



**Écologie des Oomycètes et champignons
phytopathogènes dans les sols de forêt de Guyane
Française : éclairages sur les relations entre
communautés de Phytophthora et d'arbres dans les
forêts tropicales**

Jean Legeay

► **To cite this version:**

Jean Legeay. Écologie des Oomycètes et champignons phytopathogènes dans les sols de forêt de Guyane Française : éclairages sur les relations entre communautés de Phytophthora et d'arbres dans les forêts tropicales. Biologie végétale. Université de Lorraine, 2019. Français. NNT : 2019LORR0072 . tel-02331046

HAL Id: tel-02331046

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-02331046>

Submitted on 24 Oct 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Ecole Doctorale SIRENa (Sciences et Ingénierie des Ressources
Naturelles)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Lorraine

Mention : « Biologie et écologie des forêts et des agrosystèmes »

Thèse soutenue le 21/06/2019

Par Jean Legeay

**Ecologie des Oomycètes et champignons phytopathogènes dans les
sols de forêt de Guyane Française : éclairages sur les relations
entre communautés de *Phytophthora* et d'arbres dans les forêts
tropicales**

Rapporteurs : Mme Cécile ROBIN, DR, UMR Biogeco, Bordeaux

Mr Christian STEINBERG, DR, UMR Agroécologie, Dijon

Examineurs : Mr Renaud IOOS, DR, ANSES, Nancy

Mme Lucie VINCENOT, MC, Laboratoire Ecodiv, Rouen

Directeur de thèse : Marc BUEE, DR, UMR IAM, Nancy

Co-directeur de thèse : Benoît MARCAIS, DR, UMR IAM, Nancy

UMR INRA/Université de Lorraine Interactions Arbres-Microorganismes Ecologie des
champignons pathogènes forestiers & Ecogénomique des interactions

Rue d'Amance – 54280 Champenoux

Remerciements

Je remercie Benoît, Marc et Claude de m'avoir choisi pour cette thèse et pour leur accompagnement et patience pendant ces trois ans.

Je remercie les membres du jury Cécile, Christian, Lucie et Renaud d'avoir accepté d'examiner mon travail.

Ma reconnaissance à Olivier pour sa participation aux travaux de Guyane, à Anaïs pour son aide sur la paillasse, et à Emmanuelle qui a accompli tout le traitement de données de NGS ; ainsi qu'à tout les gens qui m'ont aidé et accueilli à Kourou : Jocelyn, Eliane, Heidy et Stéphane.

Enfin, un grand merci à l'équipe patho toute entière qui m'a hébergé et nourri en sucreries pendant trois ans.

Table des matières

Introduction	1
Les forêts tropicales, haut lieu de diversité	2
L'écosystème forestier tropical	2
Les forêts néo-tropicales : forêts tropicales d'Amérique du Sud	2
Diversité microbienne des forêts tropicales	3
Hypothèses explicatives de la diversité	3
Hypothèse Janzen-Connell et ses agents	4
L'hypothèse Janzen-Connell pour expliquer le maintien de la diversité en forêts néo-tropicales	4
Prérequis de l'hypothèse Janzen-Connell	7
Mécanismes de type Janzen-Connell et feedbacks négatifs	6
Les organismes acteurs des mécanismes de type Janzen-Connell	6
Les feedback positifs : mycorhizes et organismes suppresseurs de pathogènes	8
Les Oomycètes, acteurs potentiels des mécanismes de type Janzen-Connell	9
Biologie des Oomycètes	9
Etude des communautés d'Oomycètes par piégeage/isolation	11
Etude des communautés d'Oomycètes par metabarcoding de l'ITS	12
Limites de l'ITS et marqueurs alternatifs	13
Etat des connaissances sur les communautés d'Oomycètes en milieu naturel	14
Communautés des <i>Phytophthora</i> dans les latitudes tempérées et boréales	14
Communautés des <i>Pythium</i> dans les latitudes tempérées et boréales	15
Communautés de <i>Phytophthora</i> et <i>Pythium</i> dans les forêts tropicales	16
Spécificité à l'hôte des Oomycètes	17
Les pathogènes fongiques, autres acteurs potentiels du maintien de la diversité	18
Les pathogènes fongiques dans les forêts tropicales	18
Difficultés de la distinction endophyte/pathogène chez les Fungi	19
Objectifs de la thèse	20
Méthodologie	21
Sites étudiés	21
Echantillonnage du sol	21
Piégeage/isollement	22

Metabarcoding.....	23
Chapitre 1	27
Abstract	30
Chapitre 2	34
Abstract	38
Introduction	39
Matériel & méthode.....	42
Sampling and location description.....	42
Baiting and isolation	42
Phylogenetic analysis of isolates	43
Metabarcoding and Illumina Miseq sequencing	43
Bioinformatics analysis	44
Data analysis.....	44
Résultats	45
<i>Phytophthora</i> diversity uncovered by baiting& isolation.....	45
Phylogenetic analysis of isolates	46
Metabarcoding approach and comparisonwith baiting/isolation.....	46
Community structure analysis	47
Discussion	48
Chapitre 3	64
Abstract	68
Introduction	69
Matériel & méthode.....	72
Sites and sampling.....	72
DNA extraction and PCR amplicon pyrosequencing.....	73
Bioinformatics Analysis for oomycetes Miseq reads	73
Extraction of pathogenic fungi communities data.....	75

Résultats	75
Communities composition	75
Factors structuring the oomycete and fungal pathogens communities	76
Discussion	77
Chapitre 4	90
Introduction	93
Matériel & méthode	94
Résultats	95
Discussion	96
Discussion	102
Validation d'outils et méthodes permettant de décrire les communautés d'Oomycètes ...	103
Faible diversité des <i>Phytophthora</i> et des pathogènes	105
Facteurs structurant les communautés d'Oomycètes et de Champignons pathogènes	109
Interactions plantes-pathogènes et spécialisation	110
Messages à retenir	114

Figures

Introduction

Fig 1-Forêts néotropicales	3
Fig 2-Hypothèse Janzen-Connell	6
Fig 3- Positions phylogénétique des Oomycètes et des <i>Phytophthora</i>	10
Fig 4- Procédure de metabarcoding	24

Chapitre 1

Fig 1 - Carte des régions amplifiées	30
Fig 2 - Proportions des reads par espèce de <i>Phytophthora</i>	31

Chapitre 2

Fig 1 – Sites d'échantillonnage et dispositif expérimental	62
Fig 2 – Quantification des <i>Phytophthora</i> par comptage des lésions	63
Fig 3 - Arbre phylogénétique établi via les marqueurs nucléaires d'isolats du clade 5. ..	64

Fig 4 - Proportion des échantillons contenant chaque espèce de <i>Phytophthora</i> retrouvées par piégeage/isolément	65
Fig 5- Proportion des échantillons contenant chaque espèce de <i>Phytophthora</i> retrouvées, via les trois méthodes	66
Fig S1 Arbre phylogénétique établi via les marqueurs mitochondriaux d'isolats du clade 5	67
Chapitre 3	
Fig 1 - Représentations des communautés de Péronosporomycètes.....	81
Fig 2 - Représentations des communautés de <i>Phytophthora</i>	81
Fig 3 - Représentations des communautés de Champignons pathogènes.....	82
Fig S1 - Map of the plantation's monospecific blocks.....	85
Fig S2 – Map of the sampled tree in the P16 forest.....	86
Chapitre 4	
Fig 1 - Localisation des prélèvements de sol dans la parcelle P16 de Paracou.....	98
Fig 2 - Comparaison des poids, tailles et ratios racines mortes/vivantes chez les plants de Wacapou.....	99
Fig S1- Plan des plants de Wacapou en serre et photos des plants	101
Discussion	
Fig 1 – Schéma des différentes méthodes d'analyse des communautés de <i>Phytophthora</i>	107
<u>Tables</u>	
Chapitre 1	
Table 1 – Espèces de <i>Phytophthora</i> utilisées dans la communauté artificielle.....	29
Table 2 – Amorces utilisées	30
Table 3 – Nombres d'échantillons de sols de forêt dans lesquels des <i>Phytophthora</i> ont été détectés via metabarcoding.....	32
Chapitre 2	
Table 1 – Proportions des espèces retrouvées via les trois différentes méthodes.....	68
Chapitre 3	
Table 1 – Nombre d'espèces retrouvées dans les deux sites pour chaque groupe	

Taxonomique.....	86
Fig 2 –P-values de chaque effetet interactions.....	87
Chapitre 4	
Table 1-Effet des traitements sur les plants de Wacapou	100

INTRODUCTION GENERALE

Les forêts tropicales, haut lieux de diversité

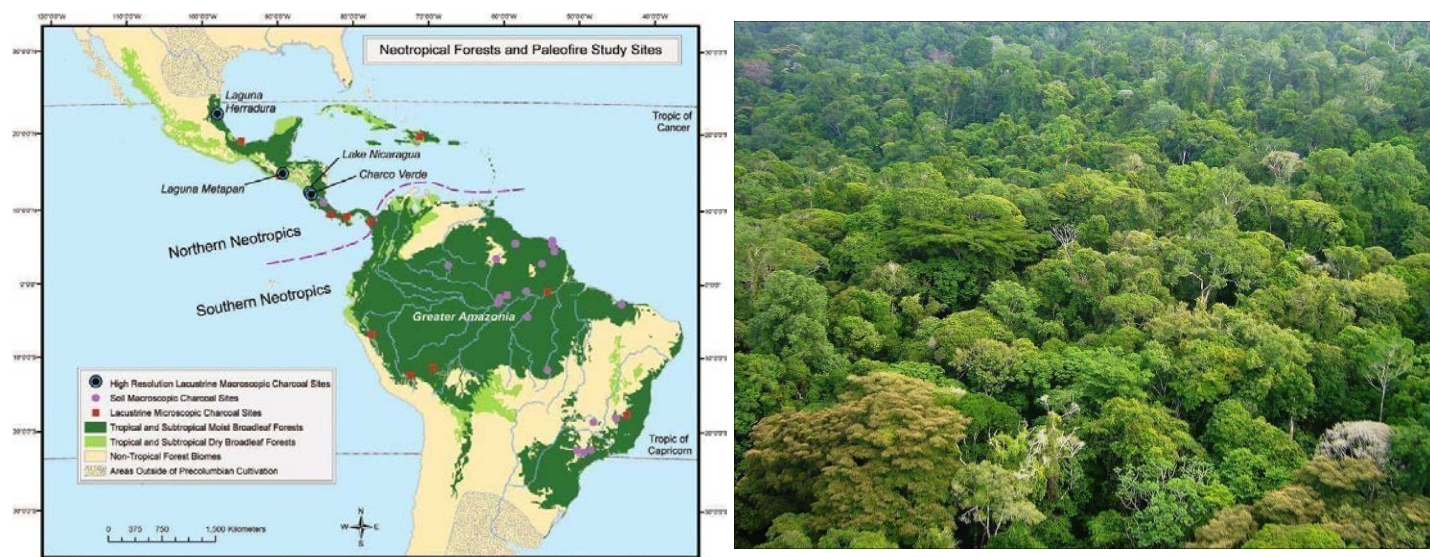
L'écosystème forestier tropical

Les forêts tropicales constituent l'écosystème terrestre le plus divers à l'échelle globale, comprenant environ 50 % de toutes les espèces répertoriées (Wilson 1988). La diversité végétale, en particulier, y est très élevée avec une estimation d'un nombre d'espèces d'arbres situé entre 40 000 et 53 000 (Slik *et al.* 2015). Elles se situent dans des régions à températures et précipitations mensuelles élevées, et à faible saisonnalité (Whitmore 1998). Elles couvrent environ 7% de la surface terrestre et 50 % de la surface forestière et sont situées dans les zones équatoriales d'Amérique, d'Afrique et d'Asie-Pacifique (Wilson 1988). Cet écosystème, dominé par les arbres, possède un sous-étage constitué de plantules, juvéniles et grimpants ligneux ; les espèces herbacées y étant plutôt rares (Richards 1996). On divise classiquement les sols de forêts tropicales en trois types : les bas-fonds, sols situés dans des dénivelés topographiques les rendant inondés à la saison des pluies ; les sols de terre ferme, situés à des topographies plus élevées et échappant ainsi à l'ennoyage saisonnier ; et les sables blancs, sols plus acides et plus pauvres en nutriments que les deux sols précédents (Randall 2017).

Les forêts néotropicales : forêts tropicales d'Amérique du Sud

La diversité alpha des plantes dans le bassin amazonien (fig1) est plus élevée que dans n'importe quel autre écosystème terrestre, à égalité avec l'île de Bornéo, avec environ 300 espèces d'arbres par hectare (Gentry, 1988a,b). Dans une analyse à plus large échelle, le nombre d'espèces végétales néotropicales (estimé à environ 16000) est aussi nettement plus élevé que dans les autres forêts tropicales d'Asie et d'Afrique (Ter Steege *et al.* 2014, Gentry, 1982). Il en va de même pour le nombre d'espèces d'insectes (Godfray *et al.* 1999). Toutefois, les forêts de l'est de l'Amazonie, et en particulier de Guyane, sont considérées comme relativement moins diverses, en comparaison de celles d'Amazonie de l'Ouest (Ter Steege 1998). Les forêts guyanaises sont

dominées par des arbres appartenant aux groupes des Légumineuses, des Chrysobalanacées et des Lécythidacées (Ter Steege *et al.* 2013).



A

B

Fig 1 : A : Localisation des forêts tropicales humides (vert sombre) en Amérique centrale et du Sud (carte adaptée de Carvalho *et al.* 2013). B : Canopée de la forêt de Guyane Française, illustrant sa forte diversité non-agrégée en arbres

Diversité microbienne des forêts tropicales

Comparativement aux nombreuses données botaniques accumulées sur les forêts amazoniennes, les études sur les communautés microbiennes restent lacunaires et, par conséquent, les interactions plantes/micro-organismes de ces écosystèmes sont encore mal connues. Bien que la diversité fongique y soit très élevée, il n'est pas encore possible de fournir une estimation du nombre d'espèces fongiques présents dans cet écosystème (Piepenbring *et al.* 2011a), d'autant plus que les outils moléculaires ne permettent pas encore de classifier bon nombre d'entre elles (Kõljalg *et al.* 2013). Toutefois, le gradient latitudinal de diversité fongique ne semble pas aussi fort que celui de diversité végétale (Tedersoo *et al.* 2014), ou d'autres organismes (Gaston, 2000 ; Hawkins *et al.*, 2003). La plupart des arbres des forêts tropicales forment des mycorhizes arbusculaires (McGuire *et al.* 2009). Certains genres sont connus pour former des ectomycorhizes dans les forêts africaines et asiatiques (Torti & Coley

1999), mais ce type de symbiose est notoirement très rare dans les forêts amazoniennes (Béreau & Garbaye 1994, Béreau *et al.* 1997).

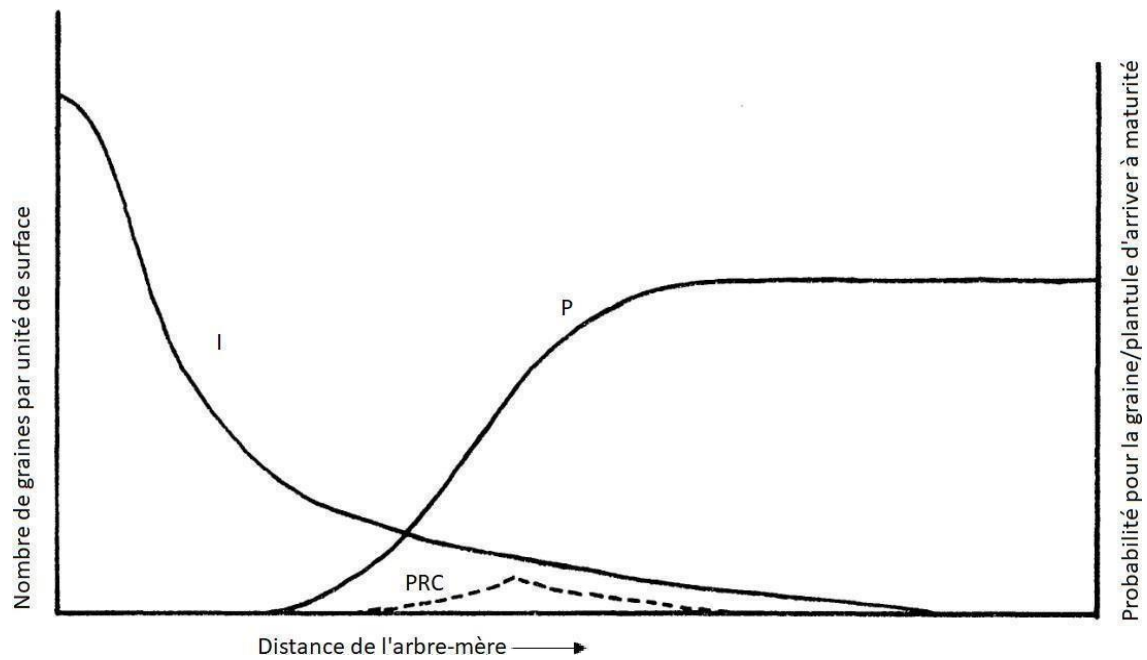
Hypothèses explicatives de la diversité

Cette très forte diversité végétale est souvent expliquée par la plus longue stabilité des forêts tropicales en tant qu'écosystèmes, contrairement aux forêts tempérées et boréales qui sont passées par des périodes glaciaires (Pimm & Brown 2004). Toutefois, cette hypothèse explique l'origine de la diversité mais pas son maintien. En effet, le principe d'exclusion compétitive suppose que l'espèce la mieux adaptée à une niche donnée devrait prendre le dessus sur les autres et exclure ses compétiteurs dans un environnement homogène (Wright, 2002). Plusieurs hypothèses ont donc été proposées afin d'expliquer le maintien de cette diversité. Certaines de ces hypothèses invoquent des facteurs abiotiques créant une hétérogénéité de l'environnement comme la création de clairières (Denslow, 1987) ou la différence entre ratios de nutriments (Tilman & Pacala 1993). Mais de nombreux autres facteurs peuvent créer une hétérogénéité micro-environnementale maintenant une diversité à l'échelle locale (Svenning 2001). Dans les tropiques, cette hétérogénéité spatiale s'accompagne d'une stabilité du milieu dans le temps qui permet aux espèces d'occuper des niches stables, contrairement aux latitudes tempérées où les contrastes saisonniers imposent une spécialisation moindre des espèces (Brown 2014). Toutefois, l'hypothèse qui nous intéresse pour la suite de cette étude est celle de Janzen-Connell, qui repose sur le rôle des ennemis naturels des plantes comme acteurs principaux du maintien de cette diversité végétale.

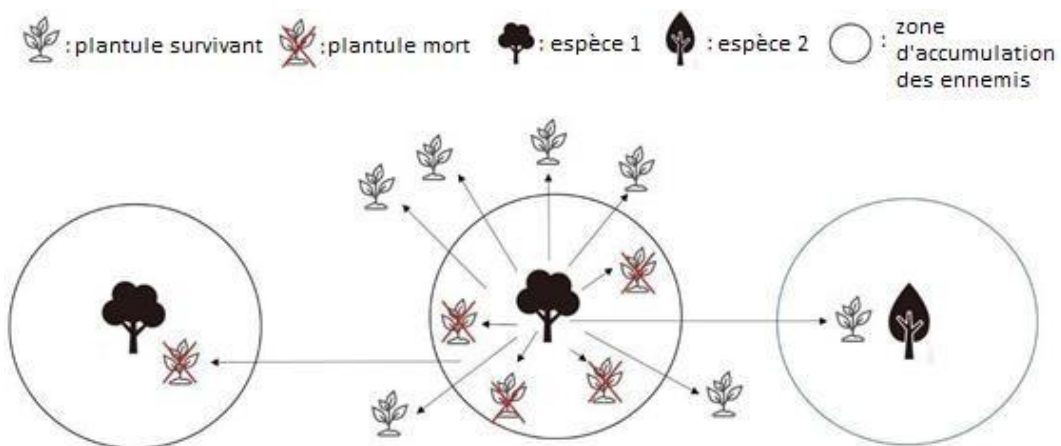
Hypothèse Janzen-Connell et ses acteurs potentiels

L'hypothèse Janzen-Connell pour expliquer le maintien de la diversité dans les forêts tropicales

L'hypothèse Janzen-Connell s'appuie sur le fait que les plantules d'une certaine espèce d'arbre peuvent être soumises à deux types de mortalités causés par les ennemis naturels des plantes (Janzen 1970, Schupp 1992) : (1) une mortalité dépendante de la distance à la plante « mère » due au fait que l'arbre parent a accumulé un certain cortège d'ennemis qui vont affecter les plantules germant dans sa proximité (Hyatt *et al.* 2003) (2) une mortalité dépendante de la densité, due au fait de l'accumulation locale de plantules qui cause également l'accumulation de leurs ennemis. Ces deux mortalités diminueraient la fitness des plantules à proximité de plantes conspécifiques (fig 2), et par conséquent, entraîneraient une perte de fitness pour les espèces les plus abondantes et un avantage pour les espèces les plus rares. En limitant ces phénomènes agrégatifs, de nombreuses espèces différentes d'arbres peuvent coexister, sans qu'une espèce ne prenne le dessus sur les autres (Terborgh 2012). Cette hypothèse a l'avantage de non seulement impliquer une hétérogénéité du milieu qui se crée via la densité en arbres conspécifiques, mais aussi de désavantager les espèces les plus abondantes (Wright, 2002).



A



B

Fig 2 : A : Hypothèse Janzen-Connell. I est le nombre de graines par unité de surface de sol. P est la probabilité de survie des plantules issues des graines. PRC est la probabilité qu'un nouvel individu adulte apparaisse. Adapté de Janzen D.H., 1970, Herbivores and the number of tree species in tropical forests, American Naturalist, vol.104, pp.501-528 B: Schématisation simplifiée des mécanismes de l'hypothèse Janzen-Connell.

Prérequis de l'hypothèse Janzen-Connell

Toutefois, pour fonctionner, l'hypothèse Janzen-Connell nécessite que deux prérequis soient respectés. Premièrement, la distance de dispersion des ennemis des plantes doit être inférieure à celle des plantes, ceci afin que les graines puissent germer soit dans des zones libres de pathogènes, soit dans des zones contenant des pathogènes, créant ainsi de l'hétérogénéité (Hyatt *et al.* 2003). Deuxièmement, les ennemis naturels des plantes doivent démontrer un certain degré de spécialisation, afin de maintenir cette hétérogénéité de niches pour une large majorité des espèces d'arbres (Sedio & Ostling 2013). Même si une spécificité stricte n'est pas nécessaire, les ennemis doivent au moins avoir un spectre de préférence pour leurs hôtes végétaux. Certaines publications traitant de modèles théoriques remettent toutefois en cause ces prérequis. En effet, pour Stump & Chesson (2015) ainsi que Adler & Muller-Landau (2005),

seule la spécialisation des pathogènes est nécessaire au maintien d'une diversité végétale, une trop faible dispersion des ennemis des plantes pouvant même nuire à l'effet de maintien de la diversité.

Prérequis de l'hypothèse Janzen-Connell

Toutefois, pour fonctionner, l'hypothèse Janzen-Connell nécessite que deux prérequis soient respectés. Premièrement, la distance de dispersion des ennemis des plantes doit être inférieure à celle des plantes, ceci afin que les graines puissent germer soit dans des zones libres de pathogènes, soit dans des zones contenant des pathogènes, créant ainsi de l'hétérogénéité (Hyatt *et al.* 2003). Deuxièmement, les ennemis naturels des plantes doivent démontrer un certain degré de spécialisation, afin de maintenir cette hétérogénéité de niches pour une large majorité des espèces d'arbres (Sedio & Ostling 2013). Même si une spécificité stricte n'est pas nécessaire, les ennemis doivent au moins avoir un spectre de préférence pour leurs hôtes végétaux. Certaines publications traitant de modèles théoriques remettent toutefois en cause ces prérequis. En effet, pour Stump & Chesson (2015) ainsi que Adler & Muller-Landau (2005),

seule la spécialisation des pathogènes est nécessaire au maintien d'une diversité végétale, une

trop faible dispersion des ennemis des plantes pouvant même nuire à l'effet de maintien de la diversité.

Mécanismes de type Janzen-Connell et feedbacks négatifs

Des effets de type Janzen-Connell, ont été relevés en milieu tropical dans de nombreuses publications, mais ces dernières ne portent en général que sur un faible nombre d'espèces d'arbres (Comita *et al.* 2014, Hansen *et al.* 2008). Il s'agit souvent de fontes de semis à intensité dépendante de la densité des plantules ou de la distance à l'arbre mère. La méta-analyse de Comita *et al.* (2014) montre que l'amplitude de ces mortalités dépendantes de la densité et/ou de la distance semble proportionnelle au niveau de précipitation de la zone étudiée. L'implication potentielle de ce facteur climatique pourrait suggérer une implication plus forte des effets Janzen-Connell dans les forêts tropicales par rapport aux forêts tempérées. Cependant, des feedbacks négatifs du sol (c'est-à-dire une plante poussant plus difficilement dans un sol prélevé au pied d'une plante conspécifique) ont été décrits pour des arbres en milieu tempéré (Nijjer *et al.* 2006) et pour des arbres néo-tropicaux (Mangan *et al.* 2010). Petermann *et al.* 2008 trouvent également des effets de type Janzen-Connell chez 24 espèces herbacées d'Europe. Ces feedbacks négatifs semblent toujours être dus à des organismes pathogènes, et la plupart des publications mettent en avant leurs effets (Bagchi *et al.* 2010).

Les organismes acteurs des mécanismes de type Janzen-Connell

Parmi les publications citant des organismes mycéliens du sol comme responsables d'effets Janzen-Connell, on peut citer Liu *et al.* (2015a), portant sur des mortalités distances-dépendantes des plantules de trois arbres subtropicaux de Chine. De même, Bell *et al.* (2006) et Bagchi *et al.* (2010) ont observés des mortalités densité-dépendantes sur un arbre néo-tropical. Quant à Packer & Clay (2000), ils rapportent une mortalité de plantules au pied d'un arbre tempéré. Toutes ces mortalités seraient dues à des pathogènes du sol. Dans les travaux de Packer & Clay (2000) et Bell *et al.* (2006), ceux-ci ont été identifiés comme des Oomycètes. Davidson (2000) a décrit des fontes de semis causées par des *Pythium* et par *Phytophthora heveae* sur 2 arbres du Costa Rica. A côté de ces études identifiant des Oomycètes comme agents de mécanismes Janzen-Connell, on trouve Liu *et al.* (2015b), identifiant l'Ascomycète *Fusarium oxysporum* comme agent de mortalités densité-dépendantes sur des plantules de l'arbre

subtropical *Ormosia glaberrima*.

