

La face cachée du Creux du Van : présence des endophytes racinaires *Phialocephala fortinii* s.l. et *Acephala applanata* sur le pergélisol du Creux du Van

Autor(en): **Queloz, Valentin**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Actes de la Société jurassienne d'émulation**

Band (Jahr): **110 (2007)**

PDF erstellt am: **21.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-684629>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

La face cachée du Creux du Van

Présence des endophytes racinaires
Phialocephala fortinii s.l. et *Acephala applanata*
sur le pergélisol du Creux du Van

Valentin Queloz

Résultats extraits du travail de diplôme de Valentin Queloz, déposé en février 2006 pour l'obtention du titre d'ingénieur forestier diplômé ETHZ.

Introduction

La plupart des plantes à fleurs sont colonisées par des mycorrhizes. Le terme mycorrhize représente une symbiose entre une racine et un champignon. Le champignon permet à la plante d'atteindre plus facilement l'eau et les éléments nutritifs contenus dans le sol, protège cette dernière contre les micro-organismes pathogènes et produit des métabolites utiles à celle-ci. En contrepartie, la plante fournit au champignon les hydrates de carbone dont il a besoin pour vivre. Ecologiquement, les mycorrhizes sont cependant restreintes aux racines fines non lignifiées. Un autre groupe de micro-organismes bien moins connu que les mycorrhizes est capable de coloniser les tissus racinaires lignifiés: il s'agit des endophytes foncés à septes (dark, septate endophytes; DSE). Ces ascomycètes mélanisés appartenant à l'ordre des Héliotiales sont très fréquents dans les racines de conifères. Ils sont en outre capables de coloniser les racines de plus de six cents espèces végétales appartenant à cent quarante-quatre familles taxonomiques¹. Les DSE font partie des endophytes racinaires les plus répandus. Il n'y a très vraisemblablement aucun épicéa (*Picea abies*) dans les forêts suisses et européennes qui ne soit colonisé par les DSE. La plupart des DSE appartiennent au complexe d'espèces de *P. fortinii* s.l.. Aucune forme sexuée de *P. fortinii* s.l. n'a été découverte à ce jour. Le complexe d'espèces est cependant très divers et formé par de nombreuses espèces cryptiques²⁻⁴. En plus de l'espèce à part entière *Acephala applanata*, sept autres espèces cryptiques

ont été décrites par des méthodes de biologie moléculaire⁵. In vitro, certaines espèces appartenant au complexe d'espèces de *P. fortinii* s.l. sont capables de se reproduire de manière asexuée. Ceci par le biais de deux méthodes: les conidies et les microsclérotés. Il est impossible aujourd'hui de décrire avec précision le mode de dissémination de ce complexe d'espèces. Cependant, il apparaît clairement que les microsclérotés seraient plus à même de jouer un rôle dans la dissémination de *P. fortinii* s.l.^{6,7} que les conidies produites en petit nombre et dont aucune germination n'a jamais été observée. Malgré l'absence apparente d'un cycle sexué, la variabilité génétique de *P. fortinii* s.l. s'avère très élevée. Jumponnen et al.⁸ ont découvert près de vingt-trois individus (RAPD) sur le front d'un glacier. Des résultats similaires ont été démontrés dans une pessière des environs de Zurich: près de vingt et une empreintes génétiques (ISSR-PCR) différentes détectées sur une surface de 9 m²⁹. Queloz et al.¹⁰ ont démontré sur la même surface d'essai que la distribution spatiale des haplotypes multigéniques de *P. fortinii* s.l. est stable sur une période d'au moins trois ans. Il semble qu'il y ait recombinaison génétique à l'intérieur des espèces cryptiques, car l'index d'association n'affiche pas de valeurs significativement différentes de zéro^{3,11}. De manière intéressante, Grünig et al.¹¹ ont démontré récemment que les communautés de *P. fortinii* s.l. issues de deux pessières primaires de Suisse diffèrent significativement des communautés étudiées précédemment dans les pessières exploitées. Comme les deux communautés primaires étudiées sont très proches l'une de l'autre du point de vue géographique, il a été décidé d'étudier une nouvelle communauté primaire dans une autre région de Suisse. Les caractéristiques du Creux du Van ont répondu aux critères recherchés. La problématique proposée est la suivante: I) est-ce que *P. fortinii* s.l. est capable de survivre sur un pergélisol? II) quelles sont les espèces cryptiques présentes? III) le site du Creux du Van héberge-t-il de nouvelles espèces cryptiques?

Matériaux et méthodes

Région étudiée et échantillonnage

La région choisie pour cette étude est le cirque du Creux du Van. Celui-ci se trouve dans le canton de Neuchâtel, à vingt kilomètres au sud-ouest de sa capitale politique (45°56'N, 6°44'E). Nous avons sélectionné un peuplement d'épicéas nains sur un éboulis de blocs avec pergélisol à une altitude de 1200 mètres. La surface a une exposition nord-est et est entourée par un cirque de roches¹² (figure 1). De manière



Figure 1: Localisation de la grille hiérarchique dans le cirque du Creux du Van. La zone éclaircie représente l'étendue des épicéas nains (photographie: Christoph Grünig).

intéressante, le microclimat spécifique de cette station et, par conséquent, son pergélisol ne sont pas liés à un manque de rayonnement solaire, mais à un système de ventilation complexe de l'éboulis sous-jacent, fonctionnant dans un sens ou dans l'autre, selon la température extérieure de l'air. Le mécanisme exact de cette anomalie thermique est décrit en détail dans Delaloye et al.¹². Le peuplement mixte étudié est composé d'épicéas et de bouleaux. L'unité végétale est une pessière à tofieldie (*Tofieldio-Piceetum*)^{13, 14}. A cause du sous-sol gelé en permanence, la croissance de la végétation est très lente et les arbres n'atteignent pas plus de trois à quatre mètres. Depuis 1876, le site du Creux du Van est protégé. Il constitue la première réserve forestière de Suisse et, dès lors, aucune exploitation forestière n'y est autorisée. Comme la croissance des arbres y est très limitée, on peut en déduire qu'aucune intervention forestière n'a eu lieu sur la surface étudiée, même avant sa mise sous protection (Jean-Michel Oberson, ingénieur forestier d'arrondissement, communication personnelle). Pour l'échantillonnage, une grille hiérarchique de 14 m x 14 m est définie (à quatre mètres à l'est de la station de mesures MADD¹²) et subdivisée en carrés de 2 m x 2 m. Un des carrés de 2 m x 2 m est alors choisi aléatoirement et à son tour divisé en

