnight *et al.*, 2019), et d'autre part sur la transformation *centered log-ratio* (clr) qui corrige la dispersion des variances des données de *metabarcoding* (Lloréns-Rico *et al.*, 2021). Les résultats obtenus avec ces deux méthodes étant similaires, nous ne présenterons ici que les valeurs obtenues à partir

des données d'abondance relative. Les différences entre groupes d'échantillons sont visualisées à l'aide d'ordinations (NMDS) présentées en **Figure IV.3**. Le compartiment a une influence significative forte sur le mycobiote, expliquant 21% de la variabilité dans le cas de l'ITS2 (R^2=0.21, $p<10^{-4}$) et 37% dans le cas du 18S (R^2=0.37, $p<10^{-4}$). En comparaison, l'influence du site est plus faible, quoique significative dans le cas de l'ITS2 (R^2=0.10, $p<10^{-4}$) contrairement au 18S (R^2=0.03, p=0.10). L'influence du site étudiée séparément pour les racines et la rhizosphère est toutefois plus importante : 22% de la variabilité du mycobiote racinaire étudié grâce à l'ITS2 est expliquée par le site (R^2=0.22, $p<10^{-4}$) contre 32% pour la rhizosphère (R^2=0.32, $p<10^{-4}$). A nouveau, la variabilité expliquée par le site dans le jeu de données 18S est plus faible (rhizosphère : R^2=0.13, p=3.2x10^{-3} ; racines : R^2=0.08, p=0.20).

Le séquençage des communautés fongiques d'*Helianthemum lippii* nous a également permis d'évaluer la présence d'OTUs fongiques appartenant aux genres *Terfezia*, *Tirmania* et *Picoa*. Nous avons ainsi identifié 6 OTUs assignés au genre *Picoa* et un OTU assigné au genre *Terfezia* (**Figure IV.2**). En assignant à nouveau les séquences de ces OTUs sur la base de données NCBI, nous avons pu préciser leur identité taxonomique. Les OTUs du genre *Picoa*, sur la base de leur séquence d'ITS2, appartiennent aux espèces *Picoa lefebvrei* (OTU2, OTU32, OTU315, OTU409) et *Picoa juniperi* (OTU12, OTU178). L'unique OTU du genre *Terfezia* (OTU156) n'a pas pu être identifié plus précisément. L'OTU2, assignée à *P. lefebvrei* est très majoritaire par rapport aux autres OTUs de champignons formant des truffes du désert et est présent dans les racines et la rhizosphère d'*Helianthemum lippii* dans les quatre sites étudiés, mais absent du sol nu de sites de Sahary et Sharaan (**Figure IV.2**).

Les truffes du désert représentent une part variable du mycobiote d'*Helianthemum lippii* qui varie entre compartiments (**Figure IV.4**). La proportion la plus élevée est observée dans les racines des individus prélevés dans le site de Sharaan (62±22% du mycobiote total), tandis que la proportion de truffes du désert dans le sol nu des sites de Sahary et Sharaan est nulle. Les racines présentent en général une proportion de *reads* assignés aux truffes du désert plus élevée que la rhizosphère, bien que la différence soit seulement significative dans le site de Sahary (**Figure IV.4**). La proportion de champignons formant des truffes du désert varie entre 35±25% à Al-Buriekah et 62±22% à Sharaan, bien que la variable « site » n'ait pas d'effet significatif sur la proportion de champignon formant des truffes du désert (régression linéaire, p=0.78).

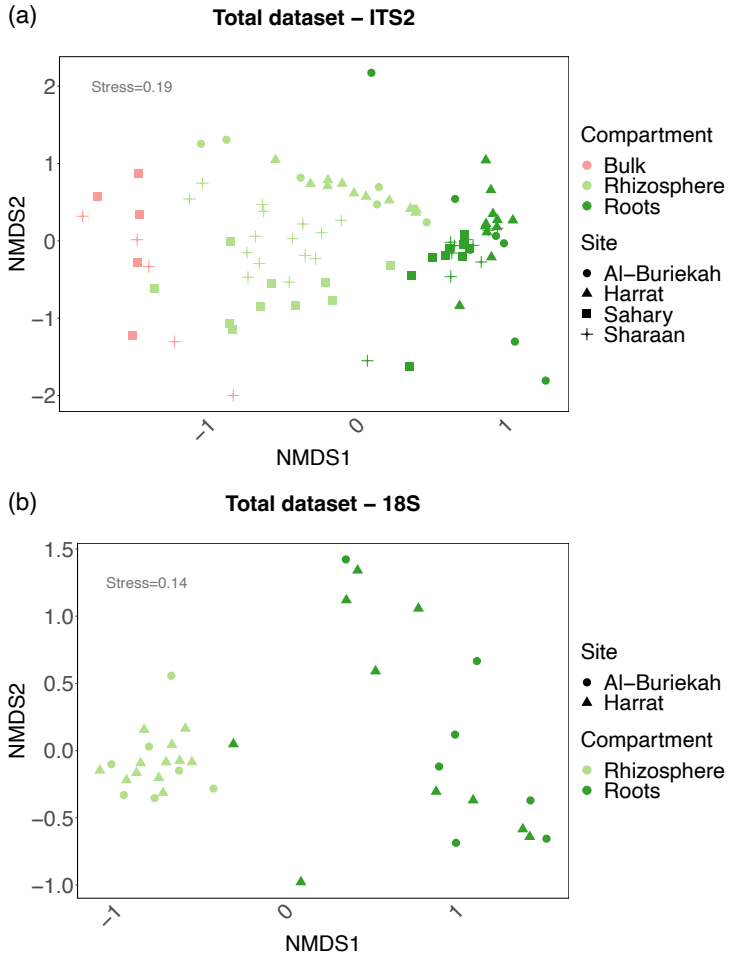


Figure IV.3 Le compartiment est le principal facteur influençant les différences de composition du mycobiote d'Helianthemum lippii. (a) *Non-metric multidimensional scaling* (NMDS) des communautés fongiques révélées par l'ITS2. **(b)** *Non-metric multidimensional scaling* (NMDS) des communautés fongiques révélées avec le marqueur 18S.

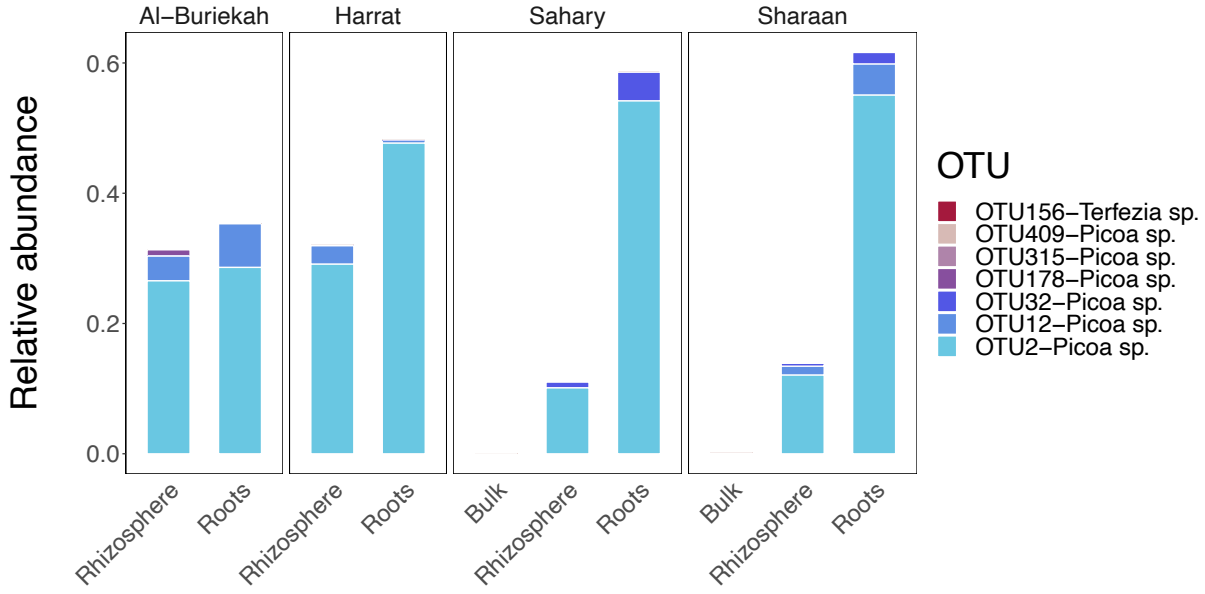


Figure IV.2 Abondance relative de séquences appartenant à des genres formant des truffes du désert associées à *Helianthemum lippii*.

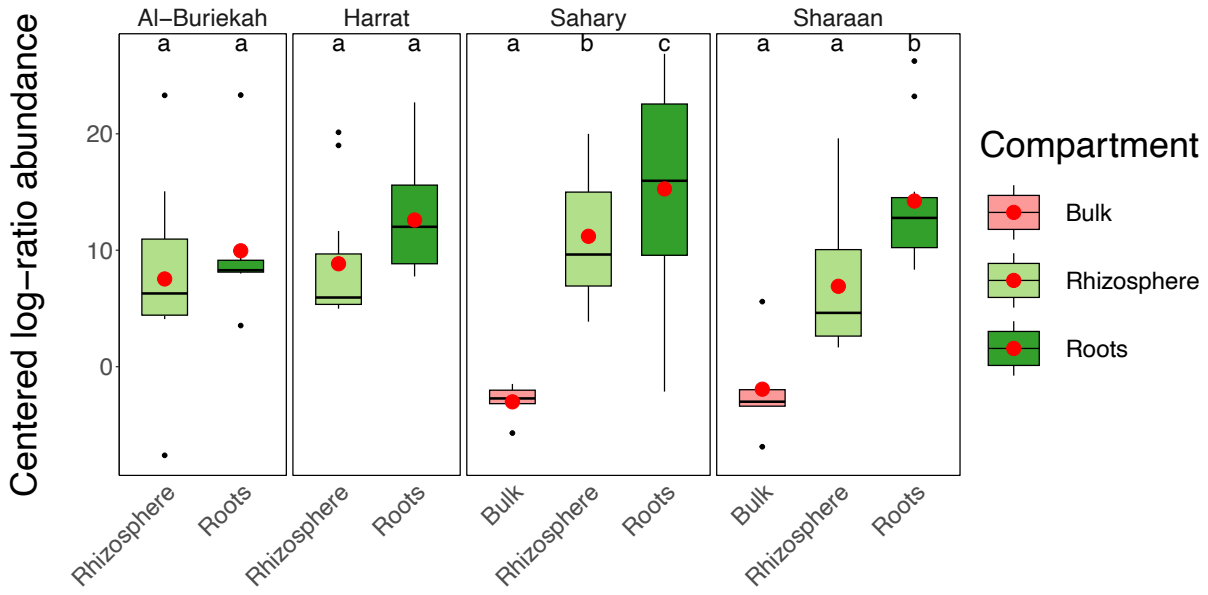


Figure IV.4 *Helianthemum lippii* présente une part variable de séquences de champignon formant des truffes du désert au sein de son mycobiote, en particulier entre compartiments. Boîtes à moustaches de l'abondance de séquences assignées aux genres formant des truffes du désert dans les compartiments *d'Helianthemum lippii*, préalablement transformées (*centered log-ratio*). Les points rouges correspondent à la moyenne. Les données transformées ont été utilisée pour évaluer la significativité des différences observées entre compartiments afin de respecter les hypothèses de normalité et d'homogénéité des variances. Des lettres différentes indiquent une différence significative au sein de chaque site (régression linéaire suivie du test *post-hoc* de Tukey).

Finalement, le séquençage des communautés fongiques associées à *Helianthemum lippii* a permis de mettre en évidence la présence inattendue de champignons appartenant aux Glomerales, un ordre de champignon formant des mycorhizes à arbuscules (**Figure IV.1b**), représentant une proportion importante du mycobiote racinaire (Al-Buriekah : 49±38% ; Harrat : 51±34%) mais très peu présents dans la rhizosphère (Al-Buriekah : 2.3±2.7% ; Harrat : 1.0±0.6%). La rhizosphère est en revanche caractérisée par une forte proportions de champignons appartenant à l'ordre des Chitrydiomycota (**Figure IV.1b**). Les deux compartiments présentent en effet des communautés significativement différentes (18S ; PERMANOVA ; R^2=37%, $p<10^{-4}$).

1.3.2. Observations microscopiques de structures mycorhiziennes dans les racines d'*Helianthemum lippii*.

Nous avons effectué des observations en microscopie optique de racines d'*H. lippii* afin d'identifier plus précisément les structures mycorhiziennes formées par les champignons identifiés par séquençage. Le taux de mycorhization par individu était relativement élevé (47-100%). Nous avons principalement observé des structures typiques de champignons mycorhiziens arbusculaires telles que des spores (8 individus sur 9), des vésicules (5/9) et, plus rarement, des arbuscules (2/9). Nous avons également observé quelques hyphes septés mélanisés (**Figure IV.5**). Nous n'avons cependant pas observé de formation de manteau autour des racines, structure observée de manière variable dans la colonisation ectendomycorhizienne.

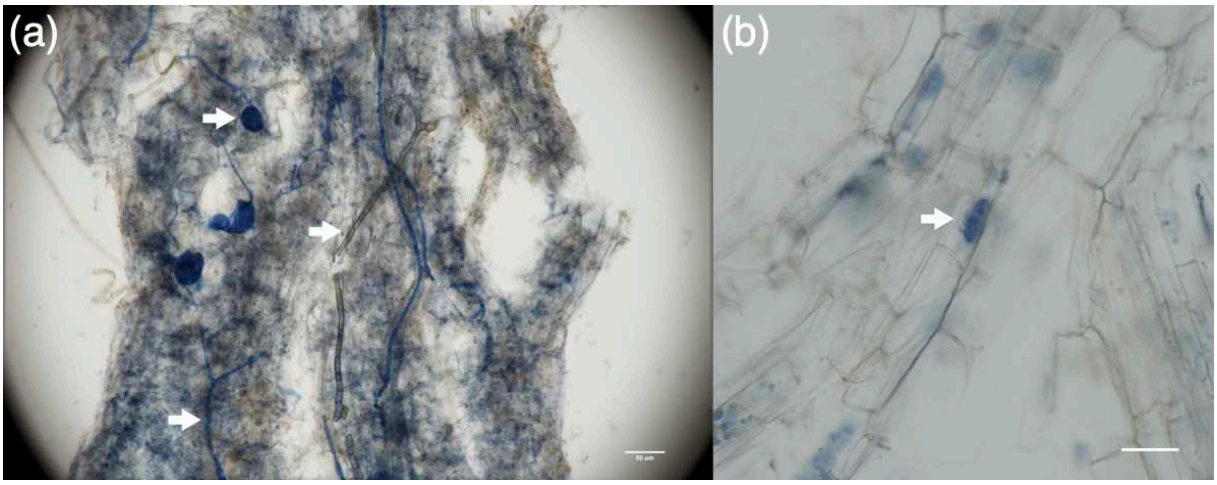


Figure IV.5 Observation en microscopie optique de racines d'*Helianthemum lippii* colorées au bleu Trypan dans le lacto-phénol d'Amman. (a) De haut en bas : vésicules ; hyphes septés mélanisés ; hyphes indifférenciés. Bar d'échelle : 50 µm. **(b)** Arbuscule dans une cellule racinaire. Bar d'échelle : 25 µm. Images : A. Robin-Soriano.

1.3.3. Observations de carpophores de truffes du désert dans le site de Sharaan et identification moléculaire.

La veille réalisée sur les quatre sites étudiés a permis de récolter des carpophores de truffes du désert dans le site de Sharaan. Quinze carpophores ont ainsi été récoltés en mars 2023. Ces derniers se développaient en position semi-hypogées (**Figure IV.6**). Leur péridium et leur gléba sont de couleur blanche, pouvant jaunir dans les zones de maturité des spores ou par contact. Les carpophores présentent tous un pseudo-stipe (ou pseudo-pied) permettant l'ancrage au sol mais de taille variable entre spécimens. La gléba contient des asques renfermant

8 spores dans la très grande majorité des cas (quelques fois 7). Les carpophores ont tous été récoltés à proximité d'individus d'*Helianthemum lippii* se développant dans ou proches d'axes de drainage en contrebas de massifs de grés (souvent désignés par les termes *wadi* ou *oued* selon les régions). Ces axes de drainage permettent l'écoulement de l'eau après les pluies.

Figure IV.6 Photographie d'un carpophore de *Tirmania nivea* en position semi-hypogée, dans la réserve naturelle de Sharaan, observé le 3 mars 2023. Ce carpophore se développe à proximité d'un individu d'*Helianthemum lippii*. Photographie : M. Ducousso.

Les éléments de la description morphologique des fructifications réalisée par M. Ducousso et présentés en **Annexe 4** suggèrent que ces carpophores appartiennent à l'espèce *Tirmania nivea*, avec un développement semi-hypogée atypique. Afin d'associer une séquence à l'identification de ces carpophores, nous avons séquencé la région ITS1 + 5.8S + ITS2 de l'opéron ribosomal de deux de ces carpophores à l'aide des amorces ITS5 (3'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-5' ; White *et al.*, 1990) et ITS4 (3'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-5' ; White *et al.*, 1990) et séquencé les produits PCR obtenus par séquençage Sanger (Eurofins, Germany). L'assignation taxonomique des séquences a été réalisée par BLASTn sur la base de données NBCI car les assignations réalisées sur la base de données UNITE se sont avérées de faible homologie (<90% d'identité de séquence). Ces assignations taxonomiques ont permis de confirmer l'appartenance des carpophores au genre *Tirmania*. Les deux carpophores présentent un très haut niveau de similarité avec certaines séquences assignées à *T. nivea* et d'autres assignées à *T. sahariensis*.

1.3.4. Caractérisation du microbiote bactérien d'*Helianthemum lippii*.

Nous avons caractérisé le microbiote bactérien d'*H. lippii* afin d'identifier de potentielles bactéries associées préférentiellement avec des champignons formant des truffes du désert ou spécifiques de sites présentant une production spontanée de truffes. Cette analyse est cependant toujours en cours et nous ne présenterons ici que des données issues des sites d'Al-Buriekah et de Harrat al Uwairid. La caractérisation du microbiote bactérien des individus d'*H. lippii* a été réalisée par Maurice *et al.* (en préparation) et sera à terme intégrée dans le but d'analyser le lien entre truffles du désert et bactéries. Nous pouvons toutefois observer que le microbiote bactérien des racines d'*H. lippii* est caractérisé par la forte abondance des phylums Proteobacteria, Bacteroida et Actinobacteria (**Figure IV.7**) également présents dans la rhizosphère mais en plus faible proportion (en particulier pour le phylum Actinobacteria). Le compartiment a une importance forte sur le microbiote bactérien (R^2=38% ; $p<10^{-4}$) en comparaison du site (R^2=6%, p=0,017). L'analyse conjointe des communautés bactériennes et fongiques, notamment par l'analyse de réseaux de co-occurrence, nous permettra d'identifier les potentielles associations préférentielles entre truffes du désert et bactéries.

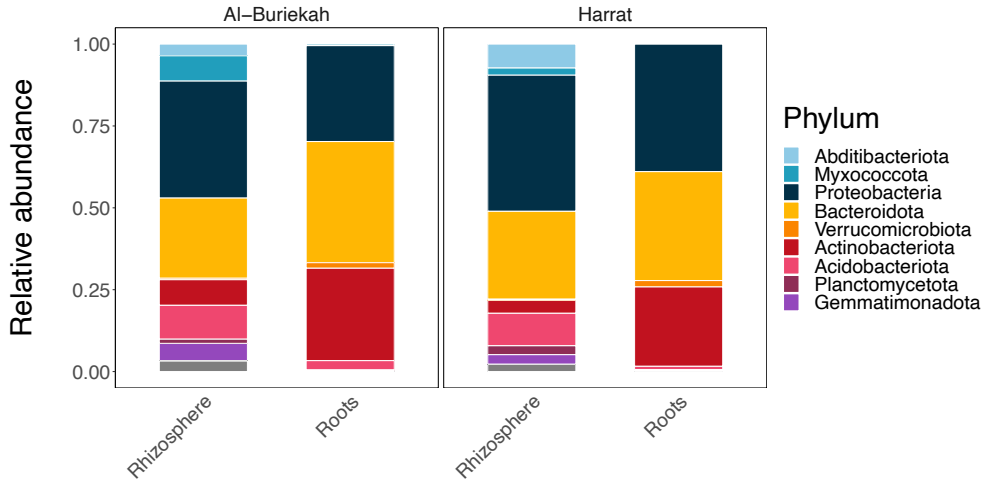


Figure IV.7 Communautés bactériennes identifiées dans les racines et la rhizosphère d'individus d'*Helianthemum lippii* par séquençage du marqueur 16S.

1.3.5. Conditions édaphiques.

Les quatre populations d'*H. lippii* que nous avons étudié se développaient toutes dans ou à proximité de zones d'écoulement d'eau temporaires localement dénommées *wadi*. Les

populations des sites de Sahary, Sharaan *et* Al-Buriekah se situent en contrebas de falaises de grès, tandis que la population étudiée dans le site de Harrat al Uwairid se situe sur un plateau basaltique d'origine volcanique. L'analyse en composantes principales réalisées à partir des données de XRF de ces sites semble suggérer que la teneur en silice du sol (Si) a une influence forte sur les différences de compositions en éléments entre les différents sites, le site situé sur le plateau de Harrat al Uwairid présentant la plus faible teneur en comparaison des trois autres sites (**Figure IV.8**). Le site d'Al-Buriekah semble présenter une plus grande variabilité, partiellement liée à des teneurs en aluminium (Al) plus importantes.

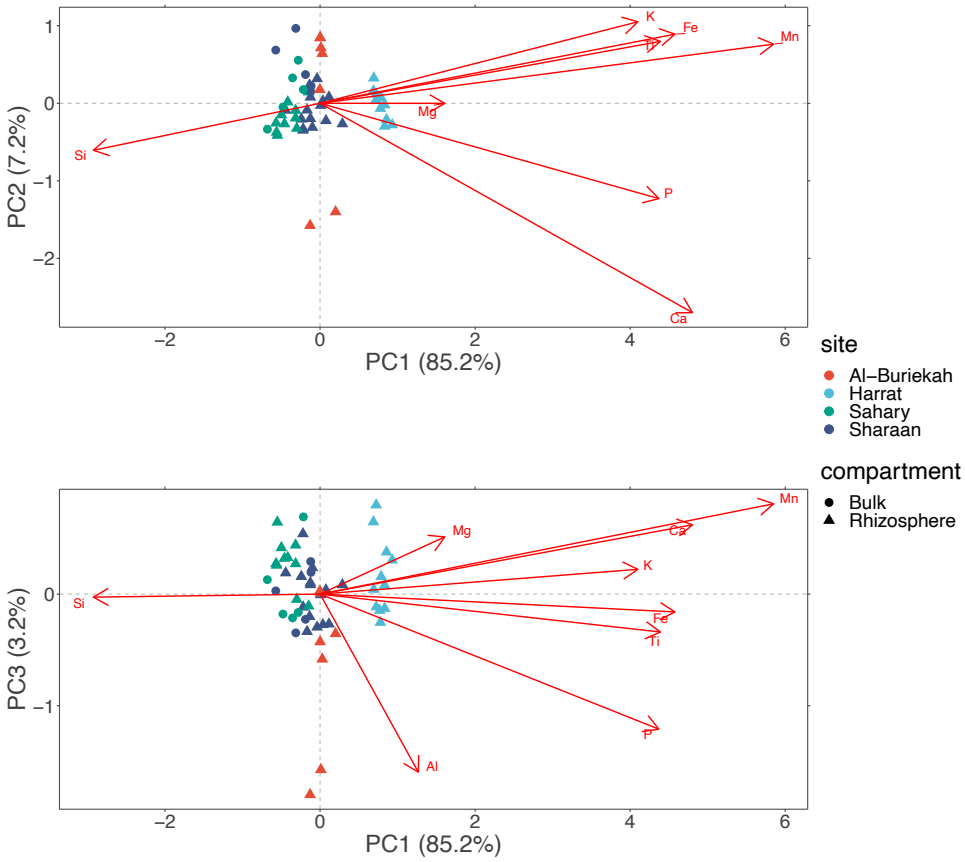


Figure IV.8 Analyse en composantes principales (PCA) de la composition en éléments du sol révélée par XRF. L'ordination est représentée avec les axes 1 et 2 (haut) et 1 et 3 (bas). L'axe 1 explique 85.2% de la variance observée, tandis que les axes 2 et 3 expliquent respectivement 7.2 et 3.2% de la variance. Les flèches rouges indiquent la contribution de chaque élément à la variance observées entre échantillons

1.4. Discussion.

Ce travail, dont l'analyse est toujours en cours, nous a permis d'identifier le développement spontané de carpophores de truffes du désert (*Tirmania nivea*) dans la région d'AlUla et de mieux caractériser le microbiote fongique et bactérien des racines d'*Helianthemum lippii in situ*, sans toutefois nous permettre d'identifier de séquences du genre *Tirmania* dans les échantillons étudiés. Les populations d'*H. lippii* se développent principalement dans des zones d'écoulement de pluies (*wadi*). Le régime hydrique semble donc être un facteur majeur dans l'établissement des populations d'*H. lippii*, et donc *a fortiori* la production de truffes du désert. Nous souhaiterions à terme explorer d'avantage le lien entre champignons et bactéries.

1.4.1. Une production spontanée de carpophores de *Tirmania nivea* dans la région d'AlUla.

Le suivi réalisé sur les quatre stations naturelles d'*Helianthemum lippii* étudiées au cours de ce travail a permis de mettre en évidence la production spontanée de carpophores de truffles du désert dans la réserve naturelle de Sharaan. La caractérisation taxonomique sur la base de critères morphologiques a permis d'assigner ces truffes à l'espèce *Tirmania nivea*, identification partiellement concordante avec les assignations moléculaire effectuées sur la base de la séquence ITS1+5.8S+ITS2. En effet, les séquences obtenues présentent un fort niveau d'homologie avec deux espèces proches : *Tirmania nivea* et *Tirmania sahariensis*, une espèce récemment décrite par Zitouni-Haouar *et al.* (2023). Certaines espèces du genre *Tirmania* ont déjà été observée dans la péninsule arabique, telles que *T. nivea* (Desf.) et *T. pinoyi* (Maire) (Hashem *et al*., 2018) tandis que *Tirmania sahariensis* a été principalement observée dans le nord de l'Afrique, bien que des spécimens aient été également observés au Koweït et au Qatar (Zitouni-Haouar *et al.*, 2023). L'obtention de séquences de plusieurs gènes à partir d'un nombre plus important de carpophores pourrait nous permettre de caractériser plus précisément l'affiliation taxonomique de ceux récoltés sur le site de Sharaan. A ce jour, le développement de la culture de truffes du désert concerne principalement des espèces du genre *Terfezia*, notamment *T. claveryi* et *T. boudieri* (Morte *et al*., 2021) et nous n'avons pas identifié d'essais de mise en culture d'espèces du genre *Tirmania*. La synthèse mycorhizienne en condition contrôlée

est toutefois possible, comme observé entre *H. guttatum* et *T. pinoyi* (Fortas & Chevalier, 1992). Des enquêtes dans les marchés locaux, ainsi que des essais réalisés par des chef.fes pourraient permettre d'identifier un intérêt potentiel en gastronomie pour la culture de *Tirmania nivea*.

1.4.2. Les espèces du genre *Tirmania* n'ont pas été observées dans le mycobiote d'*Helianthemum lippii*.

La caractérisation du mycobiote d'*Helianthemum lippii* nous a permis de montrer que cette espèce s'associait avec des champignons formant des truffes du désert, principalement du genre *Picoa*. Les racines récoltées présentent en effet une forte proportion d'OTUs apparentant au genre *Picoa*, l'OTU2 étant très majoritaire et affilié à *P. lefebvrei*. Étonnamment, nous n'avons identifié aucune séquence assignée au genre *Tirmania*, même dans le site de Sharaan où des carpophores de *Tirmania nivea* ont été récoltés en mars 2023. Les carpophores de *Tirmania* ont tous été récoltés à proximité d'individus d'*Helianthemum lippii* et nous n'avons pas observé d'autres espèces de plantes susceptibles de former des associations ectendo-mycorhiziennes avec *Tirmania* spp. autour des carpophores. Il est donc peu probable que les carpophores aient été produits par des champignons associés à d'autres hôtes qu'*Helianthemum lippii*. L'absence de séquences de *Tirmania* spp. dans les racines d'*H. lippii* pourrait en revanche être liée à des différences saisonnières. En effet, les échantillons de racines ont été prélevés au cours de la saison sèche (été 2021) à Sahary et Sharaan et au printemps de l'année 2022 pour Al-Buriekah et Harrat al Uwairid, année caractérisée par l'absence de pluies dans la région d'AlUla contrairement à 2023. L'activité biologique des microorganismes dépend très fortement des évènements de pluie en milieu aride (Schulze-Makuch *et al.*, 2018) et des différences importantes de composition de communautés fongiques ont été observées entre une année sèche et une année pluvieuse chez *Cistanthe longiscapa* (Montiaceae) dans le désert d'Atacama (Araya *et al*., 2020). Le régime hydrique semble également avoir une influence sur la mycorhization par certaines espèces formant des truffes du désert : Morte *et al.* (2010) ont par exemple observé en plantation qu'*H. almeriense* était plus fortement colonisée par *T. claveryi* en condition de stress hydrique. Le taux de mycorhization a toutefois été mesuré au printemps et n'a pas pu être mesuré à nouveau au printemps. Nos analyses pourraient à terme être complétées par le prélèvement conjoint de carpophores et de racines d'*H. lippii*. Les différences entre diversité fongique du sol et diversité des fructifications sont également courantes (Richard *et al*., 2004).

1.4.3. *Helianthemum lippii*, une espèce ectendomycorhizienne colonisée par des Glomeromycota.

Étonnamment, nous avons observé une forte abondance relative de Glomerales dans les racines d'*H. lippii*, en particulier grâce au marqueur 18S. Ces observations moléculaires ont été étayées par l'observation de structures typiques de mycorhizes arbusculaires en microscopie optique : nous avons en effet fréquemment observé des vésicules, et dans certains cas des arbuscules. La colonisation intracellulaire par les hyphes fongiques a déjà été observée chez plusieurs espèces d'*Helianthemum*, toutefois attribuée à des champignons formant des ectomycorhizes du phylum Ascomycota (Díez *et al.*, 2002 ; Kovács & Trappe, 2014 ; Morte & Andrino, 2014). En revanche, Read *et al.* (1977) ont observé la formation de structures typique de mycorhizes à arbuscules chez des jeunes plants d'*Helianthemum* spp. en Angleterre, sans toutefois préciser les structures observées (arbuscules, vésicules, spores). Les champignons impliqués dans la formation de ces structures n'avaient pas non plus été identifiés. Ces structures n'ont pas été observées chez les individus adultes, tandis que la formation d'ectendomycorhizes et la présence d'hyphes septés mélanisés étaient fréquentes. Les travaux de Read *et al.* (1977) pourraient donc suggérer que les jeunes plants sont initialement colonisés par des champignons mycorhiziens à arbuscules, remplacés par des champignons formant des ectendomycorhizes au cours du développement de la plante. Les observations que nous présentons ici ont toutes été effectuées sur des individus adultes et ne soutiennent donc pas cette hypothèse. Les espèces du genre *Helianthemum* pourraient donc former plusieurs types d'associations mycorhiziennes comme observé chez un grand nombre de genres et de familles de plantes (Teste *et al*., 2020). De manière alternative, la colonisation par les champignons mycorhiziens à arbuscules pourrait être une niche écologique secondaire pour ces champignons, au même titre que nous avons pu l'observer pour les champignons ectomycorhiziens (**Article III**). Nous ne savons toutefois pas à ce stade si la formation d'associations mycorhiziennes à arbuscules chez *Helianthemum lippii* est fonctionnelle ni mutualiste (Johnson *et al*., 2015). Les champignons mycorhiziens à arbuscules semblent en effet pouvoir coloniser de manière endophyte les racines de plantes ectomycorhiziennes (Brundrett, 2006). D'autres travaux menés dans la région d'AlUla ont mis en évidence que certaines plantes appartenant à des familles considérées alors comme non-mycorhiziennes, telles que les Amaranthaceae, pourraient également être colonisées par des champignons mycorhiziens à arbuscules, tels que *Haloxylon salicornicum* (Robin-Soriano *et al.*, en préparation ; Maurice *et al.*, en préparation). Notons ici que l'ensemble des prélèvements présentés dans cette étude, mais également ceux étudiés par

Robin-Soriano *et al.* (en préparation) et Maurice *et al.* (en préparation) ont été effectués en période sèche. Il est possible qu'après la période de pluie, les communautés fongiques associées aux racines d'*H. lippii* changent, avec une prédominance d'associations ectendomycorhiziennes. La présence de carpophores de *Tirmania nivea* en mars 2023 après une période pluvieuse favorise cette hypothèse. Par ailleurs, les travaux menés par Kilpeläinen *et al.* (2017) suggèrent que les champignons mycorhiziens à arbuscules colonisent de manière plus efficace les racines d'*Alnus incana*, une espèce formant des mycorhizes à arbuscules et des ectomycorhizes, en conditions de sécheresse. Les champignons mycorhiziens arbusculaires présenteraient une meilleure résistance aux conditions de sécheresse qui pourrait expliquer leur colonisation chez *H. lippii* en période de sécheresse.

1.4.4. Prochaines étapes : étude des liens entre truffes du désert et bactéries.

L'analyse conjointe du microbiote fongique et bactérien nous a permis de décrire les communautés bactériennes associées à *Helianthemum lippii* dans deux sites contrastés de la région d'AlUla : le site d'Al-Buriekah, au Nord d'AlUla est caractérisé par la présence de massifs de grés, tandis que le site du plateau du Harrat al Uwairid se situe sur un plateau basaltique. Pourtant, l'influence du site sur les communautés bactériennes est relativement faible, en particulier comparé à l'effet du compartiment (rhizosphère *vs*. racines). Les individus d'*H. lippii*, dans les deux cas, prospéraient dans des axes de drainages. L'apport hydrique semble donc fondamental dans l'établissement des populations d'*H. lippii* et les *wadi* pourraient former des îlots de fertilité (**Article I**). L'analyse des liens de co-variance entre bactéries et champignons symbiotiques pourrait permettre d'identifier des bactéries d'intérêt dans la formation de mycorhizes, tels que les *mycorrhiza helper bacteria* (Frey-Klett *et al*., 2007) et qui pourraient favoriser indirectement la production de truffes du désert. Or, comme nous l'avons vu ici, les truffes de *Tirmania nivea* identifiées en mars 2023 après des évènements de pluies n'ont pas été retrouvées comme champignon mycorhizien dans les racines d'individus d'*H. lippii* récoltées en période sèche. La récolte conjointe de racines d'*H. lippii* et de truffes du désert serait donc plus pertinente pour étudier les liens de co-variance entres bactéries et champignons mycorhiziens formant des truffes du désert. Chez *Helianthemum almeriense* et *T. claveryi*, Navarro-Ródenas *et al.* (2016) ont par exemple démontré que plusieurs souches bactériennes isolées à partir des racines de la plante, appartenant par exemple aux genres *Pseudomonas* et *Bacillus*, amélioraient la mycorhization et la croissance des plants en pépinière. L'étude du microbiote bactérien des carpophores de *Tirmania nivea* pourrait

également nous permettre d'identifier des bactéries impliquées dans la production de composés volatiles par les truffes du désert (Splivallo *et al*., 2015).

2. Rôle des spores dans la reproduction sexuée de la truffe noire du Périgord (*Tuber melanosporum*).

2.1. Contexte et problématique.

L'état des connaissances scientifiques sur la biologie et l'écologie de certains groupes de champignons formant des truffes est plus avancé que pour d'autres. C'est le cas par exemple des espèces du genre *Tuber* : ces connaissances ont permis de développer la production en plantation de certaines espèces de ce genre (Murat, 2015 ; Le Tacon, 2017 ; Hall *et al.*, 2017). La connaissance des interactions entre le champignon et ses hôtes *in situ* a entre autres permis le développement de méthodes de mycorhization en pépinière (chez *T. melanosporum* par exemple ; Chevalier & Grente, 1979) très largement utilisées de nos jours pour la production de plants mycorhizés (Murat, 2015). Certains aspects fondamentaux de l'écologie et de la biologie des espèces du genre *Tuber* ne sont toutefois toujours pas élucidés et ces lacunes limitent la maîtrise de la culture des truffes.

Les carpophores (ou truffes) sont issus de la fusion de deux hyphes présentant des types d'incompatibilités sexuels opposés ou *mating types* (souvent abrégé MAT ; Riccioni *et al.*, 2008 ; Martin *et al.*, 2010). La fusion ne peut avoir lieu qu'entre un individu présentant le *mating type* 1 (MAT1-1) et un individu présentant le *mating type* 2 (MAT1-2). Le type sexuel d'un individu est indépendant de sa contribution dans la reproduction. Nous pouvons en effet distinguer des individus dits maternels qui assurent la formation des tissus haploïdes nourriciers et protecteurs, tels que la gléba et le péridium, et des individus paternels dont la contribution n'est observable que dans le matériel génétique des spores haploïdes contenues dans la gléba. Le matériel génétique de ces dernières résulte en effet de la recombinaison du matériel génétique de l'individu maternel et de l'individu paternel. Les structures impliquées dans la reproduction, qu'il s'agisse des individus paternels ou maternels, n'ont toutefois jamais pu être observées et restent inconnues à ce jour.

En revanche, l'étude de l'écologie des individus maternels et paternels a permis de clarifier une partie du cycle de vie de *T. melanosporum* (Selosse *et al*., 2017). Les individus maternels, qui forment les tissus haploïdes du carpophore (gléba et péridium), forment également les ectomycorhizes environnantes et le mycélium du sol (Rubini *et al.*, 2011 ; Murat *et al.*, 2013). Ils peuvent aussi coloniser en tant qu'endophytes les racines de plantes herbacées voisines de l'hôte ectomycorhizien (Schneider-Maunoury *et al*., 2018, 2020). Les individus

maternels sont souvent de grande taille, persistent sur plusieurs années et sont impliqués dans la formation de plusieurs carpophores (Murat *et al.*, 2013 ; Taschen *et al.*, 2016 ; De la Varga *et al.*, 2017). Au contraire, les génét (*i.e.*, individus définis sur la base de marqueurs génétiques) paternels sont rarement détectés durant deux années consécutives, participent en général à la formation d'un faible nombre de carpophores et sont de petite taille (Taschen *et al.*, 2016 ; De la Varga *et al.*, 2017) suggérant un fort niveau de renouvellement annuel des individus paternels. En plantations et en truffière spontanées, les individus maternels et paternels proches spatialement sont également proches génétiquement (isolement par la distance ; Murat *et al.*, 2013 ; Taschen *et al.*, 2016 ; De la Varga *et al.*, 2017) et nous pouvons observer un fort niveau de consanguinité, suggérant que la reproduction sexuée à lieu entre individus proches spatialement et génétiquement. Finalement, la formation de zones de dominance d'un des *mating type* est courante autour des arbres producteurs, alors même que les plants produits en pépinière semblent présenter les *deux mating types* de manière équilibrée (Rubini *et al*., 2011). Or, rappelons-le, la fusion ne peut avoir lieu qu'entre des individus présentant des *mating types* opposés ; une telle dominance spatiale pourrait donc diminuer la probabilité de rencontre entre individus de *mating types* opposés et ainsi limiter la production de carpophores. L'ensemble de ces résultats suggèrent que les spores présentes dans le sol pourraient se comporter comme individus paternels : celles-ci présentent les deux *mating types*, sont présentes en grande quantité dans le sol (Schneider-Maunoury *et al*., 2019) et sont dispersées par des animaux tels que des limaces (Ori *et al*., 2021).

