

Écologie et biologie reproductive de la Truffe noire
(*Tuber melanosporum* Vittad.)



Ecology and reproductive biology of the black Truffle
(*Tuber melanosporum* Vittad.)

Préambule

« En général, les secrets de la nature sont si difficiles à dévoiler que les efforts de tous les chercheurs de bonne volonté peuvent ne pas être inutiles ; souvent même un heureux hasard amène des révélations que la science a été impuissante à découvrir. Puisse-t-il en être ainsi pour la truffe, dont la génération ou reproduction a mis la patience des plus savants naturalistes à une si rude épreuve ! »

Charler Kiefer

Études sur la génération et la culture de la truffe, 1879

Cent quarante ans plus tard, la patience des naturalistes tient bon et la communauté internationale qui s'intéresse à la Truffe commence à percer à jour les secrets de sa reproduction. Cette thèse, préparée au sein de l'Institut de Systématique, Évolution et Biodiversité du Muséum national d'Histoire naturelle (Paris) sous la direction de Marc-André Selosse, s'inscrit dans la lignée des nombreux travaux déjà effectués. Elle n'aurait pu voir le jour sans la participation bénévole de nombreux trufficulteurs et l'aide précieuse du Service de Systématique Moléculaire.

Le terme « truffe » désigne plusieurs espèces de champignons hypogés, parmi lesquelles les Truffes « vraies » qui appartiennent au genre *Tuber*. Cette thèse s'intéresse en particulier à une espèce donnée, *Tuber melanosporum*, la Truffe noire ou Truffe du Périgord. On utilisera ici le terme « Truffe » avec une majuscule pour désigner les espèces appartenant au genre *Tuber* (Truffe noire, Truffe de Bourgogne, etc.) et « truffe » sans majuscule pour parler des fructifications souterraines comestibles.

Les Truffes ont fait l'objet de nombreux travaux de recherche, mais leur écologie et leur cycle de vie restent encore partiellement inconnus. Cette thèse s'attache d'une part à mieux comprendre certains aspects de la reproduction de la Truffe noire et les conséquences de son introduction à travers le monde. Elle analyse d'autre part les interactions qui existent entre les Truffes et les plantes herbacées avec lesquelles elles coexistent, en élargissant finalement l'analyse à d'autres champignons forestiers. Espérons que ces esquisses de réponse puissent elles aussi *ne pas être inutiles* !



Remerciements

Quelques lignes ne suffiront pas à retranscrire la multitude d'interactions mutualistes dont résulte cette thèse, ni ma reconnaissance envers chacune d'entre elles.

Marc-André, merci de m'avoir fait confiance, de m'avoir aiguillée quand j'en avais besoin et laissé une grande liberté le reste du temps, et d'avoir considéré que la formation à la biologie microbienne incluait aussi bien le travail de laboratoire que les balades en forêt et les dégustations de vin. Merci Martina, Daniel, Lucie, Patricia et Claude d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse. Merci Aurélie, Christophe et Franck pour l'écoute bienveillante et les conseils judicieux lors des comités de thèse ou en dehors.

Merci à tous les trufficulteurs et trufficultrices qui ont donné des truffes, des plantes, des conseils et du temps au cours de ces trois ans. Merci entre autres à Francis Caulet, Hervé Covès, Henri Frochot, Laurent Genola, Jean-Paul Laurents et Christophe Robin pour leur disponibilité et leur confiance dans la recherche. Merci à toutes les personnes qui m'ont offert leur soutien technique, scientifique et psychologique pendant cette thèse : Josie, Céline, Delphine, Thomas, Régis, Jawad et Carole au SSM ; Elisa, Franck et Marie-Pierre à Montpellier ; Flora, Aurélie, Simone, Claude et Francis à Nancy ; Pierre-Emmanuel, Diederik, Daniel et Jérôme à Dijon. Merci à toute l'équipe du secrétariat de l'ISYEB, Sabrina, Samia, Sylvianne, Nora, Güzide et tous les autres sans qui rien ne serait possible.

Merci à celles et ceux qui ont partagé le quotidien du Muséum et qui participent à cette ambiance si chaleureuse du 3^{ème} Crypto – ce joyeux remue-méninge. Félix, l'aventure continue dans les champs et sur les ponts ! Florent et Chantal, merci pour votre bienveillance et toutes les discussions scientifiques et horticoles. Conrado, Myriam et Ninon, Élie, Tomas, Isabel, Bethany, Pauline, Benoît, Bastien et Rémi, merci pour votre présence et votre bonne humeur. Merci aux jardiniers, Philippe, Hélène et les autres, qui nous offrent un cadre de travail hors norme.

Merci à l'équipe de l'école doctorale pour sa disponibilité et sa bienveillance : Nathalie, Anaïs et Mahjoubia, Vincent et Jérôme. Un immense merci à tous les membres du département des formations, particulièrement à Émilie qui nous a laissé une grande liberté dans les enseignements dispensés et à Christine qui a toujours géré les détails pratiques même en dernière minute. Merci à tous les professeurs relais et surtout Alexandra, Natacha et Romina pour les échanges enrichissants et encourageants sur l'enseignement dans le secondaire. Merci Félix, Alice, Charline, Olivier, Élie et Juliette d'avoir partagé mes premières heures devant des élèves.

Merci enfin à toutes celles et tous ceux sans qui rien n'aurait d'intérêt. Celles et ceux avec qui on défait et on refait le monde, on partage un repas, une lecture ou un poème, avec qui on discute, on décortique, on s'oppose, on s'inspire, on apprend et on enseigne, on cherche de nouvelles voies, on imagine l'avenir adossé à la colline, on fait du pain, on plante des graines, on fait la sieste au soleil et on s'émerveille.



Sommaire

Lexique	9
Liste des acronymes	10
I Introduction	11
1 La Truffe noire, un champignon ectomycorhizien	12
1.1 Origine des truffes et découverte de l'association symbiotique	12
1.2 Fonctionnement général des symbioses mycorhiziennes	13
1.3 Rôles connus de la symbiose dans le cycle de vie de la Truffe	17
2 Biologie reproductive de la Truffe noire	19
2.1 La reproduction des champignons	19
2.2 Connaissances actuelles sur le cycle de vie de la Truffe	20
2.3 Structure génétique des populations de Truffe noire	24
3 La Truffe noire en Europe et dans le monde	27
3.1 Exigences pédo-climatiques de la Truffe noire	27
3.2 La trufficulture en Europe	27
3.3 Trufficulture et domestication de la Truffe noire	30
4 La Truffe noire et les plantes herbacées	33
4.1 Le brûlé, aspect particulier du cycle de vie de la Truffe	33
4.2 L'endophytisme, une interaction asymptotique	36
4.3 Les écologies multiples des champignons	38
5 Problématiques et organisation de la thèse	41
II Résultats	43
1 Apports à la biologie reproductive de la Truffe noire	44
1.1 Vérification préalable de l'unicité des partenaires parentaux	44
1.2 Article I : mise à jour sur le cycle de vie de la Truffe noire	45
1.3 Article II : estimation de la banque de spores dans les brûlés	51
2 Génétique des populations en zone d'introduction	67
2.1 Contexte et problématique	67
2.2 Matériel et méthodes	68
2.3 Résultats : traits conservés et traits variables entre la France et l'Australie	72

2.4	Discussion : une introduction récente et multiple	76
2.5	Conclusion	83
3	Preuves moléculaires de l'endophytisme de la Truffe noire	84
3.1	Contexte et résumé de l'article III	84
3.2	Article III	85
4	Endophytisme de la Truffe noire et de la Truffe de Bourgogne	96
4.1	Contexte et résumé de l'article IV	96
4.2	Article IV	97
5	Endophytisme des champignons ectomycorhiziens	137
5.1	Contexte de l'étude et problématiques	137
5.2	Matériel et méthodes	139
5.3	Résultats	142
5.4	Discussion : ectomycorhize et endophytisme opportuniste	150
III	Discussion et perspectives	153
1	Biologie reproductive de la Truffe noire, endémique et introduite	154
1.1	Les spores, une fonction mâle dans la reproduction ?	154
1.2	Mécanismes à l'origine de la structuration spatiale	157
1.3	Prochains mystères à élucider	160
2	Endophytisme des Truffes et lien à la filière de production	162
2.1	Premières preuves de l'endophytisme des Truffes	162
2.2	Les Truffes dans leur écosystème	164
3	Endophytisme et niche écologique des champignons	166
3.1	La double niche écologique ectomycorhizienne et endophyte, une caractéristique répandue ?	166
3.2	Évolution de la double niche écologique mycorhizienne-endophyte	168
3.3	Repenser la niche écologique des champignons	169
	Conclusion	171
	Annexes	173
1	Les secrets de la reproduction de la Truffe noire (Planet-vie, 2017)	174
2	<i>Time to re-think fungal ecology ?</i> (New Phytologist, 2018)	181
	Bibliographie	187

Lexique

Ascocarpe : organe reproductif des Ascomycètes, issu de la fusion de deux filaments fongiques, au sein duquel sont formées les spores par méiose. L'ascocarpe peut être ouvert (apothécies des Pézizes), fermé (cléistothèces des Truffes) ou entre les deux (*e.g.* périthèces).

Asque : chez les Ascomycètes, cellule qui contient les spores issues de la méiose.

Biotrophie : caractéristique des champignons qui se nourrissent d'organismes vivants sans les tuer. Les champignons biotrophes peuvent être mutualistes, commensaux ou parasites non létaux.

Caryogamie : fusion des noyaux des deux cellules reproductrices lors de la fécondation. La caryogamie fait suite à la *plasmogamie*.

Dioécie : chez les plantes, caractéristique des espèces dont les individus sont strictement mono-sexués, c'est-à-dire que chaque plant ne porte que des organes reproducteurs mâles ou que des organes reproducteurs femelles.

Genet : voir *génotype*.

Génotype : ensemble des allèles portés par un individu, défini pour tout ou partie de ses gènes. Chez les animaux, un individu est souvent défini par un génotype unique, c'est-à-dire une combinaison allélique unique pour l'ensemble des gènes de cet individu. Chez les plantes et les champignons, la multiplication végétative (ou clonale) est fréquente et conduit à la formation de plusieurs individus au génotype identique (au moins juste après la multiplication, avant l'apparition de nouvelles mutations). On parle alors de *genet* pour désigner l'ensemble des individus possédant le même génotype et issus d'un même événement de multiplication, et de *ramet* pour parler de chaque entité physiquement séparée des autres entités individuelles (par exemple un rejet pour un arbre, un ascocarpe pour un champignon).

Hyphe : filament fongique de quelques micromètres de diamètre, composé d'une paroi chitineuse protégeant une membrane plasmique qui délimite les cellules.

Microbiote : ensemble des microorganismes (levures, virus, bactéries, eucaryotes microscopiques) vivant sur ou dans un autre organisme. Ces microorganismes peuvent être présents sans impact sur leur hôte (commensalisme) ou entrer en interaction avec lui (mutualisme, parasitisme).

Mycélium : ensemble des hyphes d'un champignon.

Nécrotrophie : caractéristique des champignons qui se nourrissent d'organismes vivants et provoquent leur mort. Les champignons pathogènes sont généralement nécrotrophes, et certains parasites peuvent l'être aussi selon l'intensité du parasitisme.

Périthèce : voir *ascocarpe*.

Plasmogamie : fusion des membranes plasmiques des deux cellules reproductrices lors de la fécondation, donnant naissance à un mycélium dicaryotique (à deux noyaux).

Ramet : voir *génotype*.

Saprotrophie : caractéristique des champignons qui se nourrissent de matière organique morte en la dégradant et en absorbant les nutriments résultant de cette dégradation.

Spore : chez les champignons, structure unicellulaire issue de la méiose (méiospore) ou de la mitose (mitospore) qui donne un nouvel individu après germination. Souvent protégée par une paroi résistante, la spore peut germer lorsque la paroi faiblit, par exemple après son passage dans le tube digestif d'un animal.

Valeur sélective : capacité d'un individu porteur d'un allèle, d'un génotype ou d'un trait phénotypique donné à se reproduire. La valeur sélective (ou *fitness* en anglais) mesure la sélection naturelle qui s'exerce sur un individu dans un environnement donné (elle varie donc dans le temps et l'espace), en prenant en compte sa survie et sa fécondité (nombre de descendants viables et fertiles).

Liste des acronymes

ADN : acide désoxyribonucléique

AM : endomycorhize à arbuscules

ARN : acide ribonucléique

CM : endomycorhize à Mucoromycète (en anglais *coil-forming endomycorrhiza*)

comm. pers. : communication personnelle

EcM : ectomycorhize

ErM : mycorhize éricoïde

FISH : hybridation *in situ* en fluorescence (en anglais *fluorescent in situ hybridization*)

IBD : isolement par la distance (en anglais *isolation by distance*)

ITS : en anglais *internal transcribed spacer*

MAT : type sexuel (en anglais *mating type*)

MLG : génotype multi-locus

NGS : séquençage haut-débit (en anglais *next generation sequencing*)

NM : non mycorhizien(ne)

OrM : mycorhize d'orchidée

OTU : unité taxonomique opérationnelle (en anglais *operationnal taxonomic unit*)

PCR : réaction en chaîne par polymérase (en anglais *polymerase chain reaction*)

qPCR : PCR quantitative

I Introduction

La Truffe noire, un champignon ectomycorhizien

1.1 Origine des truffes et découverte de l'association symbiotique

« Il y a presque lieu de croire que ce sont des plantes, et moins elles le paraissent, plus elles piquent la curiosité des Botanistes. »

Pierre-Barthélémy Pennier de Longchamps
Dissertation physico-médicale sur les Truffes et sur les Champignons, 1766

Connues depuis l'Antiquité, « de Cicéron qui les nomme les *enfants de la terre*, tandis que Porphyre (...) les appellera, trois siècles plus tard, les *enfants des dieux* » (Chatin, 1869a), les truffes ont fait l'objet de nombreux débats. Au cours du XIX^{ème} siècle, plusieurs savants se penchent sur la question de leur nature et de leur origine : certains y voient « une sorte de gale produite sur les racines des arbres à la suite de la piqûre d'un insecte », tandis que selon d'autres « la truffe serait un produit de l'excrétion radiculaire de certains arbres ». Mais à cette époque, plusieurs naturalistes ont déjà proposé une autre réponse : « la truffe n'est pas autre chose qu'un champignon hypogé » (Mouillefert, 1888).

Au sens large, le terme *truffe* désigne en effet les structures reproductives d'organismes appartenant au règne des Eumycètes, ou champignons vrais¹, groupe au sein duquel la capacité à former des truffes est apparue plus d'une centaine de fois (Tedersoo *et al.*, 2010). Une truffe est un organe souterrain (hypogé), fermé sur lui-même (contrairement aux champignons composés d'un pied et d'un chapeau). Il s'agit d'une fructification issue de la reproduction sexuée et qui contient donc les spores*², englobées dans une matrice (la gléba), elle-même protégée par un épiderme mélanisé et écailleux (le périidium).

Les Truffes consommées dès l'Antiquité, telles que les Truffes du désert (ou terfèzes, *Terfezia* spp.) ou les Truffes « vraies » (*Tuber* spp.), appartiennent aux Ascomycètes (Hansen et Pfister, 2006) ; leurs structures reproductives sont donc appelées ascocarpes*. Les Truffes au sens strict appartiennent au genre *Tuber*, qui compte au moins 180 espèces (Bonito *et al.*, 2013), dont seules quelques unes sont connues pour leurs qualités gastronomiques (Fig. 1). Les plus importantes dans le contexte européen sont la Truffe blanche d'Alba (*T. magnatum* Pico 1788) que l'on trouve surtout dans le Piémont italien ; la Truffe du Périgord (*T. melanosporum* Vittad.

1. Pour plus d'informations sur les différents groupes inclus dans le terme *champignon*, voir l'article *Qu'est-ce qu'un champignon ?* publié en mars 2019 sur le site de vulgarisation <https://planet-vie.ens.fr>.

2. Les termes suivis d'un astérisque sont définis dans le lexique page 9.

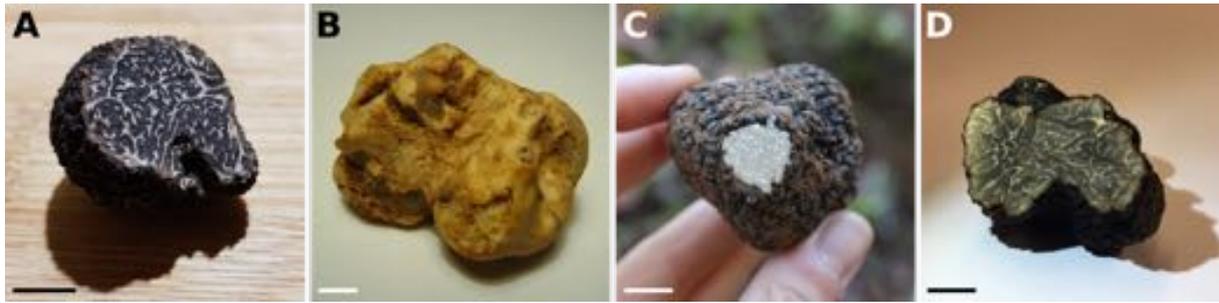


Figure 1 – Différentes truffes du genre *Tuber* : (A) *T. melanosporum*, (B) *T. magnatum*, (C) *T. aestivum* var. *uncinatum*, (D) *T. brumale*. Les barres d'échelle représentent 1 cm. Photos (A,C) L. Schneider-Maunoury, (B) M. Plassio/Wikimedia, (D) E. Grinfeder/MNHN.

1831) ; la Truffe blanche d'été (*T. aestivum* Vittad. 1831) et sa forme automnale la Truffe de Bourgogne (*T. aestivum* var. *uncinatum* Chatin 1887) ou encore *T. brumale* (Vittad. 1831). Certains amateurs consomment d'autres espèces moins connues, comme *T. borchii* (Vittad. 1831).

Les truffes sont récoltées au pied de diverses espèces d'arbres (Chatin, 1869b). Le lien qui unit l'arbre et la Truffe a été source de controverses pendant longtemps (Le Tacon, 2017), jusqu'à ce que le forestier Albert Bernhard Frank soit mandaté par le gouvernement de Prusse pour lever le mystère. Guidé par les travaux de Boudier (1876) et Reess (1880) qui avaient décrit l'interaction entre des racines de pin et le mycélium* d'*Elaphomyces* (truffe des cerfs), Frank observe les racines des arbres truffiers et constate que leurs extrémités sont ramifiées et entourées de filaments qu'il attribue à la Truffe (Frank, 1885). Il forge alors le terme « mycorhize » pour désigner cet organe mixte, du grec *mukès*, champignon et *rhiza*, racine.

Frank avait reconnu dans les mycorhizes un organe d'échange, en insistant sur l'importance de l'interaction pour la nutrition de l'arbre (Frank, 1885, 1892). On sait aujourd'hui que l'association bénéficie à la fois à l'arbre et au champignon, ce qui la range dans la catégorie des symbioses (Smith et Read, 2008). On doit à Frank lui-même le terme de *Symbiotismus* pour désigner l'association intime de deux organismes, décrite alors qu'il observait l'interaction entre l'algue et le champignon qui forment les lichens (Frank, 1877). Heinrich Anton de Bary transforme, sans citer Frank, ce terme en « symbiose », qu'il définit comme l'association de deux organismes différents qui coexistent durablement (de Bary, 1878). En français, le terme de symbiose désigne souvent plus précisément une association physique durable à *benefices réciproques* pour chacun des partenaires (Selosse, 2000) : c'est la définition qui sera retenue dans cette thèse.

1.2 Fonctionnement général des symbioses mycorhiziennes

1.2.1 Une association à bénéfices réciproques

La symbiose mycorhizienne associe donc de manière intime un partenaire végétal et un partenaire fongique, qui échangent protection et alimentation (van der Heijden *et al.*, 2015). L'avantage pour la plante est directement visible : lorsqu'on cultive une plante dans un sol stérile, sa croissance et sa survie en sont affectées (Mosse, 1957). L'absence de champignons mycorhiziens

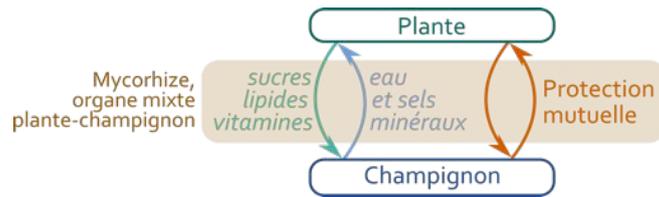


Figure 2 – Fonctionnement des symbioses mycorhiziennes : les transferts provenant du partenaire végétal sont indiqués en vert et ceux provenant du partenaire fongique en bleu, la protection en orange.

peut même empêcher complètement la germination et la croissance de leur arbre-hôte : c’est par exemple le cas du pin *Pinus patula* dont l’introduction en Afrique ne fut efficace que lorsque les jeunes plants furent importés avec leur sol (Mikola, 1970).

Les champignons mycorhiziens fournissent en effet à leur plante-hôte de l’eau et des minéraux qu’ils vont puiser à distance des racines (Marschner et Dell, 1994 ; Garbaye, 2013 ; Fig. 2). La taille des hyphes* fongiques (quelques micromètres de diamètre) et leur croissance rapide permettent aux champignons d’explorer un volume de sol bien supérieur à celui disponible pour les racines. Ils peuvent ainsi récupérer des éléments rares, tels que le phosphore, peu mobile et rapidement épuisé à proximité des racines (Jakobsen, 1995 ; Wipf *et al.*, 2019). Par ailleurs, certains champignons mycorhiziens sont aussi capables d’extraire des nutriments de la matière organique du sol (Lindahl et Tunlid, 2015 ; Nicolás *et al.*, 2019) ou directement des minéraux (Landeweert *et al.*, 2001). Ils sécrètent pour cela des acides ou des radicaux libres qui dissolvent roche ou complexes organiques et libèrent des nutriments (Kohler *et al.*, 2015 ; Op De Beeck *et al.*, 2018). En parallèle, l’arbre fournit au champignon des produits carbonés issus de la photosynthèse, essentiellement des sucres (van der Heijden *et al.*, 2015), mais aussi des lipides (Rich *et al.*, 2017) et parfois des vitamines (Nagae *et al.*, 2016 ; Fig. 2). Ce flux de carbone vers le champignon représente une part importante des photosynthétats, de 10 à 50 % des produits de la photosynthèse selon le contexte et le type de mycorhize (van der Heijden *et al.*, 2015).

Par ailleurs, les partenaires de la symbiose mycorhizienne se protègent mutuellement (Smith et Read, 2008 ; Fig. 2). Le champignon bénéficie à l’intérieur des racines d’un environnement plus stable que le sol environnant et ses hyphes intra-racinaires, qui stockent souvent des réserves, sont à l’abri des mycophages. Les mycorhizes augmentent la tolérance des plantes à un certain nombre de stress abiotiques tels que la sécheresse, l’acidité du sol, la salinité ou les métaux toxiques (Finlay, 2004 ; Lenoir *et al.*, 2016). En occupant la surface racinaire, elles empêchent ou limitent la colonisation par des micro-organismes pathogènes et stimulent de plus la réponse immunitaire des plantes (Pozo et Azcón-Aguilar, 2007 ; Jung *et al.*, 2012 ; Cameron *et al.*, 2013).

1.2.2 Variations morphologiques autour des mycorhizes

Les symbioses mycorhiziennes concernent plus de 85 % des plantes terrestres (Wang et Qiu, 2006 ; Brundrett et Tedersoo, 2018) et peuvent être distinguées selon leurs caractéristiques morphologiques. La symbiose la plus répandue (72 % des plantes terrestres ; Brundrett et Tedersoo, 2018 ; Fig. 3) est la symbiose endomycorhizienne à arbuscules (AM), dans laquelle les hyphes fongiques pénètrent à l’intérieur du cortex racinaire en franchissant les parois végétales

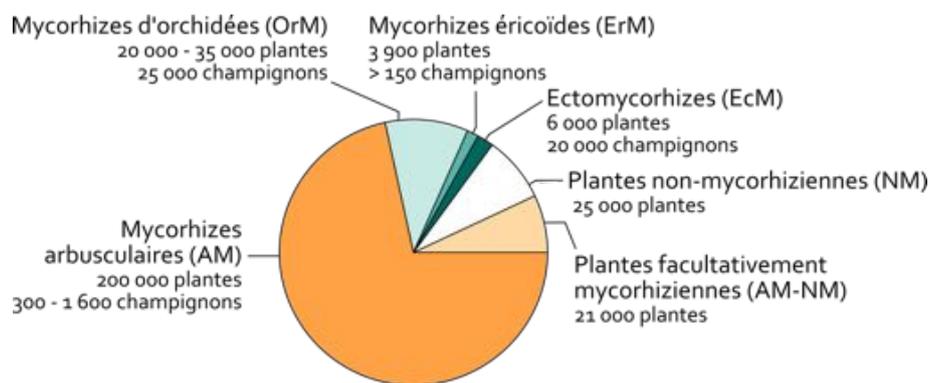


Figure 3 – Proportion de chaque type de mycorhize parmi les plantes terrestres. Les nombres d'espèces végétales et fongiques concernées sont issus de van der Heijden *et al.* (2015) et Brundrett et Tedersoo (2018).

et repoussent les membranes plasmiques pour mettre en place des structures ramifiées appelées arbuscules. Ces arbuscules, qui démultiplient la surface de contact entre membranes plasmiques des hyphes et des cellules végétales, constituent la principale surface d'échange entre les deux partenaires. Les champignons AM appartiennent aux Gloméromycètes (Spatafora *et al.*, 2017).

Plus récemment, des endomycorhizes impliquant des Mucoromycètes (CM) ont aussi été mises en évidence, mais leur importance écologique reste mal établie (Bidartondo *et al.*, 2011). Les hépatiques et les anthocérotes, qui ont divergé très tôt dans la phylogénie des plantes terrestres, ainsi que les lycopodes et les fougères, sont souvent associés à des champignons AM ou CM (Strullu-Derrien *et al.*, 2018). Les premières preuves fossiles d'endomycorhizes AM et CM, datées du Dévonien (400 Ma), montrent que ces associations étaient déjà diversifiées (Strullu-Derrien *et al.*, 2014, 2018). Ces indices suggèrent le rôle majeur joué par l'association endomycorhizienne dans la colonisation du milieu aérien par les végétaux (Selosse et Le Tacon, 1998).

Les mycorhizes d'orchidées (OrM) concernent seulement les orchidées, soit la deuxième plus grande famille d'Angiospermes (10 % des plantes terrestres ; Brundrett et Tedersoo, 2018 ; Fig. 3). Il s'agit aussi d'une endomycorhize, mais les partenaires fongiques mettent en place entre la paroi et la membrane plasmique des cellules racinaires des structures spiralées appelées pelotons, qui ne persistent que quelques jours avant d'être dégradés. Les champignons impliqués appartiennent principalement aux Ceratobasidiaceae, Serendipitaceae et Tullasnellaceae, trois familles de Basidiomycètes (Dearnaley *et al.*, 2012). Les mycorhizes éricoïdes (ErM) ressemblent morphologiquement aux OrM, mais impliquent exclusivement certaines espèces de la famille des Éricacées, soit environ 1,5 % des plantes terrestres (Brundrett et Tedersoo, 2018 ; Fig. 3). Les champignons concernés appartiennent aux Ascomycètes et aux Basidiomycètes, mais leur diversité reste peu explorée (Kohout, 2017).

Enfin, la quatrième catégorie de mycorhize reconnue est celle qui avait été décrite par Frank en 1885 : il s'agit des ectomycorhizes (EcM), nommées ainsi à cause du manchon d'hyphes qui entoure l'extrémité des racines (Fig. 4). Décrit dès 1840 par le forestier Theodor Hartig sans qu'il n'en soupçonne la nature fongique (Le Tacon, 2017), ce manteau est composé d'hyphes qui s'immiscent entre les cellules sans traverser les parois, formant le réseau de Hartig (Smith et

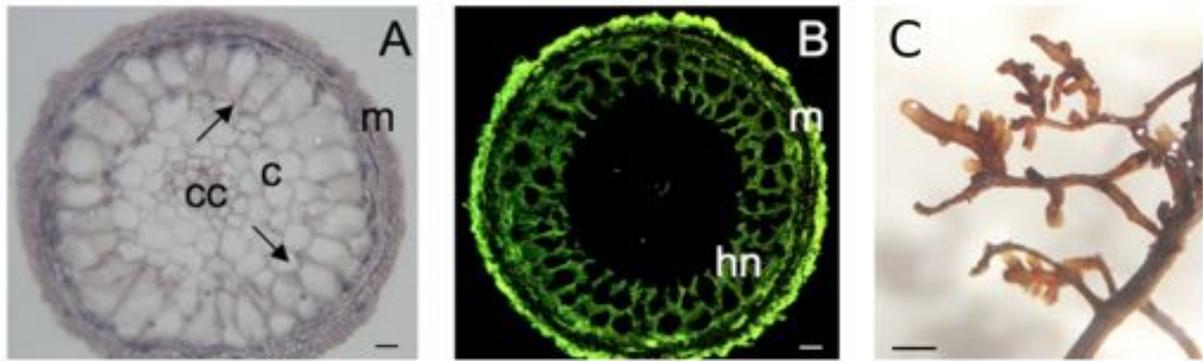


Figure 4 – Ectomycorhizes de *Tuber melanosporum*. (A) Coupe transversale d’ectomycorhize observée au microscope optique. (B) Coupe transversale d’ectomycorhize observée au microscope à épifluorescence, les hyphes de *T. melanosporum* sont marqués en vert. (C) Ectomycorhizes de *T. melanosporum* sur racine de noisetier. *cc* : cylindre central, *c* : cellules corticales, *hn* : réseau de Hartig, *m* : manteau. Les barres d’échelle représentent 200 μm (A,B) et 2 mm (C). Photos (A,B) tirées de Martin *et al.* (2010) et reproduites avec l’aimable autorisation de R. Balestrini, (C) L. Schneider-Maunoury.

Read, 2008). Les EcM ne concernent que 2 % des plantes terrestres (Brundrett et Tedersoo, 2018 ; Fig. 3) mais jouent un rôle majeur dans la structuration des écosystèmes à l’échelle du globe en s’associant avec des arbres aux populations denses et largement distribuées, principalement en zones tempérées (Courty *et al.*, 2010 ; Peter *et al.*, 2013). Cette association serait apparue entre 60 et 80 fois dans l’évolution des champignons (Tedersoo et Smith, 2013, 2017 ; Martin *et al.*, 2016), à la fois chez les Ascomycètes et les Basidiomycètes, mais aussi chez des Mucoromycètes (Endogonales ; Spatafora *et al.*, 2017 ; Brundrett et Tedersoo, 2018).

1.2.3 Évolution des symbioses mycorhiziennes

Notons que parmi les 15 % de plantes terrestres restant, seuls 8 % ne s’associent à aucun champignon mycorhizien (plantes non-mycorhiziennes, NM ; Fig. 3) : il s’agit essentiellement de plantes spécialistes, telles que des carnivores, parasites ou épiphytes (Brundrett et Tedersoo, 2018). Les derniers 7 % sont parfois trouvés en association avec des partenaires fongiques AM et parfois sans, selon l’habitat ou la communauté végétale dans lesquels ils se trouvent (plantes facultativement mycorhiziennes, NM-AM ; Fig. 3). Ces espèces végétales au statut mycorhizien inconstant témoignent de l’histoire évolutive des symbioses mycorhiziennes. La distribution des types de mycorhizes dans la phylogénie des plantes indique que l’ancêtre commun des plantes terrestres était probablement associé avec des champignons AM et/ou CM et que l’état NM serait dû à une perte secondaire de la symbiose (Maherali *et al.*, 2016 ; Strullu-Derrien *et al.*, 2018). L’état facultativement mycorhizien illustrerait quant à lui l’affaiblissement de la symbiose pouvant mener à la perte de l’association.

D’autre part, l’existence d’espèces facultativement mycorhiziennes souligne aussi la labilité de l’association, qui dépend de nombreux facteurs biotiques et abiotiques. En effet, l’impact de l’association sur les partenaires dépend de paramètres tels que les espèces fongique et végétale mises en présence (Klironomos, 2000 ; Walder *et al.*, 2012), la richesse de la communauté considérée ou la disponibilité en nutriments (Hoeksema *et al.*, 2010). Dans certains cas, la symbiose peut ne

pas bénéficier à la plante-hôte, voire réduire sa croissance, suggérant une relation de parasitisme (Hoeksema *et al.*, 2010; Walder *et al.*, 2012; Gibert *et al.*, 2019).

Par ailleurs, plantes et champignons sont capables de réguler les flux de nutriments selon le niveau de coopération de leur partenaire : les champignons attribuent plus de nutriments aux plantes qui fournissent davantage de carbone, tandis que les plantes allouent davantage de carbone aux champignons qui apportent le plus d'azote ou de phosphore (Bever *et al.*, 2009; Kiers *et al.*, 2011; Fellbaum *et al.*, 2014). Bien que les études se concentrent généralement sur un certain aspect de la valeur sélective* du partenaire végétal (la croissance) au détriment d'autres indicateurs et que la valeur sélective du partenaire fongique ne soit jamais mesurée faute de méthodes adéquates, la relation symbiotique peut être vue à l'échelle évolutive comme un continuum entre mutualisme et parasitisme (Johnson *et al.*, 1997; Johnson et Graham, 2013; Smith et Smith, 2013).

1.3 Rôles connus de la symbiose dans le cycle de vie de la Truffe

1.3.1 Une production de truffes dépendante de la présence des arbres

Les Truffes s'associent avec leurs arbres-hôtes en symbioses EcM, formant des mycorhizes reconnaissables comme organes mixtes à leur forme et leur couleur (Fig. 4) même si l'identification du champignon à l'échelle de l'espèce requiert parfois des méthodes moléculaires (*cf.* encadré 1). *Tuber melanosporum* s'associe préférentiellement avec des espèces calcicoles comme les chênes (*Quercus ilex*, *Q. petraea* ou encore *Q. pubescens*) et les noisetiers (*Coryllus avellana*), deux essences que l'on retrouve fréquemment dans les truffières. S'il est possible d'isoler le mycélium de certaines espèces de Truffes à partir d'ectomycorhizes et de le cultiver sur un milieu adéquat (Chaze, 1943; Murat, 2004), la production d'ascocarpes n'a jamais été obtenue en l'absence de l'arbre symbiotique. Dans la première moitié du XX^{ème} siècle, Chaze et Mestas ont rapporté la production de structures apparentées à des périthèces* à partir de mycélium de *T. melanosporum*, dans lesquels ils observent des spores semblables à celles de la Truffe noire (Chaze et Mestas, 1939; Chaze, 1950). Cependant, et malgré de nombreux essais, ces résultats n'ont jamais été reproduits. L'interaction symbiotique semble donc avoir un rôle majeur si ce n'est indispensable dans la production de truffes.

Des expériences de marquage isotopique sur le terrain ont permis d'éclairer cette dépendance en mettant en évidence une partie des échanges entre les partenaires fongique et végétal. À l'aide de CO₂ marqué au carbone 13 (¹³CO₂), Le Tacon et son équipe ont montré que le carbone fixé par l'arbre au cours de la photosynthèse était en partie dérivé vers les mycorhizes, puis vers les ascocarpes (Le Tacon *et al.*, 2013). À l'inverse, lorsque la litière est marquée au ¹³C et à l'azote lourd (¹⁵N), les ascocarpes sont enrichis en ¹⁵N mais pas en ¹³C, indiquant qu'ils tirent bien leurs éléments minéraux (dont l'azote) du sol et parfois de la dégradation de la matière organique du sol (par eux ou par d'autres micro-organismes), mais que leur carbone est plutôt issu de l'association symbiotique (Le Tacon *et al.*, 2015). Ces expériences ont infirmé l'hypothèse selon laquelle les ascocarpes pouvaient survivre indépendamment de l'arbre-hôte en assurant leur nutrition carbonée à partir de la matière organique du sol (Zeller *et al.*, 2008; Le Tacon *et al.*, 2013, 2015). La symbiose joue donc un rôle majeur dans le cycle de vie de la Truffe, puisqu'elle

permet au champignon d'accumuler suffisamment de ressources pour produire sa fructification (cf. Fig. 7 p. 22).

1.3.2 Des capacités limitées pour exploiter la matière organique du sol

Par ailleurs, le séquençage du génome de *T. melanosporum* a montré que la Truffe possédait peu d'enzymes nécessaires à la dégradation de la matière organique (Martin *et al.*, 2010). Contrairement aux champignons saprotrophes*, qui tirent leur carbone de la matière organique du sol, le génome des champignons EcM contient peu de gènes codant des enzymes dégradant la paroi végétale (*plant cell wall degrading enzymes*, PCWDE; Kohler *et al.*, 2015; Peter *et al.*, 2016). Le génome de *T. melanosporum* n'échappe pas à cette règle et présente peu de gènes codant des glycoside hydrolases ou des polysaccharides lyases, impliquées dans la dégradation des sucres complexes tels que la cellulose et l'hémicellulose (Martin *et al.*, 2010). Les quelques PCWDE présentes dans le génome de la Truffe noire sont surtout exprimées dans les ectomycorhizes, suggérant que *T. melanosporum* dégrade les parois des cellules de son hôte lors de la colonisation racinaire, alors que ses qualités de saprotrophe sont limitées (Martin *et al.*, 2010).

Encadré 1 – Techniques moléculaires pour l'identification des champignons

L'identification d'une espèce requiert de pouvoir observer des structures appartenant à cette espèce et de disposer de critères pertinents pour les discriminer. Dans le cas des champignons, les fructifications sont souvent éphémères, difficiles à détecter, voire inexistantes. Les critères morphologiques, physiologiques et écologiques ne sont donc pas toujours suffisants pour accéder à l'identité d'une espèce. Vers la fin des années 90 ont été développées des techniques moléculaires d'identification, qui consistent à extraire l'ADN des fructifications, du mycélium ou encore des ectomycorhizes et à comparer cet ADN avec celui d'espèces connues. La technique utilisée au cours de cette thèse – et largement employée aujourd'hui – consiste à séquencer l'ITS (*internal transcribed spacer*, séquences d'ADN séparant les sous-unités de l'ARN ribosomique), considéré comme le « code-barre » moléculaire des champignons : une séquence suffisamment universelle pour couvrir l'ensemble du règne des Eumycètes et suffisamment variable pour distinguer différentes espèces (Schoch *et al.*, 2012).

Les séquences obtenues sont ensuite comparées entre elles et groupées selon leur niveau de ressemblance en OTU (*operationnal taxonomic units*, soit des unités taxonomiques utilisables comme approximation d'espèces). Un seuil de 97 % est souvent utilisé (Hughes *et al.*, 2009), même si des seuils plus élevés peuvent être nécessaires chez certains genres (*e.g.* Garnica *et al.*, 2016). Les OTU sont ensuite comparées aux séquences déjà connues (par exemple dans la base de données UNITE; Kõljalg *et al.*, 2013), ce qui permet de leur assigner une identité taxonomique (famille, genre, espèce... selon le niveau de ressemblance avec les séquences connues).

Biologie reproductive de la Truffe noire

2.1 La reproduction des champignons

« Rien de plus bizarre en Botanique que la végétation des champignons... »

Jean-Henri Fabre

Notes sur le mode de reproduction des Truffes

Bulletin de la Société d'Agriculture et d'Horticulture du Vauchuse, 1857

2.1.1 Reproduction asexuée et reproduction sexuée

La reproduction des champignons a longtemps été assimilée à de la génération spontanée, tant l'apparition de fructifications après une pluie peut être soudaine (Fabre, 1857). Mais l'observation minutieuse du sol permet de découvrir le mycélium et son lien aux fructifications macroscopiques que l'on appelle champignons, issues de la reproduction sexuée. La reproduction des champignons peut s'effectuer de manière asexuée (sans brassage génétique) ou sexuée (avec échange génétique entre partenaires; Billiard *et al.*, 2012; Fig. 5). La reproduction asexuée, ou végétative, reproduit l'individu de manière clonale, soit par fragmentation du mycélium, soit *via* la mise en place de spores asexuées, les conidies (Taylor *et al.*, 1999). Ces cellules, issues de mitoses (on parle de *mitospores*), permettent une dispersion aérienne de l'espèce et ont surtout été décrites chez les Ascomycètes (Guidot *et al.*, 2003; Healy *et al.*, 2013).

La reproduction sexuée, à l'inverse, fait intervenir un brassage génétique. Elle implique la fusion de deux cellules haploïdes (plasmogamie*) puis celle de leur noyau (caryogamie*), suivie par une méiose qui met en place les spores (appelées cette fois-ci *méiospores*). Plasmogamie et caryogamie sont les deux étapes de la fécondation, qui peut avoir lieu entre individus issus de la même méiose ou de méioses différentes (Fig. 5). Le type d'appariement est contrôlé par un locus de type sexuel (*mating type*, abrégé en MAT; Coppin *et al.*, 1997; Debuchy *et al.*, 2010). Au sein de chaque espèce, le locus du type sexuel abrite au moins deux gènes codant des protéines différentes : il s'agit donc en toute rigueur d'*idiomorphes*, mais on parle parfois d'allèles. La reproduction nécessite la présence simultanée des deux gènes du type sexuel (Coppin *et al.*, 1997). Certaines espèces possèdent les deux types sexuels dans leur génome haploïde et peuvent donc s'autoféconder : on parle d'autofécondation haploïde (Fig. 5) et les espèces concernées sont appelées *homothalliques*. À l'inverse, les espèces *hétérothalliques* ne possèdent qu'un gène de type sexuel et doivent donc obligatoirement se croiser avec un individu possédant l'autre type

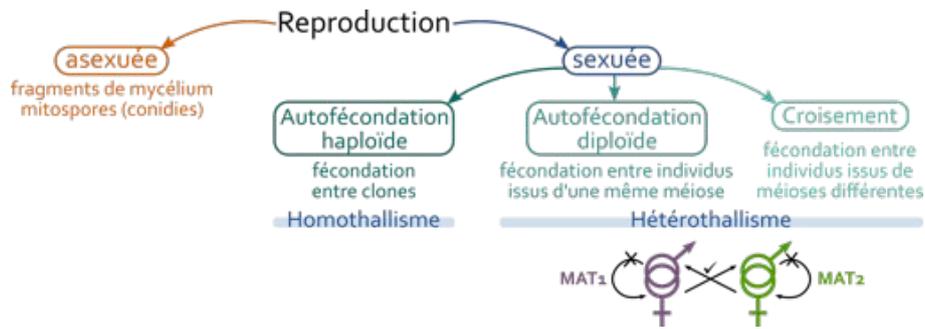


Figure 5 – Modes de reproduction et types d'appariement possibles chez les champignons (d'après Billiard *et al.*, 2012). Dans le cas des champignons hétérothalliques, comme la Truffe noire, chaque individu possède un seul type sexuel, ce qui empêche l'autofécondation mais est indépendant du rôle joué par l'individu dans la reproduction (mâle, femelle ou hermaphrodite).

sexuel. Cet individu peut être issu de la même méiose (autofécondation diploïde) : en effet, la fécondation engendre des haploïdes des deux types sexuels dans la même méiose en ratio 1/1. Il peut aussi être issu d'une autre méiose que celle dont le premier est issu (il s'agit alors d'un véritable croisement ; Fig. 5).

2.1.2 Structures reproductrices chez les champignons

Indépendamment des types sexuels qui définissent la compatibilité sexuelle entre individus, l'investissement dans la reproduction permet de distinguer (ou non) des rôles différents pour chaque partenaire. Chez certains Ascomycètes, la reproduction sexuée se fait par fusion de deux hyphes indifférenciés : il n'y a pas de différence d'investissement entre les partenaires. À l'inverse, chez d'autres elle fait intervenir des structures reproductives spécialisées (Fig. 6). Chez la plupart des Pézizales, ordre auquel appartient *T. melanosporum*, un mycélium *receveur* porte une structure différenciée (l'ascogone) munie d'un hyphe particulier (le trichogyne) qui fusionne avec un mycélium *donneur* et capte ses noyaux (Debuchy *et al.*, 2010). Les noyaux parentaux fusionnent (caryogamie), puis ce noyau diploïde subit la méiose. Dans ce cas, il y a un investissement différent entre les mycéliums donneur et receveur : le zygote se développe sur le mycélium receveur, qui investit donc davantage de ressources dans la reproduction. Ces fonctions *donneuse* et *receveuse* de noyaux sont similaires aux fonctions *mâle* et *femelle* respectivement (mais indépendantes du type sexuel porté par chaque individu ; Fig. 5 ; Nieuwenhuis *et al.*, 2011).

2.2 Connaissances actuelles sur le cycle de vie de la Truffe

2.2.1 Cycle de vie et étapes de la reproduction pendant l'année

Tuber melanosporum vit dans le sol sous forme d'hyphes dont l'ensemble forme le mycélium. Ce mycélium s'associe aux racines des arbres, formant des ectomycorhizes au sein desquelles transitent sucres et vitamines vers le champignon *versus* eau et sels minéraux vers l'arbre. Les individus fongiques qui interagissent avec les arbres bénéficient donc d'un accès à leurs ressources

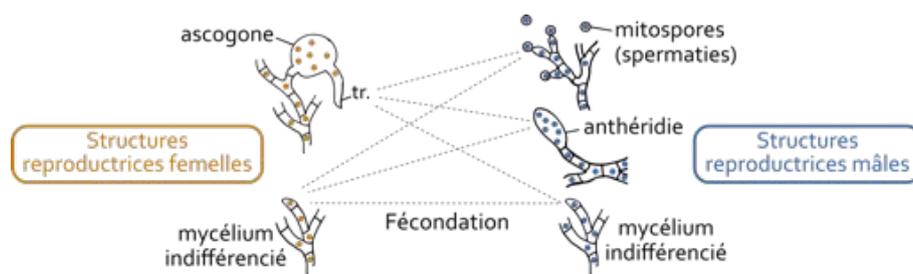


Figure 6 – Structures reproductrices chez les Ascomycètes (d’après Selosse *et al.*, 2016). *tr.* : trichogyne. Les structures impliquées dans la reproduction de la Truffe noire ne sont pas connues, mais certaines hypothèses sont rendues moins probables que d’autres par les études de génétique des populations.

carbonées, qui sont utilisées entre autre pour la croissance des ascocarpes (Le Tacon *et al.*, 2013, 2015). La formation des jeunes truffes commence au printemps et se poursuit en été (Kulifaj, 1984). Dans le courant de l’automne, les truffes grandissent jusqu’à atteindre leur maturité entre novembre et février, où elles développent leurs arômes (Fig. 7 ; Le Tacon *et al.*, 2016).

Les arômes des truffes sont dus à des composés organiques volatiles (COV), principalement des alcools (comme l’octénol responsable de l’odeur de champignon) et des molécules soufrées (comme le diméthylsulfure, composé clé de l’arôme des truffes ; Talou *et al.*, 1987 ; Splivallo *et al.*, 2011). Ces molécules sont produites par l’ascocarpe et son microbiote* : bactéries et levures qui colonisent les truffes interfèrent avec la synthèse des composés spécifiques de l’arôme de chaque espèce (Vahdatzadeh *et al.*, 2015). Libérés par les truffes mûres, les arômes attirent animaux fouisseurs (sangliers, rongeurs, *etc.* ; Talou *et al.*, 1990 ; Piattoni *et al.*, 2012 ; Ori *et al.*, 2018) ou souterrains (limaces, vers, coléoptères, *etc.* ; H. Covès, comm. pers. ; Coutin, 1989 ; Hochberg *et al.*, 2003) qui les consomment. Les spores résistent au passage dans le tube digestif (Piattoni *et al.*, 2014) grâce à leur épaisse paroi qui accumule un composé noir et résistant, la mélanine, donnant à la Truffe noire son qualificatif de *melanosporum*. Elles sont dispersées au gré des déplacements de ces animaux ; si elles se trouvent dans des conditions adéquates, elles pourront germer et reformer un mycélium végétatif (Fig. 7).

2.2.2 Aspects génétiques de la reproduction

Découverte de l’allogamie et des types sexuels

La Truffe noire a longtemps été considérée comme se reproduisant exclusivement par autofécondation (Bertault *et al.*, 1998, 2001). Cependant, cette conclusion était liée au fait que les techniques d’extraction d’ADN utilisées ne permettaient pas d’atteindre l’ADN des spores, protégé par leur épaisse paroi de mélanine, mais seulement celui de la gléba, haploïde. La mise au point d’un protocole d’extraction d’ADN plus vigoureux permettant de rompre la paroi des spores (Paolocci *et al.*, 2006) a montré que deux génotypes* étaient trouvés lorsque les spores sont séquencées en masse (Riccioni *et al.*, 2008). Ils correspondent à ceux du zygote même si celui-ci est transitoire et indiquent que la Truffe noire peut se reproduire par fécondation croisée (*cf.* encadré 2 p. 23 sur les techniques moléculaires utilisées).

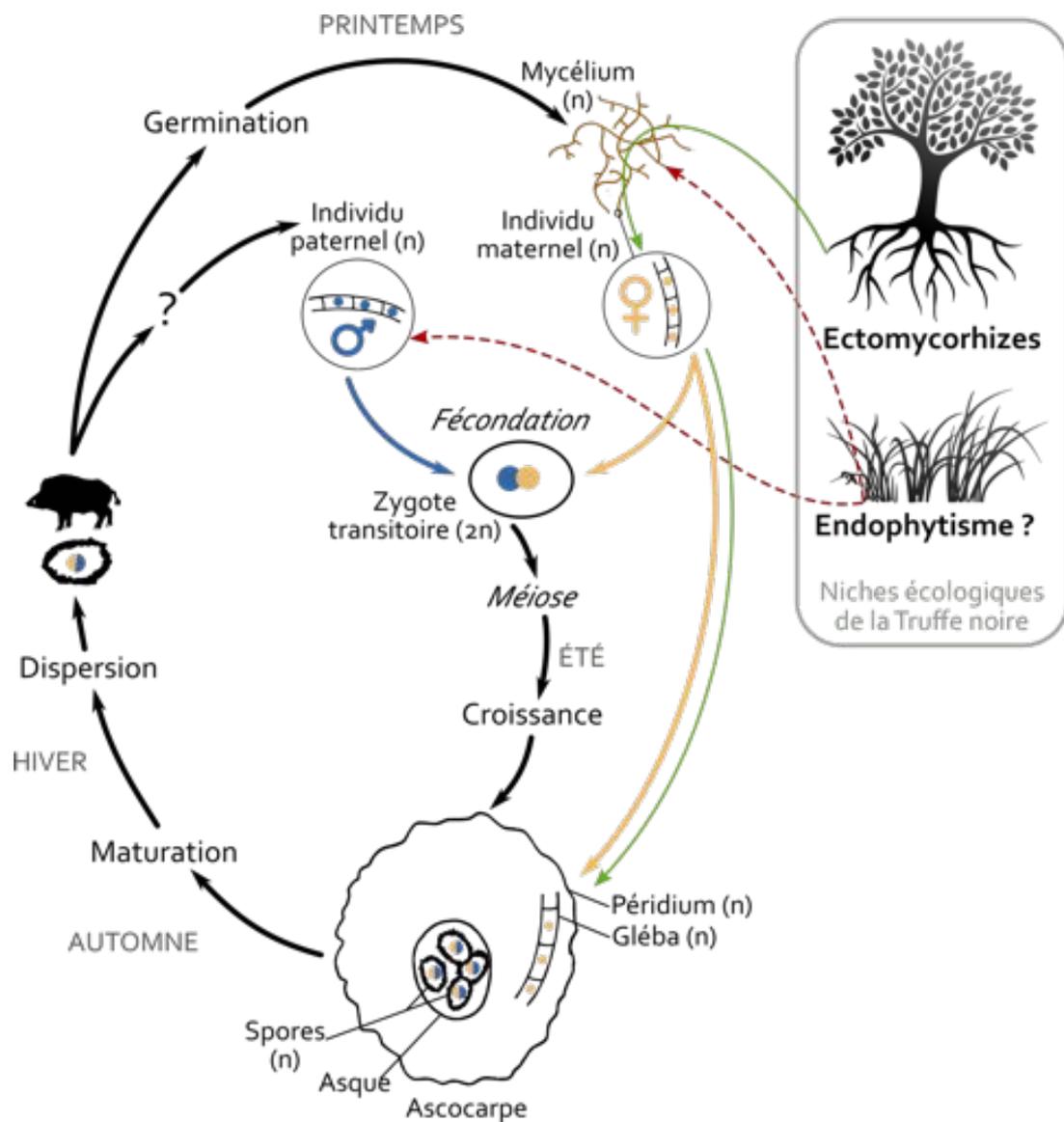


Figure 7 – Cycle de vie de la Truffe noire et étapes de la reproduction pendant l’année. En *italique* sont indiquées les deux étapes de la reproduction sexuée, fécondation et méiose; dans l’encadré gris sont indiquées en **gras** deux niches écologiques de la Truffe noire : une niche écologique vérifiée, les ectomycorhizes, et une niche écologique étudiée au cours de cette thèse, l’endophytisme dans les racines de plantes herbacées; en lettres CAPITALES sont indiquées les saisons pendant lesquelles ont lieu chacune des étapes du cycle de vie. La flèche bleue indique la contribution paternelle (au cours de la fécondation uniquement) et la flèche beige la contribution maternelle (fécondation et formation de la gléba). Les niveaux de ploïdie sont indiqués entre parenthèse : (n) haploïde, (2n) diploïde. La flèche verte indique le flux de ressources carbonées allouées par l’arbre-hôte aux mycorhizes, qui participent à l’élaboration de l’ascocarpe.

Deux ans plus tard, le séquençage du génome de la Truffe noire a mis en évidence l'existence d'un locus de type sexuel (Martin *et al.*, 2010; Rubini *et al.*, 2011b). À cet emplacement, chaque individu possède l'un des deux gènes MAT1-1-1 ou MAT1-2-1 (abrégés par la suite en MAT1 et MAT2), qui codent des protéines très différentes l'une de l'autre (une protéine à domaine α et un facteur de transcription HMG¹ respectivement; Rubini *et al.*, 2011b). Chaque individu de *T. melanosporum* ne possédant qu'un seul des deux idiomorphes du locus MAT, il y a nécessairement allofécondation : la Truffe noire est donc bien une espèce hétérothallique (Fig. 5).

Encadré 2 – Techniques moléculaires de génétique des populations

La **génétique des populations** s'intéresse à la distribution et à la variation des fréquences alléliques dans les populations d'êtres vivants, c'est-à-dire tout ensemble d'individus de la même espèce, vivant au même moment et au même endroit. La fréquence de chaque allèle d'un même gène est influencée par le système de reproduction de l'espèce et par différentes forces, appelées *pressions évolutives* : la sélection naturelle, la dérive, la mutation et la migration. En l'absence de force évolutive et lorsque chaque individu dans la population a la même probabilité de se croiser avec tous les autres individus (régime de reproduction *panmictique*), les fréquences alléliques ne changent pas d'une génération à l'autre. Cet état idéal est connu sous le nom d'*équilibre de Hardy-Weinberg*. À l'inverse, lorsque les fréquences alléliques varient, on peut en tirer des déductions sur les forces évolutives à l'œuvre ou le régime de reproduction.

Afin de mieux comprendre les mécanismes de la reproduction ou la dispersion d'individus au sein d'une population, il est nécessaire de pouvoir **identifier les individus** en jeu, par exemple les deux individus impliqués dans la formation d'un ascocarpe (Vincenot et Selosse, 2017). Il faut donc obtenir des séquences génétiques qui soient spécifiques de chaque individu, ou à défaut un ensemble de séquences dont chaque combinaison différente est propre à un individu donné. Par ailleurs, si l'on s'intéresse au régime de reproduction d'une espèce, il faut étudier des portions du génome qui ne soient pas soumises aux forces évolutives (en particulier, non soumises à la sélection naturelle), afin de pouvoir attribuer les changements de fréquences alléliques au seul mode d'appariement entre les individus.

Les **marqueurs microsatellites** remplissent ces deux critères : il s'agit de séquences d'ADN idéalement non-codantes et composées d'un motif de quelques paires de bases répété plusieurs dizaines de fois. Le nombre exact de motifs est variable d'un individu à l'autre et chaque nombre de répétitions donné constitue un « allèle » du marqueur microsatellite. Une combinaison de plusieurs marqueurs polymorphes dans une population permet donc de distinguer les individus les uns des autres (cette technique est utilisée par exemple par la police scientifique). Les marqueurs microsatellites ne sont *a priori* pas soumis aux pressions évolutives : l'ADN non-codant n'est probablement pas soumis à sélection, la probabilité qu'une mutation ait lieu entre deux générations (ce qui empêcherait d'associer un individu et ses descendants) est faible et la dérive joue peu dans des populations de grande taille.

Dans les ascocarpes, la gléba est haploïde et possède donc un allèle par marqueur microsatellite. La combinaison des allèles de chaque marqueur de la gléba constitue le *génotype* de la gléba. Chaque spore prise individuellement est elle aussi haploïde, puisque issue d'une méiose, et possède pour chaque marqueur une combinaison unique d'allèles maternels et d'allèles paternels. Lorsque l'on extrait l'ADN d'un grand nombre de spores en même temps, on obtient deux allèles possibles pour chaque marqueur : il s'agit de l'ensemble des allèles maternels et paternels (on observe en mélange les allèles en ségrégation méiotique). Il suffit alors de soustraire au génotype des spores le génotype de la gléba pour obtenir le génotype paternel.

1. High Mobility Group

Partenaire maternel et partenaire paternel

Chez *T. melanosporum*, les structures reproductives parentales n'ont jamais été observées, les aspects génétiques de son cycle de vie sont déduits des niveaux de ploïdie observés. Les deux structures parentales haploïdes fusionnent (plasmogamie), formant un mycélium dicaryotique. On ne sait pas quand intervient la caryogamie, elle pourrait n'avoir lieu qu'après le début du développement de l'ascocarpe, lorsque les veines de la gléba commencent à se différencier (Le Tacon, 2017). Le mycélium dicaryotique donne naissance à des cellules ascogènes dicaryotiques, dans lesquelles a lieu la caryogamie. La cellule ascogène devient alors un asque* qui abrite la méiose, mettant généralement en place quatre spores haploïdes². Les asques sont eux-mêmes englobés dans la gléba, le tout étant protégé par le péridium (Fig. 7).

Seul l'un des deux individus parentaux est impliqué dans la formation de la gléba et du péridium, l'autre ne participe qu'à la formation des spores (Riccioni *et al.*, 2008). L'individu qui forme la gléba et le péridium a donc un rôle central dans la nutrition et la protection des cellules ascogènes puis des spores : pour cette raison, et par analogie avec d'autres systèmes de reproduction, cet individu est appelé *maternel*, tandis que celui qui ne laisse que ses gènes dans les spores est appelé *paternel*. Notons que le rôle maternel ou paternel joué lors de la reproduction est indépendant du type sexuel (MAT1 ou MAT2), chaque individu pouvant être maternel ou paternel quelque soit son type sexuel. La Truffe noire est donc, comme de nombreux autres Pézizomycètes, une espèce hermaphrodite mais auto-stérile (Fig. 5).

2.3 Structure génétique des populations de Truffe noire

2.3.1 Écologie des individus maternels

La génétique des populations analyse la distribution des fréquences alléliques dans les populations pour comprendre les stratégies d'histoire de vie et les systèmes de reproduction des êtres vivants (*cf.* encadré 2). Ces outils ont été utilisés avec succès chez un grand nombre de champignons EcM tels que les lactaires, les bolets, les amanites ou les matsutake (Douhan *et al.*, 2011 ; Vincenot et Selosse, 2017). Appliquée aux Truffes, l'analyse des génotypes individuels a apporté des pistes sur l'écologie des individus parentaux (Riccioni *et al.*, 2008 ; Murat *et al.*, 2011, 2013). Le génotypage des ascocarpes, des ectomycorhizes et d'échantillons de sol des truffières a mis en évidence que les individus impliqués comme partenaires maternels dans la formation d'ascocarpes étaient aussi en interaction avec les arbres avoisinants dans les ectomycorhizes (Rubini *et al.*, 2011a ; Murat *et al.*, 2013). L'association mycorhizienne entre arbres-hôtes et individus maternels est cohérente avec le fait que les ressources carbonées allouées par l'arbre à son symbiote fongique sont utilisées pour la croissance et la maturation des ascocarpes (Le Tacon *et al.*, 2013, 2015 ; Fig. 7). À l'inverse, les génotypes paternels ne sont pas retrouvés dans les ectomycorhizes, ce qui soulève la question de leur niche écologique exacte.

2. Il est cependant fréquent d'observer des asques qui comportent plus ou moins de quatre spores, la taille des spores étant alors inversement proportionnelle au nombre de spores dans l'asque (observations personnelles ; C. Murat, S. Belmondo, comm. pers.). Les mécanismes sous-jacents sont aujourd'hui inconnus.

2.3.2 Structure génétique à l'échelle d'une truffière

Afin de mieux comprendre la reproduction de la Truffe noire, la structure génétique des individus maternels et paternels a été étudiée à l'échelle de plusieurs truffières (Taschen *et al.*, 2016 ; De la Varga *et al.*, 2017). De telles analyses ont permis de montrer que les individus maternels et paternels n'étaient pas impliqués de la même manière dans la reproduction. Les individus maternels participent chacun à la formation de nombreux ascocarpes (jusqu'à plus d'une vingtaine ; Taschen *et al.*, 2016), formant des genets* (individus génétiques) très étendus et parfois pérennes d'une année à l'autre (De la Varga *et al.*, 2017). À l'inverse, les individus paternels s'étendent bien moins, puisqu'ils ne sont retrouvés au maximum que dans quatre ascocarpes (et le plus souvent un seul) et semblent rarement pérennes (De la Varga *et al.*, 2017). Un petit nombre de génotypes a été retrouvé à la fois comme partenaire maternel dans un ascocarpe et maternel dans un autre dans la truffière étudiée par De la Varga *et al.* (2017), aucun dans celle étudiée par Taschen *et al.* (2016). Par ailleurs, les génotypes maternel et paternel associés au sein d'un même ascocarpe témoigne d'un fort apparentement, indiquant que les individus qui se croisent sont génétiquement proches.

Isolement par la distance et nature des individus paternels

À l'échelle de la truffière, les individus maternels et paternels montrent une structuration génétique marquée : les individus les plus proches spatialement sont aussi les plus proches génétiquement, tandis que les individus éloignés géographiquement sont généralement (mais pas toujours) éloignés génétiquement. On parle d'isolement par la distance, une structure génétique liée à la capacité de dispersion des individus (en anglais *isolation by distance* ou IBD ; Wright, 1943 ; Rousset, 1997). En effet, plus les individus sont capables de se déplacer loin (par exemple par le déplacement de spores méiotiques ou mitotiques ; Fig. 6) et plus la probabilité de rencontrer des individus non apparentés augmente. À l'inverse, si les individus se déplacent peu, ils restent proches des individus issus de la même méiose et ont donc une probabilité élevée de se croiser.

Cette structure génétique apporte une indication indirecte sur la nature des individus paternels. En effet, le fort isolement par la distance qui les caractérise suggère qu'ils dispersent peu dans l'environnement. Il est connu que les mitospores (asexuées) peuvent jouer le rôle de gamètes mâles chez certains Ascomycètes (Glass et Kulda, 1992 ; Guidot *et al.*, 2003) : on les appelle alors des *spermaties* (Fig. 6). Mises en place à la surface du sol et dispersées par le vent, de telles spores ont été observées chez un certain nombre d'espèces de Pézizomycètes EcM (Healy *et al.*, 2013), y compris au sein du genre *Tuber* (Urban *et al.*, 2004). Cependant, elles n'ont pour l'instant jamais été mises en évidence chez *T. melanosporum*, malgré de nombreuses recherches (Selosse et Urban, comm. pers.). L'isolement par la distance soutient par ailleurs l'hypothèse d'une absence de spermaties dispersées par le vent sur de grandes distances. Les individus paternels sont donc *a priori* relativement proches spatialement des individus maternels.

Agrégation par types sexuels maternels

Les analyses génétiques à l'échelle des truffières ont mis en évidence un autre aspect de la structure génétique des populations de Truffe noire : les ascocarpes sont agrégés selon le type sexuel maternel, qui est aussi celui du mycélium des ectomycorhizes et des échantillons de sol voisins (Murat *et al.*, 2013 ; Rubini *et al.*, 2014 ; Taschen *et al.*, 2016 ; De la Varga *et al.*, 2017). En effet, au pied d'un même arbre, les truffes et les ectomycorhizes appartiennent majoritairement à l'un ou l'autre des types sexuels, formant ainsi des plages spatiales de même type sexuel.

Cette agrégation par type sexuel des ectomycorhizes et des ascocarpes pose un problème dans la recherche des individus paternels : si ceux-ci sont de type sexuel opposé au type sexuel maternel, alors ils sont exclus des plages de types sexuels maternels. Ils ne peuvent donc pas se trouver à proximité des individus maternels sur les ectomycorhizes (ce qui est cohérent avec le fait qu'on ne les y a jamais trouvés ; Murat *et al.*, 2013 ; Taschen *et al.*, 2016 ; De la Varga *et al.*, 2017). Cependant, l'isolement par la distance et le fort apparentement entre individus maternel et paternel suggèrent que les partenaires paternels se trouvent à proximité des partenaires maternels. Il faut donc faire l'hypothèse qu'ils occupent une niche écologique³ différente de celle des individus maternels.

Ces différents aspects de la structure génétique des individus maternels et paternels (isolement par la distance, apparentement élevé, agrégation par type sexuel, niches écologiques distinctes) font l'objet d'une synthèse dans le **Chapitre 1** de la partie II. Ce chapitre s'attache au problème de l'écologie des partenaires paternels et propose un modèle de la reproduction de *T. melanosporum* intégrant les éléments connus au début de cette thèse.

3. On doit le concept de *niche écologique* à G. E. Hutchinson (1957), qui la définit comme un « hypervolume » dans lequel toutes les dimensions sont des conditions environnementales ou des ressources nécessaires à l'existence d'une espèce. Ici, la niche écologique connue des individus maternels est principalement l'ectomycorhize.

La Truffe noire en Europe et dans le monde

3.1 Exigences pédo-climatiques de la Truffe noire

La Truffe noire est endémique du nord de la Méditerranée, de l'Espagne à la Turquie, où elle se développe spontanément dans des boisements peu denses ou en lisière de forêt (Fig. 8). Elle croît sur des sols généralement calcaires et drainant, à forte activité biologique (Callot *et al.*, 1999; Garcia-Montero *et al.*, 2006, 2013; Jaillard *et al.*, 2014). On la trouve en climats méditerranéen, océanique ou semi-continentale (Bonito *et al.*, 2010; Le Tacon, 2017). Pluviométrie estivale et températures extrêmes sont des facteurs importants pour la production (Büntgen *et al.*, 2011; Le Tacon *et al.*, 2014; Baragatti *et al.*, 2019) : la Truffe nécessite un apport d'eau suffisant en été, période d'initiation et de croissance des jeunes ascocarpes (Kulifaj, 1984), ce qui explique qu'on ne la trouve pas dans le sud de l'Italie ou de l'Espagne (Le Tacon, 2017). Elle est par ailleurs sensible au gel et ne se récolte donc pas au-delà de 48 ° de latitude Nord (la Meuse est sa limite septentrionale naturelle; Le Tacon, 2017), ni au-delà de 1000 m d'altitude en France ou 1400 m en Espagne (Le Tacon, 2017).

Les exigences climatiques de la Truffe noire contraignent donc sa répartition : ainsi, lors de la dernière glaciation (il y a environ 10 000 ans), la Truffe noire était probablement cantonnée au nord du pourtour méditerranéen, de l'Italie à l'Espagne (Bertault *et al.*, 1998; Murat *et al.*, 2004; García-Cunchillos *et al.*, 2014). La colonisation de son aire de répartition actuelle a vraisemblablement eu lieu en même temps que l'expansion de ses arbres-hôtes, en particulier les chênes (Murat *et al.*, 2004). À l'inverse, les bouleversements climatiques en cours pourraient déplacer la zone favorable à la Truffe noire vers le nord : la baisse des précipitations prévue en région méditerranéenne rendrait cette zone moins propre à la trufficulture, tandis que la hausse globale des températures pourrait permettre une production plus au nord (Büntgen *et al.*, 2012).

3.2 La trufficulture en Europe

3.2.1 Trufficulture historique

Les truffes sont traditionnellement récoltées dans des espaces boisés ouverts où elles fructifient naturellement, mais des truffières plantées furent aussi mises en place en France dès le XVIII^{ème} siècle (Fig. 8). Les premières truffières artificielles furent obtenues par Buffon

autours des années 1740, lorsque celui-ci apporta des truffes et la terre qui les entourait au pied de charmes non producteurs (Le Tacon, 2017). Vers le milieu du XVIII^{ème} siècle, plusieurs personnes eurent indépendamment l'idée de planter des glands provenant de truffières spontanées, créant ainsi les premières truffières plantées (Le Tacon, 2017). Au cours du XIX^{ème} siècle, divers essais d'inoculations d'arbres avec des fragments de truffes permirent d'étendre la production et plusieurs sources témoignent par la suite de l'usage de glands ou de sol provenant de truffières productrices pour en établir de nouvelles (Chatin, 1869a ; Kiefer, 1879 ; Chaze, 1943).

Aux XIX^{ème} et XX^{ème} siècles, la population majoritairement rurale maintenait des espaces ouverts propices à la Truffe par ses nombreuses activités (élevage extensif, utilisation du bois ou des plantes comestibles ; Aumeeruddy-Thomas *et al.*, 2012). Des lois de restauration des terrains en montagne au XIX^{ème} siècle, associées à des aides financières de l'État, favorisèrent aussi les plantations de truffières sur les terrains dégradés par le surpâturage (Le Tacon, 2017). Par ailleurs, dans les années 1870, le *Phylloxera* contribua à l'essor de la trufficulture en décimant de nombreuses parcelles de vignes converties par la suite en truffières (Le Tacon, 2017). La France atteignait ainsi une production estimée à 1000 tonnes/an au début du XX^{ème} siècle (Hall *et al.*, 2003).

3.2.2 Déclin de la production

Au cours du XX^{ème} siècle, la trufficulture évolua jusqu'à devenir une véritable production agricole, avec ses itinéraires techniques et ses connaissances spécifiques. Le rôle de la taille de l'arbre, du travail du sol, du réensemencement de la truffière ou encore de l'irrigation ont été mis en avant et fait l'objet de différentes méthodes de trufficulture (Olivier, 2000 ; Chevalier et Pargney, 2014). Les pratiques des trufficulteurs sont hautement diverses et reposent à la fois sur des connaissances empiriques et sur un certain partage d'expérience entre trufficulteurs (Aumeeruddy-Thomas *et al.*, 2012).

Cependant, l'amélioration des connaissances concernant la Truffe n'empêcha pas la chute de production, stabilisée entre 30 et 50 tonnes par an en France (Hall *et al.*, 2003 ; Le Tacon, 2017). Cette baisse importante de la production s'explique essentiellement par l'exode rural, qui marque le déclin, voire la fin, de nombreux usages liés à la forêt. Cette évolution des modes de vie entraîna une fermeture des milieux, les espèces de landes (buissons et arbustes) puis de forêts prenant le dessus sur les espaces ouverts en l'absence de pression de pâturage ou de coupe. Par ailleurs, les deux guerres mondiales provoquèrent aussi une rupture dans la transmission des savoirs relatifs à la récolte des truffes (Hall *et al.*, 2003).

3.2.3 Mycorhization contrôlée et trufficulture actuelle

À la fin des années 1960, une équipe italienne parvint à inoculer différentes espèces de Truffes sur les racines d'arbres-hôtes en conditions contrôlées (Le Tacon, 2017). Cette réussite marqua le début de la mycorhization contrôlée de plants truffiers, commercialisés dès 1973 (Chevalier et Grente, 1979 ; Murat, 2015). Aujourd'hui, près de 300 000 arbres mycorhizés sont vendus annuellement en France et plus de 80 % de la production française de Truffe noire proviennent d'arbres mycorhizés plantés, soit environ 25 000 hectares (Murat, 2015). Cette



Figure 8 – Truffière spontanée (en haut) et truffière plantée (en bas). La truffière spontanée est caractérisée par la présence de chênes verts (*Quercus ilex*) et de genévriers cades (*Juniperus oxycedrus*), ainsi que de nombreuses espèces herbacées ou arbustives (cistes, euphorbes, thym...). La truffière plantée est composée de chênes verts et son couvert herbacé est strictement contrôlé (Uzès, Gard, mai 2016). Photos L. Schneider-Maunoury.

proportion atteint 50 à 60 % en Italie et en Espagne, où la trufficulture se développe en réponse à la déforestation et permet la valorisation de zones rurales isolées (Bonet *et al.*, 2006 ; Samils *et al.*, 2008 ; Reyna-Domenech et Garcia-Barreda, 2014). Les 20 % restant proviennent de truffières qui n'ont pas été plantées mais qui sont souvent gérées par un trufficulteur (irrigation, travail du sol, *etc.*), c'est pourquoi on préférera le terme de truffières « spontanées » plutôt que « naturelles ».

3.3 Trufficulture et domestication de la Truffe noire

3.3.1 Une espèce en voie de domestication

La création de truffières plantées et gérées permet de standardiser un certain nombre de procédures, de tester différentes méthodes et de sélectionner celles qui mènent au meilleur rendement ; elle pourrait un jour conduire à la sélection de traits particuliers chez la Truffe, comme la taille ou l'arôme. Ces modifications liées à l'usage humain font partie du processus de domestication (Dupont *et al.*, 2017). Chez la Truffe noire, l'existence dans l'aire d'origine de la Truffe noire de truffières spontanées et de truffières plantées permet d'évaluer les différences qui pourraient résulter du processus de domestication (Taschen *et al.*, 2016). L'absence d'isolement génétique entre truffières spontanées et plantées indique que des flux de gènes persistent entre les populations de Truffe sauvages et inoculées, au moins dans le Languedoc-Roussillon où a été menée l'étude de Taschen *et al.* (2016). Cependant, il existe un IBD marqué dans les deux types de truffières, indiquant que les pratiques des trufficulteurs n'ont pas effacé la structuration génétique des truffières (Taschen *et al.*, 2016). En particulier, la pratique de réensemencement, qui consiste à disperser des fragments de truffes au pied des arbres truffiers après la saison de récolte pour augmenter la quantité de spores dans le sol (Murat, 2015), pourrait contribuer à homogénéiser la répartition des différents génotypes à l'échelle de la truffière, voire favoriser les génotypes les moins souhaitables si l'on n'utilise pour cela que les ascocarpes abîmés ou tardifs. Par ailleurs, la reproduction de la Truffe noire, bien que favorisée empiriquement, n'est pas complètement contrôlée. Si l'on entend par domestication la maîtrise de la reproduction, *T. melanosporum* est encore au stade de proto-domestication (Taschen *et al.* 2016 ; Dupont *et al.*, 2017).

3.3.2 Culture de la Truffe noire dans le monde

Plus de 200 espèces de champignons EcM ont été introduits hors de leur aire de répartition initiale, très souvent à la suite de l'introduction de leur arbre-hôte (75 % des introductions de champignons EcM seraient dus à des plantations de pins et d'eucalyptus dans l'hémisphère sud ; Mikola, 1970 ; Vellinga *et al.*, 2009 ; Sulzbacher *et al.*, 2018). Au contraire, dans le cas de la Truffe noire, c'est bien le champignon et non l'arbre-hôte qui était recherché lors de son introduction dans de nombreux pays, proches de son aire d'origine (Portugal, Maroc) ou au contraire très éloignés du bassin méditerranéen (Fig. 9 ; Reyna et Garcia-Barreda, 2014 ; Nowak, 2015, Le Tacon, 2017). Dès les années 1980, dans les zones bénéficiant d'un climat similaire à la région méditerranéenne, des plantations d'arbres truffiers se développent sur des sols parfois amendés en calcaire afin d'atteindre le pH adéquat (comm. pers. de trufficulteurs sud-africains,



Figure 9 – Distribution de *Tuber melanosporum* dans le monde. En vert sont indiqués les pays dans lesquels la Truffe noire est endémique (nord du bassin Méditerranéen : Bulgarie, Croatie, Espagne, France, Grèce, Italie, Roumanie, Serbie, Slovaquie, Slovénie, Suisse, Turquie), en bleu-vert les pays proches dans lesquels elle a été introduite (Maroc, Portugal et Royaume-Uni) et en orange les autres pays distants dans lesquels elle a été introduite.

australiens et chiliens). L'introduction s'est faite essentiellement par la plantation de jeunes chênes mycorhizés sur place à partir d'ascocarpes européens (Hall *et al.*, 2017). Cependant, aucune donnée détaillée sur ce qui a été introduit et à partir de quelle(s) source(s) exacte(s) n'est disponible. Cette extension de l'aire de distribution hors de l'aire d'origine accompagne très souvent la domestication d'espèces (Murphy, 2007). Dans le cas de la Truffe noire, dont la reproduction n'est pas complètement maîtrisée par l'homme, la diffusion de l'espèce précède cependant la domestication (Taschen *et al.*, 2016).

3.3.3 Impacts de l'introduction sur la structure génétique des populations

L'introduction d'espèces dans des zones où aucune population sauvage n'existe préalablement s'accompagne souvent de modifications dans la structure génétique des populations (moins de diversité génétique, plus forte consanguinité, clonalité et autogamie accrues, *etc.*; Dlugosch et Parker, 2008). Cependant, les effets génétiques de l'introduction hors zone de répartition ont été relativement peu étudiés chez les champignons et se sont surtout concentrés sur les champignons pathogènes d'espèces cultivées (Gladieux *et al.*, 2015). Chez les espèces étudiées, des résultats très variables ont été observés dans l'évolution de la diversité génétique, depuis une réduction drastique à la suite de l'introduction d'un unique génotype, jusqu'à une augmentation de la diversité liée à des introductions multiples depuis plusieurs sources conduisant à l'émergence rapide de nouvelles combinaisons alléliques (Gladieux *et al.*, 2015). Concernant le mode de reproduction, le changement le plus souvent observé à la suite d'une introduction est la perte ou la diminution de la reproduction sexuée au profit de la multiplication clonale (par exemple, l'oïdium de la vigne entre 1850 et 1900), processus qui s'explique aisément dans le cas de champignons pathogènes introduits dans des grandes cultures génétiquement homogènes (Gladieux *et al.*, 2015).

Dans le cas de la Truffe noire, la production de truffes dans les zones d'introduction témoigne du fait que la reproduction sexuée n'a pas disparu. Par ailleurs, la seule étude menée sur *Tuber melanosporum* dans l'hémisphère Sud, en Australie, n'indique pas de perte de diversité génétique globale, mais des modifications dans la répartition des types sexuels. La domination du type sexuel MAT1 sur le type MAT2 suggère une possible compétition entre les deux types sexuels (Linde et Selmes, 2012). Une comparaison plus approfondie de la structure génétique des populations de Truffe noire en France et en Australie (diversité génétique, clonalité, répartition des types sexuels...) fait l'objet du **Chapitre 2** de la partie II, qui analyse les effets de la dispersion sur la structure génétique des populations.

La Truffe noire et les plantes herbacées

4.1 Le brûlé, aspect particulier du cycle de vie de la Truffe

4.1.1 Une zone pauvre en végétation

Dans une truffière, spontanée ou plantée, la présence de mycélium de *Tuber melanosporum* dans le sol est souvent rendue visible par la pauvreté de la strate herbacée (Fig. 10), ce qui vaut à cette zone son nom de *brûlé* (Martegoute et Courdeau, 2002). Le brûlé est plus ou moins marqué selon les truffières et les saisons et reflète l'extension du mycélium et des ectomycorhizes de *T. melanosporum* (Callot, 1999 ; Fig. 11). Il correspond à la zone de production de truffes, ou préfigure celle-ci (Callot, 1999). On observe parfois des brûlés dans les truffières à *T. aestivum*, mais de manière moins systématique et souvent moins marquée que pour *T. melanosporum* (Pacioni, 1991).

La flore des brûlés est dominée par des thérophytes (plantes annuelles passant l'hiver sous forme de graines) adaptées aux milieux ensoleillés et calcaires (Martegoute et Courdeau, 2002 ; Gonzales-Armada *et al.*, 2010). On y trouve de nombreuses Poacées (pâturin rigide, *Catapodium rigidum*, fétuque ovine, *Festuca ovina*), des plantes xérophytes (par exemple diverses espèces de *Sedum*) ou encore des orchidées. La plupart de ces plantes sont des espèces non-EcM, le plus souvent associées à des champignons AM. Certaines sont citées comme favorables à la Truffe (les plantes *compagnes*) tandis que d'autres sont vues comme défavorables (comm. pers. de trufficulteurs ; Taschen *et al.*, soumis). Néanmoins, aucune espèce n'indique avec certitude la production de truffes (Martegoute et Courdeau, 2002).

4.1.2 Une zone d'interaction entre la Truffe et les autres micro-organismes

Le brûlé est une zone dans laquelle domine le mycélium *T. melanosporum* (Callot, 1999). Cependant, l'abondance de Truffe noire sur les ectomycorhizes dépend du stade d'avancement du brûlé : elle est peu présente dans les ectomycorhizes des brûlés immatures, abondante dans les brûlés producteurs et disparaît après la fin de la production (Taschen *et al.*, 2015). De même, dans les forêts fermées, elle est peu abondante dans le sol et absente sur les ectomycorhizes (Taschen *et al.*, 2015). Dans les brûlés producteurs, *T. melanosporum* cohabite avec une communauté EcM diversifiée (Gonzales-Armada *et al.*, 2010 ; De Miguel *et al.*, 2014 ; Taschen *et al.*, 2015), ce qui est aussi le cas de *T. aestivum* (Benucci *et al.*, 2011). La communauté fongique du sol y



Figure 10 – Brûlé au pied d'un chêne pubescent dans une truffière plantée (Castelnau-de-Montmiral, Tarn, octobre 2017). Photo L. Schneider-Maunoury.

est cependant distincte, moins riche en Basidiomycètes EcM et moins diversifiée qu'à l'extérieur du brûlé (Napoli *et al.*, 2010 ; Fig. 11). Par ailleurs, la présence de *T. melanosporum* affecte aussi les communautés de bactéries et d'archées (Mello *et al.*, 2013), la microfaune (Menta et Pinto, 2016) et la communauté des champignons AM (Mello *et al.*, 2015 ; Fig. 11). Cependant, la colonisation des plantes herbacées par des champignons AM n'est pas influencée par la présence de *T. melanosporum* : les plantes herbacées du brûlé sont largement endomycorhizées, malgré leur faible abondance (Mello *et al.*, 2015).