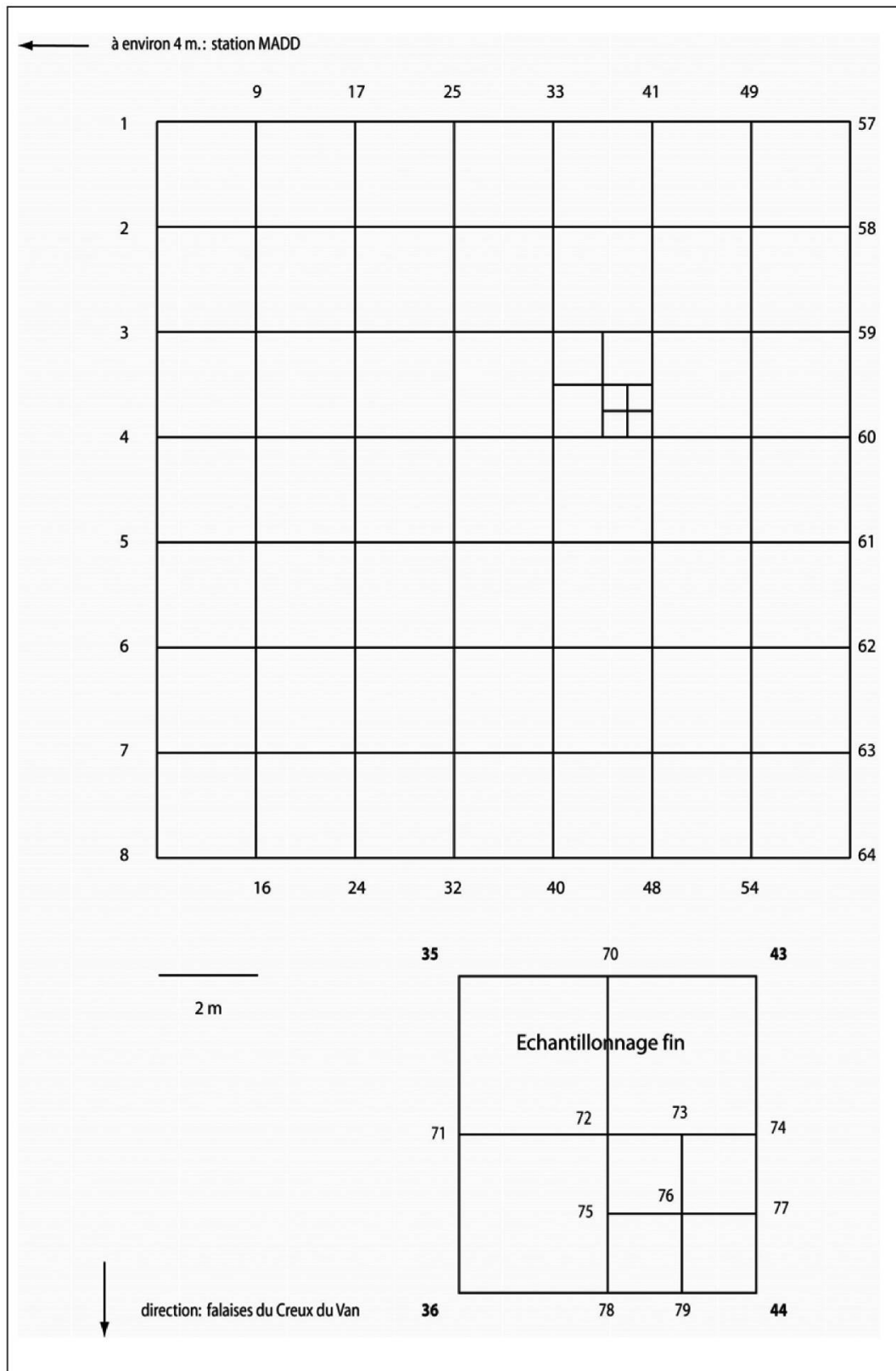


Figure 2: Design expérimental de la grille hiérarchique du Creux du Van.

quatre carrés de 1 m x 1 m, desquels un carré choisi à nouveau de manière aléatoire est partagé en quatre autres carrés de 0,5 m x 0,5 m (échantillonnage fin, figure 2)¹⁵. Cinq fragments de racines d'épicéa (Ø 0,5 – 3 mm) et respectivement deux de *Vaccinium* spp. sont récoltés sur les points de la grille hiérarchique de 14 m x 14 m, dans les dix premiers centimètres du sol. Pour l'échantillonnage fin, seuls deux fragments de racines de *Vaccinium* spp. sont ramassés à chaque point. Toutes les racines récoltées sont traitées dans les quarante-huit heures.

Isolation des DSE

Chaque fragment de racine est nettoyé sous l'eau courante, un segment de 2 à 2,5 cm y est découpé et stérilisé en surface (1 min dans de l'éthanol à 99%, 5 min dans de l'eau oxygénée à 35%, puis 30 min dans de l'éthanol à 99%). Un morceau de racine d'environ 5 mm est ensuite découpé et placé de façon stérile sur une boîte de Petri contenant un extrait de malt avec de la Terramycine® (MEAT = 20 g l⁻¹ d'extrait de malt, 15 g l⁻¹ d'agar-agar et 50 mg l⁻¹ de Terramycine® (Pfizer, Zurich)). On incube alors les boîtes de Petri à température ambiante. Afin de s'assurer que chaque échantillon ne contienne qu'un seul individu, le mycélium mélanisé croissant hors de la racine est isolé une seconde fois par la méthode des pointes d'hyphes (une pointe d'hyphes de chaque échantillon est découpée sous une loupe binoculaire et transférée sur une nouvelle boîte de Petri avec MEAT).

Extraction de l'ADN

L'ADN de 50 à 80 mg de mycélium provenant de chaque isolat est extrait selon Grünig¹⁵. La qualité et la concentration de l'ADN ainsi extrait sont déterminées par une électrophorèse sur gel (gel d'agarose de 0,7% dans 0,5 x TBE pour deux heures à 50 V, coloration dans un bain d'éthidium bromide de 10 µg ml⁻¹ et photographie sous rayons ultraviolets).

Formation des groupes pour les RFLP à l'aide des empreintes génétiques (ISSR-PCR)

Environ 1 ng d'ADN de chaque isolat est utilisé pour 15 µl de solution finale. Sont alors ajoutés 13,9 µl d'eau distillée, 2,0 µl de tampon PCR 10 x, 2,0 µl de dNTPs 1 x, 1,0 µl de primer PCR CGA¹⁶ et 0,08 µl de Taq-Polymerase. Après une dénaturation de 2 min à 94°C, trente-cinq cycles sont effectués. Chaque cycle est composé des étapes

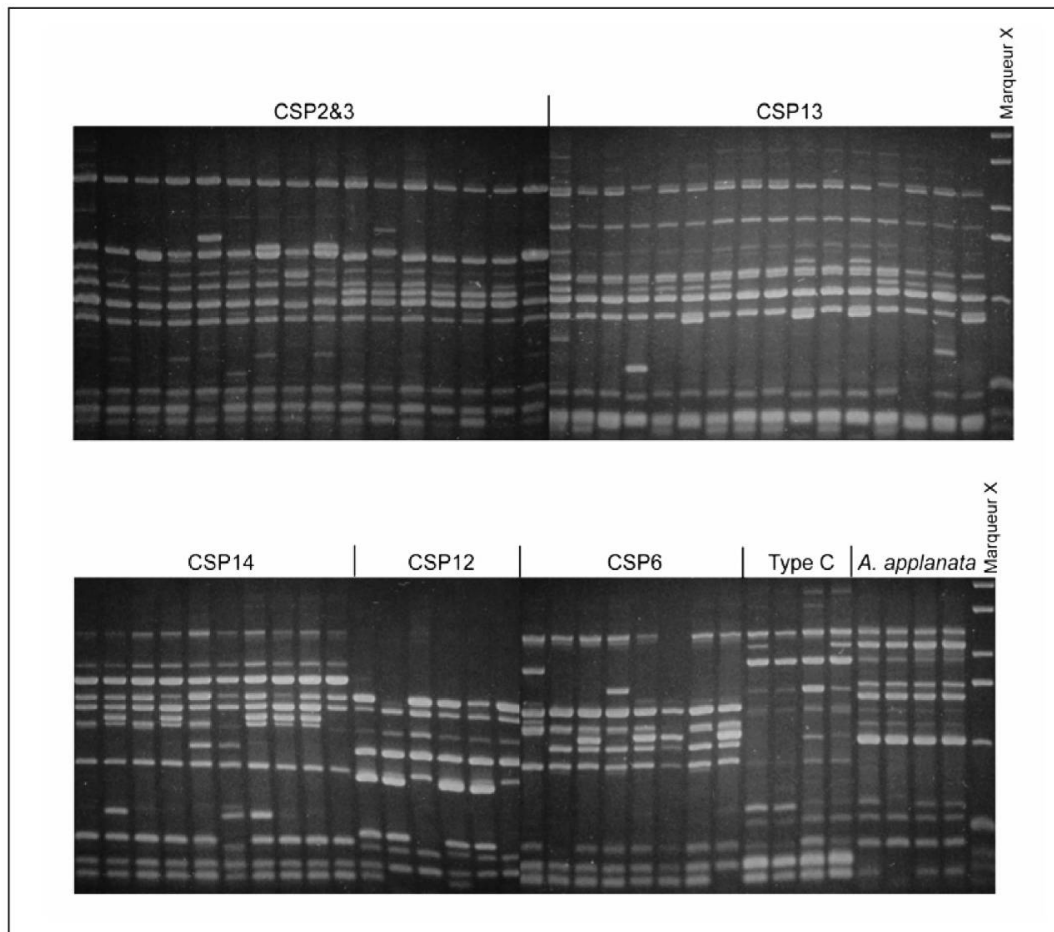


Figure 3: Exemples de groupes d'empreintes génétiques selon la méthode ISSR-PCR

suivantes: 1 min de dénaturation à 94 °C, 2 min d'annealing à 53,5° C et 2 min d'extension à 72° C. Après les trente-cinq cycles, une étape d'extension finale de 10 min à 72° C termine la PCR. Les fragments obtenus durant l'ISSR-PCR sont alors séparés par une électrophorèse sur gel (gel d'agarose de 1% dans 0,5 x TBE pour 15 min à 50 V et 3 h à 84 V, coloration dans un bain d'éthidium bromide de 10 µg ml⁻¹ et photographie sous lumière UV). A l'aide des photographies obtenues, les isolats sont classés par groupes contenant des empreintes génétiques similaires (figure 3). Les groupes ainsi formés vont permettre de faciliter l'interprétation des données RFLP.