Il faut également ajouter que certains herbivores, comme les mammifères et surtout les insectes, peuvent aussi jouer un rôle dans la mortalité distance-dépendante (Fricke *et al.* 2014, Gripenberg *et al.* 2013, Norghauer *et al.* 2006). Par ailleurs, Deniau *et al.* 2017 ont montré qu'il pouvait exister une synergie insecte-champignons décomposeurs dans les effets Janzen-Connell, les champignons décomposeurs favorisant l'herbivorie des plantules par les insectes. Cependant, contrairement aux pathogènes, la prédation par les insectes serait soumise à un phénomène de satiété qui limite la mortalité des plantules à un certain seuil (Xiao *et al.* 2016).

Comme on l'a vu, les pathogènes les plus étudiés dans le cadre de l'hypothèse Janzen-Connell sont ceux se dispersant dans le sol. Ceux-ci ont en effet des distances de dispersion souvent limitées, ce qui permet de satisfaire le prérequis de distance de dispersion plus faible que celle des hôtes. Toutefois, certains parasites des parties aériennes, foliaires ou agents de chancres ont des distances de dispersion relativement faibles. Cela est valable en particulier pour ceux dispersés par splashing, avec une dispersion moyenne de moins de 15 cm par événement de splashing chez *Colletotrichum acutatum* et *Phytophthora cactorum*, respectivement responsables de l'anthracnose et de la pourriture du fraisier (Madden, 1997). Un éventuel rôle des pathogènes à voie de dispersion aérienne dans les mécanismes de type Janzen-Connell mérite donc d'être étudié. Dans cet esprit, deux études révèlent que peu de symptômes sont causés par des pathogènes foliaires comparativement aux pathogènes du sol, aussi bien sur des plantules en forêts néo-tropicales (Mangan *et al.*, 2010), que pour des plantes herbacées de prairie (Spear & Mordecai, 2018). En revanche, dans des forêts tempérées, Fukasawa *et al.* (2016) ont identifié les pathogènes foliaires comme les principaux acteurs de mécanismes de Janzen-Connell chez deux espèces ligneuses du genre *Cornus* et *Prunus*. L'étude de Gilbert *et al.* (1994) trouve également qu'un agent de chancre chez une Lauracée (*Ocotea whitei*) est responsable de mortalités densité-dépendantes en forêt néotropicale. Le même auteur trouve également que l'inoculation d'un agent du chancre sur des plantules de *Tetragastris panamensis*, une Burséracée, accroît la mortalité générale des plantules de la zone inoculée, mais sans que cette mortalité soit liée à des symptômes de chancre (Gilbert, 1996).

Les feedbacks positifs : mycorhizes et organismes supprimeurs des pathogènes

Les communautés de micro-organismes du sol sont souvent décrites comme affectant les effets de feedback de manière complexe, pouvant autant avoir un effet négatif (pathogènes) que positif (mycorhizes, organismes supprimeurs de pathogène). Liang *et al.* (2015) ont ainsi décrit une action suppressive des mycorhizes arbusculaires sur les effets de type Janzen-Connell dus à des pathogènes du sol, et une observation similaire a été rapportée pour les champignons ectomycorhiziens en forêt tempérée (Deniau *et al.* 2017). Un feedback positif, dû à des mycorhizes arbusculaires, a été observé en forêt néo-tropicale (Mangan *et al.* 2010). D'autres types de feedback positifs sont créés par des bactéries productrices d'antibiotique du genre *Streptomyces*, celles-ci ayant une action suppressive sur les pathogènes du sol (Doubou *et al.* 2011). Dans les forêts néo-tropicales, la thèse de Becklund (2016) a confirmé cette action positive sur la croissance des plantes des *Streptomyces*, celle-ci pouvant même aller jusqu'à un feedback positif des sols à proximité de l'arbre-mère. L'action et l'abondance des *Streptomyces* semble liée à des facteurs complexes et pas seulement à la plante-hôte, ajoutant ainsi une couche de complexité et d'hétérogénéité aux interactions plantes-microorganismes dans les forêts néo-tropicales. Toutefois, Klironomos (2002) trouve que la plupart des feedbacks sont négatifs sur des espèces herbacées du Canada, seules les espèces invasives bénéficiant de feedbacks positifs dûs aux mycorhizes.

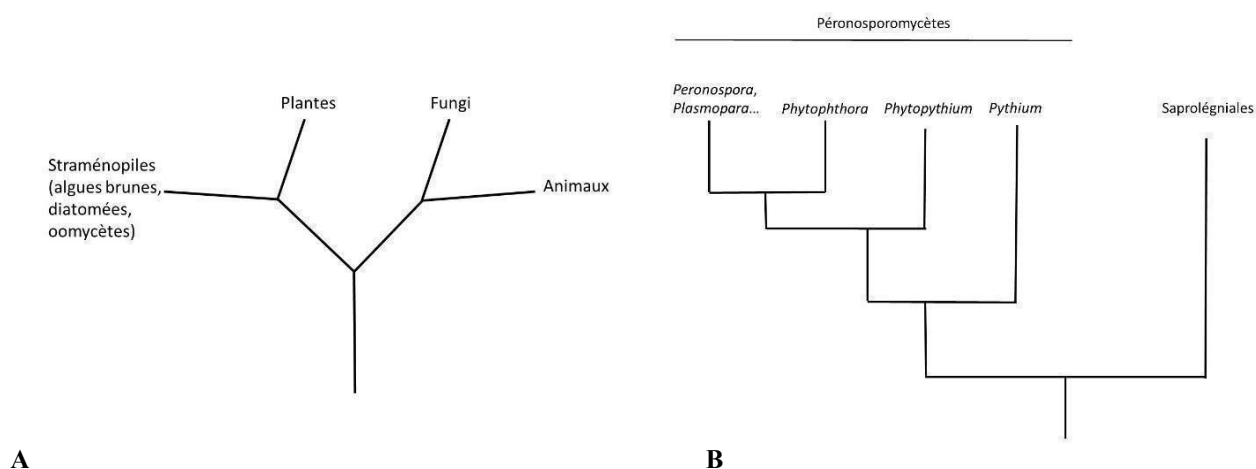
Les Oomycètes, acteurs potentiels des mécanismes de type Janzen-Connell

Biologie des Oomycètes

Les Oomycètes sont des organismes semblables morphologiquement aux Champignons. Comme eux, ils sont hétérotrophes et forment au cours de leur croissance un mycélium filamenteux (Alexopoulos *et al.* 1997). Toutefois, ils en sont très éloignés phylogénétiquement, puisqu'ils sont situés dans l'infra-règne des Straménopiles (Fig 3A) aux côtés des algues brunes (Patterson & Sogin 1992). Ils comprennent des saprophytes et des pathogènes d'animaux et de

plantes (Margulis & Schwartz 2000). La très grande majorité des Oomycètes phytopathogènes connus appartiennent au sous-groupe des Péronosporomycètes, qui comprend les deux genres d'importance *Phytophthora* et *Pythium*, ainsi que d'autres genres plus réduits comme *Phytopythium*, *Brema*, *Peronospora* (Agrios 1997). Parmi les Péronosporomycètes, le genre de loin le plus étudié est *Phytophthora* qui comprend de nombreux pathogènes d'importance économique et environnementale, en particulier en forêt (Hansen 2015). Il est parfois considéré comme le genre le plus dévastateur sur les Dicotylédones (Erwin & Ribeiro 1996). A l'inverse, les *Pythium* sembleraient affecter plus particulièrement les Monocotylédones (Ho 2018), causant de nombreuses fontes de semis en agriculture (Hendrix & Campbell 2003). Il faut toutefois noter que certains *Pythium* sont en fait des parasites d'Oomycètes et ont donc une action protectrice (biocontrôle) sur les plantes (Benhamou *et al.* 2012). Ces deux genres ubiquitaires se retrouvent sous tous les climats (Erwin & Ribeiro 1996 ; Hendrix & Campbell 2003). *Phytophthora* en particulier compte de nombreux pathogènes invasifs introduits via le commerce et les échanges internationaux (Jung *et al.* 2016). Le genre *Phytophthora*, qui compte plus d'une centaine d'espèces, est divisé en dix clades phylogénétiques pouvant en général être associés à un certain comportement écologique: opportuniste aquatique, pathogène foliaire, ou pathogène du sol (Hansen 2015). Le genre *Pythium* comprend environ 280 espèces, auxquelles il faut ajouter les 15 espèces du genre *Phytopythium*, anciennement décrites comme *Pythium* (de Cock *et al.* 2011). Les *Phytophthora* et *Pythium* ont une biologie assez similaire (Hardham 2001). En effet, ils se multiplient très efficacement grâce à une production abondante de spores asexuées, les zoospores. Celles-ci sont pourvues de flagelles leur donnant de la mobilité en milieu aquatique et, dans une certaine mesure, dans les sols mouillés ou ennoyés. Ces spores asexuées sont les principaux vecteurs d'infection des Péronosporomycètes (Erwin & Ribeiro 1996). Ces derniers peuvent également produire des spores de manière sexuée (les oospores), qui sont des formes de résistance en restant en dormance (Erwin & Ribeiro 1996). En effet, ces oospores permettent parfois aux *Phytophthora* et au *Pythium* de garder un potentiel pathogène

« dormant » dans un sol, et cela sur plusieurs années. Les *Pythium* sont en général considérés comme tendant plus vers la nécrotrophie que beaucoup de *Phytophthora*, souvent décrits comme hémibiotrophes (McCarthy & Fitzpatrick 2017). La phylogénie et l'écologie des Péronosporomycètes ne sont pas encore complètement établies, mais il semblerait que les *Phytophthora* soient plus proches de phytopathogènes biotrophes, comme les *Peronospora* et les *Plasmopara*, que des *Pythium* (Fig 2B).



Etude des communautés d'oomycètes par piégeage/isolation

La méthode traditionnelle d'étude des communautés d'Oomycètes phytopathogènes repose sur une « approche cultivable », faisant appel à l'utilisation de feuilles (dites « feuilles-pièges ») flottant sur de l'eau comme support temporaire de « culture » pour l'isolement. Cette technique est développée plus en détail dans le chapitre « Méthodologie ». Elle possède certains avantages par rapport à d'autres approches cultivables, faisant une empreinte directe des microorganismes ciblés du sol à l'aide d'un milieu sélectif. Tout d'abord, on peut traiter une plus grande quantité de sol en « concentrant » les *Phytophthora* dans les feuilles-pièges (classiquement environ 200 ml pour un piégeage). De plus, l'immersion dans l'eau permet de réactiver les espèces en dormance dans le sol sous forme d'oospores. Finalement, bien que cette technique permet en général d'obtenir plusieurs espèces de *Phytophthora* et/ou de *Pythium*, elle demeure toutefois

un proxy relativement imparfait de la composition originelle en oomycètes du sol. Les biais les plus évidents concernent une possible sélectivité des *Phytophthora* à l'espèce de feuille piège, mais aussi une sélection, ou surestimation, des *Phytophthora* ayant une croissance plus rapide à l'intérieur de la feuille piège.

Etude des communautés d'oomycètes par metabarcoding de l'ITS

Depuis plus d'une décennie, les techniques de metabarcoding fournissent un moyen rapide et efficace de décrire les communautés de micro-organismes dans les sols (entre autre), via des amplifications PCR et du séquençage à haut débit (voire partie « Méthodologie » et fig 4). Si ces approches « non-cultivables » sont maintenant communément utilisées pour les bactéries et les Champignons, ce n'est pas encore le cas pour les Oomycètes. Héritage du metabarcoding fongique (Schoch *et al.* 2012), la région du génome utilisée dans l'identification moléculaire des oomycètes est également l'espace intergénique transcrit (ITS pour *Internal Transcribed Spacer*). Des amorces spécifiques ont été développées par Scibetta *et al.* (2012), afin d'amplifier la région ITS des *Phytophthora* à partir d'ADN environnementaux extraits de sols d'Ecosse. Catala *et al.* (2015 ; 2017) et Prigigallo *et al.* (2015) ont également utilisés ces mêmes amorces sur des sols de forêt et de pots de pépinières, obtenant une quantification de la diversité comparable ou supérieure à celle obtenue par piégeage. Ces amorces ont aussi été utilisées par Burgess *et al.* (2016) pour un vaste relevé de la diversité des *Phytophthora* couvrant les principales régions d'Australie. Le metabarcoding a aussi été employé sur le groupe plus général des Oomycètes du sol par Counce *et al.* (2013) et Sapkota & Nicolaisen (2015) grâce à des amorces, initialement développées par Cooke *et al.* (2000) pour du séquençage Sanger. Les mêmes amorces spécifiques des Oomycètes ont été utilisées par Vannini *et al.* (2013) sur des sols de châtaigneraies d'Italie, et les résultats obtenus par metabarcoding du sol ont été comparés aux résultats acquis par piégeage et isolation, révélant une efficacité de détection du metabarcoding supérieure à celle du piégeage. De la même manière, Bose *et al.* (2018), trouvent une efficacité du metabarcoding nettement supérieure à celle du piégeage, avec 32 espèces

retrouvées dans des sols sud-africains, contre seulement 5 par la méthode cultivable. D'autres amorces, ciblant majoritairement les Oomycètes, ont été développées et testées par Riit *et al.* (2016). Toutefois, ces deux jeux d'amorces sont spécifiques des Oomycètes et donc amplifient aussi le groupe des Saprolegniales, qui ne contient pas de phytopathogènes. Actuellement, il n'existe pas dans la littérature d'amorces ciblant spécifiquement les Péronosporomycètes.

Limites de l'ITS et marqueurs alternatifs

Il faut noter que l'efficacité de l'ITS est encore très discutée pour l'identification spécifique de ces microorganismes. S'il est très variable chez les Champignons et possède un pouvoir discriminant suffisant au niveau de l'espèce (Nilsson et al, 2008), son polymorphisme est en revanche beaucoup plus réduit chez les *Phytophthora*, et ne permet pas toujours de résoudre leur phylogénie (Blair et al., 2008). Ainsi Weir *et al.* (2015) trouvent 2 nouvelles espèces de *Phytophthora*, *P. cocois* et *P. agathidicida*, indissociables de *P. castaneae* via l'ITS. De la même manière, Martin & Tooley (2003) trouvent que les relations phylogénétiques entre trois espèces de *Phytophthora* sont contredites par l'ajout de nouveaux marqueurs génétiques à la phylogénie. Enfin, certaines espèces de *Phytophthora* décrites avec l'ITS ont été placées dans un groupe basal non résolu qui semble se trouver en dehors de l'embranchement principal du genre (Belbahri et al., 2006 ; Dick et al., 2006). Des marqueurs phylogénétiques alternatifs ont été proposés pour étudier la diversité des oomycètes, comme la Cytochrome Oxidase1 (COX1) (Choi *et al.* 2015, Martin *et al.* 2014), ou le gène Ras pour les *Phytophthora* (König et al. 2015). Le genre *Phytophthora* comprend probablement de nombreux complexes d'espèces qui ne sont pas dissociables par la morphologie, ou par le marqueur ITS seul, et requiert donc une phylogénie élaborée à partir de plusieurs marqueurs ou l'utilisation de la génomique comparative (Blair et al., 2008 ; Martin *et al.* 2012).

Etat des connaissances sur les communautés d'Oomycètes en milieu naturel

Communautés de *Phytophthora* dans les latitudes tempérées et boréales

Les études portant sur les *Phytophthora* sont souvent entreprises en réponse à un problème phytosanitaire particulier causé par une seule espèce et sont donc souvent peu exploitables pour une description plus large de la communauté des *Phytophthora*. Toutefois, en milieu forestier, un effort est entrepris depuis 15-20 ans pour décrire les communautés de *Phytophthora* présentes dans le sol ou dans les cours d'eau sans se focaliser sur une espèce particulière. Pour citer, de manière non-exhaustive, quelques exemples d'études par piégeage/isolation à l'échelle de la communauté, on trouve Balci *et al.* (2007) dans les chênaies du Nord-Est américain, Vettraino *et al.* (2002) sur les chênaies d'Italie, Szabo *et al.* (2013) sur les forêts hongroises, Smahi *et al.* (2017) sur les chênaies d'Algérie, et enfin l'index des espèces de *Phytophthora* par habitat et espèce d'arbre réalisé en Oregon par Hansen *et al.* (2014). Par ces approches de piégeage, Jung *et al.* (2018) trouvent 12 espèces dont 4 non-décrites, et une dominance de l'espèce *Phytophthora cinnamomi* dans les sols des forêts humides tempérées du Chili. A une échelle plus réduite, Scanu *et al.* (2015) trouvent huit espèces de *Phytophthora* sur 50 hectares de forêt de Sardaigne, pourtant considérée comme un hotspot de biodiversité végétale. Plus récemment, Burgess *et al.* (2017 ; 2018) ont décrit et analysé la diversité des *Phytophthora* sur une échelle couvrant l'intégralité du continent australien. Soixante-huit espèces putatives ont ainsi été trouvées et 54% de ces espèces, dont les deux plus répandues (*P. multivora* et *P. cinnamomi*), y sont considérées comme invasives. Le meilleur prédicteur de la composition des communautés de *Phytophthora* y apparaît comme l'écorégion, une catégorisation de leurs environnements servant de proxy aux conditions biotiques et abiotiques locales. Cela suggère que les communautés de *Phytophthora* répondent à de complexes interactions de facteurs

environnementaux que cette étude n'a pas pu dissocier et directement quantifier. Par ailleurs, il est important de souligner que de nombreuses espèces de *Phytophthora* sont détectées par metabarcoding dans des sols de forêts sans qu'il y ait eu un signalement de maladie correspondant à ces détections. A une échelle beaucoup plus fine, les communautés de la rhizosphère (racines non lavées) et du sol sembleraient identiques (Sims *et al.* 2015), contrairement à ce qui est rapporté pour d'autres microorganismes (Buée *et al.*, 2009). Enfin, la diversité moyenne des *Phytophthora* dans les sols semble avoir un lien avec le niveau d'anthropisation. En effet, la diversité par site est par exemple augmentée dans les environnements anthropisés, comme les pépinières (Redondo *et al.* 2018), ou les zones urbaines (Dale, 2018 ; Redondo *et al.*, 2018) par rapport aux environnements naturels. Toutefois, dans des plantations monospécifiques d'Acacia et d'Eucalyptus d'Afrique du Sud, la diversité est en fait moindre que dans les forêts naturelles d'Afrique du Sud (Bose, 2018). Ainsi, la diversité en *Phytophthora* ne serait donc pas simplement liée au niveau d'anthropisation du milieu, mais aussi à la diversité végétale et/ou au caractère introduit ou pas des plantes-hôtes.

Communautés de *Pythium* dans les latitudes tempérées et boréales

Il n'existe pas à ma connaissance de publication sur les communautés de *Pythium* dans des sols de forêt tempérée. Certains travaux ont porté sur des sols de pépinière (Weiland 2011) et sur des sols agricoles et de parc urbain (Paulitz & Adams 2003, Dick & Ali-Shtayeh 1986). Ceux-ci rapportent des chiffres allant d'une à six espèces par site agricole étudié, et cette diversité peut monter jusqu'à 20 espèces par site dans les environnements urbains. Dans ces deux dernières études (Paulitz & Adams 2003, Dick & Ali-Shtayeh 1986), les communautés de *Pythium* apparaissent comme structurées par les précipitations, les températures et les paramètres chimiques du sol. Les différentes espèces de *Pythium* ont chacune leurs préférences et se répartissent en « niches » suivant ces trois variables environnementales, formant ainsi des gradients d'abondance de chaque espèce au sein des communautés. De la même manière que

les *Phytophthora*, des *Pythium* pathogènes sont souvent retrouvés dans un sol sans que les plantes ou plantules ne présentent de symptôme apparent (Coffua *et al.* 2016).

Communautés de *Phytophthora* et *Pythium* dans les forêts tropicales

Parmi les études portant sur les communautés d'Oomycètes dans les forêts tropicales, Burgess *et al.* (2017) ont échantillonné les *Phytophthora* dans 20 sites de l'état australien subtropical/tropical du Queensland, trouvant 13 espèces différentes dont 1 non décrite, les plus fréquentes étant *P. cinnamomi* and *P. heveae*. Dans une autre étude, Zeng *et al.* (2009) ont identifié 14 espèces de *Phytophthora* dans un relevé de l'île tropicale de Hainan, mais seulement 5 espèces de *Phytophthora* ont été isolées à partir des forêts (*P. cinnamomi*, *P. castaneae*, *P. heveae*, *P. infestans* et *P. cactorum*). Hon-Hing *et al.* (2012) ont également mené un échantillonnage sur divers écosystèmes de l'île de Hainan en ciblant l'étude sur les *Pythium*. Ces auteurs ont trouvé 29 espèces de *Pythium* et *Phytopythium* dans une dizaine d'environnement différents (entre autres forêts naturelles, pépinières, rizières...), avec une forte dominance ubiquitaire de *Phytopythium vexans* et une plus forte diversité en milieu urbain. Ho *et al.* (2009) et Jung *et al.* (2016) ont comptabilisé respectivement 48 espèces de *Pythium* et 27 espèces de *Phytophthora* à Taiwan ; 17 espèces de *Phytophthora* n'avaient apparemment jamais été décrites. Dans ce dernier cas, bien que Taiwan ne soit pas soumis à un climat tropical mais subtropical, les communautés décrites ont de fortes similarités avec celles des forêts tropicales, étant dominées par *P. cinnamomi* et des espèces du clade 5 comme *P. heveae* et *P. castaneae*. Au cours de sa thèse de Doctorat, Wallace (2015) a mené une étude sur les *Phytophthora* des forêts néo-tropicales du Costa Rica, en se focalisant sur les plantes vivantes et les cours d'eau. Cet auteur a identifié 21 espèces différentes, mais les communautés constituées par ces *Phytophthora* étaient assez différentes de celles des trois études

précédemment citées (Burgess *et al.* 2017; Jung *et al.* 2016 ; Zeng *et al.* 2009) portant sur les sols de la zone Asie/Australie. Ces différences reposent plus particulièrement sur une faible représentation de *P. cinnamomi*, *P. heveae* et *P. castaneae* dans les forêts du Costa Rica. Toutefois, au vu de la littérature, il est impossible de dire si ces différences proviennent de l'écart géographique (Wallace ayant échantillonné en Amérique alors que les autres études portent sur l'Asie/Australie), ou bien de l'habitat échantillonné (plantes et cours d'eau chez Wallace contre sols dans les autres études).

Spécificité à l'hôte des Oomycètes

La question de la spécificité à l'hôte des Oomycètes phytopathogènes nous intéresse tout particulièrement dans le cadre de l'hypothèse Janzen-Connell. Augspurger & Wilkinson (2007) ont montré que les espèces de *Pythium* récoltées dans des sols néo-tropicaux avaient un large spectre d'hôtes potentiels, mais montraient une agressivité différente suivant l'espèce de l'hôte. Ce caractère « agressif » est d'autant plus délicat à démontrer que les infections par *Pythium* sont souvent le fait d'une association d'espèces de *Pythium*, de telle façon que des espèces opportunistes pourraient agir en synergie avec une espèce à fort potentiel pathogène (Suffert & Guibert 2006). Ainsi, lors d'une infection par des *Pythium*, il faut prendre en compte la communauté entière des *Pythium* infectant la plante, et pas seulement le pathogène le plus virulent, les autres espèces de *Pythium* pouvant modifier l'agressivité de celui-ci ou la résistance de la plante (Abdullah *et al.* 2017). Les *Phytophthora* ont une spécificité également très variable, pouvant aller d'espèces inféodées à un genre unique d'hôtes jusqu'à plusieurs centaines d'espèces (Erwin & Ribeiro 1996), et jusqu'à 3000 hôtes potentiels pour *P. cinnamomi* (Hardham 2005). Avec le temps et l'augmentation des publications sur le sujet, les gammes d'hôtes connus de beaucoup d'espèces de *Phytophthora* s'élargissent (Schwingle & Blanchette 2008). Toutefois, il faut aussi noter que les *Phytophthora* sont très souvent des

parasites de racines fines sans réel impact sur la survie de la plante. Les inoculations de *Phytophthora* en conditions contrôlées, souvent à forte densité, peuvent donc amener à une surestimation des impacts réels du pathogène en conditions naturelles. La spécificité à l'hôte des *Phytophthora* apparaît donc comme encore relativement imprévisible.

Les pathogènes fongiques, autres acteurs potentiels du maintien de la diversité

Les pathogènes fongiques dans les forêts tropicales

Comme pour beaucoup d'organismes vivants (Stevens, 1989), toutes les guildes écologiques de Champignons à l'exception des ectomycorhiziens augmentent en diversité en se rapprochant de l'équateur (Tedersoo *et al.* 2014). La diversité des Champignons pathogènes semble plus élevée en forêt néo-tropicale que dans les forêts tempérées, même si cette observation ne serait pas applicable à tous les groupes taxonomiques (Piepenbring *et al.* 2011b). Toutefois, cette diversité fongique ne semble pas corrélée à la diversité des plantes d'après Tedersoo *et al.* 2014, même si, là encore, la question reste discutée (Peay *et al.* 2014). Par ailleurs, les communautés de Champignons pathogènes des forêts néo-tropicales semblent dominées par les nécrotrophes par rapport aux biotrophes (Garcia-Guzman & Heil 2013), en particulier parmi les espèces d'arbres ombrophiles (Garcia-Guzman & Espinosa-Garcia 2011). D'une manière générale, le fait que la position taxonomique de nombreuses espèces de Champignons des forêts tropicales demeure mal connue (Köljalg *et al.* 2013), soit car appartenant à de nouveaux groupes non- décrits, soit par manque de discrimination des outils moléculaires (Schadt & Rosling 2015),

rend difficile la description de ces communautés. La prévalence des maladies dues aux pathogènes fongiques est en tout cas très forte dans les forêts néo-tropicales, touchant de 50 % à 100 % des plantes échantillonnées dans diverses études (Gilbert 2005). A titre de comparaison avec les forêts plus élevées en latitude, Nguyen *et al.* (2016) trouvent un maximum de 40 % de plantes infectées en Finlande, et ce ratio descend à 3% en Espagne. Selon Sarmiento *et al.* (2017), les agents de mécanismes de type Janzen-Connell sont clairement identifiés comme étant des pathogènes fongiques, et font preuve d'une certaine spécialisation à l'hôte. Konno *et al.* (2011) montre que sur des plantules appartenant à quatre espèces d'arbres, l'ascomycète *C. anthrisci* présente une forte variabilité de la spécificité à l'hôte entre isolats de la même espèce pathogène, suivant l'hôte sur lequel ils ont été isolés.