4.1.3 Une zone d'interaction entre la Truffe et les plantes herbacées

L'origine du brûlé est mal connue, mais son existence suggère une interaction entre la Truffe et les plantes herbacées, au sujet de laquelle plusieurs hypothèses non-exclusives ont été avancées (Fig. 11). Des expériences en laboratoire ont montré que des extraits d'ascocarpes ou de mycélium de différentes espèces de Truffes ont un impact négatif sur la croissance de certaines plantes herbacées (Pacioni, 1991 ; Angelini *et al.*, 2015). Entre autres molécules, l'octénol est responsable d'une perturbation du métabolisme oxydatif chez *Arabidopsis thaliana*, indiquant que les composés organiques volatiles impliqués dans les arômes peuvent avoir d'autres rôles que l'attraction des disperseurs (Splivallo *et al.*, 2007). Le mycélium de *T. melanosporum* produit aussi de l'éthylène et de l'auxine qui modifient le développement racinaire à la fois de plantes-hôtes EcM et de plantes non-hôtes non-EcM (*Cistus incana* et *A. thaliana* respectivement ; Splivallo *et al.*, 2009). Ces interactions biochimiques entre Truffes et plantes herbacées, appelées interactions allélopathiques, ont été démontrées en laboratoire (parfois en utilisant des ascocarpes et non du mycélium), la transposition aux processus ayant lieu dans le brûlé n'est donc pas évidente.

D'autres études ont suggéré un potentiel parasitisme des racines de plantes herbacées par le mycélium de certaines Truffes *in situ*. Plattner et Hall (1995) ont observé par immuno-détection du mycélium attribué à *T. melanosporum* dans le cortex de racines de deux herbacées AM, la

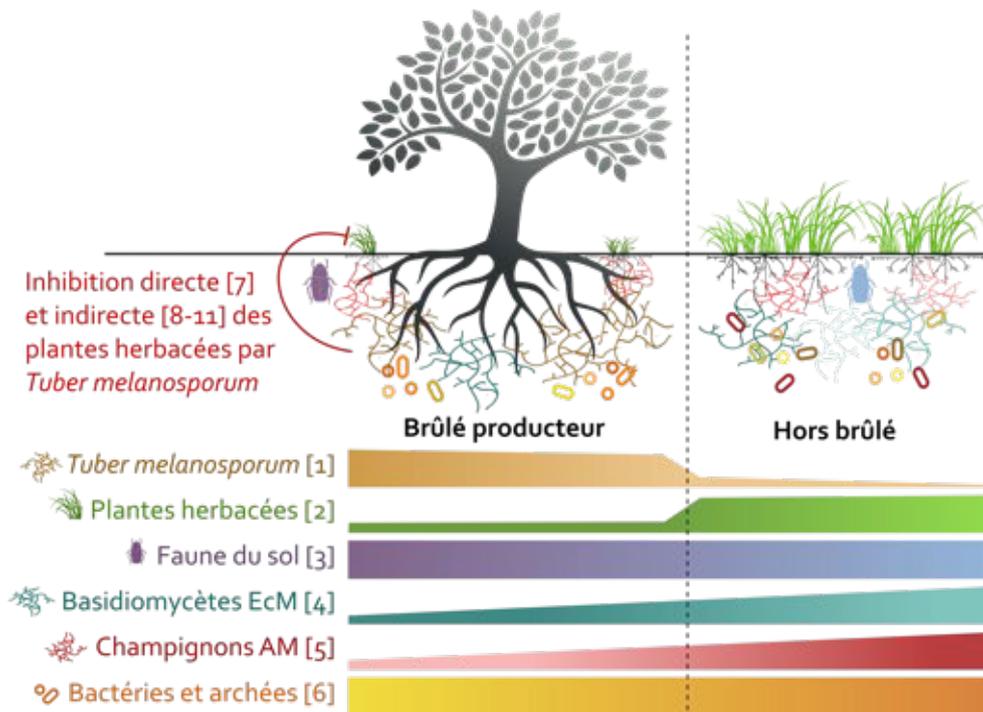


Figure 11 – Modifications de l'écosystème dans les brûlés à *Tuber melanosporum*. Les gradients indiquent les modifications entre brûlé et hors brûlé : la hauteur du gradient indique la quantité (*e.g.* davantage d'herbacées en dehors du brûlé) et la couleur la qualité (*e.g.* composition des communautés bactériennes différente dans et hors brûlé). [1] Callot, 1999 ; [2] Martegoutte et Cordeau (2002), Gonzales-Armada *et al.* (2010) ; [3] Menta et Pinto (2016) ; [4] Napoli *et al.* (2010) ; [5] Mello *et al.* (2015) ; [6] Mello *et al.* (2013) ; [7] Plattner et Hall (1995) ; [8] Paccioni (1991) ; [9] Splivallo *et al.* (2007) ; [10] Splivallo *et al.* (2009) ; [11] Angelini *et al.* (2015).

flouve odorante (*Anthoxanthum odoratum*) et le liondent faux-pissenlit (*Leontodon taraxacoides*). Ils associent les nécroses observées dans le cortex racinaire à l'action du mycélium et suggèrent donc que *T. melanosporum* ait une action pathogène sur les plantes herbacées ; toutefois, leur immuno-marquage reste peu clair. Chez la Truffe de Bourgogne *T. aestivum*, une colonisation de la surface racinaire a aussi été mise en évidence par des méthodes moléculaires (Gryndler *et al.*, 2014), sans que le rôle de cette interaction n'ait été démontré.

Par ailleurs, ces interactions entre la Truffe et les plantes herbacées pourraient avoir un rôle dans la nutrition de l'arbre-hôte. Taschen *et al.* (soumis) ont mis en place une expérience de trois ans dans laquelle des chênes inoculés ou non avec *T. melanosporum* étaient cultivés avec et sans plantes herbacées. Lorsque le mycélium de Truffe noire est présent, les plantes herbacées poussent moins bien et leur statut nutritionnel est négativement affecté, tandis que celui des jeunes chênes est positivement influencé. La Truffe noire pourrait donc être le médiateur d'interactions arbre- plante herbacée dans le brûlé (Taschen *et al.*, soumis).

4.1.4 Une stratégie d'espèce pionnière

Les modifications des communautés microbienne et végétale liées à la présence de *Tuber melanosporum* semblent indiquer que cette dernière est une espèce compétitive de milieu ouvert :

l'émission de composés allélopathiques qui affectent aussi bien les micro-organismes (bactéries, champignons AM et EcM) que les plantes herbacées assurent à la Truffe noire un avantage compétitif sur les brûlés (Streiblova *et al.*, 2012). Cet effet allélopathique herbicide pourrait intervenir dès l'initiation du brûlé en inhibant la germination des plantes herbacées (Taschen *et al.*, soumis). Cependant, la Truffe noire est remplacée par d'autres espèces au cours de l'évolution des truffières (d'autres Truffes comme *T. brumale*, des espèces du genre *Tomentella*, *etc.*; comm. pers. de trufficulteurs; Taschen *et al.*, 2015) et disparaît lorsque le milieu se ferme, indiquant son caractère pionnier dans la succession écologique (*cf.* encadré 3).

Encadré 3 – Les successions écologiques

Une **succession écologique** correspond à l'évolution des communautés après la mise en place d'un nouvel habitat ou une perturbation de l'écosystème (Anderson, 2007). Par exemple, on appelle *succession primaire* le passage d'une roche nue vers une pelouse de plantes herbacées, puis une lande où s'installent des arbustes, peu à peu remplacés par des arbres en boisement ouvert jusqu'à atteindre le stade de la forêt fermée si rien ne s'oppose à cette évolution. Cependant, ce modèle ne prévaut pas partout : si dans certaines successions les espèces se remplacent les unes après les autres, dans d'autres la plupart des espèces sont présentes dès le début, mais leur abondance relative change et l'écosystème est dominé par différentes espèces au cours du temps (Twieg *et al.*, 2007).

C'est ce cadre théorique qui est utilisé pour décrire les successions écologiques de champignons EcM (*e.g.* Mason *et al.*, 1983). On distingue alors des espèces *early-stage* qui colonisent les arbres-hôtes en début de succession et sont peu à peu rejointes (et parfois dominées) par des espèces *late-stage* lorsque la succession évolue (lors de l'évolution d'une forêt, Mason *et al.*, 1983; après un feu, Visser, 1995; ou encore après une coupe à blanc, Jones *et al.*, 2002). Les espèces fongiques sont rarement remplacées (peu d'espèces *early-stage* disparaissent au cours de la succession), mais s'ajoutent plutôt les unes aux autres, avec un certain nombre d'espèces inféodées aux stades tardifs de la succession (*late-stage*) et d'autres présentes tout au long de la succession (*multi-stage*; Visser, 1995).

Une truffière est un boisement ouvert, il s'agit d'un stade intermédiaire de l'écosystème maintenu par des perturbations telles que le pâturage, la taille des arbres, le travail du sol ou le contrôle de l'enherbement. L'évolution naturelle de la plupart des truffières sans intervention humaine est la fermeture du milieu, colonisé par des arbres, qui entraîne la disparition de la Truffe noire. Cette dernière est donc plutôt une espèce *early-stage*, ou *pionnière* : elle est compétitive au cours des stades précoces de la succession, pendant lesquels elle fructifie, mais est dominée par d'autres espèces (sans toutefois disparaître) lors de l'évolution de la truffière (Taschen *et al.*, 2015).

4.2 L'endophytisme, une interaction sans symptôme apparent entre plantes et champignons

4.2.1 Définition de l'endophytisme

L'interaction entre *Tuber aestivum* et les plantes herbacées mise en évidence par Gryndler *et al.* (2014) rentre dans la catégorie des interactions endophytes, c'est-à-dire des interactions asymptomatiques entre plantes et micro-organismes (Brundrett, 2006). Les tissus végétaux vivants (racines, tiges, feuilles, fleurs, *etc.*) sont colonisés par des communautés de champignons, de

bactéries, d'archées et même parfois de protistes (Hardoim *et al.*, 2015) sans qu'aucune structure caractéristique ni aucune modification ne soit observable. C'est cette absence de structure visible qui définit l'endophytisme, par opposition à d'autres types d'interaction comme le parasitisme, où l'on observe nécrose et dégradation des structures végétales, ou les symbioses, où des surfaces d'échanges différenciées (arbuscules, pelotons, réseau de Hartig...) sont détectables (Wilson, 1995).

Les micro-organismes impliqués peuvent être classés selon le degré de dépendance à leurs plantes-hôtes : certains ne peuvent pas vivre en dehors de leur hôte (endophytes *obligatoires*) tandis que d'autres sont surtout présents à la surface des tissus végétaux et ne pénètrent que ponctuellement (endophytes *opportunistes*). Entre ces deux extrêmes, les endophytes *facultatifs* présentent des degrés de dépendance variés (Hardoim *et al.*, 2015). Certaines espèces peuvent aussi être endophytes pendant une partie de leur cycle de vie seulement : c'est le cas d'un certain nombre de champignons pathogènes qui passent par une phase de latence dans les tissus végétaux avant le début des symptômes (Wilson, 1995).

Les endophytes fongiques appartiennent majoritairement aux Gloméromycètes, Ascomycètes et Basidiomycètes (Hardoim *et al.*, 2015). Une large proportion d'Ascomycètes endophytes se trouvent dans les Dothidéomycètes et les Sordariomycètes, deux classes qui comportent de nombreuses espèces nécrotrophes* pathogènes de plantes (Hardoim *et al.*, 2015), tandis qu'on trouve des Basidiomycètes endophytes dans les Agaricomycètes, qui comptent aussi bien des saprotrophes que des champignons EcM (Hardoim *et al.*, 2015).

4.2.2 Effets de l'endophytisme

Les champignons endophytes trouvent dans les tissus végétaux un environnement protecteur permettant de résister aux stress abiotiques et souvent des ressources nutritionnelles (Brundrett, 2006). Les impacts sur la plante-hôte constituent quant à eux un continuum de la toxicité au mutualisme en passant par le commensalisme (Saikkonen *et al.*, 1998 ; Rodriguez *et al.*, 2009 ; Hardoim *et al.*, 2015). Ces impacts varient selon divers facteurs biotiques, comme la capacité de l'hôte à contrôler la prolifération de l'endophyte, et abiotiques, comme la disponibilité en nutriments (Lieberman et Benfey, 2016). Des conditions environnementales différentes peuvent donc, comme pour la symbiose, modifier l'issue de l'interaction (Bronstein, 1994).

Le microbiote fongique racinaire d'*A. thaliana* améliore par exemple la nutrition de cette plante non-mycorhizienne mais seulement dans les sols pauvres en phosphore (Hiruma *et al.*, 2016 ; Almario *et al.*, 2017). À l'inverse, les champignons du genre *Bortyospheria* sont sans impact sur leurs hôtes quand les conditions de croissance sont bonnes, mais deviennent pathogènes en conditions de stress (Slippers et Wingfield, 2007). Gibert *et al.* (2019) indiquent que l'interaction avec un champignon endophyte est bénéfique pour la plante dans seulement 60 % des cas (70 études sur 169 rapportent un effet négatif de l'endophyte). L'effet d'un même champignon endophyte peut aussi varier selon l'hôte : *Verticillium dahliae* est endophyte dans la moutarde ou l'orge mais pathogène de la pomme de terre (Wheeler *et al.*, 2019), tandis que *Fusarium graminearum* est pathogène de différentes céréales cultivées en Amérique du Nord mais sans impact sur les Poacées natives de cette même zone (Lofgren *et al.*, 2018). Enfin, certaines espèces résistent à la classification, comme les *Dark Septate Endophytes* (DSE), qui peuvent avoir des

effets positifs, négatifs ou neutres sur leurs hôtes (Jumponnen, 2001 ; Mandyam et Jumponnen, 2015).

4.2.3 Truffes et endophytisme

Dans le cas des Truffes, l'existence du brûlé suggère une interaction entre mycélium et plantes herbacées. Ces interactions sont en partie indirectes, *via* les composés organiques volatiles libérés par la Truffe (Streiblova *et al.*, 2012), mais pourraient aussi être directes, comme le suggèrent les études de Plattner et Hall (1995) et Gryndler *et al.* (2014). Par ailleurs, de nombreux exemples montrent que certains champignons mycorhiziens sont capables de coloniser en endophytes des plantes non-mycorhiziennes (van der Heidjen *et al.*, 2015). Le champignon EcM *Tricholoma matsutake* colonise par exemple les racines des arbres AM *Cedrela odorata* et *Prunus speciosa* (Murata *et al.*, 2013, 2014). La Truffe noire, quant à elle, a été identifiée dans les racines de différentes espèces d'orchidées (*Epipactis microphylla*, Selosse *et al.*, 2004 ; *Limodorum abortivum*, Girlanda *et al.*, 2006), soulignant sa capacité à occuper des niches écologiques différentes selon l'hôte rencontré.

Si elle est avérée, la colonisation endophyte des racines de plantes herbacées serait pour la Truffe une niche écologique supplémentaire, bien distincte des ectomycorhizes. Or l'analyse du cycle de vie de *T. melanosporum* montre que les deux partenaires impliqués dans la reproduction ne cohabitent pas dans les ectomycorhizes (où l'on ne retrouve que des individus maternels) mais doivent cependant être spatialement proches l'un de l'autre (Chapitre 2 de l'introduction). Ces éléments permettent de proposer l'hypothèse de l'endophytisme dans les racines des plantes herbacées comme potentielle niche écologique des individus paternels. La colonisation racinaire de plantes des brûlés à *T. melanosporum* et son rôle dans le cycle de vie de la Truffe ont été mis en évidence au cours de cette thèse par plusieurs techniques moléculaires ; les résultats de ces analyses font l'objet du **Chapitre 3** de la partie II. L'étude de l'endophytisme a ensuite été complétée par des techniques de microscopie et les analyses faites sur *T. melanosporum* ont été étendues à *T. aestivum* ; ces résultats sont abordés dans le **Chapitre 4** de la partie II.

4.3 Les écologies multiples des champignons

4.3.1 Frontières floues entre niches écologiques

Plusieurs exemples vus précédemment indiquent qu'un certain nombre de champignons peuvent occuper différentes niches écologiques selon le contexte, voire l'hôte dans lequel ils se trouvent : certaines espèces peuvent établir différents types de mycorhizes (EcM et ErM, Bergero *et al.*, 2000 ; EcM et OrM, Selosse *et al.*, 2004, Weiß *et al.*, 2016), d'autres peuvent être mycorhiziennes et endophytes (*Sebacina indica*, Weiß *et al.*, 2016 ; *Tricholoma matsutake*, Murata *et al.*, 2013, 2014 ; *Tuber aestivum*, Gryndler *et al.*, 2014), mycorhiziennes et saprotrophes (Leotiomycètes ErM et saprotrophes, Martino *et al.*, 2018) ou encore pathogènes et endophytes (*Beauveria bassiana*, Kasambala Donga *et al.*, 2018 ; *Fusarium graminearum*, Lofgren *et al.*, 2018 ; *Verticillium dahliae*, Wheeler *et al.*, 2019).

Pour de nombreux groupes, le mode de nutrition n'est pas toujours clair (*cf.* encadré 4). Le Basidiomycète EcM *Cortinarius cinnamomeus* forme par exemple des structures semblables à des ectomycorhizes mais sans réseau de Hartig avec les racines de plusieurs espèces NM ou AM de *Carex* (Harrington et Mitchell, 2002). Des approches variées permettent par ailleurs de mettre en évidence que certains taxons considérés comme saprotrophes pourraient en fait être biotrophes*, c'est-à-dire acquérir tout ou partie de leur carbone d'organismes vivants (Hygrophoraceae, Griffith *et al.*, 2014, Halbwachs *et al.*, 2018 ; Hymenochaetales, Korotkin *et al.*, 2018 ; diverses espèces de Basidiomycètes, Smith *et al.*, 2017). À l'inverse, des espèces considérées comme mutualistes témoignent aussi d'une certaine capacité à utiliser la matière organique morte (par exemple *Tricholoma matsutake* ; Vaario *et al.*, 2002). Enfin certaines espèces changent de types trophiques au cours de leur vie, comme beaucoup de nécrotrophes* qui parasitent leurs hôtes jusqu'à provoquer leur mort et continuent de vivre en dégradant la matière organique morte, c'est-à-dire en saprotrophe (par exemple l'Armillaire couleur de miel, *Armillaria mellea* ; Guillaumin, 2005).

Ces exemples montrent que définir la niche écologique d'une espèce n'est pas toujours aisé et dépend de nombreux paramètres. La plante-hôte considérée, son statut nutritionnel, les conditions dans lesquelles elle se trouve ou encore l'espèce ou la souche de champignon impliquée font varier l'issue de l'interaction. La niche écologique de nombreuses espèces relève davantage du continuum que de catégories fixes (Fig. 12), bien que celles-ci soient utilisées par habitude et par facilité, au risque de parfois masquer la réalité.

Encadré 4 – Les types trophiques des champignons

Les champignons peuvent être classés selon leur manière d'acquérir des nutriments, c'est-à-dire leur mode de nutrition, encore appelé type trophique. On distingue classiquement trois types trophiques, qui se traduisent ensuite par des niches écologiques variées au sein de chaque type (Tedersoo *et al.*, 2014) :

- Les **pathotrophes** acquièrent leurs nutriments aux dépens d'un autre organisme vivant. Il s'agit par exemple des parasites et des pathogènes de plantes, d'animaux ou d'autres champignons.

- Les **saprotrophes** dégradent la matière organique morte : on y trouve les décomposeurs de la litière (comme le champignon de Paris, *Agaricus bisporus*), les pourritures du bois (pourriture blanche et pourriture brune), les espèces coprophages, *etc.*

- Les **symbiotrophes** échangent des nutriments avec un autre organisme vivant, avec lequel elles vivent donc en mutualiste. Cette catégorie regroupe les espèces mycorhiziennes, mais aussi les lichens et les espèces épiphytes bénéfiques pour leur hôte.

On distingue par ailleurs les espèces **biotrophes**, qui se nourrissent aux dépens d'organismes vivants (symbiotrophes et pathotrophes non létaux) et les espèces **nécrotrophes**, qui se nourrissent de tissus dont ils provoquent la mort (pathotrophes létaux ou provoquant des nécroses).

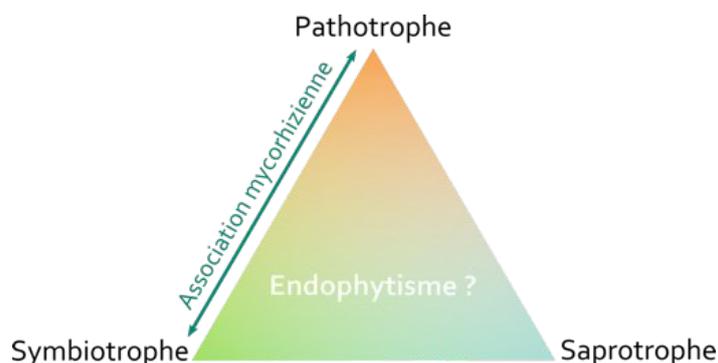


Figure 12 – Continuum entre les différents types trophiques des champignons. L'association mycorhizienne est un continuum entre mutualisme et parasitisme, tandis que le type trophique des endophytes est souvent difficile à définir.

4.3.2 Doubles niches écologiques et évolution des interactions

Par ailleurs, certains groupes fongiques présentent une grande diversité de modes trophiques : l'ordre des Sebacinales (Basidiomycètes) compte par exemple des espèces endophytes ou EcM parmi les Sebacinaceae, des endophytes et des espèces EcM, ErM et OrM parmi les Serendipitaceae (Selosse *et al.*, 2009 ; Weiß *et al.*, 2011, 2016). Les membres de ces deux familles présentent en outre certaines caractéristiques des saprotrophes (capacité à croître sur du bois mort en laboratoire, enzymes nécessaires à la dégradation de la matière organique ; Weiß *et al.*, 2016), bien que la saprotrophie n'ait pas été observée dans la nature. De même, les Tulasnellaceae regroupent des espèces EcM, OrM et endophytes (Oberwinkler *et al.*, 2017).

L'existence d'espèces qui occupent plusieurs niches écologiques au sein de ces groupes (en particulier les espèces à la fois mycorhiziennes et endophytes) peut être interprétée comme un témoignage de leur histoire évolutive. En effet, il a été proposé que l'interaction mycorhizienne ait évolué depuis un ancêtre endophyte : l'endophytisme serait alors la « salle d'attente » vers une interaction plus étroite entre plantes et champignons et les espèces occupant la double niche écologique endophyte et mycorhizienne auraient évolué de la première vers la deuxième en conservant leur état ancestral (« *waiting room hypothesis* », Selosse *et al.*, 2009 ; van der Heijden *et al.*, 2015). Au cours de cette thèse, la présence de champignons EcM dans les racines de plantes non-EcM a été testée dans différents contextes ; les résultats de ces analyses sont présentés et discutés dans le **Chapitre 5** de la partie II.

Problématiques et organisation de la thèse

Cette thèse s'organise autour de trois grands axes, à savoir la biologie reproductive de la Truffe noire (**chapitres 1 et 2**), son écologie (**chapitres 3 et 4**) et enfin l'écologie d'autres champignons EcM (**chapitre 5**). La **partie II** présente les résultats obtenus, discutés dans la **partie III** :

Le **chapitre 1** propose une mise à jour du cycle de vie de la Truffe noire ainsi qu'un modèle de répartition des niches écologiques des partenaires maternels et paternels qui permet d'expliquer les observations apparemment contradictoires dans leur structure génétique (Article I, *Trends in Microbiology*). En lien avec ce modèle sont exposés les résultats d'une étude destinée à estimer la banque de spores de *T. melanosporum* dans les truffières (Article II, *Mycorrhiza*).

Dans la lignée des études de génétique des populations de Truffe noire réalisées en France, le **chapitre 2** étudie la structure génétique de deux populations australiennes et d'une population française et les compare aux populations déjà étudiées. L'objectif de ce chapitre est d'analyser l'effet de l'introduction en dehors de la zone d'endémisme sur la structure génétique des populations.

Le **chapitre 3** présente les premiers indices de l'endophytisme de *T. melanosporum* dans les racines des plantes herbacées du brûlé, obtenus par des techniques de biologie moléculaire. Il fait ainsi le lien entre l'endophytisme et le cycle de vie de la Truffe en analysant les génotypes présents en endophytes dans les racines des plantes herbacées (Article III, *Fungal Ecology*).

Le **chapitre 4** élargit les analyses du chapitre 3 à la Truffe de Bourgogne *T. aestivum* en établissant l'endophytisme de cette deuxième espèce. Il apporte par ailleurs des preuves supplémentaires de l'interaction endophyte entre Truffes et plantes herbacées (Article IV, en préparation). L'endophytisme est mis en évidence par observation directe du mycélium endophyte au microscope et par l'évaluation de son statut métabolique.

Enfin, le **chapitre 5** aborde l'endophytisme des champignons EcM dans leur ensemble, en dehors du contexte des truffières. Des échantillonnages de plantes herbacées dans différents écosystèmes forestiers indiquent que l'endophytisme des champignons EcM pourrait être plus répandu que ce qui était jusqu'alors soupçonné. De plus, la caractérisation conjointe des communautés fongiques présentes dans les racines et dans le sol rhizosphérique permet de mieux cerner les mécanismes de l'endophytisme des champignons EcM.

II Résultats

Apports à la biologie reproductive de la Truffe noire

1.1 Vérification préalable de l'unicité des partenaires parentaux

Toutes les analyses de génétique des populations de Truffe noire sont effectuées à partir d'un fragment d'ascocarpe (généralement moins d'un cm³) et reposent donc sur l'hypothèse qu'un seul individu maternel et un seul individu paternel sont impliqués dans l'ensemble de l'ascocarpe. La morphologie des ascocarpes est variable, de la sphère jusqu'aux formes à plusieurs lobes (formes *polylobées* ; Fig. 13). La texture du sol contraint physiquement la croissance des truffes et influence donc leur forme (Callot, 1999). Cependant, la fusion d'ascocarpes génétiquement différents au cours du développement, conduisant à la mise en place d'ascocarpes polylobés, est connue dans une espèce proche, la Truffe du désert *Terfezia boudieri* (Holdengraeber *et al.*, 2001 ; Aviram *et al.*, 2004). Plus de deux individus pourraient donc intervenir dans la mise en place des ascocarpes, mais la probabilité de le détecter est faible si l'on ne génotype qu'un petit fragment.

Afin de tester cette hypothèse, 4 truffes rondes (fournies par Hervé Covès, Corrèze) ont été échantillonnées en trois points différents, 11 truffes polylobées (fournies par Hervé Covès et Jean-Paul Laurent, Corrèze et Aveyron respectivement) ont été découpées en cubes d'environ 1 cm³ (10-23 morceaux par truffe) et une douzième truffe polylobée, d'un poids total de 1 kg (fournie par Claude Murat, Lorraine), a été échantillonnée en 12 points différents. L'ADN de la gléba de chacun des 181 échantillons a été extrait avec le kit RED Extract-N-Amp (Sigma-Aldrich, Allemagne) et celui des spores selon le protocole décrit par Paolucci *et al.* (2006) et De la Varga



Figure 13 – Truffe monolobée (à gauche) et truffe polylobée (à droite). La barre d'échelle représente 2 cm. Photos F. Le Tacon (gauche) et L. Schneider-Maunoury (droite).

et al. (2017). Les 362 extractions d'ADN (gléba et spores) ont été génotypées à l'aide de 15 marqueurs microsatellites (Murat *et al.*, 2011) et le locus du type sexuel (Rubini *et al.*, 2011b).

Quel que soit le nombre d'extractions d'ADN réalisées à partir de la gléba des ascocarpes (3 à 23 extractions par ascocarpe), le génotype maternel obtenu était toujours le même, indiquant l'unicité de ce partenaire. Pour 10 truffes polylobées sur 12, un seul génotype paternel a été obtenu pour toutes les extractions d'ADN de spores, suggérant là aussi l'unicité de ce partenaire. En revanche, pour deux truffes (16 et 23 fragments respectivement), deux marqueurs microsatellites ont montré des profils différents pour des extractions d'ADN de spores provenant de fragments différents, suggérant l'implication de deux partenaires paternels. Ces allèles supplémentaires pourraient être dus à des artefacts du génotypage, les génotypages ont donc été répétés quatre fois. Les deux allèles paternels ont été obtenus entre une et trois fois sur les quatre essais, ne permettant pas de trancher en faveur de leur nature réelle ou artéfactuelle. Afin de vérifier si ces allèles existaient réellement, les amplifications des microsatellites concernés ont été clonées (2 marqueurs microsatellites pour 16 et 23 fragments respectivement, soient 78 clonages). Trente colonies bactériennes par clonage ont été prélevées et génotypées (soit 2340 clones). À chaque fois, l'allèle maternel et un seul allèle supplémentaire ont été obtenus, indiquant l'existence d'un seul partenaire paternel.

Cette vérification a permis d'invalidier l'hypothèse de l'existence des partenaires parentaux multiples, mais a aussi mis en évidence l'apparition possible d'artefacts dans les génotypages microsatellites, notamment pour les partenaires paternels dont l'ADN est sans doute moins concentré. Les analyses présentées dans la suite de cette thèse ont donc été réalisées en réitérant les génotypages plusieurs fois afin de s'assurer de l'exactitude des génotypes obtenus.

1.2 Article I : mise à jour sur le cycle de vie de la Truffe noire

Les données de génétique des populations de Truffe noire aboutissent à un paradoxe quant à l'emplacement des partenaires paternels impliqués dans la reproduction (Murat *et al.*, 2013; Taschen *et al.*, 2016; De la Varga *et al.*, 2017). D'un côté, le fort apparentement entre les deux partenaires et l'isolement par la distance marqué à l'échelle des brûlés impliquent que les deux partenaires doivent être spatialement proches. D'un autre côté, on constate que les individus maternels sont spatialement agrégés par zones de même type sexuel et cette agrégation concerne aussi bien les ectomycorhizes que les ascocarpes. Rubini *et al.* (2011a) ont montré qu'après inoculation de jeunes arbres avec des fragments de truffes, les deux types sexuels se retrouvent sur les ectomycorhizes, mais au bout de quelques mois l'un des deux types sexuels devient dominant. Il semble donc qu'intervienne un mécanisme qui exclut l'un des types sexuels et conduit à la mise en place de plages où ectomycorhizes et glébas sont de même type sexuel. Comme la reproduction implique des individus de type sexuel opposé, les individus paternels ne peuvent pas être situés à proximité des individus maternels – tout du moins, pas sur les ectomycorhizes.

De plus, les partenaires maternels et paternels ont des structures génétiques différentes. Les individus maternels sont de grande taille (parfois plusieurs mètres de diamètre), participent à la formation de nombreux ascocarpes et sont souvent pérennes d'une année à l'autre (malgré des années de dormance). À l'inverse, les partenaires paternels sont beaucoup plus nombreux au

sein d'une truffière, souvent impliqué dans la formation d'un seul ascocarpe et rarement pérennes d'une saison à la suivante.

Ces résultats incitent donc à chercher les partenaires paternels ailleurs que sur les ectomycorhizes. Plusieurs études ont proposé que les spores jouent le rôle de partenaire paternel (Murat *et al.*, 2013 ; Selosse *et al.*, 2013 ; Taschen *et al.*, 2016), ce qui permettrait d'expliquer plusieurs observations. En effet, les deux types sexuels sont présents dans la banque de spores du sol et peuvent être amplifiés à partir des extractions d'ADN du sol (Murat *et al.*, 2013). Lorsque les truffes sont dispersées par des animaux qui les consomment, ou lorsqu'elles ne sont pas détectées et se dégradent dans le sol, des spores des deux types sexuels (génétiquement proches car issues de la même méiose) sont présentes au même endroit. Cette présence conjointe permettrait d'expliquer le fort apparemment observé entre partenaires impliqués dans la formation d'une même truffe. Reste à expliquer l'agrégation par type sexuel et la différence de taille et de pérennité des deux partenaires.

Le modèle proposé dans l'article de revue I est le suivant : lorsqu'un arbre est nouvellement inoculé, un mécanisme encore inconnu permet aux individus de l'un des deux types sexuels d'exclure les individus du type sexuel opposé. Par la suite, toute spore qui germera au pied de cet arbre sera soit du même type sexuel que celui des mycorhizes déjà installées (type sexuel *résident*) soit du type sexuel opposé. Un mécanisme de reconnaissance permettrait alors aux spores du type sexuel résident de s'installer aussi et de devenir partenaires ectomycorhiziens sur les racines de l'arbre-hôte, tandis que les spores du type sexuel opposé seraient exclues. Seuls les individus en interaction avec l'arbre ont un mycélium suffisamment étendu et pérenne et donc assez de ressources carbonées pour mettre en place des ascocarpes (Le Tacon *et al.*, 2013). À l'inverse, les individus qui ne peuvent pas établir d'ectomycorhizes doivent tirer leur carbone de la matière organique du sol, ce que leurs capacités enzymatiques ne permettent sans doute guère (Martin *et al.*, 2010) et qui limite leur développement. Ils germent donc de manière fugace, s'étendent peu et restent rarement d'une année sur l'autre. Ces germinations, de type sexuel opposé au type sexuel résident des ectomycorhizes, peuvent en revanche féconder un mycélium maternel à proximité. Ainsi, bien qu'hermaphrodite en théorie, chaque individu ne remplit donc généralement que l'un des deux rôles mâle ou femelle dans la reproduction. Cette répartition s'apparente en pratique à de la dioécie*.

Ce modèle implique l'existence d'un mécanisme de « reconnaissance » qui permettrait à des individus de même type sexuel de cohabiter sur les racines d'un arbre-hôte en excluant les individus de type sexuel opposé. Ce mécanisme s'apparente donc à un mécanisme d'incompatibilité végétative. Le locus MAT, avec d'autres locus polymorphes, pourrait participer directement à la reconnaissance végétative entre individus (Selosse *et al.*, 2013) ou être indirectement impliqué en étant génétiquement lié à un locus de reconnaissance végétative. Ce mécanisme et les locus envisagés restent encore inconnus pour l'instant.

La synthèse des connaissances sur le cycle de vie de la Truffe noire ainsi que le modèle de répartition des niches écologiques entre partenaires parentaux a fait l'objet d'un article de vulgarisation paru en novembre 2017 sur le site Planet-Vie (en annexe 1) et d'une revue scientifique parue en octobre 2017 dans *Trends in Microbiology* sous le titre : *Black Truffle, a hermaphrodite with forced unisexual behaviour*.

could be used to design eukaryote-like mini tubes. Moreover, the bacterial tubulins can provide a synthetic backbone for studying tubulin evolution, as they present a precious intermediate snapshot in tubulin evolution, with eukaryotic tubulin being extremely conserved in structure and function, and its bacterial ancestor, FtsZ, far on the evolutionary scale. Finally, the biological function of the bacterial tubulins remains to be elucidated. The bMTs have been localized near the membrane protrusions of *Prostheco bacter* [6], and *in vitro* studies have shown that Bklc can link Btubs to lipid vesicles [7]. The stabilizing effect of Bklc on Btubs could possibly provide rigidity and shape for the prosthecae, a possibility that will need to be addressed in future studies.

¹Institut Curie, PSL Research University, CNRS UMR3348, F-91405 Orsay, France

²INSERM, U1196, Université Paris Sud, Université Paris-Saclay, F-91405 Orsay, France

³Institut Pasteur, Unité de Microbiologie Structurale, CNRS UMR3528 & Université Paris Diderot, 25 rue du Dr Roux, 75724 Paris, France

*Correspondence:

annemarie.wehenkel@pasteur.fr (A.M. Wehenkel).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2017.08.004>

References

- Mitchison, T. and Kirschner, M. (1984) Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312, 237–242
- Jenkins, C. *et al.* (2002) Genes for the cytoskeletal protein tubulin in the bacterial genus *Prostheco bacter*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 17049–17054
- Martin-Galiano, A.J. *et al.* (2011) Bacterial tubulin distinct loop sequences and primitive assembly properties support its origin from a eukaryotic tubulin ancestor. *J. Biol. Chem.* 286, 19789–19803
- Sontag, C.A. *et al.* (2005) *In vitro* assembly and GTP hydrolysis by bacterial tubulins BtubA and BtubB. *J. Cell Biol.* 169, 233–238
- Schlieper, D. *et al.* (2005) Structure of bacterial tubulin BtubA/B: evidence for horizontal gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 9170–9175
- Pilhofer, M. *et al.* (2011) Microtubules in bacteria: Ancient tubulins build a five-prot filament homolog of the eukaryotic cytoskeleton. *PLoS Biol.* 9, e1001213
- Akendengue, L. *et al.* (2017) Bacterial kinesin light chain (Bklc) links the Btub cytoskeleton to membranes. *Sci. Rep.* Published online March 30, 2017. <http://dx.doi.org/10.1038/srep45668>
- Deng, X. *et al.* (2017) Four-stranded mini microtubules formed by *Prostheco bacter* BtubAB show dynamic instability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 14, E5950–E5958
- Cheng, Y. *et al.* (2015) A primer to single-particle cryo-electron microscopy. *Cell* 161, 438–449
- Alushin, G.M. *et al.* (2014) High-resolution microtubule structures reveal the structural transition in ab-tubulin upon GTP hydrolysis. *Cell* 157, 1117–1129

Forum

Black Truffle, a Hermaphrodite with Forced Unisexual Behaviour

Marc-André Selosse,^{1,*}
Laure Schneider-Maunoury,¹
Elisa Taschen,²
François Rousset,³ and
Franck Richard⁴

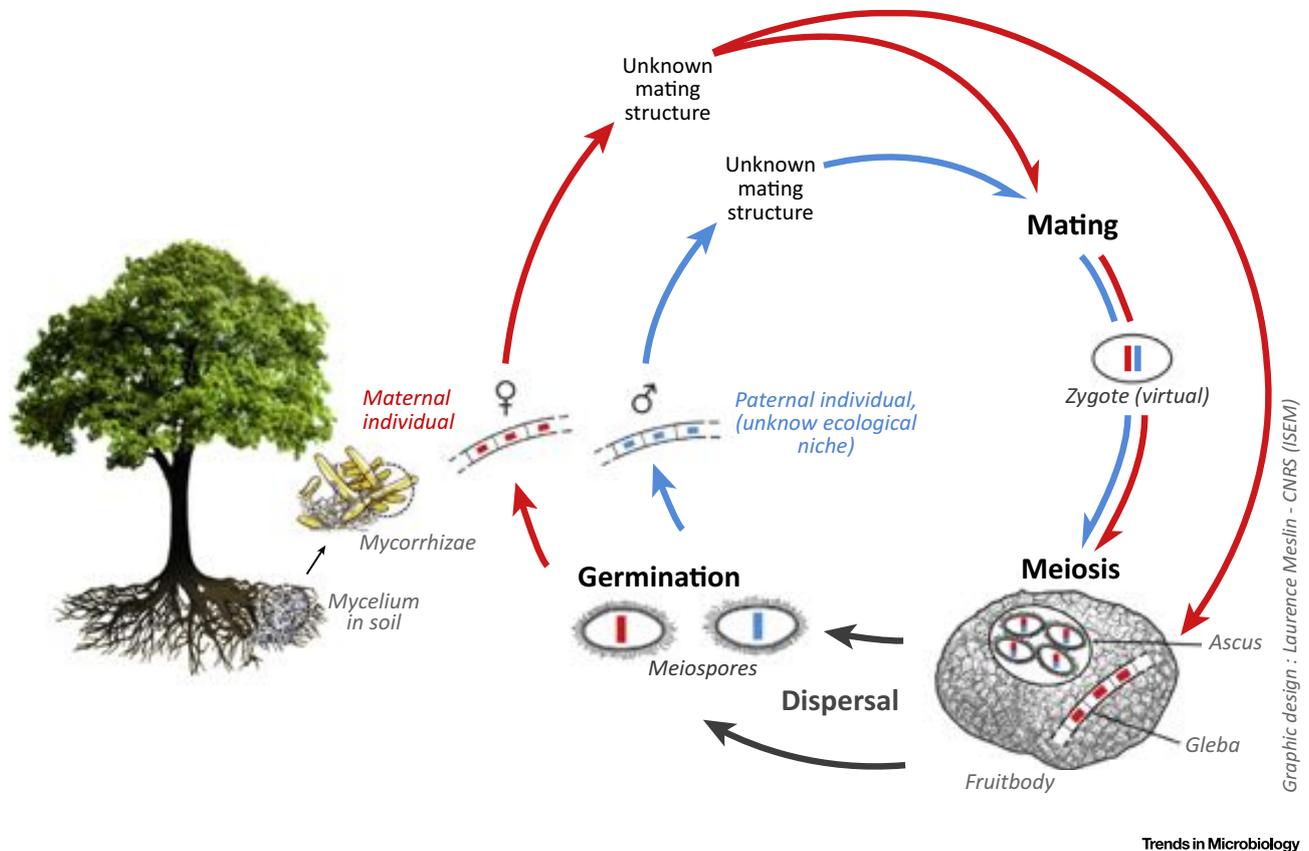
The life cycle of the black truffle (*Tuber melanosporum*) includes a mating before sporulation; although the species is hermaphroditic, mating turns out to involve parents with very different features, that mostly behave as male or female only, suggesting that this species undergoes forced dioecism.

The black truffle, a fascinating icon of the French gastronomy, turns out to have a no less fascinating sexual life. This soil fungus normally lives in soil as a haploid mycelium that associates with tree roots [1], forming symbiotic organs called mycorrhizae, from which it obtains sugar. The flavoured, edible and prized part of the truffle is an underground fruitbody, containing the meiotic spores (Figure 1). Animals attracted by the odour find and eat the fruitbodies, and the spores are dispersed in the faeces since their thick cell wall protects them from digestion.

The resistance of spores to enzymatic attacks delayed the discovery that two haploid partners are required to build a truffle fruitbody. The DNA extraction protocols used in the first instance revealed a single partner producing the outer skin and internal tissues (the so-called gleba), and because of this, truffles were long considered autogamous [2]. More recently, harsher methods allowed the

extraction of spore DNA and identified a second partner that contributes to spore genomes, together with the previous partner [3]. A mating event leads to the formation of a virtual diploid zygote, which thereafter undergoes meiosis to produce the numerous haploid spores (Figure 1). Thus, one parent (considered as the maternal one) provides genes as well as food and protection to the spores, while the other (the paternal parent) provides only genes. Black truffle haploid mycelia are considered to potentially be hermaphrodites, that is, can be mother and father, but autogamy is forbidden by the existence of mating types, a mechanism of self-sterility common among fungi: each haploid individual carries either the MAT1-1 or the MAT 1-2 allele [4], and mating occurs only between individuals of different mating types, producing MAT1-1/MAT 1-2 zygotes.

The available black truffle genome [5] prompted the design of microsatellite markers to investigate the distribution of genotypes (genetic individuals) in soil. The first analyses confirmed that the genetic individuals forming the gleba were also present on surrounding mycorrhizae [6,7], establishing evidence for the trophic link between fruitbodies and tree roots by way of the maternal parent. Moreover, labelling of tree photosynthates by ¹³CO₂ successfully demonstrated the transfer of carbon from leaves to fruitbodies [8], supporting the nutritional role of maternal individuals. Yet, the spatial analysis of populations, as sampled from mycorrhizae and gleba, revealed two strong structures. First, segregated patches of maternal individuals with identical mating types (i.e., exclusively MAT1-1 or MAT 1-2) were found in populations. Second, microsatellite analyses revealed a strong isolation by distance among maternal individuals, that is, spatially close individuals are genetically close [2,7]. The later feature may relate to the local deposition by animal dispersers of spores issuing from a single or from few fruitbodies, so that immigrant spores are



Trends in Microbiology

Figure 1. The Lifecycle of the Black Truffle *Tuber melanosporum*. The maternal individual is in red; the paternal one in blue. The edible part is a fruitbody made of sterile, nourishing, and protective tissues of maternal origin (the gleba) supporting the development of spores that derive by meiosis of a virtual zygote, itself issuing from a mating event. Each group of spores issuing from one meiosis are embedded by four in one ascus, and fruitbodies contain thousands of asci. Autogamy is prevented by mating types, that is, the maternal individual is MAT 1-1 (or MAT 1-2-1) and the paternal one is MAT 1-2-1 (or, respectively, MAT 1-1). Figure produced with the help of Laurence Meslin, Plateforme Communication Scientifique Visuelle, ISEM.

genetically related. However, isolation by distance was observed both in a naturally established truffle field and in plantations of trees inoculated in the nursery [9] where inoculation methods differ from natural conditions by often involving mixes of several fruitbodies. Moreover, immigration of spores from a few fruitbodies does not explain the spatial aggregation of mating types, since spores of a fruitbody are MAT1-1 and MAT 1-2, as the result of meiosis of the MAT1-1/MAT 1-2 zygote. Which then leads to the question: what drives such population structures?

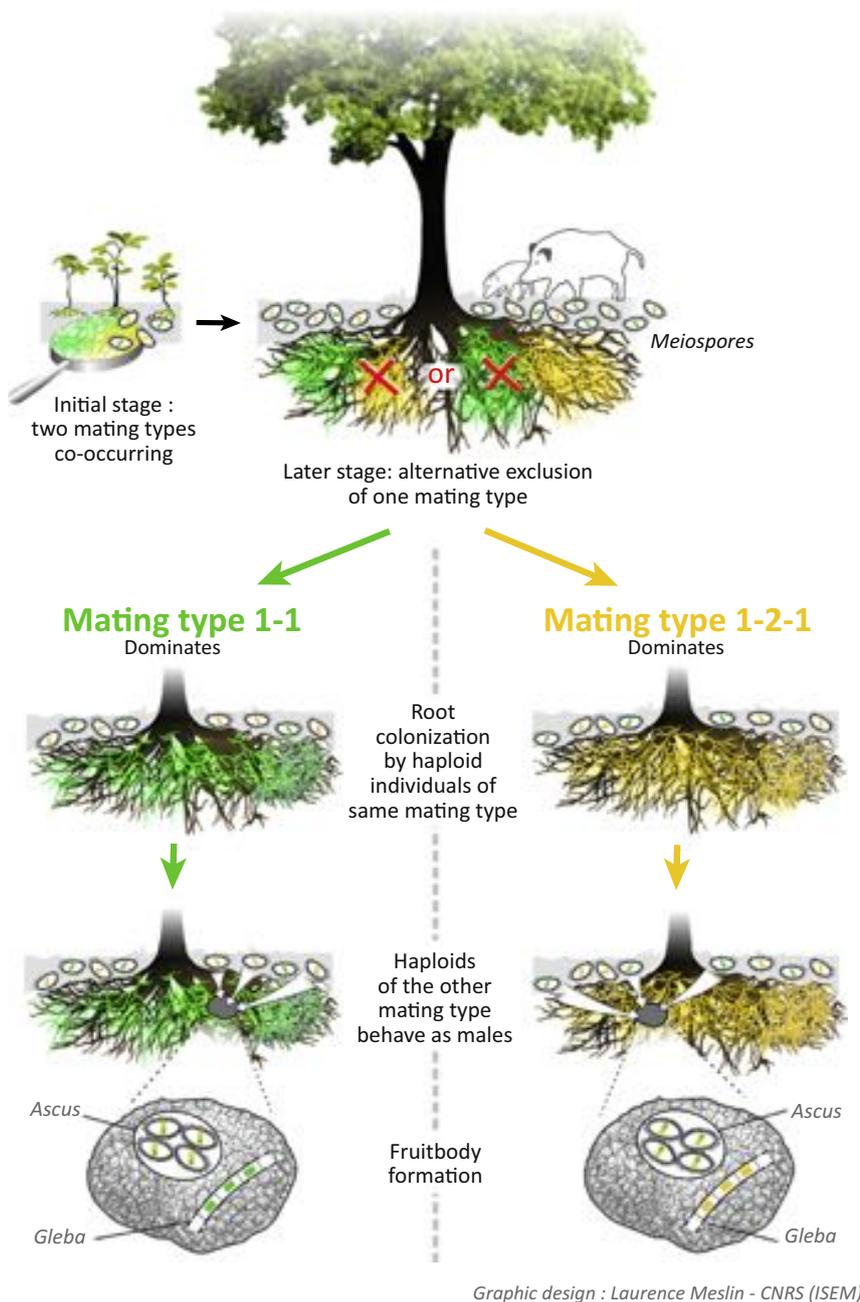
The monitoring of trees in a nursery after inoculation by black truffle spores [6] suggested that although individuals with both mating types coexisted on young

seedlings, one of the mating types was progressively excluded over time (Figure 2). The underlying mechanism is not yet fully understood, but a role for vegetative incompatibility has been suggested [6,10]. Vegetative incompatibility is a common mechanism in fungi [11], where genetically close individuals reciprocally cooperate, mainly by hyphal fusion and resource sharing. Kinship is ensured by the existence of identical alleles at one or more controlling loci. Vegetative incompatibility protects against exploitation by non-kin, and can exclude competing kinships. In the black truffle, one of the controlling loci would be linked to the mating type (if not the mating type itself [11]), so that the competitive success of one kinship would entail homogeneous MAT1-1

or MAT 1-2 patches. Homogeneity would also be favoured in parts of the genome close to the other putative controlling loci, contributing to the pattern of isolation by distance that emerges in all colonization processes, that is, spontaneous or by anthropic inoculation.

Paternal individuals only recently attracted detailed investigations [6,9,12]. Their genotype can be deduced from the zygotic genotype obtained by bulk extraction of spore DNA, by subtracting the maternal genotype as obtained by simple gleba DNA extraction (Figure 1). Paternal genotypes revealed two striking features. First, in most fruitbodies, they turned out to be genetically very similar to maternal individuals [3,9,12],

Dynamics and reproduction of truffle populations



Trends in Microbiology

Figure 2. Mating Type Dynamic and Mating in Black Truffle Populations. While at population establishment, haploid individuals of both mating types coexist (top); an exclusion of one type progressively occurs so that mycelia accessing the tree roots locally display the same mating type. Spores also exist in soil, because of spore dispersion, and because of a spore bank issuing from nondispersed fruitbodies. One half of these spores displays the alternative mating type and may provide the paternal contribution. In mating, individuals of the locally dominant mating type behave maternally, that is, also form the gleba supporting fruitbodies. With the help of Laurence Meslin, Plateforme Communication Scientifique Visuelle, ISEM.

significantly more than if mating occurred at random within the population. The load of consanguinity is mainly acting on diploids (due to the accumulation of rare deleterious recessive mutations, hidden by diploidy), but is limited on fully haploid organisms such as the black truffle. But what drives such high inbreeding? It can be explained if paternal genotypes undergo isolation by distance similar to maternal individuals, and if mating does not involve dispersal of male gametes. Under such assumptions, mating occurs between neighbouring individuals that are also genetically close, explaining the consanguinity observed. But where do these paternal individuals live in soil? The second finding was the striking differences between fathers and individuals acting as mothers.

Several maternal individuals survive from one year to another; they sometimes produce several neighbouring fruitbodies during several years [7,9], suggesting that their mycelia can reach metric size in soil; and, as stated above, they colonize surrounding tree mycorrhizae [9,12] (Figure 1). By contrast, paternal individuals are very rarely found over 2 successive years and/or in multiple fruitbodies, suggesting much smaller size and shorter lifespan; moreover, they are never found in surrounding mycorrhizae [6,9,12]. On the one hand, the latter observation is consistent with the spatial aggregation of mating types on mycorrhizae, with local patches of individuals with a single mating type. On the other hand, this appears at odds with the statement that fathers should be spatially close to mothers and that there is no dispersal of male gametes, in order to explain consanguinity. Thus, paternal individuals occupy another, yet unidentified, niche close to mothers. It has been proposed that germinating spores of the opposite mating type, although not able to settle permanently, may act as fathers [7,9,10]; yet other niches in the soil remain to be explored, including short saprotrophic survival: indeed, both mating type alleles

can often be detected when extracting soil DNA [6], suggesting that partners of the other mating type do coexist, even if their ecology remains unknown.

Despite potential hermaphroditism, consistent with rare cases where undistinguishable individuals behave as a father in one fruitbody and as mother in other ones [12], most haploid individuals undergo enforced unisexuality (Figure 2). On a given soil patch, individuals of one mating type can establish, form perennial individuals, and support fruitbodies in a maternal way. Although they could (and rarely do [12]) act as fathers as well, they are often too far from compatible partners to be able to provide a maternal contribution. Individuals whose mating type is locally excluded cannot settle, or they remain confined in a more labile niche that remains to be assessed, but they act paternally in mating (Figure 2). This is probably the only contribution they can achieve because of their limited access to resources. Thus, truffle haploid individuals are hermaphrodites enforced to unisexuality,

depending on their mating type and that of the surrounding individuals established before their arrival.

Acknowledgments

We thank three anonymous referees for helpful comments, and apologize that size limitation did not allow us to cite many relevant works.

¹Institut de Systématique, Évolution, Biodiversité (ISYEB - UMR 7205 – CNRS, MNHN, UPMC, EPHE), Muséum national d'Histoire naturelle, Sorbonne Universités, 57 rue Cuvier, 75005, Paris, France

²INRA, UMR Eco&Sols, Place Viala, 34060, Montpellier, France

³Institut des Sciences de l'Évolution, Université de Montpellier, CNRS, IRD, EPHE CC 065, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier cedex 05, France

⁴CEFE UMR 5175, CNRS – Université de Montpellier and Université Paul-Valéry Montpellier – EPHE – 1919 route de Mende, 34293 Montpellier, France

*Correspondence:

ma.selosse@wanadoo.fr (M.-A. Selosse).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2017.05.010>

References

1. Le Tacon, F. *et al.* (2015) Certainties and uncertainties about the life cycle of the Périgord black truffle (*Tuber melanosporum* Vittad.). *Ann. For. Sci.* 73, 105–117
2. Bertault, G. *et al.* (2001) Population genetics and dynamics of the black truffle in a man-made truffle field. *Heredity* 86, 451–458

3. Riccioni, C. *et al.* (2008) *Tuber melanosporum* outcrosses: analysis of the genetic diversity within and among its natural populations under this new scenario. *New Phytol.* 180, 466–478
4. Rubini, A. *et al.* (2011) Isolation and characterization of MAT genes in the symbiotic ascomycete *Tuber melanosporum*. *New Phytol.* 189, 710–722
5. Martin, F. *et al.* (2010) Périgord black truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis. *Nature* 464, 1033–1038
6. Rubini, A. (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 Phytol.* 189, 723–735
7. Murat, C. *et al.* (2013) Fine-scale spatial genetic structure of the black truffle (*Tuber melanosporum*) investigated with neutral microsatellites and functional mating type genes. *New Phytol.* 199, 176–187
8. Le Tacon, F. *et al.* (2013) Carbon transfer from the host to *Tuber melanosporum* mycorrhizas and ascocarps followed using a ¹³C pulse-labeling technique. *PLoS One* 8, e64626
9. Taschen, E. *et al.* (2016) How the truffle got its mate: insights from genetic structure in spontaneous and planted Mediterranean populations of *Tuber melanosporum*. *Mol. Ecol.* 25, 5611–5627
10. Selosse, M.-A. *et al.* (2013) Do black truffles avoid sexual harassment by linking mating type and vegetative incompatibility? *New Phytol.* 199, 10–13
11. Saupé, S.J. (2000) Molecular genetics of heterokaryon incompatibility in filamentous ascomycetes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 489–502
12. De la Varga, H. (2017) Five years investigation of female and male genotypes in Périgord black truffle (*Tuber melanosporum* Vittad.) revealed contrasted reproduction strategies. *Environ. Microbiol.* Published online March 29, 2017. <http://dx.doi.org/10.1111/1462-2920.13735>

1.3 Article II : estimation de la banque de spores dans les brûlés

Différentes pratiques empiriques consistent à apporter, seules ou en mélange, des spores sur les brûlés, en vue de le « ré-inoculer ». Si certains trufficulteurs dispersent des fragments de truffes sur l'ensemble du brûlé, d'autres enrichissent le sol localement en enfouissant des spores dans des trous d'une vingtaine de centimètres de côté et de profondeur variable (Murat *et al.*, 2017). Cette pratique connue sous le nom de « piège à truffes » se développe rapidement en France et en Espagne, malgré l'absence de preuves générales de son efficacité pour augmenter la production de truffes. Il a été montré que la production de truffes est plus souvent localisée à l'intérieur des pièges qu'à l'extérieur (Murat *et al.*, 2016), mais deux éléments interviennent dans cette pratique : l'apport de spores d'une part et la perturbation créée par l'excavation d'autre part. Une expérience de long terme mise en place à Montpellier montre en effet que dans certains cas, la perturbation seule (sans apport de spores) suffit à augmenter la production d'ascocarpe dans le piège (Taschen *et al.*, en préparation). Dans d'autres cas en revanche, il n'y a aucun effet. Dans un troisième type de cas, l'apport de spores intervient dans la formation des ascocarpe. Les génotypes introduits par les spores apportées sont retrouvés dans les spores des ascocarpe produits entre deux ans et trois ans après mise en place des pièges. Les spores introduites participent toujours comme partenaires paternels, confirmant que les partenaires paternels sont bien issus de la banque de spores du sol (Selosse *et al.*, 2017 ; Taschen *et al.*, en préparation).

Si les spores jouent effectivement le rôle de partenaires paternels dans la reproduction, alors l'apport régulier de nouvelles spores ne peut *a priori* qu'être bénéfique à la production. Cependant, les sols des truffières contiennent déjà de grandes quantités de spores et la question se pose donc de savoir si la ré-inoculation est nécessaire. L'alimentation naturelle de la banque de spores s'effectue de deux manières : soit par les déjections d'animaux consommateurs de truffes, qui dispersent des spores sur des distances plus ou moins grandes, soit par les truffes qui ne sont pas dispersées et qui sont dégradées localement par la microfaune du sol.

Afin de quantifier la proportion de truffes qui restent potentiellement sous terre après la saison de récolte, un protocole de comptage a été proposé aux trufficulteurs volontaires. Ce protocole consistait à sélectionner des arbres pour lesquels la production de truffes durant la saison était connue, à creuser dans le brûlé quatre trous de dimensions fixées après la saison de récolte mais avant l'initiation des truffes de l'année suivante (mars-avril) et à compter le nombre de truffes trouvées dans ces trous. Le nombre de truffes trouvées dans les quatre puits est ensuite extrapolé à la surface du brûlé et comparé à la production durant la saison précédente. Ce protocole a été appliqué dans 6 truffières sur 3 à 10 arbres par truffière (38 brûlés en tout). Dans 45 % des brûlés, au moins une truffe non détectée pendant la saison de récolte a été trouvée lors de l'expérience. Mis à part la truffière sur laquelle trois arbres seulement ont été testés, toutes les truffières avaient au moins un brûlé sur lequel ont été trouvées des truffes non détectées. Au total, la proportion de truffe non détectées extrapolées à la surface du brûlé atteint 42 %. Un très grand nombre de truffes restent donc sous terre et enrichissent la banque de spores du brûlé.

Ce chiffre de 42 % de truffes non détectées repose sur l'étude d'un nombre limité de brûlés, il serait donc nécessaire de recommencer ce type de mesure sur un plus grand nombre de brûlés. Cependant, il soulève des interrogations quant à l'absence de détection de ces truffes.

Plusieurs hypothèses sont possibles : le chien truffier peut avoir fait défaut, les truffes n'étaient pas mures pendant la saison de récolte, ou encore elles n'ont jamais développé d'arômes. L'existence d'ascocarpes non odorants pourrait alors être interprétée comme une stratégie d'enrichissement de la banque de spores locale, à l'instar des plantes qui produisent différents types de graines destinées à la dispersion à court ou longue distance (Imbert, 2002). Les truffes sans odeur n'étant pas dispersées, elles sont dégradées sur place et enrichissent la banque de spore localement, tandis que les truffes qui ont développé leurs arômes iront enrichir ou initier la banque de spore là où elles seront dispersées.

Cette étude a été effectuée grâce à la participation des trufficulteurs qui ont appliqué eux-mêmes le protocole proposé ou nous ont autorisé à venir le mettre en place sur leur truffière pendant les hivers 2017-2018 et 2018-2019. Les résultats préliminaires obtenus la première année ont fait l'objet d'un article de vulgarisation dans *Le Trufficulteur* en 2018 et l'ensemble des résultats, augmenté d'une année de données, a été soumis à la revue *Mycorrhiza* en mai 2019 sous le titre : *Soil spore bank in Tuber melanosporum : up to 42 % of fruitbodies remain unremoved in managed truffle grounds*. La version ci-après est la version acceptée (août 2019).

1 **Soil spore bank in *Tuber melanosporum*: up to 42% of fruitbodies remain unremoved in**
2 **managed truffle grounds.**

3

4 Laure Schneider-Maunoury^{1*}, Elisa Taschen², Franck Richard³, Marc-André Selosse^{1,4*}

5

6 ¹ Institut de Systématique, Évolution, Biodiversité (ISYEB – UMR 7205 – CNRS, MNHN, SU,
7 EPHE), Muséum national d'Histoire naturelle, 57 rue Cuvier, 75005, Paris, France

8 ² INRA, UMR Eco&Sols, Place Viala, 34060, Montpellier, France

9 ³ CEFE UMR 5175, CNRS - Université de Montpellier - Université Paul-Valéry Montpellier - EPHE –
10 1919 route de Mende, 34293 Montpellier, France

11 ⁴ University of Gdańsk, Faculty of Biology, ul. Wita Stwosza 59, 80-308 Gdańsk, Poland

12 * equally contributing.

13 Corresponding author: Marc-André SELOSSE, ma.selosse@wanadoo.fr; tel: +33 607123418.

14 <http://orcid.org/0000-0003-3471-9067>

15

16 **Summary**

17

18 Fungi fruiting hypogaeously are believed to form spore banks in soil especially because some
19 fruitbodies are not removed by animals. However, little is known on the proportion of fruitbodies that
20 are not removed by animals. Also, in managed truffle grounds, an unknown fraction of fruitbodies may
21 remain untouched. We took advantage of the brûlé phenomenon, which allows delineation of the
22 mycelium distribution, to assess the proportion of unremoved Black Truffle (*Tuber melanosporum*)
23 fruitbodies in the context of plantations where fruitbodies are actively sought and harvested by truffle
24 growers. We inspected portions of the brûlés after the harvest season to find unremoved fruitbodies.
25 On average, from six truffle grounds in which a total of 38 brûlés were investigated, unremoved
26 fruitbodies represented 33% of the whole fruitbody production (42% when averaging all the brûlés).
27 We discuss this value and its high variability among truffle grounds. Beyond the local and variable
28 accidental reasons that may lead to this high proportion, we speculate that the formation of some
29 undetectable fruitbodies may be under selection pressure, given the reproductive biology of *T.*
30 *melanosporum*.

31

32 **Keywords:** ascomycetes life cycle, brûlé, mycorrhizae, spore dispersal

33 Introduction

34 The existence of a spore bank in soil is well characterized in fungi forming hypogeous fruitbodies
35 (e.g., Kjølner & Bruns 2003; Bonito *et al.* 2012; Glassman *et al.* 2015; Séné *et al.* 2018). In such
36 species, animals usually disperse spores by ingesting the fruitbodies (Urban 2017; Vašutová *et al.*
37 2019), and a part of the spore bank is deposited by feces, but another part may arise from fruitbodies
38 that are not removed by animals and remain in the soil. The spores left in soil survive well, especially
39 compared to those of fungal species that disperse spores aerially (Bruns *et al.* 2009; Murata *et al.*
40 2017), likely due to the thick wall adapted to protect them in the digestive tract of animal dispersers.
41 Germination of this spore bank may lead to settlement of new individuals, genetically related to the
42 existing parents. This results in a pattern where spatially close individuals are genetically close, *i.e.* a
43 pattern of isolation by distance (IBD; for a review, see Douhan *et al.* 2011; Vincenot *et al.* 2017), as
44 characterized in *Rhizopogon* spp. (Kretzer *et al.* 2005; Dunham *et al.* 2013) or in *Tuber melanosporum*
45 (Bertault *et al.* 2001; Taschen *et al.* 2016; de la Varga *et al.* 2017). In the current short note, we
46 investigate the occurrence of unremoved fruitbodies of the highly prized Black Truffle, *Tuber*
47 *melanosporum*, under managed conditions where ground managers extensively harvest fruitbodies.

48

49 The biological relevance of the spore bank is very important for *T. melanosporum* because spores are
50 believed to have an additional gametic role in this and likely other *Tuber* species. Fruitbody formation
51 results from mating between two individuals of different mating type (Selosse *et al.* 2017). The
52 maternal individual forms the sterile tissues of the fruitbody and likely supports and feeds fruitbody
53 development, while the paternal individual only provides genes that can be found in the meiotic
54 ascospores (Riccioni *et al.* 2008; Murat *et al.* 2013; for review, see Selosse *et al.* 2017). Maternal
55 individuals colonize surrounding trees as ectomycorrhizal partners (Riccioni *et al.* 2008; Taschen *et al.*
56 2016). Moreover, in the brûlé, *i.e.* the zone around host trees where *T. melanosporum* develops and
57 where herbaceous plants grow poorly (Streiblová *et al.* 2012), maternal individuals colonize as
58 endophytes the roots of non-ectomycorrhizal plants (Schneider-Maunoury *et al.* 2018). Conversely,
59 paternal individuals are found neither on ectomycorrhizal roots (Murat *et al.* 2013; Taschen *et al.*
60 2016) nor as endophytes in non-ectomycorrhizal plants from the brûlé (Taschen *et al.* 2016; Schneider-
61 Maunoury *et al.* 2018). However, the possibility that paternal individuals live far away is not plausible
62 because of the high consanguinity between male and female in each fruitbody (Taschen *et al.* 2016; de
63 la Varga *et al.* 2017), which, given the existence of an IBD pattern, implies that both parents occur in
64 close vicinity. The apparent absence of vegetative presence of paternal individuals prompted the
65 hypothesis that they were germinating spores (Selosse *et al.* 2013; Taschen *et al.* 2016). Spores may
66 therefore have a gametic contribution to fruitbody formation in *T. melanosporum*.

67

68 Under this assumption, the *T. melanosporum* spore bank is not only a local inoculum providing new
69 mycelia, but also a crucial resource for future matings and the subsequent formation of fruitbodies.
70 Yet, the active fruitbody harvest for commercial reasons may preclude a sufficient spore bank in
71 managed truffle grounds. This may even explain why the large-scale inoculations and plantations in
72 France (now accounting for 80% of the harvest; Murat 2015) did not reverse the *ca.* 10-fold reduction
73 of the truffle production since the beginning of the 20th century (Callot 1999; Le Tacon 2017). One
74 may question whether truffle harvesting in truffle grounds, based on weekly detection of ripe
75 fruitbodies by trained dogs or, less often pigs (Callot 1999), may limit the spore bank. Here, we
76 estimate the percentage of unremoved fruitbodies at the end of the fruiting season on productive
77 brûlés.

78

79 **Material and methods**

80

81 *Choice of brûlés*

82 We asked French truffle growers to choose brûlés of roughly circular shape for which they knew the
83 number F of fruitbodies produced over the previous harvesting season (fall to winter). The crucial
84 point in this study is that the brûlé allows spatial delineation of the mycelium distribution. Assuming a
85 circular shape (and avoiding too irregular brûlés), we were able to approximate the surface S of these
86 brûlés. In this report, we only considered truffle grounds with more than 3 investigated brûlés. All
87 truffle grounds are managed plantations *sensu* domesticated situation in Taschen *et al.* (2016).

88

89 *Detection of unremoved fruitbodies*

90 At end of the fruiting season in 2018 or 2019 (late winter/early spring), depending on the truffle
91 ground (Table 1), at a time when dogs no longer detect any fruitbodies, 4 wells of 30 x 30 cm were
92 opened on each brûlé (Figure S1a,b). These limited areas minimized brûlé disturbance. The wells were
93 situated on the brûlé at random distances and random orientations from the tree trunk. Soil was
94 excavated down to the maximal depth where the truffle growers usually harvest fruitbodies in their
95 truffle ground (20 cm at least, and more according to soil type): our record is conservative, since we
96 cannot exclude that additional fruitbodies occur deeper. This means investigating a surface of $s =$
97 $4 \times 0.3 \times 0.3 = 0.36 \text{ m}^2$ on each brûlé. The number f of fruitbodies visually removed (i.e. without dog
98 and not using smell for detection) is recorded. We estimate the percentage of unremoved fruitbodies
99 by extrapolating the number of unremoved fruitbodies to the whole brûlé, and by dividing by the
100 observed production, i.e. as $100 \cdot (f/s)/(F/S+f/s)$.

101

102 Results and discussion

103

104 *Unremoved fruitbodies*

105 We analyzed 38 brûlés from six truffle grounds that produced 1 to 56 fruitbodies during the year of
106 investigation, which means that 152 wells were realized (Table 1). Each of these wells revealed 0 to 6
107 unremoved fruitbodies, *i.e.* in all 0 to 8 fruitbodies per brûlé (Table 1). They displayed various states
108 of preservation (but were all ripe to overripe; Figure S1c), and occurred at various depths (although
109 this was not quantified, several fruitbodies were even very close to the surface). Since the search was
110 conducted at depths where fruitbodies are normally collected on the respective truffle ground, we can
111 exclude the detection of fruitbodies that were missed by dogs because of a too deep location. We
112 consider unlikely that these fruitbodies were from previous years because (i) the high biological
113 activity in the mull-type soils of truffle ground would not allow this and (ii) the monitoring of soil-
114 implanted fruitbody pieces reveals full dismantlement and dispersal by macrofauna within 2-3 weeks
115 (Barry-Etienne, Jourdan & Murat, personal communication). Some fruitbodies may even have
116 disappeared at the time of sampling. Thus, we offer a conservative estimate of the number of
117 unremoved fruitbodies, *i.e.* additional ones may have gone unremoved in our wells, either because
118 they were located deeper, or because the fruitbodies collected in this study were totally decayed and
119 locally dispersed by the by the microfauna at the sampling date.

120

121 The values revealed high variability among wells and among brûlés (Table 1), likely because of patchy
122 distribution and low density of fruitbodies on the brûlé. The sampled area was very small
123 ($0.36 \text{ m}^2/\text{brûlé}$) and represented a small portion of the brûlés (from 1.3 to 14.2% of the brûlé surface,
124 mean 4.9%): thus, the probability of detecting fruitbodies was low, even if they were present. In this
125 framework, means are more relevant: by averaging values from the six truffle grounds, unremoved
126 fruitbodies represented 33% of the whole fruitbody production; by averaging all the brûlés, this
127 estimation reached 42% (Table 1). Due to their decaying status, no reliable weighting was possible,
128 but unremoved truffles did not look smaller than fruitbodies harvested earlier in the season
129 (Figure S1c).

130

131 Even for the mean calculated for the six truffle grounds, standard deviations were very high (as high as
132 means; Table 1) because the diverse truffle grounds offer contrasting pictures. Unremoved fruitbodies
133 reached 93% of the production in Truffle ground #3, while none was found in Truffle ground #6. We
134 suspect that both local conditions and management practices, such as soil properties or the
135 performance of dogs involved in harvesting, may explain these contrasting results. We tested whether
136 truffle grounds on which many fruitbodies have been harvested during the season contain fewer

137 unremoved truffles. However, no visual trend or statistically supported correlation was observed,
138 either when comparing all brûlés (Figure S2A; linear regression model, $P=0.17$) or when comparing
139 this at truffle ground level (Figure S2B; linear regression model, $P=0.46$). Thus, local conditions or
140 practices (especially dogs) are unlikely to explain variable levels by a simple low-quality detection,
141 and we really face a significant fraction of unremoved fruitbodies whatever the (removed) fruitbody
142 production.

143

144 We hoped to convince more truffle growers to join our efforts in order to get a better evaluation, but
145 our preliminary results met with some skepticism and limited the number of contributors. In the future,
146 a larger set of truffle grounds will be useful to identify factors driving differences between them. To
147 conclude, a substantial proportion of fruitbodies remain unremoved on average, even if this value is
148 lower (and possibly null) in some truffle grounds.

149

150 *Biological outcomes*

151 Our results indicate that unremoved fruitbodies contribute to a truffle spore bank in truffle grounds.
152 We cannot be sure that the germination ability of unremoved spores equals that of those deposited by
153 feces (transit through the digestive tract may affect this parameter; Colgan & Claridge, 2002). This
154 inoculum may be subject to underground short-range dispersal by soil microfauna (*e.g.* truffle-eating
155 coleopters such as *Leiodes cinnamomea* or larvae of the *Suillia pallida* fly; Le Tacon 2017). This may
156 reinforce the IBD detected in *T. melanosporum* populations (Taschen *et al.* 2016; de la Varga *et al.*
157 2017) by allowing the settlement of genetically close individuals in the vicinity of their parents.

158

159 It is, however, rather unexpected to reach such a level of failed detection in truffle grounds where
160 trained dogs pass regularly (more than once a week). It is hard to estimate the difference with wild
161 truffle grounds (the high standard deviations precluded detection of statistical significance), but we
162 suggest that the detection intensity may be at least similar in natural conditions. Indeed, if one assumes
163 that unremoved fruitbodies contribute to IBD, the fact that IBD did not differ between managed and
164 unmanaged (wild) truffle grounds (Taschen *et al.* 2016) suggests similar levels of failed detection.

165

166 Failed detection may be explained by two hypotheses (Figure 1). First, accidentally, dogs may simply
167 fail to detect some fruitbodies (as stated above, this is unlikely to be due to a deeper location): under
168 this assumption, unremoved fruitbodies would be normal ones (Figure 1, left panel). However, this
169 scenario is unlikely when considering the frequent harvests on the truffle ground. Second, these
170 fruitbodies may not be detectable by themselves, *e.g.* because they do not ripen correctly, remain

171 odorless as they fail, during the ripening transition, to emit the aroma attracting dispersers (Figure 1,
172 right panel; Splivallo *et al.* 2011). At the time of detection in the wells, none of the fruitbodies had
173 aroma, but this was expected given their age and decay stage.

174

175 Absence of aroma emission, if any, may in turn result from two non-exclusive causes. First,
176 developmental accident, unknown local conditions or parasitism may have modified fruitbody
177 metabolism and aroma, but this is somewhat unexpected since, from our observations, the shape
178 looked normal (Figure S1c). Second, it can be speculated that, during the development of fruitbodies,
179 a developmental switch happens after which fruitbodies become either fragrant or not fragrant (Figure
180 1, right panel). So far, we are only aware of intraspecific genotypic variability affecting aromas in the
181 related species *T. aestivum* (Splivallo *et al.* 2012). Yet, a probability of not developing an attractive
182 aroma may allow accumulation locally of spores that can contribute as male partners to mating in the
183 years ahead. Thus, if spores are indeed recruited as a source of gametes, as is currently supposed
184 (Selosse *et al.* 2013; Taschen *et al.* 2016; de la Varga *et al.* 2017), fruitbody development may have
185 evolved to account for this thanks to a developmental alternative. In other words, we suggest that
186 developmental flexibility allows the production of undetectable fruitbodies (Figure 1, right panel) in a
187 process selected by way of paternal fitness. In more than 200 plant species, seeds undergo alternative
188 development (Imbert *et al.* 2002) resulting in heteromorphy associated with different functions, e.g.
189 seeds with local *versus* distal dispersal ability, exactly as in our case for spores. However, the variable
190 rates from one truffle ground to another suggest that such a mechanism, if any, is either spatially
191 variable, or does not account for the whole number of unremoved fruitbodies in some sites.

192

193 *Implications for truffle production*

194 The awareness that spores may provide a paternal contribution has prompted fears that production may
195 be limited by the availability of paternal contributors, and this potentially gives meaning to two
196 empirical practices (Taschen *et al.* 2016; Le Tacon 2017). First, the ‘truffle trap’ is a hole in the brûlé
197 refilled by a substrate containing *T. melanosporum* spores, which in some cases enhances production
198 after 2 or 3 years (Murat *et al.* 2016; Taschen, Selosse & Richard, to be published). Second, many
199 truffle growers carry out annual scattering of fruitbody fragments on brûlés (Murat 2015) that are
200 believed to sustain the presence of the fungus (‘re-inoculation’). Indeed, it has been claimed that this
201 practice explains why paternal diversity is higher in plantations where re-inoculation is performed than
202 in the wild (spontaneous brûlés in the forest; Taschen *et al.* 2016). Our observations suggest that, if
203 relevant from a sporal point of view, such practices may not be equally useful in every plantation,
204 since variable amounts of spores are left in soil. This calls for more careful evaluation of how truffle

205 traps and annual scattering of fruitbody fragments contribute to production in diverse truffle grounds,
206 and, as stated above, more studies on factors driving the amount of unremoved fruitbodies.

207

208 Finally, assessing why some fruitbodies are undetectable requires further analysis. If these fruitbodies
209 are of commercial value at some point of their development, and as long as their partial harvest does
210 not hamper the spore bank, there is here a potential way of increasing (by up to one half) the
211 production and income of truffle grounds.

212

213 **Conclusion**

214 We have quantified the proportion of unremoved *T. melanosporum* fruitbodies in managed truffle
215 grounds where careful fruitbody harvesting makes leftovers improbable. The high proportion of
216 leftovers contributes to the formation of a consequent and perennial spore bank as recorded for other
217 hypogeous mushroom species and provides a potential source of male partners for mating in this
218 species. We speculate that undetectability may even be selected for a fraction of fruitbodies, and do
219 not consider that the leftover would necessarily be of sufficient quality for sale. The high variability of
220 the percentage of unremoved fruitbodies from one truffle ground to another suggests that some as yet
221 unknown factors affect it. Similar investigations for other truffle species, *e.g.* the economically
222 important *T. aestivum* and *T. magnatum*, are now pending, although the absence of marked brûlé in
223 these species may complicate delineation of the zone occupied by the mycelium.

224

225 **Acknowledgments**

226 We are very grateful to Lucien Bonneau, Francis Caulet, Jean-Paul Laurents, Lucien Romieu, Patrick
227 Savary and Jean-François Tourette for having carried out the protocol on, or given access to, their
228 truffle ground. We thank Dominique Barry-Etienne and Claude Murat for information on truffle
229 fruitbody decomposition in soil, David Marsh for English corrections, two anonymous referees and
230 Jan Colpaert for insightful comments on earlier versions of this paper, and Lucien Bonneau for
231 providing pictures of the experiment (supplementary figure S1).

232

233 **Authors' contributions**

234 LSM and MAS designed the study, contributed a new spore bank evaluation method, analyzed the data
235 and wrote the paper. All authors performed the research and improved the manuscript.

236 References

- 237 Bonito G, Smith ME, Breneman T, Vilgalys R (2012) Assessing ectomycorrhizal fungal spore banks
238 of truffle producing soils with pecan seedling trap-plants. *Plant Soil* 356: 357-366.
- 239 Bertault G, Rousset F, Fernandez D, Berthomieu A, Hochberg ME, Callot G, Raymond M (2001)
240 Population genetics and dynamics of the black truffle in a man-made truffle field. *Heredity* 86: 451–
241 458.
- 242 Bruns, TD, Peay KG, Boynton PJ, Grubisha LC, Hynson NA, Nguyen NH, Rosenstock NP (2009)
243 Inoculum potential of *Rhizopogon* spores increases with time over the first 4 yr of a 99-yr spore burial
244 experiment. *New Phytol* 181: 463-470.
- 245 Callot, G., 1999. *La Truffe, la Terre, la Vie*. Editions Quae, Paris.
- 246 Colgan W, Claridge AW (2002). Mycorrhizal effectiveness of *Rhizopogon* spores recovered from
247 faecal pellets of small forest-dwelling mammals. *Myc Res* 106: 314-320.
- 248 De la Varga H, Le Tacon F, Lagouet M, Todesco F, Varga T, Miquel I, Barry-Etienne D, Robin C,
249 Halkett F, Martin F, Murat C (2017) Five years investigation of female and male genotypes in périgord
250 black truffle (*Tuber melanosporum* Vittad.) revealed contrasted reproduction strategies. *Environ*
251 *Microbiol* 19: 2604-2615.
- 252 Douhan G, Vincenot L, Gryta H, Selosse MA (2011) Population genetics of ectomycorrhizal fungi:
253 from current knowledge to emerging directions. *Fungal Biol* 115: 569-597.
- 254 Dunham SM, Mujic AB, Spatafora JW, Kretzer AM (2013) Within-population genetic structure differs
255 between two sympatric sister-species of ectomycorrhizal fungi, *Rhizopogon vinicolor* and *R.*
256 *vesiculosus*. *Mycologia* 105: 814–826.
- 257 Glassman SI, Peay KG, Talbot JM, Smith DP, Chung JA, Taylor JW, Vilgalys R, Bruns TD (2015). A
258 continental view of pine-associated ectomycorrhizal fungal spore banks: a quiescent functional guild
259 with a strong biogeographic pattern. *New Phytol* 205: 1619-1631.
- 260 Imbert E (2002). Ecological consequences and ontogeny of seed heteromorphism. *Perspectives Plant*
261 *Ecol Evol Syst* 5: 13-36.
- 262 Kjølner R, Bruns TD (2003) *Rhizopogon* spore bank communities within and among California pine
263 forests. *Mycologia*, 95: 603–613.
- 264 Kretzer AM, Dunham S, Molina R, Spatafora JW (2005) Patterns of vegetative growth and gene flow
265 in *Rhizopogon vinicolor* and *R. vesiculosus* (Boletales, Basidiomycota). *Mol Ecol* 14: 2259–2268.
- 266 Le Tacon F (2017) *Les truffes. Biologie, écologie et domestication*. AgroParisTech, Nancy (France).
- 267 Murat C (2015) Forty years of inoculating seedlings with truffle fungi: past and future perspectives.
268 *Mycorrhiza* 25: 77–81.
- 269 Murat C, Bonneau L, De La Varga H, Olivier JM, Sandrine F, Le Tacon F (2016) Trapping truffle
270 production in holes: a promising technique for improving production and unravelling truffle life cycle.
271 *Italian J Mycol* 45: 47-53.
- 272 Murat C, Rubini A, Riccioni C, De la Varga H, Akroume E, Belfiori B, Guaragno M, Le Tacon F,
273 Robin C Halkett, F, Martin F, Paolucci F (2013) Fine-scale spatial genetic structure of the black truffle
274 (*Tuber melanosporum*) investigated with neutral microsatellites and functional mating type genes.
275 *New Phytol* 199: 176–187.