Southern Blotting et hybridisation (analyses single-copy RFLP)

5 µg de l'ADN de chaque isolat sont digérés par cinquante unités de l'enzyme de restriction Hind III à 37° C durant une nuit. La réussite de la digestion est testée par une électrophorèse sur gel (gel d'agarose de

0,8% dans 0,5 x TBE pour 1,5 h à 50 V, coloration dans un bain d'éthidium bromide de 10 µg ml⁻¹ et photographie sous lumière UV). L'ADN digéré de chaque isolat est ensuite séparé sur un gel d'agarose de 0,8% dans un bain de 1 x TBE (1 heure à 50 V suivie de dix-neuf heures à 85 V). Après une hydrolisation partielle dans de l'acide chlorhydrique 0,25 M durant quinze minutes, l'ADN est transféré sur une membrane HybondTMN⁺ (Amersham, Dübendorf, Suisse) dans des conditions alcalines¹⁷. La membrane est ensuite hybridée avec les onze sondes développées précédemment par Grünig et al¹⁸: pPF-008, pPF-018, pPF-023, pPF-029, pPF-036, pPF-048, pPF-061, pPF-063, pPF-075, pPF-076, pPF-080. Les sondes sont marquées radioactivement au phosphore 32 ([α -³²P] dCTP) à l'aide d'un Nick translation kit (Invitrogen, Bâle, Suisse). Les blots sont préhybridés entre 5 et 8 heures puis hybridés douze heures à 65°C. Ils sont ensuite nettoyés: 2 x avec une solution de 1 x SSC/0,1% SDS, 2 x avec une solution de 0,2 x SSC/0,1% SDS et 2 x avec une solution de 0,1 x SSC/0,1% SDS. On dépose alors les membranes de vingt-quatre à septante-deux heures à -80°C sur des films sensibles aux rayons X (Kodak Biomax MS, Amersham, Dübendorf, Suisse). Les films sont alors développés.

Analyse des populations

Les fragments ou combinaisons de fragments d'ADN ayant hybridé avec la même sonde mais présentant des longueurs différentes sont considérés comme les allèles différents d'un même locus génétique. Chaque allèle est déterminé et numéroté (figure 4). Chaque combinaison d'allèles différents est considérée comme un haplotype multigénique unique (MLH). Les isolats présentant le même MLH sont interprétés comme appartenant au même individu (clone).

Toutes les analyses sont effectuées à partir d'une banque de données ne présentant qu'une fois chaque MLH (clone). Pour l'analyse «cluster», les données RFLP sont traduites en distances par paires (le nombre de différences entre les isolats divisé par le nombre de sondes utilisées). L'analyse «cluster» est réalisée grâce à l'algorithme «single linkage» du programme SYSTAT version 11.

La différenciation des populations (clusters) reconnues comme étant séparées est testée avec le programme MultiLocus 1.3¹⁹. Les valeurs GST de différenciation des populations sont à chaque fois calculées entre deux groupes et comparées à mille sets de données aléatoires (procédure de Jackknife). Lorsque la différenciation des populations est statistiquement significative, les différents groupes (clusters) peuvent être considérés comme étant des sous-populations locales et leur déséquilibre

gamétique est alors estimé. L'association entre les différents loci génétiques est calculée à l'aide de l'index d'association I_A dans le programme MultiLocus 1.3. La signification statistique de l' I_A est testée par comparaison de l' I_A obtenu avec l' I_A attendu pour mille sets de données aléatoires soumis à l'hypothèse zéro d'un accouplement aléatoire. Si la différenciation des populations est assez élevée ($G_{ST} > 0,33$) et l'index d'association I_A significativement différent de zéro, les groupes (clusters) sont alors interprétés comme étant des espèces cryptiques. Pour chaque groupe, la diversité génétique H^{20} , le nombre potentiel de MLH (M_{pot}) et le nombre effectif de MLH (M_{eff})²¹ sont ensuite calculés :

$$H = \frac{1}{n} \sum_j (1 - \sum_i X_{ij}^2), \text{ avec } X_{ij}, \text{ la fréquence } x \text{ de l'allèle } i \text{ du locus } j \text{ [1]}$$

$$M_{pot} = \prod_j n_j, \text{ avec } n_j, \text{ le nombre d'allèles du locus } j \text{ [2]}$$

$$M_{eff} = \prod_j n_{jeff}, \text{ avec } n_{jeff} = \left[\sum_i X_{ij}^2 \right]^{-1} \text{ et } X_{ij}, \text{ la fréquence de l'allèle } i \text{ du locus } j \text{ [3]}$$

Confirmation des espèces cryptiques par séquençage

Afin de confirmer la séparation des espèces cryptiques obtenue par les données RFLP, les régions suivantes d'isolats choisis ont été séquencées: β -tubulin, pPF_018 et pPF_076².

Abondance et distribution spatiale des espèces cryptiques

L'abondance des espèces cryptiques est testée statistiquement par la méthode du chi-carré avec l'hypothèse nulle d'une distribution équipartite. La répartition spatiale est tout d'abord représentée de manière descriptive sur un plan de la surface d'essai. Pour les espèces cryptiques semblant être séparées spatialement, des tables de contingence par paires sont calculées²². De plus, une mesure d'association est calculée selon la formule $Q = (ad-bc)/(ad + bc)$, avec a = la fréquence des points pour lesquels les deux espèces cryptiques apparaissent ensemble, b = la fréquence des points pour lesquels uniquement l'espèce x apparaît, c = la fréquence des points pour lesquels uniquement l'espèce y apparaît et d = la fréquence des points pour lesquels aucune des deux espèces cryptiques n'apparaît²².

Flux de gènes et différenciation intraspécifique des populations entre les diverses surfaces d'essais

Diverses populations suisses de *P. fortinii* s.l. sont jointes à l'analyse^{3, 10, 11}. La différenciation par paires des populations (G_{ST}) ainsi que le nombre de migrations par génération (M) sont calculés à l'aide du programme ARLEQUIN v.2.001²³ pour les espèces cryptiques CSP3 et CSP6, ceci afin d'obtenir une appréciation indirecte du flux de gènes entre les populations.

Les distances par paires (G_{ST}) sont ensuite utilisées afin de réaliser une analyse «cluster» à l'aide du programme SYSTAT v.11 (algorithme single linkage). Le résultat est représenté alors sous forme d'un dendrogramme.

Résultats

Présence des DSE et d'autres endophytes racinaires

Au total, 262 DSE (56% des segments de racines analysés) ont été isolés. Proportionnellement, les racines de l'épicéa (63,75%) sont plus fortement colonisées par les DSE que celles des *Vaccinium* spp. (39%). Les isolats n'appartenant pas au groupe des DSE se sont montrés morphologiquement très divers et pour la plupart stériles. Dix-huit des septante-trois isolats provenant des racines d'épicéas et n'appartenant pas au groupe des DSE ont pu être déterminés: *Penicillium* sp. (7x), *Geniculosporium* sp. (5x), *Cryptosporiopsis radicola* (3x) et *Hormonema* sp. (3x). De manière analogue, sept des septante-cinq isolats n'appartenant pas au groupe des DSE ont pu être déterminés pour les racines de *Vaccinium* spp.: *Acremonium* sp. (1x), *Ceuthospora* sp. (1x), *C. radicola* (1x), *Cryptosporiopsis* sp. (1x), *Geniculosporium* sp. (1x), *Lecythophora hoffmannii* (1x) et *Phialophora* sp. (1x).

Classification des DSE à l'aide des empreintes génétiques (ISSR-PCR)

Les 262 isolats provenant du site du Creux du Van ont été classés à l'aide de la méthode ISSR-PCR. Seize groupes contenant des empreintes génétiques différentes ont été obtenus (figure 3). Certaines empreintes génétiques déjà étudiées^{3, 10, 24} ont pu être reconnues: CSP2 & 3, CSP6, CSP11, CSP12 et *A. applanata*. Deux nouvelles espèces cryptiques (CSP13 et CSP14) ainsi que deux types d'empreintes génétiques