Difficultés de la distinction endophyte/pathogène chez les Champignons

Les Champignons pathogènes ne sont pas complètement distincts des champignons endophytes et forment un continuum avec eux, la pathogénicité d'un endophyte pouvant varier en fonction de divers facteurs, comme l'environnement abiotique et l'âge de la plante-hôte ou du tissu contaminé (Porrás-Alfaro & Bayman 2011). Les pathogènes nécrotrophes en particulier peuvent souvent se comporter en endophytes dans certaines conditions (Delaye *et al.* 2013). La diversité des endophytes par individu est très élevée en forêt tropicale, avec par exemple environ 70 espèces fongiques par individu sur des palmiers tropicaux d'Indonésie/Australie (Fröhlich & Hyde 1999). D'ailleurs, en constatant que les forêts néotropicales abritaient une hyper-diversité d'endophytes foliaires, certains auteurs ont appelé à revoir à la hausse la diversité fongique totale de ces écosystèmes (Arnold *et al.* 2000). Cette diversité est plus élevée qu'en forêts tempérées en terme de nombre d'espèces ; toutefois, les endophytes retrouvés en forêts tempérées appartiennent à davantage de classes taxonomiques, alors que les nombreuses

espèces des forêts tropicales se regroupent dans quelques classes (Arnold & Lutzoni 2007). Les endophytes peuvent avoir divers effets sur la fitness de leurs plantes-hôtes : ils peuvent être associés à de « faibles pathogènes » en réduisant légèrement la fitness de la plante (Arnold 2005), mais peuvent aussi se comporter en « agent de biocontrôle », en limitant les dégâts des pathogènes sur leurs hôtes (Arnold et al. 2003). Ainsi, le groupe endophyte ubiquitaire des « Dark Septate Endophytes » (DSE) peut avoir des effets autant positifs que négatifs sur leur plante-hôte, en fonction des conditions environnementales, la souche de DSE, et la plante hôte (Jumpponen 2001). L'écologie des endophytes est encore très largement inconnue (Rodriguez *et al.* 2009), et le mode trophique (pathogène ou mutualiste) d'une espèce fongique endophyte et son effet sur la plante ne peuvent donc pas forcément être déduits simplement de sa taxonomie.

Objectifs de la thèse

Au regard de cette littérature, j'ai donné à cette thèse l'objectif général d'approfondir les connaissances sur le rôle des pathogènes telluriques potentiellement responsables de l'effet Janzen-Connell dans des forêts de Guyane Française, en me concentrant sur les Oomycètes. Pour ce faire, nous l'avons structurée en trois objectifs plus précis : (1) Développer et valider des outils et méthodes permettant d'étudier les communautés d'Oomycètes par metabarcoding, (chapitres 1 et 2). (2) Décrire les facteurs structurant les communautés de phytopathogènes dans les forêts de Guyane Française, avec une emphase particulière sur l'effet de la plante-hôte (chapitres 2 et 3). (3) Observer d'éventuels symptômes distance-dépendants sur une espèce d'arbre de Guyane Française et identifier les pathogènes à l'origine des symptômes attendus (chapitre 4).

Méthodologie

Cette partie est une présentation succincte et générale des matériels et méthodes utilisés.

Celles-ci sont décrites plus en détail dans chaque chapitre de résultat.

Sites étudiés

Les sites échantillonnées sont tous situées en Guyane Française. Le climat y est de type équatorial, caractérisé par une faible variation saisonnière de température, mais des variations significatives de précipitations, les périodes de Mars et d'Août-Novembre correspondant à des baisses notables de précipitations. Les sols de cette étude ont tous été échantillonnés soit en février, soit en avril, donc durant des périodes humides.

Les chapitre 3 et 4 utilisent tout deux du matériel provenant de la forêt et du dispositif expérimental (plantations) de Paracou. Cette forêt a été cartographiée et ses arbres inventoriés dans 16 parcelles depuis 1982, ce qui a notamment permis d'échantillonner du sol au pied d'individus identifiés au niveau de l'espèce. Dans le chapitre 3, une partie des sols a été échantillonnée dans les plantations monospécifique situées dans le site de Paracou. Ce dispositif expérimental est constitué de 24 blocs monospécifiques d'espèces d'arbres de Guyane Française. Enfin, dans le chapitre 2, le sol échantillonné au pied des arbres a été prélevé dans deux zones du Centre Spatial Guyanais (CSG) et dans la région de Laussat. Pour cette étude, les individus (arbres) ne sont identifiés qu'au niveau de la famille.

Notre échantillonnage s'est aussi servi de la caractérisation des sols de forêts tropicales en trois types: terra firma, sables blancs et bas-fonds (Mabberley 1983). Les terra firma et sables blancs sont des sols situés sur des élévations topographiques du terrain, leur évitant l'inondation. Les sols de terra firma sont argileux, tandis que les sables blancs sont plus sableux et plus pauvres

en nutriments. Le troisième type de sol, les bas-fonds, est souvent inondé en période humide du fait de sa localisation dans des dénivelés topographiques.

Echantillonnage du sol

Les sols sont prélevés à l'aide de tarières après avoir ôté la litière (horizons OL et OF). Pour chaque arbre, on prélève 300 mL de sol à 50 cm de la base du tronc, suivant trois orientations formant à peu près un triangle autour de l'arbre.

Les communautés de *Phytophthora* des sols sont ensuite analysées soit par piégeage/isolément sur boîte, soit par metabarcoding. Les communautés autres que les *Phytophthora* (*Pythium*, Champignons) ont seulement été analysées par metabarcoding dans cette thèse.

Piégeage/isolément

Les *Phytophthora* ont été piégés à l'aide de feuilles de trois espèces (Rhododendron, Avocatier et Manioc). Afin de séparer les phytopathogènes Oomycètes des pathogènes fongiques, 200 mL de l'échantillon de sol à étudier est placé au fond d'un récipient rempli de 500 mL d'eau distillée, à la surface duquel flottent les feuilles-pièges (Elegbede *et al.* 2009). Ornementés de flagelles, les zoospores d'oomycètes peuvent remonter à la surface de l'eau et infecter les feuilles, au contraire des spores fongiques non mobiles. Les lésions des feuilles sont ensuite découpées et placées sur du milieu de culture V8 supplémentés d'antibactériens et de fongicides (Ribeiro 1978, voir aussi chapitre 2 de cette thèse), puis repiquées jusqu'à obtenir les isolats recherchés. La surface de lésion présentée par les feuilles-piège de Rhododendron a aussi servi de proxy de quantification des *Phytophthora* dans le sol, après normation par le poids des feuilles.

Metabarcoding

Dans le chapitre 1, les différents jeux d'amorces qui seront ensuite utilisés dans la partie "metabarcoding" ont été validés sur une communauté artificielle ("mock"), constituée d'un mélange d'ADN génomique issu de 24 espèces de *Phytophthora*. Ces ADN génomiques proviennent de la collection de souches de l'équipe Ecologie des Pathogènes de l'INRA de Champenoux, parmi lesquelles quatre isolats ont été collectés au cours de l'étude constituant le chapitre 2: *P. cinnamomi*, *P. heveae*, *P. castaneae*, et *P. sp nov. clade 9*.

Le protocole de metabarcoding (Fig 4) a été effectué sur des échantillons de sol ou de feuilles-pièges. Dans les deux cas, les amplicons sont toujours obtenus via des PCR emboîtées. Les jeux d'amorces utilisés sont : oom18S / ITS7 suivi de 18ph2 / 5.81S pour l'amplification des *Phytophthora*; DC6 / ITS7 suivi de oom18s / ITS7 pour l'amplification des Péronosporomycètes. Les amorces DC6-ITS7 ont été développées par Cooke *et al.* 2000, les amorces 18Ph2-5.81S par Scibetta *et al.* 2012. L'amorce oom18S a été développée par Cordier (2012). Dans les deux études de metabarcoding, la PCR a également été pratiquée sur des blancs d'eau distillée et disposés sur la même plaque que les échantillons, afin de contrôler d'éventuelles contaminations. Ainsi, si des OTUs étaient présents dans un échantillon avec un nombre de reads inférieur ou égal à ceux des blancs, ils ont été éliminés des résultats.

Le séquençage Illumina MiSEQ et le multiplexage ont été effectués à la plateforme GET de Toulouse. Les "reads" issus des séquençages sont ensuite "clusterisés" à 99 % d'homologie. L'assignation taxonomique a été effectuée sur une base de donnée locale extraite de NCBI GenBank, en filtrant les séquences ITS des *Phytophthora* à l'aide des mots clés: "Oomycete", "*Phytophthora*", "Internal Transcribed Spacer". Sur la base de cette assignation taxonomique, les différents OTUs sont ensuite rassemblés par espèces pour l'analyse des communautés.

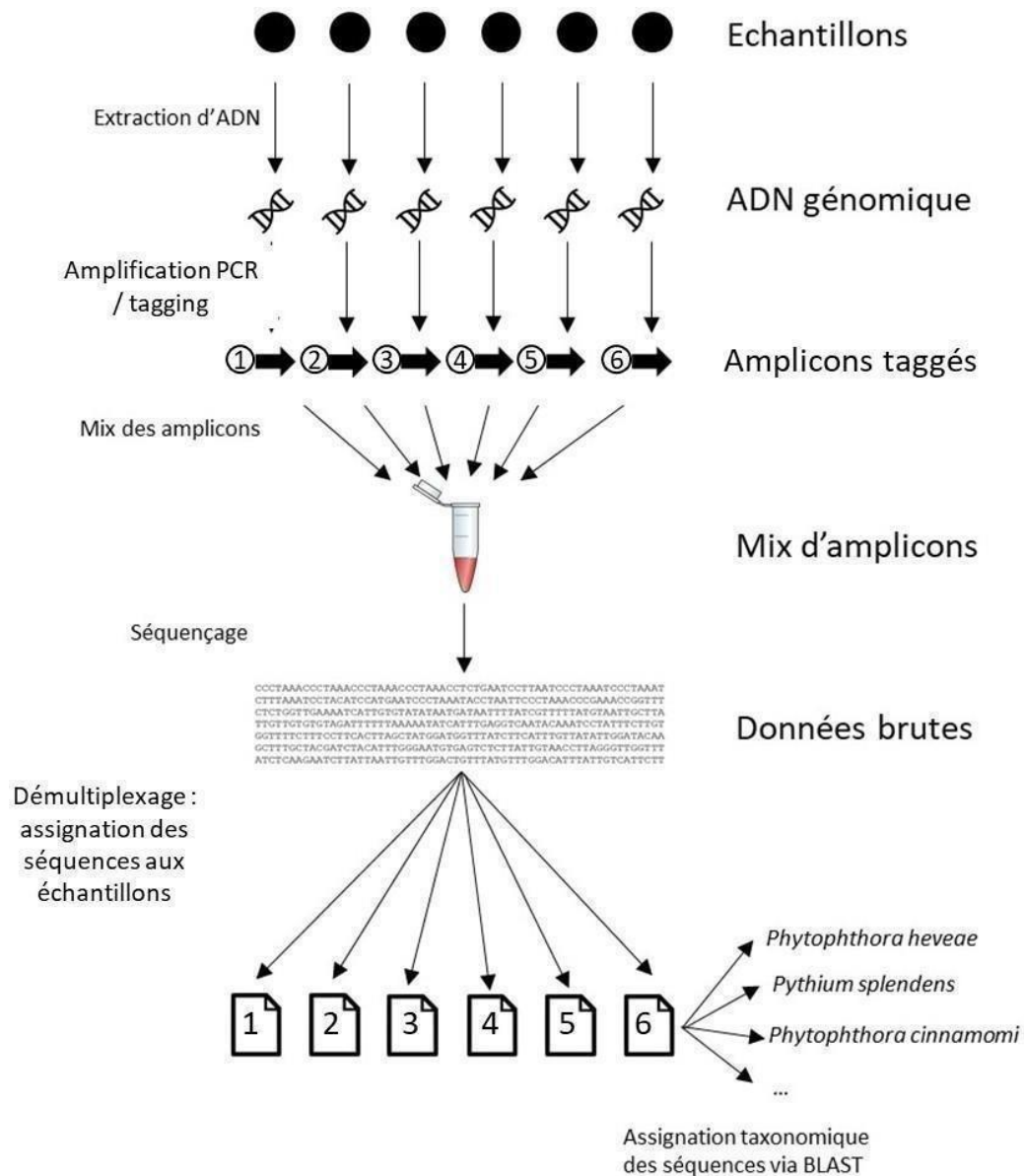


Fig 4 : Procédure classique de metabarcoding. Les échantillons peuvent être des sols, des tissus végétaux...

CHAPITRE 1

Comparison and validation of Oomycetes
metabarcoding primers for Phytophthora high
throughput sequencing

(Article publié en mars 2019 dans *Journal of Plant
Pathology*)

Avant d'étudier la diversité des Oomycètes pathogènes dans les sols de Guyane, il nous était nécessaire de valider les outils moléculaires déjà existants, d'en tester de nouveaux si aucun n'était disponible, et de déterminer quelles sont leurs limites.

Dans ce chapitre, nous avons donc testé deux jeux d'amorces déjà existant permettant d'amplifier la région ITS1 et le gène Ras-Ypt des *Phytophthora*, et un nouveau jeu permettant spécifiquement d'amplifier l'ITS1 des Péronosporomycètes (groupe rassemblant les principaux Oomycètes phytopathogènes tels que les genres *Pythium*, *Phytopythium* et *Phytophthora*). Ces tests ont été réalisés une communauté artificielle de *Phytophthora* constitué d'un mélange équimolaire d'ADN génomique de 25 espèces pour tous les jeux d'amorces, et sur des échantillons de sols de forêt seulement pour les jeux amplifiant l'ITS1.

L'amplification par metabarcoding de la communauté artificielle a permis de montrer que quasiment toutes les espèces de *Phytophthora* sont retrouvées via nos trois jeux d'amorces. Cependant, la région ITS1 ne permettait pas de différencier les espèces *P. uniformis*, *P. fragariae*, et *P. europeae*. Cette limite de la région ITS1 à discriminer certaines espèces proches de *Phytophthora* sera confirmée dans le chapitre 2, avec les espèces du clade 5. De plus, en comparant le nombre de reads obtenu par séquençage Miseq avec les proportions des ADN des différentes espèces de *Phytophthora* introduits dans le mélange originel, d'importantes distorsions quantitatives ont également été mises en lumière. Par conséquent, nos amorces permettent a priori une bonne étude qualitative des communautés de *Phytophthora* ; toutefois, elles ne permettent pas une description quantitative de ces communautés. Nous avons donc eu recours, dans les chapitres qui suivent, à une description qualitative de ces communautés, et non quantitative.

Les tests sur les échantillons de sol de forêt s du Nord-Est de la France ont démontré une spécificité adéquate des amorces, qui amplifient respectivement les *Phytophthora* et les Péronosporomycètes. La diversité en *Phytophthora* était à peu près de l'ordre de grandeur attendu en forêt tempérée. Les amorces spécifiques des Péronosporomycètes ont amplifié une forte majorité d'espèces de *Pythium* et de *Phytopythium*.

Au vu des résultats de ce chapitre, nos jeux d'amorces amplifiant l'ITS1 des *Phytophthora* et des Péronosporomycètes paraissent satisfaisants pour être utilisés dans la suite de nos études, et pour décrire la diversité des Oomycètes phytopathogènes dans les sols des forêts en Guyane Française.



Comparison and validation of Oomycetes metabarcoding primers for *Phytophthora* high throughput sequencing

Jean Legeay¹ & Claude Husson^{1,2} & Tristan Cordier³ & Corinne Vacher³ & Benoît Marcais¹ & Marc Buée¹

Received: 29 May 2018 / Accepted: 22 February 2019
Società Italiana di Patologia Vegetale (S.I.Pa.V.) 2019

Abstract

Oomycetes are eukaryotic plant pathogens that require health monitoring. High-throughput sequencing (HTS) methods replace progressively cultivation-based approaches in soil surveys of Oomycetes, but very little control has been done from synthetic communities. Indeed, several potential biases do exist and need to be assessed for Oomycetes communities. We created a mock community by mixing DNA from 24 *Phytophthora* species. We amplified two barcode regions with Oomycete-specific primers before HTS. With this aim, we used three primer sets in nested PCR amplification, targeting the ITS-1 region or the RAS gene region. The three nested PCR strategies proved to be a reliable qualitative approach, identifying approximately 95% of the species after Illumina Miseq sequencing and bioinformatic analysis. However, quantitative proportions of each species showed distortions compared to the original mixture of the mock. In addition, we compared the two ITS primer sets on soil environmental DNA sampled from temperate forests. The 'oom18S-ITS7/18ph2f-5.8S-1R' primer set, more specific to *Phytophthora*, was able to detect seven *Phytophthora* species, confirming what was expected for temperate forests. Using the 'DC6-ITS7/oom18S-ITS7' primer set that covers the broader Peronosporaceans, we detected only one *Phytophthora* species among the dominance of *Pythium* and *Phytophthora* species. We concluded that 'oom18S-ITS7/18ph2f-5.8S-1R' primer set is a reliable tool for the qualitative description of environmental *Phytophthora* communities.

Keywords *Phytophthora* · Metabarcoding · ITS region · RAS gene · Mock community

Oomycetes are fungus-like eukaryotic organisms, including widespread plant pathogens such as *Phytophthora infestans*, *P. ramorum* or *P. cinnamomi* (Hansen 2008; Kamoun et al. 2015). Many species of *Phytophthora* have co-evolved with their hosts in their native ecosystems and do not cause severe diseases in those environmental conditions. However, when introduced in a new environment, they may become invasive and represent important threats to the managed or natural eco-

systems (Hansen 2008). Examples include *P. ramorum*, *P. uniformis* or *P. lateralis* which are important invasive pathogens in Europe and/or North America but do not appear to be significant pathogens in their native environments (Brasier et al. 2010; Aguayo et al. 2013; Turner et al. 2017). It is thus important to increase our knowledge of *Phytophthora* communities, in particular of species that do not cause conspicuous damages to their host and metabarcoding of environmental DNA represents a new valuable tool for this purpose.

Indeed, DNA metabarcoding and high throughput sequencing (HTS) have been used for addressing significant questions in ecology and biodiversity assessment (Taberlet et al. 2012). Recently, these culture-independent approaches have been applied to Oomycete communities, skipping the traditional steps of baiting on trap leaves, and isolation on Petri dish, and increasing the rate of data acquisition. Sequencing of Internal Transcribed Spacer (ITS) regions is the universal barcode for fungal diversity analysis (Schoch et al. 2012). This molecular marker has been used for Oomycetes also (Coincé et al. 2013; Minjani et al. 2013; Sapkota and Nicolaisen 2015; Riit et al. 2016). Similar to

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s42161-019-00276-9>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

* Marc Buée
marc.buee@inra.fr

¹ Université de Lorraine, Inra, IAM, F-54000 Nancy, France

² DGAL, SDQPV, Département de la santé des forêts, Ministère de l'agriculture et de l'alimentation, 75015 Paris, France

³ BIOGECO, INRA, University of Bordeaux, 33615 Pessac, France

the diversity of fungal primer pairs (Bellemain et al. 2010; Tedersoo et al. 2015), oomycetes communities have been investigated thanks to different primer pairs without any validation from artificial mock. Interestingly, few studies focused on *Phytophthora* communities using the 18Ph2F-5.8S-1R primer pair (Scibetta et al. 2012; Català et al. 2015). Nevertheless, metabarcoding revealed multiple biases, including sequence errors during PCR, library preparation, primer–template mismatches bias or primer specificity (Tedersoo et al. 2018). In recent studies focusing on the *Phytophthora* community, very little control has been done, needing a benchmarking effort for this ecological group. Mock communities have proved to be efficient for revealing potential biases involved along the methodological steps of metabarcoding studies targeting fungal or protists communities (Bokulich et al. 2013; Egge et al. 2013; Taylor et al. 2016). Artificial communities are a particularly efficient tool to reveal mismatches between the read abundance and the initial proportion of species. To our knowledge, no study has used it yet for *Phytophthora* community studies. The aim of this study was to create mock communities of *Phytophthora* species, covering the nine most important clades, then to compare our three sets of primers targeting Oomycete sub-groups and validate some of them as tools for studying *Phytophthora* communities by HTS.

Mock communities were created from genomic DNAs of 24 *Phytophthora* species (Table 1) with or without background metagenomic DNAs from other microorganisms (Table S1). This additional microbial DNA (fungal or bacterial) aimed to control the potential mismatch errors between *Phytophthora* DNA and other microbial DNA. The different mock communities were amplified using three sets of primers, targeting the *Phytophthora* genus at the ITS or RAS-Ypt loci, or the broader *Peronosporaceae* group at the ITS locus (Table 2). The two ITS sets of primers were also tested on environmental samples collected from forests of NE France.

Genomic DNA was extracted from 25 *Phytophthora* sp. isolates (INRA Nancy collection) corresponding to 24 species, then quantified with a Qubit® 2.0 Fluorometer (Life technologies) at 30 ng in 2 µl. Bacterial and eukaryotic genomic DNA used as background, was extracted from 306 isolates (Table S1) from INRA collections. Additionally, eight environmental samples were obtained from soils collected in April 2016 at the base of four trees each (four soil samples per tree from 5 to 10 cm depth) in two forest plots of north-eastern France. The sampled trees belonged to *Alnus glutinosa*, *Quercus* sp., *Fraxinus excelsior* and *Carpinus betulus*. Environmental DNA was extracted with the Fast DNA SPIN Kit for soil (MP Biomedicals, Solon, OH, USA) according to the manufacturer's instructions.

Three amplicon libraries (hereafter referred to as PERO_ITS, PHYTO_ITS and PHYTO_RAS) were produced using different combinations of primers. The PERO_ITS library (targeting *Peronosporaceae*) that has resulted from a

Table 1 *Phytophthora* isolates used in the mock community. ITS sequences were deposited in GenBank under accession Nos. MH178327–MH178350. The sequences of RAS-Ypt regions have been deposited in the DRYAD database (<http://data.dryad.org/>). DRYAD entry <https://doi.org/10.5061/dryad.68tk49>

Name	Species	Clade
PAU60	<i>Phytophthora uniformis</i>	7
PAM54	<i>Phytophthora x multiformis</i>	7
Pc1A21	<i>Phytophthora x cambivora</i>	7
87_neb	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	6
CIN4	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	6
BBA65909	<i>Phytophthora cryptogea</i>	8
2KE4	<i>Phytophthora europaea</i>	7
PFF CSL	<i>Phytophthora fragariae</i>	7
gon1	<i>Phytophthora gonapodyides</i>	6
lat1	<i>Phytophthora lateralis</i>	8
PP2	<i>Phytophthora parasitica</i>	1
cit2	<i>Phytophthora pini</i>	2
resi1	<i>Phytophthora plurivora</i>	2
resi32	<i>Phytophthora pseudosyringae</i>	3
2KP7	<i>Phytophthora quercina</i>	NA
ram1	<i>Phytophthora ramorum</i>	8
soj1	<i>Phytophthora sojae</i>	7
resi73	<i>Phytophthora syringae</i>	8
Plac3	<i>Phytophthora lacustris</i>	6
27_neb	<i>Phytophthora heveae</i>	5
1288_neb	<i>Phytophthora castaneae</i>	5
1543_neb	<i>Phytophthora</i> sp. neb_1543	9
resi89	<i>Phytophthora</i> sp. hungarica	6
resi51	<i>Phytophthora obruatafolium</i>	6
NII72–5	<i>Phytophthora infestans</i>	1

nested PCR amplification of the ITS1 and 18S region fragment, used first the DC6–ITS7 primers (Cooke et al. 2000) and then the newly designed primer pair Oom18s – ITS7 (Fig. 1; Table 2). For the PHYTO_ITS library (targeting *Phytophthora*), the ITS1 was amplified by another nested PCR approach, using first the Oom18s – ITS7 primers pair and then the *Phytophthora*-specific primer pair 18Ph2F-5.8S-1R (Scibetta et al. 2012). For both ITS libraries, 2 µl of the first-round amplicons diluted 10 times was used as DNA sample for the second round following the same PCR conditions. The second PCR round was conducted in triplicate, the amplicons being pooled and purified afterward. Finally, the PHYTO_RAS library (targeting *Phytophthora*, on the RAS-Ypt gene) was produced as described by Weir et al. (2015). For each PCR assay, 2 µl of DNA material were added to 18 µl of PCR reactive solution. Detailed temperature and duration for each PCR cycle are provided in Table S2. Multiplexing and Illumina MiSeq sequencing (Reagent Kit v3 chemistry,

Table 2 Primers pairs used in this study and previous ones. The PHYTO_ITS and PERO_ITS libraries were created using nested PCR (two consecutive amplifications): first using DC6/ITS7 then oom18S/ITS7 for the PERO_ITS library; first using oom18S/ITS7 then 18Ph2F/5.8S-1R for the PHYTO_ITS library. The PHYTO_RAS library was made using simple PCR

Primer pair	Region	Specificity	Forward sequence	Reverse sequence	Annealing temperature (°C)	Reference	Used in this study
DC6-ITS7	ITS	Oomycetes	GAGGGACTTTTGGGTAATCA	AGCGTTCTTCACTCGATGTC	60	Cooke et al. (2000)	Yes
oom18S-ITS7	ITS	Peronosporales	GCGCATCGTGTAGGGATAG	AGCGTTCTTCACTCGATGTC	60	Cordier (designed for this study)	Yes
18Ph2F-5.8S1R	ITS	<i>Phytophthora</i>	GGATAGACTGTTGCATTTCAGT	GCARRGACTTTCGTCCCYRC	53	Scibetta et al. (2012)	Yes
Yph1F-Yph2R	YPT1	<i>Phytophthora</i>	CGACCATKGGTGTGGACTTT	ACGTTCTCMAGGCGTATCT	58	Weir et al. (2015)	Yes
ITS1oo-ITS3oo	ITS	Oomycetes	GGAAGGATCATTTACACACGGAAGGATCATTA	AGTATGYYGTATCAGTG	NA	Riit et al. (2016)	No
ITS6-ITS7	ITS	Oomycetes	CCAC GAAGGTGAAGTCGTAAACAAGG	AGCGTTCTTCACTCGATGTC	NA	Cooke et al. (2000)	No

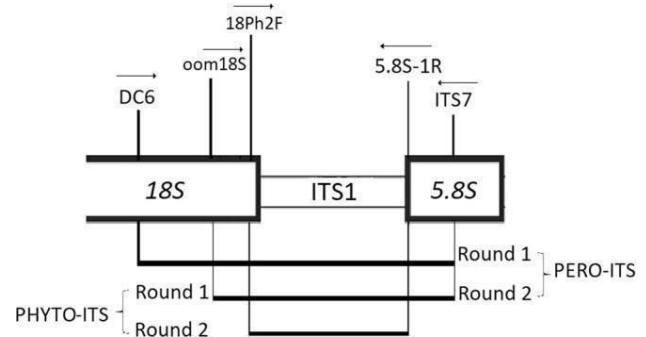


Fig. 1 Map of the 18S, ITS1, and 5.8S regions showing positions of different primer pairs

2x250pb) were done by the GeT-PlaGe platform of Toulouse (<http://get.genotoul.fr/>).