- 276 Murata M, Nagata Y, Nara K (2017) Soil spore banks of ectomycorrhizal fungi in endangered
277 Japanese Douglas-fir forests. *Ecol Res* 32: 469-479.
- 278 Riccioni, C, Belfiori B, Rubini A, Passeri V, Arcion S, Paolocci F (2008) *Tuber melanosporum*
279 outcrosses: analysis of the genetic diversity within and among its natural populations under this new
280 scenario. *New Phytol* 180: 466–478.
- 281 Schneider-Maunoury L, Clément C, Coves H, Lambourdière J, Leclercq S, Richard F, Selosse M-A,
282 Taschen E (2018). Is *Tuber melanosporum* colonizing the roots of herbaceous, non-ectomycorrhizal
283 plants? *Fungal Ecol* 31: 59-68
- 284 Selosse M-A, Schneider-Maunoury L, Taschen E, Rousset F, Richard F (2017) Black truffle, a
285 hermaphrodite with forced unisexual behaviour. *Trends in Microbiol* 25: 784-787.
- 286 Selosse M-A, Taschen E, Giraud T (2013) Do black truffles avoid sexual harassment by linking mating
287 type and vegetative incompatibility? *New Phytol* 199: 10-13.
- 288 Séné S, Selosse M-A, Forget M, Lambourdière J, Cissé K, Diédhiou AG, Rivera-Ocasio E, Kodja H,
289 Kameyama N, Nara K, Vincenot L, Mansot J-L, Weber J, Roy M, Sylla SN, Bâ A (2018) A
290 pantropically introduced tree is followed by specific ectomycorrhizal symbionts due to pseudo-vertical
291 transmission. *ISME J* 12: 1806–1816.
- 292 Splivallo R, Valdez N, Kirchhoff N, Ona MC, Schmidt JP, Feussner I, Karlovsky P (2012)
293 Intraspecific genotypic variability determines concentrations of key truffle volatiles. *New Phytol* 194:
294 823–835.
- 295 Splivallo R, Ottonello S, Mello A, Karlovsky P (2011) Truffle volatiles: from chemical ecology to
296 aroma biosynthesis. *New Phytol* 189: 688-699.
- 297 Splivallo, R , Valdez N , Kirchhoff N, Ona MC, Schmidt J, Feussner I, Karlovsky P (2012)
298 Intraspecific genotypic variability determines concentrations of key truffle volatiles. *New Phytol* 194:
299 823-835.
- 300 Splivallo R, Ottonello S, Mello A, Karlovsky P (2011) Truffle volatiles: from chemical ecology to
301 aroma biosynthesis. *New Phytol* 189: 688-699.
- 302 Streiblová E, Gryndlerová H Gryndler, M (2012) Truffle brûlé: an efficient fungal life strategy. *FEMS*
303 *Microbiol Ecol* 80: 1–8.
- 304 Taschen E, Rousset F, Sauve M, Benoit L, Dubois M-P, Richard F, Selosse M-A. (2016) How the
305 truffle got its mate: insights from genetic structure in spontaneous and planted Mediterranean
306 populations of *Tuber melanosporum*. *Mol Ecol* 25: 5611–5627.
- 307 Urban A (2017) Truffles and small mammals. In : Zambonelli A, Iotti M, Murat C editors, True truffle
308 (*Tuber* spp.) in the world, pp. 353-373. Springer, Berlin.
- 309 Vašutová M, Mlecško P, López-García A, Maček I, Boros G, Ševčík J, Fujii S, Hackenberger D, Tuf
310 IH, Hornung E, Páll-Gergely, Kjøller R (2019) Taxi drivers: the role of animals in transporting
311 mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, in press.

312 **Figure captions**

313

314 **Figure 1.** Two non-exclusive hypotheses accounting for failed detection of *T. melanosporum*
 315 fruitbodies. Left, unremoved fruitbodies are identical (especially in aroma) to the removed ones, but
 316 were accidentally left over. Right, unremoved fruitbodies differ functionally from the other ones in a
 317 way precluding their detection: at a certain developmental stage (*DS*), some truffles may fail the shift
 318 to aroma production, and thus remain undetectable.

319

320 **Figure S1.** Search for unremoved *T. melanosporum* fruitbodies at the end of the harvest season. (a)
 321 Delineation of a 30 x 30 cm surface, arbitrarily located. (b) Digging of a well to harvest the
 322 unremoved fruitbodies. (c) Five unremoved fruitbodies. Courtesy Lucien Bonneau.

323

324 **Figure S2.** Number of unremoved fruitbodies per square meter is not correlated with the number of
 325 harvested truffles per square meter. (A) all brûlés (linear regression model, P=0.17); (B) all truffle
 326 grounds (linear regression model, P=0.46).

327

328 **Table 1.** Unremoved fruitbodies on the six truffle grounds investigated (38 brûlés in all) after
 329 harvesting in 2018 or 2019, with extrapolation of the percentage (\pm standard deviation) of unremoved
 330 fruitbodies (see Materials and Methods).

Tree species	Truffle harvest	Surface (m ²)	Well 1	Well 2	Well 3	Well 4	Unremoved (estimated, %)
Truffle ground #1 (2018)							
<i>Q. ilex</i>	11	19.6	1	0	0	0	83 %
<i>Q. ilex</i>	37	28.3	5	0	0	0	91 %
<i>Q. ilex</i>	6	12.6	0	0	0	0	0 %
<i>Q. ilex</i>	7	6.2	0	0	0	0	0 %
<i>Q. ilex</i>	50	20.4	0	1	0	1	69 %
Mean of truffle ground #1: 40 \pm 33 %							
Truffle ground #2 (2018)							
<i>Q. ilex</i>	19	3.1	4	0	0	0	65 %
<i>C. avellana</i>	12	3.5	3	2	1	0	83 %
<i>C. avellana</i>	11	18.1	0	0	0	0	0 %
<i>C. avellana</i>	7	18.1	0	1	0	0	88 %
<i>Q. ilex</i>	7	3.1	0	0	0	0	0 %
<i>Q. ilex</i>	8	3.1	0	0	0	0	0 %

<i>Q. ilex</i>	16	4.5	0	1	0	0	44 %
<i>Q. ilex</i>	22	4.5	0	0	1	0	36 %
<i>Q. ilex</i>	13	4.5	0	0	0	0	0 %
<i>Q. ilex</i>	23	4.5	0	3	0	0	62 %
<i>Q. ilex</i>	17	4.5	0	0	1	0	42 %
<i>C. avellana</i>	14	6.2	0	1	0	0	55 %
Mean of truffle ground #2: 40 ± 33 %							
Truffle ground #3 (2018)							
<i>Q. ilex</i>	4	13.8	0	0	0	2	95 %
<i>Q. pubescens</i>	14	19.6	0	1	0	0	80 %
<i>Q. pubescens</i>	8	19.6	1	0	0	0	87 %
<i>Q. pubescens</i>	2	18.1	2	1	0	1	99 %
<i>Q. ilex</i>	1	22.9	2	0	0	1	99 %
<i>Q. pubescens</i>	1	13.8	0	0	0	1	97 %
<i>Q. ilex</i>	4	21.2	2	0	0	6	99 %
<i>Q. pubescens</i>	17	22.9	1	1	0	0	88 %
Mean of truffle ground #3: 93 ± 7 %							
Truffle ground #4 (2019)							
<i>Q. ilex</i>	56	12.6	0	0	0	0	0 %
<i>Q. ilex</i>	32	12.6	0	0	0	0	0 %
<i>Q. ilex</i>	37	12.6	0	1	1	0	65 %
<i>Q. ilex</i>	27	12.6	0	0	0	0	0 %
<i>Q. ilex</i>	27	12.6	0	0	0	0	0 %
<i>Q. ilex</i>	30	12.6	0	0	0	0	0 %
Mean of truffle ground #4: 11 ± 27 %							
Truffle ground #5 (2019)							
<i>Q. pubescens</i>	14	4.5	1	0	1	0	64 %
<i>Q. pubescens</i>	21	5.3	0	0	0	0	0 %
<i>Q. pubescens</i>	17	5.0	0	0	0	0	0 %
<i>Q. pubescens</i>	21	2.5	0	0	0	0	0 %
Mean of truffle ground #5: 16 ± 32 %							
Truffle ground #6 (2019)							
<i>Q. pubescens</i>	29	10.2	0	0	0	0	0 %
<i>Q. ilex</i>	17	10.2	0	0	0	0	0 %
<i>Q. ilex</i>	21	10.2	0	0	0	0	0 %
Mean of truffle ground #6: 0 ± 0 %							
Mean of all truffle grounds: 33 ± 33 %							
Mean of all brûlés investigated: 42 ± 41 %							

FIGURE 1

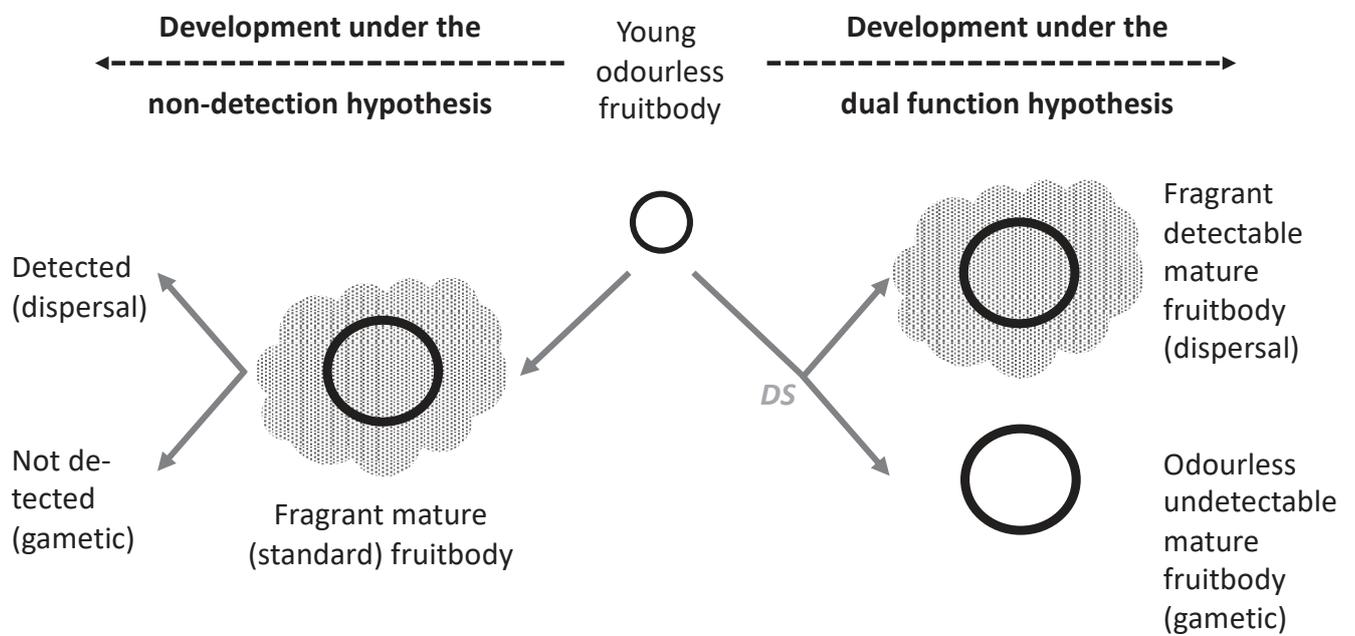
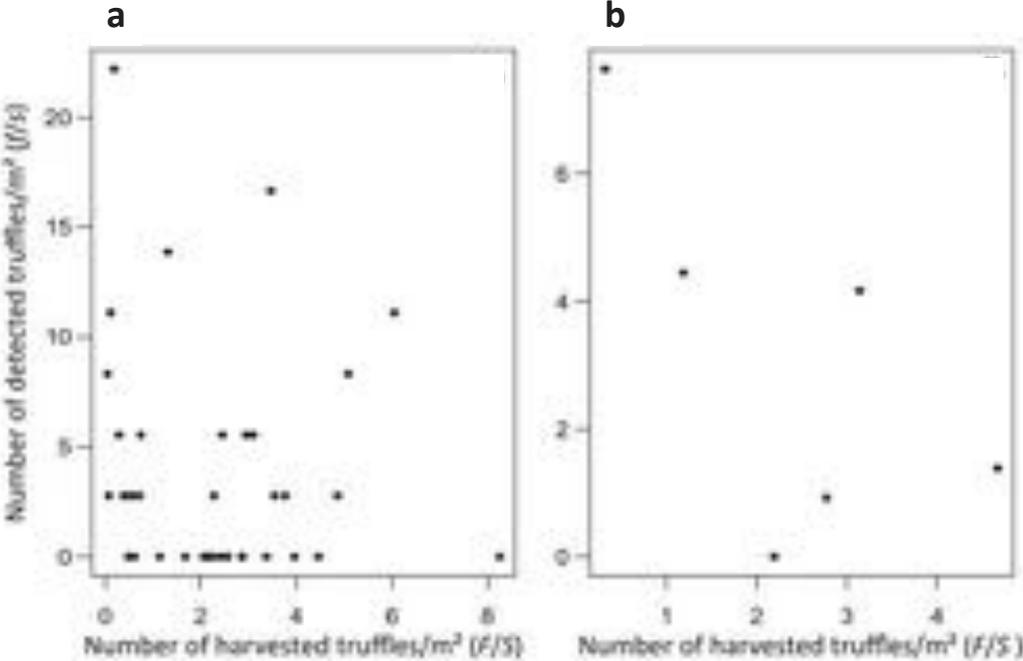


FIGURE S1



FIGURE S2



Génétique des populations en zone d'introduction

2.1 Contexte et problématique

Le deuxième chapitre de cette thèse s'intéresse à la structure génétique de populations de Truffe noire introduites en Australie. La Truffe noire est une espèce en voie de domestication (Taschen *et al.*, 2016) : bien que sa reproduction ne soit pas encore maîtrisée, sa dispersion a été largement favorisée à la fois dans son aire de répartition d'origine et dans de nombreux pays au-delà depuis la fin du XX^{ème} siècle (Fig. 9 p. 31). Contrairement à la plupart des espèces domestiquées, la diffusion de *T. melanosporum* hors de son aire de distribution s'effectue donc avant la maîtrise de sa reproduction (Murphy, 2007 ; Dupont *et al.*, 2017).

Les espèces introduites en dehors de leur aire de répartition sont soumises à de nombreuses contraintes (hybridation de populations, diminution de la taille de la population, nouvel environnement, *etc.*) qui induisent des changements évolutifs dans les populations introduites par dérive ou par sélection adaptative (Bossdorf *et al.*, 2005). Les changements phénotypiques observés sont liés à des modifications génétiques ou épigénétiques largement documentées chez les végétaux et les animaux (*e.g.* Dlugosch et Parker, 2008). Chez les champignons, ce sont surtout les pathogènes qui ont attiré l'attention. L'introduction d'une espèce fongique hors de son aire de répartition induit souvent une diminution de la diversité génétique liée à la dérive génétique dans les petites populations et à l'*effet fondateur*, c'est-à-dire le fait que seul un petit nombre d'individus, porteurs d'une fraction de la diversité génétique de la population d'origine, est introduit (par exemple chez le pathogène *Melampsora larici-populina* ; Barres *et al.*, 2008). Cependant, cette diminution de la diversité est nuancée par le nombre d'introductions (introductions multiples qui ne réduisent pas la diversité, par exemple chez *Sphaeropsis sapinea* ou *Scleroderma bermudense* ; Burgess *et al.*, 2001 ; Séné *et al.*, 2018) ou encore leur ancienneté (introduction ancienne de *Venturia inaequalis* ; Gladieux *et al.*, 2008). Par ailleurs, des modifications du système de reproduction sont parfois observées, comme l'augmentation de la clonalité ou de l'autogamie (Gladieux *et al.*, 2015), ou encore l'apparition de recombinaisons mitotiques permettant de créer de la diversité génotypique sans reproduction sexuée (par exemple chez *Phytophthora ramorum* ; Dale *et al.*, 2019). Chez les plantes et les animaux, la disparition des systèmes d'incompatibilité est souvent observée en réponse à la colonisation d'un nouvel habitat par un petit nombre d'individus (Baker, 1955 ; voir par exemple Reinhardt et Les, 1994).

Les introductions volontaires de champignons ectomycorhiziens (EcM) pour la production de carpophores ont été peu étudiées du point de vue génétique. Guérin-Laguette *et al.* (2013, 2014) rapportent l'introduction volontaire de la Truffe noire et du lactaire délicieux (*Lactarius deliciosus*) en Nouvelle-Zélande, sans en étudier les conséquences génétiques. La seule étude de génétique concernant *T. melanosporum* dans une zone d'introduction est celle de Linde et Selmes (2012) en Australie, qui étonnamment n'indique pas de diminution de la diversité génétique à partir du génotypage de six marqueurs microsatellites, voire une diversité allélique supérieure à celle observée en Europe pour certains marqueurs. Cependant, cette étude met aussi en évidence une structure des types sexuels originale par rapport aux populations étudiées en Europe : en effet, le type sexuel MAT1 domine sur les arbres inoculés depuis plus de quatre ans, alors que les deux types sexuels sont présents à part égale sur les jeunes plants. L'objectif de cette étude est donc de caractériser plus précisément la structure génétique des populations de Truffe noire introduites et d'évaluer des changements éventuels dans la reproduction liés à l'introduction. Le cas échéant, il s'agira ensuite de proposer des mécanismes afin d'expliquer ces changements.

2.2 Matériel et méthodes

2.2.1 Données utilisées

L'analyse comparée des structures génétiques en Australie et en Europe s'appuie sur plusieurs jeux de données (Tableau 1 ; Fig. 14). En Europe, les données déjà publiées (Taschen *et al.*, 2016 ; De la Varga *et al.*, 2017) ont été complétées par deux récoltes complètes effectuées pendant les hivers 1995-1996 et 1996-1997 par Bertault *et al.* (2001) sur une truffière du Languedoc-Roussillon (truffière de G. Serane), pour laquelle les génotypes maternels ont été obtenus par E. Taschen (PB3 dans Taschen *et al.*, 2016) et les génotypes paternels au cours de mon stage de Master 2 en 2016 (jeu de données « Serane » ; Tableau 1). Cette truffière, plantée entre 1989 et 1991, est composée de plus de 200 arbres appartenant à trois espèces : chêne vert (*Quercus ilex*), chêne pubescent (*Q. pubescens*) et noisetier (*Coryllus avellana*).

Les truffes australiennes ont été échantillonnées par Celeste Linde (Australian National University, Canberra) et proviennent de deux truffières situées à l'est et à l'ouest de l'Australie (BF et WA respectivement ; Tableau 1). La truffière située à l'est, BF, comporte près de 1 800 arbres plantés en 2003 sur une surface de 4 ha. La truffière la plus occidentale, quant à elle, recouvre environ 20 ha et compte plus de 13 000 arbres, plantés en 1997. Les deux truffières sont composées de chênes et de noisetiers mycorhizés avec *T. melanosporum* et installés sur des sols amendés en chaux avant plantation afin d'obtenir un pH proche de 8. La majeure partie des données sur les populations australiennes a été générée avec l'aide de Pauline Bettenfeld au cours de son stage de Master 2 (Université Pierre et Marie Curie) au premier semestre 2018 (jeux de données BF et WA2) et des génotypages complémentaires ont été réalisés par Bastien Bennetot au cours de son stage de Master 2 (Université Pierre et Marie Curie) au premier semestre 2019 (WA1).

L'échantillonnage australien était censé permettre une étude de la structure génétique à l'échelle de la truffière d'une part et du brûlé d'autre part. Concernant l'échelle de la truffière, deux échantillonnages partiels ont été réalisés aléatoirement dans les deux truffières différentes. À

Tableau 1 – Jeux de données utilisés pour l’analyse comparative de la structure génétique à l’échelle de la truffière des populations de *T. melanosporum* en zone d’endémisme (France) et en zone d’introduction (Australie).

Pays	Jeu de données	Type ¹	Année(s) de récolte	Nb. d’ascocarpes
France	Serane (cette thèse)	P	1996-1997	150 (sur 2 ans)
	Taschen <i>et al.</i> (2016)	S	2014	263
	Taschen <i>et al.</i> (2016)	S	2014	89
	De la Varga <i>et al.</i> (2017)	P	2011-2015	241 (sur 5 ans)
Australie*	Blue Frog (BF)	P	2017	123
	Western Australia (WA1)	P	2016	79 ²
	Western Australia (WA2)	P	2017	45+24 ³

* Les récoltes australiennes sont des récoltes partielles effectuées aléatoirement sur l’ensemble de la truffière, alors que les récoltes françaises sont exhaustives.

¹ S : truffière spontanée, P : truffière plantée.

² Échantillonnage de mauvaise qualité (probablement liée à la conservation des ascocarpes), qui n’a pu être utilisé que pour la diversité allélique à l’échelle de l’Australie.

³ Échantillonnages à l’échelle de la truffière (45 ascocarpes) et à l’échelle des brûlés (24 ascocarpes).

l’échelle du brûlé, un échantillonnage exhaustif aurait dû être réalisé sur trois brûlés de la truffière WA. Cependant, cette consigne n’a pu pas être suivie par les gestionnaires de cette truffière, qui n’ont transmis qu’une partie des truffes de ces échantillonnages (7 à 9 truffes par brûlé, soit 24 ascocarpes ; *cf.* Tableau 1). Cet échantillonnage localisé a donc été intégré à l’échantillonnage à l’échelle de la truffière (WA2) et n’est pas utilisable pour analyser la structure génétique à l’échelle du brûlé.

2.2.2 Génotypage des échantillons

Les génotypes maternel et paternel des ascocarpes ont été obtenus grâce à l’extraction de l’ADN de la gléba d’une part et des spores d’autre part. L’ADN de la gléba a été extrait avec le kit RED Extract-N-Amp (Sigma-Aldrich, Allemagne), permettant d’obtenir le génotype maternel. Les spores ont été isolées selon le protocole de Paolucci *et al.* (2006) et l’ADN extrait selon le protocole décrit par De la Varga *et al.* (2017). Le génotype paternel est ensuite obtenu en soustrayant le génotype maternel au génotype des spores. Le type sexuel maternel a été obtenu par PCR avec les amorces p19/p20 et p1/p2 (Rubini *et al.*, 2011b). L’obtention des deux types sexuels permet de vérifier l’efficacité de l’extraction d’ADN des spores. Quinze marqueurs microsatellites sélectionnés d’après Riccioni *et al.* (2008) et Murat *et al.* (2011) ont été utilisés pour génotyper gléba et spores. La taille des amplicons a été lue par un séquenceur ABI 3130 (Applied Biosystems, USA). Les chromatogrammes ont été analysés avec GeneMapper Software 5 (Applied Biosystems, USA) pour associer chaque pic du chromatogramme à un allèle.

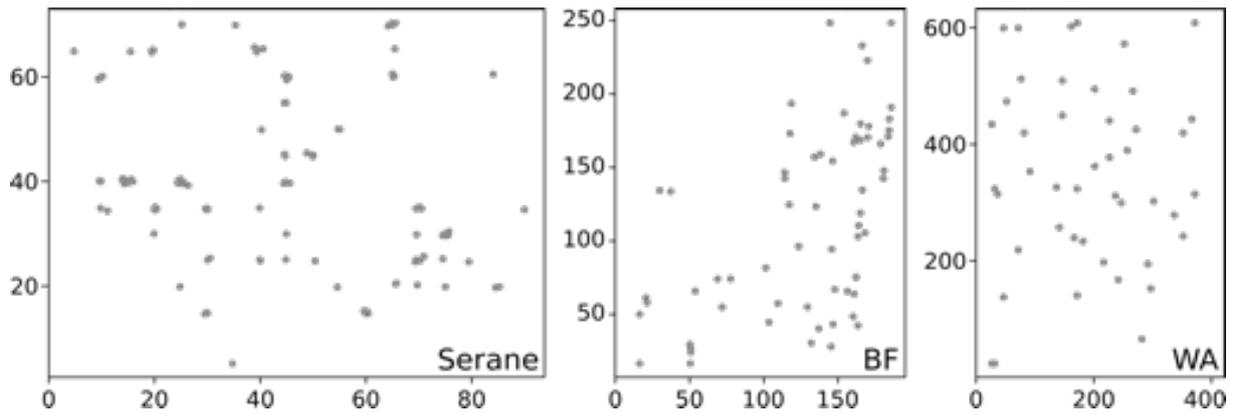


Figure 14 – Plan d'échantillonnage des trois truffières dont les récoltes ont été génotypées au cours de cette thèse (truffière de G. Serane et truffières australiennes BF et WA). Chaque point gris représente un ascocarpe. Les échelles, très différentes entre chaque truffière, sont données en mètres.

Chaque combinaison d'allèles des quinze microsatellites et du type sexuel définit un génotype haploïde multi-locus (MLG). Sauf mention contraire, les MLG incluent toujours les 15 marqueurs et le type sexuel. Le logiciel GenClone v.2.0 (Arnaud-Haond et Belkhir, 2007) affecte chaque échantillon (entité anatomique, ou ramet) à un MLG (entité génétique, ou genet). GenClone v.2.0 permet de vérifier que les ramets d'un même MLG appartiennent bien au même genet. La probabilité p_{sex} qu'un génotype apparaisse n fois indépendamment est calculée ; si $p_{sex} < 0.01$, les individus sont considérés comme appartenant à un même MLG.

2.2.3 Analyse des données

Diversité allélique et goulot d'étranglement

Afin de caractériser la diversité allélique dans les populations françaises et australiennes, le nombre d'allèles total et le nombre d'allèles privés (*i.e.* qu'on ne retrouve que dans une seule région) ont été comptés. Une analyse de raréfaction a été effectuée grâce au logiciel ADZE 1.0 (Szpiech *et al.*, 2008) sur les 10 microsatellites communs aux études françaises et australiennes, afin de s'affranchir de la différence de taille des échantillonnages dans les deux pays. Cette analyse simule le nombre d'allèles dans un échantillonnage aléatoire de n individus d'une population, n variant de 2 jusqu'à la taille de la population la plus petite.

L'existence d'un goulot d'étranglement en Australie a été testée grâce au logiciel Bottleneck 1.2.02 (Cornuet et Luikart, 1996 ; Piry *et al.*, 1999). Les populations ayant subi un goulot d'étranglement récent montrent une diminution de la diversité allélique et de la proportion d'hétérozygotes, mais la diversité allélique diminue plus rapidement que l'hétérozygotie en raison de la perte d'allèles rares qui influent peu sur l'hétérozygotie (Cornuet et Luikart, 1996). Ainsi, on compare le taux d'hétérozygotie observé H_{obs} au taux d'hétérozygotie attendu H_{exp} si les allèles étaient à l'équilibre en tenant compte de la taille de la population. Dans une population à l'équilibre, la probabilité que les locus montrent un excès ou un déficit d'hétérozygotie est égale. Le logiciel Bottleneck détermine donc si le nombre de locus présentant un excès d'hétérozygotie est plus élevé que dans une population à l'équilibre. Ce logiciel permet d'utiliser plusieurs modèles

d'évolution des marqueurs utilisés : le modèle IAM (*infinite allele model*; Kimura et Crow, 1964) dans lequel le nombre d'allèles possible dépend seulement du taux de mutation, le modèle SMM (*stepwise mutation model*; Ohta et Kimura, 1973) dans lequel les nouveaux allèles apparaissent successivement à partir des précédents (par exemple, ajout ou suppression d'un motif d'un microsatellite) et un modèle mixte (TPM, *two-phase model*). Le modèle TPM combine les deux modèles précédents en proportions variables; c'est le modèle le plus adapté aux marqueurs microsatellites (Di Rienzo *et al.*, 1994), qui évoluent généralement par ajout ou suppression d'un motif à chaque génération (SMM) mais avec des mutations ponctuelles possibles (IAM).

Diversité génotypique, isolement par la distance et structure spatiale

Pour caractériser la diversité génotypique des populations d'Australie et les comparer avec les données françaises, la diversité clonale et l'indice de Simpson ont été calculés avec GenClone v.2.0. (Arnaud-Haond et Belkhir, 2007). La diversité clonale R est définie par $R = (G - 1)/(N - 1)$, avec G le nombre de MLG et N le nombre d'individus (Dorken et Eckert, 2001; Rozenfeld *et al.*, 2007). R varie de 0 lorsque la clonalité est totale à 1 lorsque tous les individus correspondent à un genet différent. L'indice de Simpson 1-D mesure la probabilité que deux individus tirés au hasard dans la population appartiennent à deux MLG différents. Il varie de 0 lorsque tous les individus appartiennent au même MLG à 1 lorsque tous les individus appartiennent à des MLG différents. Le déficit en hétérozygotes par rapport à une population panmictique est donné par le F_{IS} , tel que $F_{IS} = 1 - H_{obs}/H_{exp}$ (avec H_{obs} la fréquence d'hétérozygotes observée et H_{exp} la fréquence d'hétérozygotes attendue sous l'hypothèse de panmixie). Cette valeur, estimée grâce à Genepop v.4.4. (Rousset, 2008), a été calculée pour l'ensemble des locus de chaque population.

Lorsque les flux de gènes sont limités, la probabilité que deux individus soient génétiquement proches est plus importante à faible distance qu'à longue distance. Cette corrélation positive entre la distance génétique et la distance géographique est appelée *isolement par la distance* (IBD; Wright, 1943). Elle peut être biaisée par la clonalité, c'est-à-dire par les individus d'un même clone (distance génétique nulle) présents à proximité les uns des autres (faible distance géographique). Les individus appartenant au même MLG sur le même brûlé ont donc été rassemblés en un seul individu fictif situé au barycentre des échantillons du même clone. L'IBD a été testé à différentes échelles spatiales grâce à Genepop v.4.4. (Rousset, 2008) et Fstat v.2.9.3. (Goudet, 1995), puis sa validité a été estimée par un test de Mantel (10 000 permutations). La différenciation génétique entre les populations australiennes et françaises (indices de différenciation F_{ST} et Rho_{ST}) a été calculée grâce aux logiciels Genepop v.4.4. (Rousset, 2008) et Fstat v.2.9.3. (Goudet, 1995).

Enfin, la répartition des types sexuels maternels (type sexuel de la gléba) a été analysée avec le logiciel Genepop v.4.4. (Rousset, 2008). En particulier, ce logiciel permet de tester si la répartition des types sexuels s'écarte d'une répartition aléatoire en vérifiant l'existence d'une agrégation des ascocarpes par type sexuel maternel, observée dans les populations françaises par Taschen *et al.* (2016) et De la Varga *et al.* (2017). Un test de Mantel permet de comparer la répartition des types sexuels obtenues après 10 000 permutations aléatoires des coordonnées spatiales des ascocarpes et la répartition observée et d'en déduire si cette répartition observée est proche d'une répartition aléatoire ou non. Comme pour l'IBD, cette analyse a été effectuée avec

le jeu de données réduit dans lequel un seul ascocarpe de chaque MLG est pris en compte, afin de s'affranchir de l'effet de la clonalité.

2.3 Résultats : traits conservés et traits variables entre la France et l'Australie

2.3.1 Diversité allélique et goulot d'étranglement

L'analyse de raréfaction effectuée avec ADZE (Szpiech *et al.*, 2008) à partir de 259 génotypes australiens et 459 génotypes français permet de distinguer la richesse allélique totale (nombre d'allèles par marqueur) et la richesse allélique privée (nombre d'allèles trouvés uniquement dans une population et pas dans les autres). Cette analyse indique qu'il n'y a pas de différence entre les données françaises et la truffière WA, mais une richesse allélique plus faible dans la truffière BF (Fig. 15 ; Tableau 2). Cependant, la richesse allélique privée semble atteindre un plateau pour WA comme pour BF, mais pas pour les données françaises, ce qui laisse supposer qu'un échantillonnage un peu plus large permettrait de détecter une différence notable.

Tableau 2 – Richesses alléliques totale et privée dans les populations françaises et australiennes (en nombre moyen d'allèles par marqueur). L'analyse a été réalisée sur les 10 marqueurs microsatellites communs aux études françaises et australiennes.

Jeu de données	Nb. de génotypes	Rich. all. totale	Rich. all. privée
France	459	9,2 ± 1	2,6 ± 0,5
BF	152	5,6 ± 0,7	0,8 ± 0,2
WA	107	6,8 ± 0,9	2,1 ± 0,4

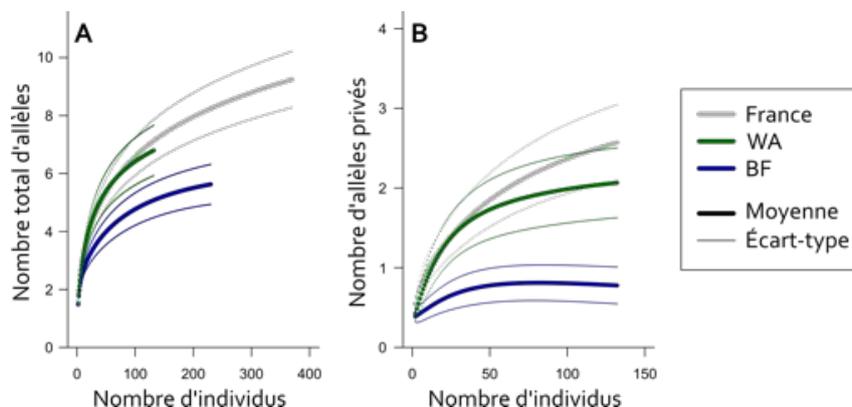


Figure 15 – Richesse allélique totale (A) et richesse allélique privée (B) dans les jeux de données français (en gris) et australiens (BF en bleu, WA en vert). La ligne épaisse indique la richesse allélique moyenne par marqueur selon le nombre d'individus considérés, les lignes fines l'écart-type.

Le test d'un goulot d'étranglement récent par le logiciel Bottleneck 1.2.02 (Cornuet et Luikart, 1996) a été réalisé en implémentant les modèles SMM et IAM et le modèle TPM avec différentes proportions de mutations successives (*stepwise*) et de mutations ponctuelles (Piry *et al.*, 1999). Tous les tests donnent une probabilité de goulot d'étranglement récent dans les populations BF et WA inférieure à 0,01 %, l'hypothèse d'un goulot d'étranglement récent est donc rejetée.

2.3.2 Diversité génotypique à l'échelle de la truffière

À l'échelle de la truffière, les populations australiennes et françaises présentent une diversité génotypique similaire : les genets maternels sont impliqués dans un plus grand nombre d'ascocarpes que les genets paternels et ont donc une diversité clonale plus faible (Tableau 3). Cette tendance est moins marquée dans le jeu de données WA2, probablement car cet échantillonnage est moins dense que les autres et le même genet est donc moins souvent ré-échantillonné (2 ascocarpes/ha, comparés aux 30 ascocarpes/ha pour BF et plus de 75 ascocarpes/ha pour Serane).

Le jeu de données WA1 étant de mauvaise qualité, seuls 30 MLG (16 maternels et 14 paternels) ont été obtenus. Ces 30 MLG ont été comparés aux MLG de WA2, obtenus sur la même truffière l'année d'après. Aucun génotype maternel ni paternel commun aux deux années n'a été trouvé, mais là encore la faible densité de l'échantillonnage en est peut-être la cause. Dans la truffière de Serane, deux génotypes paternels sur 97 (2,1 %) et 15 génotypes maternels sur 48 (31,3 %) ont été trouvés les deux années consécutives. Ces chiffres sont proches de ceux obtenus par Taschen *et al.* (2016) sur 4 brûlés étudiés pendant 4 ans (27,6 % de génotypes maternels et 2,5 % de génotypes paternels pérennes). De la Varga *et al.* (2017) détectent 16,4 % de génotypes maternels et 11,6 % de génotypes paternels pérennes sur deux à cinq ans.

2.3.3 Reproduction et niveau de consanguinité

Répartition des types sexuels

En France comme en Australie, la proportion de génotypes maternels MAT1 est variable mais proche de la moitié (France : 48,4 %, Australie : 52,2 % ; $\chi^2 : p = 0,24$; Tableau 3). De même, le nombre d'ascocarpes dont le génotype maternel est MAT1 est légèrement supérieur à la moitié, mais ne s'en écarte pas significativement (France : 53,8 %, Australie : 55,8 % ; $\chi^2 : p = 0,22$; Tableau 3). Mis à part pour les truffières spontanées génotypées par Taschen *et al.* (2016), la proportion d'ascocarpes de type sexuel MAT1 est toujours légèrement supérieure à la proportion de génotypes maternels MAT1 (+4,8 % en moyenne ; Tableau 3).

Tableau 3 – Diversité génotypique des populations françaises et australiennes.

Jeu de données	♀/♂	Nombre d'asc. géotypés	Nombre d'asc. ♀ MAT1 ¹	Nombre de MLG	Nombre de MLG MAT1	Nombre max. d'asc./MLG ²	Indice de Simpson	Diversité clonale
Serane (1996)	Mat	49	32 (65,3 %)	29	17 (58,6 %)	8 (1,7)	0,95	0,58
	Pat	48		43		2 (1,1)	1	0,89
Serane (1997)	Mat	74	44 (59,5 %)	34	17 (50 %)	12 (1,9)	0,93	0,45
	Pat	71		57		3 (1,1)	0,99	0,80
Taschen <i>et al.</i> (2016) S*	Mat	219	109 (49,7 %)	84	43 (51,2 %)	29 (1,2)	0,89	0,38
De la Varga <i>et al.</i> (2017)**	Mat	238	97 (40,7 %)	74	25 (33,8 %)	40 (3,2)	0,91	0,31
	Pat	206		138		18 (1,5)	0,98	0,67
BF	Mat	119	69 (58,0 %)	57	31 (54,4 %)	25 (2,0)	0,94	0,47
	Pat	99		95		4 (1,1)	1	0,96
WA2	Mat	66	37 (53,6 %)	48	24 (50 %)	7 (1,4)	0,99	0,72
	Pat	59		59		1 (1,0)	1	1

¹ Nombre d'ascocarpes pour lesquels le génotype maternel est de type sexuel MAT1.

² Nombre maximal d'ascocarpes par MLG (*i.e.* nombre de ramets par genet), nombre moyen entre parenthèses.

* Données cumulées pour deux truffières spontanées; ** Données cumulées sur 5 ans de récoltes.

Apparementement entre partenaires parentaux

Le déficit en hétérozygotes à l'échelle de la truffière (forte proportion de locus homozygotes, F_{IS} et Rho_{IS} élevés; Tableau 4) indique un apparementement important entre partenaires maternels et paternels, similaire pour les populations françaises et australiennes. Taschen *et al.* (2016) rapportent des F_{IS} moyens à l'échelle du brûlé (et non de la truffière) comparables (sur deux brûlés spontanés : $F_{IS} = 0.59$; sur trois brûlés plantés : $F_{IS} = 0.14$); De la Varga *et al.* (2017) indiquent un F_{IS} moyen sur cinq ans de récolte de 0,21.

Tableau 4 – Évaluation de la consanguinité dans les populations australiennes et la population française étudiées dans cette thèse.

	BF	WA2	Serane 1996	Serane 1997
Nb. de zygotes génotypés	116	69	53	81
% de locus homozygotes	80 %	70 %	72 %	78 %
F_{IS}	0,54	0,33	0,46	0,58
Rho_{IS}	0,51	0,31	0,47	0,56

Génotypes hermaphrodites

Cinq génotypes dans le jeu de données BF (3,4 %) et deux dans WA2 (2 %) sont à la fois partenaire maternel dans certains ascocarpes et paternel dans d'autres (génotypes effectivement hermaphrodites; $p_{sex} < 0,01$). Les ascocarpes dans lesquels sont impliqués ces MLG sont parfois sous le même arbre (3 MLG), ou bien éloignés de plusieurs dizaines de mètres (4 MLG, ascocarpes distants de 45 à 330 m). Dans le jeu de données de Serane, un MLG est trouvé comme partenaire paternel en 1996 et maternel en 1997 (à 21 m de distance) et un MLG est trouvé comme partenaire paternel en 1996 et maternel et paternel en 1997 (distance $< 10m$ entre les ascocarpes assignés à ce MLG), soit 1,4 % des 143 génotypes trouvés sur les deux années. Taschen *et al.* (2016) ne rapportent aucun génotype hermaphrodite, tandis que De la Varga *et al.* (2017) en indiquent 8,3 % sur les 5 années de récolte.

2.3.4 Structuration spatiale des populations

Dans les populations françaises de *T. melanosporum* (Taschen *et al.* (2016); De la Varga *et al.*, 2017), les individus maternels et paternels sont spatialement structurés : les individus les plus proches spatialement sont aussi proches génétiquement; il y a donc un mécanisme d'isolement par la distance (IBD). La truffière de Serane confirme cette structuration à l'échelle de la truffière : la distance génétique entre individus est proportionnelle au logarithme de la distance géographique avec un coefficient b (test de Mantel : $p < 0,01$) pour les deux partenaires et les deux années de récolte (individus maternels 1996 : $b = 0,074$; individus maternels 1997 : $b = 0,058$; individus paternels 1996 : $b = 0,035$; individus paternels 1997 : $b = 0,074$). En

Australie, l'IBD est détectable uniquement pour les partenaires paternels de la truffière BF, avec un coefficient $b = 0,025$ (test de Mantel : $p < 0,01$).

Par ailleurs, dans les populations françaises, les ascocarpes sont agrégés par type sexuel maternel, formant des plages de type sexuel homogène. Le jeu de données de Serane confirme cette agrégation (test de Mantel avec 10 000 permutations : $p < 0,01$). À l'inverse, aucune agrégation des ascocarpes par type sexuel maternel n'est détectable dans les populations australiennes (test de Mantel avec 10 000 permutations : $p = 0.94$ pour le jeu de données BF, $p = 0.93$ pour WA2).

2.3.5 Différenciation génétique entre populations françaises et australiennes

Les deux indices de différenciation calculés (F_{ST} et Rho_{ST}) indiquent une faible différenciation entre les populations françaises du Languedoc (Serane et Taschen *et al.*, 2016) et australiennes, mais une différenciation importante entre les populations de Lorraine (De la Varga *et al.*, 2017) et les autres (Tableau 5). L'indice Rho_{ST} , plus approprié aux données microsatellites (Rousset, 1996) indique une différenciation plus faible que celle suggérée par le F_{ST} , mais les deux indices montrent que les populations australiennes sont plus différentes des populations lorraines qu'elles ne le sont entre elles ou qu'elles ne le sont des populations languedociennes. L'origine des populations australiennes est donc probablement plus proche du Languedoc que de la Lorraine, située en bordure de l'aire de répartition de *T. melanosporum*.

Tableau 5 – Différenciation entre populations françaises et australiennes (F_{ST} / Rho_{ST}).

	BF	WA2	Languedoc
WA2	0,09 / 0,02		
Languedoc	0,08 / 0,04	0,06 / 0,07	
Lorraine	0,38 / 0,24	0,43 / 0,25	0,39 / 0,25

2.4 Discussion : une introduction récente et multiple

2.4.1 Fondation récente des populations australiennes et diversité génétique

La Truffe noire a été introduite en Australie dans les années 1990 (Le Tacon, 2017). L'introduction d'une fraction d'une population d'origine hors de son aire de répartition induit souvent le sous-échantillonnage de la diversité génétique initiale et donc une réduction cette diversité dont résulte un effet fondateur. Quinze marqueurs microsatellites ont été utilisés ici pour évaluer ce potentiel goulot d'étranglement (Spencer *et al.*, 2000).

Le logiciel Bottleneck 1.2.02 n'indique pas de goulot d'étranglement récent, quel que soit le modèle testé. Cependant, la consanguinité élevée observée dans les deux populations, comparable aux populations françaises (Tableau 4), pourrait empêcher la détection d'un goulot

d'étranglement. En effet, les goulots d'étranglement induisent une diminution de la diversité allélique et de l'hétérozygotie, la deuxième diminuant moins vite que la première : la disparition d'allèles rares fait décroître rapidement la diversité allélique mais influence peu l'hétérozygotie, qui dépend davantage des allèles fréquents (Cornuet et Luikart, 1996). Les goulots d'étranglement sont donc caractérisés par un excès d'hétérozygotie, pour une diversité allélique donnée. Or la consanguinité augmente la proportion d'homozygotie, allant à l'encontre de l'effet du goulot d'étranglement. La forte consanguinité observée dans les populations de Truffe noire pourrait donc dans ce cas masquer les conséquences génétiques d'un goulot d'étranglement.

Par ailleurs, la diversité allélique totale et la diversité allélique privée n'indiquent pas de diminution majeure entre les populations françaises et la truffière WA, mais une richesse allélique plus faible pour la truffière BF (Fig. 15). Ces résultats suggèrent une réduction de la diversité génétique pour la truffière BF, et ne permettent pas de conclusion claire pour WA. En effet, les courbes de richesses alléliques totale et privée en France n'atteignent pas l'asymptote indiquant un échantillonnage suffisant pour enregistrer l'ensemble de la diversité allélique française. Un échantillonnage plus large, à la fois en France et pour la truffière WA, est donc nécessaire pour conclure de manière robuste, mais la réduction de diversité allélique est dans tous les cas moins marquée pour WA que pour BF.

Enfin, les indices de différenciation F_{ST} et Rho_{ST} indiquent tous les deux une différenciation forte entre les populations lorraine et australiennes, mais une différenciation faible entre les populations languedociennes et australiennes (Tableau 5). Ceci suggère que les inoculum utilisés dans les pépinières australiennes ne proviennent pas du nord de la zone de distribution de *T. melanosporum*, mais pourraient provenir de populations génétiquement proches de celles que l'on trouve dans le sud de la France. La Lorraine étant en périphérie de l'aire de répartition de la Truffe noire (Le Tacon, 2017), les populations lorraines sont elles-mêmes différenciées par rapport aux populations du cœur de l'aire de répartition. C'est ce qu'indiquent les indices de différenciation, et les populations australiennes sont probablement issues de populations européennes plus centrales (sud de la France, Espagne).

Ces résultats indiquent globalement que les populations australiennes et françaises sont génétiquement proches, proximité à mettre en lien avec l'histoire de l'introduction de la Truffe noire en Australie. En effet, cette introduction est *récente* : elle a eu lieu dans les années 90, à partir d'inoculum européens. Si l'on ajoute un laps de temps nécessaire à l'entrée en production des truffières (la première truffe a été récoltée 4 ans après plantation pour la truffière BF, 6 ans pour la truffière WA), cela ne laisse qu'une vingtaine d'années d'évolution des populations introduites. Cette durée, courte au regard du temps de génération de la Truffe noire, implique que la diversité observée (en particulier dans la truffière WA) n'est sans doute pas issue de mutations post-introduction et pourrait expliquer la faible distance génétique entre populations françaises et australiennes.

2.4.2 Introductions multiples

Les introductions australiennes ont par ailleurs été *multiplées* : les pépinières australiennes ont démarré leur production de plants truffiers à partir d'ascocarpes d'origine variée, provenant essentiellement de populations espagnoles et/ou françaises (Linde et Selmes, 2012). Les deux

truffières étudiées ont été mises en place *via* des pépinières différentes : deux pépinières en Tasmanie alimentent les truffières de l'est du pays (dont BF) tandis que deux pépinières à l'ouest alimentent les truffières de l'ouest de l'Australie (dont WA ; C. Linde, comm. pers.). Ces pépinières étant indépendantes, il est cohérent d'observer des différences génétiques entre les populations des deux truffières (F_{ST} et $Rho_{ST} > 0$). Cependant, ces différences restent faibles, indiquant que les sources d'inoculum utilisés dans les deux pépinières ne sont probablement pas très différentes.

La population de Truffe noire de la truffière BF est génétiquement moins riche que les populations WA et françaises et surtout possède moins d'allèles privés : ceci suggère que cette population pourrait être issue de populations françaises, dont elle représente un sous-échantillonnage n'ayant pas encore eu le temps de se diversifier. À l'inverse, la population WA, qui contient davantage d'allèles privés, pourrait être issue d'une population européenne absente de notre jeu de données français et contenant donc une richesse allélique partiellement différente. La truffière WA n'étant que de six ans plus ancienne que la truffière BF, une diversification post-introduction est peu probable.

De plus, la population WA présente aussi une richesse allélique totale supérieure à celle de la population BF et proche de celle des populations françaises. Cette observation pourrait s'expliquer par des introductions multiples au sein même de la truffière : un mélange de différentes populations lors de l'introduction d'une espèce hors de son aire de répartition tend à limiter la perte de diversité allélique (Kolbe *et al.*, 2004), voire à augmenter la diversité (Burgess *et al.*, 2001 ; Genton *et al.*, 2005). Récemment, Séné *et al.* (2018) ont montré pour un autre champignon EcM hypogé (*Scleroderma bermudense*, co-introduit avec son hôte dans toute la zone tropicale) une absence d'effet fondateur due à des introductions répétées d'un inoculum abondant. Ce mécanisme pourrait avoir joué si les pépinières de l'ouest de l'Australie se sont approvisionnées auprès de sources différentes, mais peu de littérature est disponible sur l'histoire de l'introduction de *T. melanosporum* en Australie. Cette introduction s'est par ailleurs effectuée dans un contexte d'échanges internationaux nombreux, permettant facilement des échanges d'inoculum répétés.

Néanmoins, une étude de génétique des populations de Truffe noire espagnoles, italiennes et de l'ouest de la France permettrait probablement d'apporter des indices supplémentaires. En effet, seules des populations françaises du Languedoc et de Lorraine ont été étudiées dans cette thèse. L'analyse biogéographique de l'ensemble des sources possibles est nécessaire pour reconstituer au mieux les trajectoires de l'introduction de la Truffe noire dans l'hémisphère Sud.

2.4.3 Des caractéristiques reproductives conservées en zone d'introduction

Apparemment important entre partenaires parentaux

Le fort déficit en hétérozygotes observé dans les populations françaises se retrouve en Australie : les F_{IS} estimés pour chaque population sont du même ordre de grandeur que ceux rapportés dans la littérature (Tableau 4). Ces indices traduisent une consanguinité importante résultant de l'appariement d'individus génétiquement proches et ne permettent pas d'établir de différence dans le régime de fécondation entre populations d'origine et introduites. Ceci

suggère une fois encore un effet fondateur peu visible ou absent, puisque dans le cas contraire la consanguinité aurait été plus élevée en zone d'introduction.

Stratégies reproductives différentes entre partenaires

Comme dans les populations françaises, les génotypes maternels sont de plus grande taille que les génotypes paternels dans les truffières australiennes. Les individus maternels sont impliqués dans un plus grand nombre d'ascocarpes que les individus paternels (Tableau 3) et la diversité clonale des individus maternels est donc inférieure à celle des individus paternels. Dans 97 % des cas, les partenaires paternels ne participent à la formation que d'un seul ascocarpe (Tableau 3). L'échantillonnage sur deux années consécutives dans la truffière WA aurait du permettre d'évaluer la pérennité des génotypes, mais la mauvaise qualité de la récolte de 2016 (WA1) a limité le nombre de génotypes complets pouvant être assignés à un MLG. Seuls 30 génotypes de 10 marqueurs microsatellites ont été obtenus (sur les 158 potentiels) et aucun n'est retrouvé l'année suivante. La pérennité des génotypes maternels et paternels ne pourra être évaluée qu'après un nouvel échantillonnage, plus dense que celui des années précédentes.

Répartition équitable des types sexuels

Linde et Selmes (2012) ont mis en évidence une répartition inégale des types sexuels MAT1 et MAT2 sur les ectomycorhizes de 37 arbres dans quatre truffières australiennes. Sur les arbres producteurs comme chez les non-producteurs, MAT1 est plus fréquent que MAT2, alors que cette différence n'est pas observée dans les inoculums utilisés ni sur des jeunes arbres en pépinière. Du et al. (2017) rapportent une différence de fréquence entre les deux types sexuels de 13 espèces de morilles (genre *Morchella*, Pézizomycètes proches du genre *Tuber*) : le type sexuel MAT1 est là aussi plus abondant dans les tissus maternels des ascocarpes que le type sexuel MAT2. Dans les deux cas, cette observation est interprétée comme un potentiel avantage compétitif de MAT1 sur MAT2.

Cependant, dans les jeux de données étudiés dans cette thèse, les répartitions des types sexuels observées ne s'écartent pas d'une répartition équitable (Tableau 3). En France comme en Australie, la proportion de MLG maternels MAT1 et la proportion d'ascocarpes dont le génotype maternel est MAT1 sont proches de la moitié. Le résultat de Linde et Selmes (2012) pourrait être lié à un échantillonnage réduit (quatre échantillons de racine/arbre sur 37 arbres), ou bien la différence observée sur les ectomycorhizes ne se traduit pas en différence dans les tissus maternels des ascocarpes. Si MAT1 domine effectivement sur les ectomycorhizes, cette dominance n'est pas visible dans le nombre de génotypes MAT1 qui fructifient. Dans les deux cas, un échantillonnage couplé d'ectomycorhizes et d'ascocarpes serait nécessaire pour confirmer ou infirmer ces résultats. Globalement, *Tuber melanosporum* conserve en zone d'introduction ses deux types sexuels et ceux-ci présentent les effets de la sélection balancée attendue (May *et al.*, 1999).

Quelques génotypes hermaphrodites

Les populations françaises comptent peu de génotypes hermaphrodites (participant à la fois en tant que mâle et femelle dans des ascocarpes différents). De la Varga et al. (2017) en détectent huit sur cinq années de récolte (dont seulement trois avec une $p_{sex} < 0,05$, *i.e.* appartenant au même genet avec une probabilité supérieure à 95 %) et Taschen et al. (2016) n'en trouvent aucun dans les truffières du Languedoc. Un seul génotype hermaphrodite a été trouvé la même année dans le jeu de données de Serane ; deux génotypes ont aussi été trouvés comme partenaire paternel une année et maternel l'année suivante. Dans les populations australiennes, sept génotypes hermaphrodites ont été trouvés ($p_{sex} < 0,01$), les individus d'un même genet étant parfois géographiquement très éloignés (0 à 330 m, 50 m en moyenne).

Dans le cas de génotypes hermaphrodites situés dans le même brûlé, on peut imaginer que le mycélium d'un individu, par ailleurs en symbiose ectomycorhizienne sur les racines de l'arbre-hôte (rôle maternel), puisse jouer le rôle paternel dans la fécondation d'un mycélium du type sexuel opposé, par exemple en périphérie d'une plage de type sexuel homogène. À l'inverse, le fait que deux ramets d'un même genet se trouvent à plusieurs dizaines (voire centaines) de mètres de distance questionne la biologie de la Truffe noire. Une première réponse est que la p_{sex} est une probabilité : quand bien même la probabilité est faible (ici $< 1\%$) que deux génotypes apparaissent indépendamment de deux méioses différentes, l'événement reste possible, bien que rare. Par ailleurs, la fiabilité de la p_{sex} dépend aussi de la précision de l'estimation des fréquences alléliques dans la population (encadré 5) et ce calcul suppose que la population étudiée est à l'équilibre de Hardy-Weinberg. Or ce n'est pas le cas dans les population de Truffe noire qui ne sont *a priori* pas en panmixie, étant donné le fort apparentement et l'isolement par la distance observés, qui indiquent des flux de gènes limités au sein des truffières. La p_{sex} est donc à interpréter avec précaution.

Encadré 5 – Calcul de la p_{sex} (Arnaud-Haond *et al.*, 2007)

La probabilité p_{gen} d'un génotype multi-locus composé de l locus dans une population donnée peut être estimée par :

$$p_{gen} = \sum_{i=1}^l 2^h f_i$$

avec f_i la fréquence de l'allèle du locus i dans cette population et h le nombre de locus hétérozygotes.

Quand ce même génotype est observé n fois dans une population de N individus, la probabilité p_{sex} que ces génotypes répétés soient issus d'événements de reproduction distincts (*i.e.* de méioses différentes) s'écrit :

$$p_{sex} = \sum_{i=n}^N \frac{N!}{i!(N-i)!} (p_{gen})^i (1-p_{gen})^{N-i}$$

Dans le cas contraire, les deux ramets issus d'une même méiose et spatialement très éloignés doivent avoir été dispersés. Cette dispersion longue distance implique soit l'existence de

mitospores jouant le rôle de gamètes mâles (spermaties) qui pourraient être dispersés et féconder à distance, soit la dispersion de fragments de mycélium. Les spermaties n'ont jamais été observées malgré d'actives recherches sur deux ans (Selosse et Urban, comm. pers.) et leur existence est rendue peu probable par la structuration spatiale (IBD et consanguinité) observée pour les génotypes paternels, au moins en zone d'origine. La dispersion de mycélium implique qu'un vecteur transporte des fragments de mycélium qui soient encore capables ensuite de s'établir et de fructifier ou de jouer le rôle de partenaire paternel. Cette possibilité a été évoquée par De la Varga *et al.* (2017) qui détectent des génotypes paternels pérennes sur plusieurs années et suggèrent donc que le mycélium de *T. melanosporum* est capable de survivre en saprotrophe dans le sol.

Une troisième hypothèse est aussi possible : les individus appartenant au même genet peuvent résulter de la germination de différentes spores identiques ou quasi-identiques aux locus étudiés en raison du fort apparentement entre les partenaires parentaux. En effet, la probabilité que deux méioses donnent des spores identiques dépend du nombre de locus hétérozygotes dans le zygote (nombre de différences entre les génotypes maternel et paternel). Si l'on suppose une ségrégation indépendante des marqueurs microsatellites, la probabilité que deux spores issues de méioses différentes soient identiques s'écrit $(1/2)^n$, avec n le nombre de locus différents entre les deux partenaires (Tableau 6). La proportion de spores identiques bien qu'issues de méioses différentes dans chaque truffière correspond alors à la fréquence d'ascocarpes pour lesquels les parents diffèrent à n locus, multipliée par la probabilité d'obtenir deux spores identiques. Cette probabilité varie de 12 à 16 % dans chaque jeu de données étudiés dans cette thèse (Tableau 6). Il est alors possible pour ces spores de s'établir sur le même brûlé ou à distance les unes des autres (par exemple si une fraction seulement d'ascocarpe est consommée) et d'agir comme partenaire paternel ou maternel selon l'endroit où elles germent. Un seul genet sera détecté alors même que des individus génétiques différents sont impliqués. Seul un nombre plus important de marqueurs microsatellites polymorphes pourrait permettre de distinguer ces individus.

Les populations de Truffe noire présentent donc, en Australie comme en France, une majorité d'individus mâles ou femelles et une très petite proportion d'individus hermaphrodites. De la Varga *et al.* (2017) soulignent que cette distribution des rôles dans la reproduction s'apparente à une trioécie fonctionnelle, un système sexuel comprenant des individus mâles, femelles et hermaphrodites, plus répandu chez les plantes (*e.g.* Flemming *et al.*, 1998 ; Perry *et al.*, 2012) et chez les animaux (*e.g.* Weeks *et al.*, 2006) que chez les champignons. Chez *T. melanosporum* cependant, la trioécie n'est *a priori* pas génétique mais seulement phénotypique : chaque individu est potentiellement hermaphrodite mais ne joue la plupart du temps qu'un seul des deux rôles, quelques individus seulement ayant l'occasion de jouer les deux. La présence d'individus hermaphrodites dans les populations de Truffe noire rappelle que l'hermaphrodisme est probablement l'état ancestral chez les Ascomycètes (Glass et Kuldau, 1992), mais chaque individu est dans les faits cantonné la plupart du temps à un seul rôle reproductif, selon son type sexuel et celui de ses voisins (Selosse *et al.*, 2017). Cette séparation des rôles est liée à une autre caractéristique des populations de Truffe noire : l'agrégation par type sexuel.

Tableau 6 – Probabilité d’apparition de deux spores génétiquement identiques selon le nombre de locus hétérozygotes (*i.e.* le nombre de locus pour lesquels les individus maternel et paternel diffèrent). Pour chaque nombre de locus hétérozygotes, la proportion d’ascocarpes (Prop.) et la probabilité que deux spores identiques apparaissent (Proba.) sont données pour les trois jeux de données génotypés dans cette thèse (Serane, BF et WA2).

Nb. de locus hétérozygotes	Probabilité de deux spores identiques	Serane		BF		WA2	
		Prop.	Proba.	Prop.	Proba.	Prop.	Proba.
1	0.5	15	7.5	14.7	7.3	13	6.5
2	0.25	13.6	3.4	14.7	3.7	11.6	2.9
3	0.125	11.4	1.4	37.9	4.7	13	1.6
4	0.0625	12.9	0.8	7.7	0.5	1.5	0.1
5	0.03125	17.1	0.5	6	0.2	14.5	0.5
6	0.015625	18.8	0.3	9.5	0.2	13	0.2
7	0.0078125	7.1	0.1	6	0.1	5.8	0.1
8	0.00390625	2.1	0	1.7	0	8.7	0
9	0.001953125	0.7	0	0.9	0	5.9	0
10	0.0009765625	1.3	0	0.9	0	10	0
Prop. totale de spores identiques		14 %		16.6 %		11.9 %	

2.4.4 Une structuration spatiale différente entre la France et l’Australie

Absence d’agrégation spatiale par type sexuel maternel

Dans l’aire d’origine de la Truffe noire, les individus se répartissent par plages de génotypes maternels présentant le même type sexuel (Rubini *et al.*, 2011a ; Murat *et al.*, 2013 ; Taschen *et al.*, 2016 ; De la Varga *et al.*, 2017). Cette structure spatiale se met en place par élimination d’un type sexuel sur les ectomycorhizes quelques mois après l’inoculation des plantules en pépinière (Rubini *et al.*, 2011a). Un mécanisme d’incompatibilité végétative incluant le type sexuel (Selosse *et al.*, 2013) ou lié au type sexuel (Selosse *et al.*, 2017) pourrait conduire à ce phénomène.

Dans les deux truffières australiennes, l’agrégation des types sexuels n’est pas observée. Ce résultat indique que l’agrégation n’existe pas en Australie ou qu’elle n’est pas détectable. L’échantillonnage a été effectué de manière aléatoire sur les truffières australiennes et non de manière exhaustive comme en France : la densité d’ascocarpes atteinte est relativement faible (2/ha pour WA, 30/ha pour BF), ce qui pourrait empêcher la détection d’une structure spatiale. Par ailleurs, sur la truffière WA, trois brûlés ont été échantillonnés plus densément (7 à 9 truffes par brûlé) : sur l’un d’eux un seul type sexuel est présent et sur les deux autres l’un des deux types est majoritaire et forme une plage homogène (alors même que plusieurs génotypes coexistent). Enfin, Linde et Selmes (2012) indiquent que les deux types sexuels sont présents en proportions égales sur les plantules des pépinières australiennes et que l’exclusion de l’un des types sexuels sur les arbres plantés a aussi lieu en Australie. Ces arguments suggèrent que l’agrégation par type sexuel pourrait n’être simplement pas détectable avec l’échantillonnage disponible.

Isolement par la distance peu marqué

Les populations françaises de Truffe noire montrent également un isolement par la distance (IBD) marqué (Taschen *et al.*, 2016 ; De la Varga *et al.*, 2017 ; truffière de Serane), ce qui suggère que les flux de gènes sont réduits dans les truffières, ou qu'un mécanisme homogénéise secondairement et localement les génotypes (comme pour les types sexuels). En Australie, l'IBD n'est détecté que pour les partenaires paternels dans la truffière BF, alors même que le fort apparentement entre partenaires parentaux persiste. Là encore, la densité de l'échantillonnage pourrait empêcher de détecter la structuration : l'IBD n'est détecté que dans la truffière la mieux échantillonnée (30 ascocarques/ha *versus* 2/ha pour WA) et pour les génotypes les plus nombreux (94 génotypes paternels *versus* 56 génotypes maternels ; Tableau 3). Par ailleurs, l'IBD est plus marqué à faible distance : il est surtout visible en dessous de 6 m dans les truffières étudiées par Taschen *et al.* (2016). Dans les deux cas, un échantillonnage plus dense est nécessaire.

Cependant, on ne peut exclure que cette structure spatiale n'existe simplement pas en Australie. Les méthodes d'inoculation peuvent limiter la mise en place d'une structuration spatiale, en installant une population homogène sur l'ensemble de la truffière dans un écosystème et le nombre de générations depuis l'introduction est faible au regard de la mise en place d'un isolement par la distance. Par ailleurs, la persistance des spores dans le sol est un facteur important de la mise en place d'une structure type IBD (*e.g.* Kretzer *et al.*, 2005 ; Dunham *et al.*, 2013), or la banque de spores de *T. melanosporum* est inexistante dans les sols australiens avant introduction. Enfin, d'éventuels réensemencements pourraient brouiller une structuration peu marquée.

2.5 Conclusion

L'introduction de *Tuber melanosporum* en Australie permet d'évaluer l'impact de sa diffusion hors aire de répartition sur ses caractéristiques génétiques. La plupart des traits observés en France sont retrouvés en Australie : fort apparentement entre partenaires parentaux, taille différente entre les genets maternels et paternels, existence d'un petit nombre de génotypes hermaphrodites. En revanche, la structuration spatiale (agrégation par type sexuel et isolement par la distance) n'est pas aussi nette qu'en zone d'endémisme. Ce changement pourrait être lié au processus d'introduction, mais aussi à l'échantillonnage ; un échantillonnage plus dense et de meilleure qualité est indispensable à la caractérisation rigoureuse de la structure génétique des populations introduites. C'est pourquoi un échantillonnage dense et systématique est actuellement en cours et permettra peut-être de réévaluer les résultats précédents.

Les particularités de l'introduction de la Truffe noire se répercutent sur les caractéristiques génétiques des populations australiennes : la multiplicité des introductions a limité la perte de diversité génétique et maintenu une certaine homogénéité à l'échelle du continent. La faible durée écoulée depuis l'introduction ne permet pas d'observer une évolution importante et il est probable que les nombreux échanges commerciaux ne facilitent pas l'établissement d'une structure génétique bien marquée. Cependant, l'étude d'autres populations à la fois en zone d'origine (Espagne, Italie, ouest de la France) et dans d'autres zones d'introduction (Argentine, Chili, Afrique du Sud...) est nécessaire pour mieux retracer les déplacements de *T. melanosporum* à travers le monde.

Preuves moléculaires de l'endophytisme de la Truffe noire

3.1 Contexte et résumé de l'article III

La première partie de cette thèse s'est intéressée à la biologie reproductive de la Truffe noire et en particulier à caractériser la structure génétique des partenaires maternel et paternel impliqués dans la reproduction. Les individus paternels n'étant pas détectables sur les ectomycorhizes proches des ascocarpes mais devant tout de même se trouver à proximité, il fallait essayer de les chercher ailleurs. En parallèle, l'existence du brûlé laissait supposer une interaction – qui pouvait être directe – entre Truffe et plantes herbacées. Cette interaction endophyte serait alors une nouvelle niche écologique pour *Tuber melanosporum*, aussi bien pour les partenaires maternels déjà installés en ectomycorhizes que pour les partenaires paternels qui pourraient trouver dans les racines des plantes herbacées une niche écologique transitoire pendant leur courte durée de vie. L'objectif de ce chapitre a donc été d'explorer l'éventuel lien direct existant entre la Truffe noire et les plantes herbacées du brûlé, en cherchant à détecter moléculairement la présence de Truffe puis à identifier les individus impliqués dans l'interaction pour les comparer à ceux des ascocarpes et des ectomycorhizes. L'endophytisme de la Truffe noire dans les racines des plantes herbacées a été testé à l'aide de PCR spécifique et de séquençage haut-débit et les individus en interaction avec les racines ont été génotypés.

Plusieurs méthodes ont été utilisées pour tester l'hypothèse de l'endophytisme de *Tuber melanosporum*. Une analyse préliminaire menée par Dominique Barry-Étienne et Pierre Sourzat avait révélé, par séquençage Sanger de l'ITS fongique, des séquences attribuées à *T. melanosporum* dans les racines de *Rosa pimpinellifolia* récoltées sur un brûlé (D. Barry-Étienne et P. Sourzat, comm. pers.). À la suite de ce résultat précurseur, d'autres tests ont été effectués, sur des racines de plantes herbacées dont la surface avait été nettoyée et stérilisée afin de limiter la détection d'hyphes extra-racinaires. Un premier test a permis, à l'aide d'amorces spécifiques de *T. melanosporum*, de détecter par PCR l'ADN de la Truffe noire dans les racines de 86 % des 113 plantes testées. Les 45 espèces récoltées se sont toutes révélées colonisées par *T. melanosporum*. Sur un deuxième jeu d'échantillons de plantes herbacées, la communauté fongique des racines dans son ensemble a été évaluée par séquençage haut-débit de l'ITS fongique. La présence de *T. melanosporum* a été avérée dans deux tiers des échantillons et 74 % des espèces testées. À l'exception d'une séquence trouvée dans un échantillon récolté hors brûlé, toutes les séquences de

T. melanosporum provenaient d'échantillons récoltés à l'intérieur de brûlés, représentant 17 % des séquences fongiques obtenues.

Enfin, l'échantillonnage conjoint d'ascocarpes et de plantes herbacées sur quatre brûlés différents a permis d'identifier les individus impliqués dans l'interaction endophyte. À l'aide de 13 marqueurs microsatellites (Murat *et al.*, 2011) et du locus du type sexuel (Rubini *et al.*, 2011b), 21 ascocarpes et 52 plantes de 21 espèces différentes ont été génotypés. Les résultats indiquent clairement que les individus qui colonisent les racines des plantes herbacées sont aussi impliqués comme partenaires maternels dans les ascocarpes voisins ou sont des individus n'ayant pas participé à la formation d'ascocarpe l'année de l'échantillonnage (« nouveaux » individus), mais jamais des individus paternels.

Cette étude permet donc de tirer deux conclusions quant à l'écologie de *T. melanosporum*. D'une part, les techniques moléculaires employées mettent en évidence la présence de séquences de Truffe noire dans les racines de plantes herbacées endomycorhiziennes (Fabaceae, Poaceae...) ou non-mycorhiziennes (Brassicaceae). D'autre part, nous n'avons trouvé dans les racines que des individus maternels ou des individus n'ayant pas participé à la reproduction de la saison précédente. Ces racines ayant été minutieusement choisies, on peut exclure la formation d'ectomycorhize ; par ailleurs, l'extraction d'ADN mise en place ne permet pas de détruire la paroi mélanisée des spores. Il est donc probable qu'il s'agisse de mycélium colonisant les racines des plantes herbacées.

3.2 Article III

Les données de cette étude ont été récoltées en partie par Elisa Taschen avant le début de ma thèse (premier jeu d'échantillons utilisé pour détecter *T. melanosporum* par PCR spécifique) et en partie dans le courant de mon stage de Master 2 réalisé sous la direction de Marc-André Selosse et Elisa Taschen (échantillonnage conjoint de plantes herbacées et d'ascocarpes pour génotypage). Le séquençage de la communauté fongique des racines de plantes herbacées a été réalisé au cours de ma première année de thèse avec l'aide de Cannelle Clément et Hervé Covès (échantillonnage), Josie Lambourdière (biologie moléculaire) et Sébastien Leclercq (analyses bioinformatiques).

Ces résultats ont été publiés dans la revue *Fungal Ecology* en novembre 2017, sous le titre : *Is Tuber melanosporum colonizing the roots of herbaceous, non-ectomycorrhizal plants ?*



Is *Tuber melanosporum* colonizing the roots of herbaceous, non-ectomycorrhizal plants?



Laure Schneider-Maunoury^a, Sébastien Leclercq^a, Cannelle Clément^a, Hervé Covès^a,
Josie Lambourdière^{a,b}, Mathieu Sauve^c, Franck Richard^c, Marc-André Selosse^{a,d,*},
Elisa Taschen^e

^a Institut de Systématique, Évolution, Biodiversité (ISYEB – UMR 7205 – CNRS, MNHN, UPMC, EPHE), Muséum national d'Histoire naturelle, Sorbonne Universités, 57 rue Cuvier, 75005, Paris, France

^b Service de Systématique Moléculaire (SSM – UMS 2700 OMSI), Muséum national d'Histoire naturelle, 43 rue Cuvier, 75005 Paris, France

^c CEFE UMR 5175, CNRS, Université de Montpellier, Université Paul-Valéry Montpellier, EPHE, 1919 route de Mende, 34293 Montpellier, France

^d Department of Plant Taxonomy and Nature Conservation, University of Gdansk, ul. Wita Stwosza 59, 80-308 Gdańsk, Poland

^e INRA, UMR Eco&Sols, Place Viala, 34060, Montpellier, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 June 2017

Received in revised form

1 September 2017

Accepted 13 October 2017

Corresponding Editor: Prof. L. Boddy

Keywords:

Black truffle

Brûlé

Endophyte

Isolation by distance

Population genetics

Root fungal communities

Sexual dimorphism

ABSTRACT

The ectomycorrhizal *Tuber melanosporum* forms edible fruit-bodies after mating between two haploid parents: a maternal individual, which feeds the fruit-body and colonizes surrounding ectomycorrhizas, and a paternal one hitherto undetected around fruit-bodies. Several other aspects of *T. melanosporum* ecology remain unclear, such as the formation of a brûlé around the mycelium, i.e. patches where plant growth is impaired. Here, we test the hypothesis that *T. melanosporum*, and specifically paternal individuals, is present on the roots of herbaceous, non-ectomycorrhizal plants of the brûlé. Specific primers detected *T. melanosporum* on 78.9% of the plant individuals investigated (89.7% of the 80 species considered), and metabarcoding confirmed its presence on 46 of the 70 plant individuals investigated. Genotyping with 13 microsatellites detected maternal individuals of nearby fruit-bodies, but not paternal individuals, whose niche thus remains elusive. We discuss the possibility that *T. melanosporum* is also a root endophyte in non-ectomycorrhizal plants.

© 2017 Elsevier Ltd and British Mycological Society. All rights reserved.

1. Introduction

The black truffle *Tuber melanosporum* is an ectomycorrhizal fungus endemic to the Northern Mediterranean basin that has been targeted for domestication by humans for least two centuries (Chatin, 1869; Hall et al., 2003; see Murat, 2015 and Dupont et al., 2016 for review). Recent research has clarified aspects of the genetics of the fungus *in situ* (e.g. Taschen et al., 2016; De la Varga et al., 2017 and references therein; see below). Other work has extended our knowledge of the relationship between

T. melanosporum and its host trees, by identifying the hosts of the black truffle in natural environments (Taschen et al., 2015), and by demonstrating that the fungus uses tree photosynthates, but not soil organic matter (Le Tacon et al., 2013, 2016). Despite this growing knowledge, and efforts in planting inoculated trees (which nowadays produce 80% of the harvest; Murat, 2015), *T. melanosporum* production still remains limited (e.g. 10–50 times lower than one century ago in France; Le Tacon, 2017), suggesting that some aspects of truffle biology and ecology remain undiscovered. In this work, we consider the possibility of an overlooked interaction between *T. melanosporum* and herbaceous plants growing close to host trees. Although no ectomycorrhizal formation is expected, since these plants are endo- or non-mycorrhizal, several lines of evidence raise the intriguing possibility of such an interaction.

Firstly, the development of *T. melanosporum* mycelium in soil

* Corresponding author. Institut de Systématique, Évolution, Biodiversité (ISYEB – UMR 7205 – CNRS, MNHN, UPMC, EPHE), Muséum national d'Histoire naturelle, Sorbonne Universités, 57 rue Cuvier, 75005, Paris, France.

E-mail address: ma.selosse@wanadoo.fr (M.-A. Selosse).

URL: <http://isyeb.mnhn.fr/Marc-Andre-SELOSSE>

entails formation of brûlés, i.e. patches around host trees where vegetation density and growth are visibly reduced (Streiblová et al., 2012). Yet, the cause(s) of the brûlé remains mysterious. Secondly, there is some evidence for an interaction between *T. melanosporum* and non-ectomycorrhizal plants. Plattner and Hall (1995) published direct evidence of *T. melanosporum* on the roots of the grass *Anthoxanthum odoratum*, based on microscopic observations and polyclonal antibodies: although their antibodies were of limited specificity, the authors suggested that *T. melanosporum* induced necrotic lesions in the root cortex. Moreover, *T. melanosporum* was serendipitously found on orchid roots (*Limodorum abortivum*; Giralanda et al., 2006) by fungal molecular barcoding. Additional indirect evidence was provided by Splivallo et al. (2007), showing how *Arabidopsis thaliana* reacts to truffle volatiles by stopping growth and inducing an oxidative burst. This suggests that a recognition mechanism evolved in plants. Moreover, among Tuber species, *T. melanosporum* fruit-bodies contain free fatty acids that show high allelopathic activity on various plants (Angelini et al., 2015). However, the volatiles used by Splivallo et al. (2007) and Angelini et al. (2015) derived from fruit-bodies, not from mycelium. Finally, Gryndler et al. (2014) detected by quantitative PCR the abundant presence of the related species *T. aestivum* on healthy-looking roots from various plant species growing on brûlés formed by this truffle, and suggested that *T. aestivum* colonized dead cells of the root surface.

Recent research on *T. melanosporum* genetics and reproduction has provided evidence that the ecological niche and plant interactions of this fungus are not fully understood. *Tuber melanosporum* is a potentially hermaphroditic, but self-sterile, fungus living in the haploid stage (Selosse et al., 2017). Fertilization occurs between two haploid individuals bearing opposite sexual mating types (MAT), and, as in many ascomycetes, leads to the formation of a fruit-body where meiotic haploid spores are ripened before dissemination by animals (Selosse et al., 2013, 2017; Rubini et al., 2014; Le Tacon et al., 2016). One individual, the maternal one, forms the fruit-body flesh (also called gleba), and its genetic identity can be established upon DNA extraction from fruit-bodies by standard methods (Riccioni et al., 2008). The other individual only contributes by providing its genes to the zygote that generate the spores after meiosis, and is therefore considered paternal. Its genetic identity can only be found after fruit-body DNA has been extracted with more aggressive methods that destroy the thick, resistant spore wall (Paolocci et al., 2006; Riccioni et al., 2008). This method recovers genetic markers from bulk meiotic spores and provides the zygotic genetic identity, which, after subtracting the maternal genetic identity, gives access to the paternal identity. Yet, the life and distribution of paternal individuals in soil remain mysterious.

When investigating individuals colonizing surrounding ectomycorrhizas, only maternal genotypes of nearby fruit-bodies can be found. Maternal individuals use tree photosynthates to produce up to a dozen fruit-bodies per year, and to last several years in most cases (Murat et al., 2013; Taschen et al., 2016; De la Varga et al., 2017). Paternal individuals are involved in only one or few fructifications (with rare exceptions; e.g. De la Varga et al., 2017), rarely last from one year to another, and cannot be found on surrounding ectomycorrhizas (Rubini et al. 2011a,b; Taschen et al., 2016). They may simply be situated far away and interact distally by dispersion of hypothetical gametes. However, they are genetically very close to the fertilized maternal genotypes (Taschen et al., 2016), more than expected if random mating occurred over the whole population. Furthermore, populations display strong genetic isolation by distance at truffle ground scale, as do many fungi (especially hypogeous; Vincenot and Selosse, 2017), but in an extremely pronounced way, so that spatially close individuals are genetically

similar (Bertault et al., 2001; Murat et al., 2013; Taschen et al., 2016; De la Varga et al., 2017). Thus, the observed inbreeding in fruit-bodies results from mating between neighbouring individuals, arguing against long-distance, random dispersal of hypothetical paternal gametes. The fact that paternal individuals cannot be detected on ectomycorrhizas around fruit-bodies thus suggests that they may occupy a different, alternative niche (Selosse et al., 2013; Rubini et al., 2014).

Indeed, another observation makes the ecological niche of paternal individuals even more unclear. Spatially close maternal individuals, as found in glebas and mycorrhizas, tend to share the same MAT allele (Rubini et al., 2011a; Murat et al., 2013; Taschen et al., 2016). This situation likely results from a progressive elimination of individuals having the other MAT during population establishment (Rubini et al., 2011a, 2014; Selosse et al., 2017). The origin of such patches of individuals sharing same MAT remains mysterious, but implies that paternal individuals of complementary MAT cannot coexist locally in the ectomycorrhizal niche.

Bearing in mind indirect evidence for the interaction of *T. melanosporum* with plants in brûlés, and the missing niche for paternal individuals, we investigated root colonization in herbaceous, non-ectomycorrhizal species by *T. melanosporum* at two levels. First, at community level, we (i) detected the presence of *T. melanosporum* on roots of herbaceous plants through molecular screening with *T. melanosporum*-specific primers, and (ii) investigated its relative contribution to the fungal community by performing a metabarcoding analysis of the fungal community from roots of herbaceous plants growing in or out of brûlés. Second, at *T. melanosporum* population level, using available markers (MAT and microsatellite markers, as in Taschen et al., 2016), we described the genetic diversity of fungal individuals associated with herbaceous plants, with comparison to paternal and maternal individuals from surrounding fruit-bodies, in order to test which of these parents can be found in this overlooked niche.