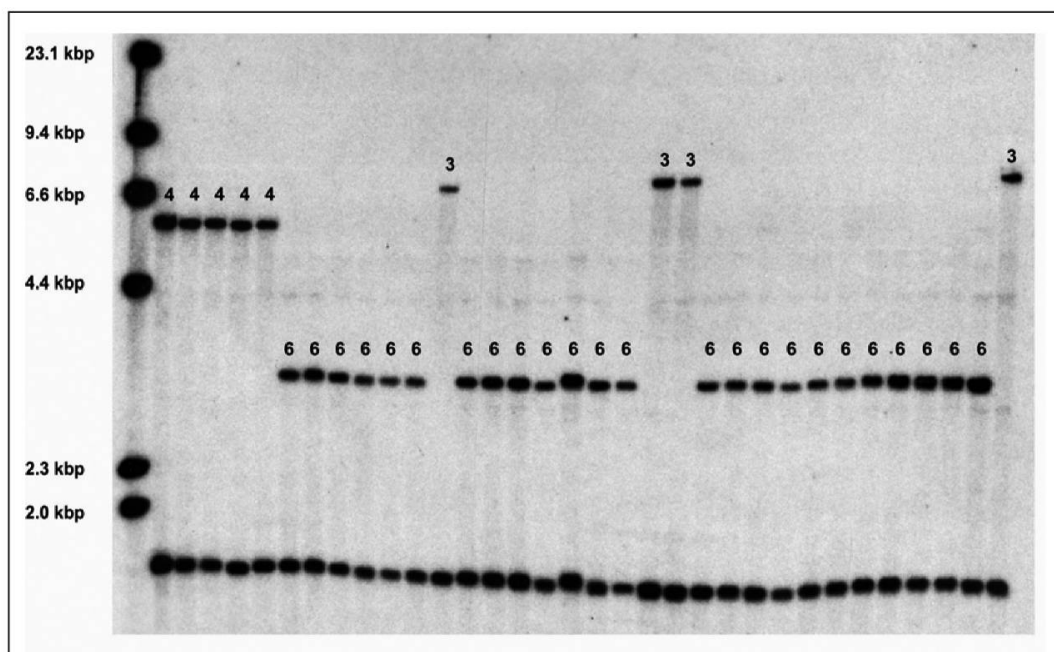


Figure 4: Exemple d'un blot RFLP, sonde pPF_061, espèce cryptique CSP3. Chaque numéro représente un allèle différent.

nouvelles (type C et type E, seuls quelques isolats) ont été observés. Les nouveaux types C et E n'ont pas été reconnus comme espèces cryptiques à part entière en raison du trop petit nombre d'isolats disponibles pour les analyses. Finalement, au total quinze isolats DSE se sont révélés ne pas appartenir au complexe d'espèces de *P. fortinii* s.l. et *A. applanata*.

Analyse de la structure des populations au Creux du Van

Au total, 247 isolats ont été analysés avec onze amorces RFLP (figure 4). On a pu détecter 112 haplotypes multigéniques. Quinze isolats ont été exclus des analyses, ceci en raison de la présence d'allèles multiples sur le même locus (CSP12).

L'analyse «cluster» des données RFLP a permis de séparer clairement huit différents groupes (figure 5). Les abondances de ces groupes sont représentées à la figure 7. CSP3, CSP13 et CSP14 sont les espèces cryptiques les plus fréquentes au Creux du Van.

Les groupes contenant un minimum de neuf haplotypes multigéniques ont été testés par paires afin de détecter une quelconque différenciation des populations. Toutes les comparaisons par paires sur les échantillons du Creux du Van ont soutenu de manière significative l'hypothèse d'une différenciation des populations. Toutes les valeurs GST, comprises entre 0,55 et 0,64, dépassaient clairement le seuil de 0,33³ (table 1). Les résultats concernant l'index d'association sont représentés

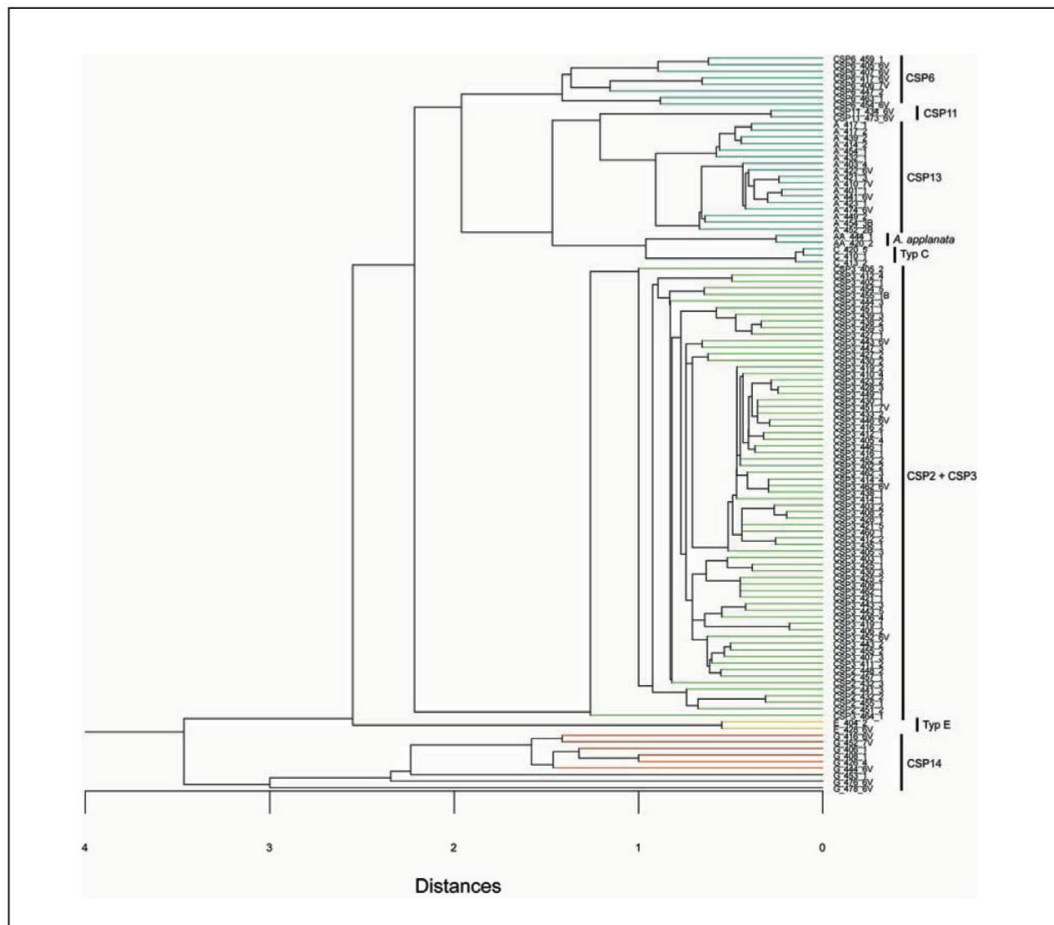


Figure 5: Analyse «cluster» des données RFLP, excepté CSP12 (problème d'amplification).

dans la table 2. Pour aucune des CSP observées, l'index d'association ne diffère de la valeur attendue 0 (recombinaison aléatoire des loci). Puisqu'elles possèdent une empreinte génétique sans ambiguïté (confirmation par séquençage, voir figure 6) et qu'elles contiennent un nombre suffisant d'isolats pour les analyses de génétique des populations, CSP13 et CSP14 peuvent être considérées comme de nouvelles espèces cryptiques. Les deux groupes restants (types C et E), composés de trop peu d'haplotypes multigéniques, n'ont pas été intégrés aux analyses et ne sont donc pas considérés comme de nouvelles espèces cryptiques.

Pour chaque espèce cryptique, la diversité génétique moyenne, le nombre potentiel d'haplotypes multigéniques ainsi que le nombre effectif d'haplotypes multigéniques ont été calculés (table 3). Le nombre d'isolats par haplotype multigénique n'était pas distribué de manière uniforme. CSP3 et CSP13 ont formé de grands clones allant jusqu'à quatorze et respectivement douze isolats.