Sequences were sorted and trimmed according to their quality using Mothur (Schloss et al. 2009) and Usearch (Edgar 2010). Only reverse reads (R2) were retained to analyze both ITS sequencing data sets. The forward reads (R1) covered the 18S ribosomal DNA region, which is highly conserved and therefore lacks nucleotide polymorphism between *Phytophthora* species. Furthermore, the paired reads could be used with V3 chemistry (2x300pb) in future studies, because the average length of the amplified fragment is 480 bp. The R2 reads were dereplicated, sorted by decreasing abundance and the singletons were discarded using Usearch Bsortbysize^ command. Sequences were then clustered with a 99% similarity threshold in order to discriminate efficiently between species, using Usearch cluster_otus command. Molecular Operational Taxonomic Units (OTUs) were taxonomically assigned using BLAST (Altschul et al. 1990) against a local database (all NCBI sequences assigned to Oomycetes with the BITS^ keyword in their GenBank definition), or a homemade database containing Sanger *RAS-Ypt* sequences from the mock isolates (Table 1). OTUs assigned to the same species were merged according to their taxonomic identity at the species level. Among the 27 samples, ten failed during the Miseq sequencing, because of very low yield or high proportions of contaminants from samples of other studies incorporated into this common Miseq run. The 17 remaining samples were submitted to a random subsampling at 471 reads by sample (minimum depth of the sample set). Because of putative PCR contaminants from other environmental samples in the same HTS run, only OTUs supported by >10 sequences were retained in the environmental samples (Miller et al. 2016).

Some species with over 99% similarity in the studied amplicons clustered together. Thus, no more than 20, 22 and 23 species could be retrieved in the PHYTO_ITS, PERO_ITS, and PHYTO_RAS libraries, respectively (Fig. 2). The clustering process generated 75 and 222 *Phytophthora* OTUs for the PHYTO_ITS and PERO_ITS libraries respectively

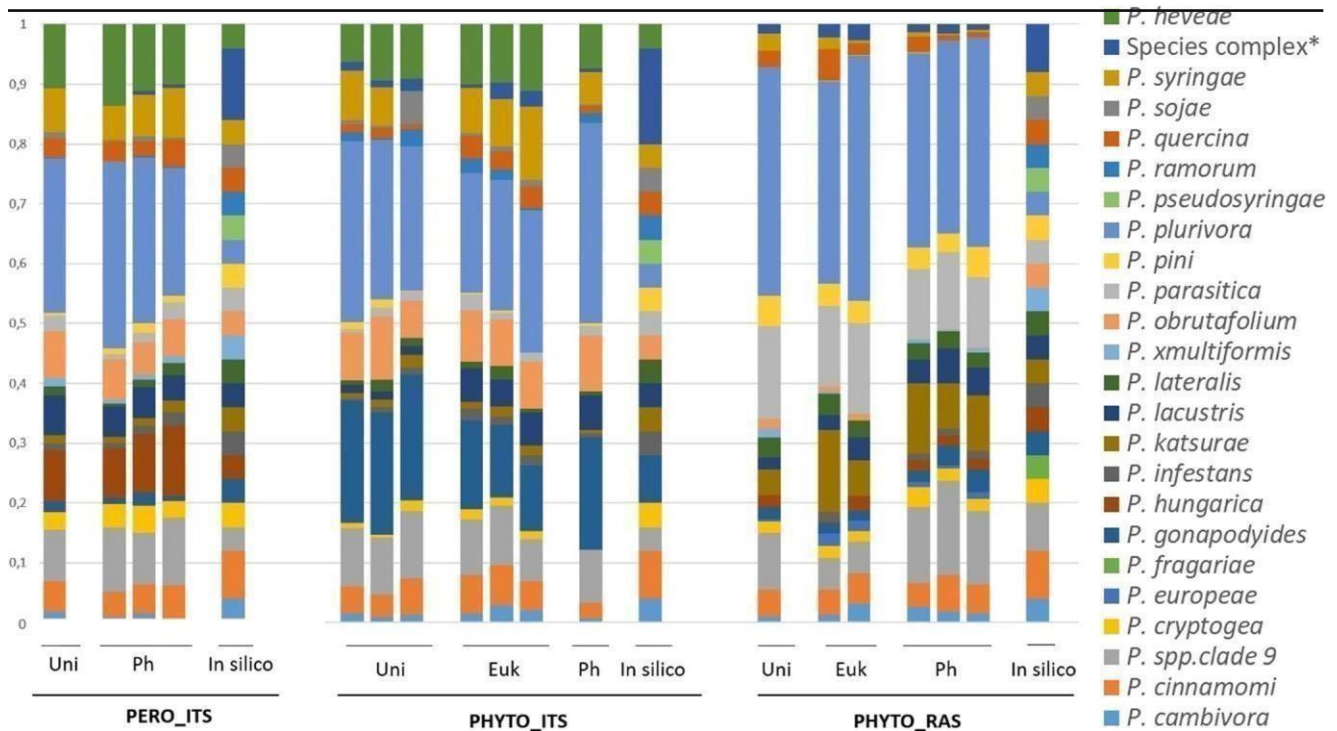


Fig. 2 Proportions of reads per *Phytophthora* species for each technical replicate, depending on the mock community composition and the PCR amplification strategy. Euk = Eukaryotic mock community; Ph = *Phytophthora*-only mock community; Uni = Eukaryotic and prokaryotic mock community. PERO_ITS is the library amplified by Peronosporales-specific primer set oom18S/ITS7; PHYTO_ITS is the library amplified by *Phytophthora*-specific primer set 18Ph2F/5.8–1.5R; RAS_ITS is the library amplified by *Phytophthora*-specific primer set Ypr1F/Ypr1R. The number of reads by sample was subsampled to 471 reads. BSpecies

complex[^] represent the fusion of *P. uniformis*, *P. europaeae* and *P. fragariae* for PERO_ITS and *P. uniformis*, *P. europaeae*, *P. fragariae* and *P. × multiformis* for PHYTO_ITS. « In silico » corresponds to expected OTUs composition based on the clustering at 99% similarity of 25 Sanger sequences from the RAS or ITS regions. Missing repetitions are due to low quality MiSeq sequencing. Differences in species proportions between samples were tested using the function ADONIS of the R *vegan* package (with 99,999 permutations)

corresponding to 19 and 21 species, as one species from the original mix. Indeed, as confirmed with in silico analysis, *P. uniformis*, *P. europaeae* and *P. fragariae* clustered together at 99% of similarity for PERO_ITS PCR strategy; and *P. uniformis*, *P. europaeae*, *P. fragariae* and *P. × multiformis* were identified as one single group at 99% of similarity also for PHYTO_ITS PCR strategy (Fig. 2). *P. pseudosyringae* was never identified in both ITS libraries. The RAS amplification gave out 60 different OTUs belonging to 22 species, with *P. ramorum* missing. Proportions of reads from each species were significantly different from the proportions of the original mix regardless of the library ($p < 0.001$). However, proportions were conserved between technical replicates, and did not depend on the added presence of other Dikarya / Procarya DNA in the mock communities ($p = 0.99$). Species distribution patterns were significantly different between each library ($p < 0.001$).

Seven different *Phytophthora* species were detected in environmental samples with the PHYTO_ITS library and just one species (*P. syringae*) with the PERO_ITS library (Table 3). Non-*Phytophthora* Oomycetes reads represented

5% and 98% of the total reads in the PHYTO_ITS and the PERO_ITS libraries respectively. *Phytophthora* represented only 2% of the total reads of PERO_ITS; while 95% of the reads were assigned to *Pythium* and *Phytophythium* and sorted in 117 OTUs pertaining to 29 species. This result constituted 97% of Peronosporomycete reads with the PERO_ITS amplification.

The two nested PCR approaches, DC6/ITS7 x Oom18S/ITS7 (PERO_ITS) and Oom18S/ITS7 x 5.8S1R/18ph2F (PHYTO_ITS), proved reliable for qualitative characterisation of mock *Phytophthora* communities without other Oomycete species. However, the second PCR strategy was much more effective for environmental samples, usually containing a much higher abundance of other Peronosporaceans such as *Pythium* (Cerri et al. 2017). Moreover, the number of amplified *Phytophthora* species corresponded to the order of magnitude of *Phytophthora* diversity in temperate forests, which is of about 2 to 8 species (Jung et al. 2010; Hansen and Delatour 1999). Thus, our study suggests that the 'Oom18S/ITS7 x 5.8S1R/18ph2F' primer set is an effective tool for qualitative description of environmental *Phytophthora* species.

Table 3 Number of environmental samples where *Phytophthora* species were detected, depending on the PCR amplification strategy. A total of 8 soil samples (corresponding to 2 sites × 4 trees) were analyzed. The PHYTO_ITS library was made using the 18Ph2F/5.8S-1R primer pair and the PERO_ITS library using the oom18S/ITS7 primer pair. Retrieved *Phytophthora* species belonged to 4 clades out of the 10 *Phytophthora* clades

Species	Number of samples/ library		Clade
	PERO_ITS	PHYTO_ITS	
<i>P. cactorum</i>	0	5	1
<i>P. europaeae</i>	0	3	7
<i>P. pini</i>	0	3	2
<i>P. plurivora</i>	0	2	2
<i>P. pseudosyringae</i>	0	4	3
<i>P. sp. neb_1543</i>	0	1	7
<i>P. syringae</i>	2	4	8

Nevertheless, quantitative distortions in the species proportions have been observed in HTS data obtained with the three primer sets, as described with other primers targeting fungal community (Nguyen et al. 2015; Buée et al. 2016). Possible causes include PCR steps and primer affinities for specific species, difference in ITS copy numbers in the genome (Bakker 2018), or errors in initial genomic DNA quantifications. This needs to be taken into account for quantitative studies. On the other hand, no mismatches bias was observed in the *Phytophthora* mocks supplemented with microbial metagenome background; and finally, qualitative detection of *Phytophthora* species, in order to detect potential pathogenic agents, would be very effective.

Although unreliable for the *Phytophthora* genus, the Peronosporacean-specific primer set enables the coverage of a wider Oomycete community, in particular *Pythium* and *Phytophthora*. The amplification of RAS-Ypt region showed good results on mock communities and could represent an alternative marker for barcoding as the ITS region presents low polymorphism in *Phytophthora*. Furthermore, it has been shown that single-copy markers can provide better relative abundance estimates of fungal taxa than the multi-copy ITS regions (Větrovský et al. 2016; Pérez-Izquierdo et al. 2017). Targeting single-copy marker could therefore improve relative abundance estimates for *Phytophthora* communities as well, but potentially at a cost of a lower detection threshold. The efficiency of the RAS gene remains to be validated on environmental samples.

In conclusion, our study revealed a high concordance between the expected and recovered community composition of *Phytophthora* within mock communities. Our results show quantitative differences that can be caused by the selection of barcode and associated primer sets. Taken together, these results reveal that 'Oom18S/ITS7 x 5.8-S1R/18ph2F'

primer set is a robust tool for future qualitative studies of *Phytophthora* community, richness study and diversity monitoring using the third-generation sequencing generations.

Acknowledgements We gratefully acknowledge E. Morin for her assistance in bioinformatics advices, and A. Gillet and L. Fauchery for their technical support. We also thank the members of the MetaBAR project ('Meta-omics and microbial ecosystems' INRA Metaprogramme), who provided the non-*Phytophthora* microbial genomics DNA from INRA microbe collections. We thank also one anonymous reviewer for providing helpful comments to improve our manuscript. JL holds PhD fellowships awarded by the BAgence Nationale de la Recherche^A as part of the ANR Blanc program NEBEDIV (ANR-13-BSV7-0009) and by the BInstitut National de la Recherche Agronomique^A (Metaprogramme MEM). The UMR IAM is supported by a grant overseen by the French National Research Agency (ANR) as part of the BInvestissements d'Avenir^A program (ANR-11-LABX-0002-01, Laboratory of Excellence ARBRE).

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

References

- Aguayo J, Adams GC, Halkett F, Catal M, Husson C, Nagy ZÁ, Hansen EM, Marçais B, Frey P (2013) Strong genetic differentiation between North American and European populations of *Phytophthora alni* subsp. *uniformis*. *Phytopathology* 103:190–199. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-12-0116-R>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215, 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Bakker MG (2018) A fungal mock community control for amplicon sequencing experiments. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12760>
- Bellemain E, Carlsen T, Brochmann C, Coissac E, Taberlet P, Kauserud H (2010) ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiol* 10:189. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-189>
- Bokulich NA, Subramanian S, Faith JJ, Gevers D, Gordon JI, Knight R et al (2013) Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nat Methods* 10:57. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2276>
- Brasier CM, Vetrano AM, Chang TT et al (2010) *Phytophthora lateralis* discovered in an old growth *Chamaecyparis* forest in Taiwan. *Plant Pathol* 59:595–603. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02278.x>
- Buée M, Sentauba E, Murat C (2016) Molecular technologies applied to the ecology of ectomycorrhizal communities. In: *Molecular Mycorrhizal Symbiosis*, p 323. <https://doi.org/10.1002/9781118951446.ch18>
- Català S, Pérez-Sierra A, Abad-Campos P (2015) The use of genus-specific amplicon pyrosequencing to assess *Phytophthora* species diversity using eDNA from soil and water in northern Spain. *PLoS ONE* 10(3):e0119311. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119311>
- Cerri M, Sapkota R, Coppi A, Ferri V, Foggi B, Gigante D, Lastrucci L, Selvaggi R, Venanzoni R, Nicolaisen M, Ferranti F, Reale L (2017)

- Oomycete communities associated with reed die-back syndrome. *Front Plant Sci* 8:1550
- Coince A, Cael O, Bach C, Lengelle J, Cruaud C, Gavory F, Morin E, Murat C, Marcais B, Buee M (2013) Below-ground fine-scale distribution and soil versus fine root detection of fungal and soil oomycete communities in a French beech forest. *Fungal Ecol* 6: 223–235. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01550>
- Cooke DEL, Drenth A, Duncan JM, Wagels G, Brasier CM (2000) A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. *Fungal Genet Biol* 30:17–32. <https://doi.org/10.1006/fgbi.2000.1202>
- Edgar, R. C. (2010). Searchandclustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26, 2460–2461. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461>
- EGGE E, Bittner L, Andersen T, Audic S, de Vargas C, Edvardsen B (2013) 454 pyrosequencing to describe microbial eukaryotic community composition, diversity and relative abundance: a test for marine haptophytes. *PLoS One* 8(9):e74371. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074371>
- Hansen E (2008) Alien forest pathogens : *Phytophthora* species are changing world forests. *Boreal Environ Res* 13:33–41
- Hansen E, Delatour C (1999) *Phytophthora* species in oak forests of North-East France. *Ann For Sci* 56:539–547. <https://doi.org/10.1051/forest:19990702>
- Jung T, Blaschke H, Oßwald W (2010) Involvement of soilborne *Phytophthora* species in Central European oak decline and the effect of location factors on the disease. *Plant Pathol* 49:706–718. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2000.00521.x>
- Kamoun S, Furzer O, Jones JD, Judelson HS, Ali GS, Dalio RJ, Roy SG, Schena L, Zambounis A, Panabières F, Cahill D, Ruocco M, Figueiredo A, Chen XR, Hulvey J, Stam R, Lamour K, Gijzen M, Tyler BM, Grünwald NJ, Mukhtar MS, Tomé DF, Tör M, Van Den Ackerveken G, McDowell J, Daayf F, Fry WE, Lindqvist-Kreuzer H, Meijer HJ, Petre B, Ristaino J, Yoshida K, Birch PR, Govers F (2015) The top 10 oomycete pathogens in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol* 16:413–434. <https://doi.org/10.1111/mpp.12190>
- Miller KE, Hopkins K, Inward DJ, Vogler AP (2016) Metabarcoding of fungal communities associated with bark beetles. *Ecol Evol* 6:1590–1600. <https://doi.org/10.1002/ece3.1925>
- Nguyen NH, Smith D, Peay K, Kennedy P (2015) Parsing ecological signal from noise in next generation amplicon sequencing. *New Phytol* 205:1389–1393. <https://doi.org/10.1111/nph.12923>
- Pérez-Izquierdo L, Morin E, Maurice JP, Martin F, Rincón A, Buee M (2017) A new promising phylogenetic marker to study the diversity of fungal communities: the glycoside hydrolase 63 gene. *Mol Ecol Resour* 17:e1–e11. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12678>
- Riit T, Tedersoo L, Drenkhan R, Runno-Paason E, Kokko H, Anslan S (2016) Oomycete-specific ITS primers for identification and metabarcoding. *MycKeys*. 14:17–30. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.14.9244>
- Sapkota R, Nicolaisen M (2015) An improved high throughput sequencing method for studying oomycete communities. *J Microbiol Methods* 110:33–39. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.01.013>
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Miller AN (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci* 109(16):6241–6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., et al., Sahl, J. W. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75, 7537–7541. <https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09>
- Scibetta S, Schena L, Chimento A, Cacciola SO, Cooke DEL (2012) A molecular method to assess *Phytophthora* diversity in environmental samples. *J Microbiol Methods* 88:356–368. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.12.012>
- Taberlet P, Coissac E, Hajibabaei M, Rieseberg LH (2012) Environmental DNA. *Mol Ecol* 21(8):1789–1793. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05542.x>
- Taylor DL, Walters WA, Lennon NJ, Boichicchio J, Krohn A, Caporaso JG, Pennanen T (2016) Accurate estimation of fungal diversity and abundance through improved lineage-specific primers optimized for Illumina amplicon sequencing. *Appl Environ Microbiol* 82:7217–7226. <https://doi.org/10.1128/AEM.02576-16>
- Tedersoo L, Anslan S, Bahram M, Pölme S, Riit T, Liiv I et al (2015) Shotgun metagenomes and multiple primer pair-barcode combinations of amplicons reveal biases in metabarcoding analyses of fungi. *MycKeys* 10:1–43. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.10.4852>
- Tedersoo L, Tooming-Klunderud A, Anslan S (2018) PacBio metabarcoding of Fungi and other eukaryotes: errors, biases and perspectives. *New Phytol* 217:1370–1385. <https://doi.org/10.1111/nph.14776>
- Turner J, O'Neill P, Grant M, Mumford RA, Thwaites R, Studholme DJ (2017) Genome sequences of 12 isolates of the EU1 lineage of *Phytophthora ramorum*, a fungus-like pathogen that causes extensive damage and mortality to a wide range of trees and other plants. *Genomics Data* 12:17–21. <https://doi.org/10.1016/j.gdata.2017.02.006>
- Vannini A, Bruni N, Tomassini A, Franceschini S, Vetrano AM (2013) Pyrosequencing of environmental soil samples reveals biodiversity of the *Phytophthora* resident community in chestnut forests. *FEMS Microbiol Ecol* 83:433–442. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12132>
- Větrovský T, Kolařík M, Žifčáková L, Zelenka T, Baldrian P (2016) The rpb2 gene represents a viable alternative molecular marker for the analysis of environmental fungal communities. *Mol Ecol Resour* 16: 388–401. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12456>
- Weir B, Paderes E, Anand N, Uchida J, Pennycook S, Bellgard S, Beever R (2015) A taxonomic revision of *Phytophthora* Clade 5 including two new species, *Phytophthora agathidicida* and *P. cocois*. *Phytotaxa* 205:21–38. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.205.1.2>

CHAPITRE 2

Surprisingly low diversity of the plant pathogen
Phytophthora in Amazonian forests

(Article accepté avec révisions dans *Microbial Ecology*)

Dans ce chapitre, nous avons cherché à améliorer les connaissances portant sur l'écologie des communautés de *Phytophthora* en forêts de Guyane. Ces communautés ont été étudiées dans deux sites distants d'environ 100 km: le massif forestier associé au Centre Spatial Guyanais (CSG) et la région forestière du Grand Laussat-Mana, située au Nord-Ouest de la Guyane. Trois méthodes ont été utilisées pour étudier ces communautés. La première méthode, relativement traditionnelle, le piégeage et l'isolement de souches à partir d'échantillons de sol, couplés à une identification moléculaire des isolats espèces isolées par un séquençage Sanger de la région ITS (internal transcribed spacer). Les deux autres méthodes s'inscrivent dans le domaine de la métagénomique environnementale. Elles utilisent les amorces PCR testées au chapitre précédent, afin de décrire ces communautés de *Phytophthora* par metabarcoding à partir d'ADN environnemental extrait i) des feuilles-pièges ou ii) des échantillons de sol prélevés en forêt.

Les sols ont été prélevés au pied d'individus appartenant à 10 familles végétales différentes dans ces deux sites : *Burseraceae*, *Chrysobalanaceae*, *Fabaceae*, *Lauraceae*, *Lecythydaceae*, *Malvaceae*, *Moraceae*, *Myrtaceae*, *Rubiaceae* et *Sapotaceae*. De plus, les parcelles échantillonnées ont été sélectionnées dans trois types d'environnement : terre ferme, bas-fonds inondés à la saison humide, et sables blancs.

Les trois méthodes donnent des résultats fort similaires. Bien que chacune d'elles permet de trouver une espèce rare de *Phytophthora* qui n'est pas détectée par les autres méthodes, la composition générale des communautés de *Phytophthora* est très similaire. La méthode de piégeage/isolement génère une proportion un peu plus importante d'espèces rares. Ce résultat pourrait résulter d'un biais du manipulateur, ayant tendance à ne pas sous-échantillonner de manière aléatoire et à sélectionner des isolats morphologiquement différents lors de l'étape du repiquage. Ainsi, le metabarcoding des sols paraît être une méthode satisfaisante pour des études d'écologie des communautés à large échelle.

Les communautés de *Phytophthora* des deux sites étudiés présentent une faible diversité (seulement six espèces en tout). Ce résultat est surprenant au regard de la très forte diversité végétale hébergée par ces environnements forestiers. Les communautés, très largement dominées par l'espèce *P. heveae*, comportent aussi une présence des espèces *P. castaneae* et *P. cinnamomi*, et d'autres non décrites. De

plus, parmi les différentes variables environnementales étudiées, seul un faible effet structurant de l'hôte a été mis en évidence dans cette étude. Cependant, la quantité totale de *Phytophthora*, estimée par le nombre de lésions produites sur les feuilles-pièges serait quantitativement différente entre les trois types d'environnement, avec une abondance beaucoup plus élevée dans les environnements de terre-ferme.

Toutefois, lorsque nous avons séquencé 16 isolats du clade 5, c'est-à-dire appartenant aux espèces *P. heveae* et *P. castaneae*, à l'aide de quatre autres marqueurs génétiques (Enolase, NADH, Cox, Ras), il est apparu que les isolats de ces 2 espèces se divisent en deux groupes à l'intérieur de chacune de ces deux espèces. Il est donc possible que nous ayons ici affaire à des complexes d'espèces, non discriminées par le marqueur ITS. En prenant en compte ces espèces putatives, nous avons mis en évidence un effet de l'environnement faible mais significatif sur ces communautés de *Phytophthora*, et que mais l'effet hôte ne s'en trouve pas renforcé.

En conclusion, bien qu'il reste de nombreuses inconnues dues à ces complexes d'espèces, la diversité des *Phytophthora* dans ces sols de forêts guyanaises est étonnamment basse, et n'apparaît que peu structurée par les potentiels arbres hôtes. Par conséquent, les *Phytophthora* telluriques semblent tendre vers un comportement plutôt généraliste dans ces forêts. Toutefois, on peut imaginer que le manque d'agrégation des espèces d'arbres dans ces forêts, et l'enchevêtrement de leurs racines, peuvent conduire à un certain manque de pertinence dans le fait de désigner un arbre-hôte pour un échantillon de sol. Ainsi, pour nous affranchir de cette contrainte, nous avons, dans le chapitre 3, étudié les *Phytophthora* dans une plantation monospécifique d'arbres. De plus, le métabarcoding des sols offrant peu de différences par rapport au piégeage/isolement, nous l'avons exclusivement utilisé dans le chapitre 3.

Surprising low diversity of the plant pathogen *Phytophthora* in Amazonian forests

Jean Legeay¹, Claude Husson^{1,2}, Benjamin Boudier¹, Eliane Louisanna³, Christopher Baraloto^{3,4}, Heidy Schimann³, Benoît Marcais^{1*}, Marc Buée^{1*}

¹ Université de Lorraine, Inra, UMR IAM - Interactions Arbres-Microorganismes -, F-54000 Nancy, France

² Ministère de l'agriculture et de l'alimentation, DGAL, SDQPV, Département de la santé des forêts, 75015, Paris, France

³ INRA, UMR EcoFoG - Ecology of Guiana Forests - (AgroParisTech, CNRS, CIRAD, Université des Antilles, Université de Guyane), 97310, Kourou, France

⁴ International Center for Tropical Botany, Department of Biological Sciences, Florida International University, Miami, Florida 33199, USA

* Corresponding authors:

marc.buee@inra.fr (M. Buée) - ORCID# : 0000-0001-8614-3886

benoit.marcais@inra.fr (B. Marcais) - ORCID# : 0000-0002-8107-644X

ABSTRACT

The genus *Phytophthora* represents an important group of plant pathogens, some of which are causing root diseases on a broad range of plants with global distribution. Communities of *Phytophthora* are often poorly known in forest ecosystems, especially in Neotropical forests, where natural enemies are hypothesized to maintain plant diversity via negative density dependence. We characterized the diversity of soil-borne *Phytophthora* communities in the French Guiana rainforest and investigated how they are structured by host identity and environmental factors. Soil was sampled at the base of saplings belonging to ten different families in ten plots across three forest environments (Terra Firme, Seasonally Flooded and White Sand) in two locations separated by 100km. *Phytophthora* diversity was studied using baiting and metabarcoding (using High Throughput Sequencing) on DNA extracted either from soil samples or from the leaves of the baiting approaches. The three methods revealed very similar communities, with the dominance of two putative species close to *Phytophthora heveae*. Additionally, *P. cinnamomi*, *P. sp. cuyabensis*, two species close to *P. castaneae*, and two undescribed new species were retrieved from the 93 forest soil samples. *Phytophthora* community compositions were impacted mainly by the host plant family, while the environment showed an effect mainly on the absolute quantity of *Phytophthora* retrieved. Overall, the richness and relative diversity of *Phytophthora* were unexpectedly low and communities were dominated by generalist species, questioning their potential roles as drivers of plant diversity in these Amazonian forests.