2. Materials and methods

2.1. Sampling

2.1.1. Detection of *T. melanosporum* on herbaceous plants

Two sample sets were used to test for the presence of *T. melanosporum* on herbaceous roots (sites and species sampled are in Tables 1 and 2), targeting arbuscular mycorrhizal (AM) and non-mycorrhizal plants (such as Brassicaceae). First, to test for the presence of *T. melanosporum* by direct PCR (described below), we assembled a preliminary sampling of 113 plant individuals from 45 non-ectomycorrhizal species growing on brûlé (sample set #1) from three truffle grounds located in Occitanie (southern France; T1-3; Table 1 and Table S1; Fig. S1). From each plant individual, we harvested 2 to 8 replicates of 2-mm root fragments depending on root system size. All non-ectomycorrhizal roots were carefully and separately washed (473 samples in all; Table S1) within 1 day after harvesting, surface-sterilized using a solution of sodium hypochlorite (2% v/v) and Tween 80 (5% w/v) for 10 s and rinsed three times in sterile water (Roy et al., 2009), before storage at -20 °C. In a second step, another sampling (sample set #2) was performed to characterize the whole root fungal community by metabarcoding of 78 plant individuals from 24 non-ectomycorrhizal plant species, from truffle grounds in Nouvelle-Aquitaine (south-centre of France; T4; Table 2 and Table S2; Fig. S1); from these, 18 plant individuals from 9 plant species were growing out of brûlés, forming a control set (Table 2 and Table S2). Between 3 and 8 root fragments per individual depending on root system size were collected, pooled per individual, and processed as above.

Table 1Sample set #1. Sites and species used for detection of *Tuber melanosporum* on non-ectomycorrhizal plant roots by direct PCR.

Site	Type ^a	Location	Year	Nb. Of plant	Plant species ^b	Positive detection ^c
T1	S	42° 44' 21" N 2° 28' 57" E	2010 –14	41	<i>Alyssum calycinum</i> (2), <i>Arabis hirsuta</i> (2), <i>Arenaria serpyllifolia</i> (2), <i>Brachypodium phoeniceum</i> (2), <i>Bupleurum fruticosum</i> (2), <i>Catapodium rigidum</i> (2), <i>Centhrantus calcitrapa</i> (2), <i>Geranium rotundifolium</i> (2), <i>Hedera helix</i> (2), <i>Holcus lanatus</i> (2), <i>Linaria simplex</i> (2), <i>Medicago</i> sp. (2), <i>Papaver rhoeas</i> (2), <i>Pimpinella</i> sp. (2), <i>Psoralea bituminosa</i> (2), <i>Reseda alba</i> (2), <i>Rubia peregrina</i> (2), <i>Sedum sediforme</i> (2), <i>Senecio capensis</i> (2), <i>Silene</i> sp. (2), <i>Stachys recta</i> (2), <i>Thymus vulgaris</i> (2), <i>Verbascum</i> sp. (2)	Samples: 37.8% Individuals: 83.3% Species: 100%
T2	S	43° 26' 48" N 3° 22' 46" E	2010 –14	48	<i>Bromus erectus</i> (2), <i>Bromus tectorum</i> (2), <i>Catapodium rigidum</i> , <i>Cerastium</i> sp. (2), <i>Erodium</i> sp. (2), <i>Erophila verna</i> , <i>Euphorbia helioscopia</i> , <i>Euphorbia nicaensis</i> , <i>Geranium robertianum</i> (6), <i>Hedera helix</i> (2), <i>Hieracium</i> sp. (2), <i>Linaria supina</i> (2), <i>Medicago</i> sp. (4), <i>Psoralea bituminosa</i> , <i>Reseda phyteuma</i> , <i>Rosa canina</i> (2), <i>Rubia peregrina</i> (2), <i>Sedum</i> sp. (2), <i>Sedum sediforme</i> , <i>Silene</i> sp. (2), <i>Spartium junceum</i> (2), <i>Sylibium marianum</i> (2), <i>Veronica cymbalaria</i> (2)	Samples: 60.1% Individuals: 90.2% Species: 100%
T3	P	43° 44' 39" N 3° 42' 20" E	2013 –14	24	<i>Bromus intermedius</i> (2), <i>Hedera helix</i> (4), <i>Sedum brevifolium</i> (2), <i>Triticum durum</i> (12)	Samples: 33.3% Individuals: 83.3% Species: 100%
Total				113	45 species	Samples: 45.2% Individuals: 85.8% Species: 100%

^a S: spontaneous truffle ground, P: plantation.^b Under brackets, repetition number for species sampled more than once.^c See details for positive detection in Table S1.**Table 2**

Sample set #2. Site and species used for assessing the whole fungal community of non-ectomycorrhizal plant roots.

Site	Location	Year	Nb. Of plant individuals	Plant species ^a	Positive detection ^b
T4	45° 4' 15" N 1° 27' 5" E	2015–16	70	<i>Agrostis capillaris</i> , <i>Anthyllis vulneraria</i> , <i>Carex flacca</i> (3), <i>Catapodium rigidum</i> (3), <i>Convolvulus arvensis</i> (2), <i>Dactylis glomerata</i> (2), <i>Daucus carota</i> , <i>Festuca pratensis</i> (3), <i>Fragaria vesca</i> , <i>Geranium aff. sessiliflorum</i> (9), <i>G. dissectum</i> (2), <i>G. robertianum</i> (6), <i>Hippocrepis biflora</i> , <i>Lapsana communis</i> (2), <i>Mercurialis annua</i> (2), <i>Myosotis arvensis</i> (4), <i>Origanum vulgare</i> , <i>Plantago lanceolata</i> (5), <i>Rubus cf. fruticosus</i> , <i>Sedum rupestre</i> (15), <i>Silene vulgaris</i> (2), <i>Vulpia myuros</i> (2), unknown species #1	In brûlés Individuals: 81.8% Species: 84.2% Out of brûlé Individuals: 6.7% Species: 14.3% Total Individuals: 65.7% Species: 73.9%

^a Under brackets, repetition number for species sampled more than once.^b See details for positive detection in Table S2.

2.1.2. Genotyping of *T. melanosporum* on non-ectomycorrhizal plants

We genotyped the genets colonizing the roots of non-ectomycorrhizal herbaceous plants on brûlés close to fruit-bodies from the previous year. For this sampling (sample set #3), we considered truffle grounds that were both spontaneous (natural woodlands in Occitanie; one brûlé on T2 and two on T5) and planted (in Nouvelle-Aquitaine; one brûlé on T6; Table 3 and Table S3; Fig. S1). Surrounding fruit-bodies were exhaustively sampled during the previous winter, and stored at -20 °C. On T2, the only 6 available plants, from 5 non-ectomycorrhizal species, were sampled in 2013, close to fruit-bodies from the previous winter (but fruit-bodies from the three previous winters were available since this site was investigated by Taschen et al., 2016). On T5, three plants randomly chosen within 10 cm from each fruit-body sampled in previous winter were collected, resulting in 25 individuals from 11 plant species. On T6, plant individuals were sampled regularly to get a more continuous mapping on each node of a 1 × 1 m grid with a 20-cm pitch, resulting in 30 individuals from 9 plant species (Table 3 and Table S3). For each plant individual, six 2-mm root fragments were sampled and processed as above before storage at -20 °C (366 samples in all; Tables S1–3).

2.2. Molecular analyses

2.2.1. DNA extraction

DNA from fruit-bodies (in T2, 5 and 6, to obtain maternal DNA from gleba) and non-ectomycorrhizal roots of sample sets #1 and #3 were extracted using the RED Extract-N-Amp Kit following the manufacturer's instructions. The zygotic DNA of T2, T5 and T6 fruit-bodies was accessed by destroying spores wall following the protocol of Taschen et al. (2016). Roots from sample set #2 were extracted using the Qiagen DNeasy Plant Kit, which was more suitable for the sequencing steps.

2.2.2. *Tuber melanosporum* detection by direct PCR

On sample set #1, the presence of *T. melanosporum* on non-ectomycorrhizal roots was tested using the specific primers MeIF and MeIR as in Douet et al. (2004) that target the internal transcribed spacer (ITS) region of the nuclear ribosomal DNA. On 80 randomly chosen samples from sample set #1, fungal ITS sequences were amplified using ITS1-F/ITS4 (primer sequences available in Table S4; White et al., 1990; Gardes and Bruns, 1993) and tentatively sequenced with the same primers whenever a single amplicon was present. Raw sequence data were edited using CodonCode Aligner (CodonCode, Centerville, MA, USA), and assigned to a genus or

species by using BLASTN against the GenBank database (GB accession numbers MF693835–46, Table S5).

2.2.3. Metabarcoding of root fungi

On sample set #2, the whole fungal community was assessed by amplifying the ITS2 region using the two general primer pairs ITS3/ITS4-OF and ITS86-F/ITS4 (Table S4). This primer choice amplifies a large set of fungi (Waud et al., 2014), but not necessarily AM fungi that are expected to be underrepresented: thus, we target the non-AM community. The PCR temperature profile was 95 °C for 7 min, followed by 30 cycles at 94 °C for 30 s, 59.2 °C for 40 s, 72 °C for 60 s, and a final extension at 72 °C for 10 min. Each sample was identified with different tags, added by way of tagged primers in a second PCR with similar conditions except the annealing temperature of 60.4 °C. The two tagged PCR amplicons for each sample were pooled and purified with NucleoMag[®] NGS Clean-up. The pooled library was then sequenced with an Ion Torrent sequencer (Life Technologies, Carlsbad, USA), and the sequences were processed in a two-step procedure to deal with the great length variation of the sequenced reads. The first step was the creation of a reference R-OTU (Reference Operational Taxonomic Unit) database, based on the fully sequenced amplicons only. For this, all reads containing both ITS86-F and ITS4 primers were extracted and trimmed from each sample dataset using Cutadapt v1.4.1 (Martin, 2011) with the minimum size option (-m) at 200 bp, the minimum quality filter option (-q) at Q25, a maximum error rate (-e) of 25%, and the minimum overlap option between the reads and the primer reference (-O) at 6 bp. Since the primer pair ITS86-F/ITS4 is included into the stretch amplified by the pair ITS3/ITS4-OF, and because we allowed a primer recognition with up to 25% errors, our procedure concurrently selected the region spanning from ITS86-F to ITS4 in reads produced by both amplifications, even if some sequences amplified with ITS3/ITS4-OF diverged substantially at the ITS86-F and ITS4 loci. After several tests, a 25% error threshold was shown to maximize the number of captured ITS3 sequences (~84% of sequences captured, compared to only 69% with the default error rate of 10%) with a limited amount of non-specific capture. The pool was then clustered into R-OTUs using the SWARM algorithm (Mahé et al., 2014) with a resolution of 5. All singleton R-OTUs were discarded, as were chimeras detected with the UCHIME algorithm v4.2.4 (Edgar et al., 2011) against the UNITE fungal reference database v.7 (Köljalg et al., 2013). In the second step, we extracted and trimmed all reads from the original dataset containing at least one of the ITS86-F or ITS4 primers, using the same algorithm and filtering options as in the first step (except a minimum size of 150 bp). Filtered reads were clustered into OTUs using BLASTN (Altschul et al., 1990) against the R-OTU database created in step one with a 97% similarity threshold. Fungal taxonomic assignment was finally obtained for OTUs by comparing the reference sequence of each corresponding R-OTU to the UNITE fungal reference database v.7 using BLASTN. A final step of filtering was conducted to remove non fungi sequences (mostly spurious amplification of plant ITS) and samples containing less than 1000 sequences, except one non-brûlé sample which harboured 986 sequences. All these treatments were carried out using the Qiime pipeline (Caporaso et al., 2010) and homemade scripts, available from the authors upon request. Raw sequence reads are available in Genbank under accession numbers SAMN07498277–SAMN07498354. The ecology of each OTU (that is, ectomycorrhizal, AM, endophytes, pathogens or saprobes) was inferred from that of closest relatives in GenBank and UNITE databases (Sebacinaceae that have both ectomycorrhizal and endophytic abilities (Weiß et al., 2016) were all classified here as ectomycorrhizal).

2.2.4. *Tuber melanosporum* genotyping

On sample set #3, the genetic structure was analyzed by genotyping samples with 13 microsatellites (as in Taschen et al., 2016) and the mating-type locus (using primers p19–p20 and p1–p2 as in Rubini et al., 2011b). Zygotic genotypes were only considered when the two MAT alleles were successfully amplified, a criterion confirming efficient spore DNA extraction, and paternal genotypes were obtained by differences with the gleba (maternal) genotype. All microsatellite profiles were analyzed with GeneMapper[®] Software (Applied Biosystems, Foster City, CA USA). We defined haploid multilocus genotypes (MLGs) based on the mating type and microsatellite loci. To avoid genotyping uncertainties, we further screened microsatellite data and, considering each brûlé separately, we first discarded microsatellite loci with more than 10% of missing data (one locus in one of the two brûlés from T5), then samples with missing data for one or more microsatellite loci in the remaining dataset. We obtained one 'MLG dataset' per population, and the so-called probability of each MLG (P_{Gen}) was estimated based on allelic frequencies in each population using GenClone v. 2.0 (Arnaud-Haond and Belkhir, 2007). For MLGs represented more than once in fruit-bodies and/or non-ectomycorrhizal roots, the probability that the replicate genotypes resulted from independent events of sexual reproduction (P_{sex}) was calculated using MLGSim (Stenberg et al., 2003). The spatial aggregation of mating types was tested using Genepop v.4.4 (Rousset, 2008).

3. Results

3.1. *Tuber melanosporum* is detectable on non-ectomycorrhizal roots

A first test using *T. melanosporum*-specific primers MelF and MelR (Douet et al., 2004) on the 473 root fragments from sample set #1 detected *T. melanosporum* in 45.2% of the root samples of non-ectomycorrhizal plants growing on brûlés (Tables 1 and S1). The percentage of positive plant individuals varied from 83.3% to 90.2% between truffle grounds, and all investigated species were positively detected for *T. melanosporum* at least on one root fragment (Table 1). Furthermore, direct Sanger sequencing of the whole fungal ITS amplified with universal primers ITS1-F/ITS4 on 80 randomly chosen roots provided good-quality reads in 31 roots (39%). The amplified sequences matched *T. melanosporum* in 21 roots (GenBank accession number MF693844 and MF693846; Table S5), and diverse ectomycorrhizal fungi in 10 roots (*Inocybe* sp., $n = 2$; Thelephoraceae sp., $n = 4$; Sebacinaceae sp., $n = 2$; and Pezizomycotas sp., $n = 2$; GenBank accession numbers MF693835–43; Table S5). When considering the three sample sets from this study altogether (sample sets #1, 2 and 3; Tables S1–3), *T. melanosporum* was molecularly detected on 49.7% of the 918 root fragments, and 93% of the 82 plant species investigated (98% of the 77 AM species).

3.2. Assessment of the total fungal community

The Ion Torrent run on sample set #2 produced between 1000 and 28 000 reads per sample after filtering. Eight samples were discarded because of the low number of sequences (<1000). The final OTU table (Table S6) included 402455 reads distributed in 1215 OTUs, among them ectomycorrhizal fungi (28.2% of sequences), AM fungi (0.2%; which are poorly targeted by the primers used), endophytic fungi (36.8%), saprobes (2.8%), pathogens (5.5%), and other taxa (unidentified or not assigned to a trophic type, 26.4%; Fig. 1A–B and Table S6). The proportion of Ascomycota and Basidiomycota differed in and out of brûlés in terms of reads (17.9% and 15.4% of Basidiomycota in and out of brûlés respectively;

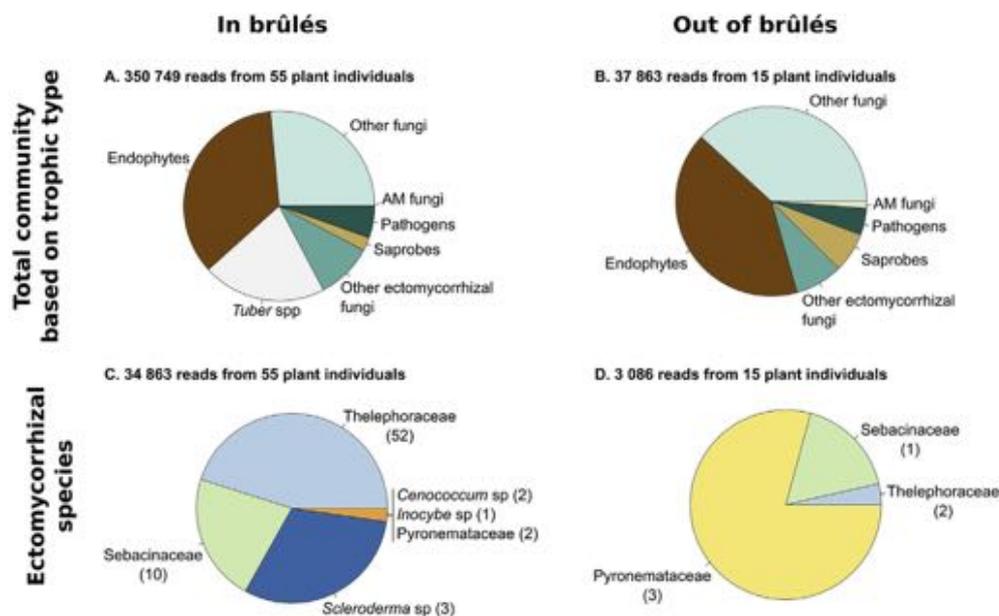


Fig. 1. Metabarcoding of fungal community of roots of non-ectomycorrhizal plants found in brûlés (A,C) and out of brûlés (B,D), in proportion of the total number of identified reads. (A,B) total community, based on trophic types; (B,C) ectomycorrhizal fungal taxa other than *Tuber* spp., with number of OTUs in brackets.

$\chi^2 = 2319$; $df = 1$; $p < 2.2e-16$), as well as the proportions of trophic types (i.e., endophytes, pathogen, ectomycorrhizal, saprobies or AM; $\chi^2 = 9925$; $df = 5$; $p < 2.2e-16$; Fig. 1A and B). Differences were mainly due to the presence of two *Tuber* species in brûlés (Fig. 1A), as they represent 68.7% of the ectomycorrhizal species in brûlés, but were virtually absent from roots out of brûlés (only seven reads on three plant individuals; Table S2). Besides *Tuber* species, eight ectomycorrhizal taxa were found, including Sebacinaceae, Thelephoraceae, Pyronemataceae, and species in the genera *Inocybe*, *Cenococcum* and *Scleroderma* (Fig. 1C).

Tuber melanosporum represented 17.3% of all reads, and more precisely $14.6 \pm 22.2\%$ of the reads (mean \pm standard deviation) per plant from brûlés versus $3.3e-5 \pm 0.0001\%$ per plant out of brûlés ($\chi^2 = 6042$; $df = 1$; $p < 2.2e-16$). *T. melanosporum* was present on 81.8% of the individuals, i.e. 45 of the 55 plant individuals in brûlés versus only one individual (*Plantago lanceolata*) out of the 15 individuals collected out of brûlé ($\chi^2 = 26$; $df = 1$; $p = 2.9e-07$). In all, this represented 17 of the 23 investigated non-ectomycorrhizal plant species (Table 2 and Table S2). We also recovered *T. mesentericum* (7.1% of the individual herbaceous plants). Beyond a few reads of *Tuber* spp, the diversity of ectomycorrhizal taxa found on non-ectomycorrhizal roots out of brûlés was a subset of the previous taxa (Pyronemataceae spp., Sebacinaceae spp., and Thelephoraceae spp.; Fig. 1D). Interestingly, the dominant taxa out of brûlés (Pyronemataceae spp., 79.2% of the ectomycorrhizal reads; on 9 out of 15 plants), a close relative of the genus *Tuber* within Pezizales, was nearly absent from brûlé plant roots (0.02% of the ectomycorrhizal reads, in only 3 plants out of 55).

3.3. *Tuber melanosporum* genetic diversity in fruit-bodies and non-ectomycorrhizal plant roots

Over the three sites used to build sample set #3 for genotyping *T. melanosporum* on non-ectomycorrhizal roots (Table 3), this species was positively detected on 56.3% of the samples (85.2% of the plant individuals; Table 3 and Table S3) and successfully genotyped on 45.6% of the samples (70% of the 21 investigated species; Table S3). Whenever several roots of the same plant were

successfully genotyped (up to $n = 6$), a similar MLG was recovered, except for a *Reseda phyteuma* plant from T2 (Fig. 2A) and for 4 plants from T5 (Fig. 2C) that each displayed two MLGs differing at one locus only. In all sites, the most abundant root MLG was also recovered as maternal MLG of some surrounding fruit-bodies, but never as paternal genotype (Fig. 2). In T2, the most abundant root MLG was one of the seven maternal MLGs found over 3 years (Fig. 2A), while the two other root MLGs were not found in any fruit-body. In T5, the two brûlés covered by the analysis each harboured a different root MLG, which was the maternal MLG of all fruit-bodies of the respective brûlé (Fig. 2B). In T6, the most abundant root MLG was the only maternal MLG (Fig. 2C), while the four other root MLGs were not found in any fruit-body. The root fragments always displayed the mating type of the closest fruit-body from the same year (Fig. 2). The mating types were spatially aggregated on each brûlé (Mantel permutation test: $p < 0.001$).

4. Discussion

Our results show that *T. melanosporum* DNA can be detected at high frequency on roots of herbaceous plants of brûlés (55.7% of roots fragments investigated; 78.9% of plant individuals; 89.7% of plant species over the entire study, cumulating all sample sets). *Tuber melanosporum* represented 17.3% of reads in the metabarcoding analysis of the root fungal community. Moreover, *T. melanosporum* individuals on roots can be genotyped by microsatellites and their MAT allele can be recovered, indicating the presence of a very limited number of individuals (up to two) per plant. These individuals include some of the maternal individuals forming the surrounding fruit-bodies, plus some other individuals with the same MAT, thus suggesting the spatial aggregation of vegetative individuals of the same MAT. Paternal individuals were never found on roots of herbaceous plants, which is congruent with the local exclusion of their MAT around the fruit-bodies. Our results are unlikely to result from DNA extraction of resting soil spores contaminating the root surface. A large *T. melanosporum* spore bank likely exists in brûlé soil (Taschen et al., 2016) due to unremoved fruit-bodies, as in other species with subterranean fruiting (Kretzer

Table 3
Sample set #3. Sites and species used for genotyping of *Tuber melanosporum* on non-ectomycorrhizal plant roots.

Site	Type ^a	Location	Year	Number of:		Species sampled ^b	Positive detection ^c
				Ascocarps	Plants		
T2	S	43° 26' 48" N 3° 22' 46" E	May 2013	10 ^d	6	<i>Geranium robertianum</i> (2), <i>Sedum sediforme</i> , <i>Catapodium rigidum</i> , <i>Reseda phyteuma</i> , <i>Erophila verna</i>	Samples: 75% Successfully genotyped: 59.3%
T5	S	44° 0' 43" N 4° 25' 12" E	May 2016	8	25	Unknown Borraginaceae, <i>Cardamina hirta</i> (2), <i>Geranium robertianum</i> , <i>Melica ciliata</i> (4), <i>Lathyrus pratensis</i> , <i>Lysimachia foemina</i> (3), <i>Sedum sediforme</i> (2), <i>Stellaria media</i> (6), <i>Trifolium incarnatum</i> (2), <i>Veronica arvensis</i> (2), <i>Vicia sativa</i>	Samples: 49.3% Successfully genotyped: 18.9%
T6	P	45° 4' 15" N 1° 27' 5" E	June 2016	3	30	<i>Anthyllis vulneraria</i> , <i>Catapodium rigidum</i> , <i>Euphorbia cyparissias</i> , <i>Geranium robertianum</i> (17), unknown species #1 (5), unknown species #2	Samples: 58.3% Successfully genotyped: 51.4%
All				21	61	24 species	Samples: 56.3% Successfully genotyped: 45.6%

^a S: spontaneous truffle ground, P: plantation.

^b Under brackets, repetition number for species sampled more than once.

^c See details for positive detection in Table S3.

^d Sampled over the 3 previous years (otherwise, one year only). These ascocarps were already genotyped by Taschen et al. (2016), and are part of the so-called 'SB2' plantation (see Fig. S3a in Taschen et al., 2016).

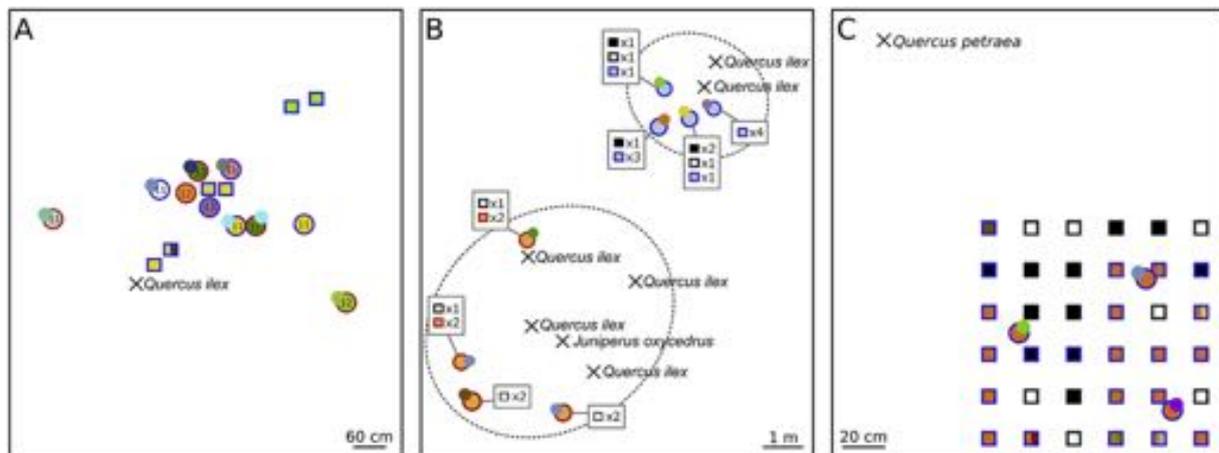


Fig. 2. Map of the MLGs found on non-ectomycorrhizal plants in brûles from two spontaneous truffle grounds, T2 (A) and T5 (B; two brûles each delimited by dotted lines), and one plantation T6 (C). Tree positions are indicated by crosses with their Latin name. For fruit-bodies, the largest circle in the background indicates the maternal MLG and the smaller, overlapping one corresponds to paternal MLG. Non-ectomycorrhizal herbaceous plants are represented by squares: black squares: genotyping failed despite detection of *T. melanosporum*; empty squares: absence of *T. melanosporum*. Colours of squares and circles indicate MLG identity in each site (two colours in a square indicate that different MLGs were found on different roots from the same plant individual). Colours of the border indicate the mating type (red: MAT1-1; blue: MAT1-2).

et al., 2005; Dunham et al., 2013; Glassman et al., 2015; Murata et al., 2017). On one hand, extraction of spore DNA requires specific methods that were not applied here. On the other hand, multiple genotypes can be expected from the spore bank, while clear haploid genotypes were recovered, suggestive of the large distribution of a single (or a few) vegetative individual(s) at the scale of root systems. We discuss below these results in relation to a potential interaction and endophytism of *T. melanosporum* on roots of herbaceous plants, and to the ecology of paternal individuals.

4.1. *Tuber melanosporum* as a root endophyte?

The detection of *T. melanosporum* in roots of herbaceous plants is reminiscent of previous reports on orchids (Girlanda et al., 2006) and on various plant hosts for the related species *T. aestivum* (Gryndler et al., 2014). Yet, *T. melanosporum* can be abundantly

amplified from truffle ground soil, likely due to mycelial abundance of this species, when barcoding the whole soil fungal community (Napoli et al., 2010; Mello et al., 2015; Taschen et al., 2015), raising the possibility that soil contamination explains our results. We do not favour this interpretation for three reasons. First, we did not see any particular density of hyphae surrounding the samples under the dissecting microscope. Second, the detection was possible even after surface sterilization with sodium hypochlorite in the presence of a wetting agent (see Material and Methods), likely destroying any surface contamination persisting after careful washing. Such a protection of DNA suggests a more intimate interaction. Third and last, the molecular signal was intense, as shown by the direct sequencing of *T. melanosporum* ITS amplicons, or by the frequency of *T. melanosporum* OTUs in metabarcoding analyses. Although indirect, these results suggest a high DNA concentration, which is unexpected for a simple surface contamination.

This is to our knowledge the first molecular evidence that *T. melanosporum* is frequently and abundantly present on the roots of herbaceous plants on brûlés. Indeed, these plants are either non-mycorrhizal (such as Brassicaceae), and thus did not attract many analyses of root fungi, especially in the framework of truffle grounds, or in most cases form arbuscular mycorrhizas with Glomeromycotina. The later situation entailed the use of primers specific to Glomeromycotina when trying to assess how brûlés affect fungal diversity in roots of herbaceous plants (e.g., Mello et al., 2015), so that the presence of *T. melanosporum* has hitherto been overlooked. In previous studies, the fact that the AM fungal community structure is affected in brûlés, where richness is lower compared to outside the brûlés, is also suggestive of an interaction between roots and *T. melanosporum* (Mello et al., 2015).

We consider our data congruent with an endophytic colonization of roots by *T. melanosporum*. By endophyte, we mean here a fungus growing in living plant tissues (biotrophy) without causing obvious symptoms or morphological modifications (e.g. no mycorrhiza), whatever its impact on host nutrition (Wilson, 1995; Hardoim et al., 2015). Moreover, endophytism does not exclude, in our eyes, a colonization of locally dead cells or tissues, killed by the endophyte itself or by other causes, within otherwise mostly intact, living tissue and root. Such a situation is described for some endophytes (such as Sebaciales, which were also found in this study; Weiß et al., 2011, 2016) or was hypothesized for *T. aestivum* (Gryndler et al., 2014). Thus, our definition of biotrophy, at this stage of analysis, is at the organ level, since our study targets healthy-looking roots. Our sampling did not consider the possibility of necrotic attacks at root level, as was tentatively described by Plattner and Hall (1995), and thus we do not exclude that they may also occur.

Such an endophytic colonization of non-ectomycorrhizal roots could be widespread in other Pezizomycotina, if not in other ectomycorrhizal fungal taxa. Indeed, we detected other ectomycorrhizal fungal sequences during our survey, belonging to Cenococcum, Scleroderma, Thelephoraceae, Pyronemataceae, Sclerodermataceae, Sebacinaceae and other Tuber spp. Interestingly, and although different samples were used, metabarcoding and direct PCR sequencing approaches indicated quite congruent diversity of ectomycorrhizal fungi. These taxa known to occur in truffle grounds (Napoli et al., 2010; Belfiori et al., 2012; Benucci et al., 2014; Taschen et al., 2015) are unlikely to be simple contaminants in our samples, as would be, for example, saprobic soil fungi. Whereas endophytism is reported in Sebacinaceae (Selosse et al., 2009; see Weiß et al., 2016 for a review), ectomycorrhizal fungi can be sporadically found, likely as endophytes, in some non-ectomycorrhizal plants in addition to their regular mycorrhizal fungi (e.g. Bougoure et al., 2007; Těšitelová et al., 2015; Toju et al., 2016). Moreover, endophytic abilities are reported in other ectomycorrhizal taxa, such as *Tricholoma* spp. (Murata et al., 2013, 2014). Once again, primers used for investigating AM plants may have underestimated the presence of ectomycorrhizal fungi in the past. It is even hypothesized that, in some lineages at least, ectomycorrhizal fungi evolved from root endophytic ancestors that progressively gained more integrated mycorrhizal interaction with roots (Selosse et al., 2009; van der Heijden et al., 2015). In such a scenario, endophytic abilities may simply persist as an ancestral trait in some ectomycorrhizal taxa. Thus, although more detailed morphological analyses are now required (see below), the ability of *T. melanosporum* to colonize roots of herbaceous plants may be an overlooked feature shared with some other ectomycorrhizal taxa.

4.2. The elusive ecological niche of paternal individuals

The genotyping of *T. melanosporum* individuals on roots of

herbaceous plants did not solve the open question of the ecological niche of paternal individuals. Conversely, maternal individuals were detected, as well as a few new MLGs not seen in fruit-bodies, but no MLG corresponding to paternal individuals involved in the fertilization of previously sampled fruit-bodies. All individuals detected on roots of herbaceous plants followed the previously reported trends (see Introduction) for (i) spatial aggregation of MAT (they were always from the locally dominant MAT), and (ii) local aggregation of close relatives as they tended to be genetically related to the individuals that grow close by. As an illustration of the later point, the genotypes found within each of the three sites (ca. 1 m² in size) often differed by 2–3 loci, while the different MLGs from a single root system, i.e. on a more restricted area, only differed by up to two loci (Fig. 3).

Non-reproducing individuals, as we detected, are already known: some genets undergo dormancy (i.e. do not fruit one year, although they fruit the years after and before; Taschen et al., 2016). Moreover, when looking at sequence polymorphism (point mutation) of *T. melanosporum* ITS, the diversity of haplotypes recovered from ectomycorrhizas can exceed that observed on fruit-bodies (Napoli et al., 2010). We did not find individuals with complementary MAT on roots of herbaceous plants, so that the (still unknown) mechanism for MAT exclusion also acts within the endophytic niche.

The spatial structure as seen from roots of herbaceous plants is thus congruent with that obtained from the genotyping of ectomycorrhizas and maternal individuals in fruit-bodies. Some maternal MLGs are abundant, cover large areas and access plant resources, but the ecological niche of paternal individuals remains elusive. One main caveat in the present study is the sampling period. To characterize genetically the paternal individuals in fruit-bodies, we sampled after fruiting. However, paternal individuals often do not last (Taschen et al., 2016; De la Varga et al., 2017), so that they may already have vanished by the time of fruiting. Unfortunately, any sampling before mating or fruit-body production would kill the individual(s) detected. Although we do not know when mating occurs, fruit-body growth starts in late spring or early summer of the previous year (Le Tacon et al., 2016), and PCR amplification of MAT alleles on young fruit-bodies in summer shows that the two partners are already associated at that time (Taschen et al., unpublished data). Thus, sampling in late spring/early summer should be performed to demonstrate further whether paternal individuals with the other MATs exist at that

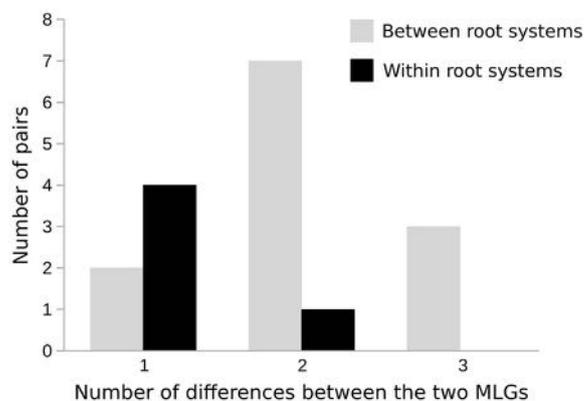


Fig. 3. Number of loci (out of 13) revealing a different allele in pairwise comparisons between MLGs detected on non-ectomycorrhizal plants. Pairs of genets occurring in different root systems from same site in grey (up to three differences observed; n = 12 comparisons); pairs of genets occurring in same root system in black (up to two differences observed; n = 5 comparisons).

period, on roots of both ectomycorrhizal and herbaceous, non-ectomycorrhizal plants.

Beyond this caveat, our data further support the idea that paternal individuals have to be found somewhere else, as proposed before (Selosse et al., 2013; Rubini et al., 2014; Taschen et al., 2016): germinating spores and/or small mycelia surviving in soil may act as male. Further analyses, directly on soil, are now required to characterize the life of paternal individuals.

4.3. Biological relevance of an endophytic niche and perspectives

Our data raise two major questions for future research, respectively the anatomical nature of the interaction with roots of herbaceous plants and its possible biological relevance for *T. melanosporum* maternal individuals. The anatomical nature of the interaction needs more direct inspection of roots by light and electron microscopy. Our preliminary attempts revealed putative ascomycetous hyphae in living cells, suggesting the existence of endophytic, intracellular fungi, but without a conclusive demonstration that it was *T. melanosporum* (Taschen, Bonfante, Faccio & Selosse; unpublished data). The demonstration that they belong to *T. melanosporum* will need the use of antibodies (as in the demonstration that *Tuber* spp. are mycorrhizal in some orchids; Selosse et al., 2004) or the development of fluorescent *in situ* hybridization (FISH). As our data show, this challenge extends to other ectomycorrhizal species found in roots of herbaceous plants. We now need to characterize the exact cellular interaction (superficial or more intimate, with dead or living cells) of these fungi in root tissues.

Can an interaction with herbaceous plants be biologically relevant for *T. melanosporum*? This successional species develops in environment where trees colonize within a rich herbaceous flora (Callot, 1999; Taschen et al., 2015). A canopy opening, that favours herbaceous species (among other, complex effects), is beneficial to *T. melanosporum* (e.g. Garcia-Barreda et al., 2015). Could herbaceous plants provide carbon to *T. melanosporum*? On the one hand, the natural isotopic abundance of *T. melanosporum* fruit-bodies is typical of that of ectomycorrhizal fungi (i.e. less ^{13}C -enriched but more ^{15}N -enriched than saprobic fungi; Zeller et al., 2008) and estimations based on labelling of tree photosynthates suggest that almost all the carbon allocated to the fruit-body comes from the host tree (Le Tacon et al., 2013). On the other hand, the natural isotopic abundances expected for endophytes that use plant carbon are very variable (Seitzman et al., 2011; Selosse & Martos, 2015), and the values obtained for *T. melanosporum* fruit-bodies do not exclude a contribution of carbon obtain by endophytism. Moreover, the relevance of carbon from herbaceous plants may target more the vegetative life in spring than the fruiting season, since herbaceous plants become rarer in summer and fall, at least in the Mediterranean ecosystems where *T. melanosporum* lives. Finally, the genome of *T. melanosporum* reveals two features that could be essential for endophytic colonization and nutrition, namely a set of carbohydrate-cleaving enzymes, although few of them might be linked to degradation of plant cell walls, and the presence of an invertase that might give access to plant-derived sucrose (Martin et al., 2010). More experimental approaches, e.g. in mesocosm, and/or after stable isotope probing (SIP) of herbaceous plants, may reveal whether truffle get some reward from this interaction. Such approaches may also validate the empirical practice of some truffle growers, who sow cereals or shrubs (such as *Lavendula*) in truffle grounds (Callot, 1999). They may also quantify the cost of the interaction, if any, on the plant side.

Finally, the brûlé remains a mysterious phenomenon (Streiblová et al., 2012). Although our data do not provide any new explanation, the interaction of *T. melanosporum* with plants roots opens a new

perspective. Several reports suggest that a certain abundance of *T. melanosporum* must be reached for a brûlé to be formed. DNA quantification in soil reveals that brûlé formation requires a high level of mycelium in soil (Suz et al., 2008; Queralt et al., 2017), and it takes a few years before a brûlé develops under inoculated trees (Callot, 1999). Similarly, over one year, brûlés appear in late spring, after the herbaceous vegetation has started to develop (Streiblová et al., 2012), indicating that *T. melanosporum* should develop after the winter break, before plants are affected. It remains unclear whether the interaction with herbaceous plants we observed can be involved, at least in part, in brûlé formation, or whether brûlés instead arise from a phytotoxic effect and/or even simple competition for mineral nutrients in soil (Pacioni, 1991; Angelini et al., 2015; see review in Streiblová et al., 2012).

Our results support an interaction between *T. melanosporum* and roots of herbaceous plants, and are relevant for future research on the brûlé phenomenon and on the mycelial development of the fungus. They also point to the need for more research on the anatomical nature and functional aspects of this interaction. We have extended the niche of individuals that contribute maternally to fruit-body production, but we leave open the question of the exact niche of the individuals contributing paternally to reproduction.

Acknowledgments

We thank the 'Service de Systématique Moléculaire' (UMS2700 MNHN/CNRS) for granting access to its technical platform. We warmly thank Paul Stengel, Pierre Bernadach and Christophe Bot for providing access to their truffle grounds, the ADIDA for financial support and access to the Pôle d'Expérimentations sur la Truffe, three anonymous referees and Lynne Boddy for very useful corrections, as well as David Marsh for English corrections.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2017.10.004>.

References

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).
- Angelini, P., Tirillini, B., Properzi, A., Rol, C., Venanzoni, R., 2015. Identification and bioactivity of the growth inhibitors in *Tuber* spp. methanolic extracts. *Plant Biosyst.* 149, 1000–1009. <https://doi.org/10.1080/11263504.2014.983575>.
- Arnaud-Haond, S., Belkhir, K., 2007. GENCLONE: a computer program to analyse genotypic data, test for clonality and describe spatial clonal organization. *Mol. Ecol. Notes* 7, 15–17. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01522.x>.
- Belfiori, B., Riccioni, C., Tempesta, S., Pasqualetti, M., Paolucci, F., Rubini, A., 2012. Comparison of ectomycorrhizal communities in natural and cultivated *Tuber melanosporum* truffle grounds. *FEMS Microbiol. Ecol.* 81, 547–561. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01379.x>.
- Benucci, G.M.N., Raggi, L., Albertini, E., Csorbai, A.G., Donnini, D., 2014. Assessment of ectomycorrhizal biodiversity in *Tuber macrosporum* productive sites. *Mycorrhiza* 24, 281–292. <https://doi.org/10.1007/s00572-013-0538-3>.
- Bertault, G., Rousset, F., Fernandez, D., Berthomieu, A., Hochberg, M.E., Callot, G., Raymond, M., 2001. Population genetics and dynamics of the black truffle in a man-made truffle field. *Heredity* 86, 451–458. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2540.2001.00855.x>.
- Bougoure, D.S., Parkin, P.I., Cairney, J.W.G., Alexander, I.J., Anderson, I.C., 2007. Diversity of fungi in hair roots of Ericaceae varies along a vegetation gradient. *Mol. Ecol.* 16, 4624–4636. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03540.x>.
- Callot, G., 1999. *La Truffe, la Terre, la Vie*. Editions Quae, Paris.
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G.A., Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C.A., McDonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W.A., Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld, J., Knight, R., 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* 7, 335–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>.

- Chatin, A.D., 1869. *La Truffe. Etude des conditions générales de la production Truffière*, first ed. Bouchard-Huzard, Paris.
- De la Varga, H., Le Tacon, F., Lagouet, 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. *Environ. Microbiol.* 19, 2604–2615. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13735>.
- Douet, J.P., Castroviejo, M., Mabru, D., Chevalier, G., Dupré, C., Bergougnoux, F., Ricard, J.M., Medina, B., 2004. Rapid molecular typing of *Tuber melanosporum*, *T. brumale* and *T. indicum* from tree seedlings and canned truffles. *Anal. Bioanal. Chem.* 379. <https://doi.org/10.1007/s00216-004-2643-9>.
- Dunham, S.M., Mujic, A.B., Spatafora, J.W., Kretzer, A.M., 2013. Within-population genetic structure differs between two sympatric sister-species of ectomycorrhizal fungi, *Rhizopogon vinicolor* and *R. vesiculosus*. *Mycologia* 105, 814–826.
- Dupont, J., Dequin, S., Giraud, T., Le Tacon, F., Marsit, S., Ropars, J., Richard, F., Selosse, M.-A., 2016. Fungi as a source of food. *Microbiol. Spectr.* 5. FUNK-0030–2016.
- Edgar, R.C., Haas, B.J., Clemente, J.C., Quince, C., Knight, R., 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr381> [PubMed 21700674].
- García-Barreda, S., Molina-Grau, S., Reyna, S., 2015. Reducing the infectivity and richness of ectomycorrhizal fungi in a calcareous *Quercus ilex* forest through soil preparations for truffle plantation establishment: a bioassay study. *Fungal Biol.* 119, 1137–1143. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.08.014>.
- Gardes, M., Bruns, T.D., 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizas and rusts. *Mol. Ecol.* 2, 113–118.
- Girlanda, M., Selosse, M.A., Cafasso, D., Brilli, F., Delfino, S., Fabbian, R., Ghignone, S., Pinelli, P., Segreto, R., Loreto, F., Cozzolino, S., Perotto, S., 2006. Inefficient photosynthesis in the Mediterranean orchid *Limodorum abortivum* is mirrored by specific association to ectomycorrhizal Russulaceae. *Mol. Ecol.* 15, 491–504. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02770.x>.
- Glassman, S.L., Peay, K.G., Talbot, J.M., Smith, D.P., Chung, J.A., Taylor, J.W., Vilgalys, R., Bruns, T.D., 2015. A continental view of pine-associated ectomycorrhizal fungal spore banks: a quiescent functional guild with a strong biogeographic pattern. *New Phytol.* 205, 1619–1631. <https://doi.org/10.1111/nph.13240>.
- Gryndler, M., Černá, L., Bukovská, P., Hřelová, H., Jansa, J., 2014. *Tuber aestivum* association with non-host roots. *Mycorrhiza* 24, 603–610. <https://doi.org/10.1007/s00572-014-0580-9>.
- Hall, I.R., Yun, W., Amicucci, A., 2003. Cultivation of edible ectomycorrhizal mushrooms. *Trends Biotechnol.* 21, 433–438. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(03\)00204-X](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(03)00204-X).
- Hardoim, P.R., van Overbeek, L.S., Berg, G., Pirttilä, A.M., Compant, S., Campisano, A., Döring, M., Sessitsch, A., 2015. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 79, 293–320. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00050-14>.
- Köjalg, U., Nilsson, R.H., Abarenkov, K., Tedersoo, L., Taylor, A.F.S., Bahram, M., Bates, S.T., Bruns, T.D., Bengtsson-Palme, J., Callaghan, T.M., Douglas, B., Drenkhan, T., Eberhardt, U., Duenas, M., Greben, T., Griffith, G.W., Hartmann, M., Kirk, P.M., Kohout, P., Larsson, E., Lindahl, B.D., Lücking, R., Martín, M.P., Matheny, P.B., Nguyen, N.H., Niskanen, T., Oja, J., Peay, K.G., Peintner, U., Peterson, M., Pöldmaa, K., Saag, L., Saar, I., Schüßler, A., Scott, J.A., Senés, C., Smith, M.E., Suija, A., Taylor, D.L., Telleria, M.T., Weiss, M., Larsson, K.-H., 2013. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Mol. Ecol.* 22, 5271–5277. <https://doi.org/10.1111/mec.12481>.
- Kretzer, A.M., Dunham, S., Molina, R., Spatafora, J.W., 2005. Patterns of vegetative growth and gene flow in *Rhizopogon vinicolor* and *R. vesiculosus* (Boletales, Basidiomycota). *Mol. Ecol.* 14, 2259–2268. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02547.x>.
- Le Tacon, F., 2017. *Les truffes. Biologie, écologie et domestication*. AgroParisTech, Nancy (France).
- Le Tacon, F., Rubini, A., Murat, C., Riccioni, C., Robin, C., Belfiori, B., Zeller, B., De la Varga, H., Akroume, E., Deveau, A., Martin, F., Paolucci, F., 2016. Certainties and uncertainties about the life cycle of the Périgord black truffle (*Tuber melanosporum* Vittad.). *Ann. For. Sci.* 73, 105–117. <https://doi.org/10.1007/s13595-015-0461-1>.
- Le Tacon, F., Zeller, B., Plain, C., Hossann, C., Bréchet, C., Robin, C., 2013. Carbon transfer from the host to *Tuber melanosporum* mycorrhizas and ascocarps followed using a ¹³C pulse-labeling technique. *Plos One* 8, e64626. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064626>.
- Mahé, F., Rognes, T., Quince, C., de Vargas, C., Dunthorn, M., 2014. Swarm: robust and fast clustering method for amplicon-based studies. *Peer J.* 2, e593. <https://doi.org/10.7717/peerj.593>.
- 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., Bolchi, A., Brenna, A., Brun, A., Brun, A., Buée, M., Cantarel, B., Chevalier, G., Couloux, A., Da Silva, C., Denoeud, F., Duplessis, S., Chignone, S., Hilselberger, B., Iotti, M., Marçais, B., Mello, A., Miranda, M., Pacioni, G., Quesneville, H., Riccioni, C., Ruotolo, R., Splivallo, R., Stocchi, V., Tisserant, E., Viscomi, A.R., Zambonelli, A., Zampieri, E., Henrissat, B., Lebrun, M.-H., Paolucci, F., Bonfante, P., Ottonello, S., Wincker, P., 2010. Périgord black truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis. *Nature* 464, 1033–1038. <https://doi.org/10.1038/nature08867>.
- Martin, M., 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.J.* 17, 10–12. <https://doi.org/10.14806/embnet.17.1.200>.
- Mello, A., Lumini, E., Napoli, C., Bianciotto, V., Bonfante, P., 2015. Arbuscular mycorrhizal fungal diversity in the *Tuber melanosporum* brûlé. *Fungal Biol.* 119, 518–527. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.02.003>.
- Murat, C., 2015. Forty years of inoculating seedlings with truffle fungi: past and future perspectives. *Mycorrhiza* 25, 77–81. <https://doi.org/10.1007/s00572-014-0593-4>.
- 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., Paolucci, F., 2013. Fine-scale spatial genetic structure of the black truffle (*Tuber melanosporum*) investigated with neutral microsatellites and functional mating type genes. *New Phytol.* 199, 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, 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* 24, 315–321. <https://doi.org/10.1007/s00572-013-0534-7>.
- Murata, M., Nagata, Y., Nara, K., 2017. Soil spore banks of ectomycorrhizal fungi in endangered Japanese Douglas-fir forests. *Ecol. Res.* 32, 469–479. <https://doi.org/10.1007/s11284-017-1456-1>.
- Napoli, C., Mello, A., Borra, A., Vizzini, A., Sourzat, P., Bonfante, P., 2010. *Tuber melanosporum*, when dominant, affects fungal dynamics in truffle grounds. *New Phytol.* 185, 237–247. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03053.x>.
- Pacioni, G., 1991. Effects of *Tuber* metabolites on the rhizospheric environment. *Mycol. Res.* 95, 1355–1358.
- Paolucci, F., Rubini, A., Riccioni, C., Arcioni, S., 2006. Reevaluation of the life cycle of *Tuber magnatum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 2390–2393. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.4.2390-2393.2006>.
- Plattner, I., Hall, I.R., 1995. Parasitism of non-host plants by the mycorrhizal fungus *Tuber melanosporum*. *Mycol. Res.* 99, 1367–1370.
- Queralto, M., Parladé, J., Pera, J., Miguel, A.M.D., 2017. Seasonal dynamics of extra-radical mycelium and mycorrhizas in a black truffle (*Tuber melanosporum*) plantation. *Mycorrhiza* 1–12. <https://doi.org/10.1007/s00572-017-0780-1>.
- Riccioni, C., Belfiori, B., Rubini, A., Passeri, V., Arcioni, S., Paolucci, F., 2008. *Tuber melanosporum* outcrosses: analysis of the genetic diversity within and among its natural populations under this new scenario. *New Phytol.* 180, 466–478. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02560.x>.
- Rousset, F., 2008. Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resour.* 8, 103–106. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x>.
- Roy, M., Watthana, S., Stier, A., Richard, F., Vessabutr, S., Selosse, M.-A., 2009. Two mycoheterotrophic orchids from Thailand tropical dipterocarpacean forests associate with a broad diversity of ectomycorrhizal fungi. *BMC Biol.* 7, 51. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-7-51>.
- Rubini, A., Belfiori, B., Riccioni, C., Arcioni, S., Martin, F., Paolucci, F., 2011a. *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 Phytol.* 189, 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., Paolucci, F., 2011b. Isolation and characterization of MAT genes in the symbiotic ascomycete *Tuber melanosporum*. *New Phytol.* 189, 710–722. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03492.x>.
- Rubini, A., Riccioni, C., Belfiori, B., Paolucci, F., 2014. Impact of the competition between mating types on the cultivation of *Tuber melanosporum*: Romeo and Juliet and the matter of space and time. *Mycorrhiza* 24, 19–27. <https://doi.org/10.1007/s00572-013-0551-6>.
- Seitzman, B.H., Ouimette, A., Mixon, R.L., Hobbie, E.A., Hobbie, D.S., 2011. Conservation of biotrophy in Hygrophoraceae inferred from combined stable isotope and phylogenetic analyses. *Mycologia* 103, 280–290. <https://doi.org/10.3852/10-195>.
- Selosse, M.-A., Dubois, M.-P., Alvarez, N., 2009. Do Sebaciales commonly associate with plant roots as endophytes? *Mycol. Res.* 113, 1062–1069. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.07.004>.
- Selosse, M.-A., Faccio, A., Scappaticci, G., Bonfante, P., 2004. Chlorophyllous and achlorophyllous specimens of *Epipactis microphylla* (Neottieae, Orchidaceae) are associated with ectomycorrhizal septomycetes, including truffles. *Microb. Ecol.* 47, 416–426. <https://doi.org/10.1007/s00248-003-2034-3>.
- Selosse, M.-A., Schneider-Maunoury, L., Taschen, E., Rousset, F., Richard, F., 2017. Black truffle, a hermaphrodite with forced unisexual behaviour. *Trends Microbiol.* 25, 784–787. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.05.010>.
- Selosse, M.-A., Martos, F., 2014. Do chlorophyllous orchids heterotrophically use mycorrhizal fungal carbon? *Trends in Plant Science* 19, 683–685. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.09.005>.
- Selosse, M.-A., Taschen, E., Giraud, T., 2013. Do black truffles avoid sexual harassment by linking mating type and vegetative incompatibility? *New Phytol.* 199, 10–13.
- Splivallo, R., Novero, M., Berteà, C.M., Bossi, S., Bonfante, P., 2007. Truffle volatiles inhibit growth and induce an oxidative burst in *Arabidopsis thaliana*. *New*

- Phytol. 175, 417–424. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02141.x>.
- Stenberg, P., Lundmark, M., Saura, A., 2003. MLGsim: a program for detecting clones using a simulation approach. *Mol. Ecol. Notes* 3, 329–331. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2003.00408.x>.
- Streiblová, E., Gryndlerová, H., Gryndler, M., 2012. Truffe brûlée: an efficient fungal life strategy. *FEMS Microbiol. Ecol.* 80, 1–8. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01283.x>.
- Suz, L.M., Martín, M.P., Oliach, D., Fischer, C.R., Colinas, C., 2008. Mycelial abundance and other factors related to truffle productivity in *Tuber melanosporum*–*Quercus ilex* orchards. *FEMS Microbiol. Lett.* 285, 72–78. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01213.x>.
- 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*. *Mol. Ecol.* 25, 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 *Tuber melanosporum* brûlés developed in multi-host Mediterranean plant communities: ectomycorrhizal diversity on *Tuber melanosporum* brûlés. *Environ. Microbiol.* 17, 2747–2761. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12741>.
- Těšitelová, T., Kotlínek, M., Jersáková, J., Joly, F.-X., Košnar, J., Tatarenko, I., Selosse, M.-A., 2015. Two widespread green *Neottia* species (Orchidaceae) show mycorrhizal preference for Sebaciales in various habitats and ontogenetic stages. *Mol. Ecol.* 24, 1122–1134. <https://doi.org/10.1111/mec.13088>.
- Toju, H., Tanabe, A.S., Ishii, H.S., 2016. Ericaceous plant-fungus network in a harsh alpine-subalpine environment. *Mol. Ecol.* 25, 3242–3257. <https://doi.org/10.1111/mec.13680>.
- 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 Phytol.* 205, 1406–1423. <https://doi.org/10.1111/nph.13288>.
- Vincenot, L., Selosse, M.-A., 2017. Population biology and ecology of ectomycorrhizal fungi. *Ecol. Stud.* 230, 39–59.
- Waud, M., Busschaert, P., Ruyters, S., Jacquemyn, H., Lievens, B., 2014. Impact of primer choice on characterization of orchid mycorrhizal communities using 454 pyrosequencing. *Mol. Ecol. Resour.* 14, 679–699. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12229>.
- Weiβ, M., Sýkorová, Z., Garnica, S., Riess, K., Martos, F., Krause, C., Oberwinkler, F., Bauer, R., Redecker, D., 2011. Sebaciales everywhere: previously overlooked ubiquitous fungal endophytes. *Plos One* 6, e16793. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016793>.
- Weiβ, M., Waller, F., Zuccaro, A., Selosse, M.-A., 2016. Sebaciales - one thousand and one interactions with land plants. *New Phytol.* 211, 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*. Elsevier, pp. 315–322. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>.
- Wilson, D., 1995. Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos* 73, 274. <https://doi.org/10.2307/3545919>.
- Zeller, B., Bréchet, C., Maurice, J.-P., Tacon, F., 2008. Saprotrophic versus symbiotic strategy during truffle ascocarp development under holm oak. A response based on ¹³C and ¹⁵N natural abundance. *Ann. For. Sci.* 65, 607. <https://doi.org/10.1051/forest:2008037>.

Endophytisme de la Truffe noire et de la Truffe de Bourgogne

4.1 Contexte et résumé de l'article IV

Le chapitre 3 a présenté les premiers indices moléculaires de l'interaction entre la Truffe noire et les plantes herbacées. La chronologie de l'échantillonnage ne permet cependant pas de savoir quels individus colonisent les racines à d'autres moments de l'année, ni si les « nouveaux » individus parfois détectés sur les racines participent à la reproduction sexuée au cours de la saison suivante. Ces résultats soulèvent en outre plusieurs questions concernant la nature exacte de l'interaction endophyte : les hyphes interagissent-ils avec des cellules vivantes, mortes ou sénescents ? dans quelle(s) partie(s) de la racine ? avec quels impacts fonctionnels pour la Truffe comme pour la plante ? Ce deuxième chapitre concernant l'endophytisme de la Truffe apporte donc des éléments supplémentaires sur cette nouvelle interaction. Il permet par ailleurs d'élargir les résultats précédents à la Truffe de Bourgogne *T. aestivum*, l'autre espèce de Truffe qui produit des brûlés.

Un nouvel échantillonnage de plantes herbacées réalisé sur une truffière à *T. melanosporum* entre deux récoltes d'ascocarpes a permis de mettre en évidence que les individus qui colonisent les racines des plantes herbacées peuvent être impliqués dans l'épisode de reproduction qui suit la récolte des plantes herbacées et pas seulement dans celui qui la précède. Les résultats obtenus sont ambigus puisque le génotype principalement trouvé dans les racines des plantes herbacées est retrouvé comme partenaire maternel dans plusieurs ascocarpes de la saison suivante, mais aussi comme partenaire paternel dans un ascocarpe de cette même saison. Il s'agit donc de l'un de ces rares génotypes réellement hermaphrodites.

Concernant la Truffe de Bourgogne, le séquençage de la communauté fongique des racines de 33 plantes herbacées a révélé la présence de *T. aestivum* dans 79 % des plantes, appartenant à six des sept espèces récoltées. *Tuber aestivum* représentait 3 % des séquences fongiques obtenues. Des échantillonnages d'ascocarpes et de plantes herbacées ont été réalisés conjointement car la saison de maturité des ascocarpes (à l'automne) correspond à une période pendant laquelle les plantes herbacées sont encore présentes. Les résultats sont univoques : les génotypes retrouvés dans les plantes herbacées sont soit le génotype maternel de l'ascocarpe le plus proche, soit des génotypes « nouveaux », mais jamais des génotypes paternels. Par ailleurs, le statut métabolique de la Truffe de Bourgogne endophyte dans les racines a été évalué en quantifiant par qPCR les

ARN de différents gènes impliqués dans le métabolisme. Cette technique a mis en évidence que le mycélium de *T. aestivum* est métaboliquement actif dans les racines des plantes herbacées.

Enfin, le mycélium de Truffe noire a pu être observé à l'intérieur des racines de plantes herbacées grâce à l'utilisation de sondes fluorescentes. Un protocole d'hybridation *in situ* avec des sondes fluorescentes (FISH) a été mis en place : des racines de plantes herbacées ont été marquées avec une sonde spécifique de *T. melanosporum* couplée à une molécule fluorescente et observées au microscope confocal. Dans 43 % des cas, cette technique a mis en évidence des hyphes de *T. melanosporum* alignés dans la longueur de la racine, probablement dans l'apoplasme entre les cellules racinaires.

4.2 Article IV

Les données utilisées dans cet article ont été en partie obtenues au cours des stages de Myriam Moreno (Magistère de l'Université Paris-Sud ; échantillonnage sur brûlé à *T. melanosporum*) et Bethany Farrah (Licence de biologie de l'École Normale Supérieure de Paris ; échantillonnage sur brûlé à *T. aestivum*) que j'ai eu l'occasion d'encadrer. Les expériences de microscopie ont été réalisées au sein de l'unité *Interactions Arbres-Microorganismes* de l'INRA de Nancy, en collaboration avec Aurélie Deveau. Les mesures d'expression génétique par qPCR ont été effectuées au sein de l'unité *Agroécologie* de l'INRA de Dijon avec Pierre-Emmanuel Courty.

Ces résultats ont été soumis en septembre 2019 à la revue *New Phytologist* sous le titre *Two ectomycorrhizal truffles, Tuber melanosporum and T. aestivum, colonize endophytically roots of non-ectomycorrhizal plant in natural environments.*

1 **Two ectomycorrhizal truffles, *Tuber melanosporum* and *T. aestivum*,**
2 **endophytically colonize roots of non-ectomycorrhizal plants in natural**
3 **environments.**

4

5

6 Laure Schneider-Maunoury^{1,*}, Aurélie Deveau^{2,°}, Myriam Moreno¹, Flora Todesco², Simone
7 Belmondo², Claude Murat², Pierre-Emmanuel Courty³, Marcin Jąkowski⁴, Marc-André Selosse^{1,4,°,*}

8

9 ¹ Institut de Systématique, Évolution, Biodiversité (ISYEB – UMR 7205 – CNRS, MNHN, SU,
10 EPHE), Muséum national d'Histoire naturelle, 57 rue Cuvier, 75005, Paris, France

11 ² Université de Lorraine, INRA, UMR IAM, Lab of Excellence ARBRE, 54000 Nancy, France

12 ³ Agroécologie, AgroSup Dijon, CNRS, INRA, Université de Bourgogne Franche-Comté, 17 rue
13 Sully, 21000 Dijon, France

14 ⁴ University of Gdańsk, Faculty of Biology, ul. Wita Stwosza 59, 80-308 Gdańsk, Poland

15

16 [°] These two authors co-supervised this work.

17

18 * Authors for correspondence:

19 Marc-André Selosse. Email: ma.selosse@wanadoo.fr; Tel.: +33 607 12 34 18.

20 Laure Schneider-Maunoury. Email: laure.schneimau@protonmail.com; Tel.: +33 674 35 94 99.

21

22 Word count: Summary: 200

23 **Total: 7342**

24 Introduction: 1379

25 Material and methods: 2113

26 Results: 1414

27 Discussion: 2116

28 Acknowledgments: 125; Supporting information summary: 95

29 Figures: 5; Table: 2

30 Suppl. Material : 3 tables, 2 figures and 1 suppl. text.

32

33 **Abstract:**

34 - Serendipitous findings and studies on *Tuber* species suggest that some ectomycorrhizal fungi,
35 beyond their complex interaction with ectomycorrhizal hosts, also colonize roots of
36 non-ectomycorrhizal plants (NEP) in a loose way called endophytism. Here, we investigate
37 endophytism of *T. melanosporum* and *T. aestivum in situ*.

38 - We visualized endophytic *T. melanosporum* hyphae by fluorescent *in situ* hybridization on NEP.
39 For the two *Tuber* species, microsatellite genotyping investigated the presence in NEP of the
40 individuals whose mating produced nearby ascocarps. We quantified the expression of four *T.*
41 *aestivum* genes in NEP roots.

42 - *Tuber melanosporum* hyphae colonized the apoplast of healthy NEP roots, confirming
43 endophytism. *Tuber melanosporum* and *T. aestivum* found in NEP contributed to nearby
44 ascocarps, but only as maternal parents (forming the flesh). Individuals paternal to ascocarps
45 (giving the genes found in meiotic spores only) were not detected. Gene expression of *T.*
46 *aestivum* in NEP confirmed a living status.

47 - *Tuber* species, and likely other ectomycorrhizal fungi found in NEP in this study, can be root
48 endophytes. This is relevant for the ecology (brûlé formation) and production of truffles. More
49 generally, endophytism may be a remnant of the evolutionary past of some ectomycorrhizal
50 fungi, which have evolved from endophytes.

51

52

53 **Keywords:** Black Périgord truffle, Burgundy truffle, brûlé, ectomycorrhizas, endophytism, FISH,
54 truffle life cycle, truffle dioecy.

56

57 **Introduction**

58

59 Fungi exploit extremely diverse resources, from dead organic matter to association with living
60 organisms (Dighton & White, 2017), but they are also often flexible: a given species can exploit
61 different resources, either simultaneously or depending on their environment. As a result, some
62 species appear to have dual ecological niches (*e.g.*, Behie *et al.*, 2012; Chauvet *et al.*, 2015; Lofgren
63 *et al.*, 2018). The usual textbook division of fungal ecology into simple niches is thus sometimes
64 questionable (Selosse *et al.*, 2018), especially since next-generation sequencing (NGS) now reveals
65 unexpected fungi in diverse environments (Hibbett *et al.*, 2009; Nilsson *et al.*, 2019). In recent
66 times, this has turned out to apply to some ectomycorrhizal (ECM) fungi: usually, their mycelium
67 envelops the host plant roots within a hyphal sheath and penetrates between cortical cells (forming
68 the Hartig net; Smith & Read, 2008; van der Heijden *et al.*, 2015). In the Hartig net, ECM fungi
69 exchange water and mineral nutrients collected in the soil against plant photosynthates.

70 Beyond this morphologically elaborated interaction, increasing but indirect evidence suggests that
71 some ECM fungi also colonize living roots of non-ECM plants as endophytes, *i.e.* form loose
72 associations without symptoms or ECM morphology (endophytism, *sensu* Wilson, 1995; see also
73 Rodriguez *et al.*, 2009). Endophytism in non-ECM plants has been claimed for ECM taxa such as
74 Sebacinaceae (Selosse *et al.*, 2009; Weiß *et al.*, 2011, 2016), non-*Tuber* Pyronemataceae (Hansen *et*
75 *al.*, 2013) or Helotiales (Wang *et al.*, 2006), although to our best knowledge no given species was
76 shown to be simultaneously ECM and endophytic. Morphological evidence on a single non-ECM
77 host species is also reported for ECM species such as *Cortinarius cinnamomeus* (Harrington &
78 Mitchell, 2002) and *Tricholoma matsutake* (Murata *et al.*, 2013, 2014). Endophytism was suggested,
79 based on molecular evidence, for *Tuber* species on several non-ECM families, namely for the
80 Burgundy truffle (*Tuber aestivum*; Gryndler *et al.*, 2013, 2014) and the Périgord black truffle (*T.*
81 *melanosporum*; Schneider-Maunoury *et al.*, 2018). Other ECM taxa are serendipitously found when
82 barcoding root fungal communities of non-ECM plants. For example, *Cenococcum*, *Scleroderma*,
83 Thelephoraceae and non-*Tuber* Pyronemataceae in Mediterranean arbuscular mycorrhizal or
84 non-mycorrhizal herbs (Schneider-Maunoury *et al.*, 2018) and *Meliniomyces* and *Rhizopogon* on
85 arbuscular mycorrhizal *Chamaecyparis obtusa* (Toju & Sato, 2018); various Inocybaceae,
86 Cortinariaceae, Russulaceae and Thelephoraceae in orchid species where they are unlikely to be
87 mycorrhizal (*e.g.*, Shefferson *et al.*, 2005; Jacquemyn *et al.*, 2017); various ECM species in ericoid
88 mycorrhizal plants (Bougoure *et al.*, 2007). Yet, evidence for a dual ecological ECM + endophytic
89 niche still requires direct observation of endophytic hyphae in roots, since contamination or

90 rhizospheric colonization may provide similar molecular signals. Direct anatomical and functional
91 evidence (such as fungal gene expression) is pending.

92 Endophytism in roots of non-ECM plants would be both economically and ecologically relevant in
93 *Tuber* spp. Economically, this genus encompasses species of high commercial and gastronomic
94 values (Zambonelli *et al.*, 2016), for which the domestication, *i.e.* the control of reproduction, has
95 not been achieved despite centuries of attempts (Murat, 2015; Dupont *et al.*, 2017). In France, for
96 example, *T. melanosporum* production was reduced 20-fold over the XXth century (Le Tacon,
97 2017), and even if the large-scale plantation of inoculated trees stopped the trend over the last 30
98 years, guidelines for orchards management are still needed (Murat, 2014; Taschen *et al.*, 2016; Le
99 Tacon, 2017). Thus, better knowledge of the ecology of truffles could enhance cultural practices.
100 Ecologically, *T. aestivum* and *T. melanosporum* live in ECM forests where trees are not dense and
101 canopies are open, and thus coexist with arbuscular mycorrhizal and non-mycorrhizal herbs and
102 shrubs, whose roots are available for colonization: for example, *T. melanosporum* is a successional
103 species that colonizes trees at the early stages of forest colonization (Taschen *et al.*, 2015).

104 Moreover, the presence of *T. melanosporum* or *T. aestivum* mycelium is often recognizable because
105 of the so-called brûlé (Streiblova *et al.*, 2012), a zone where herbaceous and shrubby, non-ECM
106 plants are less abundant and smaller. Although enigmatic, the brûlé suggests physiological
107 interaction between fungi and non-ECM plants. On the one hand, an allelopathic role of inhibitory
108 volatile organic compounds produced by *Tuber* mycelia could be involved (Pacioni, 1991; Angelini
109 *et al.*, 2015), and *T. melanosporum* produces ethylene and auxin, which may affect root
110 development (Splivallo *et al.*, 2009). On the other hand, a more direct endophytic interaction in the
111 roots of non-ECM plants could shape the brûlé. Pioneering work using immuno-localization has
112 revealed *T. melanosporum* mycelium in unhealthy root tissues of two brûlé herbs, but with limited
113 resolution (Plattner & Hall, 1995). Considering healthy tissues, Gryndler *et al.* (2014) detected *T.*
114 *aestivum* by PCR on the roots of 14 non-ECM plants. Schneider-Maunoury *et al.* (2018) similarly
115 detected *T. melanosporum* on the roots of 90% of non-ECM plants growing on brûlés, but not
116 outside of brûlés. In the latter work, microsatellites showed that the roots harboured *T.*
117 *melanosporum* genotypes identical to those found on nearby ECM roots and ascocarps (see below).
118 Yet, the genetic identity of endophytic individuals and their link to ascocarp-forming ones is
119 unknown for *T. aestivum*.

120 For *T. melanosporum*, some non-ECM plant species are empirically considered beneficial to truffle
121 production (Martegoute & Courdeau, 2002; Olivier *et al.*, 2012; see Supplement S1 in Taschen *et*
122 *al.*, 2019), while some others reduce ECM colonization of host trees (Mamoun & Olivier, 1997;
123 Olivera *et al.*, 2011). Recently, a three-year long rhizotron experiment involving young *Quercus*
124 *ilex* trees inoculated (or not) with *T. melanosporum* and with (or without) non-ECM plants from six

125 species further supported direct interactions (Taschen *et al.*, 2019): *T. melanosporum* reduced the
126 growth and nutrition of non-ECM plants, and strongly inhibited germination of weed seeds in the
127 rhizotrons. Interestingly, the presence of non-ECM plants promoted the development of truffle
128 mycelium in the soil (Taschen *et al.*, 2019). Although this work did not investigate the actual
129 colonization of non-ECM plants, it suggests that interactions with *T. melanosporum* may contribute
130 to brûlé formation.

131 Finally, endophytism has another specific relevance in the framework of the particular reproduction
132 biology of *Tuber* spp., where edible ascocarps (the spore-bearing fruiting bodies) result from the
133 mating between two individuals (Le Tacon *et al.*, 2015; Selosse *et al.*, 2017). Although the genomes
134 reveal hermaphroditism (Martin *et al.*, 2010; Murat *et al.*, 2018), mating is only successful between
135 individuals of different mating types (Riccioni *et al.*, 2008), and a functional asymmetry exists
136 between sexual partners in *T. melanosporum* at least (Selosse *et al.*, 2013; Taschen *et al.*, 2016; De
137 la Varga *et al.*, 2017). The maternal individual forms the flesh and a link to surrounding trees
138 (Deveau *et al.*, 2019) that feeds the ascocarps, while the paternal individual (father) only contributes
139 by providing genes for the meiotic ascospores. Maternal individuals frequently occupy large areas,
140 are often perennial and ectomycorrhizal on nearby host trees (Rubini *et al.*, 2011; Murat *et al.*, 2013;
141 Le Tacon *et al.*, 2013, 2015). They are also detected in nearby non-ECM plants
142 (Schneider-Maunoury *et al.*, 2018). Conversely, paternal individuals are small, often annual, and
143 hitherto undetected on ECM roots (Taschen *et al.*, 2016; De la Varga *et al.*, 2017). This prompted
144 the hypothesis that they could be endophytic, but the search for their endophytic presence in the
145 year after ascocarp formation (*i.e.*, the spring following the ascocarp harvest; Schneider-Maunoury
146 *et al.*, 2018) failed to detect them. This is not a final answer since, considering the low survival of
147 most paternal individuals, their presence as endophytes should also be assessed in the spring before
148 mating.

149 We sought to characterize further endophytism in non-ECM plants for the economically relevant *T.*
150 *melanosporum* and *T. aestivum*, in four directions that deepen our knowledge of endophytism in *T.*
151 *melanosporum* and extend these features to the less studied *T. aestivum*. Firstly, more direct
152 morphological evidence of endophytism was sought by fluorescent *in situ* hybridization (FISH)
153 experiments on roots of non-ECM plants colonized by *T. melanosporum*. Secondly, considering the
154 paternal niche for *T. melanosporum*, we re-investigated the possibility that paternal individuals are
155 endophytic by sampling non-ECM plants before the harvest of ascocarps. Thirdly, the endophytism
156 of *T. aestivum* in non-ECM plants was characterized by PCR detection and NGS methods;
157 specifically, the genetic relationship between individuals forming ascocarps and endophytes was
158 assessed by microsatellites. Fourthly, we quantified the expression of *T. aestivum* genes within
159 non-ECM plant roots that were likely colonized endophytically.

160 **Materials & methods**

161

162 *Study sites and samples*

163 For *in situ* hybridization and the search for endophytism of paternal individuals in *T. melanosporum*,
164 ascocarps and non-ECM plants from brûlés were harvested in the experimental truffle-ground of
165 Rollainville (Lorraine, France) studied by De la Varga *et al.* (2017; Table 1). All ascocarps found
166 on the truffle-ground were harvested during the 2016-2017 and 2017-2018 winters. In mid-June
167 2017, two productive trees were chosen (A11 and F11 in Fig. 3 of De la Varga *et al.*, 2017). At the
168 base of these two trees, herbaceous non-ECM plants were harvested, when present, on each node of
169 a 1x1m grid with a 20-cm pitch, resulting in 40 plant individuals from 10 species for both FISH
170 studies and molecular typing. ECM root tips of *Corylus avellana* were also sampled, at each corner
171 and in the middle of the two grids, and tested by PCR with specific primers (see below). This
172 resulted in a total of 110 ascocarps, 32 ECM root tips and 40 non-ECM plants (Tables 1 and S1).

173 To search for endophytism and truffle gene expression in *T. aestivum*, ascocarps and non-ECM
174 plants were sampled in the truffle-ground of Daix (Burgundy, France) studied by Molinier *et al.*
175 (2015) and Splivallo *et al.* (2019; Table 1). No brûlé is visible on this truffle-ground. In autumn
176 2017, 33 herbaceous non-ECM plants from 7 species (Tables 1 and S1) were harvested to assess the
177 fungal community within their roots by NGS. In autumn 2018, 13 ascocarps were harvested and,
178 around each of them, non-ECM plants (2 to 10 depending on plant density; resulting in 60 plants
179 from 17 species; Tables 1 and S1). *T. aestivum* ECM roots were also sampled from nine *Corylus*
180 *avellana* trees, 2 m from the trunk. Three samples (*ca.* 100 mg) were snap-frozen and stored at -80°
181 C for genotyping and gene expression analysis from (i) each non-ECM plant root system, including
182 several roots, (ii) each ascocarp, and (iii) the three pools of *T. aestivum* ECM roots. All other
183 samples were stored after careful washing at -20°C, except these for FISH (see below).

184

185 *FISH detection of T. melanosporum in non-ECM plants*

186 To visualize *T. melanosporum* hyphae within non-ECM plant roots, we set up a FISH experiment.
187 Roots harvested in spring 2017 (Tables 1 and S1) were cut into three consecutive pieces: the 1-cm
188 central fragment was immediately put in 500 µL of fixation solution with paraformaldehyde (see
189 SM1.1 for detailed buffer compositions) and incubated overnight at 4°C to fix RNAs as described
190 by Bertaux *et al.* (2003). Then, it was rinsed three times in PBS 1X for 1 min before being
191 transferred into ethanol with PBS 1X (in 1:1 ratio) and kept at -20°C for further analyses. The two
192 flanking fragments were used for *T. melanosporum* detection by direct PCR (see below). Central
193 fragments for which *T. melanosporum* was positively detected in at least one of the two flanking
194 fragments were used for FISH. We used two probes: first, the universal probe Euk516 (Amann *et*

195 *al.*, 1990; see SM1.2 for probes sequences) targeting 18S rRNA sequences of eukaryotes coupled
196 with Cy3 dye (Thermo Fisher Scientific, USA), called here “Euk-Cy3”; second, a specific probe
197 targeting *T. melanosporum* ITS2 RNA designed based on the work of Paolucci *et al.* (1999) coupled
198 with AlexaFluor-633 dye (Thermo Fisher Scientific, USA) called here “Paol-633”. Fluorochromes
199 were chosen to minimize excitation of autofluorescence of the root and fungi. Preliminary tests of
200 the specificity of the Paol probe and optimization of the hybridization protocol are described in
201 SM1.3. Briefly, we first tested the specificity of the Paol probe coupled to AlexFluor-488 (probe
202 Paol-488; ThermoFisher Scientific, USA) on fixed mycelium of a pure culture of *T. melanosporum*
203 Mel28 as positive control, and on *T. brumale* ascocarps and mycelium of *T. magnatum* and
204 *Magnaporthe sp.* (Pezizomycota) as negative controls (Fig. S1). The overlap between root
205 autofluorescence and emission spectra of AlexFluor-488 prompted us to change the dye to
206 AlexaFluor-633 (probe Paol-633).

207 Root samples were cut into 2 mm-long fragments, themselves cut longitudinally into two pieces
208 with a razor blade. Ascocarps were cut into 30 μ m-thick slices with a vibratome VT1200S (Leica
209 Microsystems, France) after embedding in 4% agarose. Root, ascocarps and mycelium samples
210 were treated for 30 minutes with 20 μ L of lyticase (Sigma-Aldrich, Germany; SM1.1) to weaken
211 plant and fungal cell walls, dehydrated gradually in ethanol baths (50, 80 and 96% ethanol; 3 min
212 each), deposited on gelatine-coated glass slides (SM1.1) and covered by 8 μ L of hybridization
213 buffer (SM1.1) and 1 μ L of each probe, as in Antony-Babu *et al.* (2014). Negative controls without
214 probe were also prepared. Hybridization was allowed for 90 min at 46°C with a 35% formamide
215 stringency before two washing baths at 48°C for 30 min in saline buffer (see SM1.1 for buffer
216 composition and SM1.3 for protocol optimization). Samples were finally dried on a glass slide,
217 mounted in Citifluor (Citifluor Ltd, UK), covered with a thin observation slide, sealed with nail
218 polisher and conserved in the dark at 4°C.

219 Observations were made using spectral deconvolution mode on a LSM780 Axio Observer Z1 laser
220 scanning confocal microscope (LSCM, Carl Zeiss, Germany), equipped with 488, 561 and 633 nm
221 excitation lasers, DIC transmitted white light and T-PMT and GaAsp PMT detectors, coupled to
222 ZEN 2.1 lite black software (CarlZeiss, Germany). *Tuber melanosporum* mycelium and root
223 samples of each harvested species incubated without any probe during the hybridization stage were
224 used to define the autofluorescence emission spectrum of each species. *Tuber melanosporum*
225 mycelium slides marked with either the universal eukaryote probe or the truffle-specific probe were
226 used to define the emission spectra of each of these two probes in the specific tissues. Root samples
227 were then observed in spectral deconvolution mode to disentangle autofluorescence of the
228 mycelium and the root, and emission of each probe. Images were taken with a 40x 1.2 NA objective

229 using the Z stack function. Data visualization was performed by 2D maximum intensity projection
230 (ZEN 2.1 lite black software).

231

232 *DNA extraction*

233 DNA from ascocarp flesh (giving access to the maternal genotype) and from non-ECM plant roots
234 and leaves was extracted with the RED Extract-N-Amp kit (Sigma-Aldrich, Germany) following
235 the manufacturer's instructions. For the roots of non-ECM plants, the samples differed between
236 species: for *T. melanosporum*, where samples were also prepared to check for colonization before
237 FISH, 1 cm-long root fragments were used; for *T. aestivum*, for each plant, we assembled two pools
238 of 2 to 5 root fragments 1 cm in length (depending on their size). In all cases, only roots looking
239 healthy under the dissecting microscope were used. For ascocarps, additional DNA extractions of
240 bulk truffle spores (giving access to the maternal + paternal zygotic genotype) were performed
241 according to the protocol modified by Taschen *et al.* (2016) and De la Varga *et al.* (2017) from
242 Paolocci *et al.* (2006). Briefly, spores were first isolated from ascocarp by cutting thin slices of
243 frozen ascocarps above 4 mL of sterile water and allowing the spores to settle. Ascii and spores
244 were then crushed with steel beads in a TissueLyser (Qiagen, USA).

245

246 *PCR detection of Tuber spp. in non-ECM plant roots*

247 Non-ECM plant root fragments were carefully washed, surface-sterilized for 5 minutes in ethanol
248 and 15 seconds in sodium hypochlorite, and rinsed three times in sterile water as in
249 Schneider-Maunoury *et al.* (2018) to minimize superficial contaminants. *T. melanosporum* was
250 detected by direct PCR with primers MelF and MelR (Douet *et al.*, 2004) specific for this species'
251 internal transcribed spacer of ribosomal DNA (ITS), following the PCR protocol of
252 Schneider-Maunoury *et al.* (2018). *T. aestivum* was detected by direct PCR with the specific ITS
253 primers (Todesco *et al.*, 2019), TuITS1 (5'-ACCACAGCTGCGTACAATGCC-3') and TuITS4
254 (5'-GATCCGAGGTCAAACCTGACG-3').