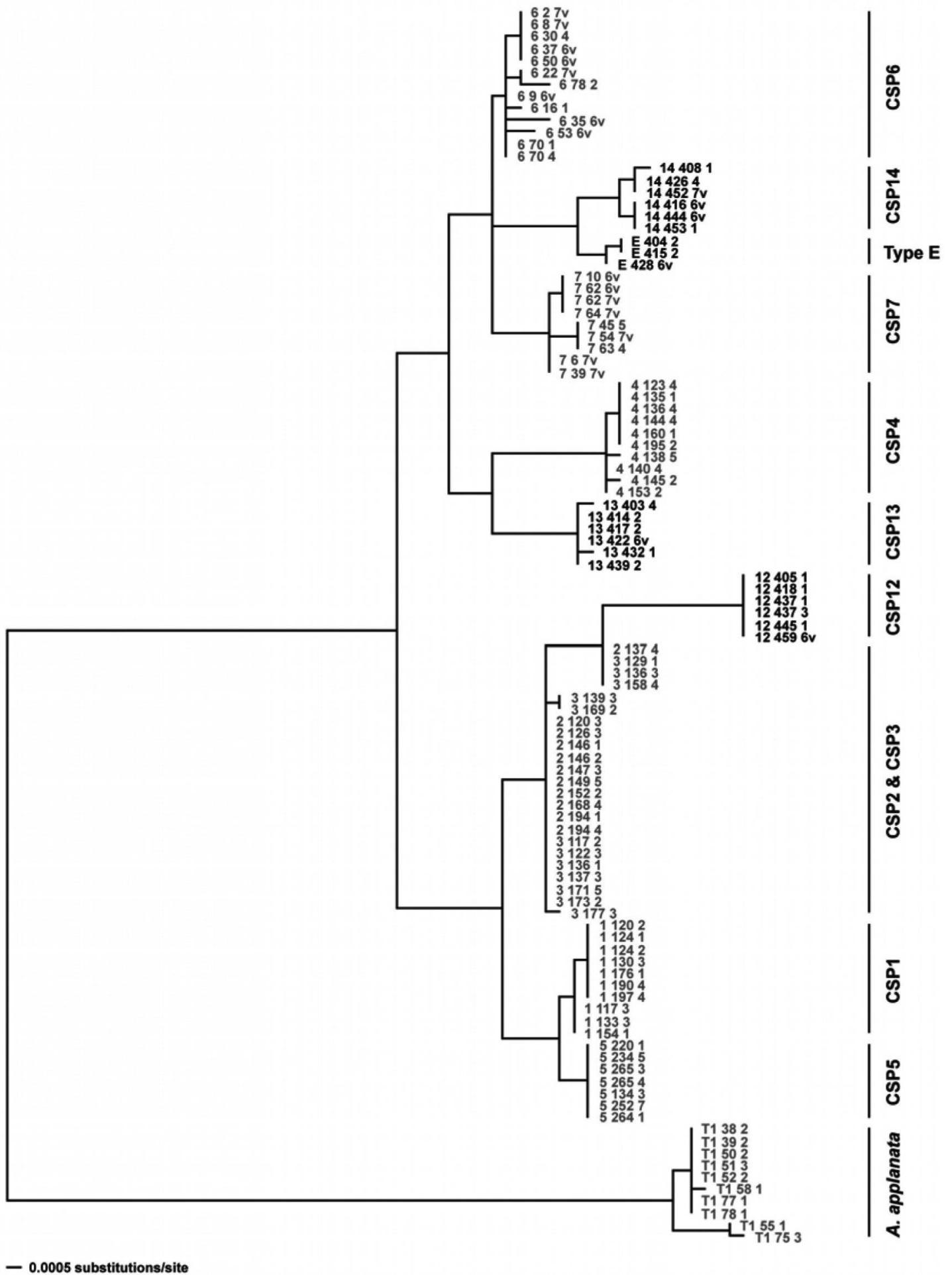


Figure 6: Dendrogramme (maximum likelihood) des séquences combinées (β -tubulin, pPF_018, pPF_076). Les isolats provenant du Creux du Van sont en caractère gras (type E, CSP12, CSP13 et CSP14).

Table 1: Valeurs G_{ST} pour les espèces cryptiques du Creux du Van composées de plus de 9 MLH ; pour toutes les valeurs, $p = 0.001$

Cluster	CSP3	CSP13	CSP14
CSP3	-	-	-
CSP13	0.642	-	-
CSP14	0.586	0.621	-

Table 2: Index d'association (I_A) et probabilité (p) pour les espèces cryptiques du Creux du Van

Cluster	# MLH	I_A	p
CSP3	62	0.125	0.103
CSP13	17	0.207	0.083
CSP14	9	0.028	0.419

Table 3: Diversité génétique moyenne (H), nombre potentiel de MLH (M_{pot}) et nombre effectif de MLH (M_{eff}) pour les espèces cryptiques du Creux du Van

Cluster	H	M_{pot}	M_{eff}	# loci polymorphes
CSP3	0.337	559'872	868	9
CSP13	0.303	1'728	174	7
CSP14	0.312	972	125	7

Table 4: Informations concernant les populations suisses choisies de CSP3

Site étudié	Abbréviation	Coordonnées	Date du prélèvement	Surface en m^2	# points	# MLH CSP3
Zürichberg	ZB	685.000/249.725	Mai 2002	196	74	49
Üetliberg	UEB	678.450/246.800	Mai 2001/ Februar 2004	108	48	18
Bödmeren	BOD	707.120/203.560	September 2003	196	74	19
Scatlé	SCAT	722.975/183.400	Mai 2004	196	74	23
Creux du Van	CDV	545.750/198.175	Mai 2005	196	74	62

Table 5A: Valeurs G_{ST} entre les populations suisses de CSP3

	# MLH	G_{ST}				
		ZB	UEB	BOD	SCAT	CDV
ZB	48	-				
UEB	18	0.007	-			
BOD	19	0.049	0.051	-		
SCAT	23	0.038	0.048	0.000	-	
CDV	62	0.019	0.031	0.052	0.031	-

Table 5B: Nombre de migrants (M) entre les populations suisses de CSP3

	# MLH	M				
		ZB	UEB	BOD	SCAT	CDV
ZB	48	-				
UEB	18	76.130	-			
BOD	19	9.622	9.363	-		
SCAT	23	12.543	9.837	infini	-	
CDV	62	25.189	15.532	9.179	15.627	-

Distribution spatiale des espèces cryptiques

Les isolats de CSP3 sont distribués de manière uniforme sur toute la grille hiérarchique et ont été exclus de l'analyse pour cette raison. CSP13 et CSP14 sont en revanche séparées spatialement. Le test de contingence de Pielou²² ainsi que la mesure d'association confirment les observations empiriques ($p < 0,05$; $Q = -0,105$).

Flux de gènes et différenciation intraspécifique des populations de CSP3 entre diverses surfaces d'essais en Suisse

La différenciation des populations ainsi que le flux de gènes ont été étudiés entre les populations suivantes: Zürichberg (ZH), Üetliberg (ZH), Bödmeren (SZ), Scatlé (GR) et Creux du Van (NE) (table 4).

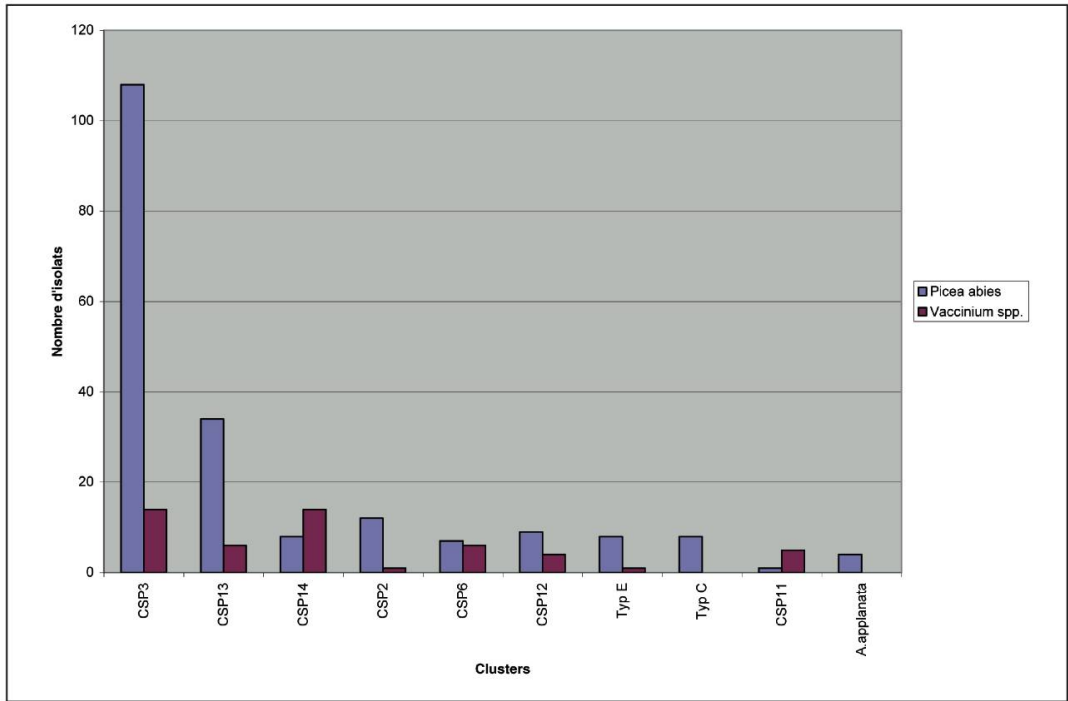


Figure 7: Abondance des groupes principaux (espèces cryptiques et types) au Creux du Van.