Bien qu'émise à plusieurs reprises (Taschen *et al.*, 2016 ; De la Varga *et al.*, 2017 ; Selosse *et al.*, 2017), l'hypothèse de la contribution paternelle des spores dans la reproduction sexuée de la truffe noire *T. melanosporum* n'a été évaluée expérimentalement qu'à une seule reprise par Taschen *et al.* (2022). En inoculant des spores de truffes autour d'arbres producteurs sous forme de « pièges » (*i.e.*, des apports localisés dans des trous de quelques dizaines de centimètres), une technique largement répandue chez les trufficulteurs, les auteurs de cette étude ont démontré que les spores pouvaient avoir une contribution génétique paternelle. Toutefois, ce lien génétique n'a pu être établi significativement que dans un des trois sites étudiés. Cette absence de lien génétique dans deux des trois sites étudiés pourrait être liée à une variabilité entre sites (*e.g.*, différences de distribution spatiale des *mating types*) mais également au faible contraste génétique entre truffes inoculées et mycélium déjà en place dans la truffière au moment de l'inoculation. Quoiqu'il en soit, d'autres expériences *in situ* sont nécessaires pour clarifier le rôle potentiel des spores dans la reproduction sexuée des truffes, dont *Tuber melanosporum*. Au cours de cette thèse, nous avons réalisé le génotypage de carpophores

récoltés après la mise en place d'une expérience similaire à celle présentée par Taschen *et al.* (2022). Toutefois, le faible nombre de carpophores récoltés dans les pièges et les difficultés rencontrées lors du génotypage de ces carpophores n'ont malheureusement pas permis d'obtenir de résultats exploitables.

2.2. Matériel et méthodes.

Afin d'évaluer la contribution des spores dans la production de carpophores, huit arbres producteurs ont été sélectionnés dans une truffière plantée, située sur la commune de Nant (Aveyron, France). Les brûlés (*i.e.*, zones le plus souvent circulaires autour des arbres producteurs caractérisées par une végétation herbacée peu dense et peu développée dans lesquelles les carpophores se développent) ont été divisées en quatre parties égales. Dans chaque quart, un piège à truffes a été mis en place, avec un inoculum contenant des spores de truffes ou non en alternance (un quart sur deux est donc inoculé). Les pièges sont des trous de 20cm x 20cm x 20 cm (hauteur, largeur, profondeur) dans lesquels ont été apportés un mélange de terreau et de vermiculite (témoins négatifs, deux par brûlés) ou un mélange de terreau, vermiculite et de broyat de carpophores de truffes (inoculum). La mise en place des pièges a été effectuée au printemps 2018, après la période de récolte de la saison 2017-2018, avant le début de cette thèse. Quelques truffes récoltées au cours de la saison 2017-2018 ont été conservées congelées afin de génotyper les populations déjà en place avant la mise en place de l'expérimentation. Toutefois, ces truffes ne proviennent en général pas des mêmes arbres que ceux choisis pour la mise en place du dispositif.

Trois carpophores prélevés à Rognes (Bouches-du-Rhône, France) ont été utilisés pour l'inoculation (soit plus de 200 km du site expérimental). Du fait des patrons régionaux d'isolement par la distance observés précédemment (Taschen *et al.*, 2016), ces truffes sont supposées génétiquement éloignées des populations déjà présentes dans la truffière de Nant. Chaque incolat a été utilisé sur plusieurs arbres (**Tableau IV.2**). L'effet des pièges étant observable deux années après l'inoculation (Murat *et al.*, 2016 ; Taschen *et al.*, 2016), les carpophores produits au cours de la saison 2019-2020 ont été récoltés pour génotypage.

2.2.1. Génotypage des carpophores

Extraction d'ADN des spores.

Le protocole d'extraction des spores a été adapté d'un protocole développé par Claude Murat à l'INRAe de Nancy. Les spores haploïdes présentent dans la gléba des carpophores sont d'abord isolées. Pour cela, nous avons coupé de fines lamelles de gléba, en évitant le péridium, placées dans des tubes Eppendorf 2mL et de l'eau Mili-Q stérilisée. Afin de mettre en suspension les spores, les tubes sont légèrement vortexés pendant quelques secondes. La phase liquide est ensuite transférée dans un nouveau tube et centrifugée à 14 000 rpm pendant 10 minutes. Le surnageant est ensuite jeté et remplacé par le tampon d'extraction du kit d'extraction Qiagen DNeasy Plant Kit (Qiagen, Allemagne). Le culot est broyé à l'aide de deux billes d'inox pendant 3x30s à 30Hz dans un Tissue Lyzer II (Qiagen, Allemagne) afin de libérer le contenu des spores. Le reste de l'extraction est réalisée en suivant les instructions du fabricant.

Extraction d'ADN de la gléba.

Nous avons extrait l'ADN de la gléba en utilisant le kit d'extraction REDExtract-N-Amp Plant PCR Kit (Sigma Aldrich, Allemagne). Une étape préliminaire de lavage au sorbitol a été ajoutée afin de limiter la présence d'inhibiteurs de PCRs dans l'extrait d'ADN : une petite quantité de truffes (environ $1mm^3$) est d'abord placée dans un tube Eppendorf 2 mL avec une solution de rinçage au sorbitol dont la constitution est présentée dans Inglis *et al.* (2018) : 100 mM Tris-HCl pH 8.0 ; 0.35 M Sorbitol ; 5 mM EDTA pH 8.0 ; 1% (w/v) Polyvinylpyrrolidone (Sigma Aldrich) et 1% v/v 2-mercaptoethanol. Le tube est ensuite vortexé, puis centrifugé pendant 5 minutes à 14 000 rpm. Le surnageant est jeté et le culot utilisé pour l'extraction d'ADN selon les instructions du constructeur.

Vérification de l'identité taxonomique des carpophores.

L'identité taxonomique des carpophores (appartenant *a priori* à l'espèce *Tuber melanosporum*) a été vérifiée par séquençage d'une portion de l'ITS2 à l'aide d'un couple d'amorce spécifique de *T. melanosporum* : MELf (5'-CACCTGTGGGAGATCTCTAT-3') et MELr (5'-TGTGACTGATCCAGGTCTTAT-3' ; Douet *et al.*, 2004). Les réactions PCRs ont

été effectuées avec la DFS-Taq DNA (Bioron, Allemagne) comme suit : dénaturation initiale de 5min à 95°C suivie de 35 cycles de 1min à 91°C, 1min à 55°C, 2min à 72°C ; puis une élongation finale de 5min à 72°C. La présence et la taille des produits PCRs ainsi obtenus ont été vérifiée par migration sur gel d'agarose à 2%. Les échantillons appartenant à *T. melanosporum* présentent une bande d'environ 400 paires de base sur gel après migration. Les amplifications ont été effectuées à partir de la gléba ou des spores pour chaque individu.

Détermination du type sexuel.

Afin de déterminer le type sexuel (MAT1-1 ou MAT1-2) des individus maternels et paternels, nous avons amplifié les deux gènes idiomorphes à l'aide des couples d'amorces p19-p20 pour MAT1-1 et p1-p2 pour MAT1-2 comme décrit dans Rubini *et al.* (2011). Le type sexuel est ensuite déterminé par migration des produits PCRs sur gel d'agarose : le couple d'amorce p19-p20 amplifie une région d'environ 421 pb tandis que le couple d'amorce p1-p2 amplifie une région de 550 pb. Les spores contiennent normalement les deux types sexuels, leur amplification permet donc de vérifier que les extractions d'ADN de spores ont bien permis d'obtenir l'ADN des deux génotypes haploïdes. Le type sexuel de la gléba correspond au type sexuel maternel. Par déduction, l'autre type sexuel correspond à celui de l'individu paternel.

Génotypage par séquençage de marqueurs microsatellites.

Nous avons génotypé la gléba et les spores des carpophores à l'aide de marqueurs microsatellites comme décrit par Schneider-Maunoury et collaborateurs (Schneider-Maunoury *et al.* 2018). Quinze marqueurs microsatellites couplés à des fluorochromes ont été amplifiés en multiplex (*i.e.*, plusieurs couples d'amorces par réaction PCR). La taille des produits PCRs a ensuite été déterminée à l'aide d'un séquenceur ABI (Gentyan, INRAe) : les produits PCRs sont séparés en fonction de leur taille par électrophorèse à capillarité puis leurs fluorochromes sont excités à l'aide de lasers. La taille des différents produits PCRs est alors reportée sur un chromatographe, calibré à l'aide d'un marqueur de taille de 25-500 pb (Liz-500, ThermoFisher, Angleterre). Les chromatographes ont été analysés à l'aide du logiciel en accès libre Osiris 2.15.1, afin d'associer chaque pic de fluorescence à une taille de microsatellite. Le génotype maternel est défini à partir des allèles détectés dans la gléba. Les spores présentent les génotypes paternels et maternels ; le génotype paternel est donc défini par déduction du génotype maternel et du génotype des spores. Chaque combinaison unique d'allèles pour les 15 marqueurs micro-

satellites correspond à un clone génétique ou multi-locus genotype (MLG). La définition des MLGs nécessite toutefois l'obtention des données pour chacun des marqueurs et des individus. Or, dans cette étude, l'analyse des carpophores ne nous a permis d'obtenir que des profils génétiques lacunaires, ne permettant pas la définition de MLGs.

2.3. Résultats et discussion

Sur les 8 arbres inoculés au printemps 2018, 251 carpophores ont été récoltés en 2020, dont seulement 18 provenaient des pièges mis en place en 2018 (**Tableau IV.2**). Ainsi, certains arbres ne présentaient pas ou peu de truffes récoltées dans les pièges, là où l'apport de spores a été réalisé. Le pourcentage de truffes récoltées dans les pièges est donc faible (de 0% pour les arbres n°2,3,5 et de 3,3 à 33,3% pour les arbres n°7 et n°4 respectivement). Seuls les arbres présentant strictement plus d'un carpophore récolté dans les pièges ont été retenus pour effectuer les analyses moléculaires, soit les arbres n°1, 4 et 8.

Tableau IV.2 Truffes récoltées et analysées sur les huit arbres inoculés. Les truffes inoculum A, B et C correspondent aux trois truffes utilisées comme inoculum dans les pièges.

	Arbre 1	Arbre 2	Arbre 3	Arbre 4	Arbre 5	Arbre 6	Arbre 7	Arbre 8	**Total**
Inoculum	A	A	A	B	B	C	C	C	**-**
Nb. de carpophores récoltés	41	31	27	9	23	31	29	42	**233**
Nb. de carpophores dans les pièges	4	0	0	3	0	0	1	10	**18**
Nb. de carpophores analysés	33	-	-	9	-	-	-	35	**77**

L'analyse génotypique des carpophores récolés en 2020 n'a malheureusement pas permis d'obtenir de profil génétique complet pour aucun des carpophores : aucun échantillon parmi les 77 retenus ne présentait une valeur d'allèle pour chaque marqueur microsatellite et pour le type sexuel. Différents protocoles d'extraction (gammes de quantité de carpophore utilisée pour l'extraction, ajout d'une étape de lavage au sorbitol, purification post-extraction) et d'amplification (dilutions des ADNs, essais de différents mélanges d'amorces pour les

réactions en multiplex) ont permis de déterminer des conditions d'analyses moléculaires plus efficaces (notamment grâce au lavage au sorbitol), mais n'ont toutefois pas permis d'obtenir des résultats complets. Afin d'évaluer si les difficultés rencontrées provenaient des méthodes utilisées et/ou des pratiques de laboratoire, des essais d'amplification indépendants ont été réalisés par Claude Murat (UMR IAM, INRAe) : des échantillons pour lesquels nous n'arrivions pas réussi à amplifier les gènes de type sexuel ont été analysé par C. Murat à l'aide de trois protocoles d'amplification différents : (i) le protocole d'amplification présenté par Rubini *et al.* (2011) et que nous avons également utilisé dans ce travail, (ii) un protocole d'amplification adapté à l'amplification en PCR digitale à gouttelettes (ddPCR) et (iii) un protocole d'amplification par PCR quantitative (Chen *et al.,* 2021). Les amplifications n'ont pas pu être réalisées à l'aide du protocole de Rubini *et al.* (2011) mais ont fonctionné à l'aide des protocoles en PCR digitale à gouttelettes et en PCR quantitative, suggérant que la quantité d'ADN présente dans les extraits était faible et/ou qu'ils présentaient une concentration importante d'inhibiteurs de PCRs. Si de tels protocoles peuvent permettre de déterminer le type sexuel des carpophores, ils n'ont à ce jour pas été adaptés au génotypage par marqueurs microsatellites.

Quoique partielle, la caractérisation génétique des truffes inoculum et des truffes récoltées sur la truffière expérimentale (avant et après inoculation) a permis de montrer que le contraste génétique entre truffes inoculum et truffes locales était faible. En effet, sur les quinze marqueurs microsatellites utilisés, seulement cinq présentaient un allèle observé uniquement chez les truffes inoculées. Pourtant, les truffes ayant servi d'inoculum ont été récoltées à plus de 200 km du site d'expérimentation ; du fait des patrons d'isolement par la distance observés à l'échelle régionale (Taschen *et al*., 2016) et ce même en ne considérant que des truffières plantées, un plus grand contraste génétique entre truffes inoculum et truffes récoltées dans la truffière de Nant était attendu. Les populations de truffes étudiées présentent en général une faible diversité génétique à l'échelle du site et un fort niveau de consanguinité (Molinier *et al.*, 2016 ; De la Varga *et al.*, 2017 ; Staubli *et al.*, 2022) et les patrons d'isolement par la distance à l'échelle régionale, bien que significatifs, sont plus faibles que ceux observés à l'échelle métrique au sein des populations. L'utilisation d'un nombre plus élevé de marqueurs microsatellites pourrait par exemple permettre une meilleure discrimination entre individus proches génétiquement et donc améliorer la puissance statistique de tests d'apparentements nécessaire à l'analyse de tels dispositifs expérimentaux (Taschen *et al*., 2022). L'utilisation d'autres marqueurs et de méthodes plus récentes permettant une caractérisation génétique plus précise des individus, tels que les polymorphismes mono-nucléiques (SNPs ; Helyar *et al.*, 2011) ou

encore le séquençage à haut débit de marqueurs microsatellites (Lepais *et al*., 2020) pourrait également permettre une caractérisation génétique plus fine des populations de truffes. Le séquençage du génome de certaines espèces de truffes telles que *Tuber melanosporum* (Martin *et al*., 2010), *T. magnatum*, *T. aestivum*, *Terfezia boudieri* (Murat *et al*., 2018), *T. claveriy* et *Tirmania nivea* (Marqués-Gálvez *et al*., 2021) ouvre la voie au développement de tels marqueurs.

Chapitre V - Discussion générale.

Au cours de cette thèse, j'ai étudié diverses facettes des interactions entre plantes et champignons, de l'écologie des communautés fongiques totales à la biologie de champignons d'intérêts, en milieux naturels *in situ*, dans des contextes de plantation et d'expérimentations *in vitro*. Les résultats obtenus apportent des informations sur l'écologie des interactions entre plantes et champignons, en particulier (i) sur l'écologie et la biologie des truffes dans des écosystèmes contrastés, (ii) sur les processus et facteurs d'assemblage des communautés fongiques des plantes et (iii) sur la plasticité écologique des interactions plantes-champignons mycorhiziens. Dans cette dernière partie, nous discuterons des résultats obtenus et les mettrons en perspective avec l'état des connaissances actuelles. Finalement, nous verrons en quoi ces connaissances sur l'écologie des interactions plantes-champignons peuvent nous éclairer sur l'évolution de ces interactions.

Plan détaillé de la discussion générale

1. Biologie et écologie des truffes en milieux tempérés et désertiques. 214

1.1. *Tuber melanosporum*, un champignon ectomycorhizien prisé toujours en quête de « pères ». 214

1.2. *Helianthemum lippii*, une espèce candidate pour la production de truffes du désert. 215

2. L'assemblage du mycobiote des plantes, un processus multifactoriel. 216

2.1. Assemblage du mycobiote et îlots de fertilité en milieu désertique. 218

2.1.1. Une distribution spatiale hétérogène des champignons du sol.

2.1.2. Transmission horizontale et verticale du mycobiote en milieu désertique.

2.2. Influence des communautés végétales sur le mycobiote racinaire. 223

2.3. Limites méthodologiques de l'évaluation des voies de transmission du microbiote. 223

3. Des niches mycorhiziennes préjugées ? 224

3.1. L'endophytisme chez les champignons mycorhiziens : une double niche écologique négligée. 225

3.1.1. Preuves de la double niche écologique ectomycorhize/endophytisme.

3.1.2. Double niche écologique et réseaux mycorhiziens communs.

3.2. Des écologies mycorhiziennes inhabituelles en milieu désertique. 229

4. Assemblage du mycobiote et évolution des interactions plantes-champignons. 230

4.1. L'endophytisme comme étape dans l'évolution des associations ecto-mycorhiziennes : l'hypothèse de la « salle d'attente ». 230

4.2. Évolution des interactions-plantes champignons et mécanismes de transmission des microorganismes. 232

1. Biologie et écologie des truffes en milieux tempérés et désertiques.

1.1. *Tuber melanosporum*, un champignon ectomycorhizien prisé toujours en quête de « pères ».

Les études réalisées *in situ* sur la génétique de populations de *Tuber melanosporum* ont permis de dessiner les contours du cycle de vie de ce champignon prisé (**IV.2**), sans finalement permettre de déterminer avec certitude quelles structures font office de « pères » pendant la reproduction sexuée. L'état des connaissances du cycle de vie de *T. melanosporum* a été rappelé au cours de cette thèse (**I.4.2**, **IV.2** et **Annexe 1** pour une version vulgarisée) et les études présentées convergent pour la plupart vers la même hypothèse : les spores présentes dans les fructifications pourraient agir comme partenaire paternel dans la reproduction sexuée. L'analyse que nous avons réalisée dans ce travail (**IV.2**) visait à tester la contribution génétique des spores dans la production de fructifications mais n'a malheureusement pas abouti. Taschen *et al.* (2022), dans un dispositif similaire, ont mis en évidence une contribution génétique des spores dans la reproduction de *T. melanosporum*, mais ce uniquement dans un des trois sites étudiés. L'absence de contribution génétique des spores dans les deux autres sites ne peut à ce jour être exclue. Toutefois, deux autres phénomènes pourraient participer à cette absence de lien génétique. Premièrement, les individus maternels sont souvent de grande taille et peuvent ainsi couvrir une grande partie de la surface des brûlés (Murat *et al.*, 2013 ; De la Varga *et al.*, 2017) créant des zones de dominance d'un des *mating types*. Ainsi, Chen *et al.* (2021) ont montré que les arbres non-producteurs ne présentent en général qu'un seul *mating type* autour de l'arbre alors que les arbres producteurs présentent dans la plupart des cas les deux *mating types* au sein du brûlé. L'effet de l'apport de spores *via* des pièges autour d'arbres producteurs présentant déjà les deux *mating types* en proportions similaires pourrait donc être limité et expliquer la variabilité du succès de cette méthodes observée par Taschen *et al.* (2022) et dans ce travail (**IV.2**). Deuxièmement, le faible contraste génétique entre truffes inoculées et truffes de ces sites affaibli le pouvoir statistique des tests permettant d'établir un potentiel lien génétique. Nous avons également observé un faible contraste génétique entre les truffes inoculées et les truffes du site étudié (**IV.2**) malgré des provenances éloignées : 200 km séparent en effet le site de prélèvement des truffes inoculées et la truffière expérimentale. Il faudrait donc améliorer le contraste du matériel génétique introduit. Chez *T. aestivum*, Staubli *et al.* (2022)

ont également observé à l'aide de marqueurs microsatellites un faible contraste génétique entre truffes au sein d'un même site. L'utilisation d'un plus grand nombre de marqueurs microsatellites pourrait permettre de caractériser avec plus de précision la diversité génétique au sein des populations de truffes. Il nous semble toutefois nécessaire d'envisager l'utilisation d'autres marqueurs et méthodes tels que les polymorphismes nucléotidiques (*single nucleotide polymorphism* ; Helyar *et al.*, 2011) et le séquençage à haut débit de marqueurs microsatellites (Lepais *et al*., 2020), qui pourraient permettre de détecter un plus haut niveau de polymorphisme au sein des populations. Les génomes de plusieurs espèces du genre *Tuber* sont disponibles (Martin *et al.*, 2010 ; Murat *et al.*, 2018) et pourront être utilisés comme ressources pour la conception de tels marqueurs.

L'utilisation de pièges pour évaluer expérimentalement la contribution en tant qu'individus paternels des spores nous semble indispensable. Les futures expériences de ce type devront cependant inclure des étapes de caractérisation supplémentaires. Tout d'abord, le contraste génétique entre les populations des truffières expérimentales et des truffes servant d'inoculum devrait être évalué avant la mise en place de tels dispositifs afin d'identifier les inoculums présentant le contraste génétique maximal avec chaque site. De plus, il nous semble fondamental d'évaluer la répartition des *mating types* autour des arbres choisis pour la mise en place de pièges car l'apport de spores (et donc des deux *mating types*) pourrait avoir un effet plus important en cas de déséquilibre entre *mating types*. Finalement, l'utilisation de méthodes permettant un génotypage plus fin des individus améliorerait le pouvoir statistique des méthodes évaluant le lien génétique entre truffes inoculées et truffes récoltées.

Une meilleure compréhension de l'écologie et de la biologie des truffes pourrait à terme permettre de mieux en maîtriser la production, notamment par le développement et la mise en place de protocoles aux champs (*e.g.*, influence du désherbage sur la croissance et la production de *T. melanosporum* ; **Annexes 2 et 3** ; évaluation de l'efficacité des pièges à truffes ; Taschen *et al.*, 2022 ; Garcia-Barreda *et al.*, 2023).

1.2. *Helianthemum lippii*, une espèce candidate pour la production de truffes du désert.

Afin d'évaluer le potentiel de la région d'AlUla (Arabie Saoudite) pour la production de truffes du désert, nous avons cherché à identifier *in situ* (i) la présence de champignons formant des truffes du désert en tant que partenaire mycorhizien d'*Helianthemum lippii*, la seule

espèce de Cistaceae identifiée dans la région et (ii) la présence de fructifications spontanées. Des fructifications de *Tirmania nivea* ont pu être identifiées à proximité d'individus d'*H. lippii* dans un des quatre sites étudiés (**IV.1**) mais ce champignon n'a pourtant pas été détecté dans les racines d'*H. lippii* et ce dans aucun des sites. Les échantillons caractérisés par séquençage de gènes marqueurs ont été collectés en période sèche en 2021 et 2022 alors que les fructifications ont été récoltées après la saison des pluies en 2023. Pour des raisons indépendantes de notre volonté (COVID-19 et conditions météorologiques), nous n'avons en effet pas pu effectuer de prélèvement de racines d'*H. lippii* en saison « humide » (après les pluies printanières). En revanche, le mycobiote d'*H. lippii* en saison sèche présente une forte proportion de *Picoa* spp., un autre genre de champignons formant des truffes du désert (Kovács & Trappe, 2014), et ce même dans le site producteur de *T. nivea*, suggérant une potentielle dynamique saisonnière dans les associations ectendomycorhiziennes d'*H. lippii*. De telles dynamiques d'associations ectomycorhiziennes ont déjà pu être observées dans des écosystèmes semi-arides (Taniguchi *et al*., 2018).

Par la suite, et ce malgré le caractère imprévisible des précipitations, le prélèvement conjoint de truffes du désert et de racines d'*H. lippii* au printemps nous permettrait d'affiner l'écologie mycorhizienne de cette plante arbustive en confirmant ou non la mycorhization d'*H. lippii* par *Tirmania nivea*. Au cours des différentes missions de prospections effectuées pour identifier des stations naturelles d'*H. lippii*, des partenaires locaux ont mentionné l'existence de zones de production et de culture de truffes du désert situées au Nord d'AlUla (région de Tabuk, Arabie Saoudite). Dans une perspective de développement de la culture de truffes du désert dans la région d'AlUla, il nous semble crucial de répertorier les pratiques et problématiques locales afin d'identifier les futurs axes de recherches (*e.g.*, production de plants mycorhizés, développement de méthodes d'irrigation, étude de la biologie reproductive des truffes du désert *etc.*).

2. L'assemblage du mycobiote des plantes, un processus multifactoriel.

Les processus et facteurs permettant d'expliquer l'assemblage du microbiote, dont sa composante fongique (le mycobiote), ont fait l'objet de nombreuses études qui ont permis de mettre en évidence l'importance de facteurs et de processus variés, à des échelles spatio-

temporelles différentes (**Figure V.1**). Au cours de cette thèse, nous avons évalué différents facteurs et processus pouvant influencer l'assemblage du mycobiote en milieux tempérés et désertiques. En milieu désertique, nous avons cherché à comprendre comment la présence d'espèces pérennes, formant des îlots de fertilité, influençait la composition du microbiote du sol (**Article I**), un réservoir majeur dans l'assemblage du mycobiote. Nous avons, dans un second temps, étudié la contribution de la transmission par les graines (transmission verticale) et par le sol (transmission horizontale) du mycobiote chez *Haloxylon salicornicum* (Amaranthaceae), une espèce pérenne courante de la péninsule arabique (**Article II**). En milieu tempéré, dans des communautés végétales plus complexes, nous avons observé que la colonisation endophyte des racines de plantes non-ectomycorhiziennes par des champignons ectomycorhiziens était favorisée par la proximité avec des hôtes ectomycorhiziens (**Article III**), suggérant une potentielle transmission horizontale du mycobiote entre espèces de plantes voisines.

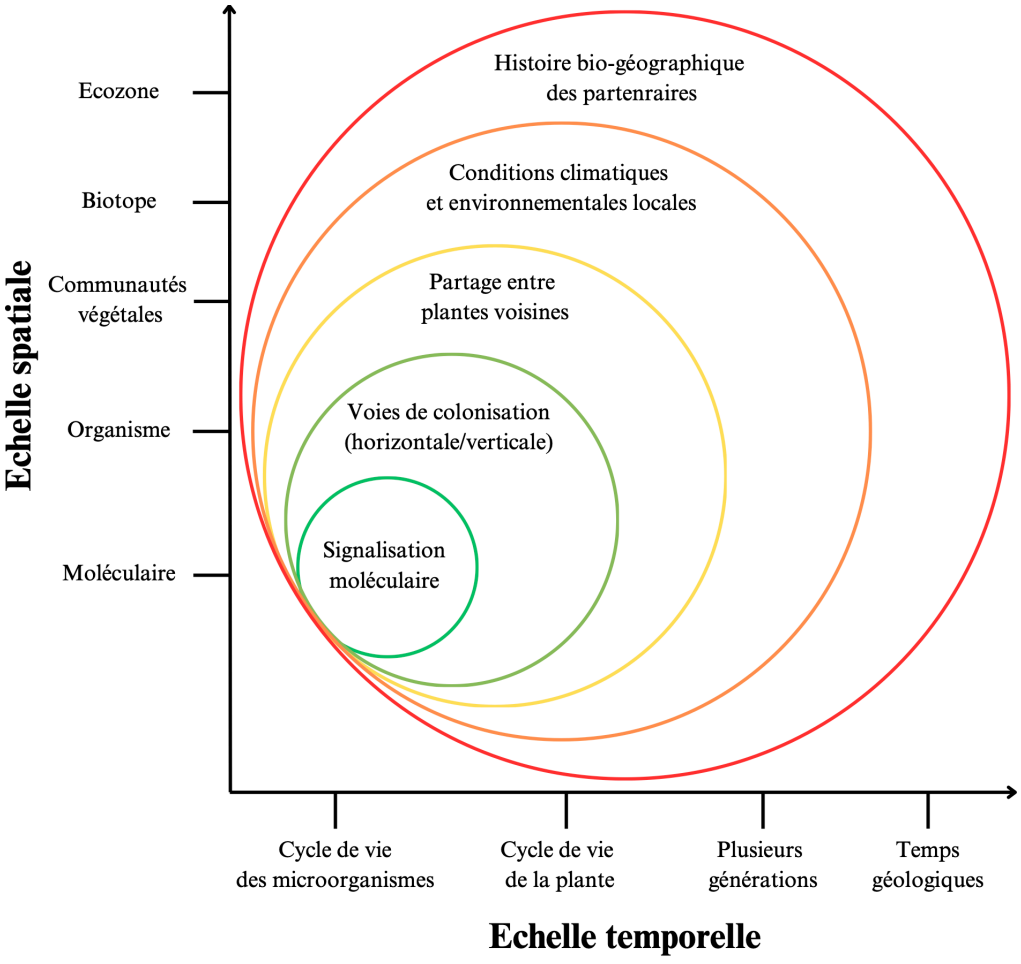


Figure V.1 Quelques exemples de facteurs et processus influençant l'assemblage du mycobiote, à des échelles de temps et d'espace variées.

2.1. Assemblage du mycobiote et îlots de fertilité en milieu désertique.

2.1.1. Une distribution spatiale hétérogène des champignons du sol.

La végétation des écosystèmes arides est souvent discontinue dans l'espace et dans le temps : elle est constituée d'espèces pérennes régulièrement espacées de plusieurs mètres et d'espèces annuelles au cycle de vie court, pouvant former un couvert végétal plus dense mais ne se développant qu'en cas de pluies. La grande majorité de l'année, le couvert végétal est donc peu dense, constitué d'individus d'espèces pérennes espacés les uns des autres, une distribution désignée comme distribution en îlots de fertilité (**Encadré 1**). Cette distribution des espèces végétales reflète une hétérogénéité spatiale dans la distribution des ressources du sol : le sol sous la canopée et à proximité des espèces pérennes présente en général des teneurs en nutriments plus élevées que le sol nu environnant (Schlesinger *et al.*, 1996 ; Titus *et al.*, 2002 ; Bachar *et al.*, 2012). Il est toutefois difficile d'affirmer à ce jour si la distribution hétérogène des nutriments du sol est à l'origine de la distribution des plantes en îlots de fertilité ou bien une conséquence d'une telle distribution. Les zones présentant de plus fortes concentrations en nutriments pourraient en effet favoriser l'établissement d'espèces pérennes, tandis que la présence de ces dernières peut augmenter la concentration de nutriments dans le sol par la formation d'une litière, la production d'exsudats racinaires, ou encore en format des refuges pour la faune.

Dans **l'Article I**, nous avons montré que la diversité microbienne du sol des îlots de fertilité est plus importante que celle du sol nu environnant. Ces différences sont toutefois plus marquées pour les bactéries (marqueur 16S) que pour les champignons (marqueurs ITS2 et 18S). En comparaison avec le sol nu, le sol des îlots de fertilité et les racines des plantes pérennes qui les constituent présentent une plus forte proportion de champignons pouvant former des interactions biotiques avec les plantes (**Article I**), tels que des champignons parasites (*e.g.*, espèces de Chytridiomycota), ou des champignons mycorhiziens appartenant aux Glomeraceae. Une telle hétérogénéité spatiale a déjà été observée au niveau de la diversité et composition des communautés bactériennes (Bachar *et al.*, 2012 ; Garcia *et al.*, 2018 ; Li *et al.*, 2023) et fongiques (Li *et al*., 2023) mais également sur l'activité des communautés bactériennes (*e.g.*, taux minéralisation de l'azote plus élevé sous la canopée de *Tamarix* spp. ; Iwaoka *et al.*, 2018). La distribution des communautés fongiques du sol dans le cadre de la distribution en îlots de fertilité a été moins étudiée en comparaison des bactéries mais Ochoa-

Hueso *et al.* (2018) ont montré que l'abondance des champignons du sol était fortement corrélée à la présence d'îlots de fertilité, alors que l'abondance et la diversité bactérienne ne l'étaient pas.

Nous avons également identifié des différences édaphiques entre sol nu et sol des îlots de fertilité : le sol à proximité des espèces pérennes est moins alcalin et présente une proportion plus élevée en éléments typiques des argiles tel que l'aluminium. Ces caractéristiques édaphiques ont pu favoriser l'établissement de plantes pérennes et donc le développement de certains champignons biotrophes (*e.g.*, pathogènes et symbiotiques) mais peuvent également être le fruit de l'activité biologique des plantes et des microorganismes des îlots de fertilité. La distribution spatiale des communautés fongiques du sol en milieu désertique semble donc suivre, au moins en partie, l'hypothèse de la distribution en îlots de fertilité, en cela que leur diversité et leur composition sont différentes en présence d'espèces pérennes comparé au sol nu. Étudier la dynamique de mise en place des plantes pérennes en milieux désertiques nous permettrait de déterminer si certaines conditions édaphiques sont nécessaires dans l'établissement de ces plantes ou une conséquence de leur activité biologique (et de celle de leurs microorganismes associés). Qu'elles en soient la raison ou la conséquence, les différences de composition des champignons du sol entre sol nu et îlots de fertilité peuvent influencer l'assemblage du mycobiote des plantes : le sol est en effet un réservoir potentiel majeur dans l'assemblage du mycobiote.

2.1.2. Transmission horizontale et verticale du mycobiote en milieu désertique.

L'étude de l'assemblage du mycobiote des plantes est une problématique fondamentale en écologie des interactions plantes-champignons. Depuis les travaux pionniers de Lourens G. M. Baas-Becking en écologie microbienne et sa célèbre formule « Tout est partout, mais l'environnement sélectionne », (Baas-Becking, 1934 ; De Wit & Bouvier, 2006), de nombreux travaux ont mis en évidence que les microorganismes ne sont pas tous distribués uniformément à l'échelle du globe mais que leur distribution présente des patrons biogéographiques (*e.g.*, Talbot *et al.*, 2014 ; Tedersoo *et al.*, 2014 ; Tedersoo & Brundrett, 2017 pour les champignons) liés en partie à leur histoire évolutive (*e.g.*, Looney *et al.*, 2016 ; Hackel *et al.*, 2022 chez les Russulaceae). Ces patrons de distribution spatiale peuvent avoir une influence forte sur l'assemblage du mycobiote, comme cela a par exemple été démontré chez les agaves (Coleman-Derr *et al*., 2016) et chez différentes essences d'arbres (*Populus*, *Quercus* and *Pinus* ; Bonito *et al.*, 2014). Toutefois, la distribution des champignons à grande échelle comme étudié dans les

citations précédentes, ou à l'échelle métrique comme étudié dans **l'Article I**, ne permet d'expliquer qu'une partie de l'assemblage du mycobiote des plantes, d'une part car certains groupes de champignons présentent un faible niveau d'endémisme comme les champignons mycorhiziens à arbuscules (Davison *et al*., 2015), et d'autre part car d'autres facteurs structurent fortement la composition du mycobiote des plantes tels que l'identité taxonomique de la plante hôte et le compartiment de la plante étudié (*e.g.*, Bonito *et al.*, 2014 ; U'Ren *et al.*, 2019 ; Thiergart *et al.*, 2020).

Une transmission verticale partielle du microbiote.

Les processus expliquant ces patrons sont encore à ce jour mal connus : les microorganismes colonisant la plante peuvent en effet provenir de l'environnement (transmission horizontale) mais également être transmis entre générations d'individus *via* les organes reproducteurs, sexués ou non (transmission verticale). La contribution respective de ces deux voies de transmission du mycobiote reste peu étudiée, en particulier en milieu désertique. Dans l'**Article II**, nous avons montré *in vitro* que le mycobiote des jeunes plants était principalement transmis verticalement par les graines, sans contribution du sol, même dans les racines. Dans le cadre de la distribution en îlots de fertilités des écosystèmes désertiques, cette stratégie de transmission du microbiote pourrait permettre aux graines de s'établir même dans des zones présentant une faible diversité microbienne comme le sol hors des ilots de fertilité. Rochefort *et al.* (2021) ont pour leur part montré *in vitro* que le sol était la source principale du mycobiote des jeunes plants de *Brassica napus* (Brassicaceae). D'autres expériences *in vitro* ont montré que le microbiote bactérien pouvait en partie être transmis par les graines chez le blé (*Triticum aestivum* ; Walsh *et al.*, 2021) et chez le radis (*Raphanus sativus* ; Simonin *et al.*, 2023). Les études quantifiant la transmission *in vitro* du microbiote (bactérien et/ou fongique) restent encore peu nombreuses, s'intéressent à des modèles de plantes très variés, et ne présentent pas de protocole uniformisé. Dans l'**Article II**, nous avons utilisé des graines prélevées *in situ* et non stérilisées de sorte à conserver des communautés fongiques proches de celles observées *in situ*, bien que le transport et la conservation de ces graines aient pu modifier les communautés fongiques des graines. L'utilisation de communautés synthétiques, comme dans Simonin *et al.* (2023), permet un meilleur contrôle de l'inoculum. Toutefois, la construction de communautés synthétiques nécessite des cultures des espèces de microorganismes représentatives des communautés fongiques observées *in situ*.

La transmission verticale pourrait en théorie permettre d'assurer une certaine stabilité dans le temps de la composition du microbiote (Bright & Bulgheresi, 2010) comme cela a déjà été démontré pour certains symbiontes tels que *Buchnera aphidicola* (Koga *et al*., 2012) ou pour la constitution d'une partie du microbiote intestinal des mammifères (Moeller *et al*., 2018). La transmission verticale du microbiote des plantes (dont le mycobiote) semble également possible, mais les conséquences écologiques d'une telle transmission nécessitent toutefois d'être évaluées. Certains champignons mutualistes peuvent être transmis verticalement, tels que les endophytes du genre *Epichloe* (Cavazos *et al*., 2018) ou les champignons ectomycorhiziens du genre *Scleroderma* (Séne *et al*., 2018). La transmission verticale du microbiote ne concerne cependant pas nécessairement que des microorganismes mutualistes : Simonin *et al.* (2023) ont par exemple montré que les bactéries fréquemment retrouvées dans le microbiote des graines pouvaient être transmises verticalement mais avaient un effet délétère sur le développement des jeunes plants. Chez certaines espèces de plantes, la prise en compte d'autres modes de transmission verticale est également nécessaire, comme la transmission verticale *via* des structures de reproduction asexuées comme observé chez *Glechoma hederacea* (lierre terrestre ; Vannier *et al.*, 2018).Une meilleure caractérisation de la transmission verticale du mycobiote et de ses conséquences écologiques semble donc nécessaire afin de mieux déterminer les conséquences écologiques de cette voie de transmission, en particulier dans le cadre du développement de méthodes d'ingénierie du microbiote des graines (*e.g.*, Arnault *et al.*, 2023).

L'environnement est une source majeure dans l'établissement du microbiote.