255

256 *Microsatellite genotyping*

257 For *T. melanosporum*, samples of ascocarp flesh, spores and non-ECM plant roots harvested
258 between 2016 and 2018 (Table 1) were genotyped with 14 microsatellites (Murat *et al.*, 2011) and
259 the mating-type locus with primers p1/p2 and p19/p20 (Rubini *et al.*, 2011b) as in
260 Schneider-Maunoury *et al.* (2018). For *T. aestivum*, samples harvested in autumn 2018 (Table 1)
261 were genotyped with 11 microsatellites (Molinier *et al.*, 2013) and the mating-type locus with
262 primers aest-MAT-1f/aest-MAT1-1r and aest-MAT1-2f/aest-MAT1-2r (Molinier *et al.*, 2016), but
263 we finally excluded the locus *aest31*, which did not amplify in some samples. To confirm efficient

264 spore DNA extraction, spore genotypes were only considered when the two mating-type genes were
265 successfully amplified. Maternal genotypes are obtained from flesh DNA extractions, and paternal
266 genotypes are obtained by removing the maternal genotype from the spore genotype. All
267 microsatellite profiles were analyzed with GeneMapper Software (Applied Biosystems, USA). We
268 defined haploid multi-locus genotypes (MLGs) based on the mating-type and microsatellite loci,
269 and calculated the probability that MLGs found in more than one sample result from independent
270 events of sexual reproduction (P_{sex}) using GenClone v. 2.0 software (Arnaud-Haond and Belkhir,
271 2007).

272

273 *NGS sequencing*

274 We assessed the fungal community of the roots of 33 non-ECM plants harvested on the *T. aestivum*
275 truffle-ground in autumn 2017 (Tables 1 and S1). Root systems were carefully washed with sterile
276 water. One healthy-looking root per plant was chosen and cut into two consecutive 2-cm pieces; one
277 was surface-sterilized as in Schneider-Maunoury *et al.* (2018) and the other not. DNA was extracted
278 using the RED Extract-N-Amp kit (Sigma-Aldrich, Germany) following the manufacturer's
279 instructions, before assessment of the fungal community as in Schneider-Maunoury *et al.* (2018).
280 The ITS2 region was amplified with the ITS86-F/ITS4 primer pair. PCR products were purified
281 with NucleoMag NGS Clean-up (Macherey-Nagel, Germany), tagged with unique primers for each
282 sample, and sequenced on an Ion Torrent sequencer (Life Technologies, USA). Sequences were
283 processed using Qiime pipelines (Caporaso *et al.*, 2010) and homemade scripts, available from the
284 authors upon request (for details, see Schneider-Maunoury *et al.*, 2018). Based on fully sequenced
285 amplicons (containing both ITS86-F and ITS4 primers, trimmed with Cutadapt v1.4.1; Martin,
286 2011), a first reference database of OTUs (Operational Taxonomic Units) was built using the
287 SWARM algorithm (Mahé *et al.*, 2014). Singleton OTUs of the reference database were discarded,
288 as were chimeras detected with the UCHIME algorithm v.4.2.4 (Edgar *et al.*, 2011) against the
289 UNITE fungal reference database v.7 (Kõljalg *et al.*, 2013). Then, reads containing either ITS86-F
290 primer or ITS4 primer were extracted from the sequenced library, trimmed as above and clustered
291 into OTUs against the OTU-reference database previously built, using BLASTN (Altschul *et al.*,
292 1990) with a 97% similarity threshold. Taxonomic assignment was then obtained by comparing the
293 representative sequence of each OTU from the constructed reference database against the UNITE
294 fungal reference database v.7 using BLASTN. Non-fungal sequences (mostly spurious
295 amplification of plant ITS) were removed. Raw sequence reads are available in GenBank under
296 accession numbers XX-XX. A classical view of the ecology of each OTU (ectomycorrhizal, AM,
297 endophytic, pathogenic or saprobic) was obtained with the FUNGuild database (Nguyen *et al.*,
298 2016). Since no difference in trophic type distribution was observed between surface-sterilized and

299 unsterilized samples (paired Student's t test, $P > 0.05$; not shown), we therefore pooled all 66
300 samples for all further analyses.

301

302 *Assessment of T. aestivum gene expression by qPCR*

303 The root samples (non-ECM root systems and pools of *T. aestivum* ECM root tips, sampled in
304 autumn 2018 at Daix; Tables 1 and S1) and the *T. aestivum* ascocarps were crushed in liquid
305 nitrogen with a TissueLyser (Qiagen, USA) before RNA extraction with the RNeasy Plant Mini Kit
306 (Qiagen, USA), following the manufacturer's instructions. RNA were cleaned with the DNA-free™
307 DNA Removal Kit (ThermoFisher Scientific, USA) and quantified with a NanoDrop (ThermoFisher
308 Scientific, USA). The cDNA were synthesized using the iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad
309 Laboratories) following the manufacturer's instructions. Primers used as controls or for analysis had
310 efficiencies ranging between 90% and 110%. Four genes encoding proteins were selected at the
311 Joint Genome Institute website (<https://mycocosm.jgi.doe.gov/Tubae1/Tubae1.home.html>) to cover
312 contrasted functional activities. We performed qPCR on, namely (Table S2), a laccase (ProtID1261;
313 primers: forward, 5'-GCAGGAGGAAGTCACCATGT-3' and reverse,
314 5'-TAGCGACTTGCAGGAGAGTG-3'), a sugar transporter (ProtID2632;
315 5'-TCGTCCCCAAATCTCCCTAC-3' and 5'-GCCTGTTCTCCGCTTCTCTT-3'), a
316 glucose-methanol-choline oxidoreductase (ProtID202; 5'-TACCTACTCCACCGCCCTTT-3' and
317 5'-CAACCTGACCAACCGAGAGA-3') and a secreted protein (ProtID2614;
318 5'-GCGGATTGGAGGATGGAT-3' and 5'-GGTGAAAGCGTCGGGATT-3'). Gene expression
319 was normalized to the *T. aestivum* housekeeping gene encoding the ribosomal protein S3 (*RPS3*;
320 ProtID3238; 5'-TGGCATCTGCTCAATCTCAA and 5'-GCTAATTCGCGAGTGAAGAA-3');
321 no data was available for samples where this gene did not amplify (Table S2). The qPCR were run
322 using the 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems) with the following cycling parameters:
323 95°C for 3 min and then 40 cycles of 95°C for 30 s, 60°C for 1 min and 72°C for 30 s. A control
324 with no cDNA was run for each primer pair; analyses were also run on three pools of *ca.* 100 mg of
325 *T. melanosporum* ECM obtained from an inoculated *C. avellana* (Pépinière Naudet, Chéu, France),
326 first checked by PCR with specific primers.

327 **Results**

328

329 *FISH observation of T. melanosporum mycelium in non-ECM plant roots*

330 We screened for the presence of *T. melanosporum* on roots of the 40 plant individuals from
331 different species sampled at Rollainville (Tables 1 and S1). Two roots per plant were investigated
332 and cut into three consecutive 1-cm fragments before checking the presence of *T. melanosporum* on
333 the two distal ones by PCR with specific primers (keeping the central fragment for FISH). Detection
334 by PCR was positive on 37 out of the 160 flanking fragments (23%): 27 out of the 80 roots had at
335 least one positive fragment (34%), *i.e.* 21 out of 40 plant individuals (53%) and nine of the ten plant
336 species (Tables 2 and S1). For 17 plant individuals from four species (*Inula conyza*, *Medicago*
337 *lupulina*, *Melampyrum arvense* and a *Poaceae* sp.) with more than one positive detection, which
338 were likely well colonized, we observed the central fragments by confocal microscopy after
339 fluorescent *in situ* hybridization (FISH) labelling (putatively positive fragments; n=21). In addition,
340 12 other central fragments from the same species for which no *T. melanosporum* was detected in
341 both flanking fragments were used as negative controls (putatively negative fragments).

342 We successfully observed fungal hyphae in two thirds of the samples (21/33), either directly
343 (without probe) or after labelling with universal probe Euk-Cy3 (Figs. 1E and S2; this probe poorly
344 labelled the plant cytoplasm, because either the amount of cytoplasm was too limited due to large
345 vacuoles or our conditions did not sufficiently permeabilize the cell wall). Hyphae specifically
346 marked by the *T. melanosporum*-specific probe Paol-633 were observed in 43% of the putatively
347 positive fragments (9/21), from the four plant species (Figs. 1 and S2), and were clearly septate.
348 Unexpectedly, *T. melanosporum* was also observed in two of the 12 putatively negative fragments
349 (16.7%), from two different species (*M. lupulina* and *Poaceae* sp.), suggesting a patchy
350 colonization of the root systems. Some hyphae of other fungal species were labelled by Euk-Cy3
351 only (Figs. 1E and S2E,F). *T. melanosporum* hyphae occurred both on and within the roots, likely in
352 the apoplast between cells that were often lined by the hyphae and apparently intact (Fig. 1C-E).

353

354 *Endophytism in T. melanosporum is a maternal feature*

355 The 110 ascocarps, 32 ECM root tips and 37 positively detected non-ECM roots (Table 2)
356 recovered from Rollainville (Tables 1 and S1) were genotyped with the 14 microsatellites and the
357 mating-type gene. Genotyping was successful for the whole 2016-2017 ascocarp harvest (33
358 maternal and paternal genotypes), but only for 91% of maternal and 58% of paternal genotypes
359 from the 2017-2018 harvest. Genotyping was successful for only three ECM root tips and six
360 non-ECM plant fragments. To include as many samples as possible, we kept samples for which
361 eight microsatellite loci (*me02*, *me13*, *me14*, *tm1*, *tm16*, *tm21*, *tm241* and *tm269*) and the mating

362 type were successfully genotyped: these 20 ECM root tips, 15 non-ECM plant roots, 83 paternal
 363 and 103 maternal individuals (221 samples) clustered into 60 different MLGs. This number of
 364 MLGs is likely underestimated since some P_{sex} values were > 0.05 , so that the multiple occurrence
 365 of the same MLG might not represent the same genet. Whenever different roots from the same
 366 non-ECM plant were typed (n=4 plants), the same MLG was recovered, and a total of three MLGs
 367 occurred on non-ECM roots. One MLG was found only on non-ECM plant roots, one only on ECM
 368 root tips, and one was shared between non-ECM plant roots and ECM root tips (Fig. 2). The only
 369 MLG detected on vegetative and ascocarp samples simultaneously occurred on n=4 non-ECM
 370 plants and on one ECM root tip in summer 2017 and was found as maternal and paternal in,
 371 respectively, seven ascocarps and one ascocarp from the next winter (2017-2018; Fig. 2). Defined
 372 by only eight microsatellite loci, this MLG had $P_{sex}>0.05$. However, all samples presenting this
 373 MLG, but two non-ECM plants, were successfully genotyped for the 14 initial microsatellites and,
 374 based on this number of loci, still belonged to the same genotype with $P_{sex} < 0.02$. Thus, one
 375 genetic individual was maternal in seven ascocarps, paternal in one ascocarp, and occurred in at
 376 least one ECM and as an endophyte in at least two, if not four, non-ECM plants from the previous
 377 summer. None of the 63 exclusively paternal MLGs (from 75 ascocarps) were found on non-ECM
 378 plants, even in samplings from the previous spring.

379

380 *T. aestivum* is endophytic in non-ECM plants

381 The root fungal community of 33 non-ECM plant individuals collected in 2017 from Daix (Tables 1
 382 and S1) was assessed by ITS2 barcoding for two root samples per individual. The 4,227,267 fungal
 383 sequences obtained after quality filtering were grouped into 1768 OTUs. Considering only the
 384 OTUs representing $> 0.001\%$ of the total sequences (*i.e.* the 670 most abundant OTUs), 142 OTUs
 385 belonged to arbuscular mycorrhizal fungi (13.5% of all sequences). 40 OTUs were assigned to
 386 ECM taxa (6% of the OTUs, representing 6.7% of the sequences; Fig. 3) mostly from Tuberales
 387 (48% of all ECM sequences), Thelephoraceae (22.9%) and Sclerodermataceae (19%). 41 OTUs
 388 only identified at family level were assigned to the ‘Saprotroph-Symbiotroph’ guild by FUNGuild
 389 (6.1% of OTUs and 14.8% of the sequences), *i.e.* belonged to families containing saprotroph and
 390 ectomycorrhizal taxa (*e.g.* Cantharellales, Helotiales, Pezizaceae, Pyronemataceae,
 391 Thelephoraceae) or saprotroph and endophytic taxa (*e.g.* Mortierellaceae). The number of ECM
 392 taxa is therefore likely underestimated (Fig. 3B) in strictly ECM taxa.

393 Among the 40 ECM OTUs, 30% were assigned to *Tuber* spp. (10 OTUs assigned to *T. aestivum*,
 394 one to *T. brumale* and one to *T. rapaeodorum*; Fig. 3). *Tuber aestivum* represented 2.9% of all
 395 fungal sequences and 44.2% of the ECM sequences. Cumulating this analysis and the genotyping
 396 (see below), *T. aestivum* was detected in 50 plant individuals (out of 93) from 12 species and 9

397 families (Tables 2 and S1), including 11 arbuscular and one orchid mycorrhizal plant species. In all,
398 54.3% of the plant individuals and 51.6% of the samples were positively detected.

399

400 *Endophytism in T. aestivum is a maternal feature*

401 Genotyping of endophytic *T. aestivum* individuals was performed on the roots of 60 non-ECM
402 plants harvested in 2018 (Tables 1 and S1), on which the presence of *T. aestivum* was tested by
403 PCR with specific primers. Detection was positive on 25 of the 60 plant individuals (42%) and ten
404 of the 17 plant species (59%; Table 2). The positively detected roots were genotyped, together with
405 the 13 ascocarps, with the 11 tested microsatellites and mating-type gene. Genotyping was
406 successful for 11 maternal and paternal genotypes, and 11 non-ECM plant fragments. Discarding
407 one microsatellite allowed us to include one more maternal individual and one more root sample,
408 and this revealed 20 different MLGs across all samples, all with $P_{sex} < 0.01$. For ascocarps, the
409 analysis revealed 11 paternal genotypes (all occurring once) versus 8 maternal genotypes (*i.e.*,
410 respectively, a clonal diversity of 1 versus 0.64; Fig. 4). Seven out of 11 ascocarps were
411 homozygous for all microsatellite loci, and on average the high *Fis* (0.87) featured high inbreeding.
412 Among the 20 MLGs, five were found both as maternal individuals and in non-ECM plant roots
413 (Fig. 4), occurring in the ascocarp(s) closest to the colonized non-ECM plant. Four MLGs occurred
414 in non-ECM plants roots only, and of the eleven paternal MLGs none were found on non-ECM
415 plants.

416

417 *Gene expression in endophytic T. aestivum*

418 We only considered the 17 non-ECM root systems sampled in 2018 at Daix that were successfully
419 genotyped for all microsatellites, suggesting abundant *T. aestivum* colonization (Table S2). The
420 housekeeping *RPS3* genes was expressed in 12 of them (Table S2), which all also expressed the
421 laccase gene. The sugar transporter, glucose-methanol-choline oxidoreductase and secreted protein
422 genes were expressed in respectively eight, six and six non-ECM root systems (Table S2; Fig. 5).
423 The five genes were simultaneously expressed in the six plants that had the highest RNA extraction
424 yield (Table S2). All investigated genes were expressed in *T. aestivum* ECM root tips and ascocarps
425 (Fig. 5), revealing a similar or often higher expression than in non-ECM roots, whatever the gene.
426 Transcripts of the sugar transporter gene were more abundant in ECMs, while the other transcripts
427 were more abundant in ascocarps. None of the five genes were expressed in the different controls
428 (not shown), *i.e.* (i) three pools of *T. melanosporum* ECM root tips, and (ii) three non-ECM root
429 systems where *T. aestivum* was not detected (from *Dactylis glomerata*, *Hedera helix* and
430 *Taraxacum sp.*; Table SX1), suggesting that the expression did not result from amplification of
431 other root fungi.

433 Discussion

434

435 *From molecular to microscopic evidence of endophytism in Tuber spp.*

436 Molecular data has hitherto supported endophytism in *T. aestivum* (PCR detection; Gryndler *et al.*,
437 2014) and *T. melanosporum* (PCR detection and microsatellite genotyping; Schneider-Maunoury *et al.*,
438 2018). Although superficial disinfection of the samples and negative controls argues against
439 contamination in the field or lab (Schneider-Maunoury *et al.*, 2018), observations of *T.*
440 *melanosporum* hyphae in roots by FISH confirm endophytic growth, beyond a simple rhizoplane
441 colonization. The living status of endophytic hyphae is supported by the FISH labelling of
442 cytoplasmic ribosomes in *T. melanosporum*, and the expression of *T. aestivum* genes that supports
443 metabolic activity. Yet, a major pending issue is the fine-scale interaction between root cells and
444 *Tuber* spp. hyphae. Our pictures suggest that hyphae grow between the cells and thus often elongate
445 along the root axis. We have no evidence for colonization of dead tissues, and the fact that roots are
446 sometimes folded may result from manipulations. Many root endophytes do not entail or feed on
447 damaged cells, even if this is observed in the endophytic model *Serendipita* (= *Piriformospora*)
448 *indica*, which also colonizes dead cells (Weiß *et al.*, 2011; Zuccaro *et al.*, 2011). Cell reactions and
449 physiological state upon *Tuber* spp. colonization require more investigations by electron
450 microscopy or plant gene expression.

451 Our results differ at first glance from the immuno-localization of *T. melanosporum* in dead tissues
452 reported by Plattner and Hall (1995) or from the claim by Gryndler *et al.* (2013, 2014) of a location
453 in the decomposing cell layer of the rhizoplane (which was hypothesized by default because they
454 did not detect hyphae in healthy root tissues). We screened healthy looking roots under the
455 dissecting microscope and therefore cannot exclude colonization of dead tissues. We observed a
456 biotrophic interaction, at least.

457 *Tuber* endophytism is strictly limited to roots: no positive sample was detected in additional tests by
458 PCR with specific primers among randomly chosen shoots and leaves of non-ECM plants from this
459 study (n=20 plants for each *Tuber* species; data not shown: this attempt also provided an additional
460 internal control for the absence of lab contamination). *Tuber* joins the guild of endophytic fungi
461 (Rodriguez *et al.*, 2009; Hardoim *et al.*, 2015), which in some cases play important roles in host
462 physiology (*e.g.*, Selosse *et al.*, 2004; Newsham, 2011; Behie *et al.*, 2012; Alamaro *et al.*, 2017).
463 They fall into the 'Class 4' endophytes in the seminal typology by Rodriguez *et al.* (2009), but we
464 suspect that this category, covering all endophytes that colonize roots exclusively, now needs
465 subdivision in light of the emergent taxonomic biodiversity of these fungi, and of their diverse root
466 interactions (entailing cell death or not, penetrating the cell wall or not, present outside the root or
467 not, etc.).

468

469 *Host range of the interaction between Tuber spp. and non-ECM plants*

470 Together with Gryndler *et al.* (2014) and Schneider-Maunoury *et al.* (2018), we confirm the
471 presence of *T. aestivum* and *T. melanosporum* in 29 families throughout the Angiosperm phylogeny
472 (Table S3), suggesting a weakly specific interaction. This is reminiscent of the fact that the ECM
473 interactions of these species are also quite unspecific, while rather constrained by pedological
474 requirements (presence of limestone and dryness... ; Le Tacon, 2017; Zambonelli *et al.*, 2016). This
475 low specificity also features endophytism of ECM Serendipitaceae (Selosse *et al.*, 2009; Weiß *et*
476 *al.*, 2011, 2016).

477 Interestingly, the host range includes non-arbuscular mycorrhizal species from free-living and
478 plant-parasitic families (resp., Brassicaceae and Orobanchaceae; Brundrett & Tedersoo, 2018). Since
479 these families likely lost the genes required for arbuscular mycorrhizal colonization (Delaux *et al.*,
480 2014), the endophytic colonization of *Tuber* spp. does not use the same pathway as the arbuscular
481 mycorrhizal interaction. Orchids, which have their specific mycorrhizal type and partners, are also
482 colonized by *Tuber* spp., in agreement with an earlier report on *T. melanosporum* (Girlanda *et al.*,
483 2006). Some truffles were even found as true mycorrhizal fungi in the orchid genus *Epipactis*, such
484 as *T. aestivum* (with hyphae forming intracellular coils typical for this mycorrhizal interaction;
485 Selosse *et al.*, 2004) and other *Tuber* species (detected molecularly; e.g., Gonneau *et al.*, 2014;
486 Jacquemyn *et al.*, 2017; Schiebold *et al.*, 2017). Thus, we cannot fully exclude a true mycorrhizal
487 colonization in *Orchis anthropophora* (but see below for an alternative evolutionary interpretation).
488 *T. aestivum* and *T. melanosporum* are not very distant in the *Tuber* phylogeny despite 100 Myrs
489 divergence (Bonito *et al.*, 2013). Does endophytic behaviour exist in the > 180 other truffle species
490 worldwide? Our NGS approaches recovered *T. mesentericum* (Schneider-Maunoury *et al.*, 2018) as
491 well as *T. brumale* and *T. rapaeodorum* (Fig. 3). Since all these species belong to Clade IV *sensu*
492 Huang *et al.* (2009), the question of the exact range of endophytic *Tuber* species remains open; this
493 question is also pending for phylogenetically close ECM taxa, such as the genera *Helvella* and
494 *Balsamia* (Bonito *et al.*, 2013): noteworthy, we found one *Helvella* Cf. *elastica* as a potential
495 endophyte in Daix on *Hedera helix*, *Picris hieracioides* and *Solidago virgaurea*.

496 In the framework of the difficult domestication and production of truffles in truffle-grounds (Murat
497 2014; Taschen *et al.*, 2016; Dupont *et al.*, 2017), the non-ECM plants now offer testable factors to
498 add efficiency to the system, beyond empirical claims (Taschen *et al.*, 2019) and local experiments
499 (Mamoun & Olivier, 1997; Olivera *et al.*, 2011).

500

501 *Endophytism and biology of the non-ECM host*

502 Several observations suggest that *T. aestivum* and *T. melanosporum* affect plant physiology and
503 development: first, the brûlé phenomenon supports a difficult settlement and/or growth where *T.*
504 *aestivum* and *T. melanosporum* mycelium occurs *in natura*; second, rhizotron experiments with or
505 without *T. melanosporum* (Taschen *et al.*, 2019) have documented how non-ECM plants (i)
506 germinate less efficiently and (ii) when surviving, have lower leaf N and P in rhizotrons inoculated
507 with *T. melanosporum* as compared to uninoculated ones (Taschen *et al.*, 2019). Moreover, the
508 expression of a secreted protein gene (ProtID2632) at a similar level as in ECM root tips supports a
509 possibility to influence host tissue. It would be surprising if the endophytic colonization by *Tuber*
510 spp. did not belong to the causes of brûlé, although direct evidence and precise mechanisms are still
511 lacking.

512 Taschen *et al.* (2019) also document that, reciprocally, *T. melanosporum* develops better (higher
513 mycelial abundance) in rhizotrons with non-ECM plants. This questions whether endophytic
514 colonization provides some resources to the mycelium, ranging from sugar to vitamins. On the one
515 hand, endophytic mycelia are also ectomycorrhizal, and associated ECM trees provide resources (at
516 least maternal mycelia; see below); moreover, isotopic abundance for ^{13}C and ^{15}N in *Tuber* spp.
517 (Zeller *et al.*, 2008) and tree photosynthate labelling (Le Tacon *et al.*, 2013, 2015) support a largely
518 ECM nutrition. On the other hand, the isotopic value of biomass gained by endophytism varies from
519 one species to another (Selosse & Martos, 2014), due to different physiological interactions,
520 meaning that predictions of the value for biomass gained from non-ECM partners, if any, are
521 unsure. It is therefore difficult to draw firm conclusions regarding ^{13}C and ^{15}N abundances.
522 Furthermore, the expression of a gene encoding a sugar transporter (ProtID2614) makes sugar
523 transport possible (although the exact roles and levels of expression of the tested *T. aestivum* genes
524 should not be overstated, due to very limited amount of truffle mRNA recovered from non-ECM
525 roots: this amount is lower than in ECM root tips and ascocarps, where the hyphae are more
526 abundant). Studies of the whole *Tuber* transcriptome in non-ECM roots, from field samples or *ex*
527 *situ* material, are promising in analyzing the physiology of the fungus in the endophytic
528 environment.

529

530 *Endophytism and sexual dimorphism in Tuber spp.*

531 One specific feature of *Tuber* species is the sexual dimorphism displayed despite their potential for
532 hermaphroditism (sometimes realized: one individual in this study and a few others in De la Varga
533 *et al.*, 2017). Males are ephemeral, cover small areas, and are absent from surrounding ECM root
534 tips; female are more often perennial, spatially larger, and colonize surrounding ECM trees. These
535 features, together with high inbreeding, were demonstrated for *T. melanosporum* (Selosse *et al.*,

536 2013; Taschen *et al.*, 2016; De la Varga *et al.*, 2017), and possibly for *T. borchii* (Leonardi *et al.*,
537 2019): this study demonstrates that sexual dimorphism also applies to *T. aestivum*.

538 While females can be found as endophytes, males (with the exception of those displaying
539 hermaphroditic behaviour) are not detected on non-ECM plant roots, even when sampling roots
540 before the fruiting season. Of course, we cannot exclude that our results (due to the rate of
541 genotyping success or limited sampling) may not reveal them, or that sampling before the fruiting
542 season fatally affects the detected male genotypes; similarly, unhealthy roots were not tested. Yet,
543 the male individual niche is unlikely to encompass healthy roots, and endophytism on non-ECM
544 plants is associated with ECM colonization. Here again, whether this ecological dimorphism of
545 ascocarp parents extends to the whole genus *Tuber*, and even to related taxa, is unclear.

546

547 *Endophytism in other ECM fungi*

548 The finding of ECM fungi in roots of non-ECM plants dates back at least to the discovery of
549 *Boletus satanas* and *Xeromus chrysenteron* in *Arrhenatherum elatius* by cloning of PCR products
550 (Vandenkoornhuise *et al.*, 2002; see introduction for more recent reports). This fact is often
551 overlooked in explicit discussion, but is hard to believe it results from contamination (ECM fungi
552 do not sporulate very abundantly, or frequently). At least in *Tuber* spp., other evidence argues in
553 favour of a physiological relevance. We call for reporting (at least in supplementary material or data
554 bases) on the 'molecular scraps', *i.e.* the data whose relevance is discarded by experts from the
555 analyses (Selosse *et al.*, 2010). Indeed, our NGS approaches in this study and in
556 Schneider-Maunoury *et al.* (2018) recovered other ECM taxa as potential endophytes in and out of
557 brûlés, especially Thelephoraceae, Sebacinaceae, Sclerodermataceae and Inocybaceae in both
558 studies. FISH and other more direct analyses are now required for rigorous assessment of
559 endophytic colorizations in these taxa. Yet, many other ECM taxa are candidates for endophytism
560 in non-ECM plants.

561 Such a dual, ECM + endophytic interaction has been viewed as a persistence of the evolutionary
562 past of ECM fungi, if they evolved from endophytic species: in the so-called 'waiting room
563 hypothesis', endophytism is considered as a niche from which the tighter and more elaborated
564 mycorrhizal can evolve (Selosse *et al.*, 2009; van der Heijden *et al.*, 2015; Schneider-Maunoury *et al.*,
565 2018). Good evidence for this was gained from *e.g.* the Sebacinales (Basidiomycetes) which
566 evolved ericoid, orchid and ECM mycorrhizal interactions from endophytic ancestors (Weiß *et al.*,
567 2011). On the plant side, two recently evolved mycorrhizal interactions have recruited new
568 mycorrhizal partners among fungal taxa known to be endophytic in other plants, namely the
569 mycorrhizas in orchids with the so-called 'rhizoctonias' (Selosse & Martos, 2014), and ericoid
570 plants with Sebacinales and Helotiales (Weiß *et al.*, 2011). Additionally, a few orchid taxa have

571 secondarily replaced the usual fungal partners by ECM fungi (Selosse & Roy, 2009): one may
572 speculate that this was allowed by the ability of ECM fungi to occasionally colonize orchids as
573 endophytes (Shefferson *et al.*, 2005; Selosse *et al.*, 2010; Jacquemyn *et al.*, 2017; see *Orchis*
574 *anthropophora* in this study). One may indeed speculate that in the latter case, an ancestral
575 endophytism turned into true mycorrhizal interaction, e.g. the genus *Tuber* spp. in the genus
576 *Epipactis* (Selosse *et al.*, 2004; see references above). Yet, phylogenies support that ECM fungi
577 have evolved from soil saprotrophic fungi (Hess & Pringle, 2014; Kohler *et al.*, 2015), but (i) these
578 analyses did not consider endophytic species or status, and (ii) endophytism may just be the
579 intermediary step on the way from saprotrophic to ECM conditions. From this step, endophytism
580 may either secondarily disappear or persist in extant ECM species. Thus, even if direct evolution
581 from saprotrophic ancestors cannot be ruled out in some taxa, the endophytic abilities in some
582 others may be a remnant from a past evolutionary step.

583 Endophytism in ECM fungi enlarges the niche of at least some ECM fungi, which were too simply
584 viewed to interconnect ECM host plants only (Selosse *et al.*, 2018). Some ECM fungi also exploit
585 dead soil organic matter (Rineau *et al.*, 2013; Bödeker *et al.*, 2014) if not dead arthropods
586 (Klironomos & Hart, 2001; a trait reported in some root endophytes too: Behie *et al.*, 2012), and
587 some also colonize non-ECM plants. The interactions demonstrated on the co-culture of ECM trees,
588 non-ECM plants and *T. melanosporum* mycelium, reported by Taschen *et al.* (2019), support the
589 physiological relevance of the resulting network. This broader view revisits the classical view of
590 ectomycorrhizal networks, and opens them to other ecosystem compartments, if not to other
591 mycorrhizal networks when ECM fungi endophytically colonize orchid, ericoid or arbuscular
592 mycorrhizal plants.

593

594 *Outline*

595 *T. aestivum* and *T. melanosporum* colonize endophytically the roots of non-ECM plants in healthy
596 tissues, without evidence of cell penetration, and with gene expression suggesting metabolic
597 activity. This feature concerns mainly mycelia supporting the growth of ascocarps (maternal
598 individuals), but not the paternal individuals so far. Whether this explains the formation of brûlés
599 and whether this applies to (at least some) other ECM taxa, even not forming brûlés, are intriguing
600 perspectives to investigate. Yet, our findings potentially enlarge the range of interactions of the
601 ECM symbioses in ecosystems by linking the ECM fungi to many other, non-ECM partners.

602

603

604 **Acknowledgements**

605 We are grateful to Christophe Robin and Henri Frochot for giving us access to the Rollainville and
 606 Daix truffle-grounds respectively; Bethany Farrah, Jérôme Fromentin and Elie Grinfeder for
 607 good-natured help with field and/or lab work; and David Marsh for English editing. We thank the
 608 *Service de Systématique Moléculaire* (UMS 2700, MNHN, CNRS) for granting access to its
 609 technical platform. This work was supported by several sponsors of the team of M.-A. Selosse
 610 (including the Company Ovinalp, Val-Buech-Meouge, France), which we gratefully acknowledge.
 611 The laboratory of Aurélie Deveau and Claude Murat is supported by the French National Research
 612 Agency through the Laboratory of Excellence ARBRE [ANR-11-LABX-0002-01].
 613 Pierre-Emmanuel Courty gratefully acknowledges the European Agricultural Fund for Rural
 614 Development (BIJOU Project) and the Burgundy Franche-Comté Regional Council.

615

616 References

- 617 **Almario J, Jeena G, Wunder J, Langen G, Zuccaro A, Coupland G, Bucher M. 2017.** Root-associated fungal
 618 microbiota of nonmycorrhizal *Arabidopsis thaliana* and its contribution to plant phosphorus nutrition. *Proceedings of the*
 619 *National Academy of Sciences* **114**: E9403-E9412.
- 620 **Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990.** Basic local alignment search tool. *Journal of*
 621 *Molecular Biology* **215**: 403–410.
- 622 **Amann RI, Binder BJ, Olson RJ, Chisholm SW, Devereux R, Stahl DA. 1990.** Combination of 16S rRNA-targeted
 623 oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:
 624 1919–1925.
- 625 **Angelini P, Tirillini B, Properzi A, Rol C, Venanzoni R. 2015.** Identification and bioactivity of the growth inhibitors
 626 in *Tuber* spp. methanolic extracts. *Plant Biosystems* **149**: 1000–1009.
- 627 **Antony-Babu S, Deveau A, Nostrand JDV, Zhou J, Tacon FL, Robin C, Frey-Klett P, Uroz S. 2014.** Black
 628 truffle-associated bacterial communities during the development and maturation of *Tuber melanosporum* ascocarps and
 629 putative functional roles. *Environmental Microbiology* **16**: 2831–2847.
- 630 **Arnaud-Haond S, Belkhir K. 2007.** GENCLONE: a computer program to analyse genotypic data, test for clonality
 631 and describe spatial clonal organization. *Molecular Ecology Notes* **7**: 15–17.
- 632 **Behie SW, Zelisko PM, Bidochka MJ. 2012.** Endophytic insect-parasitic fungi translocate nitrogen directly from
 633 insects to plants. *Science* **336**: 1576–1577.
- 634 **Bertaux J, Schmid M, Prevost-Boure NC, Churin JL, Hartmann A, Garbaye J, Frey-Klett P. 2003.** In situ
 635 identification of intracellular bacteria related to *Paenibacillus* spp. in the mycelium of the ectomycorrhizal fungus
 636 *Laccaria bicolor*. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 4243–4248.
- 637 **Bödeker ITM, Clemmensen KE, Boer W de, Martin F, Olson Å, Lindahl BD. 2014.** Ectomycorrhizal *Cortinarius*
 638 species participate in enzymatic oxidation of humus in northern forest ecosystems. *New Phytologist* **203**: 245–256.
- 639 **Bonito G, Smith ME, Nowak M, Healy RA, Guevara G, Cázares E, Kinoshita A, Nouhra ER, Domínguez LS,
 640 Tedersoo L, et al. 2013.** Historical biogeography and diversification of truffles in the Tuberales and their newly
 641 identified southern hemisphere sister lineage (JE Stajich, Ed.). *PLoS ONE* **8**: e52765.
- 642 **Bougoure DS, Parkin PI, Cairney JWG, Alexander IJ, Anderson IC. 2007.** Diversity of fungi in hair roots of
 643 Ericaceae varies along a vegetation gradient. *Molecular Ecology* **16**: 4624–4636.
- 644 **Brundrett MC, Tedersoo L. 2018.** Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New*
 645 *Phytologist* **220**: 1108-1115.

- 646 **Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich**
647 **JK, Gordon JI, et al. 2010.** QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods* 7:
648 335–336.
- 649 **Chauvet E, Cornut J, Sridhar KR, Selosse M-A, Bärlocher F. 2016.** Beyond the water column: aquatic
650 hyphomycetes outside their preferred habitat. *Fungal Ecology* 19: 112–127.
- 651 **De la Varga H, Le Tacon F, Lagouet M, Todesco F, Varga T, Miquel I, Barry-Etienne D, Robin C, Halkett F,**
652 **Martin F, et al. 2017.** Five years investigation of female and male genotypes in périgord black truffle (*Tuber*
653 *melanosporum* Vittad.) revealed contrasted reproduction strategies. *Environmental Microbiology* 19: 2604–2615.
- 654 **Delaux P-M, Varala K, Edger PP, Coruzzi GM, Pires JC, Ané J-M. 2014.** Comparative phylogenomics uncovers
655 the impact of symbiotic associations on host genome evolution. *PLOS Genetics* 10: e1004487.
- 656 **Deveau A, Clowez P, Petit F, Maurice J-P, Todesco F, Murat C, Harroué M, Ruelle J, Le Tacon F. 2019.** New
657 insights into black truffle biology: discovery of the potential connecting structure between a *Tuber aestivum* ascocarp
658 and its host root. *Mycorrhiza* 29: 219–226.
- 659 **Dighton J, White JF. 2017.** *The fungal community: its organization and role in the ecosystem*. CRC Press, Rotterdam.
- 660 **Douet JP, Castroviejo M, Mabru D, Chevalier G, Dupré C, Bergougnoux F, Ricard JM, Médina B. 2004.** Rapid
661 molecular typing of *Tuber melanosporum*, *T. brumale* and *T. indicum* from tree seedlings and canned truffles.
662 *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 379: 668–673.
- 663 **Dupont J, Dequin S, Giraud T, Tacon FL, Marsit S, Ropars J, Richard F, Selosse M-A. 2017.** Fungi as a source of
664 food. *Microbiology Spectrum* 5: 1–22.
- 665 **Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R. 2011.** UCHIME improves sensitivity and speed of chimera
666 detection. *Bioinformatics* 27: 2194–2200.
- 667 **Girlanda M, Selosse MA, Cafasso D, Brilli F, Delfine S, Fabbian R, Ghignone S, Pinelli P, Segreto R, Loreto F, et**
668 **al. 2006.** Inefficient photosynthesis in the Mediterranean orchid *Limodorum abortivum* is mirrored by specific
669 association to ectomycorrhizal Russulaceae. *Molecular Ecology* 15: 491–504.
- 670 **Gonneau C, Jersáková J, Tredern E de, Till-Bottraud I, Saarinen K, Sauve M, Roy M, Hájek T, Selosse M-A.**
671 **2015.** Photosynthesis in perennial mixotrophic *Epipactis* spp. (Orchidaceae) contributes more to shoot and fruit biomass
672 than to hypogeous survival. *Journal of Ecology* 102: 1183–1194.
- 673 **Gryndler M, Černá L, Bukovská P, Hřelová H, Jansa J. 2014.** *Tuber aestivum* association with non-host roots.
674 *Mycorrhiza* 24: 603–610.
- 675 **Gryndler M, Trilčová J, Hřelová H, Streiblová E, Gryndlerová H, Jansa J. 2013.** *Tuber aestivum* Vittad.
676 mycelium quantified: advantages and limitations of a qPCR approach. *Mycorrhiza* 23: 341–348.
- 677 **Hansen K, Perry BA, Dranginis AW, Pfister DH.** A phylogeny of the highly diverse cup-fungus family
678 Pyronemataceae (Pezizomycetes, Ascomycota) clarifies relationships and evolution of selected life history traits.
679 *Molecular Phylogenetics and Evolution* 67: 311–335.
- 680 **Harrington TJ, Mitchell DT. 2002.** Colonization of root systems of *Carex flacca* and *C. pilulifera* by *Cortinarius*
681 (*Dermocybe*) *cinnamomeus*. *Mycological Research* 106: 452–459.
- 682 **Heijden MGA van der, Martin FM, Selosse M-A, Sanders IR. 2015.** Mycorrhizal ecology and evolution: the past,
683 the present, and the future. *New Phytologist* 205: 1406–1423.
- 684 **Hess J, Pringle A. 2014.** The natural histories of species and their genomes. *Advances in Botanical Research* 70:
685 235–257.
- 686 **Hibbett DS, Ohman A, Kirk PM. 2009.** Fungal ecology catches fire. *New Phytologist* 184: 279–282.
- 687 **Huang J-Y, Hu H-T, Shen W-C. 2009.** Phylogenetic study of two truffles, *Tuber formosanum* and *Tuber furfuraceum*,
688 identified from Taiwan. *FEMS Microbiology Letters* 294: 157–171.

- 689 **Jacquemyn H, Waud M, Brys R, Lallemand F, Courty P-E, Robionek A, Selosse M-A. 2017.** Mycorrhizal
690 associations and trophic modes in coexisting orchids: An ecological continuum between auto- and mixotrophy.
691 *Frontiers in Plant Science* **8**: 1497.
- 692 **Klironomos JN, Hart MM. 2001.** Animal nitrogen swap for plant carbon. *Nature* **410**: 651–652.
- 693 **Kohler A, Kuo A, Nagy LG, Morin E, Barry KW, Buscot F, Canbäck B, Choi C, Cichocki N, Clum A, et al. 2015.**
694 Convergent losses of decay mechanisms and rapid turnover of symbiosis genes in mycorrhizal mutualists. *Nature*
695 *Genetics* **47**: 410–415.
- 696 **Kõljalg U, Nilsson RH, Abarenkov K, Tedersoo L, Taylor AFS, Bahram M, Bates ST, Bruns TD,
697 Bengtsson-Palme J, Callaghan TM, et al. 2013.** Towards a unified paradigm for sequence-based identification of
698 fungi. *Molecular Ecology* **22**: 5271–5277.
- 699 **Le Tacon F. 2017.** *Les Truffes. Biologie, écologie et domestication*. AgroParisTech, Nancy.
- 700 **Le Tacon F, Zeller B, Plain C, Hossann C, Bréchet C, Martin F, Kohler A, Villerd J, Robin C. 2015.** Study of
701 nitrogen and carbon transfer from soil organic matter to *Tuber melanosporum* mycorrhizas and ascocarps using ¹⁵N and
702 ¹³C soil labelling and whole-genome oligoarrays. *Plant and Soil* **395**: 351–373.
- 703 **Le Tacon F, Zeller B, Plain C, Hossann C, Bréchet C, Robin C. 2013.** Carbon transfer from the host to *Tuber*
704 *melanosporum* mycorrhizas and ascocarps followed using a ¹³C pulse-labeling technique (P Shaw, Ed.). *PLoS ONE* **8**:
705 e64626.
- 706 **Leonardi P, Murat C, Puliga F, Iotti M, Zambonelli A. 2019.** Unravelling whitish truffle life cycle: paternal
707 genotypes correspond to recombinant of mycelium genotypes used for plants inoculation. *Environmental Microbiology*
708 in press.
- 709 **Lofgren LA, LeBlanc NR, Certano AK, Nachtigall J, LaBine KM, Riddle J, Broz K, Dong Y, Bethan B, Kafer
710 CW, et al. 2018.** *Fusarium graminearum*: pathogen or endophyte of North American grasses? *New Phytologist* **217**:
711 1203–1212.
- 712 **Mahé F, Rognes T, Quince C, Vargas C de, Dunthorn M. 2014.** Swarm: robust and fast clustering method for
713 amplicon-based studies. *PeerJ* **2**: e593.
- 714 **Mamoun M, Olivier JM. 1997.** Mycorrhizal inoculation of cloned hazels by *Tuber melanosporum*: effect of soil
715 disinfection and co-culture with *Festuca ovina*. *Plant and Soil* **188**: 221–226.
- 716 **Martegoute J-C, Courdeau A. 2002.** *Plantes des Causses et des truffières*. Fédération Départementale des
717 trufficulteurs du Périgord, Périgueux.
- 718 **Martin M. 2011.** Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* **17**:
719 10–12.
- 720 **Martin F, Kohler A, Murat C, Balestrini R, Coutinho PM, Jaillon O, Montanini B, Morin E, Noel B, Percudani
721 R, et al. 2010.** Périgord black truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis. *Nature* **464**:
722 1033–1038.
- 723 **Molinier V, Murat C, Morin E, Gollotte A, Wipf D, Martin F. 2013.** First identification of polymorphic
724 microsatellite markers in the Burgundy truffle, *Tuber aestivum* (Tuberaceae). *Applications in Plant Sciences* **1**:
725 1200220.
- 726 **Molinier V, Murat C, Peter M, Gollotte A, De la Varga H, Meier B, Egli S, Belfiori B, Paolocci F, Wipf D. 2016.**
727 SSR-based identification of genetic groups within European populations of *Tuber aestivum* Vittad. *Mycorrhiza* **26**:
728 99–110.
- 729 **Murat C. 2015.** Forty years of inoculating seedlings with truffle fungi: past and future perspectives. *Mycorrhiza* **25**:
730 77–81.
- 731 **Murat C, Kuo A, Barry KW, Clum A, Dockter RB, Fauchery L, Iotti M, Kohler A, LaButti K, Lindquist EA, et
732 al. 2018.** Draft genome sequence of *Tuber borchii* Vittad., a whitish edible truffle. *Genome Announcements* **6**.

- 733 **Murat C, Riccioni C, Belfiori B, Cichocki N, Labbé J, Morin E, Tisserant E, Paolocci F, Rubini A, Martin F.**
 734 **2011.** Distribution and localization of microsatellites in the Perigord black truffle genome and identification of new
 735 molecular markers. *Fungal Genetics and Biology* **48**: 592–601.
- 736 **Murat C, Rubini A, Riccioni C, De la Varga H, Akroume E, Belfiori B, Guaragno M, Le Tacon F, Robin C,**
 737 **Halkett F, et al. 2013.** Fine-scale spatial genetic structure of the black truffle (*Tuber melanosporum*) investigated with
 738 neutral microsatellites and functional mating type genes. *New Phytologist* **199**: 176–187.
- 739 **Murata H, Yamada A, Maruyama T, Endo N, Yamamoto K, Ohira T, Shimokawa T. 2013.** Root endophyte
 740 interaction between ectomycorrhizal basidiomycete *Tricholoma matsutake* and arbuscular mycorrhizal tree *Cedrela*
 741 *odorata*, allowing *in vitro* synthesis of rhizospheric “shiro”. *Mycorrhiza* **23**: 235–242.
- 742 **Murata H, Yamada A, Yokota S, Maruyama T, Endo N, Yamamoto K, Ohira T, Neda H. 2014.** Root endophyte
 743 symbiosis *in vitro* between the ectomycorrhizal basidiomycete *Tricholoma matsutake* and the arbuscular mycorrhizal
 744 plant *Prunus speciosa*. *Mycorrhiza* **24**: 315–321.
- 745 **Newsham KK. 2011.** A meta-analysis of plant responses to dark septate root endophytes. *New Phytologist* **190**:
 746 783–793.
- 747 **Nguyen NH, Song Z, Bates ST, Branco S, Tedersoo L, Menke J, Schilling JS, Kennedy PG. 2016.** FUNGuild: An
 748 open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild. *Fungal Ecology* **20**: 241–248.
- 749 **Nilsson RH, Anslan S, Bahram M, Wurzbacher C, Baldrian P, Tedersoo L. 2019.** Mycobiome diversity:
 750 high-throughput sequencing and identification of fungi. *Nature Reviews Microbiology* **17**: 95–109.
- 751 **Olivera A, Fischer CR, Bonet JA, Martínez de Aragón J, Oliach D, Colinas C. 2011.** Weed management and
 752 irrigation are key treatments in emerging black truffle (*Tuber melanosporum*) cultivation. *New Forests* **42**: 227–239.
- 753 **Olivier JM. 2000.** Progress in the cultivation of truffles. In: Science and Cultivation of Edible Fungi. CRC Press,
 754 Rotterdam.
- 755 **Pacioni G. 1991.** Effects of *Tuber* metabolites on the rhizospheric environment. *Mycological Research* **95**: 1355–1358.
- 756 **Paolocci F, Rubini A, Granetti B, Arcioni S. 1999.** Rapid molecular approach for a reliable identification of *Tuber*
 757 *spp.* ectomycorrhizae. *FEMS Microbiology Ecology* **28**: 23–30.
- 758 **Paolocci F, Rubini A, Riccioni C, Arcioni S. 2006.** Reevaluation of the life cycle of *Tuber magnatum*. *Applied and*
 759 *Environmental Microbiology* **72**: 2390–2393.
- 760 **Plattner I, Hall IR. 1995.** Parasitism of non-host plants by the mycorrhizal fungus *Tuber melanosporum*. *Mycological*
 761 *Research* **99**: 1367–1370.
- 762 **Riccioni C, Belfiori B, Rubini A, Passeri V, Arcioni S, Paolocci F. 2008.** *Tuber melanosporum* outcrosses: analysis
 763 of the genetic diversity within and among its natural populations under this new scenario. *New Phytologist* **180**:
 764 466–478.
- 765 **Rineau F, Shah F, Smits MM, Persson P, Johansson T, Carleer R, Troein C, Tunlid A. 2013.** Carbon availability
 766 triggers the decomposition of plant litter and assimilation of nitrogen by an ectomycorrhizal fungus. *The ISME Journal*
 767 **7**: 2010–2022.
- 768 **Rodriguez RJ, Jr JFW, Arnold AE, Redman RS. 2009.** Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New*
 769 *Phytologist* **182**: 314–330.
- 770 **Rubini A, Belfiori B, Riccioni C, Arcioni S, Martin F, Paolocci F. 2011a.** *Tuber melanosporum*: mating type
 771 distribution in a natural plantation and dynamics of strains of different mating types on the roots of nursery-inoculated
 772 host plants. *New Phytologist* **189**: 723–735.
- 773 **Rubini A, Belfiori B, Riccioni C, Tisserant E, Arcioni S, Martin F, Paolocci F. 2011b.** Isolation and characterization
 774 of MAT genes in the symbiotic ascomycete *Tuber melanosporum*. *New Phytologist* **189**: 710–722.
- 775 **Schiebold JM-I, Bidartondo MI, Karasch P, Gravendeel B, Gebauer G. 2017.** You are what you get from your
 776 fungi: nitrogen stable isotope patterns in *Epipactis* species. *Annals of Botany* **119**: 1085–1095.

- 777 **Schneider-Maunoury L, Leclercq S, Clément C, Covès H, Lambourdière J, Sauve M, Richard F, Selosse M-A,**
 778 **Taschen E. 2018.** Is *Tuber melanosporum* colonizing the roots of herbaceous, non-ectomycorrhizal plants? *Fungal*
 779 *Ecology* **31**: 59–68.
- 780 **Selosse M-A, Dubois M-P, Alvarez N. 2009.** Do Sebaciales commonly associate with plant roots as endophytes?
 781 *Mycological Research* **113**: 1062–1069.
- 782 **Selosse M-A, Faccio A, Scappaticci G, Bonfante P. 2004.** Chlorophyllous and achlorophyllous specimens of
 783 *Epipactis microphylla* (Neottieae, Orchidaceae) are associated with ectomycorrhizal Septomycetes, including truffles.
 784 *Microbial Ecology* **47**.
- 785 **Selosse M-A, Martos F. 2014.** Do chlorophyllous orchids heterotrophically use mycorrhizal fungal carbon? *Trends in*
 786 *Plant Science* **19**: 683–685.
- 787 **Selosse M-A, Martos F, Perry BA, Padamsee M, Roy M, Paillet T. 2010.** Saprotrophic fungal mycorrhizal
 788 symbionts in achlorophyllous orchids. *Plant Signaling & Behavior* **5**: 1–5.
- 789 **Selosse M-A, Roy M. 2009.** Green plants that feed on fungi: facts and questions about mixotrophy. *Trends in Plant*
 790 *Science* **14**: 64–70.
- 791 **Selosse M-A, Schneider-Maunoury L, Martos F. 2018.** Time to re-think fungal ecology? Fungal ecological niches are
 792 often prejudged. *New Phytologist* **217**: 968–972.
- 793 **Selosse M-A, Schneider-Maunoury L, Taschen E, Rousset F, Richard F. 2017.** Black truffle, a hermaphrodite with
 794 forced unisexual behaviour. *Trends in Microbiology* **25**: 784–787.
- 795 **Selosse M-A, Taschen E, Giraud T. 2013.** Do black truffles avoid sexual harassment by linking mating type and
 796 vegetative incompatibility? *New Phytologist* **199**: 10–13.
- 797 **Shefferson RP, WEIß M, Kull T, Taylor DL. 2005.** High specificity generally characterizes mycorrhizal association
 798 in rare lady's slipper orchids, genus *Cypripedium*. *Molecular Ecology* **14**: 613–626.
- 799 **Smith SE, Read D. 2008.** *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, London.
- 800 **Splivallo R, Fischer U, Göbel C, Feussner I, Karlovsky P. 2009.** Truffles regulate plant root morphogenesis via the
 801 production of auxin and ethylene. *Plant Physiology* **150**: 2018–2029.
- 802 **Splivallo R, Vahdatzadeh M, Maciá-Vicente JG, Molinier V, Peter M, Egli S, Uroz S, Paolucci F, Deveau A.**
 803 2019. Orchard conditions and fruiting body characteristics drive the microbiome of the Black Truffle *Tuber aestivum*.
 804 *Frontiers in Microbiology* **10**: 1437.
- 805 **Streiblová E, Gryndlerová H, Gryndler M. 2012.** Truffle brûlé: an efficient fungal life strategy. *FEMS Microbiology*
 806 *Ecology* **80**: 1–8.
- 807 **Taschen E, Rousset F, Sauve M, Benoit L, Dubois M-P, Richard F, Selosse M-A. 2016.** How the truffle got its
 808 mate: insights from genetic structure in spontaneous and planted Mediterranean populations of *Tuber melanosporum*.
 809 *Molecular Ecology* **25**: 5611–5627.
- 810 **Taschen E, Sauve M, Taudiere A, Parlade J, Selosse M-A, Richard F. 2015.** Whose truffle is this? Distribution
 811 patterns of ectomycorrhizal fungal diversity in *Tuber melanosporum* brûlés developed in multi-host Mediterranean plant
 812 communities. *Environmental Microbiology* **17**: 2747–2761.
- 813 **Taschen E, Sauve M, Vincent B, Parlade J, van Tuinen D, Aumeeruddy-Thomas Y, Assenat B, Selosse M-A,**
 814 **Richard F. 2019.** Insight into the truffle brûlé: tripartite interactions between the black truffle (*Tuber melanosporum*),
 815 holm oak (*Quercus ilex*) and arbuscular mycorrhizal plants. *Plant and Soil* in revision.
- 816 **Todesco F, Belmonto S, Guignet Y, Laurent L, Fizzala S, Le Tacon F, Murat C. 2019.** Soil temperature and hydric
 817 potential influences the monthly variations of soil *Tuber aestivum* DNA in a highly productive orchard. *Scientific*
 818 *Reports* **9**: 12964.
- 819 **Toju H, Sato H. 2018.** Root-associated fungi shared between arbuscular mycorrhizal and ectomycorrhizal conifers in a
 820 temperate forest. *Frontiers in Microbiology* **9**: 433.

- 821 **Vandenkoornhuyse P, Baldauf SL, Leyval C, Straczek J, Young JPW. 2002.** Extensive fungal diversity in plant
822 roots. *Science* **295**: 2051.
- 823 **Wang Z, Johnston PR, Takamatsu S, Spatafora JW, Hibbett DS. 2006.** Toward a phylogenetic classification of the
824 Leotiomyces based on rDNA data. *Mycologia* **98**: 1065–1075.
- 825 **WeiB M, Sýkorová Z, Garnica S, Riess K, Martos F, Krause C, Oberwinkler F, Bauer R, Redecker D. 2011.**
826 Sebacinale everywhere: previously overlooked ubiquitous fungal endophytes. *PLoS ONE* **6**: e16793.
- 827 **WeiB M, Waller F, Zuccaro A, Selsos M-A. 2016.** Sebacinale - one thousand and one interactions with land plants.
828 *New Phytologist* **211**: 20–40.
- 829 **Wilson D. 1995.** Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos* **73**: 274–276.
- 830 **Zambonelli A, Iotti M, Murat C. 2016.** *True truffle (Tuber spp.) in the world: soil ecology, systematics and*
831 *biochemistry*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- 832 **Zeller B, Bréchet C, Maurice J-P, Tacon F. 2008.** Saprotrophic versus symbiotic strategy during truffle ascocarp
833 development under holm oak. A response based on ¹³C and ¹⁵N natural abundance. *Annals of Forest Science* **65**:
834 607–607.
- 835 **Zuccaro A, Lahrmann U, Guldener U, Langen G, Pfiffi S, Biedenkopf D, Wong P, Samans B, Grimm C,**
836 **Basiewicz M, et al. 2011.** Endophytic life strategies decoded by genome and transcriptome analyses of the mutualistic
837 root symbiont *Piriformospora indica*. *PLOS Pathogens* **7**: e1002290.

838

839

840

841

842 **Supporting information**

843

844 **Figure S1.** Specificity tests of probe Paol-488 combined with probe Euk-Cy3 as a control of
845 hybridization success.

846 **Figure S2.** Several controls of FISH on root samples with the *T. melanosporum*-specific probe
847 Paol-633 and the eukaryotic Euk-Cy3 probe.

848

849 **Table S1.** Detailed results on the presence of *Tuber* spp. on-ECM plants investigated by PCR using
850 specific primers.

851 **Table S2.** Samples used for detection of expression of *T. aestivum* genes.

852 **Table S3.** List of non-ECM plant families for which *Tuber* sequences have been found in this study
853 and others.

854

855 **Supplement Material 1.** FISH protocols and controls.

857

858 **Figure captions**

859

860 **Figure 1.** Observation of non-ECM plant roots by confocal microscopy after *in situ* hybridization
861 (FISH) with the *Tuber melanosporum*-specific probe Paol-633 (red) and the eukaryotic Euk-Cy3
862 probe (green; co-localization of both probes is orange-yellow). Bars: 20 μ m. **A** and **B**, *Poaceae*
863 *sp.* 1 colonized by *T. melanosporum* (white arrows). **C**, 2D-projection of a *Medicago lupulina*
864 sample. **D**, putatively positive root sample (e.g. *T. melanosporum* detected by PCR in flanking
865 fragments) of *Medicago lupulina* without any probe, colonized by septate hyphae
866 (black arrow heads). **E**, putatively positive root sample of *Melampyrum arvense* colonized by thin
867 non-*T. melanosporum* hyphae (green) and *T. melanosporum* hyphae (red).

868

869 **Figure 2.** Map of the *T. melanosporum* MLGs found as maternal or paternal individuals in
870 ascocarps (**A**, in winter 2016-17; **B**, in winter 2017-18), in non-ECM plants and in ECM root tips in
871 the Rollainville truffle-ground. The lower panel in **A** and **B** is a detail around tree A11 (crosses
872 indicate tree positions with names as in De la Varga *et al.*, 2017). For ascocarps, the largest circle in
873 the background indicates the maternal MLG while the smaller, overlapping one corresponds to
874 paternal MLG. Non-ECM plants are localized by squares and ECM root tips by triangles. Grey
875 shapes indicate that genotyping failed despite detection of *T. melanosporum*; empty shapes indicate
876 that *T. melanosporum* was not detected. Colours of shapes indicate MLG identity (two colours in a
877 square indicate that different MLGs were found on different roots from the same non-ECM plant).
878 Dotted grid delineates 1x1m squares.

879

880 **Figure 3.** Barcoding of fungal community of roots of non-ECM plants harvested in *Tuber aestivum*
881 brûlés (see Table S1 for plants involved), in proportion to the total number of identified OTUs. **A**,
882 total community based on trophic types. 'Saprotroph-Symbiotroph' trophic type includes taxa
883 identified at family level only, in families that include saprotroph and ectomycorrhizal species, so
884 that the total number of ECM OTUs is likely underestimated. **B**, ectomycorrhizal fungal families
885 recovered, with a focus on *Tuber* species.

886

887 **Figure 4.** Map of the *T. aestivum* MLGs found as maternal or paternal individuals in ascocarps and
888 in non-ECM plants in the Daix truffle-ground. For ascocarps, the largest circle in the background
889 indicates the maternal MLGs while the smaller, overlapping one corresponds to paternal MLGs.
890 Non-ECM plants are localized by squares. Grey shapes indicate that genotyping failed despite
891 detection of *T. aestivum*; empty shapes indicate that *T. aestivum* was not detected. Colours of shapes

892 indicate MLG identity (two colours in a square indicate that different MLGs were found on
893 different roots from the same non-ECM plant). Tree positions are indicated with different labels
894 according to the species. Axes are calibrated in metres.

895

896 **Figure 5.** Quantification by qRT-PCR of the transcript abundance of *T. aestivum* genes in different
897 tissues collected *in situ*: **A**, a laccase (ProtID1261); **B**, a sugar transporter (ProtID2632); **C**,
898 glucose-methanol-choline oxidoreductase (ProtID2632); **D**, a secreted protein (ProtID2614). RPS3
899 was used as the reference transcript. Endo, non-ECM plant roots where *T. aestivum* was detected
900 (n=12, see names in Table S1); Asco, ascocarp of *T. aestivum* (n=3); ECM, ECM root tips of *T.*
901 *aestivum* on *C. avellana* (n=3). Error bars represent standard deviations; in each panel, different
902 letters indicate significantly different expression according to one-way ANOVA (Scheffe's F-test;
903 P<0.05).

For Peer Review

905 **Table 1.** Sampling design and analyses

906

<i>Tuber</i> species and site	Type of sample	Date of sampling	Analyses
<i>T. melanosporum</i>	33 ascocarps	Winter 2016-2017	Genotyping
Rollainville truffleground 48.36 N, 5.74 E	40 non-ECM plants ^a	Summer 2017	Genotyping + FISH on roots
	32 ECM root tips	Summer 2017	Genotyping
	77 ascocarps	Winter 2017-2018	Genotyping
<i>T. aestivum</i>	33 non-ECM plants ^a	Autumn 2017	Barcoding of the root fungal community
Daix truffleground 47.35 N, 5.00 E	13 ascocarps	Autumn 2018	Genotyping + gene expression
	9 ECM root tips	Autumn 2018	Gene expression
	60 non-ECM plants ^a	Autumn 2018	Genotyping + gene expression

907 ^a for names of the non-ECM plants, see Table S1

908

909 **Table 2.** Non-ECM plants investigated in this study for presence of *Tuber* sp. by PCR using either
 910 specific primers for *T. melanosporum* or *T. aestivum* (harvests for genotyping) or fungal primers
 911 (for NGS sequencing), depending on the species cultivated in the respective truffle-ground.
 912 Positively detected species are in bold; see Table S1 for a detailed report on each repetition of the
 913 analyses. Non-AM species are underlined (*M. arvense* is non-mycorrhizal; *O. anthropophora* is
 914 associated with orchid mycorrhizal fungi).

915

Harvest	Plants names ^a
<i>Tuber melanosporum</i> truffle-ground ; Summer 2017 harvest (for genotyping)	<i>Achillea millefolium</i> [4], <i>Crataegus monogyna</i> , <i>Galium album</i> [4], <i>Inula conyza</i> [18], <i>Jacobaea vulgaris</i> [5], <i>Linum catarticum</i> , <i>Medicago lupulina</i> [2], <i>Melampyrum arvense</i> [3], <i>Origanum vulgare</i> [4], <i>Prunus spinosa</i> , <i>Sanguisorba minor</i> [2], Poaceae sp. 1 [10], Poaceae sp. 2 , <i>Vicia disperma</i> .
Daix <i>Tuber aestivum</i> truffle-ground Autumn 2017 harvest (for NGS barcoding)	<i>Dactylis glomerata</i> [12], <i>Geranium robertianum</i> [4], <i>Hedera helix</i> [6], <i>Orchis anthropophora</i> [2], <i>Picris hieracioides</i> [8], <i>Solidago</i> <i>virgaurea</i> , <i>Vicia sativa</i> [3]
Daix <i>Tuber aestivum</i> truffle-ground Autumn 2018 harvest (for genotyping)	<i>Cornus sanguinea</i> [2], <i>Dactylis glomerata</i> [13], <i>Elymus</i> sp. [6], <i>Epilobium hirsutum</i> , <i>Geranium robertianum</i> [2], <i>Geum aleppicum</i> [6], <i>Hedera helix</i> [6], <i>Medicago lupulina</i> , <i>Orchis anthropophora</i> [2], <i>Pastinaca sativa</i> [2], <i>Solidago virgaurea</i> [8], <i>Taraxacum</i> sp. [5], <i>Verbascum macrocarpum</i> , <i>Vicia sativa</i> .

916 ^a under brackets, number of individuals whenever more than one was sampled.

Figure 1

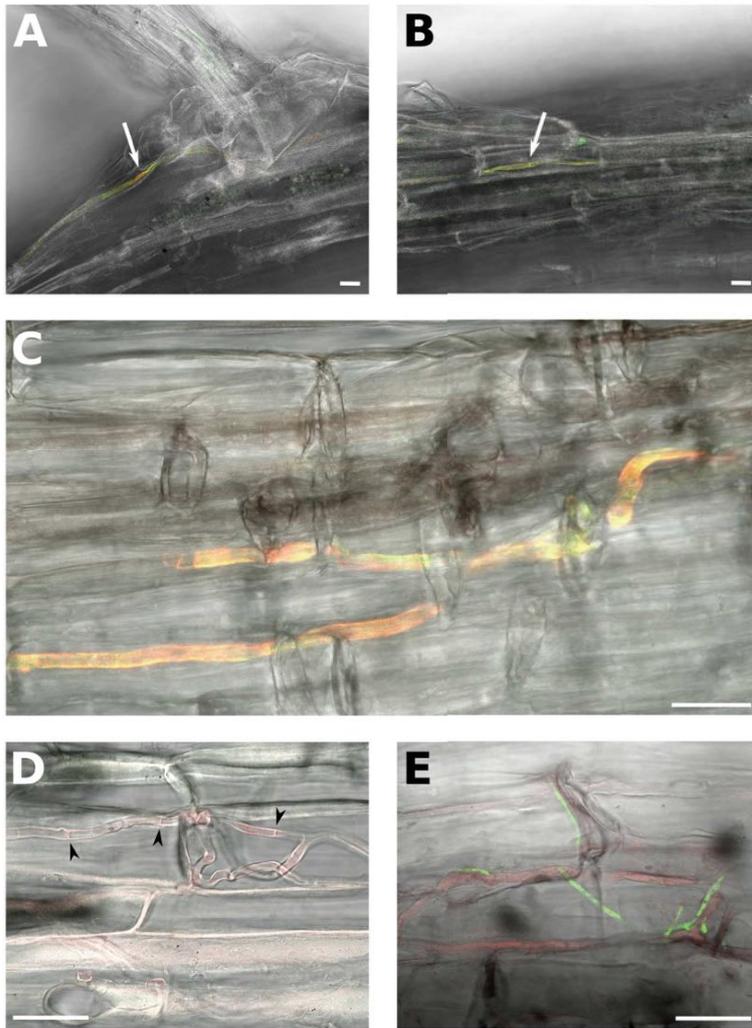


Figure 2

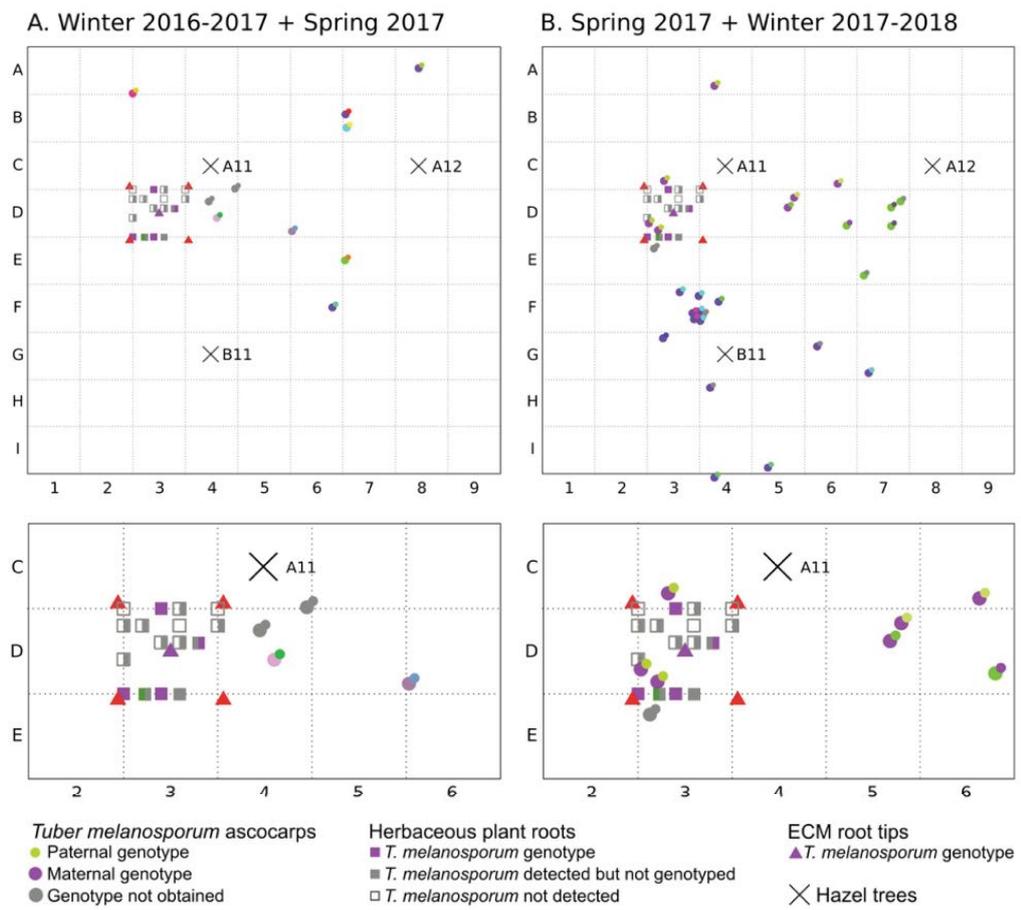
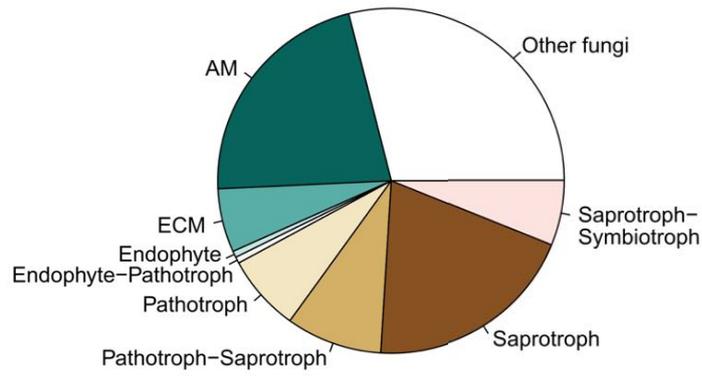


Figure 3

A. Trophic types among the 670 OTUs



B. Ectomycorrhizal families (40 OTUs)

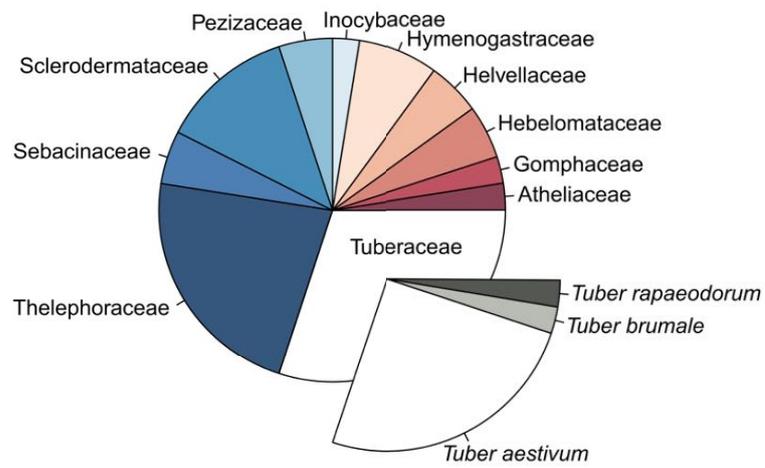


Figure 4

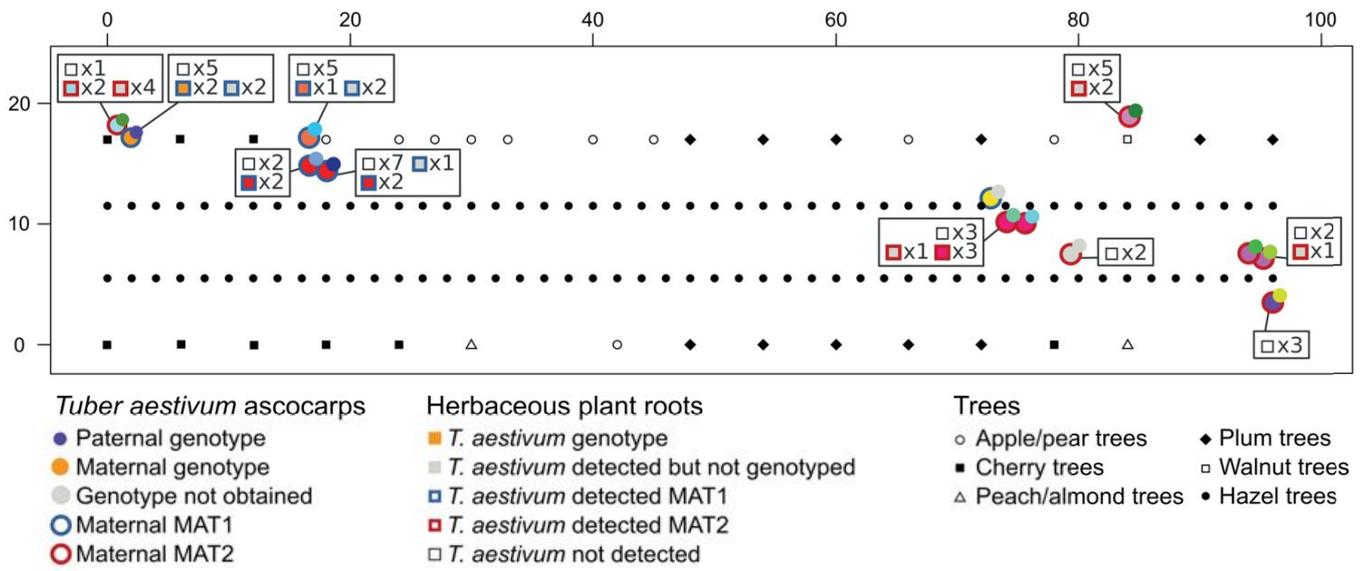
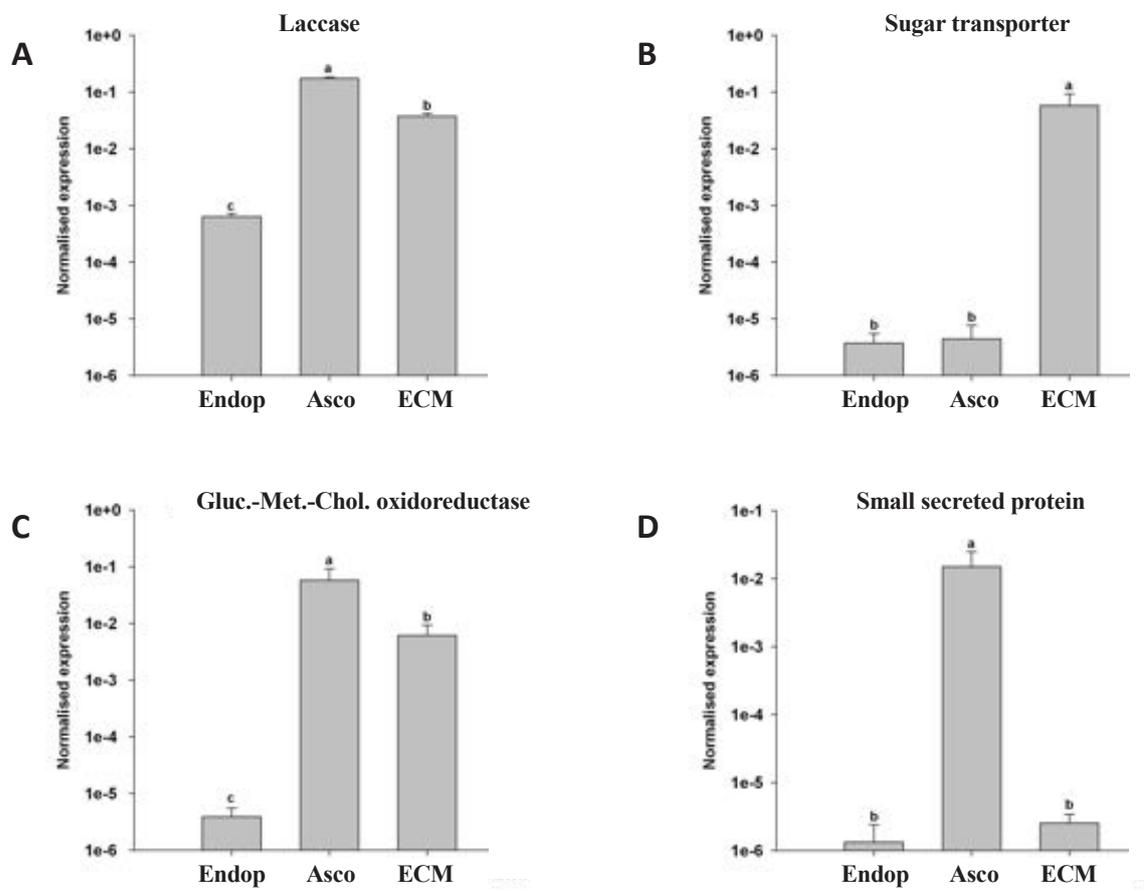


Figure 5



1 Supplement Material 1. FISH protocols and controls.

2 SM1-1. Solution compositions.

Solution	Composition
Fixation buffer	3% paraformaldehyde (PFA) – 1X phosphate buffer saline pH 7.2 (PBS – 130 mM NaCl, 7 mM Na ₂ HPO ₄ , 3 mM NaH ₂ PO ₄) 3:1
Sample storage	ethanol – PBS 1X 1:1
Slide gelatin-coating buffer	0.075% gelatin – 0.01 % CrK(SO ₄) ₂
Lyticase	15mg/mL lyticase in 100mM Tris buffer
Hybridization buffer (for one slide)	NaCl 5M: 360μL TrisHCl pH 8 1M: 40μL H ₂ O: 400-900μL according to formamide stringency (suitable quantity to reach 2mL) Formamide: 700μL (35%) to 1200μL (60%) SDS 10%: 2μL
Washing buffer (for one slide)	TrisHCl pH 8 1M: 1mL EDTA: 500μL NaCl: 40-700μL H ₂ O: suitable quantity to reach 50mL SDS 10%: 50μL

3

4 SM1-2. Probes sequences.

Probe	Target	Sequence	Fluorophore	Reference
Euk516	Eucaryotes 18S rRNA	5'-ACCAGACTTGCCCTCC-3'	Cy3	Amann <i>et al.</i> , 1990
Paol	<i>T. melanosporum</i> ITS2	5'-TGGCCATGTGTCAGATTTAGTA-3'	AlexaFluor 488 or 633	Paolocci <i>et al.</i> , 1999
revPaol	<i>T. melanosporum</i> ITS2	5'-ATGATTTAGACTGTGTACCGGT-3'	AlexaFluor 488	this work
MAT1	<i>T. melanosporum</i> MAT1	5'-CAATCTCACTCGTGATGTCTGGGTC-3'	AlexaFluor 488	Rubini <i>et al.</i> , 2011
MAT2	<i>T. melanosporum</i> MAT2	5'-CAGGTCCGTCATCTCCTTCCAGCAG-3' (p1)	AlexaFluor 488	Rubini <i>et al.</i> , 2011

5

6 SM1-3. Test of probes' specificity and optimization of hybridization protocol.

7 The specificity of probe Paol was tested by hybridizing Paol-488 with mycelium of *T.*
8 *melanosporum*, *T. magnatum* and *Magnaporthe* sp. (Pezizomycotina, Sordariomycete) and tissue sections of
9 ascocarps of *T. brumale* (Fig. S1). An absence of signal was expected for all samples except *T.*
10 *melanosporum*. In each case, the universal probe Euk-Cy3 was used to verify that the absence of signal was
11 due to an absence of binding of the probe Paol-488 and not to a technical issue during the hybridization
12 process. An anti-sens probe (revPaol-488; SM1-2) was also used to check for aspecific binding of probe
13 Paol-488. We also tested two probes targeting *T. melanosporum* mating-type genes (probes MAT1-488 and
14 MAT2-488; SM1-2) but these did not give any results (data not shown).

15 Mycelium autofluorescence spectrum was defined with mycelium incubated without any probe. The
16 emission spectra of each probe were defined with mycelium incubated with one probe at a time. Emission
17 gain was adjusted to have no signal in the *T. melanosporum* negative control without probe and maximum
18 signal on positive control (*T. melanosporum* with Paol-633). Gain then was then kept constant for all
19 imaging.

20 Additional optimizations were performed on the parameters of the hybridization protocol to adjust
21 formamide stringency (35, 40, 50 and 60%), temperature of incubation (46°C and 50°C) and duration of
22 washing time. In each case, the parameter giving the best intensity signal in the positive control combined to
23 an absence of signal in negative controls was considered as the optimal parameter. Best results were obtained
24 with a 35% formamide stringency, 46°C temperature for hybridization and two washing steps of 30 min each
25 (data not shown).

26 Following these different optimisation steps and controls, a strong signal was obtained for *T.*
27 *melanosporum* (Fig. S1A) while no signal was visible in the absence of probe or with the antisens probe
28 (Fig. S1B, C). Similarly, no signal was obtained with *Magnaporthe* (Fig. S1D) while a weak signal close to
29 background noise was detected for *T. magnatum* and *T. brumale* (Fig. S1E, F).

30

31 **Figure S1.** Specificity tests of probe Paol-488 (green) combined to probe Euk-Cy3 (red) as a control of
32 hybridization success. Bars: 20µm.

33 **A,** *T. melanosporum* mycelium with probes Euk-Cy3 and Paol-488.