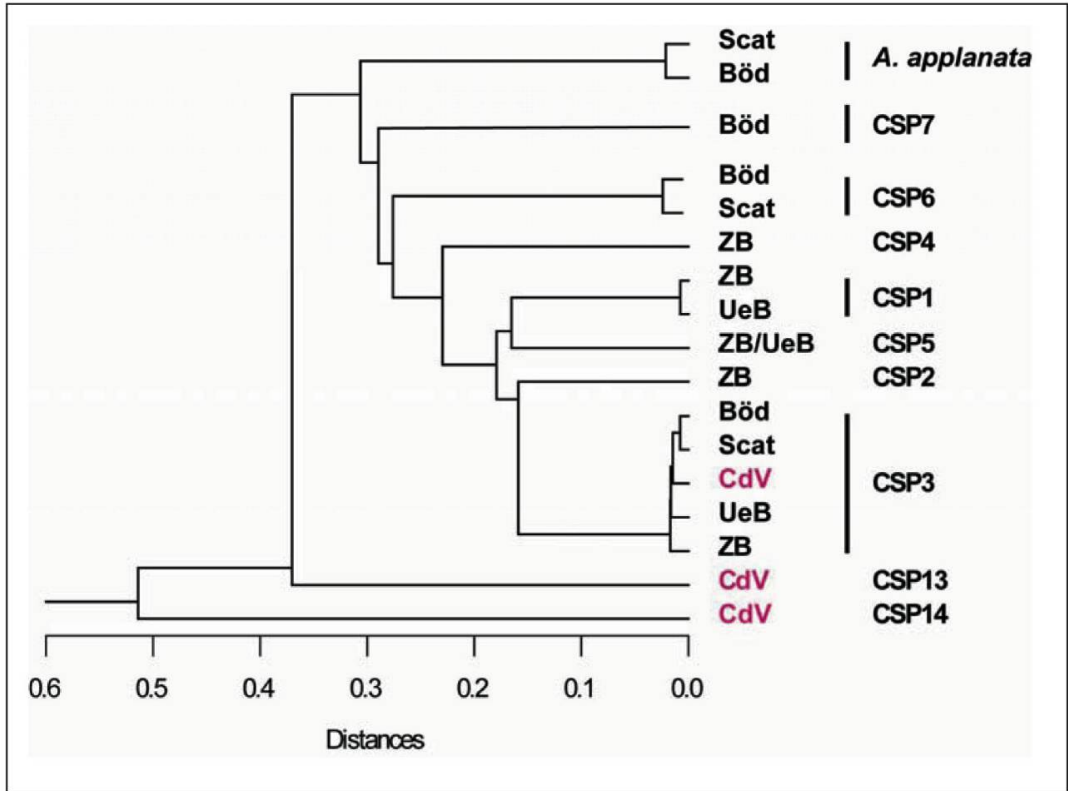


Figure 8: Analyse «cluster» entre les populations suisses choisies.

Les valeurs G_{ST} par paires ainsi que le nombre de migrants entre les différentes populations de CSP3 sont représentés dans les tables 5A et 5B. Pour CSP3, aucune différenciation des populations entre Bødmeren et le Creux du Van n'a pu être observée. Si l'on admet que le degré de ressemblance repose sur des échanges de gènes ou de génotypes, alors le nombre de migrants tend vers l'infini dans le cas présent. De manière générale, on ne peut observer qu'une faible différenciation entre les populations de CSP3. Un dendrogramme basé sur les distances par paires (valeurs G_{ST}) des populations est représenté sur la figure 8. Toutes les populations appartenant aux mêmes espèces cryptiques forment des groupes clairement définis.

Discussion

Présence du complexe d'espèces de *P. fortinii* s.l. et *A. applanata* sur un pergélisol

Le présent travail a permis de démontrer que certaines espèces du complexe de *P. fortinii* s.l. et *A. applanata* sont capables de coloniser des stations sur pergélisol. Ainsi les espèces de ce complexe ont la faculté de survivre à des conditions écologiques extrêmes, avec une température moyenne annuelle du sol avoisinant $1,3^{\circ}\text{C}$ ²⁵ et, par conséquent, à des périodes végétatives très courtes. Les communautés endophytes étudiées ici se sont avérées très diverses et de nouvelles espèces cryptiques de *P. fortinii* s.l. ont pu être caractérisées.

Les résultats de ce travail sont en accord avec des observations antérieures démontrant la présence des champignons en général, et des endophytes fongés et septés en particulier dans des sols froids à très froids^{26, 27}. Cependant, les isolats appartenant au groupe des DSE cités dans les observations mentionnées précédemment n'ayant pas été caractérisés en détail, il est impossible d'affirmer avec certitude qu'il s'agissait bien de *P. fortinii* s.l. En revanche, Jumponnen⁸ isola avec certitude *P. fortinii* s.l. d'une langue glacière. Les résultats présentés sont en accord avec l'aire de distribution du complexe d'espèces de *P. fortinii* s.l., présent dans la majorité des zones boréales et tempérées de la planète^{6, 28-33}. De plus, la large amplitude écologique de ce complexe a été démontrée à maintes reprises et sa présence a pu être documentée dans diverses stations forestières de Suisse sur *P. abies* ainsi que *Vaccinium* spp.^{3, 10, 11, 24}.

Les racines de *Vaccinium* spp. sont proportionnellement moins colonisées par les DSE que celles de l'épicéa. Par contre, la fréquence d'autres champignons y est plus élevée. Les deux forêts primaires de

montagne de Scatlé et de Bödmeren ont montré des densités de colonisation par les DSE analogues à celles du Creux du Van¹¹. En revanche, les forêts exploitées de plaine³ sont caractérisées par des densités de colonisation nettement supérieures à celles observées dans les forêts primaires. Il est clair que la densité de colonisation des racines obtenue dépend du succès d'isolation du champignon. Il a été démontré à maintes reprises que la méthode appliquée ici permet d'isoler un grand nombre d'exemplaires de *P. fortinii* s.l. Il est impossible d'affirmer aujourd'hui avec certitude que la méthode agisse de manière totalement aléatoire. Il se pourrait que certaines espèces cryptiques ou même certains clones soient systématiquement favorisés par la méthode utilisée. Un grand nombre d'espèces cryptiques a cependant pu être isolé en différents endroits. Les densités spécifiques respectives n'ont jamais montré une constance quelconque, ceci bien que la même méthode ait été utilisée pour chaque investigation^{3,10}. De plus, *A. applanata*, une espèce reconnue pour sa croissance extrêmement lente a été la plus fréquemment isolée à Bödmeren et à Scatlé. Certes, on a pu isoler jusqu'à trois espèces cryptiques (appartenant à six individus différents) dans un seul fragment racinaire de 10 cm de longueur. Cependant, la méthode permet de détecter des différences dans les fréquences des CSP entre diverses stations et régions géographiques. Additionnellement, nous avons pu démontrer que deux récoltes au même endroit avec la même méthode livrent des résultats similaires¹⁰. Cette dernière affirmation démontre le bien-fondé du choix de la méthode appliquée ici pour isoler *P. fortinii* s.l. et *A. applanata* des racines de ses hôtes.

Structure des populations au Creux du Van

La détection des clones est une base importante pour les analyses en génétique des populations. Ceci est valable aussi bien pour les analyses à l'intérieur ou entre les populations et surtout lorsque la base de données ne comporte que quelques MLH. Grünig et al.³ ont montré que les données RFLP se prêtent très bien à la reconnaissance des clones. Pour cette raison, les éliminations des clones de la base de données ont été effectuées à partir des données RFLP. La diversité génétique moyenne, le nombre potentiel de MLH ainsi que le nombre effectif de MLH sont très élevés. Ceci s'explique par la présence de groupes clairement reconnaissables (figures 5 et 6). Les valeurs G_{ST} élevées entre les groupes (jusqu'à 0,64) sont un indice pour une différenciation des populations et on peut en déduire que les groupes ainsi formés sont reproductivement isolés. De nombreuses sources ont d'ailleurs déjà démontré une isolation des groupes ainsi que la présence d'espèces cryptiques chez *P. forti-*

nii s.l. précédemment^{3, 11}. De manière analogue, la présence d'espèces cryptiques a été démontrée pour d'autres organismes³⁴⁻³⁷ comprenant aussi des champignons asexués comme *Cenococcum geophilum*³⁸. Dans le présent travail, deux nouvelles espèces cryptiques (CSP13 et 14) ont été découvertes et caractérisées. Les nouvelles espèces cryptiques détectées par RFLP ont été confirmées par empreintes génétiques ISSR-PCR ainsi que par séquençage de trois régions du génome (figure 6).