Bien que certains microorganismes semblent être transmis verticalement, la contribution de l'environnement dans l'assemblage du microbiote des plantes reste fondamentale. Nous avons en effet identifié une contribution importante du sol dans l'assemblage du mycobiote d'*H. salicornicum* chez les individus adultes *in situ*, en particulier dans les compartiments souterrains (racines et rhizosphère) mais également dans les feuilles (**Article II**). La forte contribution de l'environnement, et en particulier du sol, dans l'assemblage du mycobiote rhizosphérique et racinaire est documentée depuis longtemps chez les champignons mycorhiziens (Wilkinson & Sherratt, 2001 ; Kiers & Heijden, 2006). Cette contribution a également été observée à l'échelle des communautés totales de champignons colonisant les racines, de nombreuses études démontrant en effet que le mycobiote racinaire est un sous-ensemble des communautés fongiques du sol (*e.g.*, Thiergart *et al.*, 2020 ; Gao *et al.*, 2020 ; Maciá-Vicente *et al.*, 2020 ; Bourceret *et al.*, 2022). Si l'influence réciproque entre

compartiments aériens et souterrains *via* une signalisation a déjà été démontrée, comme par exemple la modulation du microbiote racinaire en réponse à divers stress environnementaux touchant la phyllosphère (cf. Hou *et al.*, 2021 pour une revue), la contribution du sol dans l'établissement du microbiote de la phyllosphère est en revanche moins documentée. Chez plusieurs espèces de céréales cultivées, Xiong *et al.* (2021) ont également observé que le sol est un réservoir important dans l'établissement du microbiote bactérien des feuilles. Les mécanismes et voies de transmission entre sol et phyllosphère ne sont pas connus à ce jour et ces résultats ouvrent la voie vers plus de recherche sur l'axe racine/phyllosphère.

Des processus d'assemblage dynamiques ?

Finalement, la prise en compte de la transmission verticale et horizontale chez les jeunes plants *in vitro* et chez les individus adultes *in situ* suggère un changement de la contribution respective de ces deux voies de transmission au cours du développement de la plante : le mycobiote semble d'abord transmis par les graines puis fortement recruté dans l'environnement, notamment *via* le sol (**Article II**). Bien que ces différences puissent être en partie liées à des différences méthodologiques (*in vitro* vs. *in situ*), elles suggèrent également que l'assemblage du mycobiote est un processus dynamique et peut être vue comme une succession écologique. Si des changements dynamiques du mycobiote ont déjà été observés dans d'autres études (Houlden *et al.*, 2008 ; Han *et al.*, 2017 ; Gao *et al.*, 2019 ; Liu & Howell, 2021), la prise en compte des changements de la contribution des voies de transmission du mycobiote, elle, est plus rare. La dynamique de colonisation des tissus (*i.e.*, quels microorganismes colonisent les tissus en premier) semble également avoir un effet sur l'assemblage du microbiote, un phénomène dénommé effet de priorité (Debray *et al*., 2022) : les microorganismes transmis verticalement pourraient donc avoir un effet sur l'assemblage du microbiote de la plante (Ridout *et al*., 2019). Des variations dans les voies de transmission peuvent également s'observer entre différentes générations : Rezki *et al.* (2018) ont par exemple observé une variabilité dans la composition du microbiote des graines de radis sur plusieurs générations, en partie liée à des processus stochastiques, tandis que certains microorganismes (bactéries et champignons) semblaient au contraire sélectionnés au cours du temps. Il nous semble donc important de prendre en compte ces dynamiques dans de futures recherches afin de mieux estimer la contribution de ces voies de transmissions dans l'assemblage du microbiote et leur stabilité au cours des générations de plante.

2.2. Influence des communautés végétales sur le mycobiote racinaire.

Du fait de la structure de leur couvert végétal (faible diversité végétale, structuration spatiale en îlots de fertilité, *etc.*), les écosystèmes désertiques nous semblent représenter des modèles d'intérêt pour l'écologie *in situ* (cf. **Encadré 1**). Dans de nombreux écosystèmes, le couvert végétal est toutefois plus complexe et plus dense, et sa composition influence l'assemblage du mycobiote des plantes voisines (Bittebiere *et al.*, 2020 ; Mony *et al.*, 2021 ; Mészárošová *et al.*, 2024 ; Hu *et al.*, 2022, 2023). Dans l'**Article III**, nous avons montré que certains champignons ectomycorhiziens, en particulier du genre *Russula*, sont également capables de coloniser en tant qu'endophytes les racines de plantes non-ectomycorhiziennes présentes à proximité d'hôtes ectomycorhiziens, suggérant que ces champignons peuvent être partagés entre plantes ectomycorhiziennes et plantes non-ectomycorhizienne. Un tel partage entre plantes voisines a également été observé chez d'autres champignons ectomycorhiziens comme chez *Tuber* spp. (Schneider-Maunoury *et al.*, 2018, 2020) et *Inocybe* spp. (Yung *et al.*, 2021), dans des communautés de plantes dans des écosystèmes tropicaux (Perez-Lamarque, *et al*., 2022), et chez des orchidées épiphytes (Petrolli *et al*., 2022) et pourrait donc participer à l'assemblage du mycobiote. L'influence de la composition des communautés végétales sur l'assemblage du mycobiote semble ainsi être un paramètre important dans l'assemblage du microbiote.

2.3. Limites méthodologiques de l'évaluation des voies de transmission du microbiote.

Les résultats présentés dans cette partie ont principalement été obtenus sur la base du séquençage de gènes marqueurs (ou *metabarcoding*) qui présente diverses limites (**I.5.2.3**). Ces méthodes sont par exemple sensibles aux contaminations qui peuvent biaiser les estimations de contribution des sources potentielles du microbiote. La faible proportion du mycobiote expliquée chez les jeunes plants *d'H. salicornicum in vitro* pourrait en partie être liée à de telles contaminations (**Article II**), bien que différentes précautions de manipulations aient été prises (*e.g.*, humidification du substrat avec de l'eau autoclavée, pots de culture fermés avec du coton pour permettre les échanges gazeux mais limiter l'intrusion d'éléments extérieurs, plantation des graines et récolte des jeunes plants en conditions stériles). Les méthodes de séquençage de gènes marqueurs sont de plus semi-quantitatives et permettent dans certains cas de caractériser

les communautés microbiennes de tissus quasi-stériles : la présence de microorganismes dans le liquide amniotique ou les tissus des fœtus fait par exemple l'objet de débats (Kennedy *et al*., 2023). L'utilisation de méthodes quantitatives telles que la PCR quantitative et l'observation des microorganismes par des méthodes telles que la microscopie-FISH pourraient permettre de mieux démontrer la transmission verticale du microbiote. Finalement, la prise en compte de plus de sources potentielles (microbiote des plantes voisines, dispersion par l'air *etc.*) pourrait permettre d'affiner nos connaissances sur la transmission du microbiote.

3. Des niches mycorhiziennes préjugées ?

L'étude de l'écologie des interactions entre plantes et champignons a permis d'établir des classifications et bases de données recueillant les écologies connues d'une grande diversité de champignons (*e.g.*, FUNGuild ; Nguyen *et al.*, 2016 ; FungalTraits ; Põlme *et al.*, 2020) et le type mycorhizien d'une grande diversité de plantes (*e.g.*, revue de Wang & Qiu, 2006 ; FungalRoot ; Soudzilovskaia *et al.*, 2020). Ces compilations de données sont des outils fondamentaux pour déterminer le type mycorhizien d'une espèce/famille de plantes ou encore l'écologie d'un champignon (saprotrophe, mycorhizien, endophyte, *etc.*). Les outils moléculaires de caractérisation des communautés fongiques associées aux plantes ont été développés dans le but de décrire de manière la plus précise possible les communautés fongiques spécifiques à différents types mycorhiziens. Ainsi, le marqueur 18S est souvent utilisé pour caractériser les communautés fongiques associées aux plantes connues pour former des mycorhizes à arbuscules (Simon *et al*., 1992 ; Větrovský *et al*., 2023) car il favorise la détection de groupes basaux tel que le phylum Mucoromycota alors que le marqueur ITS2 est souvent utilisé comme marqueur « universel » des communautés fongiques et favorise la détection des champignons Dikarya (Ascomycota + Basidiomycota ; Op De Beeck *et al.*, 2014 ; Tedersoo *et al.*, 2022). L'utilisation d'un de ces marqueurs favorise donc la détection de certains groupes de champignons tandis que celle de champignons occupant des niches écologiques inhabituelles peut alors être compromise (*e.g.*, champignons ectomycorhiziens dans les racines de plantes non-ectomycorhiziennes, champignons mycorhiziens à arbuscule dans les racines de plantes ectendomycorhiziennes).

3.1. L'endophytisme chez les champignons mycorhiziens : une double niche écologique négligée.

3.1.1. Preuves de la double niche écologique ectomycorhize/endophytisme.

A la suite des travaux de Laure Schneider-Maunoury (Schneider-Maunoury *et al.*, 2018, 2020 ; Schneider-Maunoury, 2019), qui démontrent que certaines espèces du genre *Tuber* peuvent coloniser *in situ* les racines de plantes non-ectomycorhiziennes en tant qu'endophytes, nous avons démontré que certains champignons du genre *Russula* peuvent aussi coloniser en tant qu'endophytes les racines de plantes non-ectomycorhiziennes (**Article III**). Ces travaux, qui combinent diverses approches dont le séquençage de gènes marqueurs, des observations en microscopie confocale après hybridation *in situ* à fluorescence et la quantification d'expression de gènes, viennent s'ajouter à d'autres travaux détectant des champignons ectomycorhiziens dans les racines de plantes non-ectomycorhiziennes (**Tableau V.1**).

Les champignons ectomycorhiziens sont donc détectés dans un grand nombre de plantes non-ectomycorhiziennes, et ce dans des écosystèmes variés. Les travaux réalisés *in situ* sur les espèces des genres *Tuber* et *Russula* suggèrent toutefois que l'endophytisme serait une niche écologique secondaire. En effet, la colonisation endophyte est principalement observée dans des formations spécifiques appelées « brûlés », *i.e.*, des zones associées à la production de fructifications de champignons ectomycorhiziens où la végétation herbacée est peu développée et peu dense (Streiblová *et al*., 2012). Ces formations, typiques des arbres producteurs de truffes, intriguent les trufficulteurs depuis de nombreuses années. Taschen *et al.* (2020) ont montré en mésocosme que les plantes herbacées autour de plants de chêne vert se développaient moins en présence de *Tuber melanosporum*, suggérant que la colonisation endophytes des plantes herbacées a un effet délétère sur leur développement, ce qui pourrait expliquer, au moins en partie, la formation de brûlés. D'autres travaux réalisés *in vitro* suggèrent que les composés organiques volatils produits par les truffes pourraient également limiter la croissance des plantes herbacées (Splivallo *et al*., 2007), sans pour autant avoir été confirmé à plus grande échelle. Ces deux mécanismes (endophytisme et composés organiques volatils) ne sont pas nécessairement exclusifs.

La formation de brûlés associés à d'autres champignons ectomycorhiziens que la truffe (*e.g.*, *Russula* spp.) est peu documentée dans la littérature scientifique, bien que ces formations soient connues des mycologues de terrain. Les brûlés représentent pourtant des opportunités de

Tableau V.1 Détection de champignons ectomycorhiziens dans les racines de plantes non-ectomycorhiziennes, supposément en tant qu'endophytes. Adapté d'après Schneider-Maunoury (2019).

Dispositif expérimental	**Méthode(s) utilisée(s)**	**Taxon fongique**	**Plante(s) étudiée(s)**	**Publication**
In vitro	Observations microscopiques après inoculation du champignon	*Tricholoma matsutake*	*Cedrela odorata*	Murata *et al.*, 2013
			Prunus speciosa	Murata *et al.*, 2014
In situ	Clonage	*Boletus satanas*, *Xerocomus chrysenteron*	*Arrhenatherum elatius*	Vandenkoornhuyse, 2002
In situ	Amorces spécifiques	Sebacinales	Diverses espèces de plantes herbacées	Selosse *et al.*, 2009 ; Weiß *et al.*, 2016 (revue)
In situ	PCR et/ou clonage et/ou NGS	Cortinariaceae, Inocybaceae, Sclerodermataceae, Sebacinaceae, Thelephoraceae, Tuberaceae, Russulaceae, *etc.*	Diverses espèces d'Orchidées tempérées et tropicales	Cf. Tableau 1 dans Selosse *et al.* (2021) pour une revue
In situ	PCR quantitative	*Tuber aestivum*	Diverses espèces de plantes herbacées	Gryndler *et al.*, 2014
In situ	Metabarcoding	*Meliniomyces*, *Rhizopogon*	*Chamaecyparis obtusa*	Toju & Sato, 2018
In situ	Metabarcoding	*Russula*, *Sebacina*, *Inocybe*, *Tuber*, *etc*.	Diverses espèces de plantes herbacées	**Article III**
In situ	Metabarcoding	*Inocybe*, *Tuber*	*Urtica dioica*	Yung *et al.*, 2021
In situ	Metabarcoding + quantification d'expression de gènes	*Tuber aestivum*	Diverses espèces de plantes herbacées	Schneider-Maunoury *et al.*, 2020
In situ	Amorces spécifiques + metabarcoding + FISH-microscopie	*Tuber melanosporum*	Diverses espèces de plantes herbacées	Schneider-Maunoury *et al.*, 2018 ; 2020
In situ	Metabarcoding + FISH-microscopie	*Russula* spp.	Diverses espèces de plantes herbacées	**Article III**

choix en écologie *in situ* pour (i) déterminer si d'autres champignons ectomycorhiziens réalisent la double niche ectomycorhizienne/endophyte et (ii) étudier l'impact des champignons ectomycorhiziens sur l'établissement et la dynamique des couverts végétaux, en particulier herbacés.

La comparaison des mécanismes moléculaires impliqués dans la colonisation par des champignons ectomycorhiziens d'hôtes ectomycorhiziens et non-ectomycorhiziennes pourrait également permettre d'identifier des voies de signalisation partagées et spécifiques à ces deux types d'interactions. L'identification de profils transcriptomiques en présence d'espèces ectomycorhiziennes et non-ectomycorhiziennes pourrait être réalisée à partir de modèles de champignons ectomycorhiziens cultivables *in vitro* dont les génomes ont déjà été séquencés, comme c'est le cas pour plusieurs espèces du genre *Tuber* (Martin *et al.*, 2010 ; Murat *et al.*, 2018). Des essais de colonisation endophyte d'*Arabidopsis thaliana* par *Tuber melanosporum* avait par exemple été entamés au cours de la thèse de Laure Schneider-Maunoury (Schneider-Maunoury, 2019). Les hyphes de *T. melanosporum* colonisaient la surface des racines sans colonisation intra-racinaire. Même sans pénétration des tissus de la plante, de tels dispositifs *in vitro* pourraient permettre de déterminer les voies de signalisation entre plante non-ectomycorhizienne et champignon ectomycorhizien par des approches de métatranscriptomique afin de les comparer aux voies de signalisation entre plantes ectomycorhiziennes et champignons ectomycorhiziens, de sorte à identifier les voies de signalisations communes et spécifiques entre ces types d'interactions.

3.1.2. Double niche écologique et réseaux mycorhiziens communs.

La connexion physique de différents individus de plantes par des champignons du sol, dénommée « réseau mycorhizien commun », peut permettre le transfert de nutriments entre plantes. L'exemple le mieux documenté à ce jour est celui des orchidées mycohétérotrophes (totales ou partielles ; Selosse *et al.*, 2006) : ces plantes s'associent à des champignons mycorhiziens qui leur fournissent tout ou partie de leur carbone sans contrepartie, carbone lui-même issu de l'association mycorhizienne formée par ces champignons avec d'autres hôtes mycorhiziens à proximité. Si l'existence de réseaux mycorhiziens communs fonctionnels est établie, leur ubiquité, leur fonctionnalité, et leur impact exact sur le fonctionnement des arbres et des écosystèmes font toutefois l'objet de débats au sein de la communauté scientifique (*e.g.* Henriksson *et al.*, 2023 ; Karst *et al.*, 2023). Nos résultats montrent que certains champignons ectomycorhiziens peuvent être partagés entre hôtes ectomycorhiziens et plantes herbacées

environnantes (**Article III**) et donc forment potentiellement un réseau mycorhizien commun, sans toutefois le démontrer formellement. Pour ce faire, il serait nécessaire (i) d'identifier des champignons ectomycorhiziens génétiquement identiques partagés entre les plantes afin de s'assurer que différentes plantes sont colonisées par des mêmes individus et (ii) de démontrer un transfert de nutriments (C, N, *etc*.) entre plantes ectomycorhiziennes et non-ectomycorhiziennes. L'effet délétère de *Tuber melanosporum* sur la croissance des plantes herbacées se développant à proximité d'un hôte ectomycorhizien observé par Taschen *et al.* (2020) pourrait par exemple être lié à un transfert de nutriments des plantes herbacées à l'hôte ectomycorhizien via le mycélium du sol.

L'existence et le rôle des réseaux mycorhiziens communs sont souvent envisagés du point de vue de l'écologie des plantes : connexion physique entre plantes voisines *via* le réseau mycorhizien, transferts de nutriments entre plantes, hypothèse de l'« arbre mère » *etc.*, et plus rarement du point de l'écologie des champignons. Les travaux de Taschen *et al.* (2020) montrent par exemple que la présence d'espèces compagnes autour de plants de chênes vert mycorhizés par *Tuber melanosporum* améliore la croissance mycélienne, et que les plantes herbacées ont une croissance plus faible en présence de *T. melanosporum* comparé aux témoins sans champignon. La croissance de l'hôte mycorhizien, en revanche, n'est pas affectée par la présence d'espèces herbacées, suggérant au final que seul le champignon tire parti du potentiel réseau mycorhizien entre hôte mycorhizien et plantes herbacées, au détriment de ces dernières. Les mécanismes expliquant l'effet délétère des champignons ectomycorhiziens sur les plantes herbacées ne sont à ce jour pas connues et peuvent être multiples :

- La colonisation endophyte des racines des plantes herbacées par des champignons ectomycorhiziens pourrait entrer en compétition avec la colonisation par d'autres champignons endophytes ou mycorhiziens (*e.g.*, champignons mycorhiziens à arbuscules). Nous n'avons observé que très rarement des arbuscules dans les racines de plantes mycorhiziennes à arbuscules en microscopie (**Article III**).
- Les champignons ectomycorhiziens pourraient avoir une activité parasitaire dans les racines de plantes non-ectomycorhiziennes et détourner une partie des nutriments de la plante. Les hyphes de *Russula* spp. et *Tuber* spp. observés dans les racines de plantes herbacées sont métaboliquement actifs (**Article III** ; Schneider-Maunoury *et al.*, 2020) ce qui pourrait permettre une telle interaction.
- Les champignons ectomycorhiziens pourraient également dégrader la matière organique du sol autour des hôtes mycorhiziens, notamment pour mobiliser de l'azote comme

suggéré par Lindahl & Tunlid (2015) et donc limiter l'accès à ce nutriment essentiel à la croissance des plantes non-ectomycorhiziennes.

Ces mécanismes potentiels ne sont pas exhaustifs ni mutuellement exclusifs et les conséquences physiologiques et écologiques de la double niche écologique ectomycorhizien/endophyte nécessitent donc d'être étudiées plus en détail. D'un point de vue fonctionnel, l'apport de ^{13}C aux plantes non-ectomycorhiziennes (sous forme de CO_2 marqué par exemple) pourrait permettre d'identifier un potentiel transfert de carbone de ces plantes à l'hôte ectomycorhizien. Les mésocosmes semblent être des systèmes plus adaptés à ce type de manipulations et pourraient faciliter la mise en place de témoins comprenant des mailles fines empêchant la croissance des hyphes entre plantes ecto- et non-ectomycorhiziennes (Karst *et al*., 2023).

3.2. Des écologies mycorhiziennes inhabituelles en milieu désertique.

L'étude du microbiote racinaire d'*Helianthemum lippii* (Cistaceae), qui avait pour but premier de déterminer le potentiel de la région d'AlUla pour la production de truffes du désert, a révélé que cette espèce, alors considérée comme ectendomycorhizienne associée à différentes espèces de Dikarya, semble également être colonisée par des champignons mycorhiziens à arbuscules du sub-phylum Glomeromycotina (**IV.1**). Nous avons en effet caractérisé le mycobiote racinaire de différents individus dans deux sites sur la base des marqueurs ITS2 et 18S qui ont permis la détection conjointe de séquences affiliées à des genres formant des ectendomycorhizes (*Picoa* et *Terfezia* spp.) et de l'ordre des Glomerales (champignons mycorhiziens à arbuscules). La formation de fructifications de *Tirmania nivea* (champignon ectendomycorhizien) confirme que l'association avec des champignons ectendmycorhiziens est fonctionnelle, le type mycorhizien jusqu'alors décrit chez les *Helianthemum* spp. (Roth-Bejerano *et al*., 2014). Pourtant, des structures typiques de champignons mycorhiziens à arbuscules ont également été observées, telles que des vésicules et dans de plus rares occasions des arbuscules. *H. lippii* pourrait donc être une espèce présentant une double écologie mycorhizienne (Teste *et al*., 2020).

D'autres associations mycorhiziennes inhabituelles ont pu être observées chez plusieurs espèces dans la région d'AlUla. Par exemple, les palmiers dattiers sauvages ne présentaient pas de structures d'associations mycorhiziennes à arbuscules (Robin-Soriano *et al.*, en préparaiton), alors que des séquences et structures de champignons mycorhiziens à arbuscules ont pu être

identifiées chez *Haloxylon salicornicum* (Amaranthaceae), une espèce appartenant à une famille traditionnellement considérée comme non-mycorhizienne (Maurice *et al.*, en préparation). Ces travaux n'ont pas encore permis de déterminer si ces associations inhabituelles sont fonctionnelles, un aspect qui mériterait d'être exploré : on retrouve ici, comme plus haut pour les réseaux mycorhiziens, les limites du séquençage qui définit la présence des protagonistes sans réellement permettre de cerner leur rôle. Ces observations mettent toutefois l'accent sur la complémentarité de différentes approches (microscopie, séquençage *etc.*) dans l'étude des associations mycorhiziennes, en particulier dans des écosystèmes encore peu étudiés (Harrison & Griffin, 2020).

4. Assemblage du mycobiote et évolution des interactions plantes-champignons.

L'objectif premier de cette thèse était de mieux comprendre l'écologie *in situ* des interactions entre plantes et champignons. Comme nous le verrons dans cette partie, ces connaissances pourraient également nous apporter des informations sur l'évolution des interactions entre plantes et champignons.

4.1. L'endophytisme comme étape dans l'évolution des associations ectomycorhiziennes : l'hypothèse de la « salle d'attente ».

Les associations ectomycorhiziennes sont des structures complexes, impliquant une signalisation et une activité moléculaire intenses entre la plante et le champignon permettant (i) de favoriser la rencontre entre les partenaires, (ii) d'assurer la colonisation par le champignon ectomycorhizien et (iii) de contourner les défenses immunitaires de la plante (Martin *et al.*, 2016 ; Plett *et al.*, 2024). Les reconstructions phylogénomiques récentes ont permis de mettre en évidence une origine saprotrophe chez plusieurs genres de champignons ectomycorhiziens (Kohler *et al.*, 2015 ; Miyauchi *et al.*, 2020). Le mode de vie ectomycorhizien a évolué indépendamment au moins 70 fois dans une grande diversité de clades fongiques (*e.g.*, chez les Endogonales, chez les Ascomycota et les Basidiomycota) et est caractérisé par un ensemble de convergences tels que la perte d'une partie des enzymes de dégradation des composants pectocellulosiques ou la prolifération d'éléments transposables (Kohler *et al.*, 2015 ; Miyauchi

et al., 2020). Les trajectoires évolutives ayant permis le passage du mode de vie libre saprotrophe au biotrophisme obligatoire ne sont cependant pas connues.

Comme nous l'avons montré précédemment, de plus en plus de travaux indiquent que les champignons ectomycorhiziens sont également capables de coloniser les racines de plantes non-ectomycorhiziennes en tant qu'endophytes (cf. **Tableau V.1**). Cette association diffuse pourrait faciliter l'établissement d'interactions biotrophes entre la plante et le champignon et a ainsi été proposée comme trajectoire évolutive entre le mode de vie saprotrophe et ectomycorhizien, une hypothèse connue sous le nom d'hypothèse de la salle d'attente (*waiting room hypothesis* ; Selosse *et al*., 2009, 2018). La capacité à coloniser en tant qu'endophytes les racines de plantes non-ectomycorhiziennes serait ainsi un trait ancestral conservé par certains champignons ectomycorhiziens.

Smith *et al.* (2017) et Thoen *et al.* (2020) ont également montré qu'une grande diversité de champignons saprotrophes étaient capables de coloniser les racines de plantes ectomycorhiziennes, colonisation qui pourrait être la première étape vers la formation d'interactions biotrophiques entre plantes ectomycorhiziennes et champignons saprotrophes comme suggéré par Baldrian & Kohout (2017). Ces deux trajectoires évolutives ne sont pas incompatibles : la colonisation par des champignons saprotrophes de racines saines de plantes ectomycorhiziennes observée par Smith *et al.* (2017) et Thoen *et al.* (2020) pourrait dans un premier temps favoriser les interactions biotiques entre plantes et champignons saprotrophes, tandis que l'endophytisme observé chez certains champignons ectomycorhiziens serait un trait ancestral conservé du mode de vie endophyte ayant permis, dans un second temps, la mise en place des structures et dialogues moléculaires plus complexes qui caractérisent l'ectomycorhize. Il est important de rappeler ici que le mode de vie ectomycorhizien a évolué indépendamment dans au moins 70-80 clades fongiques qui présentent des histoires évolutives très différentes et au sein desquels l'apparition de l'ectomycorhize a donc eu lieu à des âges très différents (Looney *et al.*, 2018 ; Chang *et al.*, 2019). Les écologies que nous observons actuellement chez différents groupes de champignons représentent donc certainement des stades évolutifs très différents.

Si l'accumulation de preuves de la double niche écologique mycorhizienne/endophyte étayent l'hypothèse de la salle d'attente (en particulier chez les Orchidaceae ; Selosse *et al.*, 2021), la démonstration formelle de cette trajectoire évolutive n'est pas encore totalement établie. Des approches de reconstructions d'états ancestraux pourraient être utiles afin d'inférer l'écologie des ancêtres communs de certains clades de champignons ectomycorhiziens, bien

que l'ubiquité de la double niche écologique ectomycorhizien/endophyte n'ai reçu à ce jour que peu d'attention.

4.2. Évolution des interactions-plantes champignons et mécanismes de transmission des microorganismes.

Comme tous les macroorganismes, les plantes présentent au sein et à la surface de leurs tissus une multitude de microorganismes, indispensables à leur développement. Les plantes, comme les animaux, ont évolué en interaction avec leur microbiote, et certains auteurs ont de fait proposé que la somme d'un macroorganisme et son microbiote (ou holobionte ; Vandenkoornhuyse *et al.*, 2015) formerait une unité de sélection (théorie de l'hologénome ; Zilber-Rosenberg & Rosenberg, 2008). Si l'importance fondamentale du microbiote dans le développement des plantes est bien établie, la pertinence de la théorie de l'hologénome est débattue (Douglas & Werren, 2016), ce pour plus plusieurs raisons.

La théorie de l'hologénome suppose une certaine stabilité des associations plantes microbiotes. Or, la transmission entre générations de plante du microbiote semble partielle (**Article II**, **V.2**), et semble dans certains cas varier entre générations (*e.g.*, Rezki *et al.*, 2018). Notons ici toutefois que Vannier *et al.* (2018) ont identifié une certaine stabilité dans la transmission verticale par stolons du microbiote du lierre terrestre. Quoiqu'il en soit, une grande partie du microbiote semble recrutée dans l'environnement direct de la plante, en particulier chez les individus adultes (**Article II**). Les champignons mycorhiziens en particulier sont en très grande majorité recrutés dans l'environnement (Wilkinson & Sherratt, 2001 ; Kiers & Heijden, 2006), même à des stades de développement très précoces comme observé pour les gamétophytes de Lycopodiaceae (Perez-Lamarque *et al*., 2023). L'assemblage du microbiote depuis l'environnement résulte aussi de processus aléatoires (ou stochastiques ; Sieber *et al.*, 2019 ; Gao *et al.*, 2020) et déterministes tels que la sélection par les plantes (Discussion précédente). Les mécanismes permettant la sélection plus ou moins spécifique d'une partie du microbiote par les plantes assurent une certaine stabilité du microbiote entre générations, du moins pour des plantes se développant dans des environnements présentant des communautés microbiennes de compositions proches.

Finalement, la théorie de l'hologénome semble adopter un point de vue « plante-centré » sans toutefois prendre en compte l'écologie des microorganismes constituant le microbiote. Mesny *et al.* (2021) ont par exemple montré que les champignons endophytes les plus

fréquemment détectés *in situ* dans les racines d'*Arabidopsis thaliana* étaient les plus aptes à recoloniser les racines de plants *in vitro*, suggérant que la colonisation par les champignons endophytes est plus liée à leur physiologie qu'à un filtre racinaire. De plus, certains champignons sont capables de coloniser simultanément plusieurs hôtes (conspécifiques ou non) formant dans certains cas des réseaux mycorhiziens communs. Ces réseaux remettent en question l'unité de l'holobionte. Plus généralement, l'écologie des microorganismes et des interactions biotiques au sein du microbiote (intra- et inter-royaumes) semblent encore peu prise en compte d'un point de vue écologique et évolutif. Comment, par exemple, intégrer le microbiote bactérien des champignons mycorhiziens à arbuscules (Bonfante *et al.*, 2019 ; Wang *et al.*, 2022) dans la théorie de l'hologénome ? Si la prise en compte du microbiote des plantes est fondamentale pour mieux comprendre leur écologie et leur évolution, il nous semble important de rappeler ici que le terme microbiote englobe une grande diversité phylogénétique de microorganismes qui jouent des rôles variés dans la physiologie des plantes et qui interagissent également entre eux au sein du microbiome. De fait, prendre en compte les trajectoires évolutives différentes de certaines couples plantes-microorganismes du microbiote semblerait plus pertinent (Douglas & Werren, 2016), comme l'étude des champignons ectomycorhiziens et de leurs hôtes par exemple.

Conclusion et perspectives

Ce travail de thèse a mis en évidence l'importance de facteurs et processus jouant un rôle dans la structuration des communautés fongiques associées aux plantes. En milieu désertique, nous avons montré que la distribution spatiale des microorganismes du sol était hétérogène et influencée par la présence d'espèces pérennes, une distribution qualifiée de distribution en îlots de fertilité. Les sols des îlots de fertilité sont donc de potentiels réservoirs majeurs de microorganismes, voire des refuges en période sèche où l'activité métabolique est probablement faible. Pour des raisons indépendantes de notre volonté, nous n'avons cependant pas pu effectuer de prélèvements en période humide. Caractériser la composition et l'activité (*e.g.*, par métatranscriptomique) des communautés fongiques du sol dans et hors des îlots de fertilité en période humide nous permettrait de mieux comprendre le rôle que jouent les champignons spécifiquement associés à la présence d'espèces pérennes (dégradation de la matière organique, association symbiotique, pathogénicité, *etc.*).

En étudiant la contribution du sol (transmission horizontale) et des graines (transmission verticale) à l'assemblage des communautés fongiques associées à *Haloxylon salicornicum*, une espèce pérenne commune de la péninsule arabique, nous avons montré qu'une partie des communautés fongiques peuvent être transmises entre générations par les graines, en particulier chez les jeunes individus. Le sol est le réservoir principal dans l'assemblage des communautés fongiques des individus adultes et participe même à l'établissement des communautés des parties aériennes. La transmission d'une partie des champignons par les graines pourrait représenter une stratégie de dispersion adaptée aux milieux désertiques où la diversité de microorganismes du sol nu est faible. Les conséquences de la transmission verticale de ces champignons sur la germination et le développement des jeunes plantes ainsi que sur l'assemblage du microbiote au cours du reste du cycle de vie doivent toutefois être évaluées expérimentalement. De plus, l'influence du sol sur l'assemblage des communautés fongiques des parties aériennes suggère une potentielle mobilité des microorganismes du sol vers les parties aériennes dont les mécanismes sont encore inconnus et méritent d'être étudiés (dispersion par l'air, mobilité *via* les tissus de la plante, *etc*.).

En période sèche, nous avons également décrit les communautés fongiques associée à *Helianthemum lippii*, une espèce arbustive s'associant avec des champignons formant des truffes du désert (*e.g.*, *Tirmania nivea*). Les données de séquençage ainsi que les observations microscopiques ont mis en évidence que cette espèce pouvait également être colonisée par des

champignons mycorhiziens à arbuscules. Compléter la caractérisation du mycobiote racinaire d'*H. lippii* par des prélèvements en saison humide nous permettrait de savoir si cette colonisation est un refuge temporaire pour les champignons mycorhiziens à arbuscule en saison sèche ou une association supplémentaire aux associations ectendomycorhiziennes potentiellement impliquée dans la physiologie des plantes.

Dans des communautés végétales plus complexes en milieux tempérés, nous avons montré que certains champignons ectomycorhiziens, en particulier du genre *Russula*, sont également capables de coloniser en tant qu'endophyte les racines de plantes non-ectomycorhiziennes à proximité d'hôtes ectomycorhiziens. Cette niche endophyte semble secondaire car elle n'est observée qu'à proximité d'hôtes ectomycorhiziens, démontrant l'influence de la composition des communautés végétales sur l'assemblage du mycobiote et suggérant un potentiel partage entre plantes voisines. Les conséquences écologiques de cette niche secondaire sont encore méconnues mais divers indices suggèrent que la colonisation endophyte a un effet délétère sur le développement des plantes non-ectomycorhiziennes (*e.g.*, présence de brûlés) et favorise la croissance du champignon (essais en mésocosmes réalisés avec *Tuber melanosporum* ; Taschen *et al.*, 2020). L'existence d'une connexion physique et fonctionnelle entre ces plantes voisines de types mycorhiziens différents nécessite une démonstration plus formelle incluant, entre autres, la détection conjointe d'individus ectomycorhiziens identiques dans les racines de plantes ecto- et non-ectomycorhiziennes ainsi qu'un transfert de nutriments entre les plantes (*e.g.*, par marquage isotopique).

Pour finir, la biologie reproductive de *Tuber melanosporum* n'est pas complètement élucidée et bien que les études réalisées jusqu'ici convergent vers l'hypothèse d'une contribution paternelle des spores, de nouveaux essais d'inoculation *in situ* sont encore nécessaires.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse mettent en avant l'importance d'une part de la complémentarité des méthodes dans l'étude de l'écologie des interactions entre plantes et champignons (*e.g.*, séquençage, microscopie) et d'autre part de la complémentarité des systèmes étudiés, de l'écologie *in situ* aux systèmes réductionnistes tels que les expérimentations *in vitro*. Nous avons de plus mis en évidence des écologies d'interactions inhabituelles chez certaines espèces de plantes (*H. lippii*) et de champignons (*Russula* spp.), démontrant que l'écologie des interactions entre plantes et champignons est quelques fois préjugées au regard de la littérature scientifique.

Chapitre VI – Annexes.

Annexe 1 : « Les truffes naissent-elles de pères inconnus ? », La Recherche, n°568 (janvier-mars 2022). p.82-87.

Marc-André Selosse
BIOLOGISTE, MUSÉUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE, PARIS
Professeur au Muséum national d'histoire naturelle (MNHN), il est spécialiste en botanique et mycologie.

Liam Laurent-Webb
AGRONOME, MUSÉUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE, PARIS
Il est actuellement en thèse à l'Institut de systématique, évolution, biodiversité du MNHN.

Les truffes naissent-elles de père inconnu ?

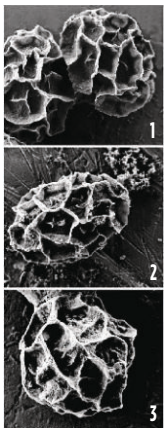
Si les truffes sont des trésors de saveurs, elles recèlent également bien des surprises au plan biologique, comme le rôle déterminant des limaces dans le transport et l'aide à la germination de leurs spores, les liens ténus et fondamentaux qu'elles entretiennent avec les arbres mais aussi avec les plantes herbacées alentour. Leur reproduction sexuée commence à être élucidée. Mais, pour l'heure, on ne trouve pas de trace du père, autre que génétique.

FOTOSEARCH RM / AGEFOTOSTOCK - RD - DR

◀ *La truffe du Périgord est le premier champignon comestible dont le génome a été entièrement séquencé, en 2010.*

Depuis la naissance de la trufficulture, au milieu du XIXe siècle, la truffe est un joyau de notre gastronomie. Pourtant, sa production a énormément baissé : d'un millier de tonnes par an vers 1900 en France, elle n'est plus que de quelques dizaines de tonnes aujourd'hui. La France, l'Italie et l'Espagne fournissent à elles seules 99 % de la production mondiale. L'explication définitive à ce déclin n'est pas claire : changement de climat, baisse de l'activité rurale… Cachées à l'intérieur du sol, les truffes ont longtemps conservé leurs secrets. Depuis une vingtaine d'années, des équipes de biologistes – essentiellement en France – se sont intéressées à ce champignon apprécié mais méconnu, et reprennent à la base la compréhension de son écologie. Des études génétiques ont notamment permis de mieux comprendre sa reproduction, et ont révélé la présence génétique d'un père… qui reste pour l'heure introuvable sur le terrain ! Le rôle des animaux dans la dissémination des spores et leur germination a aussi été précisé. Enfin, leur lien avec les arbres et les plantes herbacées est plus fort qu'on ne l'imagine. Autant de pistes qui permettent de découvrir un champignon à la biologie complexe et originale.

BIOLOGIE



▲ *Comparaison entre des spores contrôle (1), avalées par des souris (2) ou ingérées par des limaces (3). Dans ce troisième cas, elles sont moins altérées malgré l'ingestion, en raison d'une meilleure action de leurs enzymes digestives.*

Bien qu'il existe plus de 180 espèces de champignons souterrains du genre *Tuber,* toutes présentes dans l'hémisphère Nord, nous en consommons essentiellement trois. Surtout collectée en Italie du Nord, la truffe blanche du Piémont *(Tuber magnatum)* voit son prix atteindre 5 000 €/kg. Dans tout le sud de l'Europe, deux truffes de couleur noire sont ramassées : la truffe du Périgord *(Tuber melanosporum),* la plus méridionale et la plus prisée, dont le prix atteint 1 000 €/kg, et la truffe de Bourgogne *(Tuber uncinatum),* plus septentrionale, qui se vend à 400 €/kg environ. La partie charnue que nous consommons est en fait l'organe reproducteur – ou fructification, ou encore ascocarpe –, qui comporte les spores destinées à être dispersées. Son développement est paradoxal car ces spores n'ont pas accès au vent ! Alors que les autres champignons produisent des fructifications aériennes, libérant les spores dans l'air – comme les lames des champignons de Paris ou les tubes des cèpes – la truffe souterraine a une stratégie de dispersion complètement différente, reposant sur l'ingestion par des animaux. Les spores, à paroi épaisse, résistent à la digestion et sont dispersées dans les excréments (1) ! Le développement des fructifications correspond à des saisons où, la nourriture étant peu abondante, les animaux fouillent le sol pour se nourrir. Soit à l'automne pour les truffes du Piémont et de Bourgogne, et jusqu'en hiver pour la truffe du Périgord. Cela explique que les truffes soient toutes comestibles et odorantes, ce qui attire les disperseurs.

Comment repérer les truffes ? Une légende tenace a longtemps attribué l'attraction des cochons et des sangliers envers les truffes à l'émission d'une hormone sexuelle mâle, l'androstérone. Or, dès 1990, l'équipe de Michel Kulifaj, de l'université de Toulouse, a enterré des leurres imprégnés d'androstérone ou de sulfure de diméthyle et montré que seuls les seconds, qui n'ont rien de sexuel, étaient détectés par les cochons et des chiens (2). Ainsi, c'est bien ce composé chimique volatil présent dans de nombreuses truffes – ainsi que d'autres comme le bis(méthylthio)méthane dans la truffe du Piémont – qui confèrent son odeur si caractéristique au champignon. Les produits industriels dits « truffés » ou « à l'arôme de truffe » ne contiennent d'ailleurs souvent que ces composés. Autre curiosité : la production naturelle de la truffe ne provient pas de gènes particuliers, mais uniquement de l'activité accrue de certains d'entre eux présents dans de nombreuses autres espèces de champignons, comme l'ont montré Claude Murat et ses collègues de l'Inrae de Nancy en 2018 (3).