KEY WORDS: Biodiversity, Neotropical forests, Janzen-Connell, host specialization

INTRODUCTION

Neotropical forests are among the world's major diversity hotspots for plants [2, 23, 55]. Among the multiple hypotheses proposed to explain how plant species coexistence is promoted in these especially diverse forests [64], environmental filtering and negative density dependence of host-specific natural enemies have been highlighted [6, 25, 36, 41]. Indeed, the role of pathogens in the maintenance and structure of plant diversity has been a major topic in community ecology [1, 30], especially in Neotropical forests [4, 36, 56]. The Janzen-Connell hypothesis could explain the maintenance of plant diversity by an accumulation of host-specific natural enemies near reproductive adults that affects their offspring in the vicinity, thus limiting their abundance and aggregation [24, 37, 49]. This requires that natural enemies have a significant degree of host specialization, even if they do not have to be strict species-level specialists [4, 6]. Alternatively, pathogens may be generalists and structured more by environmental filtering and biogeographic history than by host plant community structure [6].

Because the genus *Phytophthora* contains important plant pathogen species, often involved in seedling mortality, with a worldwide presence and an important economic impact [21], it could represent a good target to study Janzen-Connell effects and host specialization in Neotropical forests. Indeed, all known *Phytophthora* species are plant pathogens, although they exhibit a diversity of aggressiveness and host range [17]. The genus encompasses 142 described species and 43 informal species [65], divided in twelve phylogenetic clades, which represent aquatic opportunists, foliar pathogens, or soil-borne pathogens [21]. However, *Phytophthora* communities have been understudied in Neotropical forests.

The few studies on *Phytophthora* in tropical forests have focused on characterizing *Phytophthora* diversity, without explicit focus on the factors shaping these communities. For example, Zeng *et al.* [66] found 14 species in the tropical island of Hainan, sampled from plant materials, soils or water at five locations, although only five species were found in forest. In their study across Australia, Burgess *et al.* [8] sampled 20 locations in the subtropical/tropical Queensland and found 13 *Phytophthora* species, among which the most frequent were *P. cinnamomi* and *P. heveae*. Wallace [61] showed that *Phytophthora* diversity could be relatively high in Neotropical forests of Costa Rica, with 21 species

found in various forest locations. Some species such as *P. cinnamomi*, *P. heveae*, *P. castaneae* were common across these studies and appear to be widespread in tropical forests [8, 26, 61, 66].

A traditional method for the study of soil-borne *Phytophthora* communities is the baiting technique. This approach involves use of plant tissues, usually leaves, as baits on which the targeted pathogens produce characteristic lesions. Isolation onto selective agar medium from the lesions enables detection and determination of species using molecular barcodes. More recently, high-throughput sequencing (HTS) methods were applied to study *Phytophthora* communities [7, 8, 10 11, 12, 60]. With this approach, DNA is directly extracted from environmental samples (e.g. soil), then DNA barcodes are amplified with *Phytophthora*-specific primers and sequenced for analysis. These methods are less time-consuming and show greater sensitivity [50], potentially circumventing biases such as seasonal variation of *Phytophthora* biomass or activity, and possible specificity of the leaves used as bait toward some *Phytophthora* species [57]. Several studies have compared these two approaches, [7, 9, 32, 59]. The HTS approach generally enables detection of a much higher number of *Phytophthora* taxa. For example, in Bose *et al.* [7], five taxa were detected by baiting whereas 32 taxa were detected by metabarcoding. In this study, we sampled soil at the stem collar of individuals from tree species belonging to ten different taxonomic families in each of three soil conditions at two different locations in French Guiana. We used baiting/isolation and metabarcoding methods to describe *Phytophthora* communities in these different environments. Our aims were (1) to compare the methods (2) to estimate the diversity of these communities and compare it to diversity of other tropical and temperate studies, and (3) to unravel the primary factors that structure *Phytophthora* communities in the soils of these Neotropical forest sites. We hypothesized (i) that soil metabarcoding will provide greater precision in community estimates than traditional baiting techniques, (ii) that *Phytophthora* richness will be similar to other sampled moist tropical forests, higher than that found in temperate forests, and (iii) that host plant identity will play a stronger role than environmental filtering in structuring *Phytophthora* communities.

MATERIAL & METHODS

Sampling and location description

Soil was sampled in plots located in two sites, in coastal French Guiana, 137 km apart from each other (Fig. 1), Laussat (5.48° N, 53.60° W, 4 plots) in mid-April 2015 and in the Centre Spatial Guyanais (abbreviated as CSG, 5.22° N, 52.84° W, 6 plots) in February and March 2015. These plots belonged to the three main forest environments in French Guyana: white sand (WS, 1 plot in Laussat and 2 in CSG), terra firme (TF, 2 plots in Laussat 2 in CSG), and seasonally flooded forests (SF, 1 plot in Laussat and 2 in CSG). Each plot is about 2 hectares in surface. These three types of environments are described in Randall [42]. The sample locations were relatively undisturbed. In each plot, 50 to 60 saplings (2-3 m in height) belonging to ten taxonomic families were selected for sampling (two to twelve individuals per family). The sampled saplings did not present any visible symptoms of disease. The host families were *Burseraceae*, *Chrysobalanaceae*, *Fabaceae*, *Lauraceae*, *Lecythidaceae*, *Malvaceae*, *Moraceae*, *Myrtaceae*, *Rubiaceae* and *Sapotaceae*. Focal families were selected for their relatively large distribution across Amazonian forests within the targeted environment types and the breadth of Angiosperm diversity they represent, as they belong to three major Angiosperms clades: the Asterids, Rosids and Magnoliids (see Fig. 4 for their repartition into these clades). Three soil samples 5-10 cm deep were collected at 15-40 cm from the stem collar after removing the litter at the base of each sapling. In each plot, soil samples collected from saplings belonging to the same family were then pooled. As all ten tree families could not be found in all ten plots, the number of pooled soil samples was 93.

Baiting and isolation

For each soil sample, two 1 l plastic containers filled with 200 mL of homogenised soil submerged by 500 mL of distilled water were prepared for baiting. In one container, three leaves of *Rhododendron* 'Cunningham's White' were placed floating upon the water, while the other received one leaf each of Cassava (*Manihot esculenta*) or Avocado (*Persea americana*). After three days of incubation at 20-22 °C, bait leaves were collected and weighed. The number of lesions was quantified on *Rhododendron* leaves only, because lesions became immediately too large and confluent on Cassava and Avocado leaves, preventing accurate quantification of infections. For each combination of bait leaf x soil sample,

up to 10 lesions were cut and placed in Petri dishes containing a *Phytophthora* selective medium (V8 juice agar complemented with 10 mg L⁻¹ pimaricine, 250 mg L⁻¹ ampicilline, 10 mg L⁻¹ rifampicine, 67 mg L⁻¹ hymexazol, 15 mg L⁻¹ benomyl). After 48 hours incubation in the dark at 25°C, mycelium was transferred onto new Petri dishes containing the same medium previously described for up to 5 putative *Phytophthora* distinct colonies per soil sample x bait leaf combination, preferentially selecting isolates with different morphology. After an additional 48-72 hours period of incubation, the mycelium was collected for DNA extraction, using the DNeasy 96 Plant kit (Qiagen) according to the manufacturer's instruction. PCR products were amplified from this genomic DNA using the ITS6-ITS4 primer pair targeting the ITS region, using the PCR protocol from [13] and the YPh1F-YPh2R primer pair targeting *RAS-Ypt* gene, using the PCR protocol from [62]. They were then sequenced in both directions with the Sanger method. The different steps of the sampling, baiting, isolation and molecular identification process are reported in Fig. 1.

Additionally, as *P. cinnamomi* is a very important invasive species found worldwide, usually present as only one of the mating types [17], the *P. cinnamomi* isolates retrieved from our samples were further characterized by determining their mating type. They were paired with A1 and A2 mating types of *P. cinnamomi* isolates from a reference collection, using the method described by Zentmyer[67].

Phylogenetic analysis of isolates

As clade 5 isolates (phylogenetically close to *P. castaneae* and *P. heveae*) were the most frequent in our study, twenty of these isolates were selected for further investigation of their genetic diversity. We selected these isolates to maximize their ITS sequence diversity. We then sequenced for each one the *RAS-YPT* gene and three additional genetic markers, Cox, Enolase and NADH genes (see [62] for the method used). Multiple sequence alignments for each gene were made using Seaview 4.0 [20]. Bayesian inference (BI) was used to reconstruct the phylogenies using MrBayes v. 3.2.2 [44] for the two categories of sequences: first, a concatenation of the mitochondrial markers (Cox and NADH), and secondly another concatenation of the nuclear markers (ITS, *RAS-Ypt* and Enolase). Nuclear genes showed congruent phylogenies, and so did mitochondrial genes; however, the phylogenies were not congruent between nuclear and mitochondrial genes, so we did not create a tree based on all five genes.

Sequences of clade-5 *Phytophthora* from Weir *et al.* were used as references, and in both trees, *P. multivora* was used as outgroup.

Two *P. cinnamomi* isolates (clade-7) from Laussat and two from CSG were also randomly selected and sequenced for the same markers.

Metabarcoding and Illumina Miseq sequencing

Two sets of DNA samples were created by extracting DNA from either (1) the 93 soil samples or (2) the 264 bait leaves corresponding to the three different bait species (Rhododendron, Avocado and Cassava, i.e. 93 x 3 bait leaves, minus 15 leaves showing no infection and discarded for further analysis). Soil samples were air-dried and sieved (2 mm mesh size). DNA extraction was performed using MP Biomedical Fast DNA™ SPIN Kit for soil on 500 mg of dried soil according to the manufacturer's instructions. Bait leaves were dried and ground using liquid nitrogen, and DNA of 500 mg leaf samples was extracted using DNeasy 96 plant kits.

PCR products were amplified from these 357 DNA samples using a nested PCR approach: the primer pair oom18S-ITS7 was used for the first round and the primer pair 18Ph2F/5.8-1R for the second round. The PCR protocol and the primer sequences are detailed in [34]. In order to detect potential contaminants, fifteen control samples, consisting of pure distilled water added to the PCR mix, were included in the same PCR plates. The multiplexing and the Illumina MiSeq sequencing were done by the GeT-PlaGe platform of Toulouse (<http://get.genotoul.fr/>).

Bioinformatics analysis

Sequences were sorted and trimmed according to their quality using Mothur [48] and Usearch [16]. The R2 reads were retained for quality reasons and because they cover the ITS1 nucleotide polymorphism region. The reads were then dereplicated to remove duplicated sequences and sorted by decreasing abundance, and the singletons were discarded using the sortbysize command of Usearch. Sequences were then clustered together to make consensus mOTUs with 99% similarity threshold, using cluster_otus command of Usearch. Generated mOTUs were taxonomically assigned using the BLAST algorithm against a database extracted from the NCBI database, containing all sequences assigned to Oomycetes with the “ITS” and “Internal Transcribed Spacer” keywords in their definitions. OTUs

assigned to the same species were merged according to their taxonomic identity at the species level. Because the Sanger sampling has much less depth than metabarcoding, and because *Phytophthora* diversity is known to be relatively low, we chose to submit the metabarcoding library to processes of random subsampling between 50 and 200 reads by sample. Finally, we chose to sample 72 reads because this was the number of reads which maximized the quantity of rare species retrieved in the samples. When mOTUs were present in the blank samples, we discarded them from environmental (soil and bait leaves) samples, but only if the number of reads in environmental samples was inferior to the number of reads in blank samples. Due to quantitative distortions using these amplification and sequencing methods [34], sequencing results were only analyzed qualitatively (i.e. presence or absence of species). ITS sequences were deposited in GenBank under the accession numbers MH938206 - MH938223. The sequences of RAS-Ypt, Enolase, Cox and NADH regions are available in the DRYAD database (<http://datadryad.org/>). DRYAD entry [doi:XXXXXX](#). The Miseq raw data were deposited in the Sequence Read Archive (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) as SUB5066167 (temporary access number).

Data analysis

The efficiency of isolation from baits was studied by analysing the likelihood that a retrieved isolate was a *Phytophthora* species using a mixed logistic regression with a logit link, taking into account the bait leaf species, the environment, the host plant family and the location (glmer function of R). The plot was added as a random factor.

The number of lesions per bait leaves was analysed as a surrogate for the quantity of *Phytophthora* inoculum in soil. Effects of the different factors, host plant family, environment and location, on the number of lesions per bait leaf weight were tested with a generalized linear model using a Poisson distribution and a log link, with the medium leaf weight as offset (glmer function of R). The plot was added as a random factor.

Differences in the composition of *Phytophthora* communities between the different methods, environments, locations and host families were tested by Permutational Multivariate Analysis of Variance (PERMANOVA) using the *adonis* function (number of permutations = 500) in the *vegan* package of R [40]. As all information on *Phytophthora* species composition could not be used in the

metabarcoding data, in particular on *P. heveae* and *P. castaneae* complexes, a second analysis was performed using only the data from the baiting/isolation study. To further characterize the diversity of communities in the different environment / families, we computed the Shannon diversity index for each host family and each “environment x location” level using *diversity* function from the veganpackage.

RESULTS

***Phytophthora* diversity uncovered by baiting & isolation**

Out of the 93 soil samples, 89 produced lesion spots on *Rhododendron* leaves, 92 on Avocado leaves and 91 on Cassava leaves. From these 272 bait leaves, 581 isolates were obtained from infection spots, out of which 366 were identified as *Phytophthora* species (Fig. 1). Among these *Phytophthora* isolates, 136 were found in TF soils, 128 in SF soils and 102 in WS soils. *Phytophthora* retrieval success depended on the bait used and on the location (both $p < 0.001$), but not on the environment ($P = 0.83$) or host family ($P = 0.42$). Fifty out of the 55 samples (91%) from CSG produced isolates that were identified as *Phytophthora* through Sanger sequencing, while only 24 out of the 38 samples (63 %) from Laussat produced isolates. *Phytophthora* strain recovery was high on *Rhododendron* leaves (167 isolates) and Avocado leaves (127 isolates), but lower on Cassava leaves (72 isolates).

The number of lesions per leaf weight was quantified on *Rhododendron* bait leaves as a measure of the presence of live *Phytophthora* in the baited soils. The number of lesions per leaf weight was not related to the location or to the environment (Fig. 2). However, the number of spots was significantly different between host plant families with a strong “family x environment” interaction (both $p < 0.001$). Figure 2 shows that while many families had higher lesion number on TF environments compared to WS or SF, other families (*Malvaceae*, *Moreceae*, *Myrtaceae*) showed limited differences between the environments.

Sanger sequences of ITS region of the *Phytophthora* isolates were approximately 800 bp in length (min 616 bp - max 876 bp), versus from 373 to 382 bp for *RAS-YPT* gene. Sequencing of the ITS region enabled us to identify five potential species: a species close to *P. heveae* (named here *P. heveae*-like, 304 isolates), a species close to *P. castaneae* (named here *P. castaneae*-like, 24 isolates), *P. cinnamomi* (23 isolates), *P. sp. cuyabensis* (6 isolates) and an undescribed species from clade 9, *P. sp. neb_1543* (9 isolates). Isolates identified as *P. heveae*-like, *P. castaneae*-like and *P. sp. cuyabensis* showed some heterogeneity of ITS sequences, differing for up to 9 bases between *P. castaneae*-like isolates, up to 4 bases between *P. heveae*-like isolates and 2 bases between *P. sp. cuyabensis* isolates. ITS sequence alignments within either *P. cinnamomi* isolates or *P. sp. neb_1543* isolates showed 100% homology.

Clustering patterns and assignation from *RAS-Ypt* and ITS sequences were similar, although variability between *RAS-Ypt* sequences was lower (up to 3 bases between *P. heveae*-like isolates, up to 2 bases between *P. castaneae*-like isolates, and no variability among isolates of other species). The three plant species used as bait leaves enabled us to retrieve very similar *Phytophthora* assemblages, with one exception - *P. sp. cuyabensis*, the least frequent species, was not recovered from Cassava leaves.

Six *P. cinnamomi* isolates were selected randomly among the 23 retrieved produced oospores after crossing with *P. cinnamomi* mating type A1, and none after crossing with mating type A2, suggesting that their mating type corresponded to A2.

Phylogenetic analysis of isolates

Figure 3 shows the phylogenetic tree built from the three nuclear markers (ITS, *RAS-Ypt*, Enolase), either sequenced from the studied set of clade-5 isolates or retrieved from GenBank. The isolates retrieved from our study clustered into four separate groups. Two of them were close to *P. heveae*, and the two others were phylogenetically close to *P. castaneae*. Bayesian inference of these *Phytophthora* strains from nuclear data revealed that distance between respectively the two *P. heveae*-like groups and the two *P. castaneae*-like groups from French Guiana were equal or greater than between reference isolates from different species of clade-5: *P. castaneae*, *P. cocois*, *P. agathidicida* and *P. heveae* (Fig. 3). Thus, these clade-5 isolates of *Phytophthora* could potentially belong to new species and were treated as such for the rest of this study. These four *Phytophthora* groups from clade-5 could be separated based on the ITS sequence alone, although the Enolase sequence was more discriminant. This enabled us to attribute each of the 304 *P. heveae*-like and 24 *P. castaneae*-like isolates retrieved from the baiting/isolation method to one of the 4 groups. On the other hand, for mitochondrial markers, all 15 isolates from clade-5 clustered with the reference *P. heveae* (Fig. S1); the mitochondrial phylogeny of the clade-5 isolates was thus not congruent with their nuclear phylogeny. While the two *P. heveae*-like groups could still be separated based on their mitochondrial markers, the two *P. castaneae*-like groups were merged with one of the *P. heveae*-like group.

The four *P. cinnamomi* isolates studied did not exhibit polymorphism for any of the studied markers.

Metabarcoding approach and comparison with baiting/isolation

The mean read number per sample was 618 ± 244 for direct metabarcoding from soil samples, and 805 ± 146 for leaf samples. The samples covering less than 72 reads were discarded. Indeed, a minimum depth of 72 reads was the compromise that allowed keeping most soil samples, while still describing all species of *Phytophthora* retrieved in the communities. Consequently, 52 soil sample libraries and 223 bait leaves libraries were used in the analysis. Both sets of data gave a mean proportion of 1% non-*Phytophthora* reads. *Phytophthora* reads from these samples were clustered in OTUs with a 99% similarity threshold, corresponding to five *Phytophthora* species only (Table 1). The R2 read length was around 400 nucleotides long in the metabarcoding libraries, while the Sanger ITS sequences previously discussed were c. 800 nucleotides long. As a consequence, ITS polymorphism of these shorter ITS fragments did not allow separation of the two *P. castaneae*-like groups, nor the two *P. heveae*-like groups, as could be done with the baiting/isolation results. Among the species retrieved, the *P. heveae* complex (*P. heveae* and/or the *P. heveae*-like groups) was present in every single sample and represented an average of 97% of the *Phytophthora* reads. Other detected species were *P. cinnamomi*, the *P. castaneae* complex, *Phytophthora. sp. neb_1543* and a new putative species from clade 10, *Phytophthora sp. nov 10*.

The species assemblage obtained with the metabarcoding method differed from the one retrieved with baiting/isolation methods by one species only found by metabarcoding (*Phytophthora sp. nov 10*) and by one species only found by baiting/isolation (*P. sp. cuyabensis*). As a result, there was a significant difference in the qualitative composition of communities retrieved with each of the three methods previously described ($p=0.001$), with the baiting / isolation method showing a lower frequency of the *P. heveae* complex and an increase in the rare species frequency (Table 1). There was no significant difference in the recovered *Phytophthora* assemblage between the bait leaf species (*Rhododendron*, Cassava, Avocado) ($p=0.9$).

Community structure analysis

The average number of species per plot was 1.4, with a dominance of the *P. heveae* complex as mentioned above. Taking into account the four new putative clade-5 species in the analysis of the *Phytophthora* communities described by the baiting and isolation method, we showed a strong location

(CSG vs Laussat) effect ($p=0.001$). Furthermore, a significant effect of forest environment (TF, SF and WS) ($p=0.017$) was also detected (Fig. 4). The mean Shannon diversity index was higher in CSG than in Laussat (0.52 vs 0.17) and was higher in SF and TF environments compared to WS (0.47 for both SF and TF vs 0.20 in WS). A significant effect of host plant family was detected ($p=0.004$), with an interaction between the family and the location ($p=0.029$). However, at higher clade levels, no effect was detected between Asterids, Rosids and Magnoliids ($p=0.166$). The Shannon index showed important variation between plant taxonomic families, with a maximum at 0.65 for the family *Lecythidaceae* and the minimum at 0.14 for the family *Rubiaceae* (Fig. 4).

To combine baiting/isolation results with metabarcoding results, we had to merge the two *P. heveae*-like species as well as the two *P. castaneae*-like species, as they could not be distinguished in the metabarcoding data. Combining the two approaches, no environment type effect was detected ($p=0.165$). An effect of the host trees taxonomy was still detected at the family level ($p=0.017$), with an interaction with the method used ($p=0.014$) (Fig. 5). A significant location effect between CSG and Laussat was detected with all methods ($p=0.001$), with a strong interaction with the method used ($p=0.002$).

DISCUSSION

Although the observed *Phytophthora* community structure depended on the approaches used, our results validated the benefits of HTS for large-scale surveys. Both HTS and baiting approaches uncovered a surprisingly low diversity of *Phytophthora* in the soils of these two French Guiana locations, with only six species retrieved and a strong dominance of the *P. heveae* complex in all samples. Moreover, no host specialist *Phytophthora* species were identified. Despite this low diversity, the communities were to some degree structured by the plant hosts with a significant family effect, suggesting a certain degree of host preference.

Comparison between baiting/isolation and metabarcoding

Similar patterns were uncovered by the three approaches used in our study, the three most abundant species being retrieved with every method, and species of the *P. heveae* complex being largely

dominant. However, the use of bait leaves followed by isolation increased the proportion of rare species compared to simple metabarcoding from soil or bait leaves. The isolate morphological observations in the initial step of the baiting/isolation method probably biased the selection toward rare species. Indeed, baiting could have the advantage to investigate communities from larger soil samples (200 ml versus about 0.5 ml). However, it did not enable us to detect additional diversity; rather, it proved to be a time-consuming additional step with little use in the metabarcoding approach. Our results therefore contrast with previous work in which metabarcoding methods were more efficient to describe *Phytophthora* community structure [7, 9, 32, 59]. The suitability of the baiting/isolation method appears to depend largely on the *Phytophthora* community sampled, on sampling conditions, and on environmental factors. Indeed, baiting can be dependent on time of sampling, quantity and type of inoculum in the soil, as well as soil parameters and origins. Timing of the sampling might for example explain the difference in *Phytophthora* recovery between the two sites we studied, which were sampled almost two months apart. One shortcoming of the metabarcoding method in this study is its inability to discriminate between the two putative *P. heveae*-like species in addition to the two putative *P. castaneae*-like species, because of the shorter length of the ITS fragment used. The baiting method does enable the obtention of living cultures for further characterisation; nevertheless, the less time-consuming metabarcoding from soil DNA was sufficient to obtain the bulk of the results in our study.

Diversity of French Guiana communities of *Phytophthora*

The number of putative *Phytophthora* species observed in these French Guiana soils is lower than what is found in other forest ecosystems, although we sampled at the basis of plant species from 10 different families representing the breadth of Angiosperm diversity and across three very different environments. This result is surprising in one of the major biodiversity hotspots of the world and given the tendency of other organisms, including every studied fungal guild, to increase in diversity at lower latitudes [52, 63]. Surveys in temperate, Mediterranean and tropical forests of several world regions have revealed a diversity of *Phytophthora* typically made of 4-10 species per sampling location [5, 7, 8, 10, 27, 39, 43, 46, 51]. As an example, Burgess et al. [8] found a mean of 5 species per sampling location in a wide survey across Australia.

The low *Phytophthora* diversity we observed in French Guiana could be explained by several factors. First, we investigated two sites both located in the Guyana coastal range under similar climatic conditions of moist seasonal forests. Wallace [61] found a wider diversity of *Phytophthora* in Neotropical forests by investigating locations of differing hygrometry and altitude (plain rainforests vs. mountain cloud forests). In the same study, the author suggests that a greater diversity can be found in water streams. Also, in our study, we investigated soil adjacent to non-symptomatic juvenile trees irrespective of their proximity to conspecific adult trees, and host-specific *Phytophthora* species might not have accumulated on them if they were not adjacent to conspecific adults. Finally, even coastal forests in French Guiana receive much less exposure to human disturbance than many other tropical and temperate forests. Many common *Phytophthora* species have been shown to be invasive and spread through worldwide trade [28, 45], and anthropization level and history of trading could be decisive factors for predicting *Phytophthora* diversity. Indeed, *Phytophthora* diversity has been linked to the degree of anthropization [14, 43], with the average number of *Phytophthora* species by location reaching nine in urban environments and only six in natural environments [14]. This calls for more standardized community descriptions in various parts of the world, especially tropical areas, which would allow future meta-analyses of *Phytophthora* diversity and composition.

Strikingly, the three dominant *Phytophthora* groups we observed in French Guiana, *P. heveae*, *P. castaneae* and *P. cinnamomi* are also the dominant *Phytophthora* groups in Hainan and Queensland soils [8, 66]. This suggests a similarity of the *Phytophthora* communities in tropical soils from South Asia to Australia and South America. For *P. heveae* and *P. castaneae*, this similarity could be spurious as we found that they are likely closely related but different species. The low, but recurrent, nucleotide polymorphism of ITS sequences obtained from genotyped strains further suggests a potential species complex. The analysis of additional markers confirms that both putative species are heterogeneous and probably distinct from *P. heveae* and *P. castaneae*. The existence of isolates close but distinct from *P. heveae* and *P. castaneae* have already been reported by Zeng *et al.* [66] in Hainan. Clade 5 has therefore recently been revised [62].