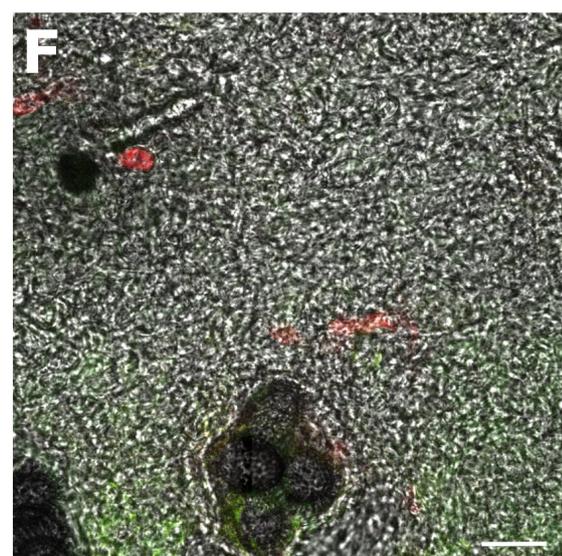
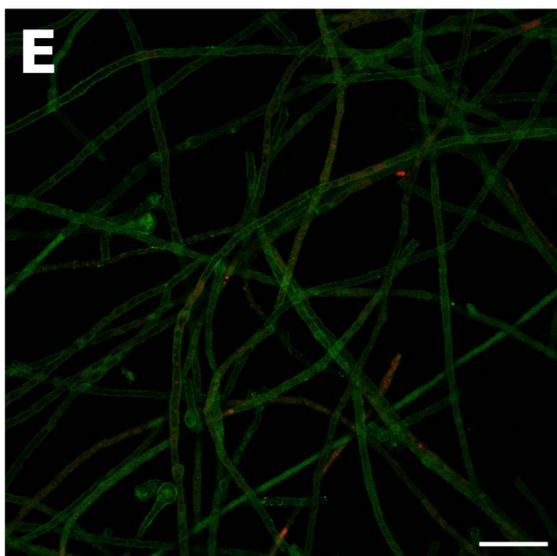
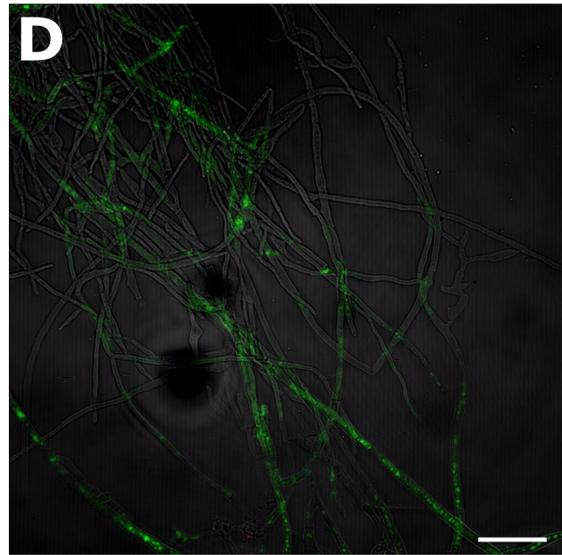
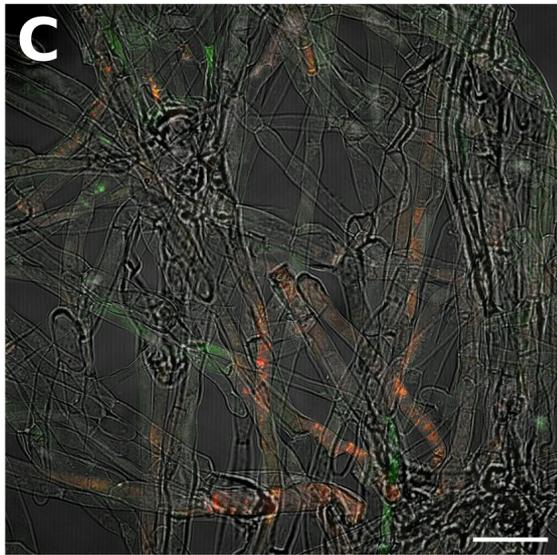
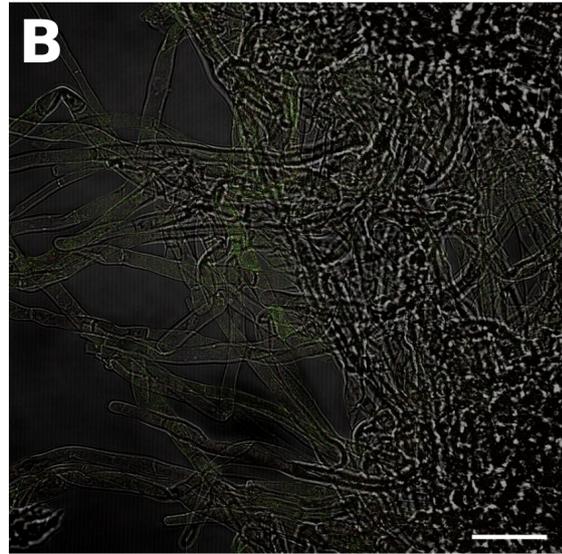
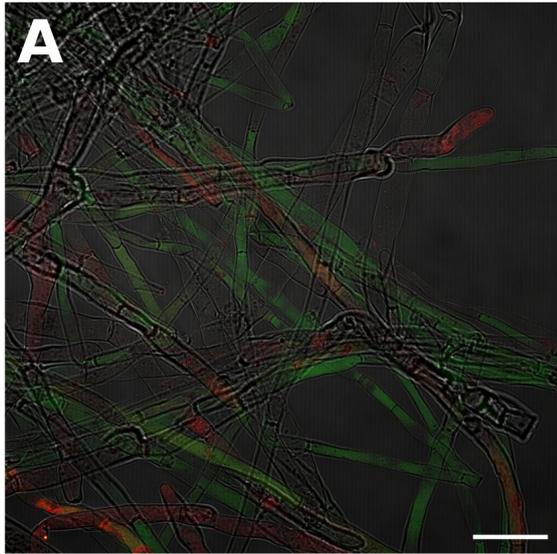
34 **B,** *T. melanosporum* mycelium without any probe;

35 **C,** *T. melanosporum* mycelium with probes Euk-Cy3 and revPaol-488;

36 **D,** *Magnaporthe sp.* mycelium with probes Euk-Cy3 and Paol-488.

37 **E,** *Tuber magnatum* mycelium with probes Euk-Cy3 and Paol-488.

38 **F,** *Tuber brumale* ascocarp with probes Euk-Cy3 and Paol-488.



40 **Figure S2.** Several controls of FISH on root samples with the *Tuber melanosporum*-specific probe Paol-633
41 (red) and the eukaryotic Euk-Cy3 probe (green; co-localization of both probes is orange-yellow). Bars:
42 10µm.

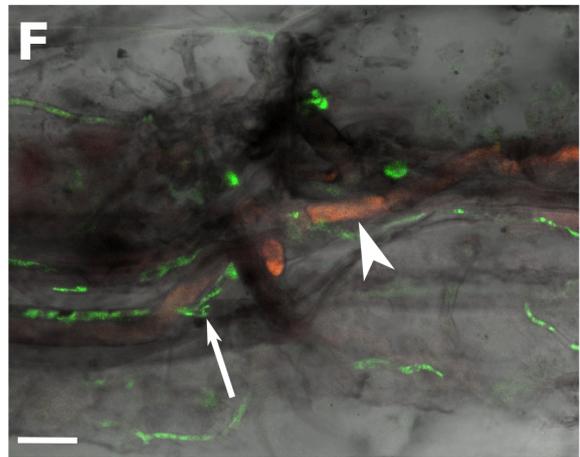
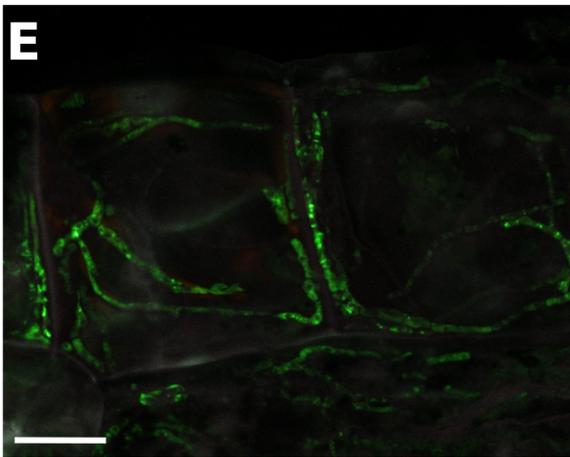
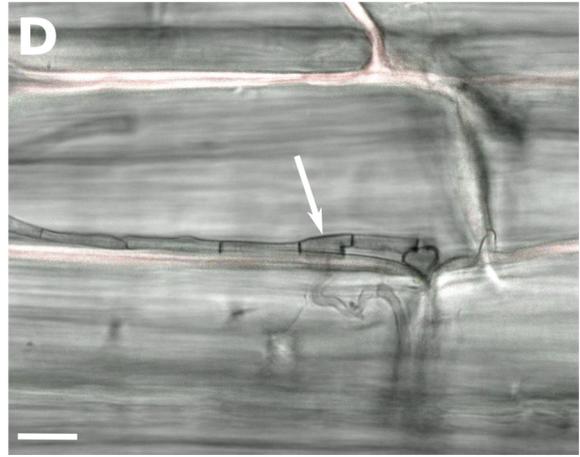
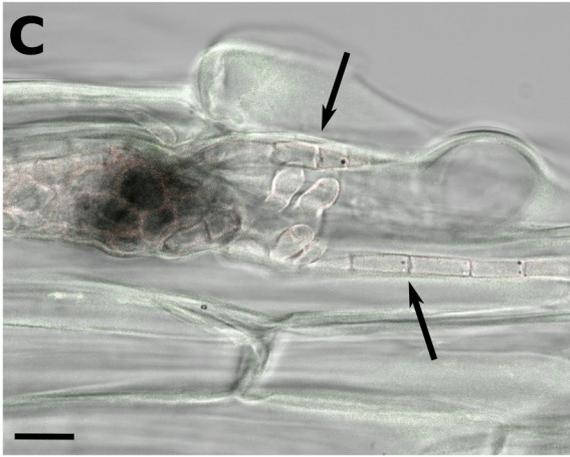
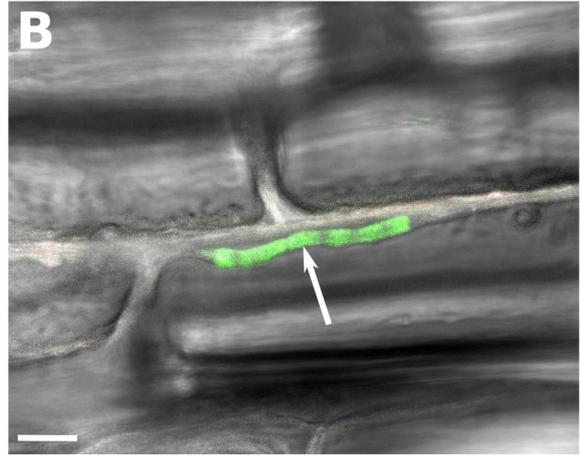
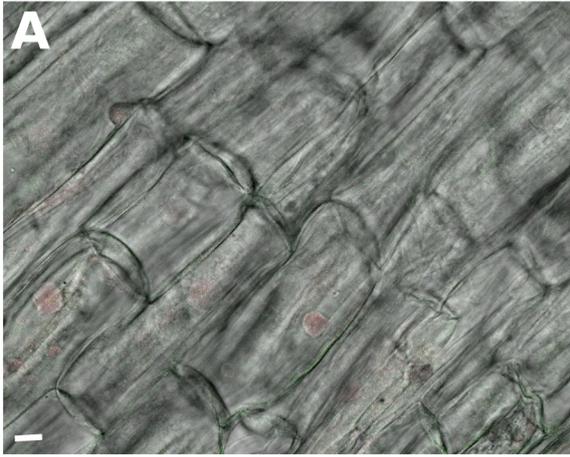
43 **A**, putatively negative root sample (*T. melanosporum* not detected by PCR in flanking fragments) of *Inula*
44 *conyza*, without any probe: this sample reveals no fungal colonization.

45 **B**, putatively negative root sample of *Poaceae sp.* hybridized with probes Euk-Cy3 and Paol-633. This
46 sample is colonized by a fungal hypha marked with Euk-Cy3 (green) but not with Paol-633, indicating that it
47 does not belong to *T. melanosporum*.

48 **C** and **D**, putatively positive root samples (*T. melanosporum* detected by PCR in flanking
49 fragments) of *Medicago lupulina* without any probe: these samples are colonized by septate hyphae (arrows).

50 **E**, putatively positive root sample of *Melampyrum arvense* hybridized with probes Euk-Cy3 and Paol-633,
51 colonized by fungal hyphae (in green) that do not belong to *T. melanosporum* (not hybridized with Paol-
52 633).

53 **F**, putatively positive root sample of *Melampyrum arvense* hybridized with probes Euk-Cy3 and Paol-633,
54 colonized by non-*T. melanosporum* fungal hyphae (in green, marked by Euk-Cy3, thin arrow) and *T.*
55 *melanosporum* hyphae (in red, marked by both probes, large arrow head).



57 **Table S1.** Detailed results on presence of *Tuber* spp. on-ECM plants investigated by PCR using specific
 58 primers for *T. melanosporum* or *T. aestivum* (harvests for genotyping) or generalist fungal primers (for NGS
 59 sequencing). *, non-AM species (*M. arvensis* is non-mycorrhizal; *O. anthropophora* is associated with orchid
 60 mycorrhizal fungi). °, plant species tested for leave endophytism.

Data set	Non-ECM plant name	Nb. of plants (nb. of samples)	Nb. of positive plants ^a (nb. of positive samples)
<i>Tuber melanosporum</i> truffleground; summer 2017 harvest for genotyping and FISH	<i>Achillea millefolium</i>	4 (16)	0
	<i>Crataegus monogyna</i>	1 (4)	1 (2)
	<i>Galium album</i>	4 (16)	0
	<i>Inula conyza</i>	18 (72)	7 (14)
	<i>Jacobaea vulgaris</i>	5 (20)	0
	<i>Linum catarticum</i>	1 (4)	1 (2)
	<i>Medicago lupulina</i>	2 (8)	2 (6)
	<i>Melampyrum arvensis</i> *	3 (12)	2 (8)
	<i>Origanum vulgare</i>	4 (16)	0
	<i>Prunus spinosa</i>	1 (2)	1 (2)
	<i>Sanguisorba minor</i>	2 (8)	0
	Poaceae sp. 1	10 (40)	5 (14)
	Poaceae sp. 2	1 (3)	1 (3)
	<i>Vicia disperma</i>	1 (4)	1 (2)
Total <i>T. melanosporum</i>	14 species (8 families)	57 (225)	21 (53)
<i>Tuber aestivum</i> truffleground; autumn 2017 harvest for NGS barcoding	<i>Dactylis glomerata</i>	12 (20)	9 (11)
	<i>Geranium robertianum</i>	4 (8)	4 (6)
	<i>Hedera helix</i>	6 (12)	4 (7)
	<i>Orchis anthropophora</i> *	2 (4)	2 (4)
	<i>Picris hieracioides</i>	8 (16)	6 (10)
	<i>Solidago virgaurea</i>	1 (2)	0
	<i>Vicia sativa</i>	3 (6)	3 (4)
	<i>Cornus sanguinea</i> °	2 (2)	1 (1)
	<i>Dactylis glomerata</i> °	13 (20)	7 (7)
	<i>Elymus sp.</i> °	6 (10)	4 (4)
<i>Tuber aestivum</i> truffleground; autumn 2018 harvest for genotyping	<i>Epilobium hirsutum</i> °	1 (1)	0
	<i>Geranium robertianum</i> °	2 (4)	0
	<i>Geum aleppicum</i> °	6 (12)	3 (3)
	<i>Hedera helix</i> °	6 (8)	1 (1)
	<i>Medicago lupulina</i> °	1 (2)	0
	<i>Orchis anthropophora</i> *°	2 (3)	0
	<i>Pastinaca sativa</i> °	2 (2)	1 (1)
	<i>Solidago virgaurea</i> °	8 (13)	4 (4)
	<i>Taraxacum sp.</i> °	5 (7)	1 (1)
	<i>Verbascum macrocarpum</i> °	1 (1)	0
<i>Vicia sativa</i> °	1 (1)	0	
Total <i>T. aestivum</i>	15 species (11 families)	92 (154)	50 (64)

61 ^a depending on the species cultivated in the respective truffleground.

62 **Table S2.** Samples (non-ECM root systems, ECM and ascocarps) used for detection of expression of *T.*
63 *aestivum* genes.

Sample name	Species	Type	PCR <i>T. aestivum</i> ^a	Extraction yield (ng RNA / μ l) ^b	qRT-PCR ^c for ProtID:				
					3238	1261	2632	202	2614
B92-4R	<i>Cornus sanguinea</i>	root	+	8	+	+	0	0	0
B50-5Ra	<i>Dactylis glomerata</i>	root	+	12	+	+	+	0	0
C881-2R	<i>Elymus sp.</i>	root	+	1	0	0	0	0	0
B51-2Ra	<i>Geum aleppicum</i>	root	+	18	+	+	+	+	+
B50-1R	<i>Hedera helix</i>	root	+	27	+	+	+	+	+
B581-3R	<i>Pastinaca sativa</i>	root	+	14	+	+	+	+	+
B50-3R	<i>Dactylis glomerata</i>	root	++	1	+	+	+	0	0
B51-5Ra	<i>Dactylis glomerata</i>	root	++	9	+	+	0	0	0
B581-1Ra	<i>Dactylis glomerata</i>	root	++	1	+	+	0	0	0
C882-3Ra	<i>Elymus sp.</i>	root	++	20	+	+	+	+	+
B51-1Ra	<i>Geum aleppicum</i>	root	++	64	+	+	+	+	+
C2-2Ra	<i>Geum aleppicum</i>	root	++	6	+	+	0	0	0
B582-1Ra	<i>Unknown sp.</i>	root	++	<1	0	0	0	0	0
B582-2R	<i>Pastinaca sativa</i>	root	++	10	+	+	+	+	+
B50-6Ra	<i>Solidago sp.</i>	root	++	0	0	0	0	0	0
B583-6Ra	<i>Solidago sp.</i>	root	++	1	0	0	0	0	0
B583-4Ra	<i>Taraxacum sp.</i>	root	++	5	0	0	0	0	0
B92-6R	<i>Dactylis glomerata</i>	root	0	nt	nt	nt	nt	nt	nt
B92-6R	<i>Dactylis glomerata</i>	root	0	nt	nt	nt	nt	nt	nt
B92-6R	<i>Dactylis glomerata</i>	root	0	8	0	0	0	0	0
B582-3Ra	<i>Hedera helix</i>	root	0	41	0	0	0	0	0
B51-8Ra	<i>Taraxacum sp.</i>	root	0	12	0	0	0	0	0
A86_asc	<i>T. aestivum</i>	ascocarp	++	10	nt	nt	nt	nt	nt
B50_asc	<i>T. aestivum</i>	ascocarp	++	77	+	+	+	+	+
B581_asc	<i>T. aestivum</i>	ascocarp	++	30	+	+	+	+	+
B92_asc	<i>T. aestivum</i>	ascocarp	++	24	+	+	+	+	+
ecm1	<i>T. aestivum</i>	ECM	++	12	+	+	+	+	+
ecm2	<i>T. aestivum</i>	ECM	++	27	+	+	+	+	+
ecm3	<i>T. aestivum</i>	ECM	++	15	+	+	+	+	+

64 ^a PCR signal with *T. aestivum*-specific primers: +, moderate signal; ++, strong signal; 0, no signal.

65 ^b plant and truffle DNA included.

66 ^c qRT-PCR signal with *T. aestivum*-specific primers: +, amplification; nt, not tested; 0, no amplification; see
67 main text for gene names.

Endophytisme des champignons ectomycorhiziens

5.1 Contexte de l'étude et problématiques

Les séquençages haut-débit de la communauté fongique des racines de plantes herbacées récoltées dans des brûlés à *Tuber melanosporum* ou à *T. aestivum* (Articles III et IV respectivement) ont mis en évidence d'une part la présence de ces deux espèces dans les racines et d'autre part la présence de champignons ectomycorhiziens (EcM) autres que les Truffes. En effet, diverses espèces appartenant essentiellement aux Pyronemataceae, Sclerodermataceae, Sebacinaceae et Thelephoraceae sont détectables – au moins par des techniques moléculaires – dans les racines de plantes non-EcM préalablement stérilisées en surface. Ces familles, ainsi que d'autres, ont été trouvées par d'autres études récentes dans les communautés fongiques des racines de plantes non-EcM (*e.g.* Toju *et al.*, 2016 ; Almario *et al.*, 2017 ; Jacuemyn *et al.*, 2017 ; Toju et Sato, 2018 ; *etc.*). Cette présence de champignons EcM dans les racines de plantes non-EcM est inattendue, mais semble plus répandue que ce à quoi l'on pourrait s'attendre.

Pour tenter de délimiter l'étendue de ce phénomène, plusieurs échantillonnages de plantes herbacées non-EcM ont été réalisés dans des contextes écologiques variés à proximité d'arbres-hôtes EcM. Tout d'abord, un échantillonnage de plantes herbacées mais aussi de plantes ligneuses EcM (chênes, *Quercus* spp.) et non-EcM (noyer, *Juglans* sp. ; vigne, *Vitis vinifera*) a été effectué en Corrèze (échantillonnage « Tmel » ; Tableau 7). L'objectif de ces prélèvements est d'une part de confirmer les résultats observés sur un premier prélèvement en truffière à *T. melanosporum* (Article III p. 85) et d'autre part de vérifier l'endophytisme de champignons EcM dans des racines de plantes ligneuses.

Afin d'explorer plus avant le lien entre brûlé et endophytisme, des plantes herbacées ont été prélevées sur des brûlés spontanés produits par un champignon EcM autre que la Truffe : *Russula delica* (Fig. 16 ; échantillonnage « Russule », Tableau 7). L'existence de ces brûlés nous a été rapportée par Laurent Genola, qui a identifié l'espèce qui en est à l'origine à l'aide de carpophores. Le phénomène des brûlés à russule n'est pas décrit dans la littérature scientifique, mais plusieurs trufficulteurs font mention de brûlés provoqués par des espèces autres que la Truffe, telles que des *Astraeus*, des sclérodermes (*Scleroderma* sp.) ou encore des russules. Comme ceux de la Truffe, ces brûlés se caractérisent par une végétation rase (Fig. 16). La communauté



Figure 16 – Brûlés spontanés attribués à la présence de russule (*Russula*). (A) Castelnau-de-Montmiral (Tarn), octobre 2017. (B) Salles-la-Source (Aveyron), octobre 2015. La flèche blanche indique un carpophore de russule trouvé sur le brûlé. Photos (A) L. Schneider-Maunoury, (B) L. Genola.

fongique endophyte des racines des plantes herbacées poussant dans et hors de ces brûlés a donc été comparée avec les observations faites dans les truffières à *T. melanosporum*.

Par ailleurs, les champignons EcM sont souvent nombreux et diversifiés dans les écosystèmes forestiers tempérés, composés d'arbres EcM (charmes, châtaigniers, chênes, hêtres, pins...) et non-EcM (érables, frênes, tilleuls... ; Tedersoo *et al.*, 2012) : retrouve-t-on alors une communauté de champignons à la fois EcM et endophytes nombreuse et diversifiée dans les racines de plantes herbacées ? Ou bien l'endophytisme est-il lié justement à cette abondance particulière de mycélium de Truffe ou de Russule dans les brûlés ? Afin de répondre à cette question, une dernière approche a été d'échantillonner des plantes herbacées dans un contexte de forêt tempérée (échantillonnage « JE », Tableau 7), c'est-à-dire dans un écosystème qui n'est pas dominé par une seule espèce de champignon EcM, comme c'est le cas dans des brûlés à *T. melanosporum* ou à *T. aestivum*. L'objectif de cet échantillonnage préliminaire était de vérifier la présence (ou l'absence) de champignons EcM dans les racines d'un cortège de plantes herbacées de sous-bois. Cette analyse soulève la question des mécanismes qui contrôlent ce processus : toutes les espèces fongiques peuvent-elles être endophytes, ou bien est-ce une caractéristique de certaines espèces seulement ?

En effet, le système immunitaire de la plante intervient dans la mise en place et le maintien des interactions plante-endophytes (Jones et Dangl, 2006). En particulier, la réponse immunitaire de la plante est parfois réduite au début de l'interaction, ce qui permet l'entrée des hyphes fongiques dans la racine (Schäfer *et al.*, 2009 ; Jacobs *et al.*, 2011). Cependant, elle est ensuite nécessaire à l'interaction, en particulier pour le contrôle de la prolifération fongique (Lahrmann *et al.*, 2015 ; Hiruma *et al.*, 2016). L'issue de cette interaction dépend donc à la fois des capacités de colonisation de l'endophyte et du système immunitaire de l'hôte, ce qui laisse supposer une différence entre communautés fongiques intra- et extra-racinaires, par ailleurs bien documentée pour les bactéries (voir par exemple Haichar *et al.*, 2008 ; Thiergart *et al.*, 2019). Pour répondre à cette question, deux échantillonnages conjoints de racines de plantes herbacées et de leur sol rhizosphérique ont été réalisés, afin de comparer la communauté fongique intra-racinaire à la communauté présente à proximité des racines.

5.2 Matériel et méthodes

5.2.1 Jeux de données

Les quatre jeux d'échantillons utilisés pour analyser les communautés fongiques intra-racinaires sont répertoriés dans le tableau 7. Dans chaque cas, la communauté fongique endophyte a été analysée sur des extrémités de racines jeunes, choisies pour leur état apparent de bonne santé et l'absence d'ectomycorhize dans le cas des racines de plantes ligneuses. Les racines ont été stérilisées en surface par des bains successifs d'éthanol à 70 % (5 minutes) et de javel à 0,9 % (15 secondes), suivis de trois rinçages à l'eau distillée. Toutes ces précautions avaient pour but de limiter au maximum la détection d'hyphes fongiques de surface, afin d'évaluer la communauté fongique intra-racinaire.

Les racines du jeu de données Tmel ont été récoltées sur les terrains calcaire du sud de la Corrèze. Les racines de plantes herbacées et de chêne proviennent de truffières à *T. melanosporum*. Les racines de noyer ont été récoltées sur des arbres poussant en bordure de truffière, tandis que les racines de vigne ont été prélevées au pied de ceps de vigne plantés à l'emplacement d'une ancienne truffière. Les racines du jeu de données Russule proviennent du même type d'environnement (des boisements peu denses de chênes en terrain calcaire) mais dans lequel la communauté EcM est cette fois dominée par des espèces du genre *Russula*. Les racines ont été récoltées dans deux sites, dans et hors des brûlés à Russule rendus visibles par la pauvreté de la strate herbacée (Fig. 16). Sur l'un des sites, les brûlés à Russule coexistaient avec un brûlé à *T. melanosporum*.

Les trois autres jeux de données proviennent de boisements tempérés en Ile-de-France. Les racines de plantes herbacées du jardin des Plantes (JE) ont été récoltées dans un espace boisé fermé au public du Muséum national d'Histoire naturelle, à Paris, composé d'un grand nombre d'arbre EcM (chêne, charme, hêtre, châtaignier...) et non-EcM. Onze espèces de plantes herbacées ont été échantillonnées (en bleu sur la Fig. 21). Les deux autres jeux de données proviennent de forêts à sol acide, dominées par des châtaigniers (*Castanea sativa*) et dont le couvert herbacé était peu divers. Dans les deux cas, les quatre espèces herbacées les plus abondantes ont été récoltées (en vert et marron sur la Fig. 21), *Arum maculatum* étant commun aux deux sites.

5.2.2 Extractions d'ADN et amplification de la communauté fongique

Pour le jeu de données JE, quatre racines par plante ont été sélectionnées et traitées séparément, résultant en 88 échantillons. Pour les autres jeux de données, quatre racines par plantes ont été sélectionnées puis groupées pour être traitées ensemble. Il y a donc autant d'échantillons que de plantes récoltées pour ces jeux de données. Le sol rhizosphérique récupéré dans le jeu de données SR est défini comme le sol restant au contact du système racinaire lorsque celui-ci est récolté : les sols d'Orsay et d'Orry-la-Ville étant relativement sableux, les quantités de sol récupéré n'ont pas excédé quelques dizaines de grammes.

L'ADN des racines a été extrait avec le kit RED Extract-N-Amp (Sigma-Aldrich, Allemagne) en suivant les instructions du fabricant. L'ADN des échantillons de sol a été extrait

Tableau 7 – Jeux de données utilisés pour l’analyse des communautés fongiques dans les racines des plantes herbacées non-ectomycorhiziennes dans différents contextes écologiques. Le nombre de plantes et d’échantillons de sol rhizosphérique récoltés sont indiqués, entre parenthèses est précisé le nombre d’échantillons quand celui-ci diffère du nombre de plantes.

Nom	Lieu	Date	Plantes	Espèces	Sol
Tmel ¹	Corrèze	Mai 2016	68 herbacées	25	-
			20 ligneuses	6	-
JE ²	Jardin des Plantes, Paris	Juin 2017	22 (88)	11	-
Russule ³	Castelnau-de-Montmiral, Tarn	Oct. 2017	18 en brûlé	4	-
			20 hors brûlé	4	-
SR1 ⁴	Orry-la-Ville, Oise	Avril 2019	16	4	16
SR2 ⁴	Orsay, Essonne	Mars 2019	18	4	18
Total			182 (248)	58	34

¹ Les récoltes de ce jeu de données ont été réalisées par Cannelle Clément dans six lieux différents dans le sud de la Corrèze (La Bouzonie, Branceilles, Chartrier-Ferrière, Crauffon, Saint-Alvère et Yssandon).

² Les récoltes de ce jeu de données ont été réalisées au Jardin Écologique (JE), parcelle de forêt du jardin du Muséum national d’Histoire naturelle (Paris), avec l’aide de Myriam Moreno.

³ Ces échantillons ont été récoltés grâce à Laurent Genola, qui a rapporté l’existence des brûlés à Russule, nous en a indiqué la localisation et a effectué l’échantillonnage hors brûlé.

⁴ Les échantillons de sol et de racines (SR) de ce jeu de données ont été récoltés avec Bastien Bennetot, qui a aussi effectué l’ensemble des étapes de séquençage de ces échantillons.

suivant le protocole décrit par Taberlet *et al.* (2012) : le sol rhizosphérique est d’abord pesé, puis mélangé à poids égal à un tampon phosphate. Cette étape libère l’ADN dans le tampon, qui est ensuite récupéré par centrifugation. L’ADN contenu dans la fraction liquide récupérée est purifié à l’aide du kit NucleoSpin Soil (Macherey-Nagel, Allemagne). La première étape proposée par Taberlet *et al.* (2012) permet donc d’homogénéiser l’ADN présent dans l’ensemble du volume de sol récolté et d’obtenir une communauté fongique plus proche de la communauté réelle que lorsqu’un très petit volume de sol est prélevé (à l’inverse, le kit NucleoSpin Soil permet par exemple d’extraire l’ADN d’échantillons de moins de 500 mg seulement).

L’ITS2 fongique a été séquencé grâce au couple d’amorces ITS86-F/ITS4 (Op De Beek *et al.*, 2014; Waud *et al.*, 2014), qui amplifie un grand nombre de taxons fongiques mais cible mal les champignons endomycorhiziens (AM). On s’attend donc à une sous-représentation des champignons AM, mais à une bonne amplification des autres taxons. Les conditions de PCR sont décrites dans l’Article III. Les produits de PCR sont ensuite purifiés à l’aide du kit NucleoMag NGS Clean-up (Macherey-Nagel, Allemagne). Une deuxième PCR permet d’identifier chaque échantillon à l’aide d’amorces uniques. Ces produits PCR sont de nouveau purifiés, puis rassemblés en une banque équimolaire séquencée sur un séquenceur Ion Torrent PGM (Life Technologies, USA).

5.2.3 Traitement bioinformatique et analyses des données

Les séquences obtenues ont été traitées comme dans l'Article III par Marcin Jakalski (Université de Gdansk, Pologne) avec Qiime (Caporaso *et al.*, 2010) et des scripts écrits par Sébastien Leclercq (INRA, Tours). Dans un premier temps, les séquences « complètes » contenant les deux amorces (ITS86-F et ITS4) ont été sélectionnées et les séquences des amorces retirées à l'aide de Cutadapt v1.4.1 (Martin, 2011). Ces séquences ont été groupées en unités taxonomiques opérationnelles (OTU, *operationnal taxonomic units*) avec l'algorithme SWARM (Mahé *et al.*, 2014), formant ainsi une première base d'OTU de référence (R-OTU). Les singletons ont été retirés, de même que les chimères détectées avec l'algorithme UCHIME v.4.2.4 (Edgar *et al.*, 2011) en comparant les séquences R-OTU à la base de données de référence pour les champignons, UNITE v.7 (Kõljalg *et al.*, 2013).

Dans un deuxième temps, les amplicons contenant soit l'amorce ITS86-F soit l'amorce ITS4 ont été extraits et traités comme précédemment. Ces séquences ont ensuite été groupées en OTU en les comparant aux R-OTU obtenues lors de la première étape, grâce à l'algorithme BLASTN (Altschul *et al.*, 1990) utilisé avec un seuil de 97 % de similarité. Ce seuil est classiquement utilisé pour les espèces fongiques (Blaalid *et al.*, 2013 ; Kõljalg *et al.*, 2013). Bien que certaines études reportent des seuils plus élevés nécessaires pour discriminer des espèces (*e.g.* 99 % de similarité pour distinguer les espèces du genre *Cortinarius* ; Garnica *et al.*, 2016), d'autres indiquent qu'il est suffisant pour détecter les espèces connues présentes dans un jeu de données (Blaalid *et al.*, 2013) et pour identifier les taxons à l'échelle du genre (Vu *et al.*, 2019).

Chaque OTU a ensuite été comparée à la base de données UNITE v.7 en utilisant l'algorithme BLASTN, pour lui assigner si possible un taxon (du phylum à l'espèce). Les OTU non attribuées à des champignons (principalement des amplifications d'ITS de plantes) ont été retirées. Les OTU les plus rares, c'est-à-dire celles présentant moins de 10 séquences dans l'ensemble du jeu de données, ont été éliminées. De même, les échantillons ayant moins de 1000 séquences n'ont pas été conservés, soit un échantillon du jeu de données Tmel, cinq échantillons du jeu de données JE, un échantillon du jeu de données Russule, trois échantillons de racines du jeu de données SR et leurs trois sols correspondant.

Enfin, l'écologie de chaque OTU (mutualiste, parasite, saprotrophe, *etc.*) a été obtenue grâce à la base de données FUNGuild (Nguyen *et al.*, 2016). Cette base de données attribue à chaque OTU - en fonction de son assignation taxonomique et si les informations sont disponibles - un type trophique (pathotrophe, saprotrophe ou symbiotrophe, voir 4 p. 39 dans l'introduction) et une guildes (*e.g.* parasite ou pathogène pour les pathotrophes, décomposeur de la litière ou coprophage pour les saprotrophes, mycorhiziens ou lichénisés pour les symbiotrophes, *etc.* ; Nguyen *et al.*, 2016). Ces deux informations ont été combinées en une variable « type trophique » qui discrimine les guildes au sein des symbiotrophes.

Les types trophiques « pathotrophes » et « saprotrophes » ont été conservés tels quels. Lorsque la (ou les) guildes(s) potentielle(s) incluaient la mention *Endophyte*, c'est ce terme qui a été gardé pour désigner le type trophique : l'endophytisme est donc compris ici au sens large, puisqu'il regroupe des espèces éventuellement bénéfiques ou délétères pour leurs hôtes. Comme attendu, aucun taxon EcM n'a été assigné à la catégorie Endophyte par FUNGuild. La catégorie « symbiotrophes » a été divisée selon le type de mycorhize formé par chaque taxon, afin

d'accéder aux espèces ectomycorhiziennes. Enfin, la catégorie « saprotrophes-symbiotrophes » regroupe deux types de taxons : d'une part, des taxons endophytes dont on ne connaît pas l'impact sur l'hôte et qui ont été assignés à la catégorie « endophyte » au sens large ; d'autre part, des taxons identifiés au mieux au niveau de la famille, qui appartiennent à une famille contenant des espèces mycorhiziennes et des espèces saprotrophes. Ce deuxième type de taxon a été laissé dans la catégorie « saprotrophes-symbiotrophes » : le nombre de taxons EcM dans chaque jeu de données est donc probablement sous-estimé, puisque certaines espèces EcM n'ont pas été identifiées comme telles. Il s'agit essentiellement de taxons appartenant aux Ceratobasidiaceae, Helotialaceae, Pezizaceae, Pyronemataceae, Thelephoraceae et Tullasnellaceae. La catégorie EcM de nos analyses ne contient donc que les taxons dont on sait avec certitude qu'ils établissent des symbioses EcM.

5.3 Résultats

5.3.1 Vue d'ensemble

Les séquençages des quatre jeux de données ont permis d'obtenir entre 1,1 et 3,4 millions de séquences après traitement bioinformatique, soit entre 30 et 60 000 séquences par échantillon (Tableau 8). Le jeu de données « SR racines » présente une diversité d'OTU plus élevée que celles des trois premiers jeux de données (55 OTU/échantillon en moyenne, contre 17-23 dans les autres jeux de données). Ceci peut s'expliquer par le fait que les 31 racines proviennent de deux lieux d'échantillonnage différents, qui possèdent donc des communautés fongiques endophytes partiellement différentes et au total plus variées. Les échantillons de sol sont quant à eux beaucoup plus riches en OTU que les échantillons racinaires.

Tableau 8 – Résultats des séquençages pour l'analyse des communautés fongiques dans les racines des plantes herbacées non-ectomycorhiziennes. Les chiffres indiqués sont les chiffres obtenus après traitement bioinformatique des séquences : élimination des séquences de mauvaise qualité, des OTU non fongiques, des OTU avec moins de 10 séquences et des échantillons avec moins de 1000 séquences. ¹Le nombre moyen de séquences ou d'OTU par échantillon est donné entre parenthèse dans la colonne correspondante.

Nom	Nb. d'échantillons	Nb. de séquences ¹	Nb. d'OTU ¹
Tmel	87	2 589 907 (29 700)	1 984 (23)
JE	83	3 383 934 (40 700)	1 427 (17)
Russule	55	1 791 962 (32 500)	933 (17)
SR	31 racines	1 087 293 (35 000)	1 697 (55)
	31 sols	1 890 914 (61 000)	2 788 (90)

5.3.2 La Truffe noire, endophyte de plantes ligneuses

Dans le jeu de données « Tmel », des racines de plantes herbacées et de plantes ligneuses ont été récoltées afin de comparer les capacités endophytes des champignons EcM dans ces deux types de plantes. Les espèces ligneuses récoltées sont d'une part des arbres EcM hôtes de la Truffe noire - chêne vert (*Quercus ilex*), chêne sessile (*Q. petraea*), chêne pubescent (*Q. pubescens*) et chêne pédonculé (*Q. robur*) - et d'autre part des arbres non-EcM non-hôtes - noyer (*Juglans* sp.) et vigne (*Vitis vinifera*). Les racines de chêne ont été récoltées en truffières, mais choisies pour leur absence d'ectomycorhize. Les racines de noyer et de vigne ont été récoltées en lisière de truffière.

Le séquençage haut-débit de l'ITS fongique confirme la présence de séquences de champignons EcM dans les racines des plantes herbacées (11 % des OTU) et dans les racines des plantes ligneuses (28 % des OTU dans les racines de chênes, 5 % dans les racines de noyer et 8 % dans les racines de vigne ; Fig. 17). Dans le cas des chênes, on ne peut pas exclure que la colonisation des racines par des espèces EcM corresponde à des initiations d'ectomycorhizes, bien que ces racines aient été choisies sans symptôme morphologique apparent de mycorhize. On ne peut donc pas désigner avec certitude cette colonisation comme un endophytisme. À l'inverse, dans le cas des racines de vigne et de noyer, espèces non-EcM, la présence de séquences de champignons EcM s'apparente à de l'endophytisme comme pour les racines de plantes herbacées.

Les taxons fongiques à la fois EcM et endophytes sont similaires dans les quatre types de plantes (herbacées, chênes, noyers, vignes ; Fig. 18). La diversité de ces taxons est proportionnelle au nombre d'échantillons (67 échantillons de plantes herbacées, huit échantillons de racines de chênes, neuf de vigne et trois de noyer) : plus un nombre élevé de racines a été analysé, plus la diversité de taxons EcM retrouvés est grande (Fig. 18). Les taxons les plus représentés sont les Truffes (*T. melanosporum* principalement mais aussi *T. brumale* et d'autres séquences attribuées au genre *Tuber*), les sclérodermes (*Scleroderma areolatum*, Sclerodermataceae), des Sebacinaceae (*Sebacina flagelliformis* et d'autres séquences attribuées au genre *Sebacina* ou seulement à la famille des Sebacinaceae) et des Thelephoraceae (*Pseudotomentella* spp. et *Tomentella* spp. majoritairement).

Ces familles majoritaires sont les mêmes que celles retrouvées dans le premier échantillonnage de racines de plantes herbacées sur brûlé à *T. melanosporum* (Article III p. 85) et dans l'échantillonnage de racines sur brûlé à *T. aestivum* (Article IV p. 97). Cependant, contrairement aux résultats de l'Article III dans lequel la Truffe noire représentait deux tiers des OTU ectomycorhiziennes, elle ne représente ici que 12 % des séquences dans les racines de plantes herbacées, 14 % dans les racines de chênes et 13 % dans les racines de noyers. Elle est absente des racines de vignes (dans lesquelles on trouve une OTU de *T. brumale* et une de *T. puberulum*, soit 4 % des OTU EcM). La présence de Truffe noire dans les racines de plantes ligneuses concorde avec les résultats de Gryndler *et al.* (2014) qui rapportent la présence de *T. aestivum* dans les racines d'orme (*Ulmus glabra*) et de frêne (*Fraxinus excelsior*).

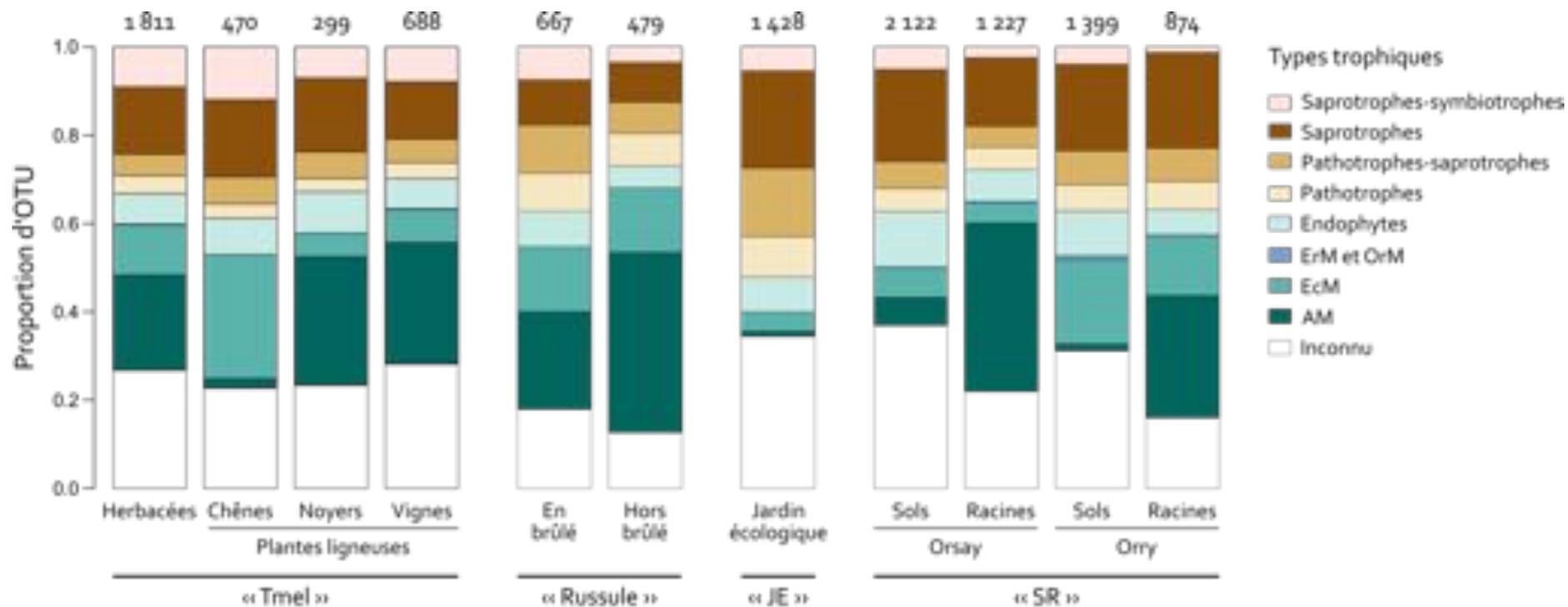


Figure 17 – Proportion d’OTU appartenant aux différents types trophiques, dans les racines de plantes herbacées ou ligneuses dans différents contextes écologiques. Les noms des différents jeux de données sont redonnés entre guillemets. Le nombre total d’OTU est donné au-dessus de chaque barre. AM : champignons endomycorhiziens (Gloméromycètes); EcM : champignons ectomycorhiziens; ErM : mycorhizes éricoïdes; OrM : mycorhizes d’orchidées. La catégorie *Endophytes* regroupe tous les taxons des guildes « endophyte », « endophyte-saprotophe » et « endophyte-pathogène » définies par FUNGuild.

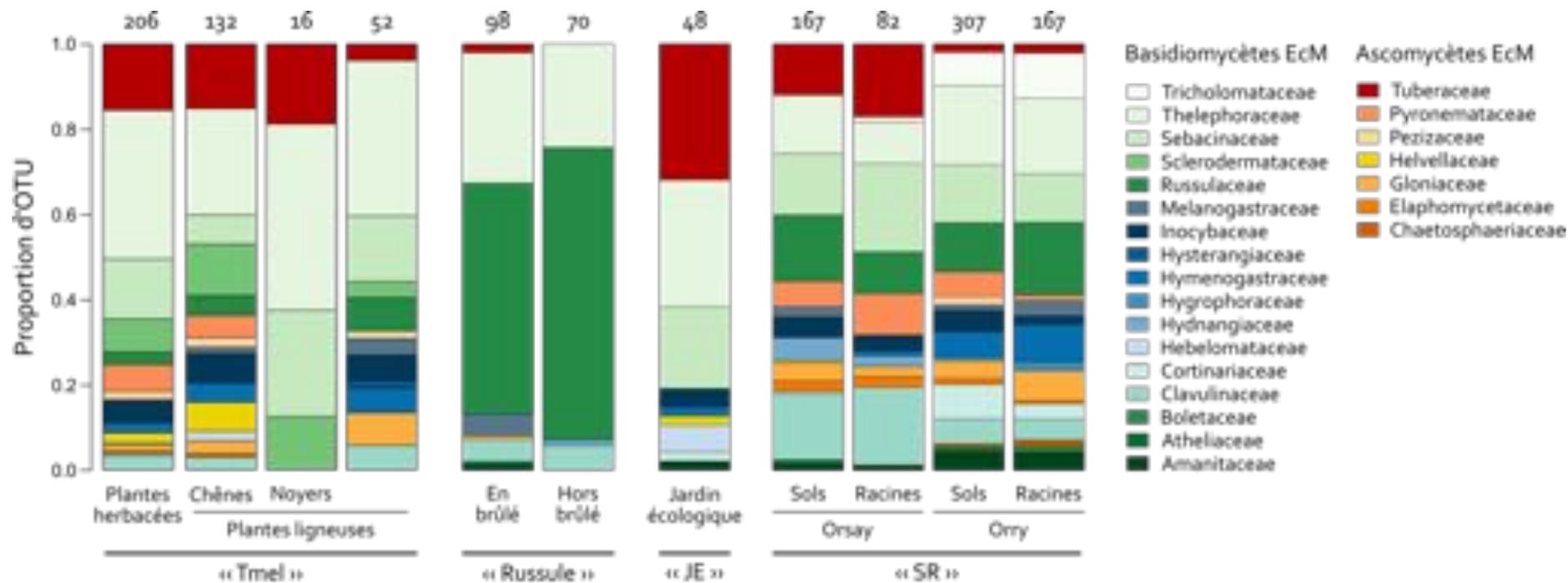


Figure 18 – Proportion d'OTU ectomycorhiziennes appartenant à différentes familles, dans les racines de plantes herbacées ou ligneuses dans différents contextes écologiques. Les noms des différents jeux de données sont redonnés entre guillemets. Le nombre total d'OTU est donné au-dessus de chaque barre. Les couleurs bleu-vert indiquent des Basidiomycètes, les couleurs rouge-orange des Ascomycètes.

5.3.3 Brûlé et endophytisme des Russules

Les racines des plantes herbacées récoltées dans les brûlés à Russule et en dehors (4 à 6 m du brûlé le plus proche) sont toutes colonisées par des espèces fongiques EcM (15 % des OTU en brûlé et hors brûlé ; Fig. 17). On retrouve les mêmes familles EcM que précédemment, mais dans des proportions très différentes puisque cette fois les Russulaceae sont largement majoritaires (54 et 68 % des OTU EcM en et hors brûlé respectivement), suivies par les Thelephoraceae (genre *Tomentella*, 30 et 24 % des OTU EcM en et hors brûlé respectivement ; Fig. 18). La présence des Russulaceae en brûlé et hors brûlé indique que le brûlé ne délimite pas strictement la présence de mycélium de Russule, et que les échantillonnages hors-brûlé n'ont pas été effectués assez loin pour permettre de voir une différence. Les Russulaceae trouvées dans les racines des plantes herbacées sont toutes assignées au genre *Russula*, la moitié des séquences environ étant identifiée à *R. delica*. Cette identification moléculaire correspond à l'identification morphologique établie à partir des carpophores par Laurent Genola, mais le séquençage de l'ITS des carpophores est nécessaire pour vérifier s'il s'agit bien des mêmes OTU qui fructifient et colonisent les racines des plantes herbacées. Cette correspondance soutient donc l'hypothèse de l'endophytisme de *R. delica* dans les racines de plantes herbacées, émise à cause de l'existence du brûlé.

5.3.4 Peu de taxons EcM endophytes en sous-bois

Les racines de plantes herbacées récoltées en sous-bois de la forêt du Jardin des Plantes (Muséum national d'Histoire naturelle, Paris) sont peu colonisées par des champignons EcM : seuls 3,4 % des OTU sont attribués à des taxons EcM (Fig. 17). Cependant, comme dans les jeux de données précédents, ces taxons sont majoritairement parmi les Sebacinaceae (19 % des OTU EcM), les Thelephoraceae (29 %, essentiellement le genre *Tomentella*) et les Tubercaceae (31 %, toutes assignées au genre *Tuber*). Ces résultats préliminaires suggèrent que des taxons EcM peuvent coloniser en endophyte des racines de plantes herbacées non-EcM, y compris en dehors d'écosystèmes dominés par un seul taxon fongique.

5.3.5 Comparaison racines-rhizosphère

Afin de mieux comprendre comme s'assemble la communauté fongique endophyte dans les racines des plantes herbacées, les communautés intra-racinaires et à proximité immédiate des racines ont été comparées. En termes de types trophiques, la différence principale entre sol rhizosphérique et racines est la proportion de taxons endomycorhiziens (AM ; Fig. 17). Les taxons AM représentent 4 et 10 % des OTU des sols rhizosphériques d'Orry et d'Orsay respectivement, contre 28 et 30 % dans les racines, ce qui reflète l'écologie largement racinaire de ces espèces.

Les proportions d'OTU EcM sont similaires dans les sols et dans les racines, un peu plus élevées à Orry qu'à Orsay (Orry : 22 % d'OTU EcM dans le sol et 16 % dans les racines ; Orsay : 8 % d'OTU EcM dans le sol et 7 % dans les racines ; Fig. 17). En prenant l'ensemble du jeu de données SR en compte (lieux de prélèvement et espèces végétales confondus), on constate que les OTU EcM endophytes dans les racines des plantes herbacées sont un sous-échantillon de l'ensemble des OTU EcM du jeu de données (Fig. 19). Seule une OTU EcM sur 441 n'est

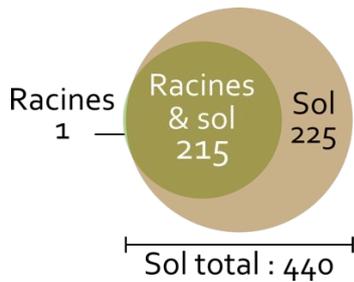


Figure 19 – Nombre d’OTU ectomycorhiziennes présentes dans les racines uniquement (« Racines »), dans les racines et dans le sol rhizosphérique (« Racines & sol »), ou dans le sol seulement (« Sol »), sur l’ensemble du jeu de données SR. Le nombre total d’OTU EcM trouvées dans le sol est donné par la barre « Sol total ».

retrouvée que dans les racines : une OTU assignée au genre *Humaria* (Pyronemataceae) retrouvée dans une racine de *Ficaria verna* à Orsay. Cependant, d’autres OTU assignées au genre *Humaria* sont retrouvées dans les sols d’Orsay et d’Orry. Globalement, la moitié des OTU EcM du sol se retrouve aussi dans les racines des plantes herbacées (215/440 ; Fig. 19).

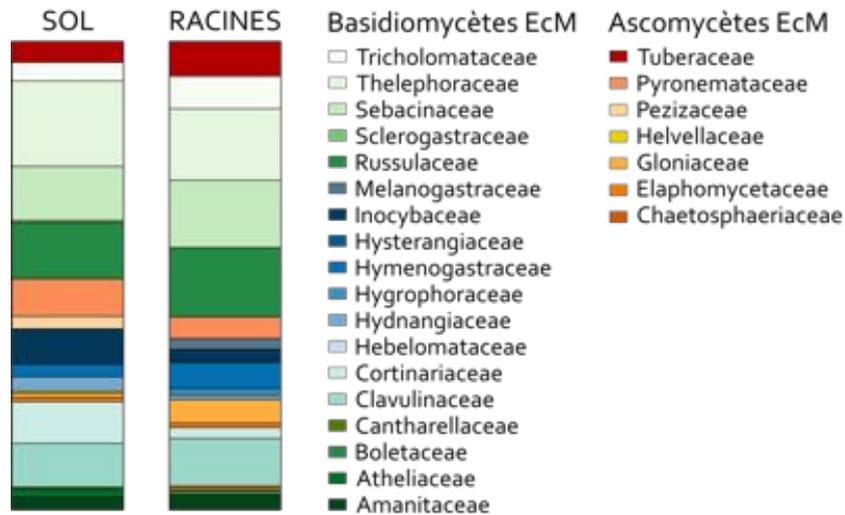
Les OTU EcM endophytes de plantes herbacées reflètent globalement la diversité présente dans les sols (Fig. 20 A). Seuls 10 genres appartenant à 7 familles ne sont pas trouvés en endophyte dans les racines alors qu’ils sont présents dans le sol environnant, mais ces taxons représentent une très faible proportion des OTU du sol (1 à 5 OTU sur les 441 OTU EcM du jeu de données ; Fig. 20 B). La richesse taxonomique des ectomycorhiziens endophytes de plantes herbacées est proportionnelle à la richesse des taxons EcM dans le sol (Fig. 20 B) : plus un taxon est abondant dans le sol (grand nombre d’OTU assignées à ce taxon), plus il est abondant en endophyte dans les racines. C’est le cas des genres *Clavulina*, *Russula*, *Sebacina*, *Tomentella* et *Tuber* (Fig. 20).

5.3.6 Endophytisme et identité de la plante hôte

En réunissant les jeux de données JE et SR, la proportion d’OTU assignées à des taxons EcM peut être comparée entre les différentes espèces de plantes herbacées. Ces deux jeux de données rassemblent 114 échantillons de racines de plantes herbacées appartenant à 18 espèces et 14 familles. La proportion d’OTU EcM varie de 0 à 22 % (Fig. 21) et dépend de l’espèce végétale (ANOVA : $p < 0,001$). Le muguet (*Convallaria majalis*) et les deux espèces d’Euphorbiaceae (*Euphorbia* sp. et *Mercurialis perennis*) présentent davantage d’OTU EcM-endophytes que les plantes des autres familles ($p < 0,001$).

Différentes espèces de plantes herbacées ayant été récoltées dans différents lieux, qui ne présentent pas tous la même richesse en taxons fongiques EcM, deux facteurs interviennent donc ici : l’espèce végétale et son environnement fongique. Or, les espèces présentant la plus forte proportion d’OTU EcM dans leurs racines ont toutes été récoltées à Orry (Fig. 21 B). On ne peut donc pas trancher entre l’hypothèse d’un filtre exercé par la plante (la proportion d’OTU EcM dépendrait de l’espèce végétale considérée) de l’hypothèse d’une colonisation passive (qui ne dépendrait que de la richesse en taxons fongiques du lieu considéré). Seules deux espèces ont été récoltées dans deux lieux (*A. maculatum* à Orsay et Orry, *M. uniflora* au jardin écologique et à Orsay), ce qui ne permet pas de tester rigoureusement les deux hypothèses. En revanche, le jeu de données SR permet de tester l’existence d’une corrélation entre le nombre d’OTU EcM dans le sol et le nombre d’OTU EcM retrouvées en endophytes dans les racines (Fig. 21 C). On constate ici que le nombre d’OTU EcM dans les racines des plantes herbacées est partiellement corrélé au nombre d’OTU EcM présentes dans le sol (régression linéaire : $p < 0,01$ et $R^2 = 0,22$).

A. Familles EcM détectées dans le sol et dans les racines



B. Nombre d'OTU de chaque genre EcM dans les racines et dans le sol

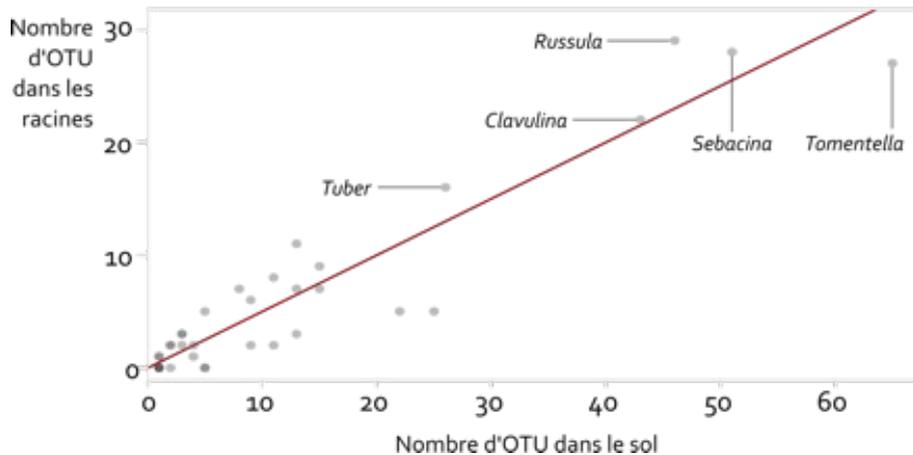


Figure 20 – Caractérisation des communautés ectomycorhiziennes-endophytes dans le sol et dans les racines. (A) Diversité des familles d'OTU EcM retrouvées dans le sol uniquement (SOL) ou dans le sol et en endophyte dans les racines de plantes herbacées (RACINES). Les espèces EcM et endophytes reflètent globalement la diversité présente dans le sol, puisque seules quelques familles ne sont pas représentées dans les racines. (B) Richesse taxonomique des genres de champignons EcM-endophytes dans les racines de plantes herbacées en fonction de la richesse dans le sol. Le nombre de taxons EcM-endophytes dans les racines est proportionnel au nombre présent dans le sol : la droite rouge correspond à la droite de régression du modèle linéaire $OTU_{racines} = a * OTU_{sol}$ avec $a = 0,49$ ($p < 0,001$ et $R^2 = 0,88$).

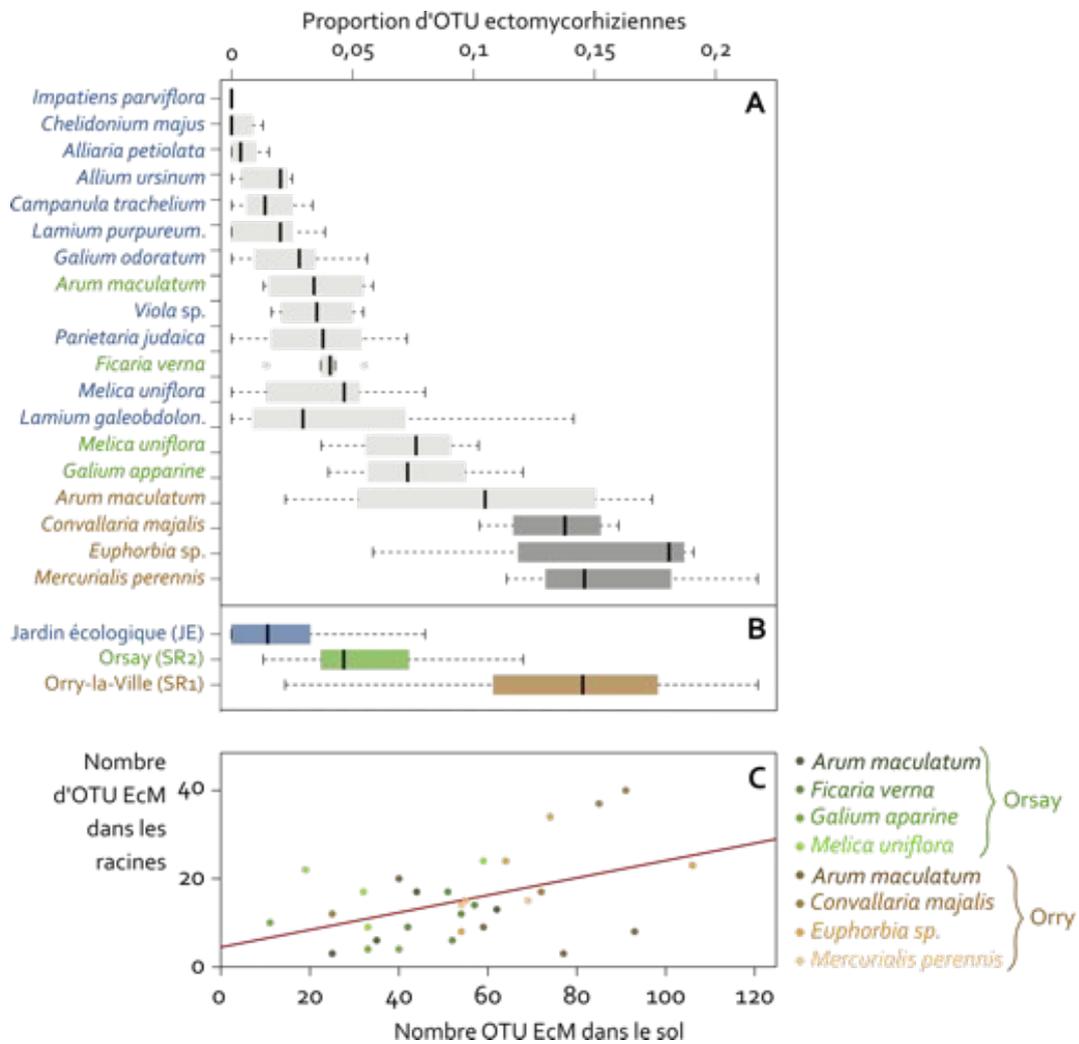


Figure 21 – Proportion d'OTU assignées à des taxons EcM dans les racines des plantes herbacées selon leur espèce (A) ou le lieu d'échantillonnage (B). Les couleurs différentes indiquent une différence de proportion d'OTU EcM-endophytes (pairwise t-test $p < 0,001$). Les espèces provenant du jardin écologique (JE) sont indiquées en bleue, celles d'Orsay (SR) en vert et celles d'Orry-la-Ville (SR) en marron. (C) Nombre d'OTU assignées à des taxons EcM dans les racines de plantes herbacées en fonction de la richesse dans le sol. Chaque point correspond à une espèce végétale. Le nombre de taxons EcM-endophytes dans les racines est proportionnel au nombre présent dans le sol : la droite rouge correspond à la droite de régression du modèle linéaire $OTU_{racines} = a * OTU_{sol}$ avec $a = 0,19$ ($p < 0,01$ et $R^2 = 0,22$).

5.4 Discussion : ectomycorhize et endophytisme opportuniste

5.4.1 Une première approche de l'endophytisme

Ces premiers jeux de séquençage indiquent la présence d'une certaine diversité de champignons EcM dans les racines de plantes non-EcM. Cette approche est préliminaire, car une seule technique a été utilisée et les résultats sont donc à considérer avec les limites inhérentes à cette technique. Les amorces utilisées, bien que censées amplifier la plupart des taxons (Op de Beeck *et al.*, 2014), peuvent avoir plus d'affinité pour certaines séquences d'ADN que pour d'autres ; les PCR peuvent être biaisées, en amplifiant davantage les petits fragments par exemple (Eisenstein, 2018) ; la définition des OTU est effectuée avec un seuil de similarité constant (97 % comme dans la plupart des études ; Hughes *et al.*, 2009) alors même que ce seuil entre espèces biologiques dépend en réalité de chaque genre...

Par ailleurs, le nombre d'OTU assignées à chaque genre ou famille fongique a été utilisé comme approximation de l'abondance d'un taxon, afin d'éviter les biais liés au nombre de séquences assignées à chaque OTU (Amend *et al.*, 2010 ; Lindhal *et al.*, 2013), mais cette mesure mériterait d'être affinée (par exemple avec des détections par qPCR). Enfin, les différents filtres de qualité appliqués aux données peuvent empêcher de détecter certains taxons : en particulier, il est recommandé d'écarter les OTU contenant moins d'un certain nombre de séquences (5 à 10 ; Lindhal *et al.*, 2013) car pouvant résulter d'erreur de séquençage ou de contaminations. Cependant, ces données écartées peuvent parfois correspondre à une réalité biologique qui ne sera alors pas détectée (Selosse *et al.*, 2010).

Dans les deux chapitres précédents, la multiplication des approches permettait d'écarter l'hypothèse de contamination : l'absence de séquence de Truffe dans les feuilles des échantillons et la détection par microscopie ou par qPCR sont autant de preuves de la réalité biologique des observations faites. Ces différentes méthodes croisées devront être appliquées aux nombreuses familles fongiques EcM détectées en endophytes, afin de confirmer les observations et de mieux circonscrire ce phénomène.

5.4.2 Endophytisme opportuniste des champignons EcM

La distribution de l'endophytisme observée parmi les taxons EcM rencontrés plaide pour un endophytisme de type opportuniste, tel que défini par Hardoim *et al.* (2015). En effet, tous les taxons EcM présents dans le sol sont concernés, sauf les moins abondants, et leur présence dans les racines des plantes herbacées semble être corrélée à leur abondance dans le sol environnant (endophytisme des Truffes ou des Russules dans leurs brûlés respectifs, corrélation entre abondance des taxons fongiques dans le sol et dans les racines). L'endophytisme n'est pas indispensable pour ces taxons, qui tirent leurs ressources carbonées de leur arbre-hôte, mais semble davantage dépendre de la probabilité de rencontre entre hyphes des taxons EcM et racines des plantes non-EcM.

Ce type de colonisation racinaire est connue chez les champignons AM qui colonisent des plantes non-AM, souvent des plantes non-mycorhiziennes comme les Brassicaceae (Cosme

et al., 2018). De Mars et Boerner (1996) indiquent qu'un certain nombre de Brassicaceae sont colonisées à des degrés variés par des Gloméromycètes, des arbuscules et des vésicules caractéristiques ayant même été observées chez certaines espèces lorsqu'elles sont en présence de plantes-hôtes endomycorhizées (Regvar *et al.*, 2003). Cette colonisation de plantes non-hôtes par des champignons AM oscille donc entre endophytisme opportuniste et véritable mycorhize selon les partenaires en présence, les interactions dans lesquelles des structures d'échanges sont mises en place restant tout de même très minoritaires.

De même, dans le cas des champignons EcM, la colonisation des racines de plantes non-EcM semble être surtout dépendante de la rencontre entre hyphes EcM et racines non-EcM, mais certains indices laissent supposer qu'il pourrait y avoir plus qu'une colonisation passive. En particulier, l'existence du brûlé chez les Russules, les Truffes et peut-être d'autres taxons d'une part, et les expériences en mésocosmes de Taschen *et al.* (2019) d'autre part, suggèrent la possibilité d'échanges ou de transferts entre plante endophytée et mycélium endophyte. La prévalence de cette double niche écologique ainsi que son évolution sont discutées plus largement dans la troisième partie de la discussion générale.

III Discussion et perspectives

Biologie reproductive de la Truffe noire, endémique et introduite

1.1 Les spores, une fonction mâle dans la reproduction ?

1.1.1 Bilan des connaissances

La première partie de cette thèse s'est attachée à préciser la biologie reproductive de la Truffe noire, dans la lignée des études italiennes et françaises de génétique des populations initiées il y a un peu plus de dix ans. Les truffières étudiées, l'une en Languedoc sur deux années consécutives et les deux autres en Australie (**Chapitre 2**), ont globalement confirmé les structures mises en évidence par les études précédentes : la reproduction de *T. melanosporum* implique deux partenaires de type sexuel opposé, avec des investissements sexuels différents. Tandis que le partenaire paternel ne laisse que ses gènes dans les spores méiotiques, le partenaire maternel met en place les tissus stériles de l'ascocarpe, en plus des spores. La différenciation entre partenaires parentaux se traduit aussi par une structure génétique distincte.

Aussi bien en France qu'en Australie, les génotypes maternels sont de grande taille et participent à de nombreux ascocarpes (jusqu'à plus d'une vingtaine la même année). Les données françaises indiquent que 15 à 30 % des individus maternels sont pérennes d'une année à l'autre, et parfois pendant 4 ou 5 ans. À l'inverse, les génotypes paternels sont de taille plus restreinte puisqu'ils ne participent souvent qu'à un seul ascocarpe (en moyenne moins de deux) et seuls 2 à 10 % de ces génotypes perdurent plus d'un an. Ces mêmes différences ont été mises en évidence pour la Truffe de Bourgogne, bien qu'avec un nombre d'ascocarpes réduit (**Artiel IV**). Ces différences de taille et de persistance sont à mettre en lien avec l'association symbiotique entre arbres-hôtes et partenaires maternels (Le Tacon *et al.*, 2013, 2015) : la fonction mâle demande peu de ressources puisque la vie végétative des individus paternels est courte, tandis que la fonction femelle nécessite de pouvoir alimenter l'ascocarpe. La différence de structure génétique pourrait aussi impliquer les plantes herbacées, avec lesquelles seuls les partenaires maternels semblent interagir (**Chapitres 3 et 4**). Cette question sera abordée dans la suite de la discussion.

En terme de structure spatiale, le génotypage de la truffière de G. Serane (Languedoc) confirme l'agrégation des ascocarpes par type sexuel maternel et l'existence d'un isolement par la distance (IBD) marqué, à la fois pour les partenaires maternels (Taschen *et al.*, 2016 ; De la Varga *et al.*, 2017), mais aussi pour les partenaires paternels (jusque-là mis en évidence sur une

seule truffière par De la Varga *et al.*, 2017). Un IBD comparable est détecté pour les partenaires paternels de l'une des truffières australiennes, mais la non-exhaustivité de l'échantillonnage ne permet pas de conclure sur l'agrégation par type sexuel en Australie. La faible distance de dispersion suggérée par l'IBD s'accompagne d'un apparemment élevé entre partenaires parentaux, lié au fait que les individus issus d'un même événement de reproduction s'éloignent peu les uns des autres, à la fois en France et en Australie. Consanguinité et IBD entrent en contradiction apparente avec l'agrégation des ascocarpes par type sexuel et l'absence des partenaires paternels dans les ectomycorhizes et les plantes herbacées, ce qui a poussé à proposer les spores comme partenaires paternels (Murat *et al.*, 2013; Selosse *et al.*, 2013). La fonction mâle des spores a aussi été suggérée chez les morilles (genre *Morchella*, Pézizomycètes) et pourrait être une caractéristique répandue chez les Pézizomycètes en général (Du *et al.*, 2017).

1.1.2 Nécessité de démontrer le rôle des spores

Le rôle des spores comme partenaires paternels – après une brève germination ou éventuellement une survie en saprotrophe dans le sol – permet en effet de dépasser le paradoxe précédent (**Article I**) : des spores des deux types sexuels sont présentes dans les ascocarpes et donc dispersées conjointement. La banque de spores du sol contient donc des individus des deux types sexuels, ce qui lève le problème de l'absence des partenaires paternels à proximité des partenaires maternels, suggérée par l'agrégation des types sexuels. Cependant, bien que ce modèle explique correctement les données observées, il est nécessaire de le démontrer rigoureusement. L'option la plus directe est d'introduire dans une truffière des spores de génotype connu sur une partie des brûlés ; le génotypage des ascocarpes récoltés les années suivantes dans les zones inoculées et non-inoculées permet de rechercher le génotype des spores introduites, à la fois dans les spores et dans les glébas. Une telle étude nécessite d'une part de connaître la diversité génétique déjà présente sur les truffières choisies et de disposer de truffes suffisamment différentes génétiquement pour distinguer les génotypes résidents et introduits. D'autre part, ce type d'analyses – qui doivent être répétées de manière homogène et effectuées sur le long terme – repose sur la disponibilité et la bonne volonté des trufficulteurs. Malgré ces contraintes, une expérience de ce type a été mise en place par Elisa Taschen et collaborateurs en 2015, et devrait bientôt livrer ses résultats.

Cette démonstration a toute son importance pour la trufficulture : le ré-ensemencement des brûlés est une pratique empirique qui n'a pas attendu la science pour être mise en place (Murat, 2015). Cependant, si les spores apportées sur les brûlés participent effectivement à la reproduction, alors il est nécessaire de prêter attention à la qualité de l'inoculum (Selosse *et al.*, 2013; Murat *et al.*, 2017). Classiquement, les trufficulteurs utilisent des ascocarpes impropres à la vente car abîmés ou non-matures, ce qui pourrait détériorer la qualité des ascocarpes à venir si ces caractéristiques s'avéraient avoir une base génétique. De plus, des différences génétiques régionales ont été mises en évidence entre les populations européennes de Truffe noire (Murat *et al.*, 2004; Riccioni *et al.*, 2008; García-Cunchillos *et al.*, 2014), voire au sein des populations françaises (Taschen *et al.*, 2016; **Chapitre 2**). À l'heure actuelle, on ne sait pas si ces différences sont corrélées aux qualités organoleptiques des ascocarpes, mais il peut être prudent de préserver de potentielles différences régionales en terme de goût (Splivallo *et al.*, 2012) ou d'adaptation locale en évitant les croisements trop éloignés.

La ré-inoculation des brûlés vise à enrichir la banque de spores de *T. melanosporum* du sol. Si celle-ci est absente des zones d'introduction comme l'Australie, il n'en est probablement pas de même pour la zone d'endémisme de la Truffe noire. La pertinence de l'apport de spores a donc été questionnée en évaluant la quantité de spores laissées dans le sol des brûlés.

1.1.3 Évaluation de la banque de spores

La banque de spores du sol est alimentée par des spores de provenance plus ou moins éloignée, depuis les spores apportées de loin par les trufficulteurs ou les fèces des grands animaux disperseurs (parfois plusieurs kilomètres ; Horton, 2017) jusqu'aux ascocarpes non détectés qui restent sur place. La dispersion des truffes sur de longues distances est effectuée par des mammifères attirés par leurs arômes (Talou *et al.*, 1990), tels que les sangliers (Piattoni *et al.*, 2012, 2014) ou les porcs-épics (Ori *et al.*, 2018). En Australie, le rôle des bettongs et d'autres mammifères marsupiaux dans la dispersion des champignons hypogés a été mis en évidence (Nuske *et al.*, 2018). À l'inverse, les ascocarpes dégradés localement sont la cible d'animaux de petite taille appartenant à la macro- et micro-faune du sol (Barry-Étienne, Jourdan et Murat, comm. pers.), parmi lesquels les coléoptères *Leiodes cinnamomea* (Hochberg *et al.*, 2003) ou les larves des mouches truffières du genre *Suillia* (Coutin, 1989), qui dispersent les spores sur de faibles distances (Grubisha *et al.*, 2007). Entre autres, le séquençage NGS (décrit dans le Chapitre 5) du contenu stomacal de dix limaces récoltées sur une truffière corrézienne par H. Covès a confirmé leur rôle dans la dispersion des spores de *T. melanosporum* : le genre *Tuber* représentait 20 % des OTU fongiques et 80 % des séquences fongiques détectées (Fig. 22) – bien qu'on ignore tout de leur viabilité.

La dégradation *in situ* de certains ascocarpes implique qu'ils n'aient pas été détectés par les grands animaux disperseurs. La proportion d'ascocarpes dégradés localement dans les brûlés a été estimée dans six truffières, avec l'aide de trufficulteurs volontaires (**Article II**). La recherche de truffes non détectées par les chiens truffiers après la saison de récolte, dans des puits de taille constante creusés aléatoirement sur 38 brûlés, a mis en évidence qu'une proportion non négligeable d'ascocarpes restait sur place : plus de 40 % de la production pourrait ainsi rester sous terre. Les spores ingérées sont alors dispersées sur des distances plus faibles que pour les grands animaux et participent donc en germant au maintien de la structure génétique des populations de Truffe (apparemment entre partenaires et IBD). En l'absence de mammifères disperseurs, la suppression des limaces provoque d'ailleurs une diminution de la production de truffes en l'espace de deux ans, soulignant leur rôle indispensable dans la dispersion et la capacité de germination des spores (Covès et Jacson, 2016).

Ce grand nombre d'ascocarpes laissés sous terre et dispersés très localement a comme conséquence directe la création et le maintien d'une banque de spores très riche, chaque ascocarpe contenant plusieurs millions de spores (Horton, 2017). Cette réserve contient des spores des deux types sexuels, et permet donc la reproduction quelle que soit la configuration locale des types sexuels installés sur les ectomycorhizes. L'évaluation de la banque de spores indique que la proportion d'ascocarpes laissés sous terre varie d'un brûlé à l'autre, mais peut être très élevée (jusqu'à 90 %). La pratique de ré-inoculation n'est donc probablement pas indispensable de la

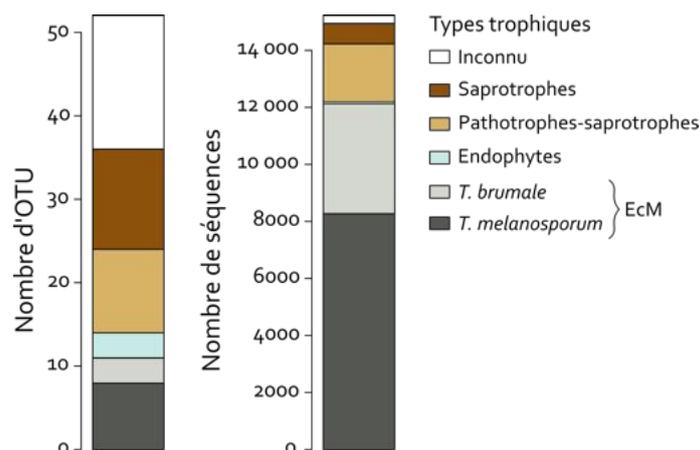


Figure 22 – Communauté fongique du contenu stomacal de dix limaces provenant d’une truffière à *T. melanosporum* (Corrèze), classée par types trophiques. *Tuber brumale* et *T. melanosporum* représentent 100 % des champignons ectomycorhiziens (EcM) détectés.

même manière sur tous les brûlés et il est probable que l’élément limitant de la reproduction sexuée ne soit pas la disponibilité en partenaires paternels (Murat *et al.*, 2013).

Les résultats de cette étude soulèvent une question : comment se fait-il qu’une aussi grande proportion d’ascocarpes puisse rester sous terre alors que des chiens dressés passent régulièrement pendant la saison de récolte pour les détecter ? L’une des possibilités est qu’il existe une grande variabilité dans les dates de maturité des ascocarpes, certains pouvant développer leurs arômes jusqu’en mars ou avril (F. Caulet et L. Genola, comm. pers.). Une autre option, proposée dans l’**Article II**, serait qu’un mécanisme empêche la production d’arômes et donc la détection par des mammifères de certains ascocarpes. Les ascocarpes inodores seraient alors dégradés sur une surface beaucoup plus restreinte et enrichiraient la banque de spores locale, tandis que les ascocarpes aromatiques participeraient au renouvellement ou à l’initiation de banques de spores distantes, à l’instar des Angiospermes produisant des formes de graines plus ou moins mobiles et donc dispersées plus ou moins loin (Imbert, 2002).

1.2 Mécanismes à l’origine de la structuration spatiale

1.2.1 L’agrégation par type sexuel, une sélection de parentèle ?

L’agrégation des génotypes maternels par type sexuel, si elle ne semble plus être un obstacle à la reproduction sexuée en privant les mycéliums de voisins compatibles, n’en reste pas moins énigmatique. Selosse *et al.* (2013) ont proposé que cette structure spatiale résulte d’un mécanisme d’incompatibilité végétative entre individus porteurs de types sexuels différents (Worrall, 1997). L’accès à l’association ectomycorhizienne avec les racines d’un arbre garantit un accès aux ressources carbonées, mais aussi à la reproduction sexuée en temps que partenaire maternel – ce qui permet en moyenne la participation à un plus grand nombre d’ascocarpes que pour les partenaires paternels. Un mécanisme d’incompatibilité végétative favoriserait l’accès aux ressources et à la reproduction des individus apparentés aux individus déjà installés, et

empêcherait compétitivement l'installation d'individus différents (Debets et Griffiths, 1998) : il s'agit donc d'une sélection de parentèle.

L'incompatibilité végétative chez les champignons filamenteux implique plusieurs locus polymorphes (locus *het* pour *heterokaryon incompatibility*; Worrall, 1997; Glass et Kaneko, 2003) : si les hyphes qui fusionnent possèdent des allèles différents pour au moins l'un des locus *het*, l'hétérocaryon issu de la fusion de ces hyphes meurt, empêchant ainsi tout échange entre les individus fongiques (Glass et Kaneko, 2003). À l'inverse, en cas de fusion compatible, un partage des cytoplasmes entre individus entraîne une coopération par la formation d'un mycélium chimère. Chez certaines espèces, comme *Ascobolus stercorarius* (appartenant aux Pézizales, comme les Truffes), *Aspergillus heterothallicus*, *Neurospora crassa* et *Sordaria brevicollis*, le locus du type sexuel fait partie des locus *het* (Glass *et al.*, 2000). Dans ces cas là, pendant la phase végétative, une différence de type sexuel induit une incompatibilité végétative, tandis que pendant la phase de reproduction cette différence est obligatoire pour qu'il y ait fécondation. Ceci implique l'existence de mécanismes génétiques particulier permettant au type sexuel de changer de fonction entre les phases végétative et sexuée (décrits par exemple chez *N. crassa*; Saupe, 2000).