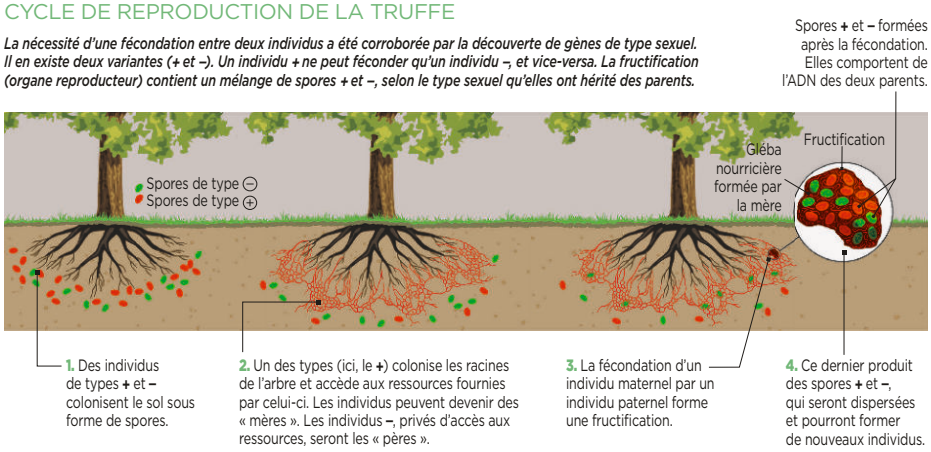
LES INVERTÉBRÉS SONT DE MEILLEURS DISPERSEURS QUE LES MAMMIFÈRES

Si l'on considère la faible valeur alimentaire des fructifications, dont la masse est dominée par des spores non digestes, on peut se demander si la truffe n'abuse pas les animaux : elle les manipule en effet par son parfum sans pour autant être particulièrement nourrissante. En mesurant les grandes surfaces de truffières développées par l'humain, pour qui la truffe n'est pourtant qu'un condiment, on entrevoit bien l'ampleur qu'a prise aujourd'hui cette manipulation ! Outre les sangliers et les rongeurs, de nombreux invertébrés se nourrissent en effet de ce mets. Certains en font même leur repas exclusif, comme une grosse mouche *(Suillia gigantea)* qui y pond ses œufs : l'insecte peut ainsi servir à repérer les fructifications, au risque que celles-ci soient véreuses. Le coléoptère *Liodes cinnamomea* dévore les truffes et y creuse des cavités profondes, au grand dam des trufficulteurs qui utilisent des pièges contenant des phéromones sexuelles pour détourner l'insecte. D'autres invertébrés font de la truffe un complément à leur alimentation : nous avons ainsi récemment étudié, avec des équipes italiennes, le cas des limaces et leur rôle dans la dissémination des spores (4). Nous avons étudié en particulier *Deroceras invadens,* abondante en Europe. Nous avons d'abord montré la présence de l'ADN de truffe dans le tube digestif des limaces que nous avons ramassées dans les truffières – qui représente parfois 100% de l'ADN de champignon détecté, alors qu'il n'y en a pas dans celui des mêmes mollusques collectés sur des sites éloignés ! Cela suggère que les spores restent vivantes malgré l'ingestion. Étudiée au microscope à force atomique, la paroi de ces spores est apparue modifiée, en particulier plus lisse et de composition moins homogène que celle de spores intactes

F. ORIET AL. UNIVERSITÉ DE BOLOGNE

CYCLE DE REPRODUCTION DE LA TRUFFE

La nécessité d'une fécondation entre deux individus a été corroborée par la découverte de gènes de type sexuel. Il en existe deux variantes (+ et –). Un individu + ne peut féconder qu'un individu –, et vice-versa. La fructification (organe reproducteur) contient un mélange de spores + et –, selon le type sexuel qu'elles ont hérité des parents.



ou ingérées par des souris. Nous avons même montré que le transit dans le tube digestif de la limace accroît la capacité des spores à germer : nous pensons que cela est dû à une meilleure action des enzymes digestives du mollusque. En effet, pour se nourrir, la limace gratte la surface des aliments à l'aide d'une langue râpeuse, la radula. Résultat : Les spores sont mieux libérées que lors de la mastication par la souris. Les enzymes digestives ont donc un accès plus direct à la paroi de celles-ci. Et les modifications qui résultent de ces actions enzymatiques amélioreraient la germination des spores.

Cette meilleure maturation des spores par des invertébrés comme les limaces expliquerait une autre particularité de la truffe. L'étude de la variabilité génétique de ce champignon, menée dans notre équipe par Elisa Taschen entre 2013 et 2016, a en effet révélé que, si les individus voisins sont génétiquement proches, les différences augmentent vite avec la distance, dès le premier mètre (5). Un argument qui suggère que la dissémination s'effectue d'abord grâce aux invertébrés. En effet, les dispersions des spores par les mammifères se font sur des grandes distances et devraient homogénéiser les populations. En revanche, avec les invertébrés comme les limaces, la maturation des spores est plus efficace, et ces dernières sont transportées moins loin, ce qui conserve des différenciations génétiques à faible distance. Les mammifères seraient alors des utilisateurs indélicats (en tout cas peu utiles) d'une dispersion qui a évolué surtout avec des invertébrés…

L'ARBRE EST LA SOURCE MAJEURE DE LA BIOMASSE DES FRUCTIFICATIONS

Transitoire, la fructification est nourrie et développée par la partie pérenne du champignon : des filaments souterrains microscopiques, que l'on appelle des hyphes. Le réseau des hyphes forme le mycélium. On sait que les truffes poussent sous les chênes mais aussi sous les charmes et noisetiers, voire les pins. Vers 1880, un ministre prussien de l'agriculture posa ainsi la question de la nature du lien entre truffes et arbres au biologiste allemand Albert Frank. Celui-ci observa alors que certains filaments du mycélium sont associés physiquement aux racines des arbres. Ce fut une découverte primordiale, car cette association est pratiquée par bien d'autres espèces de champignons ! Il nomma mycorhize cette structure mixte,

SYLVIE DESSERT

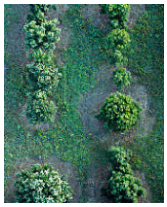
BIOLOGIE

mêlant filaments fongiques et racines (du grec *mukes*, champignon, et *rhiza*, racine). La mycorhize est vitale pour les deux partenaires : le champignon explore le sol et y prélève de l'eau et des sels minéraux (azote, potassium et phosphore) qu'il partage avec la plante, tandis que celle-ci lui fournit du sucre et sans doute des vitamines. La fructification des truffes est reliée aux mycorhizes par des filaments très ténus : on a même pu penser qu'elle perdait rapidement toute connexion au reste du mycélium et se nourrissait directement de la matière organique morte du sol. Toutefois, entre 2013 et 2018, des travaux sous la direction de François Le Tacon, de l'Inrae de Nancy, ont prouvé le contraire (6). Si l'on marque les produits de la photosynthèse d'un arbre à l'aide d'un isotope rare du carbone, le carbone 13, on retrouve ce carbone marqué dans les mycorhizes puis dans les fructifications qui se développent sous l'arbre. En revanche, si l'on introduit dans le sol des feuilles mortes enrichies en carbone 13, les fructifications n'en contiennent pas. Preuve que c'est bien l'arbre qui, via les mycorhizes, est la source majeure de la biomasse des fructifications. D'ailleurs, ces travaux ont culminé avec l'observation, en 2018, du lien de la fructification au mycélium d'une façon rocambolesque : un spéléologue, intrigué par de petites boules noires pendant au plafond d'une grotte de l'Oise, a permis de découvrir de petites fructifications précisément suspendues par ces liens !

Les pères sont indétectables, alors qu'ils devraient vivre aux côtés des mères

LES SPORES SONT BIEN LE PRODUIT DE LA FÉCONDATION ENTRE DEUX INDIVIDUS

Comment savoir à quel individu appartient une mycorhize ou une fructification ? La réponse a été donnée via des techniques génétiques révélant des portions du génome variables entre individus, les microsatellites. Grâce à l'analyse de ces derniers, nous avons montré que les mycorhizes voisines des fructifications semblent formées par le même individu que celui de la fructification… à un détail près. En effet, des extractions profondes, capables de détruire la paroi résistante des spores, ont révélé la présence de l'ADN d'un second individu ! Les spores sont donc le produit… de la fécondation entre deux individus. Le premier – considéré comme la mère – forme et nourrit aussi la fructification, et son mycélium est présent sur les mycorhizes voisines où il se nourrit. Le second ne donne que des gènes ; c'est le père. Père et mère sont génétiquement très proches et, comme les individus voisins sont génétiquement proches, le père est donc sans doute dans l'environnement immédiat de la mère. Pourtant, nos tentatives pour retrouver les traces du père chez la truffe du Périgord et celle de Bourgogne sont restées vaines : on ne détecte jamais son ADN sur les mycorhizes voisines ! Nous nous sommes demandé si l'écologie des pères n'était donc pas un peu différente. Il existe, en effet, un phénomène qui suggère que la truffe interagit avec de petites plantes herbacées. Autour des arbres abritant de la truffe, il existe ainsi une zone de végétation rabougrie, peu dense et faite d'herbes mal développées appelée « brûlé » car elle semble incendiée : la composition de la végétation est la même qu'aux alentours, mais elle est moins dense et les individus sont plus chétifs. Lors de sa thèse dans notre équipe, entre 2016 et 2019, Laure Schneider-Maunoury a cherché à savoir si la truffe interagissait directement avec les racines de ces plantes, et si l'on trouvait là ces pères invisibles par ailleurs (7). Elle a d'abord détecté de l'ADN sur les racines de ces plantes, appartenant à des espèces variées. Puis, avec Aurélie Deveau de l'Inrae de Nancy, nous avons développé une méthode permettant de colorer les filaments de truffe : l'hybridation in situ en fluorescence. Dans cette méthode, un fragment d'ADN dont la séquence est propre à l'espèce recherchée est marqué à l'aide d'un colorant fluorescent, puis déposé sur des coupes des racines fines. Là, après un traitement adapté,



▲ *Autour des arbres truffiers, on trouve une zone pauvre en végétation, appelée « brûlé ». Ce phénomène résulte de la colonisation des plantes herbacées par la truffe.*

M. TOURNAYRE

il s'attache à des fragments d'ADN présentant une séquence identique, s'il y en a, et les rend fluorescents. Cette méthode a révélé des filaments de truffe colonisant les racines et grandissant entre les cellules racinaires sans y pénétrer. Il ne s'agit pas de mycorhizes : la structure n'est pas organisée et les filaments de truffe sont plutôt épars. Aucun symptôme ni aucune déformation n'affecte ces racines : on parle d'une colonisation endophyte. Pour étudier d'éventuels liens physiologiques avec les truffes, nous avons enfin réalisé des expériences en pot, mettant des plantes herbacées en contact avec des chênes verts mycorhizés ou non par la truffe du Périgord. Nos observations suggèrent un lien : d'une part, les hyphes de truffe noire sont deux fois plus abondants dans le sol en présence de plantes herbacées ; d'autre part, la présence de truffe réduit de 40 % le développement de ces plantes et les appauvrit en azote et en phosphate (8). Bien plus, en présence de truffe, le nombre de germinations de mauvaises herbes dans les pots est réduit de près de 25 % !

NOTRE MAÎTRISE DE LA PRODUCTION DE TRUFFE RESTE IMPARFAITE

Cette interaction sans doute parasitaire avec les plantes herbacées a complexifié notre vision de l'écologie de la truffe. On ne connaît pas encore en détail les échanges, ni leur rôle dans l'alimentation du champignon, mais cela explique l'origine du brûlé. Les pères se trouvent-ils sur les racines des plantes herbacées, comme nous l'espérions ? Malheureusement, les typages génétiques n'ont détecté que les ADN des mères voisines, et non ceux des pères ! Comment donc expliquer que ces pères soient indétectables, alors que, proches génétiquement des mères, ils devraient vivre à leurs côtés ? Bien que d'autres compartiments du sol restent à explorer, les études réalisées sur des populations de truffes du Périgord et de Bourgogne, autant par notre équipe que par d'autres en France et en Italie, suggèrent une piste. Le suivi de parcelles truffières sur plusieurs années a révélé que les individus femelles forment souvent plusieurs fructifications et peuvent persister plusieurs années : cela suggère que leur mycélium est bien établi, pérenne et couvre plusieurs dizaines de centimètres carrés. À l'inverse, les pères ne sont, la plupart du temps, détectés que sur une seule fructification et durant une seule année. Pour expliquer cette fugacité, nous avons proposé que des spores restées dans le sol fécondent, en germant, les grands individus déjà établis. Ces petites germinations (de tout petits mycéliums, peut-être même pas connectés aux plantes voisines) n'auraient pas les ressources pour nourrir une fructification ; de plus, sur place, la concurrence des individus déjà établis doit être forte. Mais elles peuvent se comporter en mâles, avant de disparaître après la fécondation. L'une de nos découvertes récentes soutient cette possibilité. Des examens systématiques du sol en fin de saison dans des truffières ont révélé que près de 40 % des fructifications restent dans le sol, non récoltées (9) sans que l'on sache vraiment pourquoi : elles ont pu être « oubliées » par les chiens des trufficulteurs, ou ont « mal » mûri et n'ont jamais émis d'odeur. Mais elles accumulent des spores dans le sol, susceptibles de germer et de féconder leurs grands voisins. Au passage, cela expliquerait pourquoi les pères et les mères sont génétiquement proches, car ces spores non déplacées ont souvent pour mère… l'individu qu'elles fécondent ! Cela expliquerait la forte consanguinité entre parents observée chez les truffes.

Ces nouvelles découvertes enrichissent notre vision de ces champignons qui ont mis en place, au cours de leur évolution, de très nombreux liens d'entraide ou d'exploitation avec des espèces végétales ou animales. L'un de ces liens, le plus récent, reste encore très aléatoire : celui à l'humain. En effet, notre maîtrise de la production de truffe reste imparfaite. Bien sûr, l'inoculation de la truffe sur de jeunes arbres avant leur installation en truffière a été un progrès : 80 % des truffes de Bourgogne et du Périgord proviennent aujourd'hui de la plantation de tels arbres truffiers. L'inoculation de la truffe blanche du Piémont vient tout juste d'être maîtrisée par des équipes de l'Inrae. Mais il reste à faire. Les travaux récents, qui suggèrent un rôle des invertébrés dans la germination des spores, ou l'importance des herbacées dans la nutrition du mycélium, permettront peut-être d'utiliser demain les interactions de la truffe avec les organismes qui les entourent. ■

40 %

DES FRUCTIFICATIONS échappent à la récolte. Elles accumulent des spores dans le sol, susceptibles de germer et de féconder les grands individus déjà établis.

(1) S. Schickmann *et al.*, *Oecologia, 170*, 395, 2012.

(2) T. Talou *et al.*, *Mycol. Res., 2*, 277, 1990.

(3) C. Murat *et al.*, *Nat. Ecol. Evol., 12*, 1956, 2018.

(4) F. Ori *et al.*, *Fungal Biol., 125*, 796, 2021.

(5) E. Taschen *et al.*, *Mol. Ecol., 25*, 5611, 2016.

(6) F. Le Tacon *et al.*, *PLoS ONE, 8*, e64626, 2013.

(7) L. Schneider-Maunoury *et al.*, *New Phytol., 225*, 2542, 2019.

(8) E. Taschen *et al.*, *Plant Soil, 446*, 577. 2020.

(9) L. Schneider-Maunoury *et al.*, *Mycorrhiza, 29*, 663, 2019.

Annexe 2 : « Appel aux trufficulteurs et techniciens », Le Trufficulteur, n°115, p.19-20.

SCIENCE ET TRUFFICULTURE

Appel aux trufficulteurs et techniciens

Liam LAURENT-WEBB[1], Laurent GENOLA[2], Philippe RECH[1], Marc-André SELOSSE[1]
[1] Institut de Systématique, Evolution, Biodiversité (ISYEB), Muséum national d'Histoire naturelle, CP 39, 57 rue Cuvier, 75005 Paris
[2] Station Trufficole, 46090 Le Montat

Les plantes du brûlé, serait-elle une ressource pour la truffe ? C'est avec cette question que les auteurs de cet article sollicitent les trufficulteurs et techniciens pour une expérimentation simple visant à connaître si les plantes présentes sur le brûlé sont bénéfiques pour la truffe ou s'il faut au contraire les arracher notamment avec un travail du sol.

Pour participer à ce programme expérimental, contactez par e-mail
liam.laurent@cirad.fr

Figure 1 : Exemple d'arbre du dispositif chez André Coulon. Quart de gauche non désherbé, quart de droite désherbé. (Ph. Thibault Larcher)

Les lecteurs réguliers du *Trufficulteur* se rappellent peut-être de résultats présentés dans divers numéros récents du journal.
Le premier article (*Le Trufficulteur* 113 : 15-16 ; 2020) rapportait les travaux de Laure Schneider-Maunoury (MNHN), qui a démontré que dans des brûlés producteurs de *Tuber melanosporum* et de *Tuber aestivum,* on retrouvait de la truffe dans les racines des plantes du brûlé, dites plantes compagnes. Cette interaction est qualifiée d'endophytisme, que l'on pourrait définir ainsi : une interaction diffuse (peu de filaments mycéliens dans la racine), sans symptôme apparent (pas de parasitisme ni de structures spécialisées telles que les mycorhizes).
Mais ces filaments ont-ils un rôle, une fonction pour la truffe ? Les résultats obtenus par Elisa Taschen (alors au CEFE-CNRS Montpellier) suggèrent que oui : sur des plants de chênes truffiers en pots, la présence de plantes compagnes augmente la croissance du mycélium et la nutrition azotée de l'arbre mycorhizé. Inversement, la présence de *T. melanosporum* diminue la croissance et la germination des plantes compagnes. Ces résultats ont été publiés dans la revue Plant & Soil (446 : 577-594 ; 2019).
Alors que des écrits historiques vantent les vertus de certaines plantes pour la trufficulture, différentes techniques de désherbage sont régulièrement mises en place, en France comme à l'étranger. Les plantes du brûlé sont-elles une concurrence à réguler ou une ressource pour la trufficulture ? Les résultats obtenus sur le mycélium sont-ils extrapolables à la production d'ascocarpe ? La réponse ne peut venir que du terrain et de l'expérimentation.
Pour vérifier cela, nous faisons appel à vous, trufficulteurs et techniciens de la filière, pour mettre en place un protocole simple permettant d'évaluer l'effet de la présence du couvert végétal sur le brûlé sur 1°) la croissance mycélienne et 2°) la production de truffe. Nous travaillons à ce jour déjà avec plusieurs trufficulteurs et collaborons avec Xavier Praladé, de l'IRTA (Espagne), pour l'évaluation de la quantité de mycélium par PCR quantitative (méthode moléculaire permettant d'estimer la quantité de mycélium de truffe dans le sol). Bien que le protocole soit relativement simple à mettre en place, cette question épineuse nécessite un réseau de partenaires important pour y répondre avec rigueur, avec de nombreuses répétitions. À votre tour de nous rejoindre ?

LE PROTOCOLE EN QUELQUES MOTS

La mise en place du protocole nécessite minimum 3 brûlés producteurs, idéalement 5, avec la même essence myco-

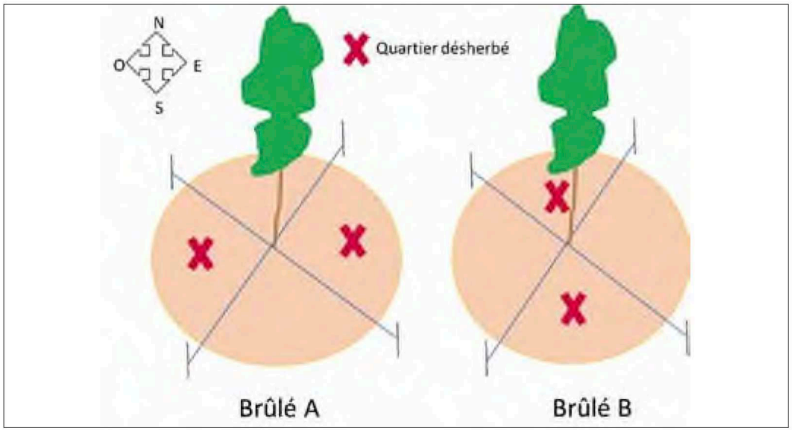


Figure 2 : Schéma du protocole expérimental

rhizée. Chaque brûlé est divisé en quatre quarts, chaque quart orienté vers un point cardinal (N/E/S/O). Deux quartiers seront désherbés, tandis que les deux autres laissés sans intervention, en alternance (Figure 1 et 2). Afin de s'affranchir d'un éventuel effet lié à l'exposition différentielle sur le brûlé, il faudra alterner les quarts désherbés ou non entre chaque arbre (Figure 2).
Le désherbage initial sera effectué par arrachage manuel des plantes présentes afin d'occasionner le moins de perturbations du sol possible. Dans le cas où cette végétation serait trop dense pour cela, d'autres méthodes sont envisageables, uniquement pour le premier désherbage. Par la suite, le contrôle de la végétation consistera à une veille régulière pour éliminer par arrachage des nouvelles plantules.

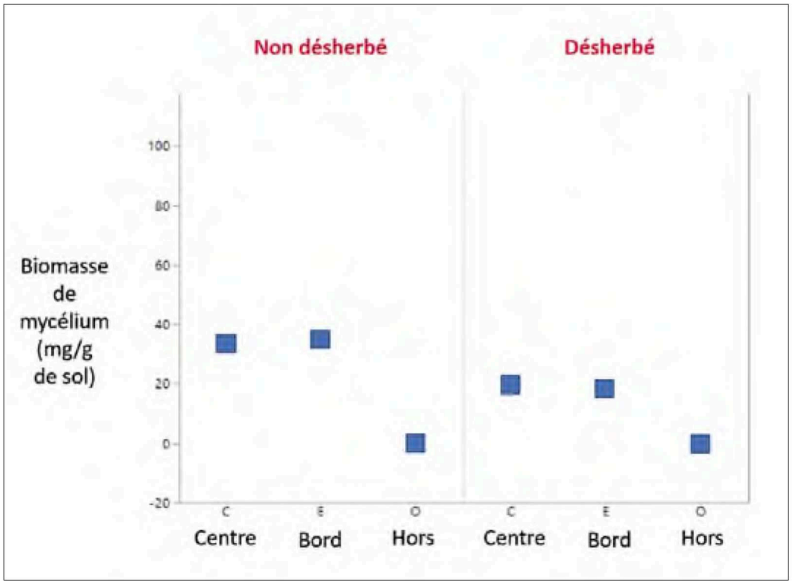


Figure 3 : Biomasse de mycélium dans les parties non désherbées et désherbées. En moyenne, dans le brûlé, la quantité de mycélium est de 38 mg/g de sol sans intervention contre 23 mg/g de sol dans les zones désherbées.

LES VARIABLES À MESURER

Nous analyserons principalement deux paramètres, à savoir 1°) la quantité de mycélium dans le sol et 2°) la production de truffes.
1°) Entre le 20 avril et le 20 mai, nous vous demanderons de prélever différents échantillons de sol de la manière suivante : dans chaque quart, du sol est prélevé au centre du quartier, sur une surface de 20x20 cm et 20 cm de profondeur. Le sol ainsi extrait est mélangé, les cailloux et graviers (> 1 cm) écartés. Après mélange, environ 10 g de sol sont conservés. Ce même échantillonnage est effectué hors du brûlé, à 10 cm, pour chaque quartier. Il y a donc un total de 8 échantillons de sol par arbre, qui seront analysés par PCR quantitative par Xavier Parladé à l'IRTA. (Frais d'expédition remboursés, bien sûr)
2°) De plus, les truffes récoltées seront enregistrées individuellement, en notant la date de récolte, la localisation de celle-ci et sa masse.
Le tout premier prélèvement de sol sera effectué avant le désherbage initial. La durée sera de deux ans au moins.

PREMIERS RÉSULTATS

Les premières analyses de quantité de mycélium du sol suggèrent que la quantité de mycélium est plus importante dans les parties non désherbées que dans les parties désherbées (Figure 3). Dans le brûlé, il y a en moyenne 38 mg/g de sol de mycélium dans les zones sans intervention, contre 23 mg/g de sol dans les zones désherbées. Ces données sont en contradiction avec celles d'Oliver et *al.* (2011) qui suggèrent que la mycorhization est plus importante dans les brûlés traités au glyphosate (mais les méthodes de défrichement diffèrent). La tendance que nous observons doit cependant être confirmée ou infirmée par un plus grand nombre de données, raison pour laquelle nous nous tournons vers vous.

Annexe 3 : Désherbage des arbres producteurs : essais *in situ*.

Afin de favoriser la production de truffes, il est nécessaire de favoriser le maintien des populations de champignon au cours des années. Un ensemble de techniques culturales permettent de favoriser le développement des espèces du genre *Tuber*, tels que la taille des arbres, l'irrigation ou encore la mise en place de « pièges » à truffes (cf. **IV.2**). La gestion de la ressource hydrique dans les truffières est un facteur clé dans la réussite des truffières, en particulier face à l'augmentation des sécheresses estivales qui pourrait fortement limiter la production de truffes (Büntgen *et al*., 2012). Afin de limiter la compétition hydrique entre le couple arbre-symbionte et les plantes environnantes, certains trufficulteurs désherbent le pourtour des arbres producteurs de manière mécanique ou chimique (Olivera *et al*., 2011, 2014). Certaines pratique de désherbage, comme la mise en place de bâches plastiques blanches autour des arbres, semblent favoriser le développement mycélien de *Tuber melanosporum* et *T. aestivum* (Olivera *et al*., 2014 ; Piñuela *et al*., 2021). L'effet du désherbage sur le développement mycélien a été l'objet d'un nombre limité d'étude, qui ne prennent en général pas en compte l'effet sur la production de carpophores (citations précédentes). De plus, des résultats récents montrent *in situ* que les hyphes de truffes sont capables de coloniser de manière endophyte les racines des plantes herbacées autour des arbres producteurs (Schneider-Maunoury *et al.*, 2018, 2020). En mésocosme, Taschen *et al.* (2020) ont démontré que la présence de plantes compagnes autour des plants mycorhizés de chêne vert (*Quercus ilex*) favorisait le développement mycélien de *T. melanosporum*. Ces résultats suggèrent que la colonisation endophyte des plantes non-ectomycorhiziennes environnantes pourrait favoriser le développement mycélien des truffes ; le désherbage pourrait donc défavoriser le développement de truffes. Afin de déterminer l'effet *in situ* du désherbage sur le développement mycélien et la production de carpophores de *T. melanosporum*, des essais au champ ont été mis en place par des trufficulteurs partenaires à partir de 2020. Ce dispositif participatif est toujours en place et fait l'objet d'une collaboration avec Xavier Parladé (IRTA, Espagne) et Ana Rincon (Institut des Sciences Agronomiques, CSIC, Espagne) qui réalisent les analyses moléculaires. Nous présenterons ici une partie des résultats car ce dispositif a été mis en place relativement récemment et que nous ne disposons à ce jour que d'une partie des données moléculaires.

Ce dispositif expérimental *in situ* est basé sur la collaboration avec des trufficulteurs volontaires mettant en place bénévolement les essais au sein de leur truffière. La publication d'un appel à contribution dans une revue française spécialisée (**Annexe 2** ; Laurent-Webb *et al*., 2021) a permis d'élargir le groupe qui présente à ce jour quatre trufficulteurs bénévoles

(trois en France et un en Espagne). Dans chaque truffière, entre 5 et 6 arbres productifs ont été sélectionnés par les trufficulteurs. Pour chaque arbre producteur sélectionné, le brûlé est divisé en quatre parts. Dans deux des quatre quartiers, la végétation est systématiquement retirée, de préférence manuellement de sorte à limiter les perturbations du sol, et ce tout au long de l'année (**Figure VI.1**). Aucune intervention n'est réalisée sur la végétation des deux autres quartiers témoins. L'orientation des quartiers désherbés (N-S ou E-O) est choisie alématoirement.

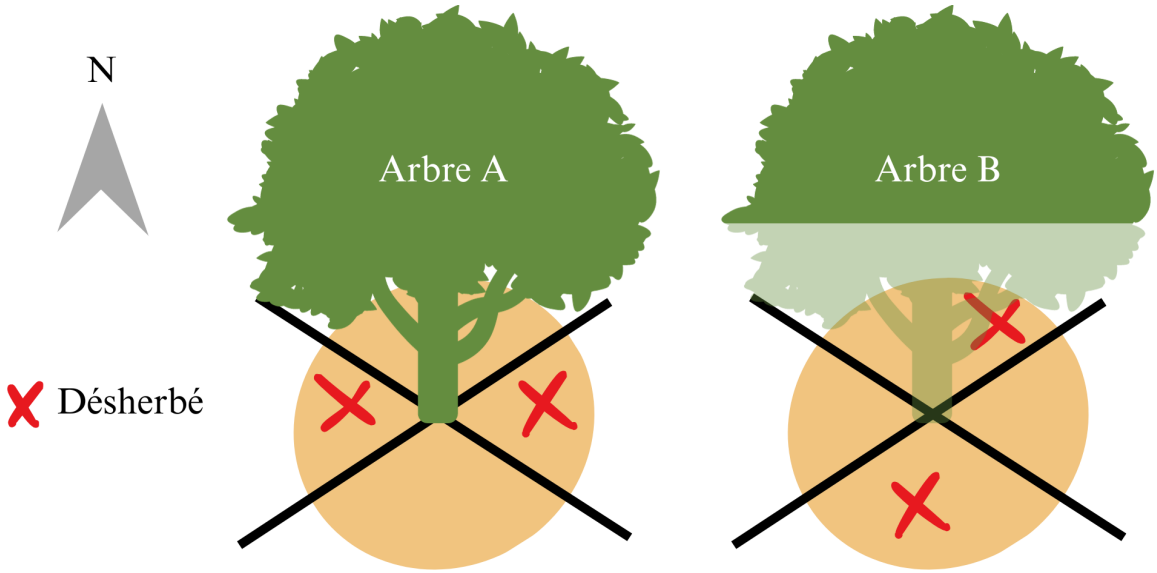


Figure VI.1 Représentation schématique du dispositif expérimental de désherbage autour des arbres producteurs.

Au printemps, après la période de récolte, 50g de sol est prélevé à 20 cm de profondeur au centre et en bordure du brûlé dans chaque quartier. Un échantillon composite de sol est formé en mélangeant, par quartier, les échantillons du centre et de la bordure du brûlé. Les échantillons sont conservés congelés avant envoi pour analyses moléculaires.

La quantification du mycélium de *T. melanosporum* présent dans le sol est quantifiée par PCR quantitative comme décrit dans Garcia-Barreda *et al.* (2023). La production des quariters déhserbés et non-déhserbés sera comparée au cours des saisons 2024/2025 et 2025/2026.

Nous disposons à ce jour seulement d'une partie des résultats de quantification du mycélium du sol, présentés en **Figure VI.2**. Nous n'avons pour le moment pas observé de différences de quantités de mycélium dans le sol entre les deux modalités (désherbé ou non ; **Figure VI.2**). Le suivi de ce dispositif pourra nous permettre de déterminer l'influence de la strate herbacée sur le développement mycélien à plus long terme et la production de fructifications de *T. melanosporum*.

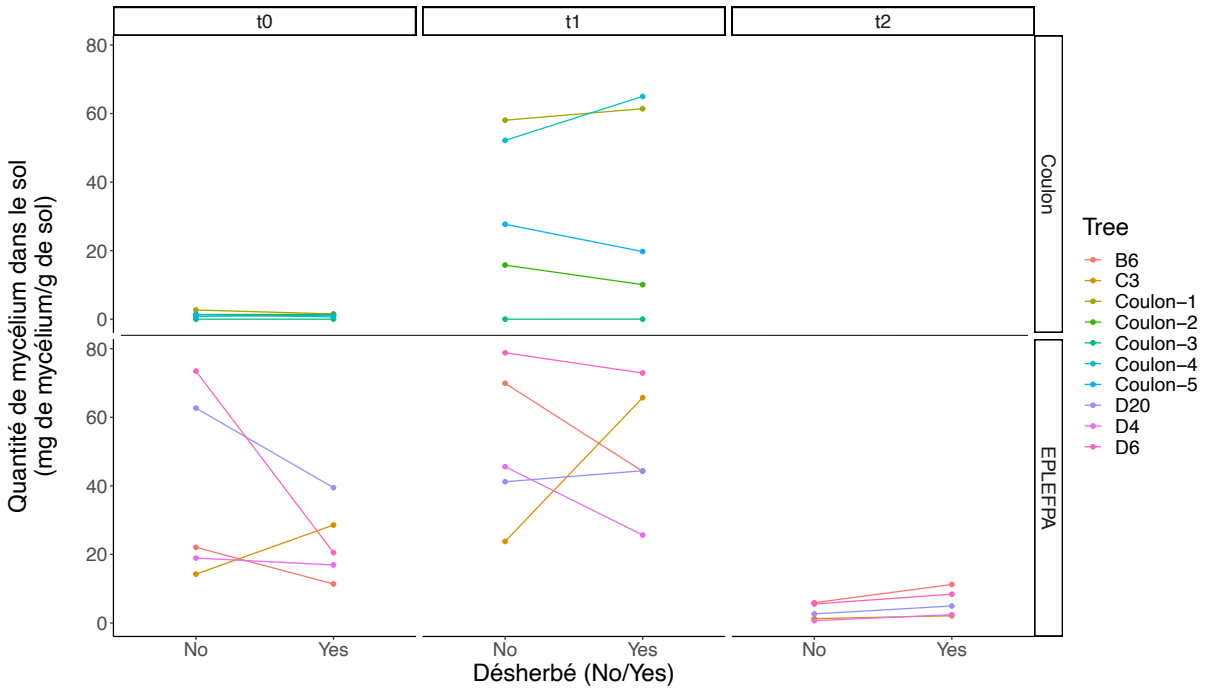


Figure VI.2 Quantification du mycélium de *Tuber melanosporum* dans le sol de quartiers désherbés ou non dans deux truffières, à différents temps. Chaque couleur correspond à la moyenne par modalité (désherbé ou non) et par arbre (*tree*).

Annexe 4 : Description morphologique des carpophores de *Tirmania nivea* récoltés sur le site de Sharaan (M. Ducousso).

Description morphologique des ascocarpes et observations au microscope réalisées par Marc Ducousso.

Champignon gastéroïde à péridium épais (1 à 2 mm) et résistant, blanc ayant tendance au jaunissement à maturité ou par contact (**Figure VI.3**). Présence d'un pseudo stipe qui assure l'ancrage de la fructification dans le sol : cet organe est d'importance très variable d'une fructification à l'autre, de résiduel à la moitié de la longueur totale de la fructification. A la différence de la gléba, le pseudo stipe renferme des grains de sable et de petites poches d'air sphériques (**Figure VI.4**). La gléba blanche à tendance à jaunir à maturité (**Figure VI.5**).

Au microscope, la gléba blanche est presque exclusivement constituée d'asques contenant 8 ascospores (parfois seulement 7). Dans les parties plus matures de la gléba, parties jaunissantes, les spores ont été libérées de l'enveloppe de l'asque, mais restent en place. Suivant les observations, des asques vidées de leurs spores sont encore visibles ou seulement un amas de tissus déstructurés (**Figure VI.6**). Le tissu du péridium est constitué d'hyphes de 4-6 µm de diamètre ; un granule très réfringent est observé au centre des septa qui séparent les cellules. Des faisceaux d'hyphes émergent de la face interne du péridium portent des asques (**Figure VI.7**). Le pseudo stipe dont l'observation est rendue délicate à cause des nombres grains de sable qui y sont inclus est constitué exclusivement d'hyphes stériles de 3-4 µm de diamètre avec des parois plus fines que dans le péridium (**Figure VI.8**).

Figure VI.3 Photographie de gauche, vue de la surface bosselée et ridée du péridium blanc de *Tirmania nivea*. Photographie de gauche vue en coupe du péridium dont la partie interne en contact de la gléba blanche, jaunie rapidement à la coupe.

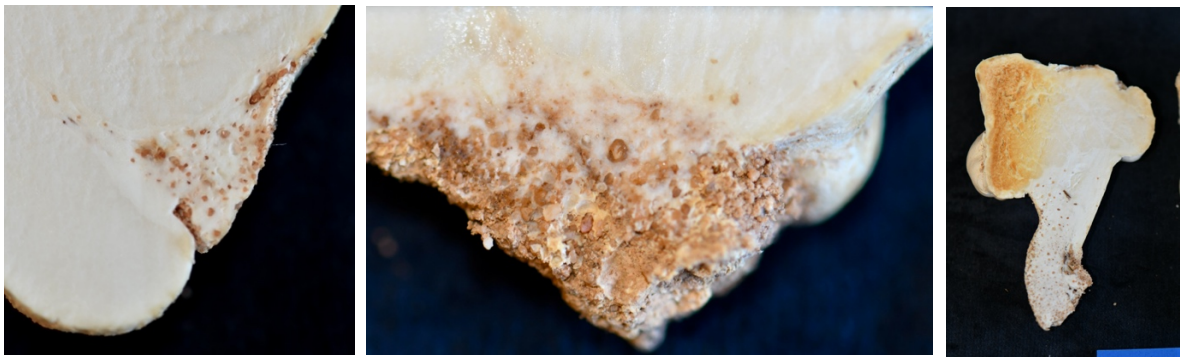


Figure VI.4 Importante diversité de développement du pseudo stipe. Dans tous les cas, son tissu inclus des grains de sable et de petites poches d'air sphériques ; ce tissu résulte d'une agglomération d'hyphes sans différentiation d'un péridium.

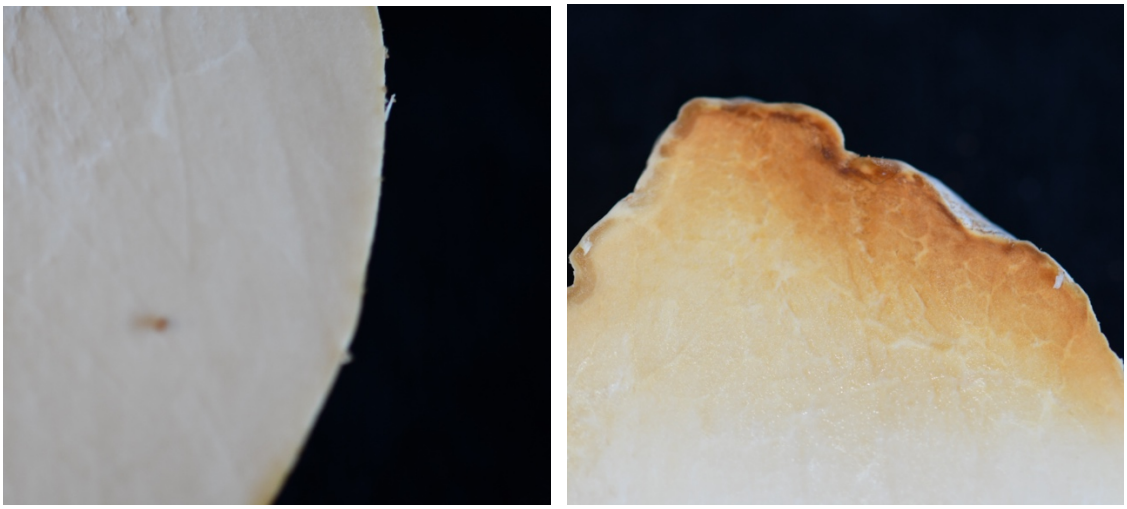


Figure VI.5 Photographie de gauche, gléba blanche en coupe sur un ascocarpe frais ; photographie de droite, jaunissement de la gléba dans la zone de maturité des spores.