Les analyses de l'index d'association (I_A) confirment la découverte de nouvelles espèces cryptiques, puisque ce dernier n'est pas significativement différent de zéro à l'intérieur des espèces testées, ce qui laisse à penser qu'une recombinaison génétique est possible. Malgré le fait que les tests soutiennent la présence de recombinaison génétique dans les espèces cryptiques, les processus impliqués restent inconnus. Deux mécanismes sont néanmoins possibles: la recombinaison génétique de *P. fortinii* s.l. par reproduction sexuée ou par parasexualité³⁹⁻⁴¹. Certes, aucune téléomorphe de *P. fortinii* s.l. n'a été trouvée jusqu'à aujourd'hui; il serait cependant possible d'admettre que la reproduction sexuée n'a lieu que très rarement ou dans des conditions très restreintes, ou alors qu'elle n'a eu lieu que par le passé et a totalement disparu aujourd'hui. L'ordre des Glomales est un exemple de champignons anciennement sexués ne se reproduisant plus aujourd'hui, et ce depuis longtemps (d'un point de vue évolutionnaire), que de manière asexuée⁴². L'hypothèse d'un cycle parasexué⁴³ avec recombinaison mitotique chez *P. fortinii* s.l. ne peut être exclue. On pense aujourd'hui que c'est par exemple le cas pour *Rynchosporium secalis*³⁹. Afin de percer le secret de la recombinaison génétique chez *P. fortinii* s.l., des études ciblées devront être effectuées.

Structure communautaire au Creux du Van

La plupart des espèces cryptiques de *P. fortinii* s.l. sont réparties uniformément sur toute la surface de la grille. Une telle répartition indique un probable comportement sympatrique des espèces cryptiques. Il est cependant judicieux de retenir que les cas de sympatrie sont très difficiles à prouver pour les micro-organismes, car ceux-ci peuvent avoir des niches écologiques très proches et donc difficilement différenciables⁴¹. Un comportement sympatrique chez *P. fortinii* s.l. a pourtant déjà été observé en Suisse par Grünig et al.³ et au Canada par Piercey et al.⁴⁴. Toutefois les espèces cryptiques CSP13 et CSP14 se démarquent de ce comportement sympatrique. Elles semblent même tout simplement s'éviter (mesure d'association de -0,104).

La composition des espèces cryptiques au Creux du Van est très différente des assemblages rencontrés à Bödmeren, Scatlé ainsi que dans deux forêts exploitées des environs de Zurich. Deux nouvelles espèces cryptiques ont été découvertes. De plus, on a pu montrer que CSP3 y est l'espèce la plus fréquente. Les espèces les plus rencontrées à Bödmeren et à Scatlé (*A. applanata* et CSP6) sont plutôt rares au Creux du Van. Il est aujourd'hui uniquement possible de spéculer sur les causes probables de telles déviations. Deux hypothèses sont envisageable: I) les différentes conditions écologiques ont conduit à des communautés divergentes ou II) la position géographique des surfaces étudiées est responsable des écarts constatés. Entre les surfaces de Bödmeren et Scatlé, les conditions écologiques divergent (géologie, température annuelle moyenne et pluviométrie annuelle), mais les communautés observées sont toutefois très semblables. Les communautés de l'est de la Suisse (Bödmeren et Scatlé) et celle de l'ouest (Creux du Van) sont certes soumises à des conditions écologiques différentes (pergélisol), les communautés végétales s'y trouvant sont cependant semblables, ce qui laisse à penser que les variations écologiques ne sont pas à même d'expliquer les divergences constatées dans la composition des communautés d'espèces du complexe de *P. fortinii* s.l. Par contre, la position géographique serait plus à même de jouer un rôle important. Bödmeren et Scatlé sont très proches l'une de l'autre dans l'est de la Suisse pendant que le Creux du Van se trouve à l'ouest de cette dernière. D'un point de vue historique, l'ouest (Jura géologique) et l'est de la Suisse se trouvent sur deux routes différentes de recolonisation de l'épicéa après les glaciations. Les épicéas du Jura proviennent probablement des refuges glaciaires des Apennins ou de la péninsule Ibérique, alors que les épicéas de l'est de la Suisse proviennent certainement des grands massifs de l'Europe de l'Est⁴⁵. L'hypothèse soutenue par Grünig¹⁵ d'une spéciation allopatrique de *P. fortinii* s.l. dans les différents refuges de l'épicéa durant la période glaciaire est confirmée par les résultats présentés ici. Les deux différentes routes de recolonisation de l'épicéa en Suisse pourraient expliquer les différences constatées entre les communautés d'espèces de l'est et de l'ouest de la Suisse. Cependant, le complexe d'espèces de *P. fortinii* s.l. ne se limitant pas aux seules racines de l'épicéa mais pouvant aussi coloniser d'autres espèces¹ comme, par exemple, le genre *Vaccinium* ayant survécu en Suisse durant les glaciations⁴⁵, l'hypothèse d'une spéciation allopatrique est à étudier plus en profondeur. Des recherches complémentaires en Suisse romande et dans les régions comprenant anciennement des refuges glaciaires pourraient livrer plus d'indices quant à la spéciation de *P. fortinii* s.l. De plus, il faut tenir compte d'une possible survie de *P. fortinii* s.l. (sous une forme persistante) dans le sol durant les glaciations. Ainsi, Kochkina et al.⁴⁶ ont réussi à recultiver des mycéliums noirs et stériles âgés de 5000 ans à 2,5 millions

d'années. Comme il est très probable que le pergélisol du Creux du Van se soit formé peu après les glaciations²⁵, il serait intéressant de comparer des éventuels échantillons de *P. fortinii* s.l. prélevés dans les couches inférieures du permafrost avec ceux analysés durant la présente étude. On pourrait ainsi comparer les communautés d'espèces de *P. fortinii* s.l. présentes à la fin des glaciations avec celles présentes aujourd'hui.

Différenciation des populations de CSP3 en Suisse

Aucune différenciation significative n'a pu être détectée entre les populations suisses (Üeltiberg, Zürichberg, Bödmeren, Scatlé et Creux du Van) pour CSP3. Le nombre de migrations entre les populations est élevé et confirme l'idée d'un flux génétique ou d'un passé commun des différentes populations³. De manière générale, on peut constater que le nombre de migrations diminue de manière logarithmique lorsque la distance entre les populations augmente. Afin toutefois de démontrer proprement une relation entre le nombre de migrations et la distance séparant les placettes d'essai, des surfaces supplémentaires devront être observées.

Conclusions

Le présent travail a permis de démontrer la présence de communautés très diverses appartenant au complexe d'espèces de *P. fortinii* s.l. et *A. applanata*. Deux nouvelles espèces cryptiques ont été découvertes et caractérisées. La composition des espèces cryptiques trouvée au Creux du Van est fondamentalement différente des autres compositions observées en Suisse³. Des flux génétiques entre diverses surfaces de Suisse ont pu être constatés. Malgré les nombreux nouveaux résultats et confirmations livrés dans cette étude, de multiples questions restent sans réponse. Des recherches ultérieures concernant la propagation de *P. fortinii* s.l. et *A. applanata* seront nécessaires à la compréhension de la biologie des populations de ce complexe d'espèces. Ces bases serviront alors à mieux comprendre le rôle écologique du complexe de *P. fortinii* s.l. et *A. applanata* dans l'écosystème forestier.

Remerciements

L'auteur tient à remercier tout particulièrement Christoph Grünig pour ses conseils scientifiques, le Club jurassien pour la mise à disposition du pergélisol, Reynald Delaloye et Jean-Michel Oberson pour leur collaboration ainsi que Claude Etique pour la révision rédactionnelle.

Résumé

La présence et la structure génétique des endophytes racinaires *Phialocephala fortinii* s.l. et *Acephala applanata* dans une station sur pergélisol ont été analysées à l'aide de onze sondes RFLP (polymorphismes de longueur des fragments de restriction). L'investigation a été menée sur un total de 247 isolats provenant de racines fines de *Picea abies* et *Vaccinium* spp. stérilisées préalablement en surface. Deux nouvelles espèces cryptiques appartenant au groupe de *P. fortinii* s.l. ont été découvertes. L'index d'association indique clairement qu'il y a recombinaison génétique pour les espèces cryptiques de *P. fortinii* s.l.. Finalement, un flux significatif de gènes a pu être constaté entre différentes populations suisses.

Valentin Queloz a obtenu son baccalauréat scientifique en 2000 au Lycée cantonal à Porrentruy et son diplôme d'ingénieur forestier à l'EPFZ en 2006. Il prépare actuellement une thèse de doctorat sur «l'évolution du complexe d'espèces de Phialocephala fortinii en Europe».

BIBLIOGRAPHIE

1. Jumpponen A, Trappe JM, 1998. Dark septate endophytes: A review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. *New Phytologist* 140, 295-310.
2. Grünig CR, Brunner PC, Duò A, Sieber TN, 2007. Suitability of methods for species recognition in the *Phialocephala fortinii* – *Acephala applanata* species complex using DNA analysis. *Fungal Genetics and Biology* 44, 773-788.
3. Grünig CR, McDonald BA, Sieber TN, Rogers SO, Holdenrieder O, 2004. Evidence for subdivision of the root-endophyte *Phialocephala fortinii* into cryptic species and recombination within species. *Fungal Genetics and Biology* 41, 676-687.
4. Grünig CR, Sieber TN, 2005. Molecular and phenotypic description of the widespread root symbiont *Acephala applanata* gen. et sp. nov., formerly known as dark septate endophyte Type 1. *Mycologia* 97, 628-640.
5. Grünig CR, Duo A, Sieber TN, Holdenrieder O, 2007. Molecular and phenotypic description of six new species within the *Phialocephala fortinii* s.l. - *Acephala applanata* species complex. *Mycologia*, submitted.