Chez *Tuber melanosporum*, le locus du type sexuel pourrait être impliqué, avec d'autres locus, dans l'incompatibilité végétative, mais la difficulté à cultiver des souches *in vitro* complique la validation expérimentale. Une autre possibilité pour expliquer les zones de type sexuel homogène serait qu'un locus d'incompatibilité végétative se situe à proximité du locus MAT. À partir de plusieurs génomes publiés par Martin *et al.* (2010) et Payen *et al.* (2015), des analyses préliminaires ont été effectuées par Bastien Bennetot (Master 2 de l'Université Pierre et Marie Curie) et Christophe Lemaire (INRA, Angers). L'objectif est de rechercher des séquences non-recombinantes à proximité du locus MAT, qui soient conservées entre individus porteurs du même MAT et polymorphes entre individus porteurs de MAT différents. Cette étude se heurte cependant à une difficulté technique, le faible nombre de génomes disponibles (sept souches de *T. melanosporum* ont été séquencées), et une difficulté méthodologique, le fort apparentement entre individus spatialement proches. En effet, si une telle région génomique homogène entre individus d'une même plage de type sexuel et polymorphe entre individus éloignés était détectée, comment distinguer l'effet d'une incompatibilité végétative de l'impact de la faible distance de dispersion, et donc de l'isolement par la distance ?

Des expériences en mésocosmes pourraient peut-être apporter des pistes de réponse. En inoculant des arbres-hôtes avec des souches de mycélium de *T. melanosporum* de génotypes connus et variés, et en suivant l'évolution des génotypes présents sur les ectomycorhizes, des mécanismes d'incompatibilité pourraient être mis en évidence. Ce type d'expérience pourrait aussi permettre de tester l'hypothèse d'une compétition entre types sexuels proposée par Rubini *et al.* (2011a) et Linde et Selmes (2012).

1.2.2 Génotypes hermaphrodites et dispersion longue-distance

Un autre aspect de la structure spatiale des génotypes de *T. melanosporum* nécessite d'être exploré : si l'isolement par la distance est la règle pour la plupart des génotypes, certains sont retrouvés dans des ascocarpes éloignés parfois de plusieurs dizaines de mètres (la plupart du temps comme partenaire maternel), alors même que la Truffe noire est créditée d'une faible

capacité de dispersion à cause de l'absence de spermatis. Parmi eux, on retrouve un certain nombre de génotypes hermaphrodites (**Chapitre 2**). L'existence de ces génotypes trouvés dans des ascocarpes distants (avec le même rôle parental ou non) s'explique (1) soit parce qu'il s'agit en fait d'individus différents mais non détectés comme tels, (2) soit parce qu'il existe des mécanismes permettant une dispersion à l'échelle de la truffière.

Limites des calculs de probabilité

L'hypothèse (1) interroge quant aux outils utilisés pour définir l'appartenance à un même génotype, la p_{gen} et la p_{sex} (cf. encadré 5 p. 80; Arnaud-Haond *et al.*, 2007). La première calcule la probabilité d'apparition d'un génotype donné dans une population comme le produit de la fréquence de chaque allèle pour chaque marqueur. Elle repose donc sur l'hypothèse que toutes les combinaisons sont équiprobables compte tenu des fréquences alléliques, c'est-à-dire que la population est à l'équilibre de Hardy-Weinberg. Or les populations de Truffe noire, à cause de leur capacité de dispersion limitée, ne sont pas en panmixie. La conséquence de l'apparement entre partenaires parentaux a été exposée dans la discussion du **Chapitre 2** : plus les génotypes parentaux sont similaires, plus la probabilité d'apparition du même génotype à partir de méioses différentes (dans le même ascocarpe) est élevée. Cette probabilité atteint 12 à 16 % dans les récoltes génotypées dans cette thèse (Tableau 6 p. 82). De plus, si tous les marqueurs microsatellites étudiés sont identiques entre deux partenaires parentaux, alors la moitié des spores produites par une même méiose sera aussi identique (car seul le locus du type sexuel est alors hétérozygote). Près de 15 % des spores des récoltes génotypées dans cette thèse et 4,4 % des spores génotypées par De la Varga *et al.* (2017) sont dans ce dernier cas.

La p_{sex} donne la probabilité qu'un génotype apparaisse plusieurs fois indépendamment, à partir de méioses différentes. Elle dépend des mêmes hypothèses que la p_{gen} puisque celle-ci est incluse dans le calcul de la p_{sex} . D'autre part, la p_{sex} étant un produit de probabilités, elle tend vers 0 lorsque le nombre d'apparitions d'un génotype augmente : si un génotype est trouvé 20 fois au pied du même arbre et une fois à distance, la probabilité qu'il apparaisse 21 fois sera sûrement très faible – mais la probabilité qu'il apparaisse deux fois à deux extrémités d'une truffière pourrait ne pas être si faible. On conclura alors qu'il s'agit bien du même individu alors qu'il pourrait y en avoir deux, dont l'un a participé à de nombreux ascocarpes localement. Il est donc important de fonder les analyses sur la probabilité qu'un génotype apparaisse dans des endroits distants, et non pas autant de fois qu'il y a d'ascocarpes dans lesquels il est impliqué. Enfin, la p_{sex} étant une probabilité, un événement très peu probable reste tout de même possible.

Dans les deux cas, sont considérées comme identiques des spores ayant les mêmes allèles aux locus étudiés (microsatellites et type sexuel), mais ces spores étant issues de méioses différentes, quoiqu'à partir du même zygote, elles ne sont pas identiques à tous les locus de leur génome. Un nombre plus élevé de marqueurs polymorphes serait donc nécessaire pour distinguer des genets différents dans le contexte génétique des truffières.

Des mécanismes de dispersion longue-distance ?

La deuxième hypothèse – les ramets distants appartiennent bien au même genet – implique l'existence de processus de dispersion à longue distance. Du mycélium pourrait être dispersé par des animaux, mais il est peu probable qu'il soit encore capable de poursuivre son développement après passage dans un tube digestif, compte-tenu de l'agressivité des sucs gastriques (Piattoni *et al.*, 2012). Des spermaties n'ont jamais été observées chez *T. melanosporum* quoiqu'elles aient été décrites chez *T. borchii* et *T. oligospermum* (Urban *et al.*, 2004). Chez *T. borchii*, l'existence de spermaties ne semble toutefois pas nécessaire pour expliquer la reproduction sexuée : dans une truffière plantée d'arbres inoculés avec des mycéliums de génotype connu, les génotypes paternels sont des combinaisons des génotypes introduits, suggérant que les spores méiotiques jouent le rôle de partenaires paternels (Leonardi *et al.*, 2019). Il serait intéressant d'étudier l'existence (ou non) d'un IBD dans les populations de cette espèce.

La question des génotypes hermaphrodites rejoint celle de la dispersion. Si un même genet se trouve avec des rôles reproductifs différents dans deux ascocarpes éloignés (maternel dans l'un et paternel dans l'autre), il est tentant d'imaginer que deux méiospores sœurs identiques ont été dispersées et se sont retrouvées dans des plages de type sexuel différent, les contraignant à adopter un rôle reproductif ou l'autre. Il ne s'agirait donc pas réellement d'un *seul* individu hermaphrodite. À l'inverse, dans le cas de génotypes hermaphrodites retrouvées dans des ascocarpes proches, on peut supposer qu'un mycélium associé en ectomycorhizes dans un brûlé – dans lequel il adopte un rôle maternel – puisse s'étendre jusqu'à entrer en contact avec la plage de type sexuel opposé la plus proche et jouer alors le rôle paternel. Dans le cas de *T. borchii*, le seul génotype hermaphrodite de la population est retrouvé dans des ascocarpes situés dans des brûlés adjacents (Leonardi *et al.*, en relecture). Dans la truffière de G. Serane, le génotype hermaphrodite trouvé en 1997 est aussi dans deux brûlés voisins (7 m) dont les ectomycorhizes sont de type sexuel opposé. Dans les truffières australiennes, trois génotypes hermaphrodites sont retrouvés dans des ascocarpes situés au pied du même arbre, mais l'échantillonnage partiel et la localisation approximative des ascocarpes ne permettent pas de dire s'ils sont en limite de zones de même type sexuel.

1.3 Prochains mystères à élucider

Toutes les questions abordées précédemment tirent leur origine d'un même mystère : comment se passe la fécondation chez les Truffes ? Bien que l'existence de gamètes mâles sous forme de mitospores (les spermaties) semble peu probable, la question des structures reproductrices impliquées n'est pas résolue puisque celles-ci n'ont pas été observées avec certitude (Callot, 1999). L'ensemble des connaissances actuelles suggère plutôt l'intervention d'un mycélium comme partenaire paternel : fugace germination d'une spore méiotique dans la plupart des cas (avec ou sans brève survie en saprotrophe), il pourrait aussi s'agir d'un mycélium installé en ectomycorhizes s'étendant jusqu'à une zone voisine de type sexuel opposé. La capacité de survie du mycélium libre dans le sol reste aussi à évaluer, puisque certains génotypes paternels semblent être pérennes (bien que là encore il puisse s'agir de spores génétiquement identiques issues d'un même ascocarpe, qui ne germeraient pas la même année).

Si la question de la nature et de la rencontre des partenaires n'est pas encore complètement résolue, la suite de leur histoire n'est pas moins mystérieuse : où est quand ont lieu la plasmogamie et la caryogamie ? L'étude de très jeunes ascocarpes de *T. melanosporum* donne des résultats contrastés (Taschen, non publié) : certains ne présentent qu'un seul type sexuel, d'autres les deux. Chez la plupart des Ascomycètes, une partie des tissus stérile est dicaryotique car résultant de la plasmogamie, mais chez *T. melanosporum* la gléba est uniformément haploïde (en témoigne le fait qu'elle a longtemps été considérée comme homothallique) et de génotype homogène dans l'ascocarpe (première partie du **Chapitre I**). Les étapes cellulaires de la fécondation restent donc encore à élucider.

Endophytisme des Truffes et lien à la filière de production

2.1 Premières preuves de l'endophytisme des Truffes

2.1.1 Récapitulons

L'existence des brûlés dans les truffières à *Tuber melanosporum* et dans une moindre mesure dans les truffières à *T. aestivum* suggère une interaction entre Truffes et plantes herbacées. Les interactions indirectes par composés organiques volatils interposés ont été mises en évidence pour les deux espèces de Truffe (Paccioni, 1991 ; Splivallo *et al.*, 2007, 2009 ; Angelini *et al.*, 2015). Une interaction plus directe entre systèmes racinaire et mycélien a été suggérée par Plattner et Hall (1995) pour la Truffe noire et Gryndler *et al.* (2014) pour la Truffe de Bourgogne. Dans les deux cas, ces publications ont ouvert des perspectives : l'interaction entre les plantes herbacées du brûlé et *T. aestivum* ou *T. melanosporum* a donc été explorée.

La première étape a été de vérifier par des méthodes moléculaires la présence de Truffe dans les racines des plantes herbacées poussant sur les brûlés. Par PCR spécifique ou par séquençage NGS de la communauté fongique, la Truffe noire a été détectée dans le système racinaire de 82 espèces de plantes herbacées parmi les 93 testées (88 %), appartenant à 25 familles botaniques (**Articles III et IV**). La Truffe de Bourgogne a été détectée dans les racines de 15 des 17 espèces testées (88 %) appartenant à 11 familles (**Article IV**), qui s'additionnent aux 10 espèces de plantes herbacées positives sur 11 testées par Gryndler *et al.* (2014). Ces détections ont été observées très majoritairement sur des plantes récoltées en brûlé, des séquences de Truffe noire ayant été détectées dans un seul échantillon récolté hors brûlé. À ces détections s'ajoute le génotypage des individus qui colonisent les racines des plantes herbacées. En plus d'indiquer que les hyphes de Truffe sont présents dans les racines des plantes herbacées en quantité et qualité suffisantes pour être génotypés, cette méthode a montré que seuls les individus maternels sont détectables, quel que soit le moment de collecte. Des échantillonnages ont été fait avant ou après la saison de récolte des ascocarpes, et l'on retrouve des individus maternels impliqués dans les ascocarpes de l'année d'avant (**Article III**) ou dans ceux de l'année d'après (**Article IV**). Il semble donc qu'il ne s'agisse pas seulement de quelques hyphes éparses en surface des racines, mais plutôt d'une réelle colonisation.

Afin d'éclaircir ce point, un protocole d'hybridation *in situ* (FISH) a été mis en place pour la Truffe noire, avec Aurélie Deveau (INRA, Nancy) : une amorce fluorescente spécifique de *T. melanosporum* visant l'ARN a été utilisée pour visualiser le mycélium dans les racines de plantes herbacées. Cette technique a permis d'obtenir avec succès des images d'hyphes de Truffe noire longeant les cellules racinaires dans l'apoplasme (**Article IV**), confirmant la présence de mycélium vivant dans les racines (l'ARN étant rapidement dégradé, les sondes n'auraient pas trouvé de cible dans des tissus morts). Ces observations valident donc la pertinence de qualifier cette interaction d'endophyte, en temps que colonisation diffuse intra-racinaire sans structure spécifique apparente (notamment mycorhizienne : peloton, arbuscule ou réseau de Hartig).

La question de l'endophytisme a aussi été abordée sous l'angle fonctionnel. L'expression de quelques gènes de la Truffe de Bourgogne a été évaluée dans des ectomycorhizes, des ascocarpes et des racines de plantes herbacées récoltées en truffière, avec Pierre-Emmanuel Courty (INRA, Dijon). Certains gènes étant exprimés dans les racines, cette analyse confirme que le mycélium de Truffe de Bourgogne endophyte est métaboliquement actif (**Article IV**).

2.1.2 Prochaines étapes

Ces résultats sont prometteurs mais restent limités. En particulier, la technique de FISH ne permet pas de caractériser précisément l'interaction entre hyphes et cellules racinaires. En effet, les images obtenues sont trop imprécises pour affirmer où les hyphes de *T. melanosporum* se situent exactement dans la paroi végétale, ni pour savoir si les cellules avec lesquelles ils sont en contact sont vivantes, sénescents ou mortes. Les racines observées ayant été choisies pour leur état apparent de bonne santé, la présence de Truffe noire ne semble pas être associée aux nécroses observées par Plattner et Hall (1995), mais des images plus précises sont nécessaires. Pour cela, l'observation des racines au microscope électronique à transmission (TEM) serait pertinente, mais la juxtaposition des protocoles de FISH (indispensable pour assurer l'identité spécifique des hyphes) et de TEM n'est pas évidente. Entre autre, l'observation d'échantillons au TEM nécessite des coupes fines, ce qui diminue la probabilité d'observer des hyphes vivant dans l'épaisseur de la racine, alors que la microscopie confocale permet ce type d'analyse.

Pour s'affranchir de l'hybridation *in situ*, il faudrait pouvoir manipuler des plantes herbacées avec lesquelles seule l'espèce fongique qui nous intéresse (*T. melanosporum*, *T. aestivum* ou pourquoi pas d'autres espèces) pourrait interagir. Les hyphes observés seraient alors attribuables à l'espèce étudiée. Une expérience dans ce sens a été mise en place avec A. Deveau : neuf plantules d'*Arabidopsis thaliana* stériles ont été mises en culture avec des fragments de mycélium vivant de *T. melanosporum* (souche Mel28) et trois sans mycélium, dans des conditions de stérilité garantissant au maximum l'absence de contamination fongique. Ces cultures avec ou sans mycélium ont été placées dans des conditions de croissance contrôlées (éclairage, humidité, température) et observées au microscope confocal au bout de 3, 7 et 15 jours. Si des hyphes sont bien observés au contact des racines, aucun n'entre dans la racine au bout de deux semaines de co-culture (Fig. 23). Cette expérience n'a pas pu être prolongée, mais elle mériterait d'être répétée, en faisant varier les conditions de culture : en particulier, l'issue de l'interaction dépend peut-être du statut nutritionnel des espèces en présence, et donc du milieu dans lequel elles sont cultivées.

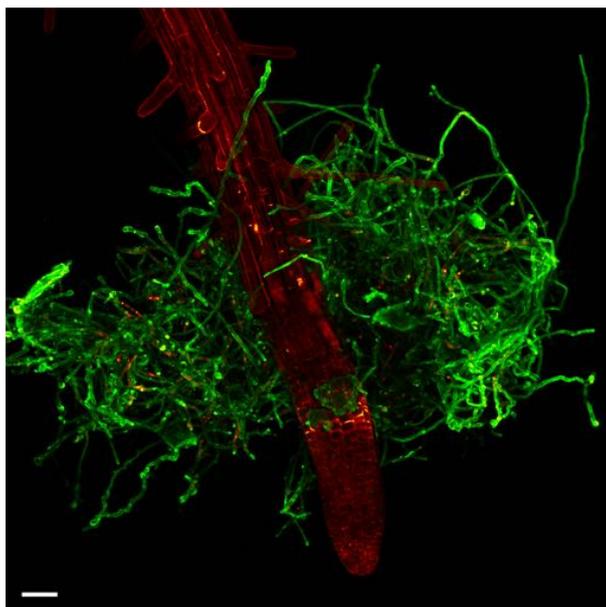


Figure 23 – Racine d'*Arabidopsis thaliana* après 15 jours en présence de mycélium de *T. melanosporum*. Le mycélium est marqué au WGA (en vert) et les parois des cellules racinaires apparaissent en rouge. La barre blanche correspond à 50 μm . Photo A. Deveau.

Enfin, la caractérisation fonctionnelle de l'interaction est indispensable pour saisir le rôle écologique de l'endophytisme des Truffes, et éventuellement proposer des pratiques de culture adaptées. Pour cela, une étude de l'ensemble du transcriptome du mycélium endophyte et de la racine colonisée, sans *a priori* sur les gènes exprimés ou non, permettrait de mieux comprendre les transferts ou échanges éventuels ayant lieu entre les deux partenaires.

2.2 Les Truffes dans leur écosystème

2.2.1 Impact controversé de l'interaction sur le cycle de vie des Truffes

Les connaissances actuelles sur l'impact de l'interaction entre Truffes et plantes herbacées sont encore lacunaires, et reposent soit sur l'empirisme des trufficulteurs, soit sur des expériences caractérisant la quantité de mycélium dans le sol ou le taux de mycorhization des arbres-hôtes, mais jamais la production d'ascocarpes. Entre autre, le semis de fétuque ovine (*Festuca ovina*) au pied de noisetiers inoculés avec *T. melanosporum* diminue la mycorhization des arbres (Mamoun et Olivier, 1997). De même, l'usage de glyphosate pour contrôler l'enherbement des brûlés augmente la mycorhization (Olivera *et al.*, 2011). Le désherbage chimique est d'ailleurs largement utilisé en Australie, où la production d'ascocarpes est généralement satisfaisante (Murat et Sourzat, comm. pers.). À l'inverse, certaines plantes sont considérées comme ayant un impact positif sur la Truffe, dont d'ailleurs *F. ovina* (Sourzat, 1983 ; Martegoutte et Courdeau, 2002 ; Taschen *et al.*, 2019). Dans une expérience en mésocosme, Taschen *et al.* (2019) ont mis en évidence une augmentation de la quantité de mycélium de *T. melanosporum* dans le sol en présence de plantes herbacées, ainsi qu'une augmentation de la quantité d'azote et de phosphore dans les feuilles de l'arbre-hôte mycorhizé par *T. melanosporum* en présence de plantes herbacées.

La caractérisation de l'impact des plantes herbacées a toute son importance dans la définition des itinéraires techniques en trufficulture. En effet, dans un contexte d'aridification des écosystèmes méditerranéens (Giorgi et Lionello, 2008), la gestion de l'eau est déjà une question importante. Par ailleurs, l'usage de pesticides questionne quant aux impacts possibles sur la santé humaine et celle des écosystèmes.

2.2.2 Effets possibles de l'interaction entre Truffes et plantes herbacées

Les impacts de l'interaction entre Truffes et plantes herbacées peuvent être multiples. Plusieurs études proposent que la diminution de l'abondance des plantes herbacées dans les brûlés soit la conséquence d'une compétition pour l'eau, ou éventuellement pour les nutriments (Olivera *et al.*, 2011 ; Streiblova *et al.*, 2012). Cependant, la mise en évidence d'une interaction physique entre racines et mycélium suggère un mécanisme plus direct, posant la question de transferts nutritionnels (ce qui n'exclue pas une compétition indirecte). Le mycélium de *Tuber* tire-t-il une quelconque ressource des racines des plantes herbacées, comme pourrait le laisser penser l'expression d'un transporteur de sucre dans le mycélium endophyte (toutefois dans des proportions bien plus faibles que dans les ectomycorhizes ; **Article IV**) ? À l'inverse, les plantes herbacées qui survivent sur les brûlés pourraient-elles justement être celles qui arrivent à tirer profit de la présence de Truffe, quand les autres dépérissent ?

Une étude de transcriptomique pourrait apporter des réponses à ces questions et la comparaison de plantes herbacées en bonne santé avec des plantes dépérissantes enrichirait l'analyse. L'étude de Taschen *et al.* (2019) indique déjà que la Truffe est au cœur d'interactions entre plantes endomycorhiziennes (AM) et ectomycorhiziennes (EcM), au détriment des premières et au bénéfice des secondes. Il est certain que les plantes herbacées ne sont pas indispensables à la production d'ascocarpes, mais si le brûlé résultait d'un parasitisme des plantes herbacées par la Truffe qui en bénéficie, alors il peut être avantageux de laisser en place la couverture herbacée du brûlé. En revanche, si cette végétation entre en compétition avec la Truffe et/ou l'arbre-hôte, la supprimer diminuerait la compétition. Des études de très long terme seraient nécessaires pour distinguer les différents effets, sans doute complexes, des plantes herbacées (relations trophiques, compétition pour l'eau, mais aussi limitation de l'assèchement du sol en été, décompactage du sol, augmentation de la teneur en matière organique, *etc.*).

L'endophytisme semble donc être une niche écologique supplémentaire pour la Truffe. La recherche de mycélium endophyte au cours de l'année permettrait de caractériser la dynamique de cette interaction. En effet, les échantillonnages de cette thèse ont tous été réalisés au début de l'été pour la Truffe noire et en automne pour la Truffe de Bourgogne, et ne donnent donc qu'un instantané de l'interaction. Par ailleurs, ces échantillonnages ont eu lieu dans des truffières plantées, à l'exception de l'échantillonnage d'un brûlé, et l'analyse gagnerait à être répétée dans différentes truffières spontanées. Les premières études menées sur *T. melanosporum* et *T. aestivum* indiquent que ce sont surtout les individus maternels qui interagissent avec les plantes herbacées (**Articles III et IV**) : la niche écologique endophyte ne résout donc pas la question du mode de vie des partenaires paternels, surtout concernant la survie dans le sol de ceux qui persistent plusieurs années.

Endophytisme et niche écologique des champignons

3.1 La double niche écologique ectomycorhizienne et endophyte, une caractéristique répandue ?

3.1.1 Résumé de la situation

Des espèces de Truffes autres que *T. aestivum* et *T. melanosporum* ont été détectées dans les différents séquençages des racines de plantes herbacées : *T. brumale*, *T. mesentericum* et *T. puberulum* dans les brûlés à *T. melanosporum* (**Article III, Chapitre 5**), *T. brumale* et *T. rapaeodorum* dans les brûlés à *T. aestivum* (**Article IV**), mais aussi un grand nombre d'OTU assignées au genre *Tuber* dans les racines de plantes herbacées de sous-bois (**Chapitre 5**). La double niche écologique EcM et endophyte n'est donc pas restreinte à des espèces responsables de la formation de brûlés.

Les analyses effectuées dans cette thèse permettent de détecter couramment dans les racines des plantes herbacées non-EcM un certain nombre de taxons EcM : Pyronemataceae, Sclerodermataceae, Sebacinaceae, Thelephoraceae et Tuberaceae sont retrouvées aussi bien dans les racines des plantes herbacées des brûlés que dans celles des forêts franciliennes, tandis que les Russulaceae sont présentes en abondance dans les herbacées des brûlés à Russule et des forêts d'Île-de-France. Ces mêmes groupes sont retrouvés par d'autres études portant spécifiquement sur l'endophytisme de champignons EcM ou plus généralement sur les communautés fongiques des racines de plantes non-EcM (Tableau 9).

Le double échantillonnage du sol et des racines avait pour objectif de distinguer l'effet de l'abondance d'une espèce fongique dans le sol d'une part et de ses capacités propres d'endophyte d'autre part. Dans les brûlés (à Truffe ou à Russule), une espèce EcM domine les autres et l'endophytisme pourrait donc s'apparenter à une colonisation passive liée à la très grande abondance de mycélium dans le sol, tandis que dans une forêt, la diversité des champignons EcM est plus élevée. Les résultats obtenus sur ces deux échantillonnages tendent à montrer que l'abondance d'un genre EcM dans les racines des plantes non-EcM est corrélée principalement à son abondance dans le sol : la plupart des genres présents dans le sol le sont aussi dans les racines. Seules les Atheliaceae (trois genres) et les Pezizaceae (deux genres) ne sont jamais retrouvées dans les racines, mais ces familles sont présentes en très faible quantité (deux à cinq OTU maximum,

Tableau 9 – Détection de champignons EcM endophytes dans les racines de plantes non-EcM, dans différents contextes d'étude.

Type d'étude	Taxon(s) fongique(s)	Plantes	Publication
<i>in vitro</i> ¹	<i>Tricholoma matsutake</i>	<i>Cedrela odorata</i>	Murata <i>et al.</i> , 2013
		<i>Prunus speciosa</i>	Murata <i>et al.</i> , 2014
<i>in vivo</i> , détection spécifique ²	Sebacinales	Plantes herbacées	Selosse <i>et al.</i> (2009) ; Weiß <i>et al.</i> (2016)
	<i>Tuber aestivum</i>	Plantes herbacées	Gryndler <i>et al.</i> (2014) ; Article IV
	<i>T. melanosporum</i>	Plantes herbacées	Article III
<i>in natura</i> , clonage	<i>Boletus satanas</i> , <i>Xerocomus chrysenteron</i>	<i>Arrhenatherum elatius</i>	Vandenkoornhuysen <i>et al.</i> , 2002
	<i>Meliniomyces</i> , <i>Rhizopogon</i>	<i>Chamaecyparis obtusa</i>	Toju et Sato, 2018
<i>in vivo</i> , metabarcoding ³	<i>Russula</i> , <i>Sebacina</i> , <i>Tomentella</i> , <i>Tuber...</i>	Plantes herbacées	Chapitre 5
	Cortinariaceae, Inocybaceae, Sclerodermataceae, Sebacinaceae, Thelephoraceae, Tuberaceae...	Orchidées tempérées	Jacquemyn <i>et al.</i> , 2017 ; Mujica <i>et al.</i> (en préparation)
	Pezizaceae, Sebacinaceae, Thelephoraceae...	Orchidées tropicales	Petrolli, Martos et Selosse (non publié)

¹ Culture *in vitro* d'un taxon fongique donné avec une plante donnée.

² Recherche spécifique d'un taxon fongique par PCR dans des racines de plantes herbacées.

³ Metabarcoding de la communauté fongique de racines de plantes herbacées.

contre plusieurs dizaines d'OTU pour les familles les plus représentées). Ceci suggère que le même mécanisme est à l'œuvre dans les brûlés et dans les sols de forêt tempérée : l'abondance de mycélium dans le sol s'accompagne d'une colonisation des racines non-EcM à proximité, sans que certains genres EcM ne témoignent d'une propension particulière à l'endophytisme. Taschen *et al.* (2019) ont proposé que cette particularité soit une propriété des champignons EcM pionniers, qui vivent dans des écosystèmes riches en herbacées et en arbustes non-EcM, mais cela reste encore à explorer. Globalement, rien ne permet à ce stade d'affirmer que certains taxons sont plus susceptibles que d'autres de coloniser les racines des plantes herbacées, mais une augmentation et une diversification de l'échantillonnage seront nécessaires pour tracer les contours phylogénétiques – s'ils existent – de cette capacité à coloniser les plantes non-EcM.

3.1.2 Limites et prochaines étapes

Cette analyse préliminaire se heurte cependant à de nombreuses limites, la première étant la manière d'estimer l'abondance des taxons fongiques dans le sol. Tout repose sur le séquençage de l'ITS fongique et présente donc les limites inhérentes à cette technique : amorces utilisées, biais de PCR, définition des OTU... Ici, le choix a été fait de travailler avec le nombre d'OTU et

non pas le nombre de séquences, peu fiable pour mener des analyses quantitatives (Amend *et al.*, 2010 ; Lindhal *et al.*, 2013), mais cette estimation de l'abondance d'un taxon n'est pas non plus idéale. Enfin, la suppression des OTU peu abondantes (Lindhal *et al.*, 2013) peut conduire à écarter des taxons ayant une vraie signification biologique (Selosse *et al.*, 2010). Néanmoins, dans l'ensemble, la multiplicité des approches (culture *in vitro*, PCR spécifique d'un taxon, analyse de la communauté fongique endophyte) et des contextes (plantes avec différents types mycorhiziens ; Tableau 9) rend peu probable que tous ces résultats ne soient que le reflet de contaminations, surtout dans la mesure où ces taxons ne produisent pas de spores mitotiques. Comme pour l'endophytisme des Truffes, il sera nécessaire de les compléter par des approches morphologiques (microscopie) et fonctionnelles (transcriptomique, culture en mésocosme, *etc.*) afin de préciser les effets de l'interaction.

Par ailleurs, le filtre exercé par la plante non-EcM colonisée n'a pas pu être estimé : en effet, les mécanismes de défense ou de criblage de l'entrée des endophytes peuvent varier d'une espèce ou d'une plante individuelle à l'autre, et influencer la capacité d'un mycélium à entrer et coloniser les tissus racinaires. Bien que les communautés de champignons EcM semblent davantage conditionnées par des filtres abiotiques que par la compatibilité avec les arbres-hôtes (Bruns *et al.*, 2002 ; Koide *et al.*, 2011), on peut envisager que certaines plantes herbacées seraient plus à même d'être colonisées que d'autres. Une analyse statistique plus poussée des données permettrait de plus de comparer les communautés EcM-endophytes dans les racines de plantes herbacées individuelles et non pas seulement à l'échelle de chaque espèce végétale.

3.2 Évolution de la double niche écologique mycorhizienne-endophyte

3.2.1 Colonisation neutre ou interaction active

L'endophytisme a été observé pour presque tous les genres fongiques EcM rencontrés, à l'exception des moins abondants. Ceci suggère que cette double niche écologique EcM-endophyte pourrait n'être que le résultat de la rencontre au hasard des racines de plantes non-EcM et des hyphes de champignons EcM, les seconds colonisant les premières à un degré dépendant de leur abondance dans le sol (plus un taxon fongique est abondant, et plus il sera probable de l'observer dans les racines des plantes herbacées). Ce scénario *neutre* ou *passif* suppose que le système immunitaire des plantes herbacées autorise cette colonisation : c'est ce qui a été observé dans l'interaction entre les champignons AM *Rhizophagus* spp. et la plante non-hôte non-mycorhizienne *Arabidopsis thaliana* (Fernández *et al.*, 2019). En présence d'une plante-hôte AM, *Rhizophagus* colonise les racines d'*A. thaliana* durant les premiers stades de l'interaction ; au bout de quelques temps, les défenses immunitaires de la plante sont activées et la colonisation diminue (Fernández *et al.*, 2019).

Chez les Brassicaceae, supposées non-AM, de nombreuses espèces sont colonisées à des degrés variés par des Gloméromycètes (De Mars et Boerner, 1996 ; Regvar *et al.*, 2003 ; Cosme *et al.*, 2018, *etc.*), suggérant que les champignons mycorhiziens peuvent interagir avec les racines de plantes non-mycorhiziennes avec des conséquences morphologiques et écologiques variées le long d'une sorte de continuum entre colonisation neutre et interaction active. Dans le cas des champignons EcM, bien que la large distribution de l'endophytisme plaide pour une colonisation

passive, d'autres indices suggèrent aussi un mécanisme plus actif et avec des conséquences sur les deux partenaires et sur l'écosystème. En particulier, la colonisation racinaire de plantes herbacées non-EcM par les Truffes est corrélée à l'existence du brûlé (**Articles III et IV**), implique l'expression de gènes du métabolisme dans le mycélium endophyte (**Article IV**) et intervient – par des mécanismes encore inconnus – dans des transferts de nutriments entre plantes (Taschen *et al.*, 2019). Décrypter les échanges éventuels dans les racines colonisées permettrait de statuer sur l'impact écologique de l'endophytisme et ouvrirait des pistes pour comprendre son évolution.

3.2.2 Trajectoires évolutives possibles

La distribution phylogénétique de la double niche EcM-endophyte questionne quant à son évolution. La capacité d'endophyte est présente chez quasi-tous les taxons trouvés dans les analyses du **Chapitre 5**, Ascomycètes comme Basidiomycètes, ce qui soutient l'idée que l'endophytisme pourrait être lié à l'évolution de la symbiose ectomycorhizienne. Il a été proposé que l'endophytisme soit une niche écologique transitoire vers l'ectomycorhize, une *salle d'attente* vers une interaction plus étroite (Selosse *et al.*, 2009 ; van der Heijden *et al.*, 2015). Brundrett et Tedersoo (2018) reconnaissent aussi des interactions intermédiaires, difficilement classables, entre symbioses AM et EcM ou entre l'absence de symbiose et la symbiose EcM.

Une hypothèse de trajectoire évolutive (Fig. 24) a été proposée dans un commentaire publié dans *New Phytologist* en 2018 (en annexe 2 p. 181). Les symbioses EcM sont apparues de multiples fois au sein de clades saprotrophes (Kohler *et al.*, 2015). Par ailleurs, une capacité à la biotrophie est détectée chez un nombre croissant de groupes saprotrophes (Grelet *et al.*, 2017 ; Smith *et al.*, 2017). À l'inverse, des groupes mycorhiziens témoignent de capacités de saprotrophes, quoique limitées (Vaario *et al.*, 2002 ; Op de Beeck *et al.*, 2018 ; Nicolas *et al.*, 2019). L'évolution de la saprotrophie vers la symbiose mycorhizienne pourrait donc passer par une étape d'endophytisme, d'abord délétère pour la plante puis bénéfique, et enfin spécialisé morphologiquement et fonctionnellement (Selosse *et al.*, 2018). De la même manière, les mycorhizes d'Orchidées (OrM) font classiquement intervenir des groupes fongiques considérés comme saprotrophes mais en réalité aussi endophytes (Ceratobasidiales, Sebaciniales et Tulasnellales, voire des *Mycena* ; Selosse et Martos, 2014) et les mycorhizes éridoïdes (ErM) impliquent des taxons aux compétences saprotrophes mais aussi endophytes reconnues (Martino *et al.*, 2018).

3.3 Repenser la niche écologique des champignons

La symbiose mycorhizienne est globalement peu spécifique : la plupart des espèces fongiques s'associe – au sein d'un type mycorhizien – avec plusieurs espèces végétales, et inversement. Cette multiplicité d'interactions relie entre elles des espèces différentes, créant ainsi des réseaux mycorhiziens à l'intérieur desquels transitent de l'eau, des nutriments ou encore des molécules de défense d'une plante à l'autre (des *common mycorrhizal networks*, CMN ; Simard *et al.*, 2012). En plus de pouvoir s'associer avec plusieurs espèces de plantes différentes, certains champignons sont aussi capables de s'impliquer dans des types de mycorhizes différents, ce qui élargit d'autant la portée des réseaux mycorhiziens. Certains champignons EcM (dont les Truffes) s'associent par

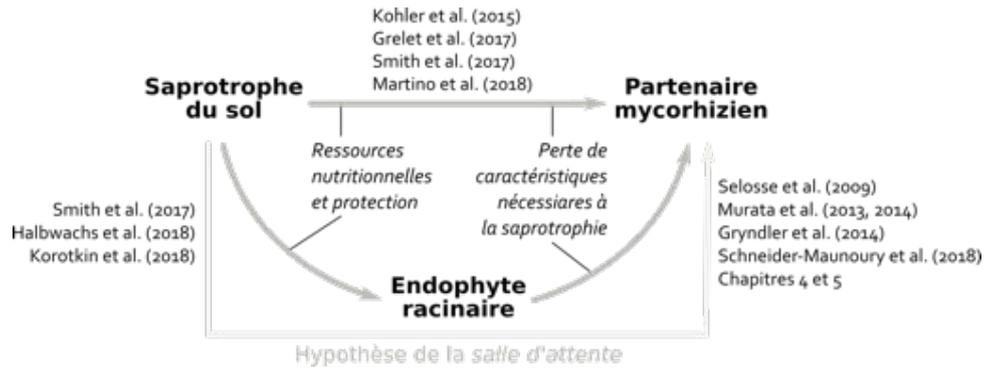


Figure 24 – Proposition de trajectoire évolutive entre saprotrophie, endophytisme et mutualisme, d’après Selosse, Schneider-Maunoury et Martos (2018). Les niches écologiques sont indiquées en **gras** et des facteurs pouvant promouvoir l’évolution d’une niche à l’autre en *italique*.

exemple à la fois avec des arbres-hôtes EcM et des orchidées (Selosse *et al.*, 2004), ou des espèces ErM sont trouvées en symbiose avec des arbres EcM (Bergero *et al.*, 2000 ; Vrålstad, 2004).

L’introduction de l’endophytisme ajoute encore des espèces potentiellement reliées entre elles par des champignons : un certain nombre de taxons mycorhiziens et endophytes est par exemple partagé entre plantes AM et EcM en forêt tempérée (Toju *et al.*, 2013 ; Peršoh, 2015 ; Toju et Sato, 2018) ou entre plantes EcM et OrM (Gonneau *et al.*, 2014 ; Jacquemyn *et al.*, 2017 ; Schiebold *et al.*, 2017). Les expériences en mésocosmes de Taschen *et al.* (2019) montrent que la Truffe noire intervient dans des interactions entre arbre EcM et plantes herbacées AM. Des transferts d’azote ont même été observés entre insectes et plantes *via* des champignons (Klironomos et Hart, 2001 ; Behie *et al.*, 2012). Prendre en compte la possibilité que des espèces fongiques occupent plusieurs niches écologiques (plusieurs types de mycorhizes, des associations mycorhizienne et endophyte, ou encore pathogène et endophyte ; Selosse *et al.*, 2018) est donc indispensable pour envisager globalement les réseaux d’interactions.

Conclusion

Les chapitres qui précèdent ont permis d'une part de préciser la structure génétique des individus impliqués dans la reproduction sexuée de la Truffe noire, et d'autre part de mettre en évidence une nouvelle niche écologique occupée par certains individus de cette espèce : l'apoplasme des racines saines des plantes herbacées. La distinction entre les rôles maternel et paternel dans la reproduction – bien visible dans les caractéristiques génétiques des deux partenaires en zone d'endémisme comme en zone d'introduction – se dessine encore davantage dans cette niche écologique endophyte : seuls les individus maternels se retrouvent dans les racines des plantes herbacées non-ectomycorhiziennes qui les entourent (sauf individus paternels hermaphrodites). Le même constat a été fait chez la Truffe de Bourgogne, dont les individus paternels sont petits et nombreux tandis que les partenaires maternels, plus étendus, occupent la double niche écologique ectomycorhizienne et endophyte. Pour ces deux espèces, comme peut-être pour d'autres *Tuber*, la fonction mâle est probablement assurée par les méiospores provenant de la banque du sol. Chez *T. melanosporum*, cette banque de spores est abondamment enrichie par la large proportion d'ascocarpes dégradés localement.

Refuge transitoire, source de nutriments pour la Truffe ou pour l'arbre-hôte, stratégie d'évitement de la compétition : le rôle de la colonisation des plantes herbacées reste encore à élucider. Néanmoins, plusieurs indices convergent vers l'existence d'une interaction directe entre racines de plantes herbacées et mycélium de Truffe, qui participe peut-être à la manifestation du brûlé et pourrait avoir un rôle à jouer dans les itinéraires techniques de la trufficulture. Cette double niche écologique n'est pas restreinte aux Truffes, mais au contraire a été observée chez un très grand nombre d'espèces fongiques ectomycorhiziennes par des techniques moléculaires. Ce travail rejoint les études, nombreuses mais dispersées, qui ont rapporté la présence imprévue de champignons dans des interactions où l'on ne les attendait pas. Ces interactions devront être confirmées par des travaux futurs convoquant des techniques variées (observations de terrain, approches moléculaires, observation microscopique ou encore expérimentations), mais elles élargissent déjà le périmètre du vaste réseau mycélien qui relie les plantes entre elles et qui connecte parfois les plantes à d'autres êtres vivants. Elles soulignent par ailleurs l'importance de multiplier les approches pour cerner au mieux le fonctionnement du monde vivant, ainsi que la nécessité de penser en dehors des *a priori*.



Annexes

Les secrets de la reproduction de la Truffe noire (Planet-vie, 2017)

Article paru en novembre 2017 sur le site planet-vie.fr, à destination des enseignants de sciences naturelles : <https://planet-vie.ens.fr/article/2458/secretsreproduction-truffe-perigord-bientot-perces-jour>.



Les secrets de la reproduction de la Truffe du Périgord bientôt percés à jour ?

Laure Schneider-Maunoury

Présentation

Présentation des modalités de reproduction de la Truffe noire du Périgord (*Tuber melanosporum*) et des difficultés à en cerner tous les aspects.

Table des matières

1. Une reproduction sexuée impliquant deux partenaires...
2. ... ayant chacun une niche écologique propre
3. Le *brûlé*, une particularité de la Truffe du Périgord
4. Le mystère du partenaire paternel en voie de résolution
5. Références

NB : « Truffe » avec une majuscule désigne ici l'espèce *Tuber melanosporum* tandis que « truffe » sans majuscule désigne la fructification comestible du champignon.

En mycologie, le terme de *truffe* désigne les champignons dont la fructification se met en place sous terre et non en surface. Parmi ces champignons souterrains, on distingue les truffes « vraies » qui appartiennent au genre *Tuber*, bien connu en Europe grâce à plusieurs espèces comestibles particulièrement appréciées, telles que la Truffe blanche du Piémont (*Tuber magnatum*) que l'on trouve quasi-exclusivement en Italie, la Truffe de Bourgogne (*Tuber aestivum*), ou encore la Truffe noire du Périgord (*Tuber melanosporum*). Cette dernière tient une place importante dans la culture et la gastronomie française, et fait depuis plusieurs décennies l'objet de tentatives de domestication.

La Truffe noire est un champignon ectomycorhizien : elle établit avec les racines d'un arbre-hôte une interaction étroite dont chaque partenaire bénéficie. Le mycélium vivant dans le sol, constitué d'hyphes haploïdes, forme autour des jeunes racines de l'arbre un manteau et pénètre entre les cellules corticales, établissant ainsi une zone de protection et d'échanges (Fig. 1A). Les hyphes mycéliens, plus fins que les racines et capables d'explorer un grand volume de sol, captent eau et minéraux qu'ils transfèrent à l'arbre. Celui-ci fournit en retour des molécules carbonées issues de la photosynthèse, telles que des sucres ou des lipides. La symbiose ectomycorhizienne permet en outre une protection mutuelle accrue des deux partenaires contre les agressions du sol.

De nombreuses études ont montré comment un « dialogue moléculaire » entre les partenaires fongique et végétal permet l'établissement de la symbiose mycorhizienne, et on sait depuis plus de 40 ans comment inoculer en pépinière les jeunes arbres avec *Tuber*

melanosporum. Plus de 80 % de la production française de truffes noires est aujourd'hui assurée par des plantations de chênes ou de noisetiers inoculés (le reste de la production provenant de truffières spontanées gérées). Cependant, de nombreux mystères entourent la formation des truffes proprement dite : si les ectomycorhizes sont indispensables à la production de la partie comestible du champignon (la « truffe » au sens commercial du terme, appelée ascocarpe, Fig. 1B), leur présence seule ne garantit pas la récolte.

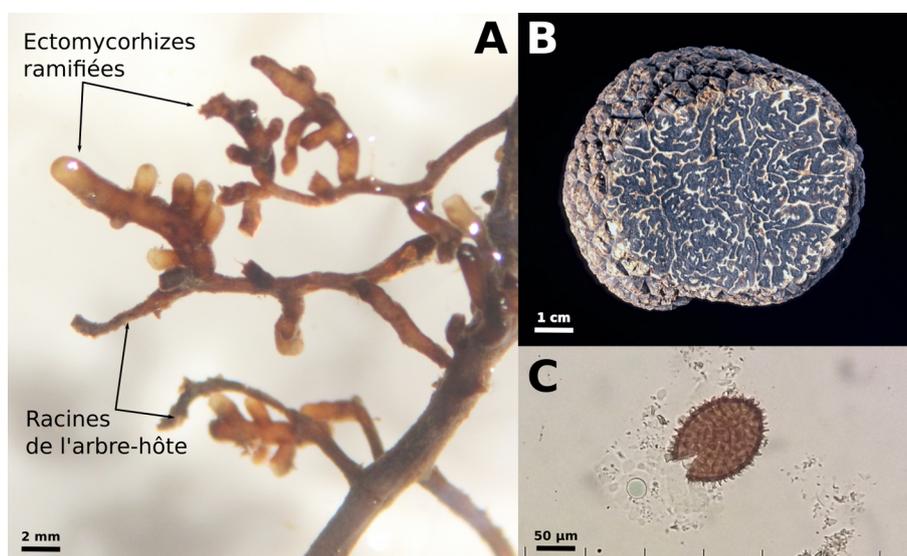


Fig. 1 : La Truffe noire, *Tuber melanosporum*. (A) ectomycorhizes de *Tuber melanosporum* sur racine de noisetier, observées à la loupe binoculaire (photo Laure Schneider-Maunoury), (B) ascocarpe de *Tuber melanosporum* (photo François Le Tacon), (C) spore de *Tuber melanosporum* observée à la loupe binoculaire (photo Laure Schneider-Maunoury).

Auteurs : Laure Schneider-Maunoury et François Le Tacon

Licence [Creative Commons - Attribution](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Une reproduction sexuée impliquant deux partenaires...

L'ascocarpe est l'équivalent anatomique du « chapeau » des champignons de surface, mais refermé sur lui-même et contenant en son sein les spores issues de la méiose, enfermées dans des asques. La chair de la truffe (les veines claires visibles sur la figure 1A) sont constituées de cellules haploïdes de génotype maternel. Les zones noires correspondent aux spores imprégnées de mélanine (Fig. 1C). Elles sont issues de la méiose de la cellule-œuf et sont donc également haploïdes mais contiennent à la fois des allèles maternels et des allèles paternels. Les appellations mâles et femelles sont données par analogie avec les espèces – telles que les animaux – dans lesquelles les individus qui investissent le plus dans la reproduction en portant la descendance sont appelés femelles et les individus investissant peu mâles. Chez la Truffe, le génotype femelle (ou maternel) est donc par convention celui retrouvé à la fois dans la chair et les spores, tandis que le génotype mâle (ou paternel) est celui trouvé uniquement dans les spores (Fig. 2).

Très peu de choses sont connues sur les mécanismes de la reproduction de la Truffe : on ignore encore quelles sont les structures reproductives mises en jeu dans la fécondation (simple mycélium, structure spécialisée ou encore cellules libres jouant le rôle de gamètes ?), s'il y a une unique fécondation et si celle-ci est suivie ou non de mitoses. L'impossibilité de cultiver la Truffe et

de produire des ascocarpes en laboratoire rend difficile l'étude de la fécondation, qui en milieu naturel se déroule sous terre, au début de l'été.

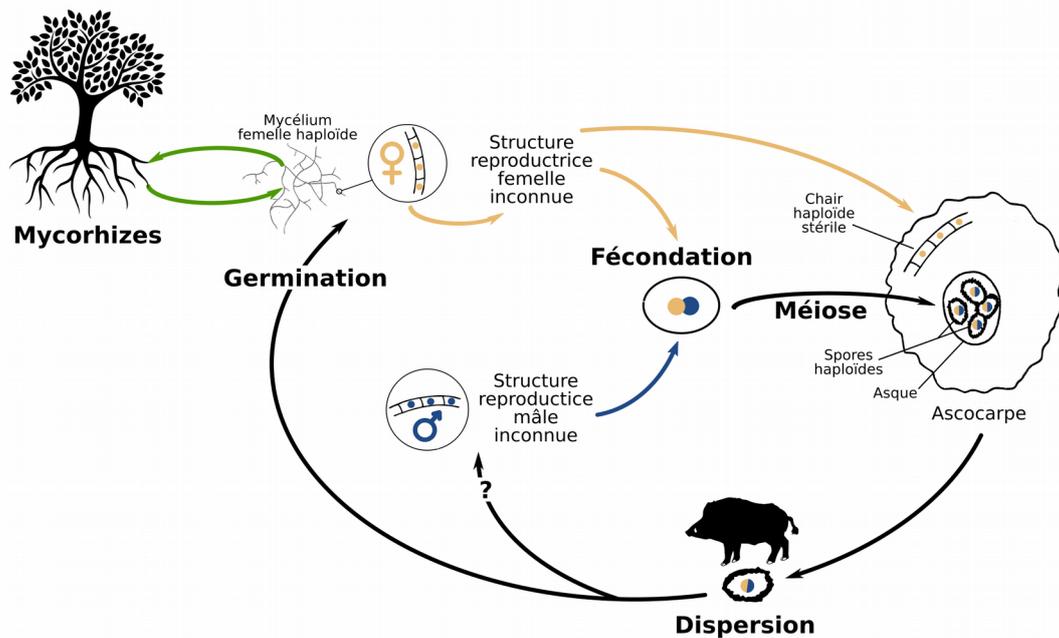


Fig. 2 : Cycle de vie de *Tuber melanosporum*

Auteur : Laure Schneider-Maunoury

Licence [Creative Commons - Attribution](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Par ailleurs, le génome de la Truffe contient un locus d'auto-incompatibilité, appelé « type sexuel » (ou *mating type*) : ce locus présente deux gènes (MAT1 ou MAT2), dont la présence conjointe est nécessaire à la reproduction. Ces deux gènes sont situés au même endroit dans le génome (même locus) mais codent chacun une protéine ayant une fonction complètement différente : on les appelle alors *desidiomorphes* et non pas des allèles. Le mycélium de *T. melanosporum* étant haploïde, chaque individu ne possède qu'un seul des deux gènes MAT, mais la présence des deux protéines codées par MAT1 et MAT2 est requise pour la fécondation : la reproduction a donc obligatoirement lieu entre deux individus différents porteurs de gènes MAT opposés. Pour autant, la Truffe est un organisme hermaphrodite, et chaque individu peut jouer le rôle mâle ou femelle dans la reproduction à condition de rencontrer un individu du type sexuel opposé (Fig. 3).

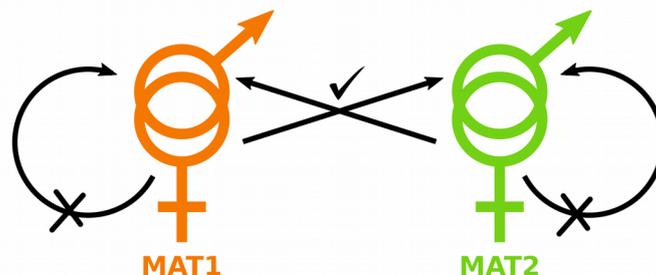


Fig. 3 : Fonctionnement des types sexuels chez *Tuber melanosporum*. Chaque individu est hermaphrodite et porteur du gène MAT1 ou du gène MAT2. La fécondation est possible entre deux individus de type sexuel opposé, mais pas entre deux individus de même type sexuel ou au sein d'un même individu (autofécondation)

Auteur : Laure Schneider-Maunoury

... ayant chacun une niche écologique propre

Des analyses génétiques ont montré que le génotype maternel des ascocarpes est aussi présent dans les ectomycorhizes avoisinantes, ce qui signifie que les individus maternels établissent des ectomycorhizes avec l'arbre-hôte. À l'inverse, les génotypes paternels ne sont jamais retrouvés sur les ectomycorhizes, indiquant que les individus mâles occupent une autre niche écologique.

Le génotypage de plusieurs centaines d'échantillons de truffes et d'ectomycorhizes pendant cinq ans a mis en évidence des différences importantes dans la structure génétique des deux populations parentales. Les individus maternels, qui forment des ectomycorhizes, sont de grande taille (de l'ordre de quelques m²), et sont impliqués dans de nombreux ascocarpes, parfois sur plusieurs saisons consécutives. Les partenaires paternels, quant à eux, participent à un petit nombre d'ascocarpes et sont très rarement trouvés deux années de suite. L'écologie des deux partenaires est donc bien distincte, l'un étant large et pérenne, l'autre petit et éphémère. Observation surprenante, on retrouve extrêmement peu de génotypes à la fois mâle dans un ascocarpe et femelle dans un autre (bien que la Truffe soit théoriquement hermaphrodite), ce qui suggère qu'un déterminisme particulier contraint le rôle reproductif de chaque individu.

Par ailleurs, les génotypes maternel et paternel d'une même truffe sont souvent très proches, témoignant d'un haut niveau de consanguinité. Enfin, proximités spatiale et génétique sont corrélées : plus les ascocarpes sont proches géographiquement dans la truffière, et plus leurs génotypes sont proches génétiquement ; inversement, plus ils sont éloignés dans la truffière, plus leurs génotypes sont différents. C'est ce qu'on appelle l'isolement par la distance (IBD ou *isolation by distance* en anglais) : chaque individu tend à se reproduire davantage avec les individus à proximité qu'avec les individus éloignés, ce qui traduit une absence de flux de gènes (qui rendrait les génotypes plus homogènes d'un bout à l'autre de la truffière). Ces indices suggèrent que les individus paternels, bien que non détectés encore, sont spatialement proches des individus maternels.

Une difficulté supplémentaire dans la recherche des partenaires paternels s'ajoute ici : au pied des arbres truffiers, on observe que les ascocarpes et les ectomycorhizes sont rassemblés par type sexuel. Dans certaines zones, toutes les ectomycorhizes et la chair des ascocarpes seront de type MAT1, tandis que dans la zone voisine elles seront MAT2. Comme la reproduction ne peut avoir lieu qu'entre individus de type sexuel opposé, cette observation entre en contradiction avec la déduction précédente selon laquelle les deux partenaires devaient être spatialement proches. Si les partenaires paternels ne peuvent pas être présents sur les ectomycorhizes mais doivent être proches des individus maternels, quelle niche peuvent-ils bien occuper ?

Le brûlé, une particularité de la Truffe du Périgord

Lorsqu'un arbre-hôte (chêne, noisetier, tilleul, charme...) est en symbiose avec *T. melanosporum*, on observe à sa base le développement d'une zone pauvre en plantes herbacées, appelée « brûlé » à cause de sa végétation rase et peu dense (Fig. 4). La présence de cette zone est corrélée à celle d'ectomycorhizes sur les racines de l'arbre, mais son existence ne s'explique pas encore. Il a récemment été mis en évidence que la Truffe colonise de manière diffuse les racines des plantes herbacées, sans dommage apparent ni structure visible (contrairement aux

ectomycorhizes). Cette colonisation, appelée « endophyte » (terme qui désigne une interaction plante-champignon sans structure morphologique spécifique, dont les conséquences pour chaque partenaire sont inconnues), pourrait contribuer à ralentir ou empêcher la croissance des herbes du brûlé.

L'endophytisme, cette nouvelle niche écologique inconnue jusqu'alors pour *T. melanosporum*, intrigue pour deux raisons : la première est qu'elle pourrait être celle des partenaires paternels. Cependant, le génotypage du mycélium en interaction avec les racines des plantes herbacées révèle souvent le génotype maternel des ascocarpes les plus proches ou d'autres génotypes inconnus, mais jamais les génotypes paternels recherchés. La quête des partenaires paternels continue donc...

En revanche, cette découverte soulève la question de la délimitation des niches écologiques des champignons : une espèce fongique classiquement considérée comme ectomycorhizienne avec certaines espèces végétales, peut en fait être en même temps (et au même endroit) endophyte avec d'autres espèces végétales ! Reste à savoir si cette interaction endophyte est réellement négative pour les herbacées, ce qui pourrait expliquer le brûlé, et quel est son impact sur la vie de *T. melanosporum*.

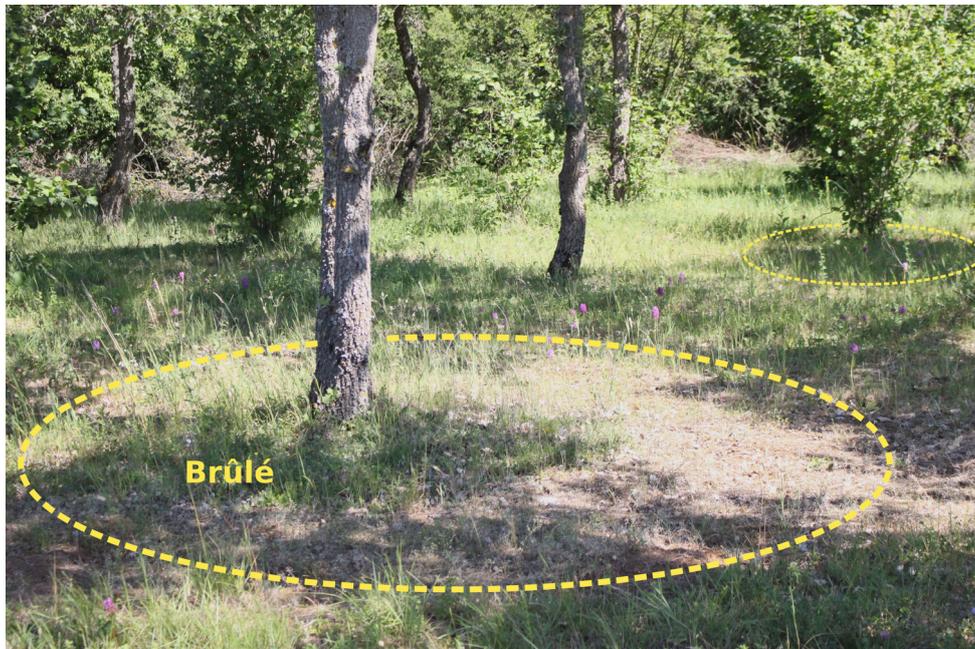


Fig. 4 : Brûlé au pied d'un chêne truffier. La végétation est rase, peu dense et moins diversifiée qu'à l'extérieur du brûlé, et témoigne de la présence d'ectomycorhizes sur les racines de l'arbre.

Auteur : Laure Schneider-Maunoury

Licence [Creative Commons - Attribution](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Le mystère du partenaire paternel en voie de résolution

Chez un certain nombre de champignons, on connaît l'existence de cellules mobiles qui jouent le rôle de gamètes mâles, mais aucune structure de la sorte n'a été documentée chez *T. melanosporum*. Cependant, une hypothèse qui expliquerait les observations faites jusqu'à présent est que les spores elles-mêmes pourraient être (directement ou après une germination rapide) les partenaires paternels.

En effet, lorsqu'une truffe mature est ingérée par un animal attiré par son parfum, celui-ci disperse conjointement les spores contenues dans l'ascocarpe dans ses déjections. Se trouvent donc au même endroit des spores génétiquement proches (puisqu'issues d'un même événement de reproduction) et portant les idiomorphes MAT1 et MAT2 (puisque la reproduction a nécessité la présence de ces deux idiomorphes). Tout se passe alors comme si localement, un type sexuel donné devenait « dominant » dans les ectomycorhizes, et que seuls les spores de ce même type sexuel pouvaient établir de nouvelles ectomycorhizes et former des ascocarpes. Par exemple, si des spores d'un même ascocarpe sont déposées au milieu d'une zone où toutes les ectomycorhizes sont MAT1, alors les spores MAT1 vont pouvoir germer et former des ectomycorhizes. L'association symbiotique permettra à ces individus d'accéder à suffisamment de ressources carbonées pour assurer le développement et la nutrition d'ascocarpes. À l'inverse, la germination des spores MAT2 sera empêchée (par un mécanisme encore inconnu) et elles n'auront accès qu'à peu de ressources, les capacités de *T. melanosporum* à dégrader la matière organique morte du sol étant probablement limitées. Les individus MAT2 seront alors contraints de jouer le rôle paternel dans la formation des ascocarpes, potentiellement en germant rapidement et en rencontrant une structure reproductive maternelle, ne laissant que leurs gènes dans les spores.

Ce scénario rend compte à la fois de la consanguinité élevée et de l'isolement par la distance observés entre ascocarpes d'un même brûlé, ainsi que de l'agrégation des ectomycorhizes et des ascocarpes par type sexuel. Il est actuellement testé grâce à des expériences menées sur plusieurs années, qui consistent à inoculer des spores dont les génotypes sont connus et à rechercher ces génotypes dans les tissus maternels et les spores des ascocarpes des années suivantes. Mieux comprendre la reproduction de la Truffe du Périgord permettra peut-être d'en améliorer la production, en fort déclin depuis un siècle, mais aussi de mieux cerner l'écologie des champignons mycorhiziens, dont le rôle dans les écosystèmes est fondamental. Affaire à suivre...

Références

Articles de recherche

Taschen *et al.* (2016). How the truffle got its mate : insights from genetic structure in spontaneous and planted Mediterranean populations of *Tuber melanosporum*. *Molecular Ecology* 25, 5611–5627

Selosse *et al.* (2017). Black Truffle, a hermaphrodite with forced unisexual behaviour. *Trends in Microbiology*, in press

Références en français

[Selosse *et al.* \(2016\). Truffe en quête de pères : un champignon à l'orientation sexuelle forcée, et pas encore domestiqué ! *Le Trufficulteur* 97 : 7-11.](#)

Selosse *et al.* (2017). La truffe révèle les secrets de sa sexualité. *La Recherche* 524 : 72-76.

Pour citer cet article

[Laure Schneider-Maunoury, Les secrets de la reproduction de la Truffe du Périgord bientôt percés à jour ?](#), Planet-Vie, Vendredi 10 novembre 2017, <https://planet-vie.ens.fr/article/2458/secrets-reproduction-truffe-perigord-bientot-perces-jour>

Time to re-think fungal ecology ? (New Phytologist, 2018)

Commentaire de Lofgren *et al.* (*Fusarium graminearum* : pathogen or endophyte of North American grasses? *New Phytologist* 217 : 1203–1212, 2018) et Martino *et al.* (Comparative genomics and transcriptomics depict ericoid mycorrhizal fungi as versatile saprotrophs and plant mutualists. *New Phytologist* 217 : 1213–1229, 2018), paru en novembre 2018 dans le *New Phytologist*.



Commentary

Time to re-think fungal ecology? Fungal ecological niches are often prejudged

There is growing evidence that many fungi have more complex niches than previously imagined, and two articles in this issue of *New Phytologist*, based on different methodological approaches (Lofgren *et al.*, pp. 1203–1212; Martino *et al.*, pp. 1213–1229), support this. Both question whether the ability to colonize several ecological niches is a common phenomenon in fungi.

‘... as readers, reviewers, researchers, or editors, we should be prepared to re-think fungal ecology, and describe niches beyond those our respective domains of research predict.’

Fusarium graminearum is an American fungus that causes Fusarium Head Blight in cultivated grasses, which entails billions of dollars of losses during epidemics affecting wheat and barley. It causes the kernels to shrivel up due to the production of mycotoxins (trichothecenes), which also makes the seeds inedible. In this issue of *New Phytologist*, Lofgren *et al.* demonstrate a very different interaction with native North-American grasses. The fungus was isolated in 17 out of 25 asymptomatic native grass species, where it grew as a symptomless endophyte – by endophyte, we mean a fungus growing in living plant tissues which does not cause obvious symptoms or morphological modifications (e.g. no mycorrhiza) in terms of its impact on the host (Hardoim *et al.*, 2015). Interestingly, the accumulation of trichothecenes was often limited in these grass species, and Lofgren *et al.* verified the Koch’s postulates by inoculating *F. graminearum* on native grasses, and established its potential for endophytism with reduced trichothecenes accumulation. There are additional barcoding reports that *Fusarium* spp. can be found as endophytes in various other plants (Bonito *et al.*, 2016; Glynou *et al.*, 2017). Thus, a major disease in introduced grasses in North America emerged from a common endophyte of native grasses, adding another example to the growing list of evidences that fungi which are reputedly ‘phytopathogenic’ can be recovered as endophytes from healthy plant tissue (Rodriguez *et al.*, 2009; Hardoim *et al.*, 2015; Almarino *et al.*, 2017).

This article is a Commentary on Lofgren *et al.*, 217: 1203–1212 and Martino *et al.*, 217: 1213–1229.

Some mycorrhizal fungi also have another ecological niche, as evidenced by recent research on fungal genomics. Martino *et al.*, in this issue of *New Phytologist*, assembled the draft genomes of three Leotiomycetes (Ascomycota), *Meliniomyces bicolor*, *M. variabilis* and *Rhizoscyphus ericae*, which form a particular type of mycorrhiza with some Ericaceae plants, the ericoid mycorrhiza. Analysis of these genomes confirms trends observed in another sequenced ericoid mycorrhizal Leotiomycete, *Oidiodendron maius* (Kohler *et al.*, 2015); namely, ericoid mycorrhizal fungi possess numerous enzyme-coding genes involved in the degradation of polysaccharides, proteins and lipids in a number similar (or even higher) to that found in related saprotrophic species. This can explain their saprotrophic survival and high-degrading abilities, long reported from *in vitro* cultivation. At the same time, they display several features of mycorrhizal fungi, such as an expansion of the gene family involved in nutrient uptake/exchange and an abundance of small secreted proteins (SSPs) that have important roles in biotrophic interactions. Additionally, Martino *et al.* studied gene expression and showed that 10–20% of these SSPs are induced during mycorrhizal interaction, a proportion similar to fungi from other mycorrhizal types (e.g. Kohler *et al.*, 2015). Most ericoid plants live in soils where the turnover in organic matter is slow (van der Heijden *et al.*, 2015), and where most phosphorus (P) and nitrogen (N) resources occur as organic compounds: the ability of ericoid mycorrhizal fungi to degrade organic matter is thus pivotal in host–plant adaptation.

Although they deal with different plant–fungal interactions, Lofgren *et al.* and Martino *et al.* both reveal fungi that do not exactly match the usually recognized ecological niches, but cover two of them in a larger, dual niche. Although this phenomenon has long been recognized, it is often considered to be an exception, rather than a general trend among fungi (e.g. ‘multifunctional’ fungi in Brundrett, 2006). Are dual niches kinds of exceptions, or do they tell us more? Here, we look at the literature to show and explain why occupation of more than one ecological niche may be common in fungi.

Do fungal ecological niches reflect more than mycologist’s sociology?

Several other fungi display a dual niche, with two apparently unrelated aspects (Table 1). For example, some insect parasites are also plant endophytes, and they can transfer animal N to the plant (Behie *et al.*, 2012). Some years ago, several ‘Ingoldian fungi’, a set of ascomycetes which decay dead leaves in freshwater, were discovered in living leaves, and the tendency of their spores to concentrate in foam may allow aerial re-infection of living leaves (Sokolski *et al.*, 2006; Selosse *et al.*, 2008). Lichen-forming fungi from the genus *Stictis* were found to form a single complex of species with saprotrophic *Conotrema*, and these species have the

Table 1 Published examples of fungi with dual ecological niches, depending on hosts and conditions, with indication for the evolutionary trajectory of Fig. 1 whenever a scenario is proposed

Dual ecological niche	Fungal taxa	References	Evolutionary trajectory
Endophytic + phytoparasitic	<i>Fusarium graminearum</i>	Lofgren <i>et al.</i> (2018, this issue of <i>New Phytologist</i> , pp. 1203–1212)	(b)
Mycorrhizal + saprotrophic	Ericoid mycorrhizal Leotiomycetes <i>Mycena</i> ^a Basidiomycetes incl. <i>Coniophora</i> , <i>Hypholoma</i> , <i>Phellinus</i> ^a	Martino <i>et al.</i> (2018, this issue of <i>New Phytologist</i> , pp. 1213–1229) Selosse <i>et al.</i> (2010); Grelet <i>et al.</i> (2017) Smith <i>et al.</i> (2017)	(a)
Mycorrhizal + endophytic	Sebacinales incl. <i>Serendipita</i> (= <i>Piriformospora indica</i>) <i>Tuber melanosporum</i> and <i>T. aestivum</i> <i>Tricholoma matsutake</i>	Selosse <i>et al.</i> (2009); Weiß <i>et al.</i> (2016); Oliveira <i>et al.</i> (2014) Gryndler <i>et al.</i> (2014); Schneider-Maunoury <i>et al.</i> (2018) Murata <i>et al.</i> (2013, 2014)	(a)
Animal parasitic + endophytic	<i>Metarhizium</i> (= <i>Metacordyceps</i>)	Behie <i>et al.</i> (2012)	(in main text)
Lichenized + saprotrophic	<i>Stictis</i> – <i>Conotrema</i> complex	Wedin <i>et al.</i> (2004)	–
Endophytic + saprotrophic	<i>Chalara</i> 'Ingoldian fungi' (various Ascomycetes ^b) Xylariales	Koukol (2011) Sokolski <i>et al.</i> (2006); Selosse <i>et al.</i> (2008) Davis <i>et al.</i> (2003)	(b)

^aThe morphology of root colonization may differ from the 'standard' mycorrhizal morphology; however, considerable variations exist in mycorrhizal ultrastructure. For more detail, see discussions in the cited references.

^bIngoldian fungi include some Leotiomycetes, e.g. the genera *Tetracladium* or *Tricladium*.

ability to live as free-living saprotrophs and to form lichens ('optional lichenization'; Wedin *et al.*, 2004). Some important groups of saprotrophic fungi can form mycorrhizas, e.g. *Mycena* in orchids (Selosse *et al.*, 2010) or Ericaceae (Grelet *et al.*, 2017), or they can be common endophytes, such as Xylariales (Davis *et al.*, 2003) or *Chalara* spp. (Koukol, 2011). Recently, after inoculating 201 saprotrophic species on coniferous seedlings, Smith *et al.* (2017) evidenced biotrophic colonization in 17% of species, while three species induced formation of some characteristic features of ectomycorrhizas (see the Commentary by Baldrian & Kohout, 2017). Truffle species of the ectomycorrhizal genus *Tuber* (truffles) were shown to also colonize the roots of herbaceous plants where they likely live as endophytes (Gryndler *et al.*, 2014; Schneider-Maunoury *et al.*, 2018). Although the latter interaction is still poorly understood, it may account for a specific feature of truffles' habitat, the brûlé. This is a zone around trees colonized by truffles where vegetation grows poorly (Streiblová *et al.*, 2012), suggesting some interactions between truffles and herbaceous plants. The extent to which root endophytism of truffle contributes to the brûlé deserves closer investigation.

Interestingly, the presence of truffles on herbaceous plants was hidden to researchers for a long time because the primers used to specifically detect arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota, which associate with such plants) do not detect Ascomycota. There is even the possibility that additional ectomycorrhizal species colonize the roots of nonectomycorrhizal plants (Schneider-Maunoury *et al.*, 2018). When observing nature, we often see what we are specifically looking for: this may be one of the reasons why our understanding of fungal niches is long-standing, but not accurate. Mycorrhizologists study mycorrhizal fungi, lichenologists study lichens, pathologists study diseased plants, and specialists of

decomposition research dead organic matter, etc. Our respective fields may prejudice our perceptions of what the fungal ecological niches really are, and beyond occasional discoveries, the organization of mycological sub-fields reinforce the prejudged niches.

Reinvestigation is now open, at a time where molecular tools are powerful enough to challenge current understanding of fungal ecological niches. DNA barcoding can investigate the spread of a given fungal species across ecosystem compartments and ecological niches (e.g. Wedin *et al.*, 2004; Selosse *et al.*, 2008). Now, high-throughput sequencing allows for the identification of many fungi in a single sample, and we can even find unexpected fungi in a surprising place. Of course, one has to be careful with fungal contaminations. But one also has to be careful with discarding (in good faith) relevant fungi from the data. This also means that additional controls, such as re-inoculation (Lofgren *et al.*) or direct visual observation (e.g. Smith *et al.*, 2017), are required before a new niche is confirmed. On the plant side, the potential for new niches expands the pool of possible fungal interactions.

Evolutionary trajectories, and species lost in translation

As Dobzhansky rightly said for biology, nothing in ecology makes sense, except in the light of evolution. The fungal niches as they are, even if they are larger than we have been thinking, result from an evolutionary process. Here, we propose a scenario that would give sense to (at least some) observed dual niches. It relies on an evolutionary tendency among fungi to shift ecological niches (what we call here evolutionary trajectories). Such trajectories often occur convergently in numerous independent taxa. Along a trajectory, some individuals or species may retain both the previous and the

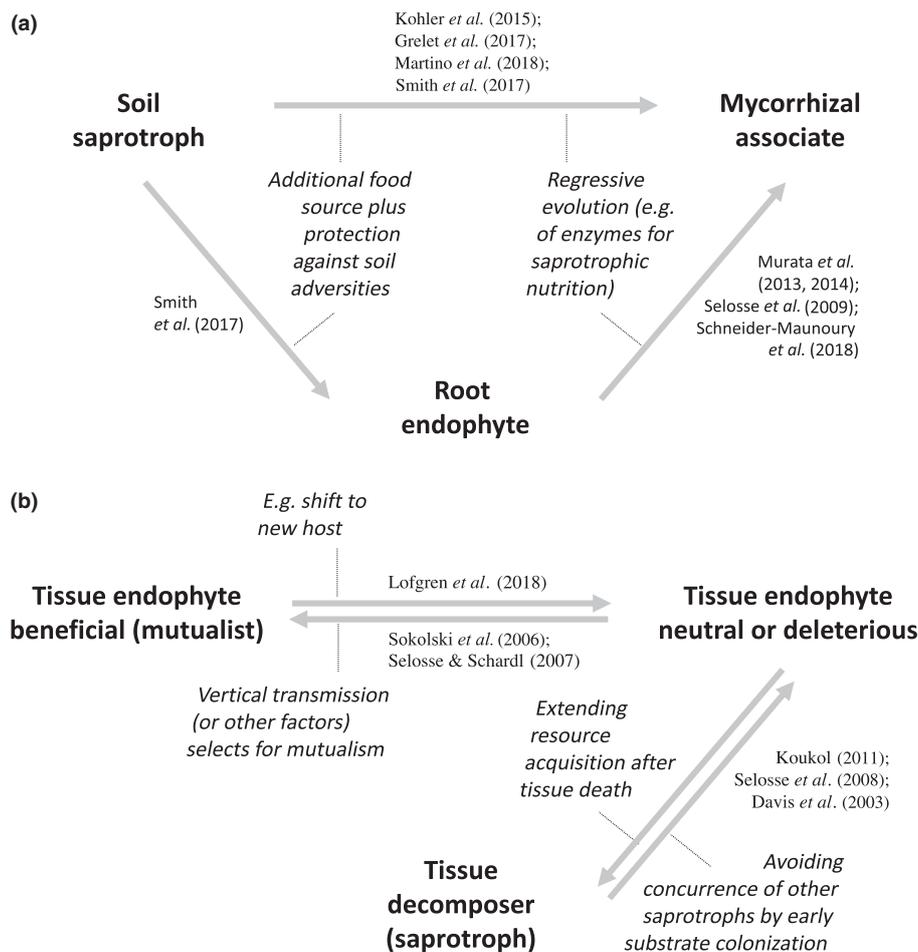


Fig. 1 Some evolutionary trajectories (grey arrows) between classical ecological niches (in bold), with some factors promoting the evolution in the direction of the arrow (italics). (a) Trajectories along the soil saprotrophy–mycorrhizal continuum, which mainly concern soil fungi; (b) trajectories along the saprotrophy–aerial endophytism continuum, which mainly concern fungi from aerial parts that may enter a vertical transmission through seeds. These trajectories and factors are not meant to be exhaustive but simply illustrate the way large, dual niches can arise in evolution. The cited work in the arrows refer to examples of fungi (also in Table 1) that occupy the two linked classical ecological niches, because they keep the previous and acquired niche in their evolution.

newly emerging niches, while others do not enter the niche enlargement, or fully shift to the new niche. For example, the finding that *Metarhizium* is both an insect parasite and a plant endophyte (Behie *et al.*, 2012) makes sense when considering the recurrent evolutionary shifts from animal to plant hosts in the Clavicipitaceae family (Spatafora *et al.*, 2007). While some clavicipitaceae species strictly associate with animals or plants, others are ‘lost in translation’ and colonize hosts from both kingdoms. Evolutionary trajectories are one of the drivers underlying dual niches, and we tentatively illustrate here a subset of possible trajectories (Fig. 1) involving fungi listed in this article (Table 1).

Many of the examples earlier, especially these reported by Martino *et al.* are relevant in the framework of the evolution to the mycorrhizal habit (Fig. 1a), a scenario that occurred many times in fungal evolution (Kohler *et al.*, 2015). We suggest two trajectories for this. First, a direct evolution from soil saprotrophic ancestors is possible, in a regressive evolution where many genes required for a saprotrophic free life are lost (van der Heijden *et al.*, 2015; Kohler *et al.*, 2015). Second, the mycorrhizal habit may have evolved from ancestors that were already able to colonize living plant tissues as endophytes (Brundrett, 2006). The latter pathway has been

referred to as the ‘waiting room’ hypothesis (Selosse *et al.*, 2009; van der Heijden *et al.*, 2015). Following this hypothesis, root endophytism acts as a symbiotic ‘waiting room’, where biotrophic coexistence predisposes evolution towards a tighter mutualism with a more complex joint mycorrhizal morphogenesis. The latter pathway seems at least relevant for fungi mycorrhizal in ericoid hosts (Martino *et al.*) and orchids (Selosse & Martos, 2014). On the fungal side, it is phylogenetically supported in the Sebaciales, which evolved both ericoid and orchid mycorrhizal habits, as well as the ectomycorrhizal habit, from endophytic ancestors (Weiß *et al.*, 2016). The ‘waiting room’ hypothesis may explain why some ectomycorrhizal taxa, such as *Tuber* or *Tricholoma* (Table 1), also behave as root endophytes if they retain an ancestral niche. It may also explain why saprotrophic *Mycena* spp., which are also known to be endophytic (e.g. Glynou *et al.*, 2017; see references in Grelet *et al.*, 2017), also occur as mycorrhizal fungi in orchids or in Ericaceae (Table 1). However, one cannot fully exclude a reverse trajectory, where mycorrhizal abilities allow endophytic colonization in nonmycorrhizal hosts: in both cases, the observation of a dual niche would emerge from an evolutionary trajectory.

The transition from saprotrophy to endophytism, or vice-versa, is also described in fungi colonizing the aerial parts of plants (Fig. 1b), with a striking convergence in ascomycetous taxa that are both litter decayers and endophytes (Selosse *et al.*, 2008; Koukol, 2011). Recurrent transitions from saprotrophy to endophytism may explain the dominance of facultative endophytes in roots, which also behave as soil saprotrophs, e.g. in the Brassicaceae *Microthlaspi* (Glynou *et al.*, 2017) or in *Populus* (Bonito *et al.*, 2016). Noteworthy, among endophytes of aerial tissues, the trajectory from neutral or deleterious to mutualistic endophyte (Fig. 1b) is very relevant for plant physiology.

Considering the evolution of mutualism in endophytic interactions, plants offer a powerful selective pressure: vertical transmission. As opposed to animals, where newborns are axenic at birth, seeds can be colonized by maternal fungi during maturation on the mother plant, with colonization reaching seeds, fruit envelopes, or even the embryo itself (Tobias *et al.*, 2017). Vertical transmission generally selects for mutualism (Fig. 1b), because any partner harming its symbiont will produce offspring interacting with partners of lower quality, while any better altruist will improve the production of partners for its own offspring (Douglas, 2008). For example, in grasses, vertical transmission drove the emergence of protective endophytes with multiple favourable effects in the genus *Epichloë*, a group of parasitic fungi that destroy seeds to form spores for their own horizontal transmission. The mutualistic *Neotyphodium* evolved from such pathogenic ancestors through loss of sporulation and independent propagation entailing vertical transmission (Selosse & Schardl, 2007). The vertical transmission of *F. graminearum* in native North-American grasses observed by Lofgren *et al.* may account for the absence of mycotoxins (trichothecenes) and pathogenicity on these hosts. At the opposite end, the jump to new hosts (the introduced grasses), without previous coevolution and efficient vertical transmission, resulted in deleterious interactions. Thus, an evolutionary trajectory including the gain of vertical transmission can select for mutualism, and a given species may have a different outcome for the host depending on its transmission mode.

Final considerations

Beyond 'the' niche we attribute to one fungal species lie populations of individuals: dual niches, within a species, may not pertain to any individual. Some individuals may, for genetic and/or environmental reasons, be more prone to use one or another aspect of a niche, while other individuals may use the whole dual niche, as demonstrated in endophytic and ectomycorrhizal truffles (Schneider-Maunoury *et al.*, 2018). Understanding the intraspecific dimension of niche variation is promising for a micro-evolutionary approach, but remains a difficult, overlooked issue (Johnson *et al.*, 2012).

Phytoparasitism, lichenization, mycorrhiza, endophytism, saprotrophy may only be a part of many fungal ecological niches, which are more complex. We should remain open, and favour naive observations: as readers, reviewers, researchers, or editors, we should be prepared to re-think fungal ecology, and describe niches beyond those our respective domains of research predict. Let us especially pay attention to the works of teams such as Lofgren *et al.*

and Martino *et al.*, which cross disciplinary borders. The latter's work nicely illustrates the set of tools, from morphological inspection and Koch's postulate to genomic and transcriptomic, that will allow us in the future to revisit fungal ecological niches. Tomorrow, we may investigate more details of how each of the various facets of the ecological niche shape fungal nutrition and reproduction.