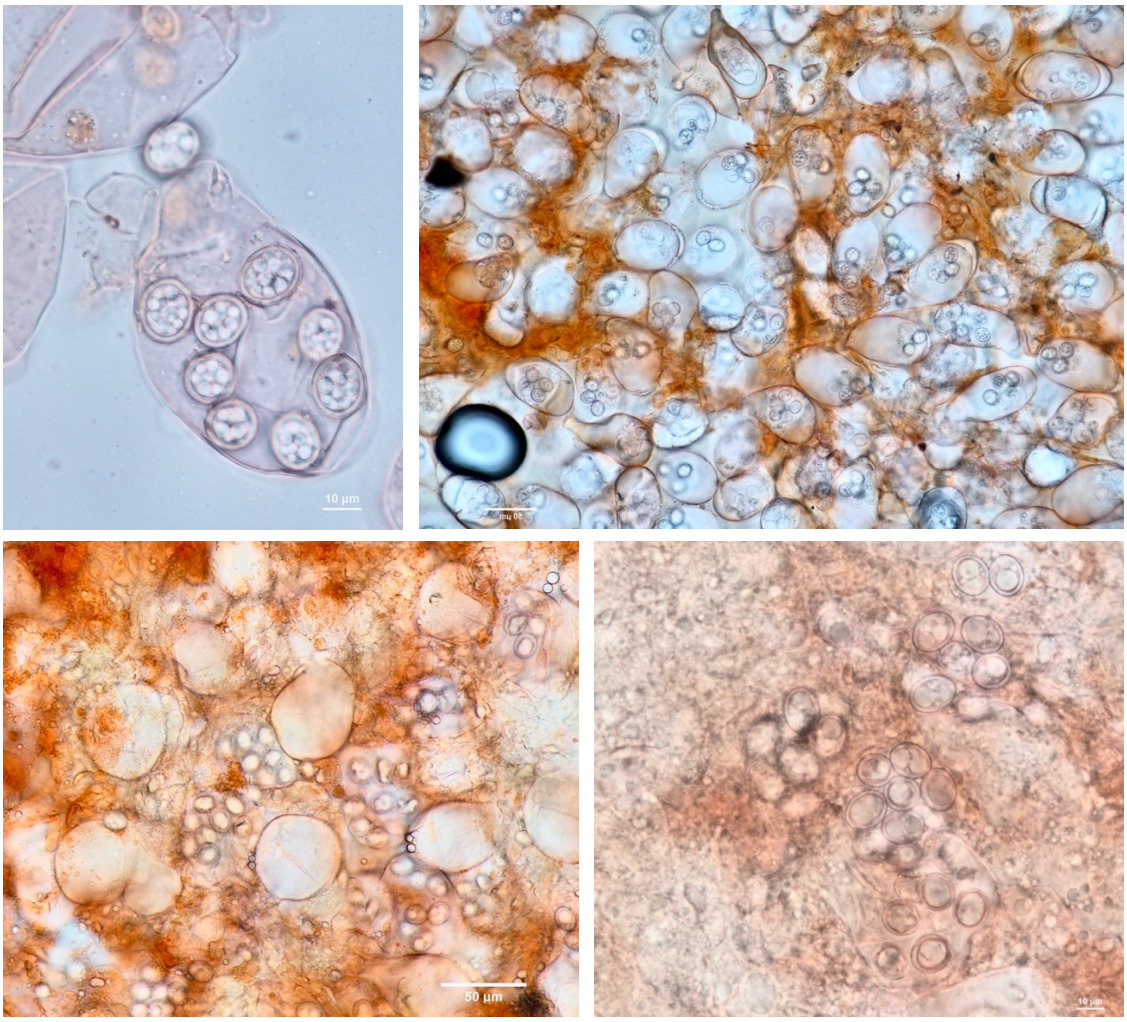


Figure VI.6 Observation de la gléba de *Tirmania nivea* au microscope à l'objectif X40 et X100 à immersion dans du rouge Congo ammoniacal, photographie en haut à gauche, asque pédicellée contenant huit spores ovoïdes lisse de 10-14 µm ; photographie en haut à droite, gléba presque exclusivement constitué d'asques ; photographie en bas à gauche, stade de maturité plus avancé avec des asques vidés de leurs spores ; photographie en bas à droite, à un stade de maturité encore plus avancé, les parois des asques ont presque complètement disparues mais les spores restent en place.

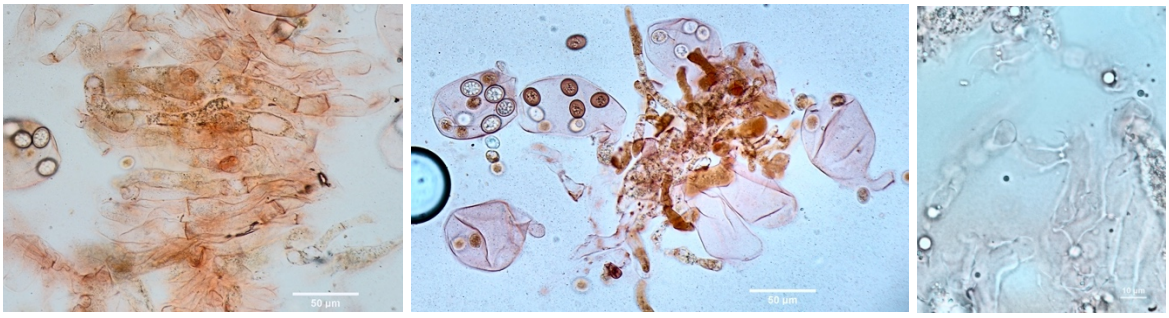


Figure VI.7 Observation du péridium de *Tirmania nivea* au microscope à l'objectif X40 et X100 à l'immersion dans une solution de rouge Congo ammoniacal ; photographie de gauche, hyphes stériles du péridium, photographie du centre faisceau d'hyphes stériles émergent de la face interne du péridium et portant des asques en position terminale des hyphes ; photographie de droite, granules réfringents au centre des septa qui séparent les cellules stériles du péridium.

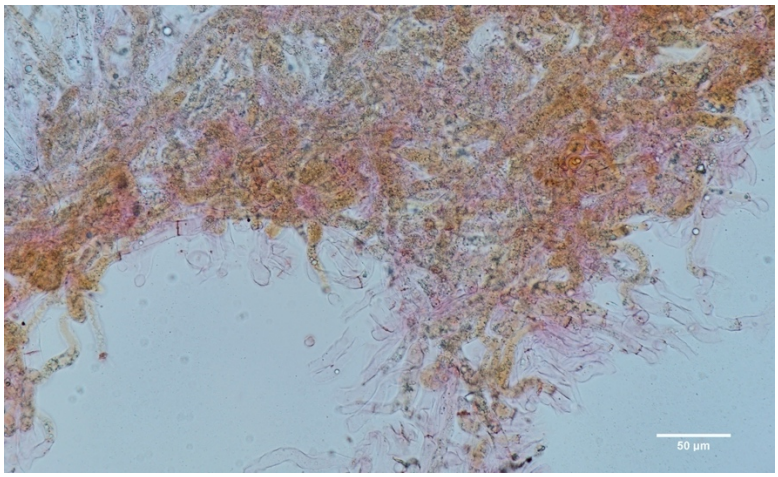


Figure VI.8 Hyphes stériles du pseudo stipe observés à l'objectif X40 dans une solution de rouge Congo ammoniacal.

Bibliographie

Abdelfattah, A., Tack, A. J. M., Lobato, C., Wassermann, B., & Berg, G. (2022). From seed to seed : The role of microbial inheritance in the assembly of the plant microbiome. *Trends in Microbiology*. https://doi.org/10.1016/j.tim.2022.10.009

Abdelfattah, A., Wisniewski, M., Schena, L., & Tack, A. J. M. (2021). Experimental evidence of microbial inheritance in plants and transmission routes from seed to phyllosphere and root. *Environmental Microbiology*, *23*(4), 2199-2214. https://doi.org/10.1111/1462-2920.15392

Abreu, A., Bourgois, E., Gristwood, A., Troublé, R., Acinas, S. G., Bork, P., Boss, E., Bowler, C., Budinich, M., Chaffron, S., de Vargas, C., Delmont, T. O., Eveillard, D., Guidi, L., Iudicone, D., Kandels, S., Morlon, H., Lombard, F., Pepperkok, R., … European Marine Biological Resource Centre - European Research Infrastructure Consortium (EMBRC-ERIC). (2022). Priorities for ocean microbiome research. *Nature Microbiology*, *7*(7), Article 7. https://doi.org/10.1038/s41564-022-01145-5

Achtman, M., & Wagner, M. (2008). Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. *Nature Reviews Microbiology*, *6*(6), Article 6. https://doi.org/10.1038/nrmicro1872

Al Salameen, F., Habibi, N., Kumar, V., Al Amad, S., Dashti, J., Talebi, L., & Al Doaij, B. (2018). Genetic diversity and population structure of Haloxylon salicornicum moq. In Kuwait by ISSR markers. *PLOS ONE*, *13*(11), e0207369. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207369

Almario, J., Fabiańska, I., Saridis, G., & Bucher, M. (2022). Unearthing the plant–microbe quid pro quo in root associations with beneficial fungi. *New Phytologist*, *234*(6), 1967-1976. https://doi.org/10.1111/nph.18061

Almario, J., Jeena, G., Wunder, J., Langen, G., Zuccaro, A., Coupland, G., & Bucher, M. (2017). Root-associated fungal microbiota of nonmycorrhizal Arabis alpina and its contribution to plant phosphorus nutrition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(44), E9403-E9412. https://doi.org/10.1073/pnas.1710455114

Almario, J., Mahmoudi, M., Kroll, S., Agler, M., Placzek, A., Mari, A., & Kemen, E. (2022). The Leaf Microbiome of Arabidopsis Displays Reproducible Dynamics and Patterns throughout the Growing Season. *mBio*, *13*(3), e02825-21. https://doi.org/10.1128/mbio.02825-21

Ammarellou, A., Wang, Y., Nematzadeh, G., & Tajick, M. (2014). Non-Mediterranean Asian Desert Countries. In V. Kagan-Zur, N. Roth-Bejerano, Y. Sitrit, & A. Morte (Éds.), *Desert Truffles : Phylogeny, Physiology, Distribution and Domestication* (p. 173-192). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-40096-4_12

Anderson, M. J. (2017). Permutational Multivariate Analysis of Variance (PERMANOVA). In *Wiley StatsRef : Statistics Reference Online* (p. 1-15). John Wiley & Sons, Ltd. https://doi.org/10.1002/9781118445112.stat07841

Anthony, M. A., Bender, S. F., & van der Heijden, M. G. A. (2023). Enumerating soil biodiversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *120*(33), e2304663120. https://doi.org/10.1073/pnas.2304663120

Araya, J. P., González, M., Cardinale, M., Schnell, S., & Stoll, A. (2020). Microbiome Dynamics Associated With the Atacama Flowering Desert. *Frontiers in Microbiology*, *0*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03160

Arnault, G., Marais, C., Préveaux, A., Briand, M., Poisson, A.-S., Sarniguet, A., Barret, M., & Simonin, M. (2023). *Seedling microbiota engineering using bacterial synthetic community inoculation on seeds*. (p. 2023.11.24.568582). bioRxiv. https://doi.org/10.1101/2023.11.24.568582

Asghari, H. R., Marschner, P., Smith, S. E., & Smith, F. A. (2005). Growth response of Atriplex nummularia to inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi at different salinity levels. *Plant and Soil*, *273*(1), 245-256. https://doi.org/10.1007/s11104-004-7942-6

Aßhauer, K. P., Wemheuer, B., Daniel, R., & Meinicke, P. (2015). Tax4Fun : Predicting functional profiles from metagenomic 16S rRNA data: Fig. 1. *Bioinformatics*, *31*(17), 2882-2884. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv287

Attia, S., Russel, J., Mortensen, M. S., Madsen, J. S., & Sørensen, S. J. (2022). Unexpected diversity among small-scale sample replicates of defined plant root compartments. *The ISME Journal*, *16*(4), Article 4. https://doi.org/10.1038/s41396-021-01094-7

Avery, O. T., MacLeod, C. M., & McCarty, M. (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *Journal of Experimental Medicine*, *79*(2), 137-158. https://doi.org/10.1084/jem.79.2.137

Baas-Becking, L. G. M. (1934). *Geobiologie; of inleiding tot de milieukunde*. WP Van Stockum & Zoon NV.

Bach, C., Beacco, P., Cammaletti, P., Babel-Chen, Z., Levesque, E., Todesco, F., Cotton, C., Robin, B., & Murat, C. (2021). First production of Italian white truffle (*Tuber magnatum* Pico) ascocarps in an orchard outside its natural range distribution in France. *Mycorrhiza*. https://doi.org/10.1007/s00572-020-01013-2

Bachar, A., Soares, M. I. M., & Gillor, O. (2012). The Effect of Resource Islands on Abundance and Diversity of Bacteria in Arid Soils. *Microbial Ecology*, *63*(3), 694-700. https://doi.org/10.1007/s00248-011-9957-x

Bahram, M., Harend, H., & Tedersoo, L. (2014). Network perspectives of ectomycorrhizal associations. *Fungal Ecology*, *7*, 70-77. https://doi.org/10.1016/j.funeco.2013.10.003

Bahram, M., Netherway, T., Frioux, C., Ferretti, P., Coelho, L. P., Geisen, S., Bork, P., & Hildebrand, F. (2021). Metagenomic assessment of the global diversity and distribution of bacteria and fungi. *Environmental Microbiology*, *23*(1), 316-326. https://doi.org/10.1111/1462-2920.15314

Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S., & Vivanco, J. M. (2006). The Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions with Plants and Other Organisms. *Annual Review of Plant Biology*, *57*(1), 233-266. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159

Baldrian, P., & Kohout, P. (2017). Interactions of saprotrophic fungi with tree roots : Can we observe the emergence of novel ectomycorrhizal fungi? *New Phytologist*, *215*(2), 511-513. https://doi.org/10.1111/nph.14665

Banos, S., Lentendu, G., Kopf, A., Wubet, T., Glöckner, F. O., & Reich, M. (2018). A comprehensive fungi-specific 18S rRNA gene sequence primer toolkit suited for diverse research issues and sequencing platforms. *BMC Microbiology*, *18*(1), 190. https://doi.org/10.1186/s12866-018-1331-4

Barajas, H. R., Martínez-Sánchez, S., Romero, M. F., Álvarez, C. H., Servín-González, L., Peimbert, M., Cruz-Ortega, R., García-Oliva, F., & Alcaraz, L. D. (2020). Testing the Two-Step Model of Plant Root Microbiome Acquisition Under Multiple Plant Species and Soil Sources. *Frontiers in Microbiology*, *11*. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.542742

Barberán, A., Bates, S. T., Casamayor, E. O., & Fierer, N. (2012). Using network analysis to explore co-occurrence patterns in soil microbial communities. *The ISME Journal*, *6*(2), 343-351. https://doi.org/10.1038/ismej.2011.119

Barberis, L., Michalet, S., Piola, F., & Binet, P. (2021). Root fungal endophytes : Identity, phylogeny and roles in plant tolerance to metal stress. *Fungal Biology*, *125*(4), 326-345. https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.11.011

Barnosky, A. D., Matzke, N., Tomiya, S., Wogan, G. O. U., Swartz, B., Quental, T. B., Marshall, C., McGuire, J. L., Lindsey, E. L., Maguire, K. C., Mersey, B., & Ferrer, E. A. (2011). Has the Earth's sixth mass extinction already arrived? *Nature*, *471*(7336), Article 7336. https://doi.org/10.1038/nature09678

Bar-On, Y. M., Phillips, R., & Milo, R. (2018). The biomass distribution on Earth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(25), 6506-6511. https://doi.org/10.1073/pnas.1711842115

Barret, M., Briand, M., Bonneau, S., Préveaux, A., Valière, S., Bouchez, O., Hunault, G., Simoneau, P., & Jacques, M.-A. (2015). Emergence Shapes the Structure of the Seed Microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(4), 1257-1266. https://doi.org/10.1128/AEM.03722-14

Bascompte, J. (2010). Structure and Dynamics of Ecological Networks. *Science*, *329*(5993), 765-766. https://doi.org/10.1126/science.1194255

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*, *100*(16), 9383-9387. https://doi.org/10.1073/pnas.1633576100

Beiler, K. J., Simard, S. W., LeMay, V., & Durall, D. M. (2012). Vertical partitioning between sister species of *Rhizopogon* fungi on mesic and xeric sites in an interior Douglas-fir forest. *Molecular Ecology*, *21*(24), 6163-6174. https://doi.org/10.1111/mec.12076

Berg, G., & Hallmann, J. (2006). Control of Plant Pathogenic Fungi with Bacterial Endophytes. In B. J. E. Schulz, C. J. C. Boyle, & T. N. Sieber (Éds.), *Microbial Root Endophytes* (p. 53-69). Springer. https://doi.org/10.1007/3-540-33526-9_4

Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Vergès, M.-C. C., Charles, T., Chen, X., Cocolin, L., Eversole, K., Corral, G. H., Kazou, M., Kinkel, L., Lange, L., Lima, N., Loy, A., Macklin, J. A., Maguin, E., Mauchline, T., McClure, R., … Schloter, M. (2020). Microbiome definition re-visited : Old concepts and new challenges. *Microbiome*, *8*(1), 103. https://doi.org/10.1186/s40168-020-00875-0

Berruti, 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*(5), 658-667. https://doi.org/10.1111/1758-2229.12574

Bittebiere, A.-K., Vandenkoornhuyse, P., Maluenda, E., Gareil, A., Dheilly, A., Coudouel, S., Bahin, M., & Mony, C. (2020). Past spatial structure of plant communities determines arbuscular mycorrhizal fungal community assembly. *Journal of Ecology*, *108*(2), 546-560. https://doi.org/10.1111/1365-2745.13279

Blackwell, M. (2011). The Fungi : 1, 2, 3 … 5.1 million species? *American Journal of Botany*, *98*(3), 426-438. https://doi.org/10.3732/ajb.1000298

Blüthgen, N., Menzel, F., & Blüthgen, N. (2006). Measuring specialization in species interaction networks. *BMC Ecology*, *6*(1), 9. https://doi.org/10.1186/1472-6785-6-9

Boddy, L., & Watkinson, S. C. (1995). Wood decomposition, higher fungi, and their role in nutrient redistribution. *Canadian Journal of Botany*, *73*(S1), 1377-1383. https://doi.org/10.1139/b95-400

Bokhary, H. A., & Parvez, S. (1992). Soil mycoflora from wild desert truffle habitats in northern Saudi Arabia. *Journal of Arid Environments*, *23*(4), 379-388. https://doi.org/10.1016/S0140-1963(18)30611-6

Bonfante, P., & Anca, I.-A. (2009). Plants, Mycorrhizal Fungi, and Bacteria : A Network of Interactions. *Annual Review of Microbiology*, *63*(1), 363-383. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073504

Bonfante, P., & Genre, A. (2010). Mechanisms underlying beneficial plant–fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature Communications*, *1*(1), Article 1. https://doi.org/10.1038/ncomms1046

Bonfante, P., Venice, F., & Lanfranco, L. (2019). The mycobiota : Fungi take their place between plants and bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, *49*, 18-25. https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.08.004

Bonifacio, E., & Morte, A. (2014). Soil Properties. In V. Kagan-Zur, N. Roth-Bejerano, Y. Sitrit, & A. Morte (Éds.), *Desert Truffles : Phylogeny, Physiology, Distribution and Domestication* (p. 57-67). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-40096-4_4

Bonito, G., Hameed, K., Ventura, R., Krishnan, J., Schadt, C. W., & Vilgalys, R. (2016). Isolating a functionally relevant guild of fungi from the root microbiome of *Populus*. *Fungal Ecology*, *22*, 35-42. https://doi.org/10.1016/j.funeco.2016.04.007

Bonito, G. M., Gryganskyi, A. P., Trappe, J. M., & Vilgalys, R. (2010). A global meta-analysis of *Tuber* ITS rDNA sequences : Species diversity, host associations and long-distance dispersal. *Molecular Ecology*, *19*(22), 4994-5008. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04855.x

Bonito, G. M., & Smith, M. E. (2016). General Systematic Position of the Truffles : Evolutionary Theories. In A. Zambonelli, M. Iotti, & C. Murat (Éds.), *True Truffle (*Tuber *spp.) in the World : Soil Ecology, Systematics and Biochemistry* (p. 3-18). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-31436-5_1

Bonito, G., Reynolds, H., Robeson II, M. S., Nelson, J., Hodkinson, B. P., Tuskan, G., Schadt, C. W., & Vilgalys, R. (2014). Plant host and soil origin influence fungal and bacterial assemblages in the roots of woody plants. *Molecular Ecology*, *23*(13), 3356-3370. https://doi.org/10.1111/mec.12821

Bonito, G., Smith, M. E., Nowak, M., Healy, R. A., Guevara, G., Cázares, E., Kinoshita, A., Nouhra, E. R., Domínguez, L. S., Tedersoo, L., Murat, C., Wang, Y., Moreno, B. A., Pfister, D. H., Nara, K., Zambonelli, A., Trappe, J. M., & Vilgalys, R. (2013). Historical Biogeography and Diversification of Truffles in the Tuberaceae and Their Newly Identified Southern Hemisphere Sister Lineage. *PLoS ONE*, *8*(1), e52765. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052765

Bonkowski, M. (2004). Protozoa and plant growth : The microbial loop in soil revisited. *New Phytologist*, *162*(3), 617-631. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01066.x

Borgmann-Winter, B. W., Stephens, R. B., Anthony, M. A., Frey, S. D., D'Amato, A. W., & Rowe, R. J. (s. d.). Wind and small mammals are complementary fungal dispersers. *Ecology*, *n/a*(n/a), e4039. https://doi.org/10.1002/ecy.4039

Bourceret, A., Guan, R., Dorau, K., Mansfeldt, T., Omidbakhshfard, A., Medeiros, D. B., Fernie, A. R., Hofmann, J., Sonnewald, U., Mayer, J., Gerlach, N., Bucher, M., Garrido-Oter, R., Spaepen, S., & Schulze-Lefert, P. (2022). Maize Field Study Reveals Covaried Microbiota and Metabolic Changes in Roots over Plant Growth. *mBio*, *13*(2), e02584-21. https://doi.org/10.1128/mbio.02584-21

Bradai, L., Bissati, S., & Chenchouni, H. (2014). Desert truffles of the North Algerian Sahara :

Brigham, L. M., Bueno de Mesquita, C. P., Spasojevic, M. J., Farrer, E. C., Porazinska, D. L., Smith, J. G., Schmidt, S. K., & Suding, K. N. (2023). Drivers of bacterial and fungal root endophyte communities : Understanding the relative influence of host plant, environment, and space. *FEMS Microbiology Ecology*, *99*(5), fiad034. https://doi.org/10.1093/femsec/fiad034

Bright, M., & Bulgheresi, S. (2010). A complex journey : Transmission of microbial symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, *8*(3), Article 3. https://doi.org/10.1038/nrmicro2262

Briscoe, L., Halperin, E., & Garud, N. R. (2023). *SNV-FEAST : Microbial source tracking with single nucleotide variants.* (p. 2022.05.28.-493810). bioRxiv. https://doi.org/10.1101/2022.05.28.493810

Brundrett, M. (2004). Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biological Reviews*, *79*(3), 473-495. https://doi.org/10.1017/S1464793103006316

Brundrett, M. C. (2006). Understanding the Roles of Multifunctional Mycorrhizal and Endophytic Fungi. In B. J. E. Schulz, C. J. C. Boyle, & T. N. Sieber (Éds.), *Microbial Root Endophytes* (p. 281-298). Springer. https://doi.org/10.1007/3-540-33526-9_16

Brundrett, M. C. (2017). Global Diversity and Importance of Mycorrhizal and Nonmycorrhizal Plants. In L. Tedersoo (Éd.), *Biogeography of Mycorrhizal Symbiosis* (p. 533-556). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-56363-3_21

Brundrett, M. C., & Tedersoo, L. (2018). Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytologist*, *220*(4), 1108-1115. https://doi.org/10.1111/nph.14976

Buée, M., Reich, M., Murat, C., Morin, E., Nilsson, R. H., Uroz, S., & Martin, F. (2009). 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. *New Phytologist*, *184*(2), 449-456. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03003.x

Diversity and bioecology. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, *26*(5), 425. https://doi.org/10.9755/ejfa.v26i5.16520

Branco, S., Schauster, A., Liao, H.-L., & Ruytinx, J. (2022). Mechanisms of stress tolerance and their effects on the ecology and evolution of mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, *235*(6), 2158-2175. https://doi.org/10.1111/nph.18308

Bulgarelli, D., Rott, M., Schlaeppi, K., Ver Loren van Themaat, E., Ahmadinejad, N., Assenza, F., Rauf, P., Huettel, B., Reinhardt, R., Schmelzer, E., Peplies, J., Gloeckner, F. O., Amann, R., Eickhorst, T., & Schulze-Lefert, P. (2012). Revealing structure and assembly cues for *Arabidopsis* root-inhabiting bacterial microbiota. *Nature*, *488*(7409), Article 7409. https://doi.org/10.1038/nature11336

Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., van Themaat, E. V. L., & Schulze-Lefert, P. (2013). Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants. *Annual Review of Plant Biology*, *64*(1), 807-838. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120106

Büntgen, U., Egli, S., Camarero, J. J., Fischer, E. M., Stobbe, U., Kauserud, H., Tegel, W., Sproll, L., & Stenseth, N. C. (2012). Drought-induced decline in Mediterranean truffle harvest. *Nature Climate Change*, *2*(12), 827-829. https://doi.org/10.1038/nclimate1733

Busby, P. E., Ridout, M., & Newcombe, G. (2016). Fungal endophytes : Modifiers of plant disease. *Plant Molecular Biology*, *90*(6), 645-655. https://doi.org/10.1007/s11103-015-0412-0

Buyck, B., Zoller, S., & Hofstetter, V. (2018). Walking the thin line… ten years later : The dilemma of above- versus below-ground features to support phylogenies in the Russulaceae (Basidiomycota). *Fungal Diversity*, *89*(1), 267-292. https://doi.org/10.1007/s13225-018-0397-5

Byrd, A. L., & Segre, J. A. (2016). Adapting Koch's postulates. *Science*, *351*(6270), 224-226. https://doi.org/10.1126/science.aad6753

Cai, L., Kreft, H., Taylor, A., Denelle, P., Schrader, J., Essl, F., van Kleunen, M., Pergl, J., Pyšek, P., Stein, A., Winter, M., Barcelona, J. F., Fuentes, N., Inderjit, Karger, D. N., Kartesz, J., Kuprijanov, A., Nishino, M., Nickrent, D., … Weigelt, P. (2023). Global models and predictions of plant diversity based on advanced machine learning techniques. *New Phytologist*, *237*(4), 1432-1445. https://doi.org/10.1111/nph.18533

Cairney, J. W. G. (2011). Ectomycorrhizal fungi : The symbiotic route to the root for phosphorus in forest soils. *Plant and Soil*, *344*(1), 51-71. https://doi.org/10.1007/s11104-011-0731-0

Callahan, B. J., McMurdie, P. J., & Holmes, S. P. (2017). Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *The ISME Journal*, *11*(12), Article 12. https://doi.org/10.1038/ismej.2017.119

Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2 : High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, *13*(7), Article 7. https://doi.org/10.1038/nmeth.3869

Carini, P., Marsden, P. J., Leff, J. W., Morgan, E. E., Strickland, M. S., & Fierer, N. (2016). Relic DNA is abundant in soil and obscures estimates of soil microbial diversity. *Nature Microbiology*, *2*(3), Article 3. https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.242

Cavazos, B. R., Bohner, T. F., Donald, M. L., Sneck, M. E., Shadow, A., Omacini, M., Rudgers, J. A., & Miller, T. E. X. (2018). Testing the roles of vertical transmission and drought stress in the prevalence of heritable fungal endophytes in annual grass populations. *New Phytologist*, *219*(3), 1075-1084. https://doi.org/10.1111/nph.15215

Ceballos, G., Ehrlich, P. R., & Dirzo, R. (2017). Biological annihilation via the ongoing sixth mass extinction signaled by vertebrate population losses and declines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(30), E6089-E6096. https://doi.org/10.1073/pnas.1704949114

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*(2), 307-312. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.04044.x

Chang, Y., Desirò, A., Na, H., Sandor, L., Lipzen, A., Clum, A., Barry, K., Grigoriev, I. V., Martin, F. M., Stajich, J. E., Smith, M. E., Bonito, G., & Spatafora, J. W. (2019). Phylogenomics of Endogonaceae and evolution of mycorrhizas within Mucoromycota. *New Phytologist*, *222*(1), 511-525. https://doi.org/10.1111/nph.15613

Chen, J., De la Varga, H., Todesco, F., Beacco, P., Martino, E., Le Tacon, F., & Murat, C. (2021). Frequency of the two mating types in the soil under productive and non-productive trees in five French orchards of the Périgord black truffle (*Tuber melanosporum* Vittad.). *Mycorrhiza*, *31*(3), 361-369. https://doi.org/10.1007/s00572-020-01011-4

Chen, L., Brookes, P. C., Xu, J., Zhang, J., Zhang, C., Zhou, X., & Luo, Y. (2016). Structural and functional differentiation of the root-associated bacterial microbiomes of perennial ryegrass. *Soil Biology and Biochemistry*, *98*, 1-10. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.04.004

Chethana, K. W. T., Manawasinghe, I. S., Hurdeal, V. G., Bhunjun, C. S., Appadoo, M. A., Gentekaki, E., Raspé, O., Promputtha, I., & Hyde, K. D. (2021). What are fungal species and how to delineate them? *Fungal Diversity*, *109*(1), 1-25. https://doi.org/10.1007/s13225-021-00483-9

Chevalier, G., & Grente, J. (1979). Application pratique de la symbiose ectomycorhizienne : Production à grande échelle de plants mycorhizés par la truffe (*Tuber melanosporum* Vitt.). *Mushroom Science*.

Chevalier, G., & Pargney, J.-C. (2014). Empirical or rational truffle cultivation? It is time to choose. *Forest Systems*, *23*(2), 378. https://doi.org/10.5424/fs/2014232-04964

Coleman-Derr, D., Desgarennes, D., Fonseca-Garcia, C., Gross, S., Clingenpeel, S., Woyke, T., North, G., Visel, A., Partida-Martinez, L. P., & Tringe, S. G. (2016). Plant compartment and biogeography affect microbiome composition in cultivated and native Agave species. *New Phytologist*, *209*(2), 798-811. https://doi.org/10.1111/nph.13697

Cosme, M., Fernández, I., Heijden, M. G. A. V. der, & Pieterse, C. M. J. (2018). Non-Mycorrhizal Plants : The Exceptions that Prove the Rule. *Trends in Plant Science*, *23*(7), 577-587. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.04.004

Costello, E. K., Stagaman, K., Dethlefsen, L., Bohannan, B. J. M., & Relman, D. A. (2012). The Application of Ecological Theory Toward an Understanding of the Human Microbiome. *Science*, *336*(6086), 1255-1262. https://doi.org/10.1126/science.1224203

Daguerre, Y., Basso, V., Hartmann-Wittulski, S., Schellenberger, R., Meyer, L., Bailly, J., Kohler, A., Plett, J. M., Martin, F., & Veneault-Fourrey, C. (2020). The mutualism effector MiSSP7 of *Laccaria bicolor* alters the interactions between the poplar JAZ6 protein and its associated proteins. *Scientific Reports*, *10*(1), Article 1. https://doi.org/10.1038/s41598-020-76832-6

Dastogeer, K. M. G., Zahan, M. I., Tahjib-Ul-Arif, Md., Akter, M. A., & Okazaki, S. (2020). Plant Salinity Tolerance Conferred by Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Associated Mechanisms : A Meta-Analysis. *Frontiers in Plant Science*, *11*. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2020.588550

Davison, J., Moora, M., Öpik, M., Adholeya, A., Ainsaar, L., Bâ, A., Burla, S., Diedhiou, A. G., Hiiesalu, I., Jairus, T., Johnson, N. C., Kane, A., Koorem, K., Kochar, M., Ndiaye, C., Pärtel, M., Reier, Ü., Saks, Ü., Singh, R., … Zobel, M. (2015). Global assessment of arbuscular mycorrhizal fungus diversity reveals very low endemism. *Science*, *349*(6251), 970-973. https://doi.org/10.1126/science.aab1161

De la Varga, H., Le Tacon, F., Lagoguet, M., Todesco, F., Varga, T., Miquel, I., Barry-Etienne, D., Robin, C., Halkett, F., Martin, F., & Murat, C. (2017). Five years investigation of female and male genotypes in périgord black truffle (*Tuber melanosporum* Vittad.) revealed contrasted reproduction strategies : Black truffle genetic structure. *Environmental Microbiology*, *19*(7), 2604-2615. https://doi.org/10.1111/1462-2920.13735

De Queiroz, K. (2007). Species Concepts and Species Delimitation. *Systematic Biology*, *56*(6), 879-886. https://doi.org/10.1080/10635150701701083

De Wit, R., & Bouvier, T. (2006). Everything is everywhere, but, the environment selects'; what did Baas Becking and Beijerinck really say? *Environmental microbiology*, *8*(4), 755-758.

Dean, R., Van Kan, J. a. L., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., & Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, *13*(4), 414-430. https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x

Debray, R., Herbert, R. A., Jaffe, A. L., Crits-Christoph, A., Power, M. E., & Koskella, B. (2022). Priority effects in microbiome assembly. *Nature Reviews Microbiology*, *20*(2), Article 2. https://doi.org/10.1038/s41579-021-00604-w

de Graaff, M.-A., Throop, H. L., Verburg, P. S. J., Arnone, J. A., & Campos, X. (2014). A Synthesis of Climate and Vegetation Cover Effects on Biogeochemical Cycling in Shrub-Dominated Drylands. *Ecosystems*, *17*(5), 931-945. https://doi.org/10.1007/s10021-014-9764-6

Deveau, A., Bonito, G., Uehling, J., Paoletti, M., Becker, M., Bindschedler, S., Hacquard, S., Hervé, V., Labbé, J., Lastovetsky, O. A., Mieszkin, S., Millet, L. J., Vajna, B., Junier, P., Bonfante, P., Krom, B. P., Olsson, S., van Elsas, J. D., & Wick, L. Y. (2018). Bacterial–fungal interactions : Ecology, mechanisms and challenges. *FEMS Microbiology Reviews*, *42*(3), 335-352. https://doi.org/10.1093/femsre/fuy008

Diédhiou, A. G., Selosse, M.-A., Galiana, A., Diabaté, M., Dreyfus, B., Bâ, 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*(8), 2219-2232. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02183.x

Dietrich, M., Montesinos-Navarro, A., Gabriel, R., Strasser, F., Meier, D. V., Mayerhofer, W., Gorka, S., Wiesenbauer, J., Martin, V., Weidinger, M., Richter, A., Kaiser, C., & Woebken, D. (2022). Both abundant and rare fungi colonizing *Fagus sylvatica* ectomycorrhizal root-tips shape associated bacterial communities. *Communications Biology*, *5*(1), Article 1. https://doi.org/10.1038/s42003-022-04178-y

Díez, J., Manjón, J. L., & Martin, F. (2002). Molecular phylogeny of the mycorrhizal desert truffles (*Terfezia* and *Tirmania*), host specificity and edaphic tolerance. *Mycologia*, *94*(2), 247-259. https://doi.org/10.1080/15572536.2003.11833230

Dini-Andreote, F., & Raaijmakers, J. M. (2018). Embracing Community Ecology in Plant Microbiome Research. *Trends in Plant Science*, *23*(6), 467-469. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.03.013

Ditengou, F. A., Müller, A., Rosenkranz, M., Felten, J., Lasok, H., van Doorn, M. M., Legué, V., Palme, K., Schnitzler, J.-P., & Polle, A. (2015). Volatile signalling by sesquiterpenes from ectomycorrhizal fungi reprogrammes root architecture. *Nature Communications*, *6*(1), Article 1. https://doi.org/10.1038/ncomms7279

Donald, J., Roy, M., Suescun, U., Iribar, A., Manzi, S., Péllissier, L., Gaucher, P., & Chave, J. (2020). A test of community assembly rules using foliar endophytes from a tropical forest canopy. *Journal of Ecology*, *108*(4), 1605-1616. https://doi.org/10.1111/1365-2745.13344

Donovan, P. D., Gonzalez, G., Higgins, D. G., Butler, G., & Ito, K. (2018). Identification of fungi in shotgun metagenomics datasets. *PLOS ONE*, *13*(2), e0192898. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192898

Dormann, C. F., Fründ, J., Blüthgen, N., & Gruber, B. (2009). *Indices, Graphs and Null Models : Analyzing Bipartite Ecological Networks*. https://publications.goettingen-research-online.de/handle/2/61194

Dormann, C. F., Fründ, J., & Schaefer, H. M. (2017). Identifying Causes of Patterns in Ecological Networks : Opportunities and Limitations. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, *48*(1), 559-584. https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-110316-022928

Dormann, C. F., & Strauss, R. (2014). A method for detecting modules in quantitative bipartite networks. *Methods in Ecology and Evolution*, *5*(1), 90-98. https://doi.org/10.1111/2041-210X.12139

Douet, J. P., Castroviejo, M., Mabru, D., Chevalier, G., Dupré, C., Bergougnoux, F., Ricard, J. M., & Médina, B. (2004). Rapid molecular typing of *Tuber melanosporum*, *T. brumale* and *T. indicum* from tree seedlings and canned truffles. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *379*(4), 668-673. https://doi.org/10.1007/s00216-004-2643-9

Douglas, A. E., & Werren, J. H. (2016). Holes in the Hologenome : Why Host-Microbe Symbioses Are Not Holobionts. *mBio*, *7*(2), e02099-15. https://doi.org/10.1128/mBio.02099-15

Duddridge, J. A., Malibari, A., & Read, D. J. (1980). Structure and function of mycorrhizal rhizomorphs with special reference to their role in water transport. *Nature*, *287*(5785), Article 5785. https://doi.org/10.1038/287834a0

Durant, S. M., Pettorelli, N., Bashir, S., Woodroffe, R., Wacher, T., Ornellas, P. D., Ransom, C., Abáigar, T., Abdelgadir, M., Alqamy, H. E., Beddiaf, M., Belbachir, F., Belbachir-Bazi, A., Berbash, A. A., Beudels-Jamar, R., Boitani, L., Breitenmoser, C., Cano, M., Chardonnet, P., … Baillie, J. E. M. (2012). Forgotten Biodiversity in Desert Ecosystems. *Science*, *336*(6087), 1379-1380. https://doi.org/10.1126/science.336.6087.1379

Edwards, J., Johnson, C., Santos-Medellín, C., Lurie, E., Podishetty, N. K., Bhatnagar, S., Eisen, J. A., & Sundaresan, V. (2015). Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(8), E911-E920. https://doi.org/10.1073/pnas.1414592112

Ellegren, H. (2004). Microsatellites : Simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics*, *5*(6), 435-445. https://doi.org/10.1038/nrg1348

Epstein, S. (2013). The phenomenon of microbial uncultivability. *Current Opinion in Microbiology*, *16*(5), 636-642. https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.08.003