P. cinnamomi is considered invasive in more than 70 countries [17], and the isolates we found showed 100% homology in the 6 tested loci. Furthermore, these isolates all belong to only one mating type,

which does not suggest a native *P. cinnamomi* population [17]. *P. cinnamomi* might therefore be an invasive species in French Guiana. This opens the question whether the similarity of *Phytophthora* communities in the soils of tropical areas is due to cryptic speciation and/or to human-mediated invasions.

Structure of the *Phytophthora* communities

The quantity of *Phytophthora* retrieved on bait leaves showed differences according to forest “environment x host family” interaction, with some families having especially high numbers of lesions on bait leaves in the TF environment. Owing to the large dominance of the *P. heveae* complex, this result probably refers mostly to *P. heveae*-like species. The fact that Oomycete mycelial growth is severely impaired in sandy soils compared to loamy soils [35] coupled with studies showing that many *Phytophthora* do not develop well in low pH soils [27] could explain the low quantity in white sand soils for most families. However, it is more surprising that seasonally flooded soils were not more favourable, as high hygrometry is generally favourable to the multiplication of *Phytophthora* species [17], especially since higher *Phytophthora* diversity was observed in this environment. The sampling season is probably crucial: the soils were sampled in the two studied locations during very wet periods and thus the situation was very favourable also in TF environment. Still, all sampling was achieved in a relatively short timeframe in each location, rendering unlikely any bias between environments induced by the climatic conditions under which samples were collected.

A host plant effect at the family level clearly shaped the composition of *Phytophthora* community. However, no *Phytophthora* species were confined to specific families, providing little evidence for host specialization in this forest. Instead, *Phytophthora* species displayed host preference rather than strict specificity. As illustrated by several studies [3, 15, 22, 47, 53], fungal communities may be influenced at different taxonomic levels of hosts. However, host taxonomic family effect has been shown to exist for two different fungal ecological groups: tropical epiphytic fungi [31] and temperate ectomycorrhizal fungi [54]. Moreover, foliar plant pathogens do exhibit a phylogenetic signal in Neotropical forests [19]. However, because *Phytophthora* inoculum (motile zoospores) is known to be disseminated by stream and run-off from ground surfaces, sudden and heavy rainfall in tropical climate may be favourable to a

rapid dissemination within both sites studied, therefore homogenising *Phytophthora* inoculum throughout the plot and blurring host taxonomy effects. Studying fine roots communities, instead of soil communities, could be an alternative method to detect host-specific *Phytophthora* species. Indeed, Khaliq *et al.* [32] retrieved 25 different *Phytophthora* species on fine roots in urban parks environment, compared to nearly half that (13) in soil.

The community we studied is dominated by large host spectrum species such as *P. heveae*-like, *P. cinnamomi* and *P. castaneae*-like. Although initially described in rubber tree plantation in south east Asia, *P. heveae* is mainly a known pathogen of fruits of avocado and cocoa [38, 58] while *P. castaneae* has been described as infecting chestnut trees [29]. However, in natural environments, they are mostly described as present in soils without causing symptoms to neighbouring trees [26; 33; 66]. The fact that generalists dominate fungal communities in Neotropical forests has already been described [18; 47]. Specialists could be represented by the rare species.

Phytophthora does not appear to be a promising agent of negative density dependence and Janzen-Connell effects in these French Guianan forests. This might be the limit of studying only one group of plant pathogens. Other groups of plant pathogens, such as fungi, may play the prominent role in these forests. We suggest that a general survey of plant pathogens across phyla and in different Neo-tropical forests, would represent an ambitious initiative but with commensurate worth.

ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge E. Morin for her assistance in bioinformatics advices and A. Gillet for her technical support. JL holds a PhD fellowship awarded by the “Agence Nationale de la Recherche” (ANR) as part of the ANR Blanc program NEBEDIV to CB, MB and HS (ANR-13-BSV7-0009) and the “Institut National de la Recherche Agronomique” (Metaprogramme MEM). UMR IAM and this work were also supported by a grant overseen by the French National Research Agency as part of the "Investissements d’Avenir" program (ANR-11-LABX-0002-01, Lab of Excellence ARBRE). The UMR EcoFoG is supported by the French National Research Agency as part of the “Investissements d’Avenir” program (Lab of Excellence CEBA, ref. ANR10LABX2501).

REFERENCES

1. Alexander HM (2010) Disease in Natural Plant Populations, Communities, and Ecosystems: Insights into Ecological and Evolutionary Processes. *Plant Disease* 94:492–503. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-5-0492>
2. Antonelli A, Sanmartin I (2011) Why are there so many plant species in the Neotropics? *Taxon* 60:403–414. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00130>
3. Arnold AE, Lutzoni F (2007) Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecology* 88:541–549. <https://doi.org/10.1890/05-1459>
4. Bagchi R, Gallery RE, Gripenberg S, et al (2014) Pathogens and insect herbivores drive rainforest plant diversity and composition. *Nature* 506:85–88. <https://doi.org/10.1038/nature12911>
5. Balci Y, Balci S, Eggers J, et al (2007) *Phytophthora* spp. Associated with Forest Soils in Eastern and North-Central U.S. Oak Ecosystems. *Plant Disease* 91:705–710. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-6-0705>
6. Bever JD, Mangan SA, Alexander HM (2015) Maintenance of Plant Species Diversity by Pathogens. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 46:305–325. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-112414-054306>
7. Bose T, Wingfield MJ, Roux J, Vivas M, Burgess TI (2018) Community composition and distribution of *Phytophthora* species across adjacent native and non-native forests of South Africa. *Fungal Ecology* 36: 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2018.09.001>
8. Burgess TI, White D, McDougall KM, et al (2017) Distribution and diversity of *Phytophthora* across Australia. *Pacific Conservation Biology* 23:150. <https://doi.org/10.1071/PC16032>
9. Català S (2017) Development of DNA massive sequencing techniques and RealTime PCR for the detection, identification and quantitation of *Phytophthora* spp. in environmental samples. PhD Thesis, Universitat Politècnica de València. <https://doi.org/10.4995/Thesis/10251/90644>
10. Català S, Berbegal M, Pérez-Sierra A, Abad-Campos P (2017) Metabarcoding and development of new real-time specific assays reveal *Phytophthora* species diversity in holm oak forests in eastern Spain. *Plant Pathology* 66:115–123. <https://doi.org/10.1111/ppa.12541>
11. Català S, Pérez-Sierra A, Abad-Campos P (2015) The Use of Genus-Specific Amplicon

- Pyrosequencing to Assess *Phytophthora* Species Diversity Using eDNA from Soil and Water in Northern Spain. PLOS ONE 10:e0119311. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119311>
12. Counce A, Caël O, Bach C, et al (2013) Below-ground fine-scale distribution and soil versus fine root detection of fungal and soil oomycete communities in a French beech forest. Fungal Ecology 6:223–235. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2013.01.002>
 13. Cooke DEL, Drenth A, Duncan JM, et al (2000) A Molecular Phylogeny of *Phytophthora* and Related Oomycetes. Fungal Genetics and Biology 30:17–32. <https://doi.org/10.1006/fgbi.2000.1202>
 14. Dale A (2018) Using genomic data to understand anthropogenic influences on Oomycete and *Phytophthora* communities, and the evolution of an alien invasive species responsible for sudden oak death, *Phytophthora ramorum*. PhD Thesis, University of British Columbia. <https://doi.org/10.14288/1.0365770>
 15. Dickie IA (2007) Host preference, niches and fungal diversity. New Phytologist 174:230–233. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02055.x>
 16. Edgar RC (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. Bioinformatics 26, 2460–2461. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461>
 17. Erwin DC, Ribeiro OK (1996) *Phytophthora* Diseases Worldwide. American Phytopathological Society Press, St Paul, MN, pp 269–280. ISBN: 978-0-89054-212-5
 18. Ferrer A, Gilbert GS (2003) Effect of tree host species on fungal community composition in a tropical rain forest in Panama: Fungal community composition in Panama. Diversity and Distributions 9:455–468. <https://doi.org/10.1046/j.1472-4642.2003.00039.x>

19. Gilbert GS, Webb CO (2007) Phylogenetic signal in plant pathogen-host range. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104:4979–4983. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607968104>
20. Gouy M, Guindon S, Gascuel O (2010) SeaView Version 4: A Multiplatform Graphical User Interface for Sequence Alignment and Phylogenetic Tree Building. *Molecular Biology and Evolution* 27:221–224. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp259>
21. Hansen EM (2015) *Phytophthora* Species Emerging as Pathogens of Forest Trees. *Current Forestry Reports* 1:16–24. <https://doi.org/10.1007/s40725-015-0007-7>
22. Ishida TA, Nara K, Hogetsu T (2007) Host effects on ectomycorrhizal fungal communities: insight from eight host species in mixed conifer-broadleaf forests. *New Phytologist* 174:430–440. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02016.x>
23. Jablonski D, Roy K, Valentine JW (2006) Out of the Tropics: Evolutionary Dynamics of the Latitudinal Diversity Gradient. *Science* 314:102–106. <https://doi.org/10.1126/science.1130880>
24. Janzen DH (1970) Herbivores and the Number of Tree Species in Tropical Forests. *The American Naturalist* 104:501–528. <https://doi.org/10.1086/282687>
25. John R, Dalling JW, Harms KE, et al (2007) Soil nutrients influence spatial distributions of tropical tree species. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104:864–869. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604666104>
26. Jung T, Chan, TT, Bakonyi J, Seres, D, Pérez-Sierra A, Yang X, Hong C, Scanu B, Fu CH, Hsueh KL, Maia C, Abad-Campos P, Léon M, Horta-Jung M, 2017. Diversity of *Phytophthora* species in natural ecosystems of Taiwan and association with disease symptoms. *Plant Pathology* 66, 194– 211. <https://doi.org/10.1111/ppa.12564>
27. Jung T, Blaschke H, Osswald W (2000) Involvement of soilborne *Phytophthora* species in Central European oak decline and the effect of site factors on the disease. *Plant Pathology* 49:706–718. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2000.00521.x>
28. Jung T, Orlikowski L, Henricot B, et al (2016) Widespread *Phytophthora* infestations in European nurseries put forest, semi-natural and horticultural ecosystems at high risk of *Phytophthora* diseases. *Forest Pathology* 46:134–163. <https://doi.org/10.1111/efp.12239>
29. Katsura K (1976) Two new species of *Phytophthora* causing damping-off of cucumber and trunk

rot of chestnut. Transaction of Mycological Society of Japan 17 :238-242

30. Keesing F, Belden LK, Daszak P, et al (2010) Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. Nature 468:647–652. <https://doi.org/10.1038/nature09575>
31. Kembel SW, Mueller RC (2014) Plant traits and taxonomy drive host associations in tropical phyllosphere fungal communities. Botany 92:303–311. <https://doi.org/10.1139/cjb-2013-0194>
32. Khaliq, I., Hardy, G.E.S.J., White, D., Burgess, T.I., 2018. eDNA from roots: a robust tool for determining *Phytophthora* communities in natural ecosystems. FEMS Microbiology Ecology 94. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy048>
33. Ko W-H, Wang SY, Ann PJ (2006) The possible origin and relation of *Phytophthora katsurae* and *P. heveae*, discovered in a protected natural forest in Taiwan. Botanical Studies 47:5
34. Legeay J, Husson C, Cordier T, Vacher C, Marcais B, Buée M (2019) Comparison and validation of Oomycetes metabarcoding primers for *Phytophthora* high throughput sequencing. Journal of Plant Pathology <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00276-9>
35. Lumsden RD (1981) A Nylon Fabric Technique for Studying the Ecology of *Pythium aphanidermatum* and Other Fungi in Soil. Phytopathology 71:282. <https://doi.org/10.1094/Phyto-71-282>
36. Mangan SA, Schnitzer SA, Herre EA, Mack KM, Valencia MC, Sanchez EI, Bever JD (2010) Negative plant–soil feedback predicts tree-species relative abundance in a tropical forest. Nature, 466: 752. <https://doi.org/10.1038/nature09273>
- Mills KE, Bever JD (1998) Maintenance of diversity within plant communities: soil pathogens as agents of negative feedback. Ecology 79:1595–1601. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(1998\)079\[1595:MODWPC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(1998)079[1595:MODWPC]2.0.CO;2)

38. Ochoa-Ascensio S, (2011) *Phytophthora heveae* causing basal rot of avocado fruit in Mexico, Proceedings VII World Avocado Congress 2011 (Actas VII Congreso Mundial del Aguacate 2011). Cairns, Australia. 5 – 9 September 2011
39. Oh E, Gryzenhout M, Wingfield BD, et al (2013) Surveys of soil and water reveal a goldmine of *Phytophthora* diversity in South African natural ecosystems. IMA Fungus 4:123–131. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2013.04.01.12>
40. Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, Minchin P R, O'hara R B, Wagner H (2016) vegan: community ecology package. R package version 2.0–7. 2013. URL <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>.
41. Philipson CD, Saner P, Marthews TR, et al (2012) Light-based Regeneration Niches: Evidence from 21 Dipterocarp Species using Size-specific RGRs. Biotropica 44:627–636. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.2011.00833.x>
42. Randall WM. A comparison of the forest soils in the Peruvian Amazon: Terra firme, palm, white sand and igap. J Soil Sci Environ Manage. 31 août 2017;8(7):130-4.
43. Redondo MA, Boberg J, Stenlid J, Oliva J (2018) Functional traits associated with the establishment of introduced *Phytophthora spp.* in Swedish forests. Journal of Applied Ecology 55:1538–1552. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13068>
44. Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, et al (2012) MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice across a Large Model Space. Systematic Biology 61:539–542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
45. Santini A, Ghelardini L, De Pace C, Desprez-Loustau M-L, Capretti P, Chandelier A, Cech T, Chira D, Diamandis S, Gaitniekis T, Hantula J, Holdenrieder O, Jankovsky L, Jung T, Jurc D, Kirisits T, Kunca A, Lygis V, Malecka M, Marcais B, Schmitz S, Schumacher J, Solheim H, Solla A, Szabò, I., Tsopelas, P., Vannini, A., Vettraino, A- M., Webber, J., Woodward, S., Stenlid J (2013) Biogeographical patterns and determinants of invasion by forest pathogens in Europe. New Phytologist 197:238–250
46. Scanu B, Linaldeddu BT, Deidda A, Jung T (2015) Diversity of *Phytophthora* Species from Declining Mediterranean Maquis Vegetation, including Two New Species, *Phytophthora crassamura* and *P. ornamentata* sp. nov. PLoS ONE 10, e0143234.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143234>

47. Schimann H, Bach C, Lengelle J, et al (2017) Diversity and Structure of Fungal Communities in Neotropical Rainforest Soils: The Effect of Host Recurrence. *Microbial Ecology* 73:310–320. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0839-0>
48. Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, Van Horn DJ, Weber CF (2009) Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 7537–7541. <https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09>
49. Schupp EW (1992) The Janzen-Connell Model for Tropical Tree Diversity: Population Implications and the Importance of Spatial Scale. *The American Naturalist* 140:526–530. <https://doi.org/10.1086/285426>
50. Shokralla S, Spall JL, Gibson JF, Hajibabaei M (2012) Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Molecular Ecology* 21:1794–1805. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05538.x>
51. Sims LL, Sutton W, Reeser P, Hansen EM (2015) The *Phytophthora* species assemblage and diversity in riparian alder ecosystems of western Oregon, USA. *Mycologia* 107:889–902. <https://doi.org/10.3852/14-255>
52. Tedersoo L, Bahram M, Polme S, et al (2014) Global diversity and geography of soil fungi. *Science* 346:1256688–1256688. <https://doi.org/10.1126/science.1256688>

53. Tedersoo L, Jairus T, Horton BM, et al (2008) Strong host preference of ectomycorrhizal fungi in a Tasmanian wet sclerophyll forest as revealed by DNA barcoding and taxon-specific primers. *New Phytologist* 180:479–490. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02561.x>
54. Tedersoo L, Mett M, Ishida TA, Bahram M (2013) Phylogenetic relationships among host plants explain differences in fungal species richness and community composition in ectomycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* 199:822–831. <https://doi.org/10.1111/nph.12328>
55. Ter Steege H, Pitman NCA, Sabatier D, et al (2013) Hyperdominance in the Amazonian Tree Flora. *Science* 342:1243092–1243092. <https://doi.org/10.1126/science.1243092>
56. Terborgh J (2012) Enemies Maintain Hyperdiverse Tropical Forests. *The American Naturalist* 179:303–314. <https://doi.org/10.1086/664183>
57. Tsao PH, Ocaña G (1969) Selective Isolation of Species of *Phytophthora* from Natural Soils on an Improved Antibiotic Medium. *Nature* 223:636–638. <https://doi.org/10.1038/223636a0>
58. Turner PD. (1968). Pod rot of cocoa in Malaysia caused by *Phytophthora heveae*. *FAO Plant Protection Bulletin* 16: 33-34.
59. Vannini A, Bruni N, Tomassini A, et al (2013) Pyrosequencing of environmental soil samples reveals biodiversity of the *Phytophthora* resident community in chestnut forests. *FEMS Microbiology Ecology* 85:433–442. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12132>
60. Vettrai AM, Bonants P, Tomassini A, et al (2012) Pyrosequencing as a tool for the detection of *Phytophthora* species: error rate and risk of false Molecular Operational Taxonomic Units. *Letters in Applied Microbiology* 55:390–396. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2012.03310.x>
61. Wallace SF (2015) Diversity of *Phytophthora* Species in Costa Rica’s Tropical Forest. PhD Thesis, Digital Repository at the University of Maryland. <https://doi.org/10.13016/m2fw79>
62. Weir BS, Paderes EP, Anand N, et al (2015) A taxonomic revision of *Phytophthora* Clade 5 including two new species, *Phytophthora agathidicida* and *P. cocois*. *Phytotaxa* 205:21. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.205.1.2>
63. Willig MR, Kaufman DM, Stevens RD (2003) Latitudinal Gradients of Biodiversity: Pattern, Process, Scale, and Synthesis. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 34:273–309. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.34.012103.144032>

64. Wright JS (2002) Plant diversity in tropical forests: a review of mechanisms of species coexistence. *Oecologia* 130:1–14. <https://doi.org/10.1007/s004420100809>
65. Yang, X., Tyler, B.M., Hong, C., 2017. An expanded phylogeny for the genus *Phytophthora*. *IMA Fungus* 8, 355–384. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2017.08.02.09>
66. Zeng H, Ho H, Zheng F-C (2009) A Survey of *Phytophthora* Species on Hainan Island of South China. *Journal of Phytopathology* 157:33–39. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2008.01441.x>
67. Zentmyer GA (1979). Stimulation of sexual reproduction in the A2 mating type of *Phytophthora cinnamomi* by a substance in avocado roots. *Phytopathology*, 69: 1129-1131. Doi.00031-949X/79/000201\$03.00/0

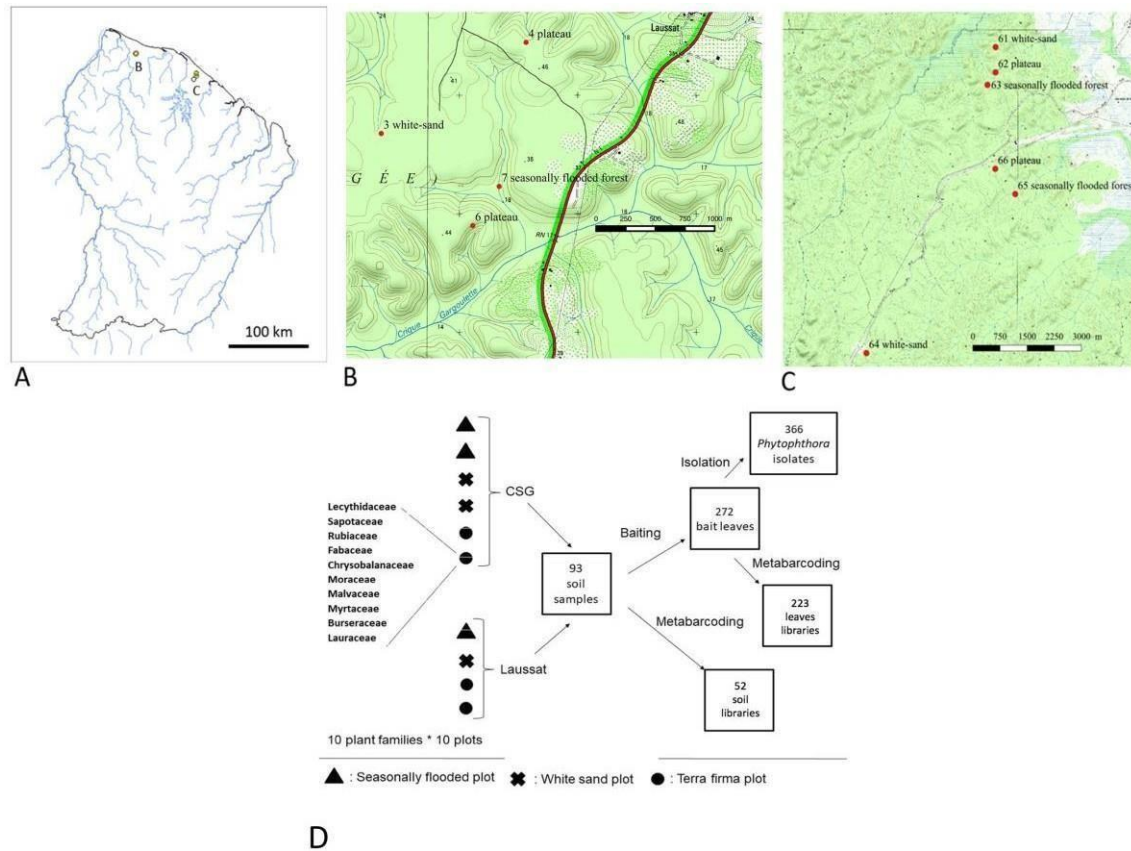


Fig. 1. Sampling sites and design of the experiment. A : Map of French Guiana showing the locations sampled for this study. B=Laussat ; C=CSG. B, C : Map of Laussat (B) and CSG (C) showing the sampled plots as red dots. Plateau = Terra firma environment. D: Experiment design with the number of samples at each step, from the sampling to the metabarcoding or isolation. Among 100 potential “tree families x plots” combinations, 93 individuals were sampled because some plant families could not be found in all plots.

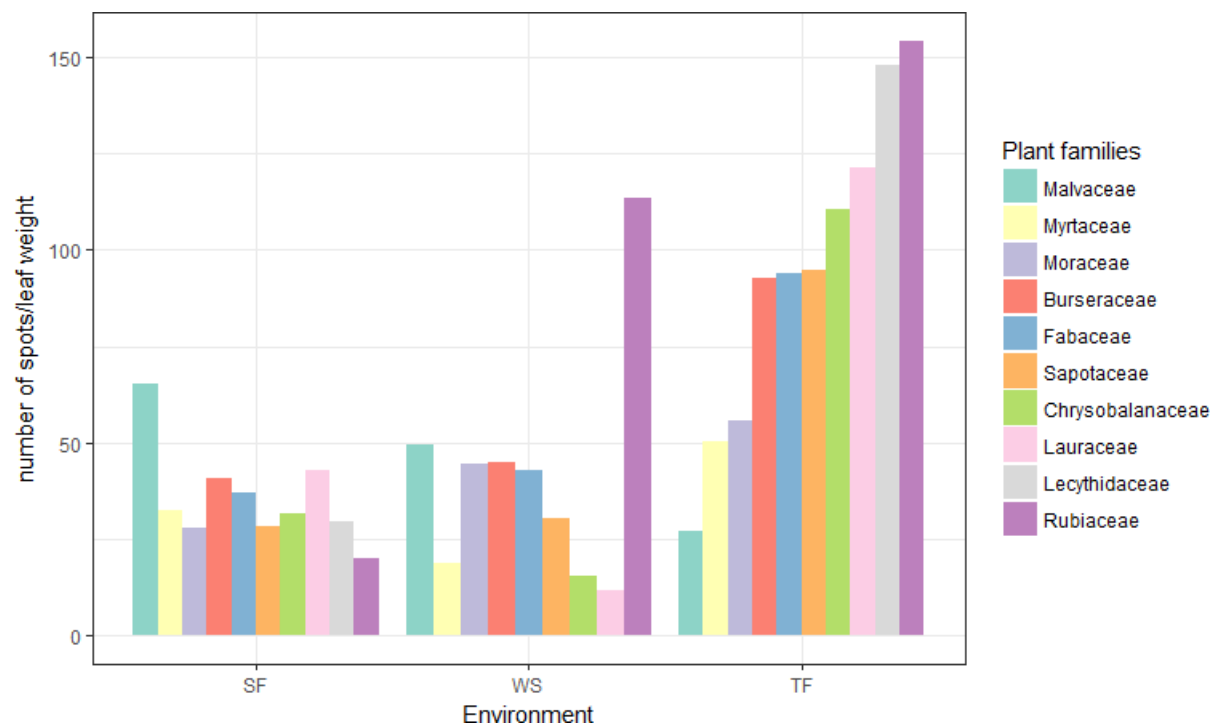


Fig. 2. Number of *Phytophthora* infection spots on *Rhododendron* leaves per leaf weight. Forest environments: TF (terra firma), SF (seasonally flooded), WS (white sand).

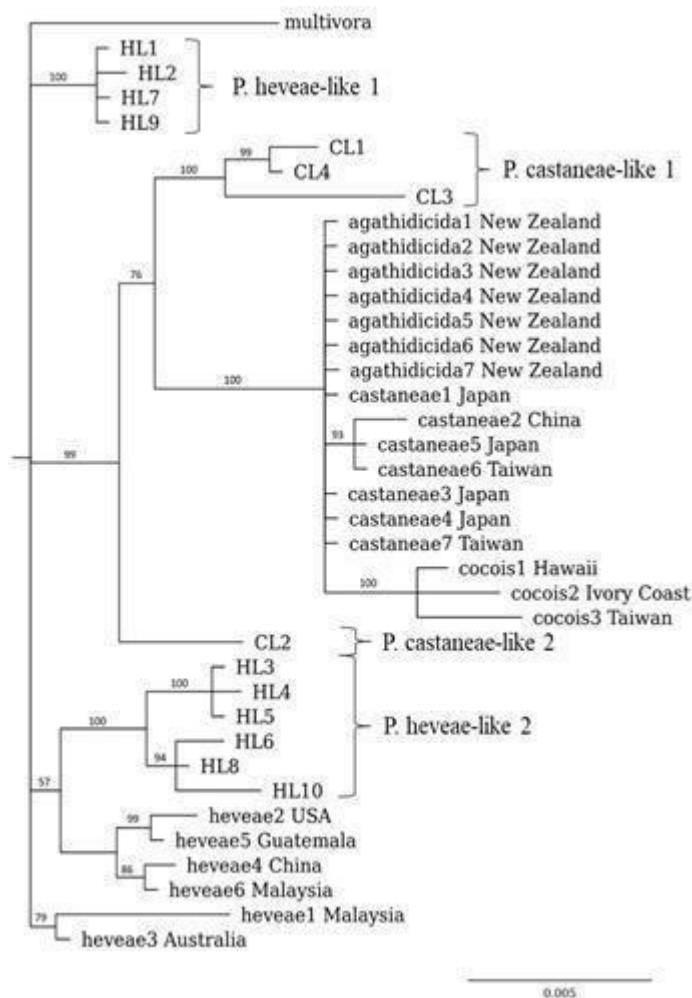


Fig. 3. Bayesian inference phylogenetic trees of 14 *P. castaneae*-like and *P. heveae*-like isolates created by concatenation of nuclear genetic markers (ITS, RAS-Ypt, Enolase). Reference isolates taken from NCBI are designated by their accession numbers and origins in Table S1. Isolates from this study are designated by either HL (*P. heveae*-like) or CL (*P. castaneae*-like). Monophyletic groups of isolates were clustered as groups which were used for further analysis.