6. Ahlich-Schlegel K, 1997. Vorkommen und Charakterisierung von dunklen, septierten Hyphomyceten (DSH) in Gehölzwurzeln, *Department of Forest Sciences, Forest Pathology and Dendrology*. ETH, Zürich, p. 170.
7. Sieber TN, 2002. Fungal root endophytes, in: Waisel Y, Eshel A, Kafkafi U (Eds), *Plant Roots The hidden half*, 3rd ed. Marcel Dekker, New York Basel, pp. 887-917.
8. Jumpponen A, 1999. Spatial distribution of discrete RAPD phenotypes of a root endophytic fungus, *Phialocephala fortinii*, at a primary successional site on a glacier forefront. *New Phytologist* 141, 333-344.
9. Grünig CR, Sieber TN, Rogers SO, Holdenrieder O, 2002. Spatial distribution of dark septate endophytes in a confined forest plot. *Mycological Research* 106, 832-840.
10. Queloz V, Grünig CR, Sieber Thomas N, Holdenrieder O, 2005. Monitoring the spatial and temporal dynamics of a community of the tree-root endophyte *Phialocephala fortinii* s.l. *New Phytologist* 168, 651-660.
11. Grünig CR, Duo A, Sieber TN, 2006. Population genetic analysis of *Phialocephala fortinii* s.l. and *Acephala applanata* in two undisturbed forests in Switzerland and evidence for new cryptic species. *Fungal Genetics and Biology* 43, 410-421.
12. Delaloye R, Reynard E, Lambiel C, Marescot L, Monnet R, 2003. Thermal anomaly in a cold scree slope (Creux du Van, Switzerland), in: Phillips M, Springman S, Arenson LU (Eds), *Permafrost: proceedings of the Eighth International Conference on Permafrost, Zurich, Switzerland, 21-25 July 2003*. Balkema, Lisse, pp. 175-180.
13. Moor M, 1954. Fichtenwälder im Schweizer Jura. *Plant Ecology* 5-6, 542-552.
14. Troutot C, Farron L, JeanRichard S, Fiechter A, Mulhauser B, Buttler A, Schaer J-P, Stettler R, Aragno P-O, Burkhard M, Meia J, 1999. *Nature au Creux du Van*, 2nd ed. Editions du Club Jurassien, Neuchâtel.
15. Grünig CR, 2004. Population biology of the tree-root endophyte *Phialocephala fortinii*, *Forest Sciences*. Swiss Federal Institute of Technology, Zürich, p. 119.
16. Grünig CR, Sieber TN, Holdenrieder O, 2001. Characterisation of dark septate endophytic fungi (DSE) using inter-simple-sequence-repeat-anchored polymerase chain reaction (ISSR-PCR) amplification. *Mycological Research* 105, 24-32.
17. Sambrook J, Russell DW, 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3 ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY.
18. Grünig CR, Linde CC, Sieber TN, Rogers SO, 2003. Development of single-copy RFLP markers for population genetic studies of *Phialocephala fortinii* and closely related taxa. *Mycological Research* 107, 1332-1341.
19. Agapow PM, Burt A, 2001. Indices of multilocus linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Notes* 1, 101-102.
20. Nei M, 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York.
21. Crow JF, Kimura M, 1970. *An introduction to population genetics*. Harper and Row, New York.
22. Pielou EC, 1977. Association between pairs of species I: Individuals in discrete habitable units, *Mathematical Ecology*. John Wiley & Sons, New York, pp. 203-239.
23. Schneider S, Roessli D, Excoffier L, 2000. *Arlequin: A software for population genetic analysis. Version 2.001*. Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneva, Switzerland.
24. Nuessli N, 2005. Populationsstruktur des Wurzelendophyten *Phialocephala fortinii* in Baumschulen, *Professur Forstschutz und Dendrologie*. Eidgenössische Technische Hochschule Zürich, Zürich.
25. Delaloye R, Reynard E, 2001. Les éboulis gelés du Creux du Van (Chaîne du Jura, Suisse). *Environnements périglaciaires (Association française du Périglaciaire)* 8, 118-129.
26. Frenot Y, Bergstrom DM, Gloaguen JC, Tavenard R, Strullu DG, 2005. The first record of mycorrhizae on sub-Antarctic Heard Island: a preliminary examination. *Antarctic Science* 17, 205-210.

27. Schmidt N, Bolter M, 2002. Fungal and bacterial biomass in tundra soils along an arctic transect from Taimyr Peninsula, central Siberia. *Polar Biology* 25, 871-877.
28. Addy HD, Hambleton S, Currah RS, 2000. Distribution and molecular characterization of the root endophyte *Phialocephala fortinii* along an environmental gradient in the boreal forest of Alberta. *Mycological Research* 104, 1213-1221.
29. Currah RS, Tsuneda A, 1993. Vegetative and reproductive morphology of *Phialocephala fortinii* (Hyphomycetes, Mycelium radialis atrovirens) in culture. *Transactions of the Mycological Society of Japan* 34, 345-356.
30. Holdenrieder O, Sieber TN, 1992. Fungal association of serially washed healthy non-mycorrhizal roots of *Picea abies*. *Mycological Research* 96, 151-156.
31. Melin E, 1921. Über die Mykorrhizapilze von *Pinus sylvestris* L. und *Picea abies* (L.) Karst. (vorläufige Mitteilungen). *Svensk Botanisk Tidskrift* 15, 192-203.
32. Read DJ, Haselwandter K, 1981. Observations on the mycorrhizal status of some alpine plant communities. *New Phytologist* 88, 341-345.
33. Richard C, Fortin J-A, 1974. Distribution géographique, écologie, physiologie, pathogénicité et sporulation du mycélium radialis atrovirens. *Phytoprotection* 55, 67-88.
34. Cepicka I, Kutigova K, Tachezy J, Kulda J, Flegl J, 2005. Cryptic species within the *Tetratrichomonas gallinarum* species complex revealed by molecular polymorphism. *Veterinary Parasitology* 128, 11-21.
35. Fenchel T, 2005. Cosmopolitan microbes and their 'cryptic' species. *Aquatic Microbial Ecology* 41, 49-54.
36. Matute DR, McEwen JG, Montes BA, San-Blas G, Bagagli E, Rauscher JT, Restrepo A, Morais F, Nino-Vega G, Taylor JW, 2006. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Molecular Biology and Evolution* 23, 65-73.
37. Pringle A, Baker DM, Platt JL, Wares JP, Latge JP, Taylor JW, 2005. Cryptic speciation in the cosmopolitan and clonal human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Evolution* 59, 1886-1899.
38. Douhan GW, Rizzo DM, 2005. Phylogenetic divergence in a local population of the ectomycorrhizal fungus *Cenococcum geophilum*. *New Phytologist* 166, 263-271.
39. Salamati S, Zhan J, Burdon JJ, McDonald BA, 2000. The genetic structure of field populations of *Rhynchosporium secalis* from three continents suggests moderate gene flow and regular recombination. *Phytopathology* 90, 901-908.
40. Taylor JW, Jacobson DJ, Fisher MC, 1999. The evolution of asexual fungi: Reproduction, speciation and classification. *Annual Review of Phytopathology* 37, 197-246.
41. Tibayrenc M, 1995. Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. *Advances in parasitology* 36, 48-115.
42. Judson OP, Normark BB, 1996. Ancient asexual scandals. *Tree* 11, 41-46.
43. Pontecorvo G, 1956. Parasexual Cycle in Fungi. *Annual Review of Microbiology* 10, 393-400.
44. Piercey MM, Graham SW, Currah RS, 2004. Patterns of genetic variation in *Phialocephala fortinii* across a broad latitudinal transect in Canada. *Mycological Research* 108, 955-964.
45. Burga CA, Perret R, 1998. *Vegetation und Klima der Schweiz seit dem jüngeren Eiszeitalter*. Ott Verlag, Thun.
46. Kochkina GA, Ivanushkina NE, Karasev SG, Gavrish EY, Gurina LV, Evtushenko LI, Spirina EV, Vorob'eva EA, Gilichinskii DA, Ozerskaya SM, 2001. Survival of micromycetes and actinobacteria under conditions of long-term natural cryopreservation. *Microbiology* 70, 356-364.