Falkowski, P. (2012). Ocean Science : The power of plankton. *Nature*, *483*(7387), Article 7387. https://doi.org/10.1038/483S17a

Fausto, C., Mininni, A. N., Sofo, A., Crecchio, C., Scagliola, M., Dichio, B., & Xiloyannis, C. (2018). Olive orchard microbiome : Characterisation of bacterial communities in soil-plant compartments and their comparison between sustainable and conventional soil management systems. *Plant Ecology & Diversity*, *11*(5-6), 597-610. https://doi.org/10.1080/17550874.2019.1596172

Felten, J., Kohler, A., Morin, E., Bhalerao, R. P., Palme, K., Martin, F., Ditengou, F. A., & Legué, V. (2009). The Ectomycorrhizal Fungus *Laccaria bicolor* Stimulates Lateral Root Formation in Poplar and *Arabidopsis* through Auxin Transport and Signaling. *Plant Physiology*, *151*(4), 1991-2005. https://doi.org/10.1104/pp.109.147231

Fernandes, A. D., Macklaim, J. M., Linn, T. G., Reid, G., & Gloor, G. B. (2013). ANOVA-Like Differential Expression (ALDEx) Analysis for Mixed Population RNA-Seq. *PLOS ONE*, *8*(7), e67019. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067019

Ferreira, I., Corrêa, A., & Cruz, C. (2023). Sustainable production of ectomycorrhizal fungi in the Mediterranean region to support the European Green Deal. *PLANTS, PEOPLE, PLANET*, *5*(1), 14-26. https://doi.org/10.1002/ppp3.10265

Field, C. B., Behrenfeld, M. J., Randerson, J. T., & Falkowski, P. (1998). Primary Production of the Biosphere : Integrating Terrestrial and Oceanic Components. *Science*, *281*(5374), 237-240. https://doi.org/10.1126/science.281.5374.237

Fitzpatrick, C. R., Copeland, J., Wang, P. W., Guttman, D. S., Kotanen, P. M., & Johnson, M. T. J. (2018). Assembly and ecological function of the root microbiome across angiosperm plant species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(6), E1157-E1165. https://doi.org/10.1073/pnas.1717617115

Fitzpatrick, C. R., Salas-González, I., Conway, J. M., Finkel, O. M., Gilbert, S., Russ, D., Teixeira, P. J. P. L., & Dangl, J. L. (2020). The Plant Microbiome : From Ecology to Reductionism and Beyond. *Annual Review of Microbiology*, *74*(1), 81-100. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-022620-014327

Fleischmann, R. D., Adams, M. D., White, O., Clayton, R. A., Kirkness, E. F., Kerlavage, A. R., Bult, C. J., Tomb, J.-F., Dougherty, B. A., Merrick, J. M., McKenney, K., Sutton, G., FitzHugh, W., Fields, C., Gocayne, J. D., Scott, J., Shirley, R., Liu, L., Glodek, A., … Venter, J. C. (1995). Whole-Genome Random Sequencing and Assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*, *269*(5223), 496-512. https://doi.org/10.1126/science.7542800

Fontaine, C., Guimarães, P. R., Kéfi, S., Loeuille, N., Memmott, J., Putten, W. H. van der, Veen, F. J. F. van, & Thébault, E. (2011). The ecological and evolutionary implications of merging different types of networks. *Ecology Letters*, *14*(11), 1170-1181. https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2011.01688.x

Fortas, Z., & Chevalier, G. (1992). Effet des conditions de culture sur la mycorhization de l'Helianthemum guttatum par trois espèces de terfez des genres *Terfezia* et *Tirmania* d'Algérie. *Canadian Journal of Botany*, *70*(12), 2453-2460. https://doi.org/10.1139/b92-303

Fortuna, M. A., Stouffer, D. B., Olesen, J. M., Jordano, P., Mouillot, D., Krasnov, B. R., Poulin, R., & Bascompte, J. (2010). Nestedness versus modularity in ecological networks : Two sides of the same coin? *Journal of Animal Ecology*, *79*(4), 811-817. https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2010.01688.x

Fournier, J., Teillet, A., Chabaud, M., Ivanov, S., Genre, A., Limpens, E., de Carvalho-Niebel, F., & Barker, D. G. (2015). Remodeling of the Infection Chamber before Infection Thread Formation Reveals a Two-Step Mechanism for Rhizobial Entry into the Host Legume Root Hair. *Plant Physiology*, *167*(4), 1233-1242. https://doi.org/10.1104/pp.114.253302

Frank, B. (2005). On the nutritional dependence of certain trees on root symbiosis with below-ground fungi (an English translation of A.B. Frank's classic paper of 1885). *Mycorrhiza*. https://doi.org/10.1007/s00572-004-0329-y

Fraser, C., Alm, E. J., Polz, M. F., Spratt, B. G., & Hanage, W. P. (2009). The Bacterial Species Challenge : Making Sense of Genetic and Ecological Diversity. *Science*, *323*(5915), 741-746. https://doi.org/10.1126/science.1159388

Frey-Klett, P., Garbaye, J., & Tarkka, M. (2007). The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytologist*, *176*(1), 22-36. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02191.x

Gaiero, J. R., McCall, C. A., Thompson, K. A., Day, N. J., Best, A. S., & Dunfield, K. E. (2013). Inside the root microbiome : Bacterial root endophytes and plant growth promotion. *American Journal of Botany*, *100*(9), 1738-1750. https://doi.org/10.3732/ajb.1200572

Gao, C., Montoya, L., Xu, L., Madera, M., Hollingsworth, J., Purdom, E., Hutmacher, R. B., Dahlberg, J. A., Coleman-Derr, D., Lemaux, P. G., & Taylor, J. W. (2019). Strong succession in arbuscular mycorrhizal fungal communities. *The ISME Journal*, *13*(1), Article 1. https://doi.org/10.1038/s41396-018-0264-0

Gao, C., Montoya, L., Xu, L., Madera, M., Hollingsworth, J., Purdom, E., Singan, V., Vogel, J., Hutmacher, R. B., Dahlberg, J. A., Coleman-Derr, D., Lemaux, P. G., & Taylor, J. W. (2020). Fungal community assembly in drought-stressed sorghum shows stochasticity, selection, and universal ecological dynamics. *Nature Communications*, *11*(1), Article 1. https://doi.org/10.1038/s41467-019-13913-9

Garcia, D. E., Lopez, B. R., de-Bashan, L. E., Hirsch, A. M., Maymon, M., & Bashan, Y. (2018). Functional metabolic diversity of the bacterial community in undisturbed resource island soils in the southern Sonoran Desert. *Land Degradation & Development*, *29*(5), 1467-1477. https://doi.org/10.1002/ldr.2905

Garcia, K., Delaux, P.-M., Cope, K. R., & Ané, J.-M. (2015). Molecular signals required for the establishment and maintenance of ectomycorrhizal symbioses. *New Phytologist*, *208*(1), 79-87. https://doi.org/10.1111/nph.13423

Garcia-Barreda, S., Marco, P., Bonito, G., Parladé, J., Sánchez, S., González, V., Larena, I., & Benucci, G. M. N. (2023). Interannual dynamics of Tuber melanosporum and fungal communities in productive black truffle orchards amended with truffle nests. *FEMS Microbiology Ecology*, *99*(8), fiad084. https://doi.org/10.1093/femsec/fiad084

García-Cunchillos, I., Sánchez, S., Barriuso, J. J., & Pérez-Collazos, E. (2014). Population genetics of the westernmost distribution of the glaciations-surviving black truffle *Tuber melanosporum*. *Mycorrhiza*, *24*(S1), 89-100. https://doi.org/10.1007/s00572-013-0540-9

Gloor, G. B., Macklaim, J. M., Pawlowsky-Glahn, V., & Egozcue, J. J. (2017). Microbiome Datasets Are Compositional : And This Is Not Optional. *Frontiers in Microbiology*, *8*. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.02224

Glynou, K., Ali, T., Buch, A.-K., Haghi Kia, S., Ploch, S., Xia, X., Çelik, A., Thines, M., & Maciá-Vicente, J. G. (2016). The local environment determines the assembly of root endophytic fungi at a continental scale. *Environmental Microbiology*, *18*(8), 2418-2434. https://doi.org/10.1111/1462-2920.13112

Glynou, K., Nam, B., Thines, M., & Maciá-Vicente, J. G. (2018). Facultative root-colonizing fungi dominate endophytic assemblages in roots of nonmycorrhizal Microthlaspi species. *New Phytologist*, *217*(3), 1190-1202. https://doi.org/10.1111/nph.14873

Gómez-Molina, E., Sánchez, S., Parladé, J., Cirujeda, A., Puig-Pey, M., Marco, P., & Garcia-Barreda, S. (2020). Glyphosate treatments for weed control affect early stages of root colonization by *Tuber melanosporum* but not secondary colonization. *Mycorrhiza*, *30*(6), 725-733. https://doi.org/10.1007/s00572-020-00990-8

Gonthier, P., Giordano, L., Zampieri, E., Lione, G., Vizzini, A., Colpaert, J. V., & Balestrini, R. (2019). An ectomycorrhizal symbiosis differently affects host susceptibility to two congeneric fungal pathogens. *Fungal Ecology*, *39*, 250-256. https://doi.org/10.1016/j.funeco.2018.12.008

Gonzalez, E., Pitre, F. E., Pagé, A. P., Marleau, J., Guidi Nissim, W., St-Arnaud, M., Labrecque, M., Joly, S., Yergeau, E., & Brereton, N. J. B. (2018). Trees, fungi and bacteria : Tripartite metatranscriptomics of a root microbiome responding to soil contamination. *Microbiome*, *6*(1), 53. https://doi.org/10.1186/s40168-018-0432-5

Gonzalez Mateu, M., Baldwin, A. H., Maul, J. E., & Yarwood, S. A. (2020). Dark septate endophyte improves salt tolerance of native and invasive lineages of *Phragmites australis*. *The ISME Journal*, *14*(8), Article 8. https://doi.org/10.1038/s41396-020-0654-y

González-Teuber, M. (2016). The defensive role of foliar endophytic fungi for a South American tree. *AoB PLANTS*, *8*, plw050. https://doi.org/10.1093/aobpla/plw050

Gottel, N. R., Castro, H. F., Kerley, M., Yang, Z., Pelletier, D. A., Podar, M., Karpinets, T., Uberbacher, E., Tuskan, G. A., Vilgalys, R., Doktycz, M. J., & Schadt, C. W. (2011). Distinct Microbial Communities within the Endosphere and Rhizosphere of *Populus deltoides* Roots across Contrasting Soil Types. *Applied and Environmental Microbiology*, *77*(17), 5934-5944. https://doi.org/10.1128/AEM.05255-11

Granja, C. (2023, octobre 10). *«Le microbiote permet de comprendre la maladie autrement»*. Libération. https://www.liberation.fr/forums/le-microbiote-permet-de-comprendre-la-maladie-autrement-20231010_Z2GU4RTCLVB27PXJCHWVEUOOKY/

Grelet, G.-A., Ba, R., Goeke, D. F., Houliston, G. J., Taylor, A. F. S., & Durall, D. M. (2017). A plant growth-promoting symbiosis between *Mycena galopus* and *Vaccinium corymbosum* seedlings. *Mycorrhiza*, *27*(8), 831-839. https://doi.org/10.1007/s00572-017-0797-5

Grigoriev, I. V., Nikitin, R., Haridas, S., Kuo, A., Ohm, R., Otillar, R., Riley, R., Salamov, A., Zhao, X., Korzeniewski, F., Smirnova, T., Nordberg, H., Dubchak, I., & Shabalov, I. (2014). MycoCosm portal : Gearing up for 1000 fungal genomes. *Nucleic Acids Research*, *42*(D1), D699-D704. https://doi.org/10.1093/nar/gkt1183

Grilli, J., Rogers, T., & Allesina, S. (2016). Modularity and stability in ecological communities. *Nature Communications*, *7*(1), Article 1. https://doi.org/10.1038/ncomms12031

Gryndler, M., Černá, L., Bukovská, P., Hršelová, H., & Jansa, J. (2014). *Tuber aestivum* association with non-host roots. *Mycorrhiza*, *24*(8), 603-610. https://doi.org/10.1007/s00572-014-0580-9

Gupta, S., Schillaci, M., Walker, R., Smith, P. M. C., Watt, M., & Roessner, U. (2021). Alleviation of salinity stress in plants by endophytic plant-fungal symbiosis : Current knowledge, perspectives and future directions. *Plant and Soil*, *461*(1), 219-244. https://doi.org/10.1007/s11104-020-04618-w

Hackel, J., Henkel, T. W., Moreau, P.-A., De Crop, E., Verbeken, A., Sà, M., Buyck, B., Neves, M.-A., Vasco-Palacios, A., Wartchow, F., Schimann, H., Carriconde, F., Garnica, S., Courtecuisse, R., Gardes, M., Manzi, S., Louisanna, E., & Roy, M. (2022). Biogeographic history of a large clade of ectomycorrhizal fungi, the Russulaceae, in the Neotropics and adjacent regions. *New Phytologist*, *236*(2), 698-713. https://doi.org/10.1111/nph.18365

Hacquard, S. (2016). Disentangling the factors shaping microbiota composition across the plant holobiont. *New Phytologist*, *209*(2), 454-457. https://doi.org/10.1111/nph.13760

Hacquard, S., Garrido-Oter, R., González, A., Spaepen, S., Ackermann, G., Lebeis, S., McHardy, A. C., Dangl, J. L., Knight, R., Ley, R., & Schulze-Lefert, P. (2015). Microbiota and Host Nutrition across Plant and Animal Kingdoms. *Cell Host & Microbe*, *17*(5), 603-616. https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.04.009

Haichar, F. el Z., Marol, C., Berge, O., Rangel-Castro, J. I., Prosser, J. I., Balesdent, J., Heulin, T., & Achouak, W. (2008). Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *The ISME Journal*, *2*(12), Article 12. https://doi.org/10.1038/ismej.2008.80

Halbwachs, H., Easton, G. L., Bol, R., Hobbie, E. A., Garnett, M. H., Peršoh, D., Dixon, L., Ostle, N., Karasch, P., & Griffith, G. W. (2018). Isotopic evidence of biotrophy and unusual nitrogen nutrition in soil-dwelling Hygrophoraceae. *Environmental Microbiology*, *20*(10), 3573-3588. https://doi.org/10.1111/1462-2920.14327

Hall, I., Fitzpatrick, N., Miros, P., & Zambonelli, A. (2017). Counter-season cultivation of truffles in the Southern Hemisphere : An update. *Italian Journal of Mycology*, 21-36 Pages. https://doi.org/10.6092/ISSN.2531-7342/6794

Han, L.-L., Wang, J.-T., Yang, S.-H., Chen, W.-F., Zhang, L.-M., & He, J.-Z. (2017). Temporal dynamics of fungal communities in soybean rhizosphere. *Journal of Soils and Sediments*, *17*(2), 491-498. https://doi.org/10.1007/s11368-016-1534-y

Hansen, K., Perry, B. A., Dranginis, A. W., & Pfister, D. H. (2013). A phylogeny of the highly diverse cup-fungus family Pyronemataceae (Pezizomycetes, Ascomycota) clarifies relationships and evolution of selected life history traits. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *67*(2), 311-335. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.01.014

Hardoim, P. R., Hardoim, C. C. P., Overbeek, L. S. van, & Elsas, J. D. van. (2012). Dynamics of Seed-Borne Rice Endophytes on Early Plant Growth Stages. *PLOS ONE*, *7*(2), e30438. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030438

Harrison, J. G., & Griffin, E. A. (2020). The diversity and distribution of endophytes across biomes, plant phylogeny and host tissues : How far have we come and where do we go from here? *Environmental Microbiology*, *22*(6), 2107-2123. https://doi.org/10.1111/1462-2920.14968

Hashem, A., Alqarawi, A. A., Shah, M. A., Wirth, S., Egamberdieva, D., Tabassum, B., & Abd_Allah, E. F. (2018). Desert Truffles in Saudi Arabia : Diversity, Ecology, and Conservation. In S. K. Sharma & A. Varma (Éds.), *Microbial Resource Conservation* (Vol. 54, p. 353-369). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-96971-8_13

Hawkins, H.-J., Cargill, R. I. M., Van Nuland, M. E., Hagen, S. C., Field, K. J., Sheldrake, M., Soudzilovskaia, N. A., & Kiers, E. T. (2023). Mycorrhizal mycelium as a global carbon pool. *Current Biology*, *33*(11), R560-R573. https://doi.org/10.1016/j.cub.2023.02.027

Hawksworth, D. L., & Lücking, R. (2017). Fungal Diversity Revisited : 2.2 to 3.8 Million Species. *Microbiology Spectrum*, *5*(4), 10.1128/microbiolspec.funk-0052-2016. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0052-2016

Helyar, S. J., Hemmer-Hansen, J., Bekkevold, D., Taylor, M. I., Ogden, R., Limborg, M. T., Cariani, A., Maes, G. E., Diopere, E., Carvalho, G. R., & Nielsen, E. E. (2011). Application of SNPs for population genetics of nonmodel organisms : New opportunities and challenges. *Molecular Ecology Resources*, *11*(s1), 123-136. https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02943.x

Henriksson, N., Marshall, J., Högberg, M. N., Högberg, P., Polle, A., Franklin, O., & Näsholm, T. (2023). Re-examining the evidence for the mother tree hypothesis – resource sharing among trees via ectomycorrhizal networks. *New Phytologist*, *239*(1), 19-28. https://doi.org/10.1111/nph.18935

Herman, R. P., Provencio, K. R., Herrera-Matos, J., & Torrez, R. J. (1995). Resource islands predict the distribution of heterotrophic bacteria in chihuahuan desert soils. *Applied and Environmental Microbiology*, *61*(5), 1816-1821. https://doi.org/10.1128/aem.61.5.1816-1821.1995

Hewitt, R. E., Chapin III, F. S., Hollingsworth, T. N., & Taylor, D. L. (2017). The potential for mycobiont sharing between shrubs and seedlings to facilitate tree establishment after wildfire at Alaska arctic treeline. *Molecular Ecology*, *26*(14), 3826-3838. https://doi.org/10.1111/mec.14143

Hiruma, K., Gerlach, N., Sacristán, S., Nakano, R. T., Hacquard, S., Kracher, B., Neumann, U., Ramírez, D., Bucher, M., O'Connell, R. J., & Schulze-Lefert, P. (2016). Root Endophyte *Colletotrichum tofieldiae* Confers Plant Fitness Benefits that Are Phosphate Status Dependent. *Cell*, *165*(2), 464-474. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.028

Hobbie, E. A., & Hobbie, J. E. (2008). Natural Abundance of 15N in Nitrogen-Limited Forests and Tundra Can Estimate Nitrogen Cycling Through Mycorrhizal Fungi : A Review. *Ecosystems*, *11*(5), 815-830. https://doi.org/10.1007/s10021-008-9159-7

Hobbie, J. E., & Hobbie, E. A. (2006). 15n in Symbiotic Fungi and Plants Estimates Nitrogen and Carbon Flux Rates in Arctic Tundra. *Ecology*, *87*(4), 816-822. https://doi.org/10.1890/0012-9658(2006)87[816:NISFAP]2.0.CO;2

Hodgson, S., de Cates, C., Hodgson, J., Morley, N. J., Sutton, B. C., & Gange, A. C. (2014). Vertical transmission of fungal endophytes is widespread in forbs. *Ecology and Evolution*, *4*(8), 1199-1208. https://doi.org/10.1002/ece3.953

Hoeksema, J. D., Chaudhary, V. B., Gehring, C. A., Johnson, N. C., Karst, J., Koide, R. T., Pringle, A., Zabinski, C., Bever, J. D., Moore, J. C., Wilson, G. W. T., Klironomos, J. N., & Umbanhowar, J. (2010). A meta-analysis of context-dependency in plant response to inoculation with mycorrhizal fungi. *Ecology Letters*, *13*(3), 394-407. https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2009.01430.x

Horton, T. R. (2017). Spore Dispersal in Ectomycorrhizal Fungi at Fine and Regional Scales. In L. Tedersoo (Éd.), *Biogeography of Mycorrhizal Symbiosis* (Vol. 230, p. 61-78). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-56363-3_3

Hosseyni Moghaddam, M. S., Safaie, N., Soltani, J., & Hagh-Doust, N. (2021). Desert-adapted fungal endophytes induce salinity and drought stress resistance in model crops. *Plant Physiology and Biochemistry*, *160*, 225-238. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.01.022

Hou, S., Wolinska, K. W., & Hacquard, S. (2021). Microbiota-root-shoot-environment axis and stress tolerance in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, *62*, 102028. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2021.102028

Houlden, A., Timms-Wilson, T. M., Day, M. J., & Bailey, M. J. (2008). Influence of plant developmental stage on microbial community structure and activity in the rhizosphere of three field crops. *FEMS Microbiology Ecology*, *65*(2), 193-201. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00535.x

Hoysted, G. A., Field, K. J., Sinanaj, B., Bell, C. A., Bidartondo, M. I., & Pressel, S. (s. d.). Direct nitrogen, phosphorus and carbon exchanges between Mucoromycotina 'fine root endophyte' fungi and a flowering plant in novel monoxenic cultures. *New Phytologist*, *n/a*(n/a). https://doi.org/10.1111/nph.18630

Hoysted, G. A., Kowal, J., Jacob, A., Rimington, W. R., Duckett, J. G., Pressel, S., Orchard, S., Ryan, M. H., Field, K. J., & Bidartondo, M. I. (2018). A mycorrhizal revolution. *Current Opinion in Plant Biology*, *44*, 1-6. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.12.004

Hu, J., Ricono, C., Fournier, P., Mondy, S., Vandenkoornhuyse, P., & Mony, C. (2023). Neighbourhood effect of weeds on wheat root endospheric mycobiota. *Journal of Ecology*, *n/a*(n/a). https://doi.org/10.1111/1365-2745.14073

Hu, J., Vandenkoornhuyse, P., Khalfallah, F., Causse-Védrines, R., & Mony, C. (2022). Ecological corridors homogenize plant root endospheric mycobiota. *New Phytologist*, *n/a*(n/a). https://doi.org/10.1111/nph.18606

Huang, X.-F., Chaparro, J. M., Reardon, K. F., Zhang, R., Shen, Q., & Vivanco, J. M. (2014). Rhizosphere interactions : Root exudates, microbes, and microbial communities. *Botany*, *92*(4), 267-275. https://doi.org/10.1139/cjb-2013-0225

Hughes, K. W., Case, A., Matheny, P. B., Kivlin, S., Petersen, R. H., Miller, A. N., & Iturriaga, T. (2020). Secret lifestyles of pyrophilous fungi in the genus *Sphaerosporella*. *American Journal of Botany*, *107*(6), 876-885. https://doi.org/10.1002/ajb2.1482

Inglis, P. W., Pappas, M. de C. R., Resende, L. V., & Grattapaglia, D. (2018). Fast and inexpensive protocols for consistent extraction of high quality DNA and RNA from challenging plant and fungal samples for high-throughput SNP genotyping and sequencing applications. *PLOS ONE*, *13*(10), e0206085. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206085

Intergovernmental Panel on Climate Change (Éd.). (2022). Desertification. In *Climate Change and Land : IPCC Special Report on Climate Change, Desertification, Land Degradation, Sustainable Land Management, Food Security, and Greenhouse Gas Fluxes in Terrestrial Ecosystems* (p. 249-344). Cambridge University Press. https://doi.org/10.1017/9781009157988.005

Iwaoka, C., Imada, S., Taniguchi, T., Du, S., Yamanaka, N., & Tateno, R. (2018). The Impacts of Soil Fertility and Salinity on Soil Nitrogen Dynamics Mediated by the Soil Microbial Community Beneath the Halophytic Shrub *Tamarisk*. *Microbial Ecology*, *75*(4), 985-996. https://doi.org/10.1007/s00248-017-1090-z

Johnson, N. C., Wilson, G. W. T., Wilson, J. A., Miller, R. M., & Bowker, M. A. (2015). Mycorrhizal phenotypes and the Law of the Minimum. *New Phytologist*, *205*(4), 1473-1484. https://doi.org/10.1111/nph.13172

Johnston-Monje, D., Lundberg, D. S., Lazarovits, G., Reis, V. M., & Raizada, M. N. (2016). Bacterial populations in juvenile maize rhizospheres originate from both seed and soil. *Plant and Soil*, *405*(1), 337-355. https://doi.org/10.1007/s11104-016-2826-0

Jumpponen, A., & Jones, K. L. (2009). Massively parallel 454 sequencing indicates hyperdiverse fungal communities in temperate *Quercus macrocarpa* phyllosphere. *New Phytologist*, *184*(2), 438-448. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02990.x

Jumpponen, A., & Trappe, J. M. (1998). Dark septate endophytes : A review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. *New Phytologist*, *140*(2), 295-310. https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1998.00265.x

Jung, S. C., Martinez-Medina, A., Lopez-Raez, J. A., & Pozo, M. J. (2012). Mycorrhiza-Induced Resistance and Priming of Plant Defenses. *Journal of Chemical Ecology*, *38*(6), 651-664. https://doi.org/10.1007/s10886-012-0134-6

Kagan-Zur, V., Roth-Bejerano, N., Sitrit, Y., & Morte, A. (Éds.). (2014). *Desert Truffles : Phylogeny, Physiology, Distribution and Domestication*. Springer-Verlag. https://doi.org/10.1007/978-3-642-40096-4

Kang, H., Chen, X., Kemppainen, M., Pardo, A. G., Veneault-Fourrey, C., Kohler, A., & Martin, F. M. (2020). The small secreted effector protein MiSSP7.6 of *Laccaria bicolor* is required for the establishment of ectomycorrhizal symbiosis. *Environmental Microbiology*, *22*(4), 1435-1446. https://doi.org/10.1111/1462-2920.14959

Karst, J., Jones, M. D., & Hoeksema, J. D. (2023). Positive citation bias and overinterpreted results lead to misinformation on common mycorrhizal networks in forests. *Nature Ecology & Evolution*, 1-11. https://doi.org/10.1038/s41559-023-01986-1

Kennedy, K. M., de Goffau, M. C., Perez-Muñoz, M. E., Arrieta, M.-C., Bäckhed, F., Bork, P., Braun, T., Bushman, F. D., Dore, J., de Vos, W. M., Earl, A. M., Eisen, J. A., Elovitz, M. A., Ganal-Vonarburg, S. C., Gänzle, M. G., Garrett, W. S., Hall, L. J., Hornef, M. W., Huttenhower, C., … Walter, J. (2023). Questioning the fetal microbiome illustrates pitfalls of low-biomass microbial studies. *Nature*, *613*(7945), Article 7945. https://doi.org/10.1038/s41586-022-05546-8

Kennedy, P. G., Peay, K. G., & Bruns, T. D. (2009). Root tip competition among ectomycorrhizal fungi : Are priority effects a rule or an exception? *Ecology*, *90*(8), 2098-2107. https://doi.org/10.1890/08-1291.1

Kiers, E. T., & Heijden, M. G. A. van der. (2006). Mutualistic Stability in the Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis : Exploring Hypotheses of Evolutionary Cooperation. *Ecology*, *87*(7), 1627-1636. https://doi.org/10.1890/0012-9658(2006)87[1627:MSITAM]2.0.CO;2

Kilpeläinen, J., Barbero-López, A., Vestberg, M., Heiskanen, J., & Lehto, T. (2017). Does severe soil drought have after-effects on arbuscular and ectomycorrhizal root colonisation and plant nutrition? *Plant and Soil*, *418*(1), 377-386. https://doi.org/10.1007/s11104-017-3308-8

Kim, K. S., & Sappington, T. W. (2013). Microsatellite data analysis for population genetics. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1006*, 271-295. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-389-3_19

Klaedtke, S., Jacques, M.-A., Raggi, L., Préveaux, A., Bonneau, S., Negri, V., Chable, V., & Barret, M. (2016). Terroir is a key driver of seed-associated microbial assemblages. *Environmental Microbiology*, *18*(6), 1792-1804. https://doi.org/10.1111/1462-2920.12977

Kloppholz, S., Kuhn, H., & Requena, N. (2011). A secreted fungal effector of *Glomus intraradices* promotes symbiotic biotrophy. *Current Biology*, *21*(14), 1204-1209. https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.06.044

Knapp, D. G., Pintye, A., & Kovács, G. M. (2012). The Dark Side Is Not Fastidious – Dark Septate Endophytic Fungi of Native and Invasive Plants of Semiarid Sandy Areas. *PLOS ONE*, *7*(2), e32570. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032570

Knight, R., Vrbanac, A., Taylor, B. C., Aksenov, A., Callewaert, C., Debelius, J., Gonzalez, A., Kosciolek, T., McCall, L.-I., McDonald, D., Melnik, A. V., Morton, J. T., Navas, J., Quinn, R. A., Sanders, J. G., Swafford, A. D., Thompson, L. R., Tripathi, A., Xu, Z. Z., … Dorrestein, P. C. (2018). Best practices for analysing microbiomes. *Nature Reviews Microbiology*, *16*(7), Article 7. https://doi.org/10.1038/s41579-018-0029-9

Knights, D., Kuczynski, J., Charlson, E. S., Zaneveld, J., Mozer, M. C., Collman, R. G., Bushman, F. D., Knight, R., & Kelley, S. T. (2011). Bayesian community-wide culture-independent microbial source tracking. *Nature Methods*, *8*(9), Article 9. https://doi.org/10.1038/nmeth.1650

Koch, R. (1910). *Die Ätiologie der Milzbrand-Krankheit, begründet auf die Entwicklungsgeschichte des Bacillus Anthracis (1876)* (Vol. 9). Barth.

Koele, N., Dickie, I. A., Oleksyn, J., Richardson, S. J., & Reich, P. B. (2012). No globally consistent effect of ectomycorrhizal status on foliar traits. *New Phytologist*, *196*(3), 845-852. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04297.x

Koga, R., Meng, X.-Y., Tsuchida, T., & Fukatsu, T. (2012). Cellular mechanism for selective vertical transmission of an obligate insect symbiont at the bacteriocyte–embryo interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(20), E1230-E1237. https://doi.org/10.1073/pnas.1119212109

Kohler, A., Kuo, A., Nagy, L. G., Morin, E., Barry, K. W., Buscot, F., Canbäck, B., Choi, C., Cichocki, N., Clum, A., Colpaert, J., Copeland, A., Costa, M. D., Doré, J., Floudas, D., Gay, G., Girlanda, M., Henrissat, B., Herrmann, S., … Martin, F. (2015). Convergent losses of decay mechanisms and rapid turnover of symbiosis genes in mycorrhizal mutualists. *Nature Genetics*, *47*(4), Article 4. https://doi.org/10.1038/ng.3223

Korotkin, H. B., Swenie, R. A., Miettinen, O., Budke, J. M., Chen, K.-H., Lutzoni, F., Smith, M. E., & Matheny, P. B. (2018). Stable isotope analyses reveal previously unknown trophic mode diversity in the Hymenochaetales. *American Journal of Botany*, *105*(11), 1869-1887. https://doi.org/10.1002/ajb2.1183

Koskella, B., Hall, L. J., & Metcalf, C. J. E. (2017). The microbiome beyond the horizon of ecological and evolutionary theory. *Nature Ecology & Evolution*, *1*(11), Article 11. https://doi.org/10.1038/s41559-017-0340-2

Kovács, G. M., & Trappe, J. M. (2014). Nomenclatural History and Genealogies of Desert Truffles. In V. Kagan-Zur, N. Roth-Bejerano, Y. Sitrit, & A. Morte (Éds.), *Desert Truffles : Phylogeny, Physiology, Distribution and Domestication* (p. 21-37). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-40096-4_2

Krings, M., Taylor, T. N., Taylor, E. L., Dotzler, N., & Walker, C. (2011). Arbuscular mycorrhizal-like fungi in Carboniferous arborescent lycopsids. *New Phytologist*, *191*(2), 311-314.

Kuzyakov, Y., & Xu, X. (2013). Competition between roots and microorganisms for nitrogen : Mechanisms and ecological relevance. *New Phytologist*, *198*(3), 656-669. https://doi.org/10.1111/nph.12235

Læssøe, T., & Hansen, K. (2007). Truffle trouble : What happened to the Tuberales? *Mycological Research*, *111*(9), 1075-1099. https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.08.004

Land, M., Hauser, L., Jun, S.-R., Nookaew, I., Leuze, M. R., Ahn, T.-H., Karpinets, T., Lund, O., Kora, G., Wassenaar, T., Poudel, S., & Ussery, D. W. (2015). Insights from 20 years of bacterial genome sequencing. *Functional & Integrative Genomics*, *15*(2), 141-161. https://doi.org/10.1007/s10142-015-0433-4

Lauber, C. L., Hamady, M., Knight, R., & Fierer, N. (2009). Pyrosequencing-Based Assessment of Soil pH as a Predictor of Soil Bacterial Community Structure at the Continental Scale. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*(15), 5111-5120. https://doi.org/10.1128/AEM.00335-09

Laurent-Webb, L., Genola, L., Rech, P., & Selosse, M.-A. (2021). Appel aux trufficulteurs et techniciens. *Le Trufficulteur*, *115*, 19, 20.

Layeghifard, M., Hwang, D. M., & Guttman, D. S. (2017). Disentangling Interactions in the Microbiome : A Network Perspective. *Trends in Microbiology*, *25*(3), 217-228. https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.11.008

Le Tacon, F. (2017). *Les truffes : Biologie, écologie et domestication*. Nancy. Ed. AgroParisTech.

Lederberg, J. (2000). Infectious History. *Science*, *288*(5464), 287-293. https://doi.org/10.1126/science.288.5464.287

Legendre, P., & Gallagher, E. D. (2001). Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. *Oecologia*, *129*(2), 271-280. https://doi.org/10.1007/s004420100716

Leonardi, P., Murat, C., Puliga, F., Iotti, M., & Zambonelli, A. (2020). Ascoma genotyping and mating type analyses of mycorrhizas and soil mycelia of *Tuber borchii* in a truffle orchard established by mycelial inoculated plants. *Environmental Microbiology*, *22*(3), 964-975. https://doi.org/10.1111/1462-2920.14777

Lepais, O., Chancerel, E., Boury, C., Salin, F., Manicki, A., Taillebois, L., Dutech, C., Aissi, A., Bacles, C. F. E., Daverat, F., Launey, S., & Guichoux, E. (2020). Fast sequence-based microsatellite genotyping development workflow. *PeerJ*, *8*, e9085. https://doi.org/10.7717/peerj.9085

Letunic, I., & Bork, P. (2021). Interactive Tree Of Life (iTOL) v5 : An online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Research*, *49*(W1), W293-W296. https://doi.org/10.1093/nar/gkab301

Li, S., Wang, C., Yang, S., Chen, W., Li, G., Luo, W., Wei, G., & Chen, C. (2023). Determining the contribution of microbiome complexity to the soil nutrient heterogeneity of fertile islands in a desert ecosystem. *Science of The Total Environment*, *857*, 159355. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.159355

Lin, H., & Peddada, S. D. (2020). Analysis of compositions of microbiomes with bias correction. *Nature Communications*, *11*(1), Article 1. https://doi.org/10.1038/s41467-020-17041-7

Lindahl, B. D., Nilsson, R. H., Tedersoo, L., Abarenkov, K., Carlsen, T., Kjøller, R., Kõljalg, U., Pennanen, T., Rosendahl, S., Stenlid, J., & Kauserud, H. (2013). Fungal community analysis by high-throughput sequencing of amplified markers – a user's guide. *New Phytologist*, *199*(1), 288-299. https://doi.org/10.1111/nph.12243

Lindahl, B. D., & Tunlid, A. (2015). Ectomycorrhizal fungi – potential organic matter decomposers, yet not saprotrophs. *New Phytologist*, *205*(4), 1443-1447. https://doi.org/10.1111/nph.13201

Liu, D., & Howell, K. (2021). Community succession of the grapevine fungal microbiome in the annual growth cycle. *Environmental Microbiology*, *23*(4), 1842-1857. https://doi.org/10.1111/1462-2920.15172

Liu, L., Yang, Y., Deng, Y., & Zhang, T. (2022). Nanopore long-read-only metagenomics enables complete and high-quality genome reconstruction from mock and complex metagenomes. *Microbiome*, *10*(1), 209. https://doi.org/10.1186/s40168-022-01415-8

Liu, S., He, F., Kuzyakov, Y., Xiao, H., Hoang, D. T. T., Pu, S., & Razavi, B. S. (2022). Nutrients in the rhizosphere : A meta-analysis of content, availability, and influencing factors. *Science of The Total Environment*, *826*, 153908. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153908

Lloréns-Rico, V., Vieira-Silva, S., Gonçalves, P. J., Falony, G., & Raes, J. (2021). Benchmarking microbiome transformations favors experimental quantitative approaches to address compositionality and sampling depth biases. *Nature Communications*, *12*(1), Article 1. https://doi.org/10.1038/s41467-021-23821-6

Lofgren, L. A., LeBlanc, N. R., Certano, A. K., Nachtigall, J., LaBine, K. M., Riddle, J., Broz, K., Dong, Y., Bethan, B., Kafer, C. W., & Kistler, H. C. (2018). *Fusarium graminearum* : Pathogen or endophyte of North American grasses? *New Phytologist*, *217*(3), 1203-1212. https://doi.org/10.1111/nph.14894

Lofgren, L. A., Uehling, J. K., Branco, S., Bruns, T. D., Martin, F., & Kennedy, P. G. (2019). Genome-based estimates of fungal rDNA copy number variation across phylogenetic scales and ecological lifestyles. *Molecular Ecology*, *28*(4), 721-730. https://doi.org/10.1111/mec.14995

Looney, B. P., Meidl, P., Piatek, M. J., Miettinen, O., Martin, F. M., Matheny, P. B., & Labbé, J. L. (2018). Russulaceae : A new genomic dataset to study ecosystem function and evolutionary diversification of ectomycorrhizal fungi with their tree associates. *New Phytologist*, *218*(1), 54-65. https://doi.org/10.1111/nph.15001

Looney, B. P., Ryberg, M., Hampe, F., Sánchez-García, M., & Matheny, P. B. (2016). Into and out of the tropics : Global diversification patterns in a hyperdiverse clade of ectomycorrhizal fungi. *Molecular Ecology*,*25*(2), 630-647. https://doi.org/10.1111/mec.13506

Louca, S., Mazel, F., Doebeli, M., & Parfrey, L. W. (2019). A census-based estimate of Earth's bacterial and archaeal diversity. *PLOS Biology*, *17*(2), e3000106. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000106

Lozupone, C., Lladser, M. E., Knights, D., Stombaugh, J., & Knight, R. (2011). UniFrac : An effective distance metric for microbial community comparison. *The ISME Journal*, *5*(2), Article 2. https://doi.org/10.1038/ismej.2010.133

Lugo, M. A., Reinhart, K. O., Menoyo, E., Crespo, E. M., & Urcelay, C. (2015). Plant functional traits and phylogenetic relatedness explain variation in associations with root fungal endophytes in an extreme arid environment. *Mycorrhiza*, *25*(2), 85-95. https://doi.org/10.1007/s00572-014-0592-5

Ma, B., Wang, Y., Ye, S., Liu, S., Stirling, E., Gilbert, J. A., Faust, K., Knight, R., Jansson, J. K., Cardona, C., Röttjers, L., & Xu, J. (2020). Earth microbial co-occurrence network reveals interconnection pattern across microbiomes. *Microbiome*, *8*(1), 82. https://doi.org/10.1186/s40168-020-00857-2