A

		Shannon diversity index	<i>P. heveae-like 1</i>	<i>P. heveae-like 2</i>	<i>P. castaneae-like 1</i>	<i>P. castaneae-like 2</i>	<i>P. cinnamomi</i>	<i>P. sp.neb1843</i>	<i>P. sp.cuyabensis</i>	
Asterids	Lecythidaceae	0.50	57	29			43		14	
	Sapotaceae	0.33	70	20	10		20	10		
	Rubiaceae	0.12	44	22		33			11	
	Fabaceae	0.42	90	30		20	20			
Rosids	Chrysobalanaceae	0.36	80	30		10	10			
	Moraceae	0.42	44	44		11	22	11		
	Malvaceae	0.23	88	44	12	12				
	Myrtaceae	0.57	60	40		30	20			
	Burseraceae	0.40	50	50		10	10			
Magnoliids	Lauraceae	0.28	50	50			10			

B

	Number of plots	Shannon diversity index	<i>P. heveae-like 1</i>	<i>P. heveae-like 2</i>	<i>P. castaneae-like 1</i>	<i>P. castaneae-like 2</i>	<i>P. cinnamomi</i>	<i>P. sp.neb1843</i>	<i>P. sp.cuyabensis</i>
Laussat/TF	2	0.10	47	21		11			
Laussat/SF	1	0.38	30	10		50		20	
Laussat/WS	1	0	33	11					
CSG/TF	2	0.63	79	79		16	42		
CSG/SF	2	0.43	95	21	11	5	37		11
CSG/WS	2	0.22	65	35		6			

Fig. 4. Proportion (%) of samples in which each of the *Phytophthora* taxa was retrieved by the baiting / isolation method, for (A) the ten sampled plant families and (B) the three environment types at both locations. One sample can contain several *Phytophthora* taxa. A: A significant difference was detected between families ($p=0.004$) but not between higher clades ($p= 0.166$). B: There was a significant difference between the two locations Laussat and CSG ($p= 0.001$) and between environment types ($p= 0.017$). TF=Terra firma. SF=seasonally flooded. WS = white sand.

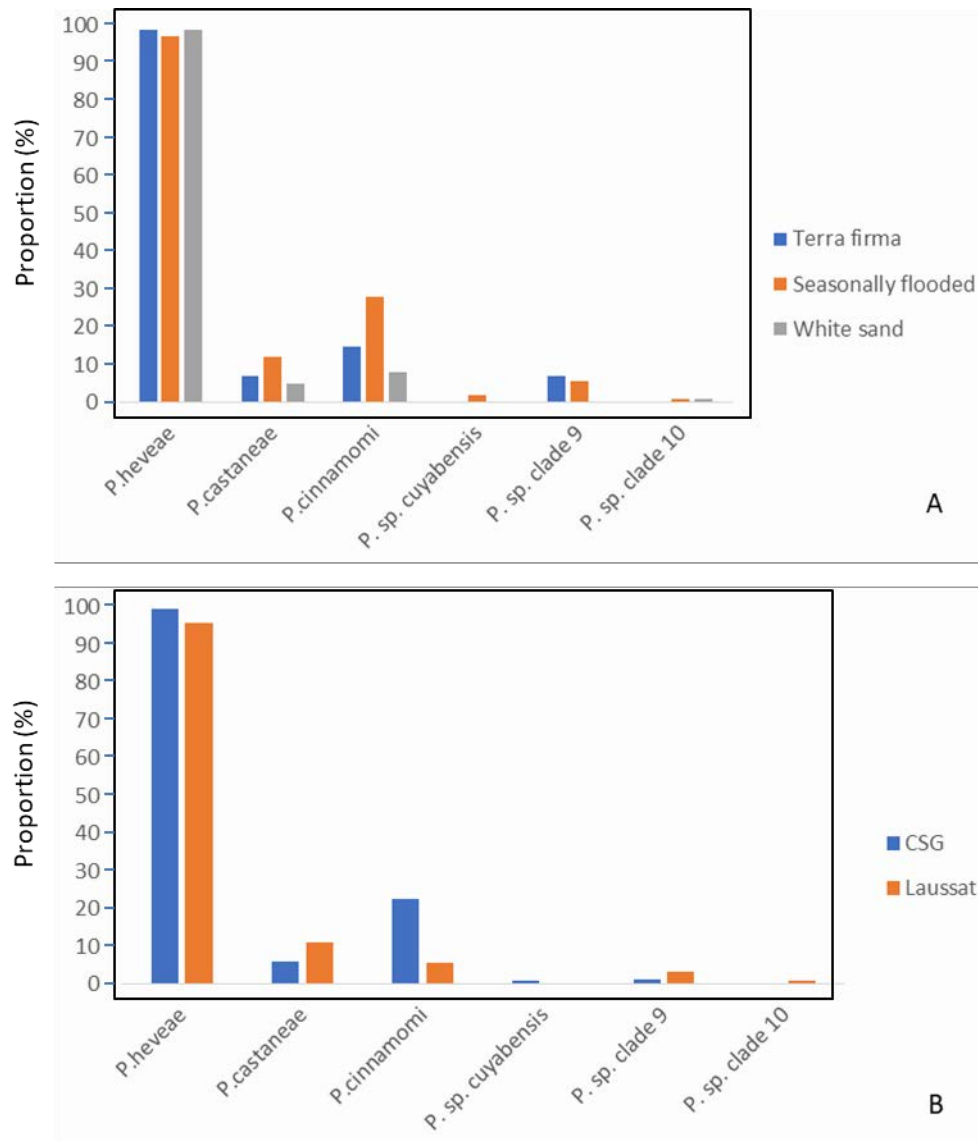


Fig. 5. Proportion of samples containing the observed species of *Phytophthora*, grouped by environment type (A) and location (B). A: Significant difference between the different environment types was detected ($p=0.003$), with seasonally flooded soils containing more rare species. B: Significant difference between the two locations was detected ($p=0.001$).

CHAPITRE 3

Low host specificities of Oomycete and fungal
plant pathogen communities in a French Guiana
forest

(Article en préparation)

En forêt naturelle néotropicale, la diversité et l'hétérogénéité spatiale des communautés d'arbres rendent extrêmement difficile la possibilité d'associer un échantillon de sol à un couvert végétal spécifique. Afin d'éviter les éventuels phénomènes d'enchevêtrements racinaires qui conduiraient à une dilution de l'effet de l'hôte, nous avons étudié par metabarcoding ciblé sur la région ITS1 les communautés de *Phytophthora* dans une plantation comprenant six blocs d'arbres monospécifiques. Nous avons également étudié d'autres agents pathogènes potentiels des plantules, à savoir les Péronosporomycètes (groupe comprenant la plupart des Oomycètes phytopathogènes dont les *Phytophthora*) et les champignons phytopathogènes. Pour ces deux derniers groupes, nous avons également étudié par metabarcoding leurs communautés dans une forêt naturelle voisine de la plantation, la parcelle P16, sous des arbres d'espèces identiques à celles de la plantation.

Ces deux sites (P16 et plantation) se trouvaient dans la forêt de Paracou en Guyane Française. Les espèces étudiées dans la plantation sont *Hymenaea courbaril*, *Simarouba amara*, *Carapa surinamensis*, *Goupia glabra*, *Platonia insignis*, et *Vochysia tomentosa*. Seules ces quatre dernières espèces ont été retrouvées dans la parcelle P16. Nous avons observé à la fois, pour chaque arbre échantillonné, trois échantillons de litière et trois de sol, la litière pouvant éventuellement constituer une niche d'hébergement temporaire pour les agents pathogènes foliaires. Les ADN environnementaux utilisés pour le metabarcoding provenaient d'une étude précédente de Schimann *et al.* (2015), portant sur les Eumycètes. Pour les *Phytophthora* et les Péronosporomycètes, un barcode spécifique ont donc été amplifiés à partir de ces extraits d'ADN à l'aide des amorces PCR validées dans le chapitre 1. Les résultats sur les Eumycètes de Schimann *et al.* (2015) ont également été traités *in silico* à l'aide d'une base de données (FunGuild) pour ne sélectionner que les espèces documentées comme pathogènes.

La différence de composition en espèces entre communautés du sol et de la litière était bien plus marquée au sein des champignons que chez les Oomycètes. Ceci pourrait être lié à la plus grande mobilité des spores d'Oomycètes, passant aisément d'un compartiment à l'autre, et/ou à la plus grande proportion de pathogènes foliaires chez les Champignons.

Aucun effet de l'hôte n'a été mis en évidence sur les communautés d'Oomycètes (*Phytophthora* et Péronosporomycètes). Par contre, un effet hôte assez faible a été mis en évidence pour les champignons

pathogènes. Ces résultats viennent appuyer ceux obtenus au chapitre 2, suggérant une faible spécialisation des *Phytophthora*, et pourraient donc s'étendre aux autres Oomycètes ainsi qu'aux champignons phytopathogènes. Toutefois, en ce qui concerne les champignons, il est possible que de nombreuses espèces soient mal documentées dans la base de données utilisée. Il est même probable qu'un grand nombre d'entre elles n'ait jamais été identifié.

Cependant, les études menées dans les chapitres 2 et 3 ne sont que des descriptions de communautés de sol et de litière. Bien qu'un effet hôte faible ou inexistant ait été observé dans la répartition de ces espèces, nous n'avons obtenu que des informations sur leur présence dans le sol, sans pouvoir étudier leur potentiel pouvoir pathogène. Nous avons donc, dans le chapitre 4, réalisé une expérimentation visant à obtenir des symptômes dépendants à la distance sur une espèce d'arbre de Guyane Française, le wacapou.

Low host specificities of Oomycete and fungal plant pathogen communities in a French Guiana forest

Jean Legeay¹, Claude Husson^{1, 2}, Cyrille Bach¹, Eliane Louisanna³, Christopher Baraloto^{3, 4}, Heidy Schimann³, Benoit Marcais¹, Marc Buée¹

¹ Université de Lorraine, Inra, UMR IAM - Interactions Arbres-Microorganismes -, F-54000 Nancy, France

² Ministère de l'agriculture et de l'alimentation, DGAL, SDQPV, Département de la santé des forêts, 75015, Paris, France

³ INRA, UMR EcoFoG - Ecology of Guiana Forests - (AgroParisTech, CNRS, CIRAD, Université des Antilles, Université de Guyane), 97310, Kourou, France

⁴ International Center for Tropical Botany, Department of Biological Sciences, Florida International University, Miami, Florida 33199, USA

Abstract: Fungi and Oomycetes (including *Phytophthora* and *Pythium*) are two major groups of plant pathogens that may play a role in the maintenance of tree diversity in neotropical forests. However, the ecology of these organisms and their links to forest plant communities remain insufficiently explored, especially concerning their host specificity. We collected soil and litter at the vicinity of six tree species at two locations in French Guiana: an experimental plantation consisting of monospecific plots of six trees and a natural forest, where four of the six tree species were found. We characterized Oomycete and fungal plant pathogen diversity in these environmental samples through NGS sequencing, then we studied the effect of the plant host and soil/litter habitat on the community structure. Oomycete and especially Fungal communities were significantly different between soil and litter. The compositions of Oomycetes communities were not significantly impacted by the plant hosts, and fungal pathogens communities were only weakly affected. These results tend to highlight a generalist, unspecialized structuration of pathogens in the soil and litter of these Guianan forests.

Introduction

Neo-tropical forests are considered to be the ecosystem harbouring the greatest plant diversity in the world (Jablonsky 2006), although the mechanisms creating and maintaining this diversity are not currently well-known (Wright, 2002). One of the main hypotheses for the maintenance of tree diversity is the Janzen-Connell hypothesis which relies on the assumption that a seedling survival is proportional to its distance from the parent tree, and inversely proportional to the density of conspecific seedlings, thus lowering the aggregation of tree species and limiting their abundance (Janzen 1970, Schupp 1998). This seedling mortality would be caused by an increase of specific plant enemies (insect herbivores or pathogens) near the parent tree and conspecific seedlings. Such mortality effects have been found to be widespread in many areas of the world, including tropical forests (Comita *et al.* 2014, Bagchi *et al.* 2010).

Most of observed Janzen-Connell type mortalities are caused by mycelial pathogenic organisms, such as stated in studies of Bagchi *et al.* (2010) and Liu *et al.* (2015a), respectively in a Panamanian tropical forest and in a Chinese subtropical forest. Some Dikarya fungi have been found to be involved in Janzen-Connell mortalities, like the Ascomycete *Fusarium oxysporum* on the subtropical tree *Ormosia glaberrima* (Liu *et al.* 2015b). However, as the two Oomycete genus *Pythium* and *Phytophthora* are known to be a major cause of seedling damping off (Cohen & Coffey 1986), they also make up potential agents of Janzen-Connell mechanisms in neo-tropical forests. This is supported by the fact that the application of Oomycete-specific pesticide decreases the distance-dependent mortality of seedlings in an African forest (Hood *et al.* 2004). In temperate climate, Packer & Clay (2000) found that the specific distance-dependant mortality of *Prunus serotina* seedlings was mostly caused by *Pythium*. Studies specifically targeting oomycetes provide two benefits. First, the study of Oomycetes pathogens in tropical forests may be simpler than the study of Dikarya pathogens, as the number of Dikarya species may be up to 14 000 in lowland Amazonia, including many unknown species and genus. In addition, unlike the Dikarya, for whom it is difficult to predict the pathogenic behavior from its taxonomy (Nguyen *et al.* 2015), Oomycetes belonging to the *Phytophthora*, *Pythium*, *Phytopythium* and *Peronospora* genera can be assumed to show some degree of pathogenicity.

However, if Dikarya and/or Oomycetes pathogens are indeed actors of Janzen-Connell mechanisms, they should display at least some degree of effective host specialization, even if they do not have to be strict species-level specialists (Bever *et al.* 2015, Bagchi *et al.* 2014, Benitez *et al.* 2013). Indeed, Gilbert & Webb (2007) found that, while fungal foliar pathogens in the tropics seem to infect multiple hosts, they display a phylogenetic signal in their host preference. Schroeder *et al.* 2018 found only 14 species-level specialists among 1038 fungal OTUs at the vicinity of three neotropical trees of the same family, suggesting a lack of specialization at the species level. Similarly, foliar endophytic fungi do not seem to exhibit strong host specificity in tropical forests (Cannon & Simmons 2002), and their diversity is not positively correlated to that of plants (Tedersoo *et al.* 2014, Suryanarayanan *et al.* 2002). As regards Oomycetes, most studies in tropical forests have focused on the *Phytophthora* diversity without attempting to determine factors governing it. Monospecific stands could allow easier identification of pathogen with strong response to high host density, because in natural forests, pathogens infecting the roots of one species can be wasted in the intermingled roots of a complex tree community (Gilbert *et al.* 1994).

Even if soil borne pathogens are often shown to be involved in Janzen-Connell mechanisms, foliar pathogens can also cause distance-dependent seedling mortality. Indeed, Fukasawa & Seiwa (2017) found that airborne foliar diseases were the main cause of density/distance dependant mortality on the seedlings of two temperate trees : *Cornus controversa* and *Prunus grayana*. In addition, fungal communities from the litter have been shown to differ from those from the soil in a French Guiana tropical forest (Schimann *et al.* 2017). However, Mangan *et al.* (2010) found that foliar pathogens contributed little to the mortality of seedlings growing near six neo-tropical trees in Barro Colorado Island, Panama. Similarly, Spear & Mordecai (2018) found that foliar pathogens are unlikely to cause species coexistence in a Californian grassland, as they infect multiple hosts and do not have an important impact on fitness. Nevertheless, litter may provide a proxy to investigate the foliar pathogens community as it contain infected fallen leaves from the trees and can be further contaminated by rain-washed inoculum from the canopy. Furthermore, the artificial increase of the litter layer, by adding new litter around seedlings of *Nectandra ambigens* in a Mexican tropical rain forest increases pathogen damage on these seedlings (Garcia & Benitez2003).

In the present study, we characterized oomycete and fungal plant pathogens communities associated with six trees species of French Guiana forest. They were sampled in top-soil and litter samples from a natural forest and in monospecific plantations. We used metabarcoding to describe *Phytophthora* and broader Peronosporomycetes communities from these environmental samples, and we abstracted and used plant pathogen fungal species also from metabarcoding data of a previous study (Schimann *et al.* ; 2017). Our aims were (1) to compare oomycete and fungal pathogen communities between the litter and soil in natural forest and tree plantation; and (2) to look for a potential host tree effect on both pathogen groups.

Material and methods

Sites and sampling

The two sites were located at Paracou station in French Guiana (5°18'N, 52°53'W). The first site is an experimental plantation settled by the CIRAD in 1983, which consisted in monospecific forest tree plots (21x21 m) planted with three-years-old seedlings of tree species selected for their timber value and their natural abundance (more details in Schimann *et al.*, 2017). Monospecific plots of six tree-species were selected to conduct this study: *Carapa surinamensis* F.A.W Miquel (Sapindales/Meliaceae), *Goupia glabra* J.B.C.F Aublet (Malpighiales/Goupiaceae), *Hymenaea courbaril* C Linnaeus (Fabales/Fabaceae), *Platonia insignis* K.F.P von Martius (Malpighiales/Clusiaceae), *Simarouba amara* J.B.C.F Aublet (Sapindales/Simaroubaceae), *Vochysia tomentosa* A.P De Candolle (Myrtales/Vochysiaceae) ; see fig S1 for a map of the plantation. The second site of sampling consisted in a permanent natural forest plot (P16 plot) followed for the dynamic of its tree communities and located nearby the plantation (Schimann *et al.*, 2017). This lowland tropical forest is typical of Guiana Shield forests with Leguminosae, Chrysobalanaceae, Lecythidaceae and Burseraceae as dominant tree families. In the P16 plot, we selected five trees of only four species (*C. surinamensis*, *G. glabra*, *P. insignis* and *V. tomentosa*; see fig S2 for a map of the trees). These individuals were randomly distributed into the 25 hectares of the P16 plot, avoiding areas of swamp forest. Soil and litter were sampled in the vicinity of 5 individuals for each of 4 tree species

in the P16 and 3 individuals for each of 6 tree species in the plantation. More details are provided in Schimann *et al.* (2017).

DNA extraction and PCR amplicon pyrosequencing

The procedures for DNA extraction were adapted from Coince *et al.* (2013). The extraction of genomic DNA was carried out using 500 mg of homogeneous soil or 500 mg of ground litter per sample using the Fast DNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals) following the manufacturer's instructions.

For Oomycetes, two different ITS1 region amplifications using two different sets of primers were performed thanks nested-PCR. One targeting the *Phytophthora* genera, using two pairs of primers developed by Legeay *et al.* (2019) and by Scibetta *et al.* (2012), the other one targeting the phylogenetic group Peronosporomycetes, using two pairs of primers developed by Cooke *et al.* (2000) and by Legeay *et al.* (2019). For each amplification, a “blank” sample was also created by practicing PCR on distilled water on the same plate as the other DNA samples. Nested PCR was used to take into account the very low pathogenic Oomycete biomass expected in soils. Two sets of libraries comprising 36 libraries each were generated for the plantation, one for each set of primer used. On the P16 natural forest plot, only the Peronosporomycetes amplification was performed, generating 40 libraries. Miseq sequencing on the libraries was performed by the PlaGe platform at Toulouse.

Bioinformatics Analysis for oomycetes Miseq reads

Sequences were sorted and trimmed according to their quality using Mothur and Usearch. To avoid sequencing errors, singleton sequences were discarded; sequences were then sorted by abundances and clustered with a homology rate of 99% using cluster_otus command of Usearch. Generated consensus mOTUs were then taxonomically assigned using the BLAST algorithm against a database extracted from the NCBI database, containing all sequences assigned to Oomycetes with the “ITS” or “16S” keywords in

their title. All reads not assigned to Oomycetes organisms (representing around 3 % of the total reads) were removed from the dataset, as it was mainly assigned to phagic DNA used as an amplification vector before the sequencing process. If a mOTU was present in higher abundance in a soil/litter sample than in the blank samples, it was discarded as contaminant in the soil/littersample.

Rarefied communities, with size equal to the minimal size of the samples (525 reads) were created.

With the Phytophthora-specific amplification (PHYTO), 2 % of the reads did not belong to the Oomycete phylum, and 20 % were assigned to the *Pythium*, *Phytophthora* and *Peronospora* genera; they were discarded in further analysis as PCR dropouts. 7 % were putative contaminations, as they were more abundant in the blank samples, and were later removed for the rest of the analyses. With the Peronosporomycete-specific (PERO) amplification, 5 % of the reads were unassigned, 0.5 % were putative contaminations and 33 % were mOTUs assigned to the *Lagenidium* and *Myzocytiopsis* genus. To our knowledge these genera were not reported to contain plant pathogens and we thus discarded these mOTUs in further analyses.

Abundance tables were transformed into simple presence/absence tables. Statistical analyses were performed with R (R project for Statistical Computing, R Core Team, 2004–2013) and the package *vegan*. Pairwise distance matrices were computed using the Bray-Curtis method, and then plotted using non-metric multidimensional scaling (NMDS), using the *metaMDS* function of the *vegan* package. The effects of tree species, distance across sites, and habitat were tested using Permutational Multivariate Analysis of Variance Using Distance Matrices (ADONIS), from the package *Vegan*.

Extraction of pathogenic fungi communities data

Fungal metabarcoding data were taken from Schimann *et al.* (2017). Each mOTU was assigned to an ecological guild and trophic mode through the use of the database « FUNGUILD » (Nguyen *et al.* 2015). Upon the mOTUs 4354 fungal mOTUS used in Schimann *et al.* (2017), only 990 (27 %) were assigned to an ecological guild. Then, among these 990 assigned mOTUs, 49 of them (amounting to 5 % of the assigned

mOTUs) were assigned to the « plant pathogen » guild. Only these 87 putative plant pathogen OTUs were retained for further analysis.

Results

Communities composition

In the plantation, the PHYTO amplification gave out four different putative species of *Phytophthora*, with *Phytophthora heveae* representing the bulk of the reads (97 % of the *Phytophthora* reads observed in the plantation). The PERO amplification gave out 1 *Lagenaria*, 4 *Peronospora*, 1 *Pseudoperonospora*, 1 *Hyaloperonospora*, 2 *Phytophthora*, 5 *Phytophythium* and 23 *Pythium* species (Table S1). The most abundant species were *Pythium takayamanum*, *Phytophythium sp.2* and *Phytophthora heveae*. The dominant genera were *Pythium*, *Phytophythium* and *Phytophthora* (Table 1).

Using Funguild, we found 66 putative pathogen fungal species from all fungal ITS data (Schimann et al., 2017) corresponding to 39 genera belonging to Ascomycetes, Basidiomycetes, Zygomycetes and Chytridiomycetes (Table 1). The three most abundant genus were *Pestalotiopsis* (with six species), *Rhizophydium* (with one species) and *Calonectria* (with one species). The three most abundant species were *Calonectria gordionae*, *Rhizophydium sp.* and *Pestalotiopsis virgatula* (Table S2). 17 Peronosporomycete species and 25 pathogenic fungi species were shared between the natural forest stand (P16) and the plantation. Six Peronosporomycetes and 14 pathogenic fungi species were found only in the P16; and 16 Peronosporomycetes and 10 pathogenic fungi species were found only in the plantation (Table 1).

Factors structuring the oomycete and fungal pathogens communities

The Peronosporomycete community was significantly different between the plantation and the natural forest ($p=0.001$) (Table 2). The community species composition and the relative abundances of those species were different between both sites. However, no structuration by the host trees ($p=0.355$), and only a weak structuration by habitat ($p=0.052$) (Fig 1), were observed in either site.

A weak but significant difference between soil and litter habitat was detected for the *Phytophthora* communities revealed using the PHYTO amplification ($p=0.02$) (Fig 2). However, no effect of the host tree was detected using this *Phytophthora* specific amplification ($p=0.860$). The mean number of Peronosporomycete and *Phytophthora* species by sample were respectively of 5.94 and 1.72. The mean Shannon diversity indexes by samples for Peronosporomycete was of 1.69 in the litter and 1.93 in the soil and of 1.56 in the plantation, 2.02 in the natural forest (P16). For the *Phytophthora* community, the mean Shannon diversity indexes by samples were of 1.55 in the litter and 1.97 in the soil.

46 fungal species-level mOTUs identified as pathogens by the FUNGuild database were retrieved in the P16, versus 49 in the plantation. Among the identified pathogens, 27 were identified in literature as leaf pathogens, 8 as root pathogens while the plant organ infected could not be identified for 12 mOTUs. In both locations, strong and significant differences between habitats ($p=0.001$) (Fig 3) and between locations ($p=0.001$) were observed in communities composition. A significant, but weak, host effect was also detected ($p=0.016$). The diversity was greater in litter, with 27 only found in litter, 16 species shared between litter and soil and 6 only found in soil.