On the plant science side, the comments earlier also underline the growing evidence that the endophytic fungome is of pivotal importance in plant functioning and evolution (Rodríguez *et al.*, 2009; Hardoim *et al.*, 2015), as exemplified by its role in the evolutionary trajectories proposed here (Fig. 1). A better understanding of the plant fungome, and its diversity and functions (Almario *et al.*, 2017; Glynou *et al.*, 2017), is now crucial.

Acknowledgements

The authors apologize for articles and models not cited for space limitations and they thank G-A. Grelet, H. C. Kistler, L. A. Lofgren, and E. Martino for helpful comments. M-A.S.'s team is supported by the 2015/18/A/NZ8/00149 grant funded by National Science Centre (NCN, Poland) and the Fondation de France.

Marc-André Selosse^{1,2*}, Laure Schneider-Maunoury¹ and Florent Martos¹

¹Institut de Systématique, Évolution, Biodiversité (UMR 7205 – CNRS, MNHN, UPMC, EPHE), Muséum national d'Histoire naturelle, Sorbonne Universités, 57 rue Cuvier, 75005 Paris, France;

²Department of Plant Taxonomy and Nature Conservation, University of Gdansk, Wita Stwosza 59, 80-308, Gdansk, Poland
(*Author for correspondence: tel +3 607 123418; email ma.selosse@wanadoo.fr)

References

- Almario J, Jeena G, Wunder J, Langen G, Zuccaro A, Coupland G, Bucher M. 2017. Root-associated fungal microbiota of nonmycorrhizal *Arabidopsis thaliana* and its contribution to plant phosphorus nutrition. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 114: E9403–E9412.
- Baldrian P, Kohout P. 2017. Interactions of saprotrophic fungi with tree roots: can we observe the emergence of novel ectomycorrhizal fungi? *New Phytologist* 215: 511–513.
- Behie SW, Zelisko PM, Bidochka MJ. 2012. Endophytic insect-parasitic fungi translocate nitrogen directly from insects to plants. *Science* 336: 1576–1577.
- Bonito G, Hameed K, Ventura R, Krishnan J, Schadt CW, Vilgalys R. 2016. Isolating a functionally relevant guild of fungi from the root microbiome of *Populus*. *Fungal Ecology* 22: 35–42.
- Brundrett MC. 2006. Understanding the roles of multifunctional mycorrhizal and endophytic fungi. In: Schulz B, Boyle C, Sieber TN, eds. *Microbial root endophytes. Soil biology (vol. 9)*. Berlin, Germany: Springer, 281–298.
- Davis EC, Franklin JB, Shaw AJ, Vilgalys R. 2003. Endophytic *Xylaria* (Xylariaceae) among liverworts and angiosperms: phylogenetics, distribution, and symbiosis. *American Journal of Botany* 90: 1661–1667.
- Douglas AE. 2008. Conflict, cheats and the persistence of symbioses. *New Phytologist* 177: 849–858.

- Glynou K, Nam B, Thines M, Maciá-Vicente JG. 2017. Facultative root-colonizing fungi dominate endophytic assemblages in roots of nonmycorrhizal *Microthlaspi* species. *New Phytologist* 217: 1190–1202.
- Grelet G-A, Ba R, Goeke DF, Houliston GJ, Taylor AFS, Durall DM. 2017. A plant growth-promoting symbiosis between *Mycena galopus* and *Vaccinium corymbosum* seedlings. *Mycorrhiza* 27: 831–839.
- Gryndler M, Černá L, Bukovská P, Hřšelová H, Jansa J. 2014. *Tuber aestivum* association with non-host roots. *Mycorrhiza* 24: 603–610.
- Hardoim PR, van Overbeek LS, Berg G, Pirttilä AM, Compant S, Campisano A, Döring M, Sessitsch A. 2015. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 79: 293–320.
- 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.
- Johnson D, Martin F, Cairney JW, Anderson IC. 2012. The importance of individuals: intraspecific diversity of mycorrhizal plants and fungi in ecosystems. *New Phytologist* 194: 614–628.
- Kohler A, Kuo A, Nagy LG, Morin E, Barry KW, Buscot F, Canbäck B, Choi C, Cichocki N, Clum A *et al.* 2015. Convergent losses of decay mechanisms and rapid turnover of symbiosis genes in mycorrhizal mutualists. *Nature Genetics* 47: 410–415.
- Koukol O. 2011. New species of *Chalara* occupying coniferous needles. *Fungal Diversity* 49: 75.
- Lofgren LA, LeBlanc NR, Certano AK, Nachtigall J, LaBine KM, Riddle J, Broz K, Dong Y, Bethan B, Kafer CW *et al.* 2018. *Fusarium graminearum*: pathogen or endophyte of North American grasses? *New Phytologist* 217: 1203–1212.
- Martino E, Morin E, Grelet G-A, Kuo A, Kohler A, Daghino S, Barry KW, Cichocki N, Clum A, Dockter RB *et al.* 2018. Comparative genomics and transcriptomics depict ericoid mycorrhizal fungi as versatile saprotrophs and plant mutualists. *New Phytologist* 217: 1213–1229.
- 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* 24: 315–321.
- Oliveira SF, Bocayuva MF, Veloso TGR, Bazzolli DMS, da Silva CC, Pereira OL, Kasuya MCM. 2014. Endophytic and mycorrhizal fungi associated with roots of endangered native orchids from the Atlantic Forest, Brazil. *Mycorrhiza* 24: 55–64.
- Rodriguez RJ, White JF Jr, Arnold AE, Redman RS. 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist* 182: 314–330.
- 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 Sebaciales commonly associate with plant roots as endophytes? *Mycological Research* 113: 1062–1069.
- Selosse M-A, Martos F. 2014. Do chlorophyllous orchids heterotrophically use mycorrhizal fungal carbon? *Trends in Plant Science* 19: 683–685.
- Selosse M-A, Martos F, Perry B, Maj P, Roy M, Paillet T. 2010. Saprotrophic fungal symbionts in tropical achlorophyllous orchids. *Plant Signaling & Behavior* 5: 349–353.
- Selosse M-A, Schardl CL. 2007. Fungal endophytes of grasses: hybrids rescued by vertical transmission? An evolutionary perspective. *New Phytologist* 17: 452–458.
- Selosse M-A, Vohnik M, Chauvet E. 2008. Out of the rivers: are some aquatic hyphomycetes plant endophytes? *New Phytologist* 178: 3–7.
- Smith GR, Finlay RD, 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: 747–755.
- Sokolski S, Piché Y, Chauvet E, Bérubé JA. 2006. A fungal endophyte of black spruce (*Picea mariana*) needles is also an aquatic hyphomycete. *Molecular Ecology* 15: 1955–1962.
- Spatafora JW, Sung G-H, Sung J-M, Hywel-Jones NL, White JF. 2007. Phylogenetic evidence for an animal pathogen origin of ergot and the grass endophytes. *Molecular Ecology* 16: 1701–1711.
- Streiblová E, Gryndlerová H, Gryndler M. 2012. Truffle brûlé: an efficient fungal life strategy. *FEMS Microbiology Ecology* 80: 1–8.
- Tobias TB, Farrer EC, Rosales A, Sinsabaugh RL, Suding KN, Porras-Alfaro A. 2017. Seed-associated fungi in the alpine tundra: both mutualists and pathogens could impact plant recruitment. *Fungal Ecology* 30: 10–18.
- Wedin M, Döring H, Gilenstam G. 2004. Saprotrophy and lichenization as options for the same fungal species on different substrata: environmental plasticity and fungal lifestyles in the *Stictis*–*Conotrema* complex. *New Phytologist* 164: 459–465.
- Weiß M, Waller F, Zuccaro A, Selosse M-A. 2016. Sebaciales – one thousand and one interactions with land plants. *New Phytologist* 211: 20–40.

Key words: endophyte, evolutionary trajectories, fungal ecological niches, fungal genomics, molecular tools, mycorrhiza, niche variation, plant fungome.



About New Phytologist

- *New Phytologist* is an electronic (online-only) journal owned by the New Phytologist Trust, a **not-for-profit organization** dedicated to the promotion of plant science, facilitating projects from symposia to free access for our Tansley reviews and Tansley insights.
- Regular papers, Letters, Research reviews, Rapid reports and both Modelling/Theory and Methods papers are encouraged. We are committed to rapid processing, from online submission through to publication ‘as ready’ via *Early View* – our average time to decision is <26 days. There are **no page or colour charges** and a PDF version will be provided for each article.
- The journal is available online at Wiley Online Library. Visit www.newphytologist.com to search the articles and register for table of contents email alerts.
- If you have any questions, do get in touch with Central Office (np-centraloffice@lancaster.ac.uk) or, if it is more convenient, our USA Office (np-usaoffice@lancaster.ac.uk)
- For submission instructions, subscription and all the latest information visit www.newphytologist.com

Bibliographie

- J. Almario, G. Jeena, J. Wunder, G. Langen, A. Zucaro, G. Coupland, et M. Bucher. Root-associated fungal microbiota of nonmycorrhizal *Arabidopsis* and its contribution to plant phosphorus nutrition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(44) : 1–10, 2017.
- S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, et D. J. Lipman. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3) : 403–410, 1990.
- A. S. Amend, K. A. Seifert, et T. D. Bruns. Quantifying microbial communities with 454 pyrosequencing : does read abundance count? *Molecular Ecology*, 19(24) : 5555–5565, 2010.
- K. Anderson. Temporal Patterns in rates of community change during succession. *The American Naturalist*, 169(6) : 780–793, 2007.
- P. Angelini, B. Tirillini, A. Properzi, C. Rol, et R. Venanzoni. Identification and bioactivity of the growth inhibitors in *Tuber* spp. methanolic extracts. *Plant Biosystems*, 149(6) : 1000–1009, 2015.
- S. Arnaud-Haond et K. Belkhir. GENCLONE : a computer program to analyse genotypic data, test for clonality and describe spatial clonal organization. *Molecular Ecology Notes*, 7(1) : 15–17, 2007.
- Y. Aumeeruddy-Thomas, C. Therville, C. Lemarchand, A. Lauriac, et F. Richard. Resilience of sweet chestnut and truffle holm-oak rural forests in Languedoc-Roussillon, France : roles of social-ecological legacies, domestication, and innovations. *Ecology and Society*, 17(2), 2012.
- H. G. Baker. Self-compatibility and establishment after “long-distance” dispersal. *Evolution*, 9(3) : 347–349, 1955.
- M. Baragatti, P.-M. Grollemund, P. Montpied, J.-L. Dupouey, J. Gravier, C. Murat, et F. Le Tacon. Influence of annual climatic variations, climate changes, and sociological factors on the production of the Périgord black truffle (*Tuber melanosporum* Vittad.) from 1903–1904 to 1988–1989 in the Vaucluse (France). *Mycorrhiza*, 29(2) : 113–125, 2019.
- B. Barres, F. Halkett, C. Dutech, A. Andrieux, J. Pinon, et P. Frey. Genetic structure of the poplar rust fungus *Melampsora larici-populina* : Evidence for isolation by distance in Europe and recent founder effects overseas. *Infection Genetics and Evolution*, 8(5) : 577–587, 2008.
- A. d. Bary. English translation of Heinrich Anton de Bary’s 1878 speech, ‘*Die Erscheinung der Symbiose*’ (‘*De la Symbiose*’). *Symbiosis*, 69(3) : 131–139, 1878.
- S. W. Behie, P. M. Zelisko, et M. J. Bidochka. Endophytic insect-parasitic fungi translocate nitrogen directly from insects to plants. *Science*, 336(6088) : 1576–1577, 2012.
- G. M. N. Benucci, L. Raggi, E. Albertini, T. Grebenc, M. Bencivenga, M. Falcinelli, et G. Di Massimo. Ectomycorrhizal communities in a productive *Tuber aestivum* Vittad. orchard : composition, host influence and species replacement. *FEMS Microbiology Ecology*, 76(1) : 170–184, 2011.
- R. Bergero, S. Perotto, M. Girlanda, G. Vidano, et A. Luppi. Ericoid mycorrhizal fungi are common root associates of a Mediterranean ectomycorrhizal plant (*Quercus ilex*). *Molecular Ecology*, 9 : 1639–1649, 2000.
- G. Bertault, M. Raymond, A. Berthomieu, G. Callot, et D. Fernandez. Trifling variation in truffles. *Nature*, 394 : 734–734, 1998.
- G. Bertault, F. Rousset, D. Fernandez, A. Berthomieu, M. E. Hochberg, G. Callot, et M. Raymond. Population genetics and dynamics of the black truffle in a man-made truffle field. *Heredity*, 86(4) : 451–458, 2001.
- J. D. Bever, S. C. Richardson, B. M. Lawrence, J. Holmes, et M. Watson. Preferential allocation to beneficial symbiont with spatial structure maintains mycorrhizal mutualism. *Ecology Letters*, 12(1) : 13–21, 2009.
- M. Bidartondo, D. Read, J. Trappe, V. Merckx, R. Ligrone, et J. Duckett. The dawn of symbiosis between plants and fungi. *Biology Letters*, 7(4) : 574–577, 2011.
- S. Billiard, M. López-Villavicencio, M. E. Hood, et T. Giraud. Sex, outcrossing and mating types : unsolved questions in fungi and beyond. *Journal of Evolutionary Biology*, 25(6) : 1020–1038, 2012.
- R. Blaaidid, S. Kumar, R. H. Nilsson, K. Abarenkov, P. M. Kirk, et H. Kausrud. ITS1 versus ITS2 as DNA metabarcodes for fungi. *Molecular Ecology Resources*, 13(2) : 218–224, 2013.
- U. Büntgen, S. Egli, J. J. Camarero, E. M. Fischer, U. Stobbe, H. Kausrud, W. Tegel, L. Sproll, et N. C. Stenseth. Drought-induced decline in Mediterranean truffle harvest. *Nature Climate Change*, 2(12) : 827–829, 2012.

- J. A. Bonet, C. R. Fischer, et C. Colinas. Cultivation of black truffle to promote reforestation and land-use stability. *Agronomy for Sustainable Development*, 26(1) : 69–76, 2006.
- G. Bonito, M. E. Smith, M. Nowak, R. A. Healy, G. Guevara, E. Cázares, A. Kinoshita, E. R. Nouhra, L. S. Domínguez, L. Tedersoo, C. Murat, Y. Wang, B. A. Moreno, D. H. Pfister, K. Nara, A. Zambonelli, J. M. Trappe, et R. Vilgalys. Historical biogeography and diversification of truffles in the Tuberales and their newly identified southern hemisphere sister lineage. *PLoS ONE*, 8(1), 2013.
- G. M. Bonito, A. P. Gryganskyi, J. M. Trappe, et R. Vilgalys. A global meta-analysis of *Tuber* ITS rDNA sequences : species diversity, host associations and long-distance dispersal. *Molecular Ecology*, 19(22) : 4994–5008, 2010.
- O. Bossdorf, H. Auge, L. Lafuma, W. E. Rogers, E. Siemann, et D. Prati. Phenotypic and genetic differentiation between native and introduced plant populations. *Oecologia*, 144(1) : 1–11, 2005.
- M. Boudier. Du parasitisme probable de quelques espèces du genre *Elaphomyces* et de la recherche de ces Tubercés. *Bulletin de la Société Botanique de France*, 23(3) : 115–119, 1876.
- J. L. Bronstein. Conditional outcomes in mutualistic interactions. *Trends in Ecology & Evolution*, 9(6) : 214–217, 1994.
- M. C. Brundrett. Understanding the roles of multifunctional mycorrhizal and endophytic Fungi. In B. J. E. Schulz, C. J. C. Boyle, et T. N. Sieber, éditeurs, *Microbial Root Endophytes*, volume 9, pages 281–298. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2006.
- M. C. Brundrett et L. Tedersoo. Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytologist*, pages 1–8, 2018.
- T. D. Bruns, M. I. Bidartondo, et D. L. Taylor. Host specificity in ectomycorrhizal communities : what do the exceptions tell us? *Integrative and Comparative Biology*, 42(2) : 352–359, 2002.
- T. Burgess, B. D. Wingfield, et M. J. Wingfield. Comparison of genotypic diversity in native and introduced population of *Sphaeropsis sapinea* isolated from *Pinus radiata*. *Mycological Research*, 105 : 1331–1339, 2001.
- G. Callot. *La Truffe, la Terre, la Vie*. Du labo au terrain. Versailles, éditions Quae, 1999.
- G. Callot, B. Jaillard, J. Braye, et M. Jalade. Incidence des caractéristiques structurales du sous-sol sur l'entrée en production de *Tuber melanosporum* et d'autres champignons mycorrhiziens. *Agronomie*, 16(7) : 405–419, 1996.
- G. Callot, Y. Daignières, D. Fernandez, M. Raymond, et X. Salducci. Incidence du sol sur la production de truffe noire du Périgord (*Tuber melanosporum*). 1999.
- D. D. Cameron, A. L. Neal, S. C. M. van Wees, et J. Ton. Mycorrhiza-induced resistance : more than the sum of its parts? *Trends in Plant Science*, 18(10) : 539–545, 2013.
- J. G. Caporaso, J. Kuczynski, J. Stombaugh, K. Bittinger, F. D. Bushman, E. K. Costello, N. Fierer, A. G. Peña, J. K. Goodrich, J. I. Gordon, G. A. Huttley, S. T. Kelley, D. Knights, J. E. Koenig, R. E. Ley, C. A. Lozupone, D. McDonald, B. D. Muegge, M. Pirrung, J. Reeder, J. R. Sevinsky, P. J. Turnbaugh, W. A. Walters, J. Widmann, T. Yatsunenko, J. Zaneveld, et R. Knight. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 7(5) : 335–336, 2010.
- M. A. Chatin. Sur les arbres et arbustes truffiers. *Bulletin de la Société Botanique de France*, 16(1) : 19–26, 1869a.
- M. A. Chatin. *La Truffe, étude des conditions générales de la production truffière*. Paris, éditions Bouchard-Huzard, 1869b.
- J. Chaze. Essais de production de la truffe à partir de cultures pures de son mycélium. *Compte-rendu hebdomadaire de l'Académie des Sciences*, pages 742–744, 1943.
- J. Chaze. Sur la formation du périthèce et d'un appareil conidien chez *Tuber melanosporum* en culture pure. *Compte-rendu hebdomadaire de l'Académie des Sciences*, pages 859–861, 1950.
- J. Chaze et P. Mestas. Essai de culture pure du mycélium truffier avec production de périthèces. *Compte-rendu hebdomadaire de l'Académie des Sciences*, pages 2099–2101, 1939.
- G. Chevalier et J. Grente. Application pratique de la symbiose ectomycorrhizienne : production à grande échelle de plants mycorrhizes par la truffe (*Tuber melanosporum* Vitt.). In *Mushroom science*, 1979.
- E. Coppin, R. Debuchy, S. Arnaise, et M. Picard. Mating types and sexual development in filamentous ascomycetes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(4) : 411–428, 1997.

- J. M. Cornuet et G. Luikart. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, 144(4) : 2001–2014, 1996.
- M. Cosme, I. Fernández, M. G. A. Van der Heijden, et C. M. J. Pieterse. Non-mycorrhizal plants : the exceptions that prove the rule. *Trends in Plant Science*, 23(7) : 577–587, 2018.
- P.-E. Courty, M. Buée, A. G. Diedhiou, P. Frey-Klett, F. Le Tacon, F. Rineau, M.-P. Turpault, S. Uroz, et J. Garbaye. The role of ectomycorrhizal communities in forest ecosystem processes : new perspectives and emerging concepts. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(5) : 679–698, 2010.
- R. Coutin. Truffes et mouches rabassières. *Insectes*, 75, 1989.
- H. Covès et C. Jacson. *Vivre ensemble notre monde truffé d'amour*. éditions Les Monédières, 2016.
- A. L. Dale, N. Feau, S. E. Everhart, B. Dhillon, B. Wong, J. Sheppard, G. J. Bilodeau, A. Brar, J. F. Tabima, D. Shen, C. M. Brasier, B. M. Tyler, N. J. Grunwald, et R. C. Hamelin. Mitotic recombination and rapid genome evolution in the invasive forest pathogen *Phytophthora ramorum*. *Mbio*, 10(2) : 1–19, 2019.
- H. De la Varga, F. Le Tacon, M. Lagouet, F. Todesco, T. Varga, I. Miquel, D. Barry-Etienne, C. Robin, F. Halkett, F. Martin, et C. Murat. Five years investigation of female and male genotypes in périgord black truffle (*Tuber melanosporum* Vittad.) revealed contrasted reproduction strategies. *Environmental Microbiology*, 19(7) : 2604–2615, 2017.
- B. G. De Mars et R. E. J. Boerner. Vesicular arbuscular mycorrhizal development in the Brassicaceae in relation to plant life span. *Flora*, 191(2) : 179–189, 1996.
- A. M. De Miguel, B. Águeda, S. Sánchez, et J. Paradé. Ectomycorrhizal fungus diversity and community structure with natural and cultivated truffle hosts : applying lessons learned to future truffle culture. *Mycorrhiza*, 24(S1) : 5–18, 2014.
- J. D. W. Dearnaley, F. Martos, et M.-A. Selosse. Orchid mycorrhizas : molecular ecology, physiology, evolution and conservation aspects. In B. Hock, éditeur, *Fungal Associations*, volume 9 of *The Mycota*, pages 207–230. Springer, Berlin, Heidelberg, 2012.
- A. J. M. Debets et A. J. F. Griffiths. Polymorphism of *het*-genes prevents resource plundering in *Neurospora crassa*. *Mycological Research*, 102(11) : 1343–1349, 1998.
- R. Debuchy, V. Berteaux-Lecellier, et P. Silar. Mating systems and sexual morphogenesis in Ascomycetes. In *Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi*, pages 501–535. K.A. Borkovitch and D.J. Ebbole, Washington DC, éditions ASM Press, 2010.
- A. Di Rienzo, A. C. Peterson, J. C. Garza, A. M. Valdes, M. Slatkin, et N. B. Freimer. Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(8) : 3166–3170, 1994.
- K. M. Dlugosch et I. M. Parker. Founding events in species invasions : genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. *Molecular Ecology*, 17(1) : 431–449, 2008.
- M. E. Dorken et C. G. Eckert. Severely reduced sexual reproduction in northern populations of a clonal plant, *Decodon verticillatus* (Lythraceae). *Journal of Ecology*, 89(3) : 339–350, 2001.
- G. W. Douhan, L. Vincenot, H. Gryta, et M.-A. Selosse. Population genetics of ectomycorrhizal fungi : from current knowledge to emerging directions. *Fungal Biology*, 115(7) : 569–597, 2011.
- X.-H. Du, Q. Zhao, E.-H. Xia, L.-Z. Gao, F. Richard, et Z. L. Yang. Mixed-reproductive strategies, competitive mating-type distribution and life cycle of fourteen black morel species. *Scientific Reports*, 7(1), 2017.
- S. M. Dunham, A. B. Mujic, J. W. Spatafora, et A. M. Kretzer. Within-population genetic structure differs between two sympatric sister-species of ectomycorrhizal fungi, *Rhizopogon vinicolor* and *R. vesiculosus*. *Mycologia*, 105(4) : 814–826, 2013.
- J. Dupont, S. Dequin, T. Giraud, F. L. Tacon, S. Marsit, J. Ropars, F. Richard, et M.-A. Selosse. Fungi as a source of food. *Microbiology Spectrum*, 5(2) : 1–22, 2017.
- R. C. Edgar, B. J. Haas, J. C. Clemente, C. Quince, et R. Knight. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 27(16) : 2194–2200, 2011.
- M. Eisenstein. Microbiology : making the best of PCR bias. *Nature Methods*, 15(5) : 317–320, 2018.
- J.-H. Fabre. Note sur le mode de reproduction des truffes. *Bulletin de la Société d'Agriculture et d'Horticulture du Vauchuse*, 5, 1857.
- C. R. Fellbaum, J. A. Mensah, A. J. Cloos, G. E. Strahan, P. E. Pfeffer, E. T. Kiers, et H. Bücking. Fungal nutrient allocation in common mycorrhizal networks is regulated by the carbon source

- strength of individual host plants. *New Phytologist*, 203(2) : 646–656, 2014.
- I. Fernández, M. Cosme, I. A. Stringlis, K. Yu, R. d. Jonge, S. M. v. Wees, M. J. Pozo, C. M. J. Pieterse, et M. G. A. v. d. Heijden. Molecular dialogue between arbuscular mycorrhizal fungi and the nonhost plant *Arabidopsis thaliana* switches from initial detection to antagonism. *New Phytologist*, 223(2) : 867–881, 2019.
- R. D. Finlay. Mycorrhizal fungi and their multifunctional roles. *Mycologist*, 18(2) : 91–96, 2004.
- T. H. Fleming, S. Maurice, et J. Hamrick. Geographic variation in the breeding system and the evolutionary stability of trioecy in *Pachycereus pringlei* (Cactaceae). *Evolutionary Ecology*, 12(3) : 279–289, 1998.
- A. Frank. Über die biologischen Verhältnisse des Thallus einiger Krustenflechten. *Beitr Biol Pflanz*, 2 : 123–200, 1877.
- A. Frank. Die Ernährung der Kiefer durch ihre Mykorrhizapilze. *Ber Dtsch Bot Ges*, 10 : 577–583, 1892.
- A. Frank. On the nutritional dependence of certain trees on root symbiosis with belowground fungi (an English translation of A.B. Frank's classic paper of 1885). *Mycorrhiza*, 15(4) : 267–275, 2005.
- J. Garbaye. *La Symbiose mycorrhizienne*. Synthèses. Versailles, éditions Quae, 2013.
- I. García-Cunchillos, S. Sánchez, J. J. Barriuso, et E. Pérez-Collazos. Population genetics of the westernmost distribution of the glaciations-surviving black truffle *Tuber melanosporum*. *Mycorrhiza*, 24(S1) : 89–100, 2014.
- L. G. García-Montero, M. A. Casermeiro, J. Hernandez, et I. Hernandez. Soil factors that influence the fruiting of *Tuber melanosporum* (black truffle). *Soil Research*, 44(8) : 731–738, 2006.
- L. G. García-Montero, I. Valverde-Asenjo, M. A. Grande-Ortíz, C. Menta, et I. Hernandez. Impact of earthworm casts on soil pH and calcium carbonate in black truffle burns. *Agroforestry Systems*, 87(4) : 815–826, 2013.
- S. Garnica, M. E. Schön, K. Abarenkov, K. Riess, K. Liimatainen, T. Niskanen, B. Dima, K. Soop, T. G. Frøslev, T. S. Jeppesen, U. Peintner, R. Kuhnert-Finkernagel, T. E. Brandrud, G. Saar, B. Oertel, et J. F. Ammirati. Determining threshold values for barcoding fungi : lessons from *Cortinarius* (Basidiomycota), a highly diverse and widespread ectomycorrhizal genus. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(4), 2016.
- J. C. Garza et E. G. Williamson. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Molecular Ecology*, 10(2) : 305–318, 2001.
- B. J. Genton, J. A. Shykoff, et T. Giraud. High genetic diversity in French invasive populations of common ragweed, *Ambrosia artemisiifolia*, as a result of multiple sources of introduction. *Molecular Ecology*, 14(14) : 4275–4285, 2005.
- A. Gibert, W. Tozer, et M. Westoby. Plant performance response to eight different types of symbiosis. *New Phytologist*, 222(1) : 526–542, 2019.
- F. Giorgi et P. Lionello. Climate change projections for the Mediterranean region. *Global and Planetary Change*, 63(2) : 90–104, 2008.
- M. Girlanda, M. A. Selosse, D. Cafasso, F. Brillì, S. Delfino, R. Fabbian, S. Ghignone, P. Pinelli, R. Segreto, F. Loreto, S. Cozzolino, et S. Perotto. Inefficient photosynthesis in the Mediterranean orchid *Limodorum abortivum* is mirrored by specific association to ectomycorrhizal Russulaceae. *Molecular Ecology*, 15(2) : 491–504, 2006.
- P. Gladieux, X.-G. Zhang, D. Afoufa-Bastien, R.-M. V. Sanhueza, M. Sbaghi, et B. Le Cam. On the origin and spread of the scab disease of apple : out of central Asia. *Plos One*, 3(1) : 1–14, 2008.
- P. Gladieux, A. Feurtay, M. E. Hood, A. Snirc, J. Clavel, C. Dutech, M. Roy, et T. Giraud. The population biology of fungal invasions. *Molecular Ecology*, 24(9) : 1969–1986, 2015.
- N. L. Glass et I. Kaneko. Fatal attraction : nonself recognition and heterokaryon incompatibility in filamentous fungi. *Eukaryotic Cell*, 2(1) : 1–8, 2003.
- N. L. Glass et G. A. Kuldau. Mating type and vegetative incompatibility in filamentous Ascomycetes. *Annual Review of Phytopathology*, 30 : 201–224, 1992.
- N. L. Glass, D. J. Jacobson, et P. K. T. Shiu. The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous Ascomycete fungi. *Annual Review of Genetics*, 34(1) : 165–186, 2000.
- C. Gonneau, J. Jersáková, E. d. Tredern, I. Till-Bottraud, K. Saarinen, M. Sauve, M. Roy, T. Hájek, et M.-A. Selosse. Photosynthesis in perennial mixotrophic *Epipactis* spp. (Orchidaceae) contributes more to shoot and fruit biomass than to hypogeous survival. *Journal of Ecology*, pages 1183–1194, 2015.

- B. González-Armada, A. M. De Miguel, et R. Y. Cavero. Ectomycorrhizae and vascular plants growing in brûlés as indicators of below and above ground microecology of black truffle production areas in Navarra (Northern Spain). *Biodiversity and Conservation*, 19(14) : 3861–3891, 2010.
- J. Goudet. FSTAT (Version 1.2) : a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, 86(6) : 485–486, 1995.
- G.-A. Grelet, R. Ba, D. F. Goeke, G. J. Houliston, A. F. S. Taylor, et D. M. Durall. A plant growth-promoting symbiosis between *Mycena galopus* and *Vaccinium corymbosum* seedlings. *Mycorrhiza*, 27(8) : 831–839, 2017.
- G. W. Griffith, A. Graham, R. G. Woods, G. L. Easton, et H. Halbwachs. Effect of biocides on the fruiting of waxcap fungi. *Fungal Ecology*, 7 : 67–69, 2014.
- L. C. Grubisha, S. E. Bergemann, et T. D. Bruns. Host islands within the California Northern Channel Islands create fine-scale genetic structure in two sympatric species of the symbiotic ectomycorrhizal fungus *Rhizopogon*. *Molecular Ecology*, 16(9) : 1811–1822, 2007.
- M. Gryndler, L. Černá, P. Bukovská, H. Hršelová, et J. Jansa. *Tuber aestivum* association with non-host roots. *Mycorrhiza*, 24(8) : 603–610, 2014.
- A. Guerin-Laguette, N. Cummings, N. Hesom-Williams, R. Butler, et Y. Wang. Mycorrhiza analyses in New Zealand truffières reveal frequent but variable persistence of *Tuber melanosporum* in co-existence with other truffle species. *Mycorrhiza*, 23(2) : 87–98, 2013.
- A. Guerin-Laguette, N. Cummings, R. C. Butler, A. Willows, N. Hesom-Williams, S. Li, et Y. Wang. *Lactarius deliciosus* and *Pinus radiata* in New Zealand : towards the development of innovative gourmet mushroom orchards. *Mycorrhiza*, 24(7) : 511–523, 2014.
- A. Guidot, H. Johannesson, A. Dahlberg, et J. Stenlid. Parental tracking in the postfire wood decay ascomycete *Daldinia loculata* using highly variable nuclear gene loci. *Molecular Ecology*, 12(7) : 1717–1730, 2003.
- J.-J. Guillaumin. *L'armillaire et le pourridié-agaric des végétaux ligneux*. éditions Quae, 2005.
- F. e. Z. Haichar, C. Marol, O. Berge, J. I. Rangel-Castro, J. I. Prosser, J. Balesdent, T. Heulin, et W. Achouak. Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *The ISME Journal*, 2(12) : 1221–1230, 2008.
- H. Halbwachs, G. L. Easton, R. Bol, E. A. Hobbie, M. H. Garnett, D. Peršoh, L. Dixon, N. Ostle, P. Karasch, et G. W. Griffith. Isotopic evidence of biotrophy and unusual nitrogen nutrition in soil-dwelling Hygrophoraceae. *Environmental Microbiology*, 20(10) : 3573–3588, 2018.
- I. Hall, N. Fitzpatrick, P. Miros, et A. Zambonelli. Counter-season cultivation of truffles in the Southern Hemisphere : an update. *Italian Journal of Mycology*, 46(0) : 21–36, 2017.
- I. R. Hall, W. Yun, et A. Amicucci. Cultivation of edible ectomycorrhizal mushrooms. *Trends in Biotechnology*, 21(10) : 433–438, 2003.
- K. Hansen et D. H. Pfister. Systematics of the Pezizomycetes : the operculate Discomycetes. *Mycologia*, 98(6,) : 1029–1040, 2006.
- P. R. Hardoim, L. S. van Overbeek, G. Berg, A. M. Pirttilä, S. Compant, A. Campisano, M. Döring, et A. Sessitsch. The hidden world within plants : ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(3) : 293–320, 2015.
- T. J. Harrington et D. T. Mitchell. Colonization of root systems of *Carex flacca* and *C. pilulifera* by *Cortinarius (Dermocybe) cinnamomeus*. *Mycological Research*, 106(4) : 452–459, 2002.
- R. A. Healy, M. E. Smith, G. M. Bonito, D. H. Pfister, Z. W. Ge, G. G. Guevara, G. Williams, K. Stafford, L. Kumar, T. Lee, C. Hobart, J. Trappe, R. Vilgalys, et D. J. McLaughlin. High diversity and widespread occurrence of mitotic spore mats in ectomycorrhizal Pezizales. *Molecular Ecology*, 22(6) : 1717–1732, 2013.
- M. G. A. v. d. Heijden, F. M. Martin, M.-A. Selosse, et I. R. Sanders. Mycorrhizal ecology and evolution : the past, the present, and the future. *New Phytologist*, 205(4) : 1406–1423, 2015.
- K. Hiruma, N. Gerlach, S. Sacristán, R. Nakano, S. Hacquard, B. Kracher, U. Neumann, D. Ramírez, M. Bucher, R. O'Connell, et P. Schulze-Lefert. Root endophyte *Colletotrichum tofieldiae* confers plant fitness benefits that are phosphate status dependent. *Cell*, 165(2) : 464–474, 2016.
- M. E. Hochberg, G. Bertault, K. Poitrineau, et A. Janssen. Olfactory orientation of the truffle beetle, *Leiodes cinnamomea*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 109(2) : 147–153, 2003.
- J. D. Hoeksema, V. B. Chaudhary, C. A. Gehring, N. C. Johnson, J. Karst, R. T. Koide, A. Pringle, C. Zabinski, J. D. Bever, J. C. Moore, G. W. T.

- Wilson, J. N. Klironomos, et J. Umbanhowar. A meta-analysis of context-dependency in plant response to inoculation with mycorrhizal fungi. *Ecology Letters*, 13(3) : 394–407, 2010.
- T. R. Horton. Spore dispersal in ectomycorrhizal fungi at fine and regional scales. In L. Tedersoo, éditeur, *Biogeography of Mycorrhizal Symbiosis*, volume 230, pages 61–78. Springer International Publishing, Cham, 2017.
- K. W. Hughes, R. H. Petersen, et E. B. Lickey. Using heterozygosity to estimate a percentage DNA sequence similarity for environmental species' delimitation across basidiomycete fungi. *New Phytologist*, 182(4) : 795–798, 2009.
- E. Imbert. Ecological consequences and ontogeny of seed heteromorphism. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 5(1) : 13–36, 2002.
- S. Jacobs, B. Zechmann, A. Molitor, M. Trujillo, E. Petutschnig, V. Lipka, K.-H. Kogel, et P. Schäfer. Broad-spectrum suppression of innate immunity is required for colonization of *Arabidopsis* roots by the fungus *Piriformospora indica*. *Plant Physiology*, 156(2) : 726–740, 2011.
- H. Jacquemyn, M. Waud, R. Brys, F. Lallemand, P.-E. Courty, A. Robionek, et M.-A. Selosse. Mycorrhizal associations and trophic modes in coexisting orchids : An ecological continuum between auto- and mixotrophy. *Frontiers in Plant Science*, 8(1497), 2017.
- B. Jaillard, D. Barry-Etienne, C. Colinas, A.-M. De Miguel, L. Genola, A. Libre, P. Neveu, D. Oliach, W. Saenz, M. Sáez, X. Salducci, G. Souche, P. Sourzat, et M. Villeneuve. Alkalinity and structure of soils determine the truffle production in the Pyrenean Regions. *Forest Systems*, 23(2) : 364, 2014.
- I. Jakobsen. Transport of phosphorus and carbon in VA mycorrhizas. In A. Varma et B. Hock, éditeurs, *Mycorrhiza : Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology*, pages 297–324. Berlin, Heidelberg, éditions Springer, 1995.
- N. C. Johnson et J. H. Graham. The continuum concept remains a useful framework for studying mycorrhizal functioning. *Plant and Soil*, 363(1) : 411–419, 2013.
- N. C. Johnson, J.-H. Graham, et F. A. Smith. Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism–parasitism continuum. *New Phytologist*, 135(4) : 575–585, 1997.
- J. D. G. Jones et J. L. Dangl. The plant immune system. *Nature*, 444(7117) : 323, 2006.
- M. D. Jones, D. M. Durall, et J. W. G. Cairney. Ectomycorrhizal fungal communities in young forest stands regenerating after clearcut logging. *New Phytologist*, 157(3) : 399–422, 2003.
- A. Jumpponen. Dark septate endophytes – are they mycorrhizal? *Mycorrhiza*, 11(4) : 207–211, 2001.
- S. C. Jung, A. Martinez-Medina, J. A. Lopez-Raez, et M. J. Pozo. Mycorrhiza-induced resistance and priming of plant defenses. *Journal of Chemical Ecology*, 38(6) : 651–664, 2012.
- T. Kasambala Donga, F. E. Vega, et I. Klingen. Establishment of the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* as an endophyte in sugarcane, *Saccharum officinarum*. *Fungal Ecology*, 35 : 70–77, 2018.
- C. Kiefer. *Études sur la génération et la culture de la truffe et procédé pratique pour obtenir des champignons dits de Paris*. Uzès, éditions H. Malige, 1879.
- E. T. Kiers, M. Duhamel, Y. Beesetty, J. A. Mensah, O. Franken, E. Verbruggen, C. R. Fellbaum, G. A. Kowalchuk, M. M. Hart, A. Bago, T. M. Palmer, S. A. West, P. Vandenkoornhuys, J. Jansa, et H. Bucking. Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis. *Science*, 333(6044) : 880–882, 2011.
- M. Kimura et J. F. Crow. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*, 49 : 725–738, 1964.
- J. N. Klironomos. Host-specificity and functional diversity among arbuscular mycorrhizal fungi. In *Microbial Biosystems : New Frontiers.*, Halifax, Canada, 2000.
- J. N. Klironomos et M. M. Hart. Animal nitrogen swap for plant carbon. *Nature*, 410(6829) : 651–652, 2001.
- U. Kõljalg, R. H. Nilsson, K. Abarenkov, L. Tedersoo, A. F. S. Taylor, M. Bahram, S. T. Bates, T. D. Bruns, J. Bengtsson-Palme, T. M. Callaghan, B. Douglas, T. Drenkhan, U. Eberhardt, M. Dueñas, T. Grebenc, G. W. Griffith, M. Hartmann, P. M. Kirk, P. Kohout, E. Larsson, B. D. Lindahl, R. Lücking, M. P. Martín, P. B. Matheny, N. H. Nguyen, T. Niskanen, J. Oja, K. G. Peay, U. Peintner, M. Peterson, K. Põldmaa, L. Saag, I. Saar, A. Schüßler, J. A. Scott, C. Senés, M. E. Smith, A. Suija, D. L. Taylor, M. T. Telleria, M. Weiss, et K.-H. Larsson. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Molecular Ecology*, 22(21) : 5271–5277, 2013.

- A. Kohler, A. Kuo, L. G. Nagy, E. Morin, K. W. Barry, F. Buscot, B. Canbäck, C. Choi, N. Cichocki, A. Clum, J. Colpaert, A. Copeland, M. D. Costa, J. Doré, D. Floudas, G. Gay, M. Girlanda, B. Henrissat, S. Herrmann, J. Hess, N. Högberg, T. Johansson, H.-R. Khouja, K. LaButti, U. Lahrman, A. Levasseur, E. A. Lindquist, A. Lipzen, R. Marmeisse, E. Martino, C. Murat, C. Y. Ngan, U. Nehls, J. M. Plett, A. Pringle, R. A. Ohm, S. Perotto, M. Peter, R. Riley, F. Rineau, J. Ruytinx, A. Salamov, F. Shah, H. Sun, M. Tarkka, A. Tritt, C. Veneault-Fourrey, A. Zuccaro, A. Tunlid, I. V. Grigoriev, D. S. Hibbett, et F. Martin. Convergent losses of decay mechanisms and rapid turnover of symbiosis genes in mycorrhizal mutualists. *Nature Genetics*, 47(4) : 410–415, 2015.
- P. Kohout. Biogeography of ericoid mycorrhiza. In L. Tedersoo, éditeur, *Biogeography of Mycorrhizal Symbiosis*, pages 179–193. Springer International Publishing, 2017.
- R. T. Koide, C. Fernandez, et K. Petprakob. General principles in the community ecology of ectomycorrhizal fungi. *Annals of Forest Science*, 68(1) : 45–55, 2011.
- J. J. Kolbe, R. E. Glor, L. R. Schettino, A. C. Lara, A. Larson, et J. B. Losos. Genetic variation increases during biological invasion by a Cuban lizard. *Nature*, 431(7005) : 177, 2004.
- H. B. Korotkin, R. A. Swenie, O. Miettinen, J. M. Budke, K.-H. Chen, F. Lutzoni, M. E. Smith, et P. B. Matheny. Stable isotope analyses reveal previously unknown trophic mode diversity in the Hymenochaetales. *American Journal of Botany*, 105(11) : 1869–1887, 2018.
- A. M. Kretzer, S. Dunham, R. Molina, et J. W. Spatafora. Patterns of vegetative growth and gene flow in *Rhizopogon vinicolor* and *R. vesiculosus* (Boletales, Basidiomycota). *Molecular Ecology*, 14(8) : 2259–2268, 2005.
- M. Kulifaj. *Tuber melanosporum* Vitt. : contribution à l'étude de la morphogénèse et la physiologie de l'ascocarpe. Thèse de doctorat, Université Paul Sabatier, Toulouse, 1984.
- U. Lahrman, N. Strehmel, G. Langen, H. Frerigmann, L. Leson, Y. Ding, D. Scheel, S. Herklotz, M. Hilbert, et A. Zuccaro. Mutualistic root endophytism is not associated with the reduction of saprotrophic traits and requires a noncompromised plant innate immunity. *New Phytologist*, 207(3) : 841–857, 2015.
- R. Landeweert, E. Hoffland, R. D. Finlay, T. W. Kuyper, et N. van Breemen. Linking plants to rocks : ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals. *Trends in Ecology & Evolution*, 16(5) : 248–254, 2001.
- F. Le Tacon. *Les Truffes. Biologie, écologie et domestication*. Nancy, éditions AgroParisTech, 2017.
- F. Le Tacon, B. Zeller, C. Plain, C. Hossann, C. Bréchet, et C. Robin. Carbon transfer from the host to *Tuber melanosporum* mycorrhizas and ascocarps followed using a ¹³C pulse-labeling technique. *PLoS ONE*, 8(5) : 1–9, 2013.
- F. Le Tacon, B. Zeller, C. Plain, C. Hossann, C. Bréchet, F. Martin, A. Kohler, J. Villerd, et C. Robin. Study of nitrogen and carbon transfer from soil organic matter to *Tuber melanosporum* mycorrhizas and ascocarps using ¹⁵N and ¹³C soil labelling and whole-genome oligoarrays. *Plant and Soil*, 395(1) : 351–373, 2015.
- F. Le Tacon, A. Rubini, C. Murat, C. Riccioni, C. Robin, B. Belfiori, B. Zeller, H. De la Varga, E. Akroume, A. Deveau, F. Martin, et F. Paoletti. Certainties and uncertainties about the life cycle of the Périgord black truffle (*Tuber melanosporum* Vittad.). *Annals of Forest Science*, 73(1) : 105–117, 2016.
- I. Lenoir, J. Fontaine, et A. Lounès-Hadj Sahraoui. Arbuscular mycorrhizal fungal responses to abiotic stresses : a review. *Phytochemistry*, 123 : 4–15, 2016.
- P. Leonardi, C. Murat, F. Puliga, M. Iotti, et A. Zambonelli. Unravelling whitish truffle life cycle : paternal genotypes correspond to recombinant of mycelium genotypes used for plants inoculation. *Environmental Microbiology*, page accepted, 2019.
- L. Liberman et P. Benfey. A friend in need (of nutrients) is a... *Cell*, 165(2) : 269–271, 2016.
- B. D. Lindahl et A. Tunlid. Ectomycorrhizal fungi - potential organic matter decomposers, yet not saprotrophs. *New Phytologist*, 205(4) : 1443–1447, 2015.
- B. D. Lindahl, R. H. Nilsson, L. Tedersoo, K. Abarenkov, T. Carlsen, R. Kjølner, U. Kõljalg, T. Pennanen, S. Rosendahl, J. Stenlid, et H. Kauserud. Fungal community analysis by high-throughput sequencing of amplified markers – a user's guide. *New Phytologist*, 199(1) : 288–299, 2013.
- C. C. Linde et H. Selmes. Genetic diversity and mating type distribution of *Tuber melanosporum* and their significance to truffle cultivation in artificially planted truffières in Australia. *Applied and*

- Environmental Microbiology*, 78(18) : 6534–6539, 2012.
- L. A. Lofgren, N. R. LeBlanc, A. K. Certano, J. Nachtigall, K. M. LaBine, J. Riddle, K. Broz, Y. Dong, B. Bethan, C. W. Kafer, et H. C. Kistler. *Fusarium graminearum* : pathogen or endophyte of North American grasses? *New Phytologist*, 217(3) : 1203–1212, 2018.
- F. Mahé, T. Rognes, C. Quince, C. d. Vargas, et M. Dunthorn. Swarm : robust and fast clustering method for amplicon-based studies. *PeerJ*, 2 : e593, 2014.
- H. Maherali, B. Oberle, P. F. Stevens, W. K. Cornwell, et D. J. McGlenn. Mutualism persistence and abandonment during the evolution of the mycorrhizal symbiosis. *The American Naturalist*, 188(5) : E113–E125, 2016.
- M. Mamoun et J. Olivier. Mycorrhizal inoculation of cloned hazels by *Tuber melanosporum* : effect of soil disinfection and co-culture with *Festuca ovina*. *Plant and Soil*, 188(2) : 221–226, 1997.
- K. G. Mandyam et A. Jumpponen. Mutualism–parasitism paradigm synthesized from results of root-endophyte models. *Frontiers in Microbiology*, 5, 2015.
- H. Marschner et B. Dell. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant and Soil*, 159(1) : 89–102, 1994.
- J.-C. Martegoute et A. Courdeau. *Plantes des Causses et des truffières*. Périgueux, éditions Fédération départementale des trufficulteurs du Périgord, 2002.
- F. Martin, A. Kohler, C. Murat, R. Balestrini, P. M. Coutinho, O. Jaillon, B. Montanini, E. Morin, B. Noel, R. Percudani, B. Porcel, A. Rubini, A. Amicucci, J. Anselem, V. Anthouard, S. Arcioni, F. Artiguenave, J.-M. Aury, P. Ballario, A. Bolchi, A. Brenna, A. Brun, M. Buée, B. Cantarel, G. Chevalier, A. Couloux, C. Da Silva, F. Denoëud, S. Duplessis, S. Ghignone, B. Hilselberger, M. Iotti, B. Marçais, A. Mello, M. Miranda, G. Pacioni, H. Quesneville, C. Riccioni, R. Ruotolo, R. Splivallo, V. Stocchi, E. Tisserant, A. R. Viscomi, A. Zambonelli, E. Zampieri, B. Henrissat, M.-H. Lebrun, F. Paolocci, P. Bonfante, S. Ottonello, et P. Wincker. Périgord black truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis. *Nature*, 464 : 1033–1038, 2010.
- F. Martin, A. Kohler, C. Murat, C. Veneault-Fourrey, et D. S. Hibbett. Unearthing the roots of ectomycorrhizal symbioses. *Nature Reviews Microbiology*, 14(12) : 760–773, 2016.
- M. Martin. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal*, 17(1) : 10–12, 2011.
- E. Martino, E. Morin, G.-A. Grelet, A. Kuo, A. Kohler, S. Daghino, K. W. Barry, N. Cichocki, A. Clum, R. B. Dockter, M. Hainaut, R. C. Kuo, K. LaButti, B. D. Lindahl, E. A. Lindquist, A. Lipzen, H.-R. Khouja, J. Magnuson, C. Murat, R. A. Ohm, S. W. Singer, J. W. Spatafora, M. Wang, C. Veneault-Fourrey, B. Henrissat, I. V. Grigoriev, F. M. Martin, et S. Perotto. Comparative genomics and transcriptomics depict ericoid mycorrhizal fungi as versatile saprotrophs and plant mutualists. *New Phytologist*, 217(3) : 1213–1229, 2018.
- P. A. Mason, J. Wilson, F. T. Last, et C. Walker. The concept of succession in relation to the spread of sheathing mycorrhizal fungi on inoculated tree seedlings growing in unsterile soils. *Plant and Soil*, 71(1) : 247–256, 1983.
- G. May, F. Shaw, H. Badrane, et X. Vekemans. The signature of balancing selection : fungal mating compatibility gene evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(16) : 9172–9177, 1999.
- A. Mello, G.-C. Ding, Y. M. Piceno, C. Napoli, L. M. Tom, T. Z. DeSantis, G. L. Andersen, K. Smalla, et P. Bonfante. Truffle brûlés have an impact on the diversity of soil bacterial communities. *PLOS ONE*, 8(4) : 1–10, 2013.
- A. Mello, E. Lumini, C. Napoli, V. Bianciotto, et P. Bonfante. Arbuscular mycorrhizal fungal diversity in the *Tuber melanosporum* brûlé. *Fungal Biology*, 119(6) : 518–527, 2015.
- C. Menta et S. Pinto. Biodiversity and ecology of soil fauna in relation to truffle. In A. Zambonelli, M. Iotti, et C. Murat, éditeurs, *True Truffle (Tuber spp.) in the World*, pages 319–331. Springer International Publishing, 2016.
- P. Mikola. Mycorrhizal inoculation in afforestation. In J. Romberger, éditeur, *International Review of Forestry Research*, volume 3, pages 123–196. Elsevier, 1970.
- B. Mosse. Growth and chemical composition of mycorrhizal and non-mycorrhizal apples. *Nature*, 179 : 922–924, 1957.
- P. Mouillefert. La truffe et sa production. *Journal d'agriculture pratique*, 1888.
- C. Murat. *Étude de la diversité génétique de la truffe blanche du Piémont (Tuber magnatum Pico) et*

- de la truffe noire du Périgord (*Tuber melanosporum* Vittad.). Thèse de doctorat, Université Henri Pointcarré, Nancy, 2004.
- C. Murat. Forty years of inoculating seedlings with truffle fungi : past and future perspectives. *Mycorrhiza*, 25(1) : 77–81, 2015.
- C. Murat, J. Díez, P. Luis, C. Delaruelle, C. Dupré, G. Chevalier, P. Bonfante, et F. Martin. 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, 2004.
- C. Murat, C. Riccioni, B. Belfiori, N. Cichocki, J. Labbé, E. Morin, E. Tisserant, F. Paolucci, A. Rubini, et F. Martin. 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, 2011.
- C. Murat, A. Rubini, C. Riccioni, H. De la Varga, E. Akroume, B. Belfiori, M. Guaragno, F. Le Tacon, C. Robin, F. Halkett, F. Martin, et F. Paolucci. 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, 2013.
- C. Murat, M.-A. Selosse, E. Taschen, L. Schneider-Maunoury, F. Richard, et F. Martin. Quelques considérations sur le réensemencement par ascospores des truffières à *Tuber melanosporum*. *Le Trufficulteur*, page 3, 2017.
- H. Murata, A. Yamada, T. Maruyama, N. Endo, K. Yamamoto, T. Ohira, et T. Shimokawa. 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, 2013.
- H. Murata, A. Yamada, S. Yokota, T. Maruyama, N. Endo, K. Yamamoto, T. Ohira, et H. Neda. Root endophyte symbiosis *in vitro* between the ectomycorrhizal basidiomycete *Tricholoma matsutake* and the arbuscular mycorrhizal plant *Prunus speciosa*. *Mycorrhiza*, 24(4) : 315–321, 2014.
- D. Murphy. *People, plants and genes : the story of crops and humanity*. Oxford Biology. Oxford, éditions Oxford University Press, 2007.
- M. Nagae, M. Parniske, M. Kawaguchi, et N. Takeda. The relationship between thiamine and two symbioses : Root nodule symbiosis and arbuscular mycorrhiza. *Plant Signaling & Behavior*, 11(12) : e1265723, 2016.
- C. Napoli, A. Mello, A. Borra, A. Vizzini, P. Sourzat, et P. Bonfante. *Tuber melanosporum*, when dominant, affects fungal dynamics in truffle grounds. *New Phytologist*, 185(1) : 237–247, 2010.
- N. H. Nguyen, Z. Song, S. T. Bates, S. Branco, L. Tedersoo, J. Menke, J. S. Schilling, et P. G. Kennedy. FUNGuild : An open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild. *Fungal Ecology*, 20 : 241–248, 2016.
- C. Nicolás, T. Martin-Bertelsen, D. Floudas, J. Bentzer, M. Smits, T. Johansson, C. Troein, P. Persson, et A. Tunlid. The soil organic matter decomposition mechanisms in ectomycorrhizal fungi are tuned for liberating soil organic nitrogen. *The ISME Journal*, 13(4) : 977, 2019.
- B. P. S. Nieuwenhuis, A. J. M. Debets, et D. K. Aanen. Sexual selection in mushroom-forming basidiomycetes. *Proceedings of the Royal Society B : Biological Sciences*, 278(1702) : 152–157, 2011.
- Z. Nowak. *Truffle : A global history*. The Edible series. London, éditions Reaktion Books, 2015.
- S. J. Nuske, S. Anslan, L. Tedersoo, M. T. L. Bonner, B. C. Congdon, et S. E. Abell. The endangered northern bettong, *Bettongia tropica*, performs a unique and potentially irreplaceable dispersal function for ectomycorrhizal truffle fungi. *Molecular Ecology*, 2018(0) : 1–12, 2018.
- F. Oberwinkler, D. Cruz, et J. P. Suárez. Biogeography and ecology of Tulasnellaceae. In L. Tedersoo, éditeur, *Biogeography of Mycorrhizal Symbiosis*, pages 237–271. Springer International Publishing, 2017.
- T. Ohta et M. Kimura. A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. *Genetics Research*, 22(2) : 201–204, 1973.
- A. Olivera, C. R. Fischer, J. A. Bonet, J. Martínez de Aragón, D. Oliach, et C. Colinas. Weed management and irrigation are key treatments in emerging black truffle (*Tuber melanosporum*) cultivation. *New Forests*, 42(2) : 227–239, 2011.
- J. M. Olivier. Progress in the cultivation of truffles. In *Science and Cultivation of Edible Fungi*. CRC Press, Rotterdam, éditions Van Griensven, 2000.
- M. Op De Beeck, B. Lievens, P. Busschaert, S. Declerck, J. Vangronsveld, et J. V. Colpaert. Comparison and validation of some ITS primer pairs useful for fungal metabarcoding studies. *PLoS ONE*, 9(6) : e97629, 2014.

- M. Op De Beeck, C. Troein, C. Peterson, P. Persson, et A. Tunlid. Fenton reaction facilitates organic nitrogen acquisition by an ectomycorrhizal fungus. *New Phytologist*, 218(1) : 335–343, 2018.
- F. Ori, J. Trappe, M. Leonardi, M. Iotti, et G. Pacioni. Crested porcupines (*Hystrix cristata*) : mycophagist spore dispersers of the ectomycorrhizal truffle *Tuber aestivum*. *Mycorrhiza*, 28(5) : 561–565, 2018.
- G. Pacioni. Effects of *Tuber* metabolites on the rhizospheric environment. *Mycological Research*, 95(12) : 1355–1358, 1991.
- F. Paolocci, A. Rubini, C. Riccioni, et S. Arcioni. Reevaluation of the life cycle of *Tuber magnatum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4) : 2390–2393, 2006.
- T. Payen, C. Murat, A. Gigant, E. Morin, S. De Mita, et F. Martin. A survey of genome-wide single nucleotide polymorphisms through genome resequencing in the Périgord black truffle (*Tuber melanosporum* Vittad.). *Molecular Ecology Resources*, 15(5) : 1243–1255, 2015.
- P.-B. Pennier de Longchamps. *Dissertation physico-médicale sur les Truffes et sur les Champignons*. Avignon, éditions Roberty et Guilhermont, 1766.
- L. E. Perry, J. R. Pannell, et M. E. Dorken. Two's company, three's a crowd : experimental evaluation of the evolutionary maintenance of trioecy in *Mercurialis annua* (Euphorbiaceae). *PLOS ONE*, 7(4) : e35597, 2012.
- M. Peter, M. Buée, et S. Egli. Biodiversity of mycorrhizal fungi as a crucial player in forest ecosystem functioning. In *Integrative approaches as an opportunity for the conservation of forest biodiversity*, In Focus - Managing Forests in Europe, page 10. Kraus, D. and Krumm, F., 2013.
- F. Piattoni, F. Ori, M. Morara, M. Iotti, et A. Zambonelli. The role of wild boars in spore dispersal of hypogeous fungi. *Acta Mycologica*, 47(2) : 145–153, 2012.
- F. Piattoni, A. Amicucci, M. Iotti, F. Ori, V. Stocchi, et A. Zambonelli. Viability and morphology of *Tuber aestivum* spores after passage through the gut of *Sus scrofa*. *Fungal Ecology*, 9 : 52–60, 2014.
- S. Piry, G. Luikart, et J.-M. Cornuet. BOTTLENECK : a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *The Journal of Heredity*, 90(4) : 502–503, 1999.
- I. Plattner et I. Hall. Parasitism of non-host plants by the mycorrhizal fungus *Tuber melanosporum*. *Mycological Research*, 99(11) : 1367–1370, 1995.
- M. J. Pozo et C. Azcón-Aguilar. Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(4) : 393–398, 2007.
- M. Reess. Über den Parasitismus von *Elaphomyces granulatus*. *Bot. Zig.*, 38 : 729–733, 1880.
- M. Regvar, K. Vogel, N. Irgel, T. Wraber, U. Hildebrandt, P. Wilde, et H. Bothe. Colonization of pennycresses (*Thlaspi* spp.) of the Brassicaceae by arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal of Plant Physiology*, 160(6) : 615–626, 2003.
- J. A. Reinartz et D. H. Les. Bottleneck-induced dissolution of self-incompatibility and breeding system consequences in *Aster furcatus* (Asteraceae). *American Journal of Botany*, 81(4) : 446–455, 1994.
- S. Reyna et S. Garcia-Barreda. Black truffle cultivation : a global reality. *Forest Systems*, 23(2) : 317, 2014.
- S. Reyna-Domenech et S. García-Barreda. European black truffle : its potential role in agroforestry development in the marginal lands of Mediterranean calcareous mountains. In A. Rigueiro-Rodríguez, J. McAdam, et M. R. Mosquera-Losada, éditeurs, *Agroforestry in Europe*, volume 6, pages 295–317. Springer Netherlands, Dordrecht, 2008.
- C. Riccioni, B. Belfiori, A. Rubini, V. Passeri, S. Arcioni, et F. Paolocci. *Tuber melanosporum* outcrosses : analysis of the genetic diversity within and among its natural populations under this new scenario. *New Phytologist*, 180(2) : 466–478, 2008.
- M. K. Rich, E. Nouri, P.-E. Courty, et D. Reinhardt. Diet of arbuscular mycorrhizal fungi : bread and butter ? *Trends in Plant Science*, 22(8) : 652–660, 2017.
- R. J. Rodriguez, J. F. W. Jr, A. E. Arnold, et R. S. Redman. Fungal endophytes : diversity and functional roles. *New Phytologist*, 182(2) : 314–330, 2009.
- F. Rousset. Equilibrium values of measures of population subdivision for stepwise mutation processes. *Genetics*, 142 : 1357–1362, 1996.
- F. Rousset. Genetic differentiation and estimation of gene flow from F statistics under isolation by distance. *Genetics*, 145 : 1219–1228, 1997.

- F. Rousset. Genepop'007 : a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8 (1) : 103–106, 2008.
- A. Rubini, B. Belfiori, C. Riccioni, S. Arcioni, F. Martin, et F. Paolocci. *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, 2011a.
- A. Rubini, B. Belfiori, C. Riccioni, E. Tisserant, S. Arcioni, F. Martin, et F. Paolocci. Isolation and characterization of MAT genes in the symbiotic ascomycete *Tuber melanosporum*. *New Phytologist*, 189(3) : 710–722, 2011b.
- A. Rubini, C. Riccioni, B. Belfiori, et F. Paolocci. Impact of the competition between mating types on the cultivation of *Tuber melanosporum* : Romeo and Juliet and the matter of space and time. *Mycorrhiza*, 24(S1) : 19–27, 2014.
- K. Saikkonen, S. H. Faeth, M. Helander, et T. J. Sullivan. Fungal endophytes : A continuum of interactions with host plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29(1) : 319–343, 1998.
- N. Samils, A. Olivera, E. Danell, S. J. Alexander, C. Fischer, et C. Colinas. The socioeconomic impact of truffle cultivation in rural Spain. *Economic Botany*, 62(3) : 331–340, 2008.
- S. J. Saupe. Molecular genetics of heterokaryon incompatibility in filamentous Ascomycetes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(3) : 489–502, 2000.
- P. Schäfer, S. Piffi, L. M. Voll, D. Zajic, P. M. Chandler, F. Waller, U. Scholz, J. Pons-Kühnemann, S. Sonnewald, U. Sonnewald, et K.-H. Kogel. Manipulation of plant innate immunity and gibberellin as factor of compatibility in the mutualistic association of barley roots with *Piriformospora indica*. *The Plant Journal*, 59(3) : 461–474, 2009.
- J. M.-I. Schiebold, M. I. Bidartondo, P. Karasch, B. Gravendeel, et G. Gebauer. You are what you get from your fungi : nitrogen stable isotope patterns in *Epipactis* species. *Annals of Botany*, 119(7) : 1085–1095, 2017.
- L. Schneider-Maunoury, S. Leclercq, C. Clément, H. Covès, J. Lambourdière, M. Sauve, F. Richard, M.-A. Sélosse, et E. Taschen. Is *Tuber melanosporum* colonizing the roots of herbaceous, non-ectomycorrhizal plants? *Fungal Ecology*, 31 : 59–68, 2018.
- C. L. Schoch, K. A. Seifert, S. Huhndorf, V. Robert, J. L. Spouge, C. A. Levesque, W. Chen, et F. B. Consortium. 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, 2012.
- M.-A. Sélosse. *La Symbiose*. Vuibert Biologie. Paris, éditions Vuibert, 2000.
- M.-A. Sélosse et F. Le Tacon. The land flora : a phototroph-fungus partnership? *Trends in Ecology & Evolution*, 13(1) : 15–20, 1998.
- M.-A. Sélosse, A. Faccio, G. Scappaticci, et P. Bonfante. Chlorophyllous and achlorophyllous specimens of *Epipactis microphylla* (Neottieae, Orchidaceae) are associated with ectomycorrhizal Septomycetes, including truffles. *Microbial Ecology*, 47(4), 2004.
- M.-A. Sélosse, M.-P. Dubois, et N. Alvarez. Do Sebaciales commonly associate with plant roots as endophytes? *Mycological Research*, 113(10) : 1062–1069, 2009.
- M.-A. Sélosse, F. Martos, B. A. Perry, M. Padamsee, M. Roy, et T. Pailler. Saprotrophic fungal mycorrhizal symbionts in achlorophyllous orchids. *Plant Signaling & Behavior*, 5(4) : 1–5, 2010.
- M.-A. Sélosse, E. Taschen, et T. Giraud. Do black truffles avoid sexual harassment by linking mating type and vegetative incompatibility? *New Phytologist*, 199(1) : 10–13, 2013.
- M.-A. Sélosse, E. Taschen, M. Sauve, L. Schneider-Maunoury, F. Rousset, et F. Richard. Truffles en quête de pères : un champignon à l'orientation sexuelle forcée, et pas encore domestiqué! *Le Trufficulteur*, page 5, 2016.
- M.-A. Sélosse, L. Schneider-Maunoury, E. Taschen, F. Rousset, et F. Richard. Black truffle, a hermaphrodite with forced unisexual behaviour. *Trends in Microbiology*, 25(10) : 784–787, 2017.
- M.-A. Sélosse, L. Schneider-Maunoury, et F. Martos. Time to re-think fungal ecology? Fungal ecological niches are often prejudged. *New Phytologist*, 217(3) : 968–972, 2018.
- S. W. Simard, K. J. Beiler, M. A. Bingham, J. R. Deslippe, L. J. Philip, et F. P. Teste. Mycorrhizal networks : mechanisms, ecology and modelling. *Fungal Biology Reviews*, 26(1) : 39–60, 2012.
- B. Slippers et M. J. Wingfield. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants : diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews*, 21(2) : 90–106, 2007.

- F. A. Smith et S. E. Smith. How useful is the mutualism-parasitism continuum of arbuscular mycorrhizal functioning? *Plant and Soil*, 363(1) : 7–18, 2013.
- G. R. Smith, R. D. Finlay, J. Stenlid, R. Vasaitis, et A. Menkis. 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, 2017.
- S. E. Smith et D. Read. *Mycorrhizal Symbiosis*. éditions Elsevier, 2008.
- S. Séné, M.-A. Selosse, M. Forget, J. Lambourdière, K. Cissé, A. G. Diédhiou, E. Rivera-Ocasio, H. Kodja, N. Kameyama, K. Nara, L. Vincenot, J.-L. Mansot, J. Weber, M. Roy, S. N. Sylla, et A. Bâ. A pantropically introduced tree is followed by specific ectomycorrhizal symbionts due to pseudo-vertical transmission. *The ISME Journal*, 12(7) : 1806–1816, 2018.
- P. Sourzat. *Trufficulture, résultats techniques d'expérimentation*. Cahors, éditions LPA du Montat, 1983.
- J. W. Spatafora, M. C. Aime, I. V. Grigoriev, F. Martin, J. E. Stajich, et M. Blackwell. The fungal tree of life : from molecular systematics to genome-scale phylogenies. In *The Fungal Kingdom*, pages 3–34. American Society of Microbiology, 2017.
- C. C. Spencer, J. E. Neigel, et P. L. Leberg. Experimental evaluation of the usefulness of microsatellite DNA for detecting demographic bottlenecks. *Molecular Ecology*, 9(10) : 1517–1528, 2000.
- R. Splivallo, M. Novero, C. M. Berteà, S. Bossi, et P. Bonfante. Truffle volatiles inhibit growth and induce an oxidative burst in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 175(3) : 417–424, 2007.
- R. Splivallo, U. Fischer, C. Göbel, I. Feussner, et P. Karlovsky. Truffles regulate plant root morphogenesis via the production of auxin and ethylene. *Plant Physiology*, 150(4) : 2018–2029, 2009.
- R. Splivallo, S. Ottonello, A. Mello, et P. Karlovsky. Truffle volatiles : from chemical ecology to aroma biosynthesis. *New Phytologist*, 189(3) : 688–699, 2011.
- R. Splivallo, N. Valdez, N. Kirchhoff, M. C. Ona, J.-P. Schmidt, I. Feussner, et P. Karlovsky. Intraspecific genotypic variability determines concentrations of key truffle volatiles. *New Phytologist*, 194(3) : 823–835, 2012.
- E. Streiblová, H. Gryndlerová, et M. Gryndler. Truffle brûlé : an efficient fungal life strategy. *FEMS Microbiology Ecology*, 80(1) : 1–8, 2012.
- C. Strullu-Derrien, M.-A. Selosse, P. Kenrick, et F. M. Martin. The origin and evolution of mycorrhizal symbioses : from palaeomycology to phylogenomics. *New Phytologist*, 220 : 1012–1030, 2018.
- C. Strullu-Derrien, P. Kenrick, S. Pressel, J. G. Duckett, J.-P. Rioult, et D.-G. Strullu. 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, 2014.
- Z. A. Szpiech, M. Jakobsson, et N. A. Rosenberg. ADZE : a rarefaction approach for counting alleles private to combinations of populations. *Bioinformatics*, 24(21) : 2498–2504, 2008.
- P. Taberlet, S. M. Prud'homme, E. Campione, J. Roy, C. Miquel, W. Shehzad, L. Gielly, D. Rioux, P. Choler, J.-C. Clément, C. Melodelima, F. Pompanon, et E. Coissac. Soil sampling and isolation of extracellular DNA from large amount of starting material suitable for metabarcoding studies. *Molecular Ecology*, 21(8) : 1816–1820, 2012.
- T. Talou, M. Delmas, et A. Gaset. Principal constituents of black truffle (*Tuber melanosporum*) aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35(5) : 774–777, 1987.
- T. Talou, A. Gaset, M. Delmas, M. Kulifaj, et C. Montant. Dimethyl sulphide : the secret for black truffle hunting by animals? *Mycological Research*, 94(2) : 277–278, 1990.
- E. Taschen, M. Sauve, A. Taudière, J. Parlade, M.-A. Selosse, et F. Richard. Whose truffle is this? Distribution patterns of ectomycorrhizal fungal diversity in *Tuber melanosporum* brûlés developed in multi-host Mediterranean plant communities. *Environmental Microbiology*, 17(8) : 2747–2761, 2015.
- E. Taschen, F. Rousset, M. Sauve, L. Benoit, M.-P. Dubois, F. Richard, et M.-A. Selosse. 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, 2016.
- E. Taschen, M. Sauve, B. Vincent, J. Parladé, D. van Tuinen, Y. Aumeeruddy-Thomas, B. Assenat, M.-A. Selosse, et F. Richard. Insight into the truffle brûlé : tripartite interactions between the black

- truffle (*Tuber melanosporum*), holm oak (*Quercus ilex*) and arbuscular mycorrhizal plants. *Plant and Soil*, page accepted, 2019.
- J. Taylor, D. Jacobson, et M. Fisher. The evolution of asexual fungi : reproduction, speciation and classification. *Annual Review of Phytopathology*, 37(1) : 197–246, 1999.
- L. Tedersoo et M. E. Smith. Lineages of ectomycorrhizal fungi revisited : Foraging strategies and novel lineages revealed by sequences from below-ground. *Fungal Biology Reviews*, 27(3) : 83–99, 2013.
- L. Tedersoo, T. W. May, et M. E. Smith. Ectomycorrhizal lifestyle in fungi : global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza*, 20(4) : 217–263, 2010.
- L. Tedersoo, M. Bahram, M. Toots, A. G. Diédhiou, T. W. Henkel, R. Kjølner, M. H. Morris, K. Nara, E. Nouhra, K. G. Peay, S. Pölme, M. Ryberg, M. E. Smith, et U. Kõljalg. Towards global patterns in the diversity and community structure of ectomycorrhizal fungi. *Molecular Ecology*, 21(17) : 4160–4170, 2012.
- L. Tedersoo, M. Bahram, S. Polme, U. Kõljalg, N. S. Yorou, R. Wijesundera, L. V. Ruiz, A. M. Vasco-Palacios, P. Q. Thu, A. Suija, M. E. Smith, C. Sharp, E. Saluveer, A. Saitta, M. Rosas, T. Riit, D. Ratkowsky, K. Pritsch, K. Poldmaa, M. Piepenbring, C. Phosri, M. Peterson, K. Parts, K. Partel, E. Otsing, E. Nouhra, A. L. Njouonkou, R. H. Nilsson, L. N. Morgado, J. Mayor, T. W. May, L. Majuakim, D. J. Lodge, S. S. Lee, K.-H. Larsson, P. Kohout, K. Hosaka, I. Hiiesalu, T. W. Henkel, H. Harend, L.-d. Guo, A. Greslebin, G. Grelet, J. Geml, G. Gates, W. Dunstan, C. Dunk, R. Drenkhan, J. Dearnaley, A. De Kesel, T. Dang, X. Chen, F. Buegger, F. Q. Brearley, G. Bonito, S. Anslan, S. Abell, et K. Abarenkov. Global diversity and geography of soil fungi. *Science*, 346(6213) : 1256688–1256688, 2014.
- L. Tedersoo, M. E. Smith, et M. E. Smith. Ectomycorrhizal fungal lineages : detection of four new groups and notes on consistent recognition of ectomycorrhizal taxa in High-Throughput Sequencing studies. In *Biogeography of Mycorrhizal Symbiosis*, pages 125–142. Springer International Publishing, 2017.
- T. Thiergart, P. Duran, T. Ellis, R. Garrido-Oter, E. Kemen, F. Roux, C. Alonso-Blanco, J. Agren, P. Schulze-Lefert, et S. Hacquard. Root microbiota assembly and adaptive differentiation among European *Arabidopsis* populations. *bioRxiv*, page 640623, 2019.
- H. Toju et H. Sato. Root-associated fungi shared between arbuscular mycorrhizal and ectomycorrhizal conifers in a temperate forest. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2018.
- H. Toju, S. Yamamoto, H. Sato, A. S. Tanabe, G. S. Gilbert, et K. Kadowaki. Community composition of root-associated fungi in a *Quercus*-dominated temperate forest : “codominance” of mycorrhizal and root-endophytic fungi. *Ecology and Evolution*, 3(5) : 1281–1293, 2013.
- H. Toju, A. S. Tanabe, et H. S. Ishii. Ericaceous plant-fungus network in a harsh alpine-subalpine environment. *Molecular Ecology*, 25(13) : 3242–3257, 2016.
- B. D. Twieg, D. M. Durall, et S. W. Simard. Ectomycorrhizal fungal succession in mixed temperate forests. *New Phytologist*, 176(2) : 437–447, 2007.
- A. Urban, I. Neuner-Plattner, I. Krisai-Greilhuber, et K. Haselwandter. Molecular studies on terricolous microfungi reveal novel anamorphs of two *Tuber* species. *Mycological Research*, 108(7) : 749–758, 2004.
- L.-M. Vaario, A. Guerin-Laguet, N. Matsushita, K. Suzuki, et F. Lapeyrie. Saprobic potential of *Tricholoma matsutake* : growth over pine bark treated with surfactants. *Mycorrhiza*, 12(1) : 1–5, 2002.
- M. Vahdatzadeh, A. Deveau, et R. Splivallo. The role of the microbiome of truffles in aroma formation : a meta-analysis approach. *Appl. Environ. Microbiol.*, 81(20) : 6946–6952, 2015.
- P. Vandenkoornhuyse, S. L. Baldauf, C. Leyval, J. Straczek, et J. P. W. Young. Extensive fungal diversity in plant roots. *Science*, 295(5562) : 2051, 2002.
- E. C. Vellinga, B. E. Wolfe, et A. Pringle. Global patterns of ectomycorrhizal introductions. *New Phytologist*, 181(4) : 960–973, 2009.
- L. Vincenot et M.-A. Selosse. Population biology and ecology of ectomycorrhizal fungi. In L. Tedersoo, éditeur, *Biogeography of Mycorrhizal Symbiosis*, pages 39–59. Springer International Publishing, 2017.
- S. Visser. Ectomycorrhizal fungal succession in jack pine stands following wildfire. *New Phytologist*, 129(3) : 389–401, 1995.
- T. Vrålstad. Are ericoid and ectomycorrhizal fungi part of a common guild? *New Phytologist*, (164) : 7–10, 2004.

- D. Vu, M. Groenewald, M. de Vries, T. Gehrman, B. Stielow, U. Eberhardt, A. Al-Hatmi, J. Z. Groenewald, G. Cardinali, J. Houbraeken, T. Boekhout, P. W. Crous, V. Robert, et G. J. M. Verkley. Large-scale generation and analysis of filamentous fungal DNA barcodes boosts coverage for kingdom fungi and reveals thresholds for fungal species and higher taxon delimitation. *Studies in Mycology*, 92 : 135–154, 2019.
- F. Walder, H. Niemann, M. Natarajan, M. F. Lehmann, T. Boller, et A. Wiemken. Mycorrhizal networks : Common goods of plants shared under unequal terms of trade. *Plant Physiology*, 159(2) : 789–797, 2012.
- B. Wang et Y.-L. Qiu. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza*, 16(5) : 299–363, 2006.
- M. Waud, P. Busschaert, S. Ruyters, H. Jacquemyn, et B. Lievens. Impact of primer choice on characterization of orchid mycorrhizal communities using 454 pyrosequencing. *Molecular Ecology Resources*, 14(4) : 679–699, 2014.
- S. C. Weeks, C. Benvenuto, et S. K. Reed. When males and hermaphrodites coexist : a review of androdioecy in animals. *Integrative and Comparative Biology*, 46(4) : 449–464, 2006.
- M. Weiß, Z. Sýkorová, S. Garnica, K. Riess, F. Martos, C. Krause, F. Oberwinkler, R. Bauer, et D. Redecker. Sebaciales everywhere : previously overlooked ubiquitous fungal endophytes. *PLoS ONE*, 6(2) : 1–7, 2011.
- M. Weiß, F. Waller, A. Zuccaro, et M.-A. Selosse. Sebaciales - one thousand and one interactions with land plants. *New Phytologist*, 211(1) : 20–40, 2016.
- D. L. Wheeler, J. K. S. Dung, et D. A. Johnson. From pathogen to endophyte : an endophytic population of *Verticillium dahliae* evolved from a sympatric pathogenic population. *New Phytologist*, 222(1) : 497–510, 2019.
- D. Wilson. Endophyte : the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos*, 73(2) : 274–276, 1995.
- D. Wipf, F. Krajinski, D. v. Tuinen, G. Recorbet, et P.-E. Courty. Trading on the arbuscular mycorrhiza market : from arbuscules to common mycorrhizal networks. *New Phytologist*, 223(3) : 1127–1142, 2019.
- J. J. Worrall. Somatic incompatibility in Basidiomycetes. *Mycologia*, 89(1) : 24, 1997.
- S. Wright. Isolation by distance. *Genetics*, 28(114) : 114–138, 1943.
- B. Zeller, C. Bréchet, J.-P. Maurice, et F. Tacon. Saprotrophic versus symbiotic strategy during truffle ascocarp development under holm oak. A response based on 13c and 15n natural abundance. *Annals of Forest Science*, 65(6) : 607–607, 2008.

Résumé

La Truffe noire (*Tuber melanosporum*) est un champignon Ascomycète vivant en symbiose ectomycorhizienne avec les racines d'arbres tels que les chênes et les noisetiers. Malgré l'intérêt porté à cette espèce, certains pans de sa biologie reproductive et de son écologie restent mal compris. La première partie de ce travail précise les aspects génétiques de sa reproduction sexuée à la fois en zone d'endémisme (nord du bassin Méditerranéen) et en zone d'introduction (hémisphère Sud) et propose un modèle expliquant certains paradoxes apparents dans la structure génétique des populations. Ce modèle fait intervenir les méiospores comme partenaires paternels dans la reproduction, soulignant l'importance de la banque de spores qui a donc été évaluée en quantifiant la proportions d'ascocarps dégradés localement. La deuxième partie s'attache à élucider les liens entre la Truffe noire et les plantes herbacées avec lesquelles elle cohabite, suggérés par le brûlé, zone pauvre en végétation qui se forme autour des arbres en symbiose avec certaines Truffes. Une interaction directe avec les racines, qualifiée d'endophyte, a été mise en évidence : le mycélium de Truffe noire colonise l'apoplasme des racines des plantes herbacées non-ectomycorhiziennes. Cette observation a été étendue à la Truffe de Bourgogne (*T. aestivum*) et elle ouvre la voie vers des pratiques agricoles intégrant la biodiversité végétale des truffières. Enfin, les communautés de champignons ectomycorhiziens dans les racines de plantes non-ectomycorhiziennes de forêts franciliennes (dominées par des arbres ectomycorhiziens) ont été évaluées : probablement plus répandu que soupçonné jusqu'alors, l'endophytisme des champignons ectomycorhiziens mis en évidence par des techniques moléculaires pousse à revisiter leur écologie et leur évolution.

Abstract

The black Truffle (*Tuber melanosporum*) is an Ascomycete living in ectomycorrhizal symbiosis with roots of trees like oaks or hazels. Despite the wide interest in this species, some features of its reproductive biology and ecology remain poorly understood. The first part of this work analyses the genetic aspects of its sexual reproduction, both in area of endemism (north of the Mediterranean basin) and in area on introduction (South hemisphere), and suggests a model that could explain some apparent inconsistencies in the populations genetic structure. In this model, meiotic spores act as paternal partners in the reproduction, highlighting the importance of soil spore bank that has therefore been evaluated by quantifying the proportion of locally degraded asocarps. The second part aims to clarify the interactions between the black Truffle and coexisting herbaceous plants, made visible by the *brûlé*, *i.e.* the vegetation-scarce area around trees associated with some Truffle species. This emphasizes a direct interaction called endophytism: black Truffle mycelium colonizes apoplastically the roots of herbaceous non-ectomycorrhizal plants. This observation has also been verified for the Burgundy Truffle (*T. aestivum*), paving the way to cultural practices that integrate truffleground plant biodiversity. Finally, ectomycorrhizal fungal communities of non-ectomycorrhizal plant roots in ectomycorrhizal forests of the Paris region have been assessed: potential endophytism has been detected for various ectomycorrhizal fungi by molecular approaches. Endophytism is probably more widespread than previously thought, and raises questions about its ecological function and evolution in ectomycorrhizal fungi.