Ma, L.-J., Geiser, D. M., Proctor, R. H., Rooney, A. P., O'Donnell, K., Trail, F., Gardiner, D. M., Manners, J. M., & Kazan, K. (2013). *Fusarium* Pathogenomics. *Annual Review of Microbiology*, *67*(1), 399-416. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155650

Maciá-Vicente, J. G., Nam, B., & Thines, M. (2020). Root filtering, rather than host identity or age, determines the composition of root-associated fungi and oomycetes in three naturally co-occurring Brassicaceae. *Soil Biology and Biochemistry*, *146*, 107806. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107806

Mack, K. M. L., & Rudgers, J. A. (2008). Balancing multiple mutualists : Asymmetric interactions among plants, arbuscular mycorrhizal fungi, and fungal endophytes. *Oikos*, *117*(2), 310-320. https://doi.org/10.1111/j.2007.0030-1299.15973.x

Mahé, F., Rognes, T., Quince, C., Vargas, C. de, & Dunthorn, M. (2015). Swarm v2 : Highly-scalable and high-resolution amplicon clustering. *PeerJ*, *3*, e1420. https://doi.org/10.7717/peerj.1420

Maillot, É. (2023, novembre 30). Homo microbiens : Épisode • 4/4 du podcast Microbiote : tous en selles ! *France Culture*. https://www.radiofrance.fr/franceculture/podcasts/lsd-la-serie-documentaire/homo-microbiens-8204417

Makhalanyane, T. P., Valverde, A., Gunnigle, E., Frossard, A., Ramond, J.-B., & Cowan, D. A. (2015). Microbial ecology of hot desert edaphic systems. *FEMS Microbiology Reviews*, *39*(2), 203-221. https://doi.org/10.1093/femsre/fuu011

Maldonado, J. E., Gaete, A., Mandakovic, D., Aguado-Norese, C., Aguilar, M., Gutiérrez, R. A., & González, M. (2022). Partners to survive : *Hoffmannseggia doellii* root-associated microbiome at the Atacama Desert. *New Phytologist*, *234*(6), 2126-2139. https://doi.org/10.1111/nph.18080

Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., Dow, M., Verdier, V., Beer, S. V., Machado, M. A., Toth, I., Salmond, G., & Foster, G. D. (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, *13*(6), 614-629. https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x

Marasco, R., Rolli, E., Ettoumi, B., Vigani, G., Mapelli, F., Borin, S., Abou-Hadid, A. F., El-Behairy, U. A., Sorlini, C., Cherif, A., Zocchi, G., & Daffonchio, D. (2012). A Drought Resistance-Promoting Microbiome Is Selected by Root System under Desert Farming. *PLOS ONE*, *7*(10), e48479. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048479

Marc, G. (2023, janvier 2). Le mycobiote, une partie du peuple invisible du corps humain. *Le Monde.fr*. https://www.lemonde.fr/sciences/article/2023/01/02/le-mycobiote-une-partie-du-peuple-invisible-du-corps-humain_6156342_1650684.html

Marchesi, J. R., & Ravel, J. (2015). The vocabulary of microbiome research : A proposal. *Microbiome*, *3*(1), 31. https://doi.org/10.1186/s40168-015-0094-5

Mariani, M. S., Ren, Z.-M., Bascompte, J., & Tessone, C. J. (2019). Nestedness in complex networks : Observation, emergence, and implications. *Physics Reports*, *813*, 1-90. https://doi.org/10.1016/j.physrep.2019.04.001

Marqués-Gálvez, J. E., Miyauchi, S., Paolocci, F., Navarro-Ródenas, A., Arenas, F., Pérez-Gilabert, M., Morin, E., Auer, L., Barry, K. W., Kuo, A., Grigoriev, I. V., Martin, F. M., Kohler, A., & Morte, A. (2021). Desert truffle genomes reveal their reproductive modes and new insights into plant–fungal interaction and ectendomycorrhizal lifestyle. *New Phytologist*, *229*(5), 2917-2932. https://doi.org/10.1111/nph.17044

Martin, F., Aerts, A., Ahrén, D., Brun, A., Danchin, E. G. J., Duchaussoy, F., Gibon, J., Kohler, A., Lindquist, E., Pereda, V., Salamov, A., Shapiro, H. J., Wuyts, J., Blaudez, D., Buée, M., Brokstein, P., Canbäck, B., Cohen, D., Courty, P. E., … Grigoriev, I. V. (2008). The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature*, *452*(7183), Article 7183. https://doi.org/10.1038/nature06556

Martin, F., Kohler, A., Murat, C., Balestrini, R., Coutinho, P. M., Jaillon, O., Montanini, B., Morin, E., Noel, B., Percudani, R., Porcel, B., Rubini, A., Amicucci, A., Amselem, J., Anthouard, V., Arcioni, S., Artiguenave, F., Aury, J.-M., Ballario, P., … Wincker, P. (2010). Périgord black truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis. *Nature*, *464*(7291), 1033-1038. https://doi.org/10.1038/nature08867

Martin, F., Kohler, A., Murat, C., Veneault-Fourrey, C., & Hibbett, D. S. (2016). Unearthing the roots of ectomycorrhizal symbioses. *Nature Reviews Microbiology*, *14*(12), 760-773. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.149

Martino, E., Morin, E., Grelet, G.-A., Kuo, A., Kohler, A., Daghino, S., Barry, K. W., Cichocki, N., Clum, A., Dockter, R. B., Hainaut, M., Kuo, R. C., LaButti, K., Lindahl, B. D., Lindquist, E. A., Lipzen, A., Khouja, H.-R., Magnuson, J., Murat, C., … Perotto, S. (2018). Comparative genomics and transcriptomics depict ericoid mycorrhizal fungi as versatile saprotrophs and plant mutualists. *New Phytologist*, *217*(3), 1213-1229. https://doi.org/10.1111/nph.14974

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*(20), 5098-5109. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05692.x

Maurice, K., Laurent-Webb, L., Dehail, A., Bourceret, A., Boivin, S., Boukcim, H., Selosse, M.-A., & Ducousso, M. (2023). Fertility islands, keys to the establishment of plant and microbial diversity in a highly alkaline hot desert. *Journal of Arid Environments*, *219*, 105074. https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2023.105074

Maurice, K. Laurent-Webb, L., Bourceret, A., Boivin, S., Boukcim, H., Selosse, M.-A., Ducousso, M. Networking the desert plant microbiome, bacterial and fungal symbionts importance in the network architecture and assortativity. En préparation.

Mayden, R. L. (1999). Consilience and a hierarchy of species concepts : Advances toward closure on the species puzzle. *Journal of Nematology*, *31*(2), 95.

McFall-Ngai, M., Hadfield, M. G., Bosch, T. C. G., Carey, H. V., Domazet-Lošo, T., Douglas, A. E., Dubilier, N., Eberl, G., Fukami, T., Gilbert, S. F., Hentschel, U., King, N., Kjelleberg, S., Knoll, A. H., Kremer, N., Mazmanian, S. K., Metcalf, J. L., Nealson, K., Pierce, N. E., … Wernegreen, J. J. (2013). Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(9), 3229-3236. https://doi.org/10.1073/pnas.1218525110

McKnight, D. T., Huerlimann, R., Bower, D. S., Schwarzkopf, L., Alford, R. A., & Zenger, K. R. (2019). Methods for normalizing microbiome data : An ecological perspective. *Methods in Ecology and Evolution*, *10*(3), 389-400. https://doi.org/10.1111/2041-210X.13115

McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2014). Waste Not, Want Not : Why Rarefying Microbiome Data Is Inadmissible. *PLOS Computational Biology*, *10*(4), e1003531. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003531

Merényi, Z., Krizsán, K., Sahu, N., Liu, X.-B., Bálint, B., Stajich, J. E., Spatafora, J. W., & Nagy, L. G. (2023). Genomes of fungi and relatives reveal delayed loss of ancestral gene families and evolution of key fungal traits. *Nature Ecology & Evolution*, *7*(8), Article 8. https://doi.org/10.1038/s41559-023-02095-9

Mesny, F., Miyauchi, S., Thiergart, T., Pickel, B., Atanasova, L., Karlsson, M., Hüttel, B., Barry, K. W., Haridas, S., Chen, C., Bauer, D., Andreopoulos, W., Pangilinan, J., LaButti, K., Riley, R., Lipzen, A., Clum, A., Drula, E., Henrissat, B., … Hacquard, S. (2021). Genetic determinants of endophytism in the *Arabidopsis* root mycobiome. *Nature Communications*, *12*(1), Article 1. https://doi.org/10.1038/s41467-021-27479-y

Mészárošová, L., Kuťáková, E., Kohout, P., Münzbergová, Z., & Baldrian, P. (2024). Plant effects on microbiome composition are constrained by environmental conditions in a successional grassland. *Environmental Microbiome*, *19*(1), 8. https://doi.org/10.1186/s40793-024-00550-z

Mischiati, P., & Fontana, A. (1993). In vitro culture of *Tuber magnatum* mycelium isolated from mycorrhizas. *Mycological Research*, *97*(1), 40-44. https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)81110-6

Miyauchi, S., Kiss, E., Kuo, A., Drula, E., Kohler, A., Sánchez-García, M., Morin, E., Andreopoulos, B., Barry, K. W., Bonito, G., Buée, M., Carver, A., Chen, C., Cichocki, N., Clum, A., Culley, D., Crous, P. W., Fauchery, L., Girlanda, M., … Martin, F. M. (2020). Large-scale genome sequencing of mycorrhizal fungi provides insights into the early evolution of symbiotic traits. *Nature Communications*, *11*(1), 5125. https://doi.org/10.1038/s41467-020-18795-w

Moeller, A. H., Suzuki, T. A., Phifer-Rixey, M., & Nachman, M. W. (2018). Transmission modes of the mammalian gut microbiota. *Science*, *362*(6413), 453-457. https://doi.org/10.1126/science.aat7164

Molinier, V., Murat, C., Baltensweiler, A., Büntgen, U., Martin, F., Meier, B., Moser, B., Sproll, L., Stobbe, U., Tegel, W., Egli, S., & Peter, M. (2016). Fine-scale genetic structure of natural Tuber aestivum sites in southern Germany. *Mycorrhiza*, *26*(8), 895-907. https://doi.org/10.1007/s00572-016-0719-y

Montesinos-Navarro, A., Segarra-Moragues, J. G., Valiente-Banuet, A., & Verdú, M. (2012). The network structure of plant–arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, *194*(2), 536-547. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.04045.x

Mony, C., Gaudu, V., Ricono, C., Jambon, O., & Vandenkoornhuyse, P. (2021). Plant neighbours shape fungal assemblages associated with plant roots : A new understanding of niche-partitioning in plant communities. *Functional Ecology*, *35*(8), 1768-1782. https://doi.org/10.1111/1365-2435.13804

Moran, N. A., Ochman, H., & Hammer, T. J. (2019). Evolutionary and Ecological Consequences of Gut Microbial Communities. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, *50*(1), 451-475. https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-110617-062453

Moreno, G., Alvarado, P., & Manjón, J. L. (2014). Hypogeous Desert Fungi. In V. Kagan-Zur, N. Roth-Bejerano, Y. Sitrit, & A. Morte (Éds.), *Desert Truffles : Phylogeny, Physiology, Distribution and Domestication* (p. 3-20). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-40096-4_1

Moroenyane, I., Tremblay, J., & Yergeau, É. (2021). Soybean Microbiome Recovery After Disruption is Modulated by the Seed and Not the Soil Microbiome. *Phytobiomes Journal*, *5*(4), 418-431. https://doi.org/10.1094/PBIOMES-01-21-0008-R

Morte, A., & Andrino, A. (2014). Domestication : Preparation of Mycorrhizal Seedlings. In V. Kagan-Zur, N. Roth-Bejerano, Y. Sitrit, & A. Morte (Éds.), *Desert Truffles : Phylogeny, Physiology, Distribution and Domestication* (p. 343-365). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-40096-4_21

Morte, A., Andrino, A., Honrubia, M., & Navarro-Ródenas, A. (2012). Terfezia Cultivation in Arid and Semiarid Soils. In A. Zambonelli & G. M. Bonito (Éds.), *Edible Ectomycorrhizal Mushrooms : Current Knowledge and Future Prospects* (p. 241-263). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-33823-6_14

Morte, A., Honrubia, M., & Gutiérrez, A. (2008). Biotechnology and Cultivation of Desert Truffles. In A. Varma (Éd.), *Mycorrhiza : State of the Art, Genetics and Molecular Biology, Eco-Function, Biotechnology, Eco-Physiology, Structure and Systematics* (p. 467-483). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-540-78826-3_23

Morte, A., Kagan-Zur, V., Navarro-Ródenas, A., & Sitrit, Y. (2021). Cultivation of Desert Truffles—A Crop Suitable for Arid and Semi-Arid Zones. *Agronomy*, *11*(8), Article 8. https://doi.org/10.3390/agronomy11081462

Morte, A., Navarro-Ródenas, A., & Nicolás, E. (2010). Physiological parameters of desert truffle mycorrhizal *Helianthemun almeriense* plants cultivated in orchards under water deficit conditions. *Symbiosis*, *52*(2-3), 133-139. https://doi.org/10.1007/s13199-010-0080-4

Mullen, R. B., & Schmidt, S. K. (1993). Mycorrhizal infection, phosphorus uptake, and phenology in *Ranunculus adoneus* : Implications for the functioning of mycorrhizae in alpine systems. *Oecologia*, *94*(2), 229-234. https://doi.org/10.1007/BF00341321

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro : The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, *51 Pt 1*, 263-273. https://doi.org/10.1101/sqb.1986.051.01.032

Murat, C. (2004). *Etude de la diversité génétique de la truffe blanche du Piémont (*Tuber magnatum *Pico) et de la truffe noire du Périgord (*Tuber melanosporum *Vittad.)* [These de doctorat, Nancy 1]. https://www.theses.fr/2004NAN10189

Murat, C. (2015). Forty years of inoculating seedlings with truffle fungi : Past and future perspectives. *Mycorrhiza*, *25*(1), 77-81. https://doi.org/10.1007/s00572-014-0593-4

Murat, C., Bonneau, L., Varga, H. D. L., Olivier, J.-M., Sandrine, F., & Tacon, F. L. (2016). Trapping truffle production in holes : A promising technique for improving production and unravelling truffle life cycle. *Italian Journal of Mycology*, *45*, 47-53. https://doi.org/10.6092/issn.2531-7342/6346

Murat, C., Díez, J., Luis, P., Delaruelle, C., Dupré, C., Chevalier, G., Bonfante, P., & Martin, F. (2004). Polymorphism at the ribosomal DNA ITS and its relation to postglacial re-colonization routes of the Perigord truffle *Tuber melanosporum*. *New Phytologist*, *164*(2), 401-411. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01189.x

Murat, C., Payen, T., Noel, B., Kuo, A., Morin, E., Chen, J., Kohler, A., Krizsán, K., Balestrini, R., Da Silva, C., Montanini, B., Hainaut, M., Levati, E., Barry, K. W., Belfiori, B., Cichocki, N., Clum, A., Dockter, R. B., Fauchery, L., … Martin, F. M. (2018). Pezizomycetes genomes reveal the molecular basis of ectomycorrhizal truffle lifestyle. *Nature Ecology & Evolution*, *2*(12), 1956-1965. https://doi.org/10.1038/s41559-018-0710-4

Murat, C., Riccioni, C., Belfiori, B., Cichocki, N., Labbé, J., Morin, E., Tisserant, E., Paolocci, F., Rubini, A., & Martin, F. (2011). Distribution and localization of microsatellites in the Perigord black truffle genome and identification of new molecular markers. *Fungal Genetics and Biology*, *48*(6), 592-601. https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.10.007

Murat, C., Rubini, A., Riccioni, C., De la Varga, H., Akroume, E., Belfiori, B., Guaragno, M., Le Tacon, F., Robin, C., Halkett, F., Martin, F., & Paolocci, F. (2013). Fine-scale spatial genetic structure of the black truffle (*Tuber melanosporum*) investigated with neutral microsatellites and functional mating type genes. *New Phytologist*, *199*(1), 176-187. https://doi.org/10.1111/nph.12264

Murata, H., Yamada, A., Maruyama, T., Endo, N., Yamamoto, K., Ohira, T., & Shimokawa, T. (2013). Root endophyte interaction between ectomycorrhizal basidiomycete *Tricholoma matsutake* and arbuscular mycorrhizal tree *Cedrela odorata*, allowing in vitro synthesis of rhizospheric "shiro". *Mycorrhiza*, *23*(3), 235-242. https://doi.org/10.1007/s00572-012-0466-7

Murata, H., Yamada, A., Yokota, S., Maruyama, T., Endo, N., Yamamoto, K., Ohira, T., & Neda, H. (2014). Root endophyte symbiosis in vitro between the ectomycorrhizal basidiomycete *Tricholoma matsutake* and the arbuscular mycorrhizal plant *Prunus speciosa*. *Mycorrhiza*, *4*(24), 315-321. https://doi.org/10.1007/s00572-013-0534-7

Naumann, M., Schüßler, A., & Bonfante, P. (2010). The obligate endobacteria of arbuscular mycorrhizal fungi are ancient heritable components related to the Mollicutes. *The ISME Journal*, *4*(7), Article 7. https://doi.org/10.1038/ismej.2010.21

Navarro-Ródenas, A., Bárzana, G., Nicolás, E., Carra, A., Schubert, A., & Morte, A. (2013). Expression Analysis of Aquaporins from Desert Truffle Mycorrhizal Symbiosis Reveals a Fine-Tuned Regulation Under Drought. *Molecular Plant-Microbe Interactions®*, *26*(9), 1068-1078. https://doi.org/10.1094/MPMI-07-12-0178-R

Navarro-Ródenas, A., Berná, L. M., Lozano-Carrillo, C., Andrino, A., & Morte, A. (2016). Beneficial native bacteria improve survival and mycorrhization of desert truffle mycorrhizal plants in nursery conditions. *Mycorrhiza*, *26*(7), 769-779. https://doi.org/10.1007/s00572-016-0711-6

Navarro-Rodenas, A., Perez-Gilabert, M., Torrente, P., & Morte, A. (2012). The role of phosphorus in the ectendomycorrhiza continuum of desert truffle mycorrhizal plants. In *Mycorrhiza* (Vol. 22, Numéro 7, p. 565-575). Springer. https://doi.org/10.1007/s00572-012-0434-2

Nelson, E. B. (2018). The seed microbiome : Origins, interactions, and impacts. *Plant and Soil*, *422*(1), 7-34. https://doi.org/10.1007/s11104-017-3289-7

Newsham, K. K. (2011). A meta-analysis of plant responses to dark septate root endophytes. *New Phytologist*, *190*(3), 783-793. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03611.x

Newsham, K. K., Upson, R., & Read, D. J. (2009). Mycorrhizas and dark septate root endophytes in polar regions. *Fungal Ecology*, *2*(1), 10-20. https://doi.org/10.1016/j.funeco.2008.10.005

Nguyen, N. H., Hynson, N. A., & Bruns, T. D. (2012). Stayin' alive : Survival of mycorrhizal fungal propagules from 6-yr-old forest soil. *Fungal Ecology*, *5*(6), 741-746. https://doi.org/10.1016/j.funeco.2012.05.006

Nguyen, N. H., Song, Z., Bates, S. T., Branco, S., Tedersoo, L., Menke, J., Schilling, J. S., & Kennedy, P. G. (2016). FUNGuild : An open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild. *Fungal Ecology*, *20*, 241-248. https://doi.org/10.1016/j.funeco.2015.06.006

Ni, M., Feretzaki, M., Sun, S., Wang, X., & Heitman, J. (2011). Sex in Fungi. *Annual Review of Genetics*, *45*(1), 405-430. https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132536

Nilsson, R. H., Kristiansson, E., Ryberg, M., Hallenberg, N., & Larsson, K.-H. (2008). Intraspecific ITS Variability in the Kingdom Fungi as Expressed in the International Sequence Databases and Its Implications for Molecular Species Identification. *Evolutionary Bioinformatics*, *4*, EBO.S653. https://doi.org/10.4137/EBO.S653

Nilsson, R. H., Wurzbacher, C., Bahram, M., Coimbra, V. R. M., Larsson, E., Tedersoo, L., Eriksson, J., Duarte, C., Svantesson, S., Sánchez-García, M., Ryberg, M. K., Kristiansson, E., & Abarenkov, K. (2016). Top 50 most wanted fungi. *MycoKeys*, *12*, 29-40. https://doi.org/10.3897/mycokeys.12.7553

Nuccio, E. E., Anderson-Furgeson, J., Estera, K. Y., Pett-Ridge, J., de Valpine, P., Brodie, E. L., & Firestone, M. K. (2016). Climate and edaphic controllers influence rhizosphere community assembly for a wild annual grass. *Ecology*, *97*(5), 1307-1318. https://doi.org/10.1890/15-0882.1

Ochoa-Hueso, R., Eldridge, D. J., Delgado-Baquerizo, M., Soliveres, S., Bowker, M. A., Gross, N., Le Bagousse-Pinguet, Y., Quero, J. L., García-Gómez, M., Valencia, E., Arredondo, T., Beinticinco, L., Bran, D., Cea, A., Coaguila, D., Dougill, A. J., Espinosa, C. I., Gaitán, J., Guuroh, R. T., … Maestre, F. T. (2018). Soil fungal abundance and plant functional traits drive fertile island formation in global drylands. *Journal of Ecology*, *106*(1), 242-253. https://doi.org/10.1111/1365-2745.12871

Odnoletkova, N., & Patzek, T. W. (2023). Water resources in Saudi Arabia : Trends in rainfall, water consumption, and analysis of agricultural water footprint. *Npj Sustainable Agriculture*, *1*(1), Article 1. https://doi.org/10.1038/s44264-023-00006-w

Olesen, J. M., Bascompte, J., Dupont, Y. L., & Jordano, P. (2007). The modularity of pollination networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(50), 19891-19896. https://doi.org/10.1073/pnas.0706375104

Olivera, A., Bonet, J. A., Palacio, L., Liu, B., & Colinas, C. (2014). Weed control modifies *Tuber melanosporum* mycelial expansion in young oak plantations. *Annals of Forest Science*, *71*(4), 495-504. https://doi.org/10.1007/s13595-014-0360-x

Olivera, A., Fischer, C. R., Bonet, J. A., Martínez de Aragón, J., Oliach, D., & Colinas, C. (2011). Weed management and irrigation are key treatments in emerging black truffle (*Tuber melanosporum*) cultivation. *New Forests*, *42*(2), 227-239. https://doi.org/10.1007/s11056-011-9249-9

Op De Beeck, M., Lievens, B., Busschaert, P., Declerck, S., Vangronsveld, J., & Colpaert, J. V. (2014). Comparison and Validation of Some ITS Primer Pairs Useful for Fungal Metabarcoding Studies. *PLoS ONE*, *9*(6), e97629. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097629

Öpik, M., Vanatoa, A., Vanatoa, E., Moora, M., Davison, J., Kalwij, J. M., Reier, Ü., & Zobel, M. (2010). The online database MaarjAM reveals global and ecosystemic distribution patterns in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *New Phytologist*, *188*(1), 223-241. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03334.x

Ori, F., Menotta, M., Leonardi, M., Amicucci, A., Zambonelli, A., Covès, H., Selosse, M.-A., Schneider-Maunoury, L., Pacioni, G., & Iotti, M. (2021). Effect of slug mycophagy on Tuber aestivum spores. *Fungal Biology*, *125*(10), 796-805. https://doi.org/10.1016/j.funbio.2021.05.002

Pacioni, G., & Comandini, O. (1999). Tuber. In J. W. G. Cairney & S. M. Chambers (Éds.), *Ectomycorrhizal Fungi Key Genera in Profile* (p. 163-186). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-662-06827-4_6

Paliy, O., & Shankar, V. (2016a). Application of multivariate statistical techniques in microbial ecology. *Molecular Ecology*, *25*(5), 1032-1057. https://doi.org/10.1111/mec.13536

Paliy, O., & Shankar, V. (2016b). Application of multivariate statistical techniques in microbial ecology. *Molecular Ecology*, *25*(5), 1032-1057. https://doi.org/10.1111/mec.13536

Palmieri, D., Vitale, S., Lima, G., Di Pietro, A., & Turrà, D. (2020). A bacterial endophyte exploits chemotropism of a fungal pathogen for plant colonization. *Nature Communications*, *11*(1), Article 1. https://doi.org/10.1038/s41467-020-18994-5

Pauvert, C., Buée, M., Laval, V., Edel-Hermann, V., Fauchery, L., Gautier, A., Lesur, I., Vallance, J., & Vacher, C. (2019). Bioinformatics matters : The accuracy of plant and soil fungal community data is highly dependent on the metabarcoding pipeline. *Fungal Ecology*, *41*, 23-33. https://doi.org/10.1016/j.funeco.2019.03.005

Paz, C., Öpik, M., Bulascoschi, L., Bueno, C. G., & Galetti, M. (2021). Dispersal of Arbuscular Mycorrhizal Fungi : Evidence and Insights for Ecological Studies. *Microbial Ecology*, *81*(2), 283-292. https://doi.org/10.1007/s00248-020-01582-x

Perez-Lamarque, B., Krehenwinkel, H., Gillespie, R. G., & Morlon, H. (2022). Limited Evidence for Microbial Transmission in the Phylosymbiosis between Hawaiian Spiders and Their Microbiota. *mSystems*, *7*(1), e01104-21. https://doi.org/10.1128/msystems.01104-21

Perez-Lamarque, B., Laurent-Webb, L., Bourceret, A., Maillet, L., Bik, F., Cartier, D., Labolle, F., Holveck, P., Epp, D., & Selosse, M.-A. (2023). Fungal microbiomes associated with Lycopodiaceae during ecological succession. *Environmental Microbiology Reports*, *15*(2), 109-118. https://doi.org/10.1111/1758-2229.13130

Perez-Lamarque, B., & Morlon, H. (2019). Characterizing symbiont inheritance during host–microbiota evolution : Application to the great apes gut microbiota. *Molecular Ecology Resources*, *19*(6), 1659-1671. https://doi.org/10.1111/1755-0998.13063

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*(1), 38. https://doi.org/10.1186/s40793-022-00434-0

Perisin, M., Vetter, M., Gilbert, J. A., & Bergelson, J. (2016). 16Stimator : Statistical estimation of ribosomal gene copy numbers from draft genome assemblies. *The ISME Journal*, *10*(4), Article 4. https://doi.org/10.1038/ismej.2015.161

Pernthaler, J., Glöckner, F.-O., Schönhuber, W., & Amann, R. (2001). Fluorescence in situ hybridization (FISH) with rRNA-targeted oligonucleotide probes. In *Methods in Microbiology* (Vol. 30, p. 207-226). Academic Press. https://doi.org/10.1016/S0580-9517(01)30046-6

Peter, M., Kohler, A., Ohm, R. A., Kuo, A., Krützmann, J., Morin, E., Arend, M., Barry, K. W., Binder, M., Choi, C., Clum, A., Copeland, A., Grisel, N., Haridas, S., Kipfer, T., LaButti, K., Lindquist, E., Lipzen, A., Maire, R., … Martin, F. M. (2016). Ectomycorrhizal ecology is imprinted in the genome of the dominant symbiotic fungus *Cenococcum geophilum*. *Nature Communications*, *7*(1), 12662. https://doi.org/10.1038/ncomms12662

Petrolli, R., Augusto Vieira, C., Jakalski, M., Bocayuva, M. F., Vallé, C., Cruz, E. D. 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*(5), 2002-2014. https://doi.org/10.1111/nph.17459

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*, *110*(11), 2568-2584. https://doi.org/10.1111/1365-2745.13986

Philippot, L., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P., & van der Putten, W. H. (2013). Going back to the roots : The microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*, *11*(11), Article 11. https://doi.org/10.1038/nrmicro3109

Pichon, B., Goff, R. L., Morlon, H., & Perez-Lamarque, B. (2023). *Telling mutualistic and antagonistic ecological networks apart by learning their multiscale structure* (p. 2023.04.04.535603). bioRxiv. https://doi.org/10.1101/2023.04.04.535603

Piñuela, Y., Alday, J. G., Oliach, D., Castaño, C., Bolaño, F., Colinas, C., & Bonet, J. A. (2021). White mulch and irrigation increase black truffle soil mycelium when competing with summer truffle in young truffle orchards. *Mycorrhiza*, *31*(3), 371-382. https://doi.org/10.1007/s00572-020-01018-x

Pirozynski, K. A., & Malloch, D. W. (1975). The origin of land plants : A matter of mycotrophism. *Biosystems*, *6*(3), 153-164. https://doi.org/10.1016/0303-2647(75)90023-4

Plattner, I., & Hall, I. (1995). Parasitism of nonhost plants by the mycorrhizal fungus *Tuber melanosporum*. In *Mycological Research* (Vol. 99, Numéro 11, p. 1367-1370). Elsevier sci ltd. https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)81223-9

Plett, J. M., Daguerre, Y., Wittulsky, S., Vayssières, A., Deveau, A., Melton, S. J., Kohler, A., Morrell-Falvey, J. L., 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*, *111*(22), 8299-8304. https://doi.org/10.1073/pnas.1322671111

Plett, J. M., Kohler, A., & Martin, F. (2024). Masters of Manipulation : How Our Molecular Understanding of Model Symbiotic Fungi and Their Hosts Is Changing the Face of "Mutualism". In Y.-P. Hsueh & M. Blackwell (Éds.), *Fungal Associations* (p. 249-272). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-031-41648-4_10

Pollock, J., Glendinning, L., Wisedchanwet, T., & Watson, M. (2018). The Madness of Microbiome : Attempting To Find Consensus "Best Practice" for 16S Microbiome Studies. *Applied and Environmental Microbiology*, *84*(7), e02627-17. https://doi.org/10.1128/AEM.02627-17

Põlme, S., Abarenkov, K., Henrik Nilsson, R., Lindahl, B. D., Clemmensen, K. E., Kauserud, H., Nguyen, N., Kjøller, R., Bates, S. T., Baldrian, P., Frøslev, T. G., Adojaan, K., Vizzini, A., Suija, A., Pfister, D., Baral, H.-O., Järv, H., Madrid, H., Nordén, J., … Tedersoo, L. (2020). FungalTraits : A user-friendly traits database of fungi and fungus-like stramenopiles. *Fungal Diversity*, *105*(1), 1-16. https://doi.org/10.1007/s13225-020-00466-2

Pozo, M. J., & Azcón-Aguilar, C. (2007). Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, *10*(4), 393-398. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.05.004

Prévost-Bouré, N. C., Dequiedt, S., Thioulouse, J., Lelièvre, M., Saby, N. P. A., Jolivet, C., Arrouays, D., Plassart, P., Lemanceau, P., & Ranjard, L. (2014). Similar Processes but Different Environmental Filters for Soil Bacterial and Fungal Community Composition Turnover on a Broad Spatial Scale. *PLOS ONE*, *9*(11), e111667. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111667

Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D. R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., … Wang, J. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, *464*(7285), Article 7285. https://doi.org/10.1038/nature08821

Rappé, M. S., & Giovannoni, S. J. (2003). The Uncultured Microbial Majority. *Annual Review of Microbiology*, *57*(1), 369-394. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090759

Rathore, V. S., Singh, J. P., Bhardwaj, S., Nathawat, N. S., Kumar, M., & Roy, M. M. (2015). Potential of Native Shrubs *Haloxylon salicornicum* and *Calligonum Polygonoides* for Restoration of Degraded Lands in Arid Western Rajasthan, India. *Environmental Management*, *55*(1), 205-216. https://doi.org/10.1007/s00267-014-0372-1

Read, D. J., Kianmehr, H., & Malibari, A. (1977). The Biology of Mycorrhiza in *Helianthemum* Mill. *New Phytologist*, *78*(2), 305-312. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1977.tb04834.x

Reimann, C., Filzmoser, P., Fabian, K., Hron, K., Birke, M., Demetriades, A., Dinelli, E., & Ladenberger, A. (2012). The concept of compositional data analysis in practice—Total major element concentrations in agricultural and grazing land soils of Europe. *Science of The Total Environment*, *426*, 196-210. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.02.032

Reyna, S., & Garcia-Barreda, S. (2014). Black truffle cultivation : A global reality. *Forest Systems*, *23*(2), 317. https://doi.org/10.5424/fs/2014232-04771

Rezki, S., Campion, C., Simoneau, P., Jacques, M.-A., Shade, A., & Barret, M. (2018). Assembly of seed-associated microbial communities within and across successive plant generations. *Plant and Soil*, *422*(1), 67-79. https://doi.org/10.1007/s11104-017-3451-2

Riccioni, C., Belfiori, B., Rubini, A., Passeri, V., Arcioni, S., & Paolocci, F. (2008). *Tuber melanosporum* outcrosses : Analysis of the genetic diversity within and among its natural populations under this new scenario. *New Phytologist*, *180*(2), 466-478. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02560.x

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*(3), 1011-1023. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01382.x

Richard, F., Moreau, P.-A., Selosse, M.-A., & Gardes, M. (2004). Diversity and fruiting patterns of ectomycorrhizal and saprobic fungi in an old-growth Mediterranean forest dominated by *Quercus ilex* L. *Canadian Journal of Botany*, *82*(12), 1711-1729. https://doi.org/10.1139/b04-128

Ridout, M. E., Schroeder, K. L., Hunter, S. S., Styer, J., & Newcombe, G. (2019). Priority effects of wheat seed endophytes on a rhizosphere symbiosis. *Symbiosis*, *78*(1), 19-31. https://doi.org/10.1007/s13199-019-00606-6

Ridout, M., & Newcombe, G. (2018). *Sydowia polyspora* is both a Foliar Endophyte and a Preemergent Seed Pathogen in *Pinus ponderosa*. *Plant Disease*, *102*(3), 640-644. https://doi.org/10.1094/PDIS-07-17-1074-RE

Robin-Soriano,A., Maurice, K., Boivin, S., Bourceret, A., Laurent-Webb, L.,Youssef, S., Nespoulos, J., Boussière, I., Berder, J., Damasio, C., Vincent, B ., Boukcim, H., Ducousso, M., Gros-Balthazard, M. A multi approach method to assess arbuscular mycorrhizal fungi diversity at the scale of a hot arid hyperalkaline region. En préparation.

Rochefort, A., Simonin, M., Marais, C., Guillerm-Erckelboudt, A.-Y., Barret, M., & Sarniguet, A. (2021). Transmission of Seed and Soil Microbiota to Seedling. *mSystems*, *6*(3), e00446-21. https://doi.org/10.1128/mSystems.00446-21

Rodríguez, C. E., Antonielli, L., Mitter, B., Trognitz, F., & Sessitsch, A. (2020). Heritability and Functional Importance of the *Setaria viridis* Bacterial Seed Microbiome. *Phytobiomes Journal*, *4*(1), 40-52. https://doi.org/10.1094/PBIOMES-04-19-0023-R

Rodriguez Estrada, A. E., Jonkers, W., Corby Kistler, H., & May, G. (2012). Interactions between *Fusarium verticillioides*, *Ustilago maydis*, and *Zea mays* : An endophyte, a pathogen, and their shared plant host. *Fungal Genetics and Biology*, *49*(7), 578-587. https://doi.org/10.1016/j.fgb.2012.05.001

Rodriguez, R. J., Jr, J. F. W., Arnold, A. E., & Redman, R. S. (2009). Fungal endophytes : Diversity and functional roles. *New Phytologist*, *182*(2), 314-330. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x

Roth-Bejerano, N., Navarro-Ródenas, A., & Gutiérrez, A. (2014). Types of Mycorrhizal Association. In V. Kagan-Zur, N. Roth-Bejerano, Y. Sitrit, & A. Morte (Éds.), *Desert Truffles : Phylogeny, Physiology, Distribution and Domestication* (p. 69-80). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-40096-4_5

Roy, M., Dubois, M.-P., Proffit, M., Vincenot, L., Desmarais, E., & Selosse, M.-A. (2008). Evidence from population genetics that the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria amethystina* is an actual multihost symbiont. *Molecular Ecology*, *17*(12), 2825-2838. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03790.x

Roy-Bolduc, A., Laliberté, E., & Hijri, M. (2016). High richness of ectomycorrhizal fungi and low host specificity in a coastal sand dune ecosystem revealed by network analysis. *Ecology and Evolution*, *6*(1), 349-362. https://doi.org/10.1002/ece3.1881

Rubini, A., Belfiori, B., Riccioni, C., Arcioni, S., Martin, F., & Paolocci, F. (2011). Tuber melanosporum : Mating type distribution in a natural plantation and dynamics of strains of different mating types on the roots of nursery-inoculated host plants. *New Phytologist*, *189*(3), 723-735. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03493.x

Rubini, A., Belfiori, B., Riccioni, C., Tisserant, E., Arcioni, S., Martin, F., & Paolocci, F. (2011). Isolation and characterization of MAT genes in the symbiotic ascomycete *Tuber melanosporum*. *New Phytologist*, *189*(3), 710-722. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03492.x

Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., & Arnheim, N. (1985). Enzymatic Amplification of β-Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science*, *230*(4732), 1350-1354. https://doi.org/10.1126/science.2999980

Sánchez Márquez, M. S., Bills, G. F., & Zabalgogeazcoa, I. (2008). *Diversity and structure of the fungal endophytic assemblages from two sympatric coastal grasses*. https://digital.csic.es/handle/10261/27529

Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *74*(12), 5463-5467. https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463

Schlesinger, W. H., Raikes, J. A., Hartley, A. E., & Cross, A. F. (1996). On the Spatial Pattern of Soil Nutrients in Desert Ecosystems. *Ecology*, *77*(2), 364-374. https://doi.org/10.2307/2265615

Schneider, A. N., Sundh, J., Sundström, G., Richau, K., Delhomme, N., Grabherr, M., Hurry, V., & Street, N. R. (2021). Comparative Fungal Community Analyses Using Meta-transcriptomics and Internal Transcribed Spacer Amplicon Sequencing from Norway Spruce. *mSystems*, *6*(1), 10.1128/msystems.00884-20. https://doi.org/10.1128/msystems.00884-20

Schneider-Maunoury, L. (2019). *Ecologie et biologie reproductive de la Truffe noire (Tuber melanosporum)* [Thèse soutenue, Paris, Muséum national d'histoire naturelle]. https://www.theses.fr/s246023

Schneider-Maunoury, L., Deveau, A., Moreno, M., Todesco, F., Belmondo, S., Murat, C., Courty, P.-E., Jakalski, M., & Selosse, M.-A. (2020). Two ectomycorrhizal truffles, *Tuber melanosporum* and *T. aestivum*, endophytically colonise roots of non-ectomycorrhizal plants in natural environments. In *New Phytologist* (Vol. 225, Numéro 6, p. 2542-2556). Wiley. https://doi.org/10.1111/nph.16321

Schneider-Maunoury, L., Leclercq, S., Clément, C., Covès, H., Lambourdière, J., Sauve, M., Richard, F., Selosse, M.-A., & Taschen, E. (2018). Is *Tuber melanosporum* colonizing the roots of herbaceous, non-ectomycorrhizal plants? *Fungal Ecology*, *31*, 59-68. https://doi.org/10.1016/j.funeco.2017.10.004

Schneider-Maunoury, L., Taschen, E., Richard, F., & Selosse, M.-A. (2019). Soil spore bank in *Tuber melanosporum* : Up to 42% of fruitbodies remain unremoved in managed truffle grounds. *Mycorrhiza*, *29*(6), 663-668. https://doi.org/10.1007/s00572-019-00912-3

Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., Fungal Barcoding Consortium, Fungal Barcoding Consortium Author List, Bolchacova, E., Voigt, K., Crous, P. W., Miller, A. N., Wingfield, M. J., Aime, M. C., An, K.-D., Bai, F.-Y., Barreto, R. W., Begerow, D., … Schindel, D. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(16), 6241-6246. https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109

Schulz, B., & Boyle, C. (2005). The endophytic continuum. *Mycological Research*, *109*(6), 661-686. https://doi.org/10.1017/S095375620500273X

Schulz, B. J. E., Boyle, C. J. C., & Sieber, T. N. (Éds.). (2006). *Microbial root endophytes*. Springer.

Schulze-Makuch, D., Wagner, D., Kounaves, S. P., Mangelsdorf, K., Devine, K. G., Vera, J.-P. de, Schmitt-Kopplin, P., Grossart, H.-P., Parro, V., Kaupenjohann, M., Galy, A., Schneider, B., Airo, A., Frösler, J., Davila, A. F., Arens, F. L., Cáceres, L., Cornejo, F. S., Carrizo, D., … Zamorano, P. (2018). Transitory microbial habitat in the hyperarid Atacama Desert. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(11), 2670-2675. https://doi.org/10.1073/pnas.1714341115

Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W. S., & Huttenhower, C. (2011). Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biology*, *12*(6), R60. https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-6-r60

Selosse, M. A., Martos, F., Perry, B., Maj, P., Roy, M., & Pailler, T. (2010). Saprotrophic fungal symbionts in tropical achlorophyllous orchids. *Plant Signaling & Behavior*, *5*(4), 349-353. https://doi.org/10.4161/psb.5.4.10791

Selosse, M.-A. (2020). Truffles. *Current Biology*, *30*(9), R382-R383. https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.02.040

Selosse, M.-A., Baudoin, E., & Vandenkoornhuyse, P. (2004). Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants. *Comptes Rendus Biologies*, *327*(7), 639-648. https://doi.org/10.1016/j.crvi.2003.12.008

Selosse, M.-A., Bessis, A., & Pozo, M. J. (2014). Microbial priming of plant and animal immunity : Symbionts as developmental signals. *Trends in Microbiology*, *22*(11), 607-613. https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.07.003

Selosse, M.-A., Charpin, M., & Not, F. (2017). Mixotrophy everywhere on land and in water : The grand écart hypothesis. *Ecology Letters*, *20*(2), 246-263. https://doi.org/10.1111/ele.12714

Selosse, M.-A., Dubois, M.-P., & Alvarez, N. (2009). Do Sebacinales commonly associate with plant roots as endophytes? *Mycological Research*, *113*(10), 1062-1069. https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.07.004

Selosse, M.-A., & Le Tacon, F. (1998). The land flora : A phototroph-fungus partnership? *Trends in Ecology & Evolution*, *13*(1), 15-20. https://doi.org/10.1016/S0169-5347(97)01230-5

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. (2021). The Waiting Room Hypothesis revisited by orchids : Were orchid mycorrhizal fungi recruited among root endophytes? *Annals of Botany*, mcab134. https://doi.org/10.1093/aob/mcab134

Selosse, M.-A., Richard, F., He, X., & Simard, S. W. (2006). Mycorrhizal networks : Des liaisons dangereuses? *Trends in Ecology & Evolution*, *21*(11), 621-628. https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.07.003

Selosse, M.-A., Schneider-Maunoury, L., & Martos, F. (2018). Time to re-think fungal ecology? Fungal ecological niches are often prejudged. *New Phytologist*, *217*(3), 968-972. https://doi.org/10.1111/nph.14983

Selosse, M.-A., Schneider-Maunoury, L., Taschen, E., Rousset, F., & Richard, F. (2017). Black Truffle, a Hermaphrodite with Forced Unisexual Behaviour. *Trends in Microbiology*, *25*(10), 784-787. https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.05.010

Sender, R., Fuchs, S., & Milo, R. (2016). Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLOS Biology*, *14*(8), e1002533. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533

Séne, S., Selosse, M.-A., Forget, M., Lambourdière, J., Cissé, K., Diédhiou, A. G., Rivera-Ocasio, E., Kodja, H., Kameyama, N., Nara, K., Vincenot, L., Mansot, J.-L., Weber, J., Roy, M., Sylla, S. N., & Bâ, A. (2018). A pantropically introduced tree is followed by specific ectomycorrhizal symbionts due to pseudo-vertical transmission. *The ISME Journal*, *12*(7), Article 7. https://doi.org/10.1038/s41396-018-0088-y

Shapira, M. (2016). Gut Microbiotas and Host Evolution : Scaling Up Symbiosis. *Trends in Ecology & Evolution*, *31*(7), 539-549. https://doi.org/10.1016/j.tree.2016.03.006

Shemesh, H., Bruns, T. D., Peay, K. G., Kennedy, P. G., & Nguyen, N. H. (2023). Changing balance between dormancy and mortality determines the trajectory of ectomycorrhizal fungal spore longevity over a 15-yr burial experiment. *New Phytologist*, *238*(1), 11-15. https://doi.org/10.1111/nph.18677

Shenhav, L., Thompson, M., Joseph, T. A., Briscoe, L., Furman, O., Bogumil, D., Mizrahi, I., Pe'er, I., & Halperin, E. (2019). FEAST : Fast expectation-maximization for microbial source tracking. *Nature Methods*, *16*(7), Article 7. https://doi.org/10.1038/s41592-019-0431-x

Sieber, M., Pita, L., Weiland-Bräuer, N., Dirksen, P., Wang, J., Mortzfeld, B., Franzenburg, S., Schmitz, R. A., Baines, J. F., Fraune, S., Hentschel, U., Schulenburg, H., Bosch, T. C. G., & Traulsen, A. (2019). Neutrality in the Metaorganism. *PLOS Biology*, *17*(6), e3000298. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000298

Simon, L., Lalonde, M., & Bruns, T. D. (1992). Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Applied and Environmental Microbiology*, *58*(1), 291-295. https://doi.org/10.1128/aem.58.1.291-295.1992

Simonin, M., Briand, M., Chesneau, G., Rochefort, A., Marais, C., Sarniguet, A., & Barret, M. (2022). Seed microbiota revealed by a large-scale meta-analysis including 50 plant species. *New Phytologist*, *234*(4), 1448-1463. https://doi.org/10.1111/nph.18037

Simonin, M., Préveaux, A., Marais, C., Garin, T., Arnault, G., Sarniguet, A., & Barret, M. (2023). Transmission of synthetic seed bacterial communities to radish seedlings : Impact on microbiota assembly and plant phenotype. *Peer Community Journal*, *3*. https://doi.org/10.24072/pcjournal.329

Sinanaj, B., Hoysted, G. A., Pressel, S., Bidartondo, M. I., & Field, K. J. (2021). Critical research challenges facing Mucoromycotina 'fine root endophytes'. *New Phytologist*, *232*(4), 1528-1534. https://doi.org/10.1111/nph.17684

Sinclair, W. A., Sylvia, D. M., & Larsen, A. O. (1982). Disease Suppression and Growth Promotion in Douglas-fir Seedlings by the Ectomycorrhizal Fungus *Laccaria laccata*. *Forest Science*, *28*(2), 191-201. https://doi.org/10.1093/forestscience/28.2.191

Slatko, B. E., Gardner, A. F., & Ausubel, F. M. (2018). Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Current Protocols in Molecular Biology*, *122*(1), e59. https://doi.org/10.1002/cpmb.59

Smith, G. R., Finlay, R. D., Stenlid, J., Vasaitis, R., & Menkis, A. (2017). Growing evidence for facultative biotrophy in saprotrophic fungi : Data from microcosm tests with 201 species of wood-decay basidiomycetes. *New Phytologist*, *215*(2), 747-755. https://doi.org/10.1111/nph.14551

Smith, S. E., & Read, D. J. (2009). *Mycorrhizal symbiosis* (3. ed., Repr). Elsevier/Acad. Press.

Soudzilovskaia, N. A., Vaessen, S., Barcelo, M., He, J., Rahimlou, S., Abarenkov, K., Brundrett, M. C., Gomes, S. I. F., Merckx, V., & Tedersoo, L. (2020). FungalRoot : Global online database of plant mycorrhizal associations. *New Phytologist*, *227*(3), 955-966. https://doi.org/10.1111/nph.16569

Splivallo, R., Deveau, A., Valdez, N., Kirchhoff, N., Frey-Klett, P., & Karlovsky, P. (2015). Bacteria associated with truffle-fruiting bodies contribute to truffle aroma. *Environmental Microbiology* (Vol. 17, Numéro 8, p. 2647-2660). Wiley. https://doi.org/10.1111/1462-2920.12521

Splivallo, R., Novero, M., Bertea, C. M., Bossi, S., & Bonfante, P. (2007). Truffle volatiles inhibit growth and induce an oxidative burst in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, *175*(3), 417-424. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02141.x

Splivallo, R., Valdez, N., Kirchhoff, N., Ona, M. C., Schmidt, J., Feussner, I., & Karlovsky, P. (2012). Intraspecific genotypic variability determines concentrations of key truffle volatiles. *New Phytologist*, *194*(3), 823-835. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04077.x

Stajich, J. E. (2017). Fungal Genomes and Insights into the Evolution of the Kingdom. *Microbiology Spectrum*, *5*(4). 10.1128/microbiolspec.funk-0055-2016. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0055-2016

Staley, J. T., & Konopka, A. (1985). Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annual Review of Microbiology*, *39*(1), 321-346. https://doi.org/10.1146/annurev.mi.39.100185.001541

Staniczenko, P. P. A., Kopp, J. C., & Allesina, S. (2013). The ghost of nestedness in ecological networks. *Nature Communications*, *4*(1), Article 1. https://doi.org/10.1038/ncomms2422

Staubli, F., Imola, L., Dauphin, B., Molinier, V., Pfister, S., Piñuela, Y., Schürz, L., Sproll, L., Steidinger, B. S., Stobbe, U., Tegel, W., Büntgen, U., Egli, S., & Peter, M. (2022). Hidden fairy rings and males—Genetic patterns of natural Burgundy truffle (*Tuber aestivum* Vittad.) populations reveal new insights into its life cycle. *Environmental Microbiology*, *n/a*(n/a). https://doi.org/10.1111/1462-2920.16131

Streiblová, E., Gryndlerová, H., & Gryndler, M. (2012). Truffle brûlé : An efficient fungal life strategy. *FEMS Microbiology Ecology*, *80*(1), 1-8. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01283.x

Strullu-Derrien, C., Kenrick, P., Pressel, S., Duckett, J. G., Rioult, J.-P., & Strullu, D.-G. (2014). Fungal associations in *Horneophyton ligneri* from the Rhynie Chert (c. 407 million year old) closely resemble those in extant lower land plants : Novel insights into ancestral plant–fungus symbioses. *New Phytologist*, *203*(3), 964-979. https://doi.org/10.1111/nph.12805

Strullu-Derrien, C., Selosse, M.-A., Kenrick, P., & Martin, F. M. (2018). The origin and evolution of mycorrhizal symbioses : From palaeomycology to phylogenomics. *New Phytologist*, *220*(4), 1012-1030. https://doi.org/10.1111/nph.15076

Taffner, J., Erlacher, A., Bragina, A., Berg, C., Moissl-Eichinger, C., & Berg, G. (2018). What Is the Role of Archaea in Plants? New Insights from the Vegetation of Alpine Bogs. *mSphere*, *3*(3), 10.1128/msphere.00122-18. https://doi.org/10.1128/msphere.00122-18

Talbot, J. M., Bruns, T. D., Taylor, J. W., Smith, D. P., Branco, S., Glassman, S. I., Erlandson, S., Vilgalys, R., Liao, H.-L., Smith, M. E., & Peay, K. G. (2014). Endemism and functional convergence across the North American soil mycobiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(17), 6341-6346. https://doi.org/10.1073/pnas.1402584111

Taniguchi, T., Kitajima, K., Douhan, G. W., Yamanaka, N., & Allen, M. F. (2018). A pulse of summer precipitation after the dry season triggers changes in ectomycorrhizal formation, diversity, and community composition in a Mediterranean forest in California, USA. *Mycorrhiza*, *28*(7), 665-677. https://doi.org/10.1007/s00572-018-0859-3

Taschen, E., Callot, G., Savary, P., Sauve, M., Penuelas-samaniego, Y., Rousset, F., Parlade, X., Selosse, M.-A., & Richard, F. (2022). Efficiency of the traditional practice of traps to stimulate black truffle production, and its ecological mechanisms. *Scientific Reports*, *12*(1), Article 1. https://doi.org/10.1038/s41598-022-19962-3

Taschen, E., Rousset, F., Sauve, M., Benoit, L., Dubois, M.-P., Richard, F., & Selosse, M.-A. (2016). How the truffle got its mate : Insights from genetic structure in spontaneous and planted Mediterranean populations of *Tuber melanosporum*. *Molecular Ecology*, *25*(22), 5611-5627. https://doi.org/10.1111/mec.13864

Taschen, E., Sauve, M., Taudiere, A., Parlade, J., Selosse, M.-A., & Richard, F. (2015). Whose truffle is this? Distribution patterns of ectomycorrhizal fungal diversity in *T uber melanosporum* brûlés developed in multi-host Mediterranean plant communities: Ectomycorrhizal diversity on Tuber melanosporum brûlés. *Environmental Microbiology*, *17*(8), 2747-2761. https://doi.org/10.1111/1462-2920.12741

Taschen, E., Sauve, M., Vincent, B., Parladé, J., van Tuinen, D., Aumeeruddy-Thomas, Y., Assenat, B., Selosse, M.-A., & Richard, F. (2020). Insight into the truffle brûlé : Tripartite interactions between the black truffle (*Tuber melanosporum*), holm oak (*Quercus ilex*) and arbuscular mycorrhizal plants. *Plant and Soil*, *446*(1-2), 577-594. https://doi.org/10.1007/s11104-019-04340-2

Taylor, J. W., Hann-Soden, C., Branco, S., Sylvain, I., & Ellison, C. E. (2015). Clonal reproduction in fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(29), 8901-8908. https://doi.org/10.1073/pnas.1503159112

Tedersoo, L., Bahram, M., Põlme, S., Kõljalg, U., Yorou, N. S., Wijesundera, R., Ruiz, L. V., Vasco-Palacios, A. M., Thu, P. Q., Suija, A., Smith, M. E., Sharp, C., Saluveer, E., Saitta, A., Rosas, M., Riit, T., Ratkowsky, D., Pritsch, K., Põldmaa, K., … Abarenkov, K. (2014). Global diversity and geography of soil fungi. *Science*, *346*(6213), 1256688. https://doi.org/10.1126/science.1256688

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*(10), 2769-2795. https://doi.org/10.1111/mec.16460

Tedersoo, L., & Brundrett, M. C. (2017). Evolution of Ectomycorrhizal Symbiosis in Plants. In L. Tedersoo (Éd.), *Biogeography of Mycorrhizal Symbiosis* (p. 407-467). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-56363-3_19

Tedersoo, L., Hansen, K., Perry, B. A., & Kjøller, R. (2006). Molecular and morphological diversity of pezizalean ectomycorrhiza. *New Phytologist*, *170*(3), 581-596. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01678.x

Tedersoo, L., Mett, M., Ishida, T. A., & Bahram, M. (2013). Phylogenetic relationships among host plants explain differences in fungal species richness and community composition in ectomycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*, *199*(3), 822-831. https://doi.org/10.1111/nph.12328

Tedersoo, L., & Smith, M. E. (2013). Lineages of ectomycorrhizal fungi revisited : Foraging strategies and novel lineages revealed by sequences from belowground. *Fungal Biology Reviews*, *27*(3), 83-99. https://doi.org/10.1016/j.fbr.2013.09.001

Tedersoo, L., Tooming-Klunderud, A., & Anslan, S. (2018). PacBio metabarcoding of Fungi and other eukaryotes : Errors, biases and perspectives. *New Phytologist*, *217*(3), 1370-1385. https://doi.org/10.1111/nph.14776

Teste, F. P., Jones, M. D., & Dickie, I. A. (2020). Dual-mycorrhizal plants : Their ecology and relevance. *New Phytologist*, *225*(5), 1835-1851. https://doi.org/10.1111/nph.16190

Thiergart, T., Durán, P., Ellis, T., Vannier, N., Garrido-Oter, R., Kemen, E., Roux, F., Alonso-Blanco, C., Ågren, J., Schulze-Lefert, P., & Hacquard, S. (2020). Root microbiota assembly and adaptive differentiation among European *Arabidopsis* populations. *Nature Ecology & Evolution*, *4*(1), Article 1. https://doi.org/10.1038/s41559-019-1063-3

Thiers, H. D. (1984). The Secotioid Syndrome. *Mycologia*, *76*(1), 1-8. https://doi.org/10.1080/00275514.1984.12023803

Thoen, E., Harder, C. B., Kauserud, H., Botnen, S. S., Vik, U., Taylor, A. F. S., Menkis, A., & Skrede, I. (2020). In vitro evidence of root colonization suggests ecological versatility in the genus *Mycena*. *New Phytologist*, *227*(2), 601-612. https://doi.org/10.1111/nph.16545

Thompson, L. R., Sanders, J. G., McDonald, D., Amir, A., Ladau, J., Locey, K. J., Prill, R. J., Tripathi, A., Gibbons, S. M., Ackermann, G., Navas-Molina, J. A., Janssen, S., Kopylova, E., Vázquez-Baeza, Y., González, A., Morton, J. T., Mirarab, S., Zech Xu, Z., Jiang, L., … Knight, R. (2017). A communal catalogue reveals Earth's multiscale microbial diversity. *Nature*, *551*(7681), Article 7681. https://doi.org/10.1038/nature24621

Tintjer, T., Leuchtmann, A., & Clay, K. (2008). Variation in horizontal and vertical transmission of the endophyte *Epichloë elymi* infecting the grass *Elymus hystrix*. *New Phytologist*, *179*(1), 236-246. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02441.x

Titus, J. H., Nowak, R. S., & Smith, S. D. (2002). Soil resource heterogeneity in the Mojave Desert. *Journal of Arid Environments*, *52*(3), 269-292. https://doi.org/10.1006/jare.2002.1010

Tkacz, A., Bestion, E., Bo, Z., Hortala, M., & Poole, P. S. (2020). Influence of Plant Fraction, Soil, and Plant Species on Microbiota : A Multikingdom Comparison. *mBio*, *11*(1), 10.1128/mbio.02785-19. https://doi.org/10.1128/mbio.02785-19

Todesco, F., Belmondo, S., Guignet, Y., Laurent, L., Fizzala, S., Le Tacon, F., & Murat, C. (2019). Soil temperature and hydric potential influences the monthly variations of soil *Tuber aestivum* DNA in a highly productive orchard. *Scientific Reports*, *9*(1), 12964. https://doi.org/10.1038/s41598-019-49602-2

Toju, H., Guimarães, P. R., Olesen, J. M., & Thompson, J. N. (2014). Assembly of complex plant–fungus networks. *Nature Communications*, *5*(1), Article 1. https://doi.org/10.1038/ncomms6273

Toju, H., & Sato, H. (2018). Root-Associated Fungi Shared Between Arbuscular Mycorrhizal and Ectomycorrhizal Conifers in a Temperate Forest. *Frontiers in Microbiology*, *9*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00433

Toju, H., Sato, H., Yamamoto, S., & Tanabe, A. S. (2018). Structural diversity across arbuscular mycorrhizal, ectomycorrhizal, and endophytic plant–fungus networks. *BMC Plant Biology*, *18*(1), 292. https://doi.org/10.1186/s12870-018-1500-5

Toju, H., Tanabe, A. S., & Ishii, H. S. (2016). Ericaceous plant–fungus network in a harsh alpine–subalpine environment. *Molecular Ecology*, *25*(13), 3242-3257. https://doi.org/10.1111/mec.13680

Toju, H., Yamamoto, S., Sato, H., & Tanabe, A. S. (2013). Sharing of Diverse Mycorrhizal and Root-Endophytic Fungi among Plant Species in an Oak-Dominated Cool–Temperate Forest. *PLOS ONE*, *8*(10), e78248. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078248

Toju, H., Yamamoto, S., Sato, H., Tanabe, A. S., Gilbert, G. S., & Kadowaki, K. (2013). Community composition of root-associated fungi in a *Quercus* -dominated temperate forest : "Co-dominance" of mycorrhizal and root-endophytic fungi. *Ecology and Evolution*, *3*(5), 1281-1293. https://doi.org/10.1002/ece3.546

Torrecillas, E., Alguacil, M. M., & Roldán, A. (2012). Host Preferences of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Colonizing Annual Herbaceous Plant Species in Semiarid Mediterranean Prairies. *Applied and Environmental Microbiology*, *78*(17), 6180-6186. https://doi.org/10.1128/AEM.01287-12

Trappe, J. M. (2005). A.B. Frank and mycorrhizae : The challenge to evolutionary and ecologic theory. *Mycorrhiza*, *15*(4), 277-281. https://doi.org/10.1007/s00572-004-0330-5

Trappe, J. M., Claridge, A. W., Arora, D., & Smit, W. A. (2008). Desert Truffles of the African Kalahari : Ecology, Ethnomycology, and Taxonomy. *Economic Botany*, *62*(3), 521-529. https://doi.org/10.1007/s12231-008-9027-6

Trappe, J. M., Claridge, A. W., Claridge, D. L., & Liddle, L. (2008). Desert Truffles of the Australian Outback : Ecology, Ethnomycology, and Taxonomy. *Economic Botany*, *62*(3), 497-506. https://doi.org/10.1007/s12231-008-9041-8

Tringe, S. G., & Hugenholtz, P. (2008). A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. *Current Opinion in Microbiology*, *11*(5), 442-446. https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.09.011

Trivedi, P., Leach, J. E., Tringe, S. G., Sa, T., & Singh, B. K. (2020). Plant–microbiome interactions : From community assembly to plant health. *Nature Reviews Microbiology*, *18*(11), Article 11. https://doi.org/10.1038/s41579-020-0412-1

Trouvelot, A., Kough, J. L., & Gianinazzi-Pearson, V. (1986). Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système radiculaire. Recherche de methods d'estimation ayantune signification function elle. *Physiological and genetical aspects of mycorrhizae", Gianinazzi-Pearson, V. y S. Gianinazzi, Eds., INRA, Paris*, 101-109.

Turnbull, M. H., Goodall, R., & Stewart, G. R. (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*(12), 1386-1394. https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1995.tb00199.x

Turner, T. R., James, E. K., & Poole, P. S. (2013). The plant microbiome. *Genome Biology*, *14*(6), 209. https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-6-209

Udvardi, M., & Poole, P. S. (2013). Transport and Metabolism in Legume-Rhizobia Symbioses. *Annual Review of Plant Biology*, *64*(1), 781-805. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312120235

U'Ren, J. M., Lutzoni, F., Miadlikowska, J., Zimmerman, N. B., Carbone, I., May, G., & Arnold, A. E. (2019). Host availability drives distributions of fungal endophytes in the imperilled boreal realm. *Nature Ecology & Evolution*, *3*(10), Article 10. https://doi.org/10.1038/s41559-019-0975-2

Vági, P., Knapp, D. G., Kósa, A., Seress, D., Horváth, Á. N., & Kovács, G. M. (2014). Simultaneous specific in planta visualization of root-colonizing fungi using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Mycorrhiza*, *24*(4), 259-266. https://doi.org/10.1007/s00572-013-0533-8

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*(4), 1406-1423. https://doi.org/10.1111/nph.13288

van der Linde, S., Suz, L. M., Orme, C. D. L., Cox, F., Andreae, H., Asi, E., Atkinson, B., Benham, S., Carroll, C., Cools, N., De Vos, B., Dietrich, H.-P., Eichhorn, J., Gehrmann, J., Grebenc, T., Gweon, H. S., Hansen, K., Jacob, F., Kristöfel, F., … Bidartondo, M. I. (2018). Environment and host as large-scale controls of ectomycorrhizal fungi. *Nature*, *558*(7709), Article 7709. https://doi.org/10.1038/s41586-018-0189-9

Vandenkoornhuyse, P. (2002). Extensive Fungal Diversity in Plant Roots. *Science*, *295*(5562), 2051-2051. https://doi.org/10.1126/science.295.5562.2051

Vandenkoornhuyse, P., Quaiser, A., Duhamel, M., Van, A. L., & Dufresne, A. (2015). The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytologist*, *206*(4), 1196-1206. https://doi.org/10.1111/nph.13312

Vanegas-León, M. L., Sulzbacher, M. A., Rinaldi, A. C., Roy, M., Selosse, M.-A., & Neves, M. A. (2019). Are Trechisporales ectomycorrhizal or non-mycorrhizal root endophytes? *Mycological Progress*, *18*(9), 1231-1240. https://doi.org/10.1007/s11557-019-01519-w

Vannier, N., Mony, C., Bittebiere, A.-K., Michon-Coudouel, S., Biget, M., & Vandenkoornhuyse, P. (2018). A microorganisms' journey between plant generations. *Microbiome*, *6*(1), 79. https://doi.org/10.1186/s40168-018-0459-7

van Rhijn, P., & Vanderleyden, J. (1995). The Rhizobium-plant symbiosis. *Microbiological Reviews*, *59*(1), 124-142. https://doi.org/10.1128/mr.59.1.124-142.1995

Vargas-Gastélum, L., Romero-Olivares, A. L., Escalante, A. E., Rocha-Olivares, A., Brizuela, C., & Riquelme, M. (2015). Impact of seasonal changes on fungal diversity of a semi-arid ecosystem revealed by 454 pyrosequencing. *FEMS Microbiology Ecology*, *91*(5). https://doi.org/10.1093/femsec/fiv044

Vellend, M. (2010). Conceptual Synthesis in Community Ecology. *The Quarterly Review of Biology*, *85*(2), 183-206. https://doi.org/10.1086/652373

Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P., Ballew, R. M., Huson, D. H., Wortman, J. R., Zhang, Q., Kodira, C. D., Zheng, X. H., Chen, L., … Zhu, X. (2001). The Sequence of the Human Genome. *Science*, *291*(5507), 1304-1351. https://doi.org/10.1126/science.1058040

Vergara, C., Araujo, K. E. C., Urquiaga, S., Schultz, N., Balieiro, F. de C., Medeiros, P. S., Santos, L. A., Xavier, G. R., & Zilli, J. E. (2017). Dark Septate Endophytic Fungi Help Tomato to Acquire Nutrients from Ground Plant Material. *Frontiers in Microbiology*, *8*. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.02437

Větrovský, T., Kolaříková, Z., Lepinay, C., Awokunle Hollá, S., Davison, J., Fleyberková, A., Gromyko, A., Jelínková, B., Kolařík, M., Krüger, M., Lejsková, R., Michalčíková, L., Michalová, T., Moora, M., Moravcová, A., Moulíková, Š., Odriozola, I., Öpik, M., Pappová, M., … Kohout, P. (2023). GlobalAMFungi : A global database of arbuscular mycorrhizal fungal occurrences from high-throughput sequencing metabarcoding studies. *New Phytologist*, *240*(5), 2151-2163. https://doi.org/10.1111/nph.19283

Vieira, M. L. C., Santini, L., Diniz, A. L., & Munhoz, C. de F. (2016). Microsatellite markers : What they mean and why they are so useful. *Genetics and Molecular Biology*, *39*(3), 312-328. https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-20160027

Vincenot, L., & Selosse, M.-A. (2017). Population Biology and Ecology of Ectomycorrhizal Fungi. In L. Tedersoo (Éd.), *Biogeography of Mycorrhizal Symbiosis* (Vol. 230, p. 39-59). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-56363-3_2

Vincent, J. B., Weiblen, G. D., & May, G. (2016). Host associations and beta diversity of fungal endophyte communities in New Guinea rainforest trees. *Molecular Ecology*, *25*(3), 825-841. https://doi.org/10.1111/mec.13510

Walsh, C. M., Becker-Uncapher, I., Carlson, M., & Fierer, N. (2021). Variable influences of soil and seed-associated bacterial communities on the assembly of seedling microbiomes. *The ISME Journal*, *15*(9), Article 9. https://doi.org/10.1038/s41396-021-00967-1

Wang, B., & Qiu, Y.-L. (2006). Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza*, *16*(5), 299-363. https://doi.org/10.1007/s00572-005-0033-6

Wang, D., Trimbos, K. B., Gomes, S. I. F., Jacquemyn, H., & Merckx, V. S. F. T. (s. d.). Metabarcoding read abundances of orchid mycorrhizal fungi are correlated to copy numbers estimated using ddPCR. *New Phytologist*, *n/a*(n/a). https://doi.org/10.1111/nph.19385

Wang, L., Zhang, L., George, T. S., & Feng, G. (2022). A core microbiome in the hyphosphere of arbuscular mycorrhizal fungi has functional significance in organic phosphorus mineralization. *New Phytologist*, *n/a*(n/a). https://doi.org/10.1111/nph.18642

Wang, Y., Wang, C., Gu, Y., Wang, P., Song, W., Ma, J., & Yang, X. (2020). The variability of bacterial communities in both the endosphere and ectosphere of different niches in Chinese chives (*Allium tuberosum*). *PLOS ONE*, *15*(1), e0227671. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227671

Wang, Z., Binder, M., Schoch, C. L., Johnston, P. R., Spatafora, J. W., & Hibbett, D. S. (2006). Evolution of helotialean fungi (Leotiomycetes, Pezizomycotina) : A nuclear rDNA phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *41*(2), 295-312. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.05.031

Watson, J. D., & Crick, F. H. C. (1953a). Molecular Structure of Nucleic Acids : A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*, *171*(4356), 737-738. https://doi.org/10.1038/171737a0

Watson, J. D., & Crick, F. H. C. (1953b). The Structure of Dna. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, *18*, 123-131. https://doi.org/10.1101/SQB.1953.018.01.020

Wearn, J. A., Sutton, B. C., Morley, N. J., & Gange, A. C. (2012). Species and organ specificity of fungal endophytes in herbaceous grassland plants. *Journal of Ecology*, *100*(5), 1085-1092. https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2012.01997.x

Weiß, M., Sýkorová, Z., Garnica, S., Riess, K., Martos, F., Krause, C., Oberwinkler, F., Bauer, R., & Redecker, D. (2011). Sebacinales Everywhere : Previously Overlooked Ubiquitous Fungal Endophytes. *PLOS ONE*, *6*(2), e16793. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016793

Weiß, M., Waller, F., Zuccaro, A., & Selosse, M.-A. (2016). Sebacinales – one thousand and one interactions with land plants. *New Phytologist*, *211*(1), 20-40. https://doi.org/10.1111/nph.13977

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols* (p. 315-322). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1

Whitlock, R. (2014). Relationships between adaptive and neutral genetic diversity and ecological structure and functioning : A meta-analysis. *Journal of Ecology*, *102*(4), 857-872. https://doi.org/10.1111/1365-2745.12240

Wiens, J. J. (2021). Vast (but avoidable) under-estimation of global biodiversity. *PLOS Biology*, *19*(8), e3001192. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001192

Wilkinson, D. M. (1997). The Role of Seed Dispersal in the Evolution of Mycorrhizae. *Oikos*, *78*(2), 394-396. https://doi.org/10.2307/3546308

Wilkinson, D. M., & Sherratt, T. N. (2001). Horizontally acquired mutualisms, an unsolved problem in ecology? *Oikos*, *92*(2), 377-384. https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2001.920222.x

Wilson, D. (1995a). Endophyte : The Evolution of a Term, and Clarification of Its Use and Definition. *Oikos*, *73*(2), 274-276. https://doi.org/10.2307/3545919

Wilson, D. (1995b). Endophyte : The Evolution of a Term, and Clarification of Its Use and Definition. *Oikos*, *73*(2), 274. https://doi.org/10.2307/3545919

Wipf, D., Krajinski, F., Tuinen, D. van, Recorbet, G., & Courty, P.-E. (2019). Trading on the arbuscular mycorrhiza market : From arbuscules to common mycorrhizal networks. *New Phytologist*, *223*(3), 1127-1142. https://doi.org/10.1111/nph.15775

Woese, C. R., & Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain : The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *74*(11), 5088-5090. https://doi.org/10.1073/pnas.74.11.5088

Xia, Y., Sun, J., & Chen, D.-G. (2018). *Statistical Analysis of Microbiome Data with R*. Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1534-3

Xie, L., Bi, Y., Ma, S., Shang, J., Hu, Q., & Christie, P. (2021). Combined inoculation with dark septate endophytes and arbuscular mycorrhizal fungi : Synergistic or competitive growth effects on maize? *BMC Plant Biology*, *21*(1), 498. https://doi.org/10.1186/s12870-021-03267-0

Xiong, C., Zhu, Y.-G., Wang, J.-T., Singh, B., Han, L.-L., Shen, J.-P., Li, P.-P., Wang, G.-B., Wu, C.-F., Ge, A.-H., Zhang, L.-M., & He, J.-Z. (2021). Host selection shapes crop microbiome assembly and network complexity. *New Phytologist*, *229*(2), 1091-1104. https://doi.org/10.1111/nph.16890

Yakti, W., Kovács, G. M., Vági, P., & Franken, P. (2018). Impact of dark septate endophytes on tomato growth and nutrient uptake. *Plant Ecology & Diversity*, *11*(5-6), 637-648. https://doi.org/10.1080/17550874.2019.1610912

Yang, B., Wang, Y., & Qian, P.-Y. (2016). Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics*, *17*(1), 135. https://doi.org/10.1186/s12859-016-0992-y

York, L. M., Carminati, A., Mooney, S. J., Ritz, K., & Bennett, M. J. (2016). The holistic rhizosphere : Integrating zones, processes, and semantics in the soil influenced by roots. *Journal of Experimental Botany*, *67*(12), 3629-3643. https://doi.org/10.1093/jxb/erw108

Yung, L., Bertheau, C., Tafforeau, F., Zappelini, C., Valot, B., Maillard, F., Selosse, M.-A., Viotti, C., Binet, P., Chiapusio, G., & Chalot, M. (2021). Partial overlap of fungal communities associated with nettle and poplar roots when co-occurring at a trace metal contaminated site. *Science of The Total Environment*, *782*, 146692. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146692

Zambonelli, A., & Bonito, G. M. (Éds.). (2012). *Edible ectomycorrhizal mushrooms : Current knowledge and future prospects*. Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-33823-6

Zambonelli, A., Iotti, M., & Murat, C. (Éds.). (2016). *True Truffle (Tuber spp.) in the World : Soil Ecology, Systematics and Biochemistry* (Vol. 47). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-31436-5

Zhou, Y., Li, X., Gao, Y., Liu, H., Gao, Y.-B., van der Heijden, M. G. A., & Ren, A.-Z. (2018). Plant endophytes and arbuscular mycorrhizal fungi alter plant competition. *Functional Ecology*, *32*(5), 1168-1179. https://doi.org/10.1111/1365-2435.13084

Zilber-Rosenberg, I., & Rosenberg, E. (2008). Role of microorganisms in the evolution of animals and plants : The hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiology Reviews*, *32*(5), 723-735. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00123.x

Zitouni-Haouar, F. E.-H., Bidartondo, M. I., Moreno, G., Carlavilla, J. R., Manjón, J. L., Neggaz, S., & Zitouni-Nourine, S. H. (2023). Bioclimatic Origin Shapes Phylogenetic Structure of Tirmania (Pezizaceae) : New Species and New Record from North Africa. *Journal of Fungi*, *9*(5), Article 5. https://doi.org/10.3390/jof9050532

Zuccaro, A., Lahrmann, U., Güldener, U., Langen, G., Pfiffi, S., Biedenkopf, D., Wong, P., Samans, B., Grimm, C., Basiewicz, M., Murat, C., Martin, F., & Kogel, K.-H. (2011). Endophytic Life Strategies Decoded by Genome and Transcriptome Analyses of the Mutualistic Root Symbiont *Piriformospora indica*. *PLOS Pathogens*, *7*(10), e1002290. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002290

Résumé

Les plantes vivent en interaction avec une multitude de microorganismes qui sont indispensables à leur développement. Parmi ces microorganismes, les champignons jouent un rôle central : certains forment les mycorhizes, des organes mixtes permettant entre autres d'assurer la nutrition des plantes. D'autres champignons, qualifiés d'endophytes, colonisent de manière plus diffuse les tissus des plantes et leurs interactions avec les plantes varient de l'amensalisme au commensalisme. Malgré l'importance des communautés fongiques associées aux plantes, les facteurs et processus influençant leur assemblage sont encore mal connus.

Au cours de cette thèse, nous avons cherché à mieux comprendre comment s'assemblent les communautés fongiques associées aux plantes (mycobiote) en milieux désertiques et tempérés. En milieu désertique, nous avons ainsi montré que la distribution spatiale des microorganismes du sol était liée à la présence d'espèces pérennes, distribuées en îlots de fertilité. En étudiant *Haloxylon salicornicum* comme modèle de plante pérenne, nous avons montré que le sol était un réservoir majeur du mycobiote (transmission horizontale) et que certains champignons étaient transmis par les graines (transmission verticale), en particulier chez les jeunes individus. Dans des écosystèmes tempérés présentant des communautés végétales plus denses et diverses, nous avons démontré que certains champignons ectomycorhiziens (*e.g.*, *Russula* spp.) sont également capables de coloniser les racines de plantes non-ectomycorhiziennes voisines en tant qu'endophytes, suggérant une influence de des communautés végétales sur l'assemblage du mycobiote racinaire. Finalement, l'étude des communautés microbiennes des racines d'*Helianthemum lippii* en milieu désertique nous a permis d'identifier des sites producteurs de truffes du désert (*Tirmania nivea*) mais également de mettre en évidence une potentielle double colonisation ectendomycorhizienne atypique.

Nous avons ainsi mis en évidence que l'assemblage des communautés fongiques associées aux plantes dépend des conditions édaphiques, de la composition des communautés végétales et des voies de transmission des champignons qui varient en fonction du développement des plantes. Les résultats obtenus suggèrent également que l'écologie des interactions entre plantes et champignons est quelque fois préjugée au regard de l'identité taxonomique des partenaires étudiés.

Abstract

Plants interact with diverse microorganisms that are essential to their development. Among these, fungi play a central role: some form mycorrhizae, symbiotic associations that, among other things, ensure plant nutrition. Other fungi, known as endophytes, loosely colonize plant tissues, and their interactions with plants range from amensalism to commensalism. Despite the importance plant-associated fungal communities, the factors and processes influencing their assembly are still poorly understood.

During the course of this thesis, we sought to gain a better understanding of how plant-associated fungal communities (mycobiota) assemble in desert and temperate environments. In desert environments, we have shown that the spatial distribution of soil microorganisms is linked to the presence of perennial species, distributed in fertility islands. By studying *Haloxylon salicornicum* as a perennial plant model, we showed that the soil was a major reservoir of mycobiota (horizontal transmission) and that some fungi were transmitted by seeds (vertical transmission), particularly in young individuals. In temperate ecosystems with denser and more diverse plant communities, we have demonstrated that some ectomycorrhizal fungi (*e.g.*, Russula spp.) are also capable of colonizing the roots of neighbouring non-ectomycorrhizal plants as endophytes, suggesting an influence of plant communities on root mycobiota assembly. Finally, the study of root microbial communities of *Helianthemum lippii* in desert environments enabled us to identify sites producing desert truffles (*Tirmania nivea*), but also to highlight a potential atypical double ectendomycorrhizal colonization.

We have thus demonstrated that the assembly of fungal communities associated with plants depends on edaphic conditions, the composition of plant communities and fungal transmission pathways varying according to plant development. Our results also suggest that the ecology of plant-fungi interactions is sometimes prejudged according to the taxonomic identity of the studied partners.