Discussion

No host effect was detected for *Phytophthora*, Peronosporomycetes ; and fungal pathogens only showed a weak specialization to host. This is particularly surprising as soilborne pathogens, including Oomycetes, are thought to be important agents of distance-dependant mortality in neotropical forests. Our study suggests that in these forests of French Guiana, foliar pathogens may be better candidates for such mechanisms. However, this observation can be tempered by two facts. First, our study relies on a fungal database to assign the ecology to the identified fungal pathogens. This database may inadequately represent taxa present in the Guiana ecosystems, in particular among the soil inhabiting fungi. This would explain the strong dominance of foliar pathogens in our dataset; a lot of the pathogens identified assign to genus identified from studies on eucalypt plantations, diseases which may create a certain bias in the fungal species which we were able to document. The lack of host effect among fungi would then simply be due to our lack of knowledge about all but the most common soilborne pathogenic fungi in neotropical forests. Indeed, Sarmiento *et al.* (2017) found that soilborne fungal pathogens isolated from seed in a neotropical forests showed host specialization. However, we found no host effect for the Peronosporomycetes, which are mainly composed of soilborne plant pathogens, without a potential bias linked to the use a database to document their ecology ; thus, we are more assured in our assessment of the generalist behaviour of Peronosporomycetes. Second, Legeay *et al* (xxxx) found, in a wider scaled study, an effect of the host plant taxonomic family on *Phytophthora* communities in neotropical forests. The difference with this study may be due to the fact that the host effect on *Phytophthora* communities is increased when looking at a greater number of host species. However, for the Peronosporomycetes, we detected 48 different species and no trace of host effect; we can thus reasonably assume that the Peronosporomycete community is not structured by host.

The fact that soil or litter habitat highly segregate fungal pathogen communities, and more weakly Peronosporomycetes or *Phytophthora* may be explained by the fact that Oomycetes can produce flagellate zoospores with a swimming ability, giving them a mobility between the different ground compartments. Furthermore, the fact that the uncovered fungal pathogens are mainly foliar, and thus may have a low

survival rate in soil, probably also play a role in the habitat effect. Overall, investigating both litter and soil seems important for fungal communities, but not necessary for Peronosporomycete communities.

There were no differences in host effect between the monospecific plantation and the P16 natural forest, indicating that the lack of host effect is not due to the intermingling of roots of different tree species. The number of Peronosporomycetes retrieved was higher in the plantation; conversely, it was lower for fungal pathogens. This might suggest an effect of anthropization on Peronosporomycete diversity, but not on fungal pathogens. However, the mean Shannon diversity index by sample was higher in the P16 forest, indicating that the additional Peronosporomycete species found in the plantation remain rare and very local. However, our study only covers one plantation and one natural forest and thus does not allow to draw too many conclusions ; and as an example, Bose *et al.* (2018) show a greater diversity of *Phytophthora* in the natural ecosystems of South Africa than in tree plantations, thus drawing contrary conclusions to ours.

From our study, it would appear that fungal pathogens communities and Oomycetes communities seem to be weakly influenced, or not influenced at all, by the host in the studied sites, even in monospecific stands. Thus, our study points at a generalist-oriented behavior of pathogens in these Guianan forests, at least those retrieved in soil and litter. However, actual pathogenicity test would be needed to observe the actual pathogenic behavior of these organisms.

ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge E. Morin for her assistance in bioinformatics advices. JL holds a PhD fellowship awarded by the “Agence Nationale de la Recherche” as part of the ANR Blanc program NEBEDIV to CB, MB and HS (ANR-13-BSV7-0009) and the “Institut National de la Recherche Agronomique” (Metaprogramme MEM). UMR IAM was supported by a grant overseen by the French National Research Agency (ANR) as part of the "Investissements d'Avenir" program (ANR-11-LABX-0002-01, Lab of Excellence ARBRE). The UMR EcoFoG is supported by the French National Research Agency (ANR) as part of the “Investissements d'Avenir” program (Lab of Excellence CEBA, ref. ANR10LABX2501).

References

- Bagchi R, Gallery RE, Gripenberg S, Gurr SJ, Narayan L, Addis CE, et al. Pathogens and insect herbivores drive rainforest plant diversity and composition. *Nature*. févr 2014;506(7486):85-8.
- Bagchi R, Swinfield T, Gallery RE, Lewis OT, Gripenberg S, Narayan L, et al. Testing the Janzen-Connell mechanism: pathogens cause overcompensating density dependence in a tropical tree: Pathogens cause overcompensating dynamics. *Ecology Letters*. oct 2010;13(10):1262-9.
- Bayandala, Fukasawa Y, Seiwa K. Roles of pathogens on replacement of tree seedlings in heterogeneous light environments in a temperate forest: a reciprocal seed sowing experiment. Power A, éditeur. *Journal of Ecology*. mai 2016;104(3):765-72.
- Benítez M-S, Hersh MH, Vilgalys R, Clark JS. Pathogen regulation of plant diversity via effective specialization. *Trends in Ecology & Evolution*. déc 2013;28(12):705-11.
- Bever JD, Mangan SA, Alexander HM. Maintenance of Plant Species Diversity by Pathogens. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 4 déc 2015;46(1):305-25.
- Bose T, Wingfield MJ, Roux J, Vivas M, Burgess TI. Community composition and distribution of *Phytophthora* species across adjacent native and non-native forests of South Africa. *Fungal Ecology*. déc 2018;36:17-25.
- Cannon PF, Simmons CM. Diversity and Host Preference of Leaf Endophytic Fungi in the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. *Mycologia*. mars 2002;94(2):210.

- Coince A, Caël O, Bach C, Lengellé J, Cruaud C, Gavory F, et al. Below-ground fine-scale distribution and soil versus fine root detection of fungal and soil oomycete communities in a French beech forest. *Fungal Ecology*. juin 2013;6(3):223-35.
- Comita LS, Queenborough SA, Murphy SJ, Eck JL, Xu K, Krishnadas M, et al. Testing predictions of the Janzen-Connell hypothesis: a meta-analysis of experimental evidence for distance- and density-dependent seed and seedling survival. *J Ecol*. juill 2014;102(4):845-56.
- Cooke DEL, Drenth A, Duncan JM, Wagels G, Brasier CM. A Molecular Phylogeny of *Phytophthora* and Related Oomycetes. *Fungal Genetics and Biology*. juin 2000;30(1):17-32.
- García-Guzmán G, Benítez-Malvido J. Effect of litter on the incidence of leaf-fungal pathogens and herbivory in seedlings of the tropical tree *Nectandra ambigens*. *Journal of Tropical Ecology*. mars 2003;19(2):171-7.
- Gilbert. Root Camouflage and Disease Control. *Phytopathology* [Internet]. 1994
- Gilbert GS, Webb CO. Phylogenetic signal in plant pathogen-host range. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 20 mars 2007;104(12):4979-83.
- Hood LA, Swaine MD, Mason PA. The influence of spatial patterns of damping-off disease and arbuscular mycorrhizal colonization on tree seedling establishment in Ghanaian tropical forest soil. *Journal of Ecology*. oct 2004;92(5):816-23.
- Jablonski D, Roy K, Valentine JW. Out of the Tropics: Evolutionary Dynamics of the Latitudinal Diversity Gradient. *Science*. 6 oct 2006;314(5796):102-6.
- Janzen DH. Herbivores and the Number of Tree Species in Tropical Forests. *The American Naturalist*. nov 1970;104(940):501-28.

Legeay J, Husson C, Cordier T, Vacher C, Marcais B, Buée M. Comparison and validation of Oomycetes metabarcoding primers for Phytophthora high throughput sequencing. *Journal of Plant Pathology*, 7 mars 2019 .

Liu X, Etienne RS, Liang M, Wang Y, Yu S. Experimental evidence for an intraspecific Janzen-Connell effect mediated by soil biota. *Ecology*. mars 2015;96(3):662-71.

Liu Y, Fang S, Chesson P, He F. The effect of soil-borne pathogens depends on the abundance of host tree species. *Nature Communications*. déc 2015;6(1):10017.

Mangan SA, Schnitzer SA, Herre EA, Mack KML, Valencia MC, Sanchez EI, et al. Negative plant–soil feedback predicts tree-species relative abundance in a tropical forest. *Nature*. août 2010;466(7307):752-5.

Mommer L, Cotton TEA, Raaijmakers JM, Termorshuizen AJ, van Ruijven J, Hendriks M, et al. Lost in diversity: the interactions between soil-borne fungi, biodiversity and plant productivity. *New Phytologist*. avr 2018;218(2):542-53.

Nguyen NH, Song Z, Bates ST, Branco S, Tedersoo L, Menke J, et al. FUNGuild: An open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild. *Fungal Ecology*. avr 2016;20:241-8.

Packer A, Clay K. Soil pathogens and spatial patterns of seedling mortality in a temperate tree. *Nature*. mars 2000;404(6775):278-81.

Sarmiento C, Zalamea P-C, Dalling JW, Davis AS, Stump SM, U'Ren JM, et al. Soilborne fungi have host affinity and host-specific effects on seed germination and survival in a lowland tropical forest. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 24 oct 2017;114(43):11458-63.

Schimann H, Bach C, Lengelle J, Louisanna E, Barantal S, Murat C, et al. Diversity and Structure of Fungal Communities in Neotropical Rainforest Soils: The Effect of Host Recurrence. *Microbial Ecology*. févr 2017;73(2):310-20.

Schroeder JW, Martin JT, Angulo DF, Barbosa JM, Perea R, Arias-Del Razo I, et al. Community composition and diversity of Neotropical root-associated fungi in common and rare trees. *Biotropica*. juill 2018;50(4):694-703.

Schupp EW. The Janzen-Connell Model for Tropical Tree Diversity: Population Implications and the Importance of Spatial Scale. *The American Naturalist*. sept 1992;140(3):526-30.

Scibetta S, Schena L, Chimento A, Cacciola SO, Cooke DEL. A molecular method to assess *Phytophthora* diversity in environmental samples. *Journal of Microbiological Methods*. mars 2012;88(3):356-68.

Spear ER, Mordecai EA. Foliar pathogens are unlikely to stabilize coexistence of competing species in a California grassland. *Ecology*. oct 2018;99(10):2250-9.

Suryanarayanan TS, Murali TS, Venkatesan G. Occurrence and distribution of fungal endophytes in tropical forests across a rainfall gradient. *Canadian Journal of Botany*. août 2002;80(8):818-26.

Tedersoo L, Bahram M, Polme S, Koljalg U, Yorou NS, Wijesundera R, et al. Global diversity and geography of soil fungi. *Science*. 28 nov 2014;346(6213):1256688-1256688.

Wright JS. Plant diversity in tropical forests: a review of mechanisms of species coexistence. *Oecologia*. janv 2002;130(1):1-14.

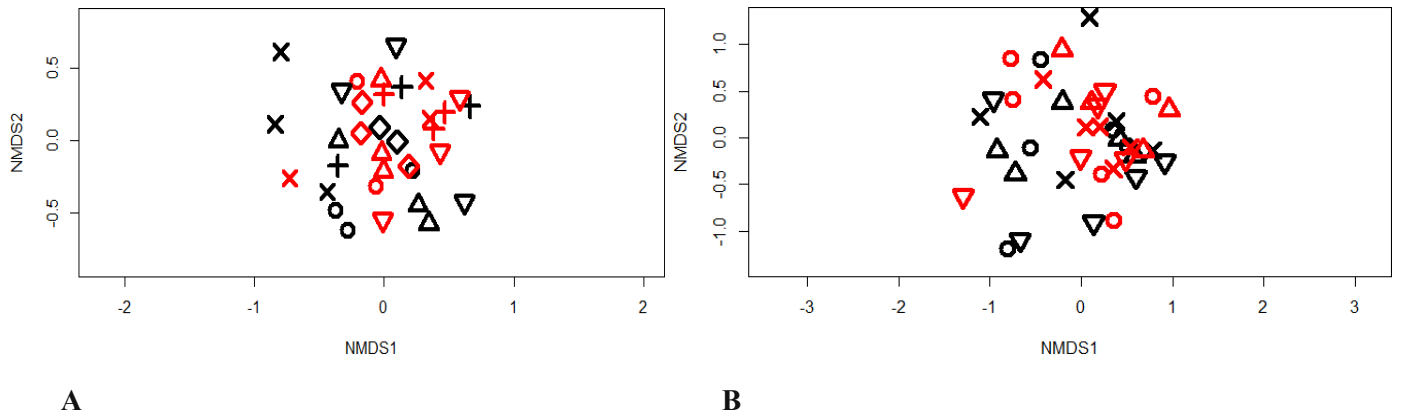


Figure1:NMDSrepresentationofthe Peronosporomycetes communities in A)theplantation B)the P16forest. Eachsymbolcorrespondstoonesample. Blackdots= littersamples;reddots= soil samples. Circle= *Carapasurinamensis* ; upward triangle = *Goupia glabra* ; plus symbol = *Hymenaea courbaril* ; cross = *Platonina insignis* ; losange = *Simarouba amara* ; downward triangle = *Vochysia tomentosa*.

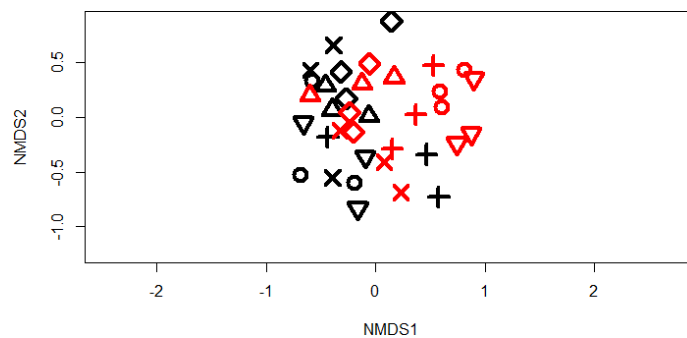


Figure2:NMDS representation of the *Phytophthora* communities in the plantation. Each symbol corresponds to one sample. Black symbols= litter samples;red symbols=soil samples. Circle= *Carapa surinamensis* ; upward triangle = *Goupia glabra* ; plus symbol = *Hymenaea courbaril* ;cross = *Platonina insignis* ; losange = *Simarouba amara* ; downward triangle = *Vochysia tomentosa*.

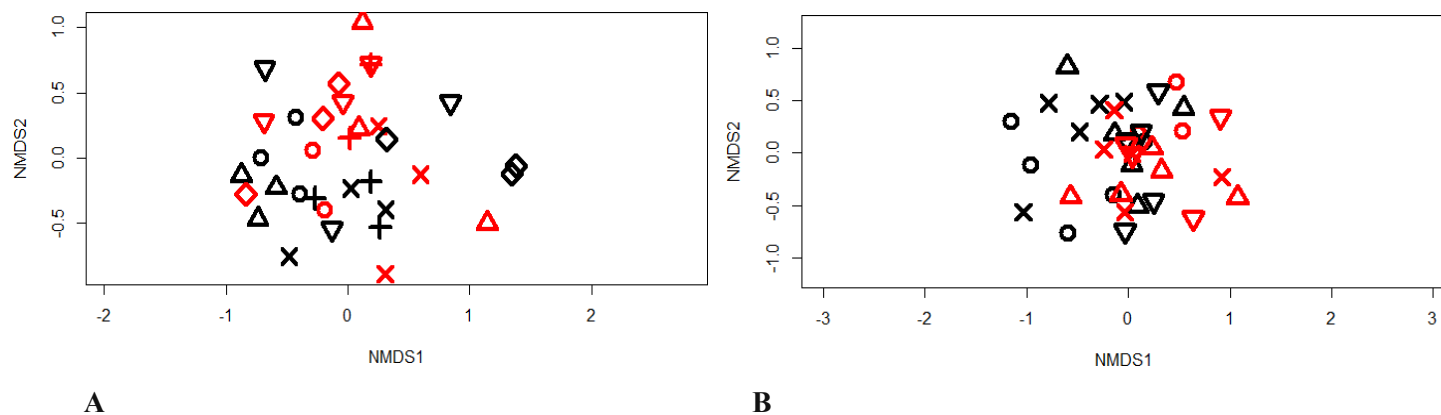


Figure 3: NMDS representation of the pathogenic Fungicommunities in A) the plantation B) the P16 forest. Each symbol corresponds to one sample. Black symbols = litter samples; red symbols = soil samples. Circle = *Carapasurinamensis* ; upward triangle = *Goupia glabra* ; plus symbol = *Hymenaea courbaril* ; cross = *Platonina insignis* ; losange = *Simarouba amara* ; downward triangle = *Vochysia tomentosa*. One Carapa soil sample in the P16 was discarded as it was a strong outlier.

Table 1 : Number of species of each taxonomic group found only at each site, or shared between the two sites.

	P16 only	P16 + plantation	Plantation only	Total
Oomycetes	6 (15 %)	17 (44 %)	16 (41 %)	39
<i>Hyaloperonospora</i>	0	0	1	1 (3 %)
<i>Lagenia</i>	0	0	1	1 (3 %)
<i>Peronospora</i>	0	1	3	4 (10 %)
<i>Phytophthora</i>	1	2	1	4 (10 %)
<i>Phytopythium</i>	1	3	1	5 (13 %)
<i>Pseudoperonospora</i>	1	0	0	1 (3 %)
<i>Pythium</i>	3	11	9	23 (59 %)
Pathogenic fungi	14 (24 %)	25 (42 %)	10 (17 %)	59
<i>Aurantiosacculus</i>	1	0	0	1 (2 %)
<i>Batcheloromyces</i>	1	1	0	1 (2 %)
<i>Botryotinia</i>	0	1	0	1 (2 %)
<i>Calonectria</i>	0	1	0	1 (2 %)
<i>Colletotrichum</i>	0	1	0	1 (2 %)
<i>Collophora</i>	0	1	0	1 (2 %)
<i>Coniella</i>	0	0	1	1 (2 %)
<i>Cylindrocladiella</i>	1	0	0	1 (2 %)
<i>Devriesia</i>	0	0	1	1 (2 %)
<i>Erysiphe</i>	1	0	0	1 (2 %)
<i>Eutypa</i>	0	1	0	1 (2 %)
<i>Eutypella</i>	0	1	0	1 (2 %)
<i>Fusarium</i>	1	0	0	1 (2 %)
<i>Helicobasidium</i>	0	1	0	1 (2 %)
<i>Laetisaria</i>	0	0	1	1 (2 %)
<i>Lasiodiplodia</i>	0	1	0	1 (2 %)
<i>Leptosphaeria</i>	0	1	0	1 (2 %)
<i>Lophodermium</i>	0	1	0	1 (2 %)
<i>Magnaporthe</i>	1	1	0	1 (2 %)
<i>Monochaetia</i>	1	1	0	1 (2 %)
<i>Monographella</i>	0	0	2	2 (4 %)
<i>Mycoleptodiscus</i>	0	1	0	1 (2 %)
<i>Mycosphaerella</i>	1	0	1	1 (2 %)
<i>Neonectria</i>	1	0	0	1 (2 %)
<i>Ophiostoma</i>	1	0	0	1 (2 %)
<i>Passalora</i>	1	0	0	1 (2 %)
<i>Pestalotiopsis</i>	0	4	0	4 (7 %)
<i>Phaeomoniella</i>	0	0	1	1 (2 %)
<i>Phlogicylindrium</i>	0	1	0	1 (2 %)
<i>Pilidium</i>	0	0	1	1 (2 %)
<i>Pseudocercospora</i>	1	1	0	1 (2 %)
<i>Readeriella</i>	1	0	0	1 (2 %)
<i>Rhizophydium</i>	0	1	0	1 (2 %)
<i>Seimatosporium</i>	0	0	1	1 (2 %)
<i>Thanatephorus</i>	1	0	0	1 (2 %)
<i>Truncatella</i>	0	0	1	1 (2 %)
<i>Volutella</i>	1	1	0	1 (2 %)

Table 2: P-values of each effect and effect interactions for each amplification library. PERO = Peronosporomycete-specific amplification library. PHYTO = *Phytophthora*-specific amplification library. No p-value of the site effect was put for the PHYTO amplification as it was only applied to the plantation site.

	PERO	PHYTO	Pathogenic Fungi
Site effect	0.001	NA	0.001
Habitat effect	0.052	0.027	0.001
Host effect	0.355	0.647	0.016
Site * habitat	0.420	NA	0.105
Site * host	0.750	NA	0.136
Host * habitat	0.650	0.792	0.308

TableS1:List of Peronosporomycete species retrieved, with their presence in litter and/or soil, and in the P16 and/or plantation. Species were assigned to each OTUs if the homology score was superior or equal to 97 %, otherwise only a genus was assigned.

Species names	Litter	Soil	P16	Plantation
<i>Hyaloperonospora brassicae</i>	X			X
<i>Lagena radicola</i>	X	X		X
<i>Peronospora ervi</i>	X			X
<i>Peronospora lamii</i>		X		X
<i>Peronospora</i> sp.	X			X
<i>Peronospora viciae</i>	X	X	X	X
<i>Phytophthora castaneae</i>	X	X	X	X
<i>Phytophthora cinnamomi</i>	X	X	X	
<i>Phytophthora heveae</i>	X	X	X	X
<i>Phytophthora</i> sp.clade9	X	X		X
<i>Phytopythium kandeliae</i>	X	X	X	
<i>Phytopythium</i> sp.1	X	X	X	X
<i>Phytopythium</i> sp.2	X	X	X	X
<i>Phytopythium</i> sp.3		X		X
<i>Phytopythium vexans</i>	X	X	X	X
<i>Pseudoperonospora</i> sp. 1	X	X	X	
<i>Pythium attrantheridium</i>	X	X	X	X
<i>Pythium heterothallicum</i>	X	X		X
<i>Pythium intermedium</i>		X		X
<i>Pythium monospermum</i>		X		X
<i>Pythium myriotylum</i>		X		X
<i>Pythium oligandrum</i>		X	X	X
<i>Pythium takayamanum</i>	X	X	X	X
<i>Pythium</i> sp. 1		X		X
<i>Pythium</i> sp. 2	X	X	X	X
<i>Pythium</i> sp. 3		X		X
<i>Pythium</i> sp. 4	X	X	X	X
<i>Pythium</i> sp. 5	X	X	X	X
<i>Pythium</i> sp. 6		X	X	
<i>Pythium</i> sp. 7		X		X
<i>Pythium</i> sp.8	X		X	
<i>Pythium</i> sp.9	X	X	X	X
<i>Pythium</i> sp.10		X		X
<i>Pythium</i> sp.11		X	X	X
<i>Pythium</i> sp.12	X		X	
<i>Pythium</i> sp.13	X	X	X	X

Table S2 : List of putative fungal pathogenic OTUs, and their presence in soil/litter and in the P16/plantation. The foliar or soilborne nature of each species is documented if the information has been retrieved in available publications ; F = foliar, S = soilborne, FS = potentially both. The homology percentage with the closest matching species is given.

Fungi species with the most homology to the OTU	Foliar/Soilborne	Litter	Soil	P16	Plantation	Homology percentage
<i>Aurantiosacculus acutatus</i>	F	x		x		95
<i>Batcheloromyces proteae</i>	F		x	x		89
<i>Batcheloromyces leucadendri</i>	F	x		x	x	89
<i>Botryotinia fuckeliana</i>	F	x		x	x	97
<i>Calonectria gordoniae</i>	F	x	x	x	x	99
<i>Collophora rubra</i>	F		x	x	x	98
<i>Coniella fragariae</i>	F	x	x		x	99
<i>Cylindrocladiella hahajimaensis</i>	S	x	x	x		91
<i>Devriesia acadensis</i>		x			x	95
<i>Erysiphe necator</i>	F	x		x		97
<i>Eutypa consobrina</i>		x	x	x	x	92
<i>Eutypella</i> sp.			x	x	x	92
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	F	x		x	x	98
<i>Fusarium solani</i>	S	x	x	x		98
<i>Helicobasidium mompa</i>	S		x	x	x	88
<i>Laetisaria</i> sp.		x			x	92
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	S	x	x	x	x	99
<i>Leptosphaeria</i> sp.	F	x	x	x	x	99
<i>Lophodermium agathidis</i>	F	x		x		95
<i>Magnaporthe griffinii</i>	S	x		x	x	100
<i>Magnaporthe grisea</i>	FS		x		x	90
<i>Monochaetia</i> sp.	F	x		x	x	94
<i>Monochaetia monochaeta</i>	F	x		x		96
<i>Monographella stoveri</i>	S	x			x	94
<i>Monographella lycopodina</i>		x			x	94
<i>Mycoleptodiscus</i> sp.		x		x	x	97
<i>Mycosphaerella suttoniae</i>	F	x			x	97
<i>Mycosphaerella</i> sp.	F	x	x	x		96
<i>Neonectria</i> sp.		x		x		88
<i>Ophiostoma</i> sp.		x	x	x		98
<i>Passalora leptophlebiae</i>	F	x		x		97
<i>Pestalotiopsis virgatula</i>	F	x	x	x	x	100
<i>Pestalotiopsis theae</i>	F	x	x	x	x	95
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	F	x		x	x	93
<i>Pestalotiopsis sorbi</i>	F	x		x	x	99
<i>Phaeomoniella</i> sp.		x	x		x	93
<i>Phlogicylindrium</i>		x		x	x	95
<i>Pilidium acerinum</i>	F	x			x	94
<i>Pseudocercospora cladrastidis</i>	F	x		x		92
<i>Pseudocercospora cladosporioides</i>	F	x		x	x	100

<i>Readeriella readeriellophora</i>	F	x		x		84
<i>Rhizophydium</i> sp.	S		x	x	x	98
<i>Seimatosporium hakeae</i>	F	x	x		x	91
<i>Thanatephorus cucumeris</i>	S	x		x		86
<i>Truncatella angustata</i>	F	x	x		x	100
<i>Volutella</i> sp.		x	x	x	x	97
<i>Volutella consors</i>	S	x	x	x		98

CHAPITRE 4

Mise en évidence par tests d'inoculation des
mécanismes de feedback négatifs par la sélection
de microorganismes du sol sur des plantules de
Vouacapoua americana

Le Wacapou (*Vouacapoua americana*) est une espèce de forêt guyanaise agrégative dont le recrutement (présence de nouveaux semis) est quasiment nul lorsque sa densité à l'âge adulte est élevée. La mortalité observée des stades plantules et graines est densité-dépendante de l'espèce et semble en concordance avec les hypothèses de Janzen (1970). Ainsi, l'objectif principal était de déterminer l'impact des communautés de champignons et/ou d'oomycètes tellurique associées au Wacapou (*Vouacapoua americana*) sur le taux de survie des semis con-spécifiques de cet arbre guyanais. Pour cela, un dispositif expérimental a été mis en place en serre, comprenant 84 semis de Wacapou en pot inoculés avec du sol prélevé soit à l'intérieur de trois zones forestières dans lesquelles des fontes de semis de Wacapou avaient été observées, soit à l'extérieur de ces zones d'exclusion des semis. Six pots témoins contenant uniquement du sol stérilisé ont aussi été préparés. Sur les 90 plants étudiés en serre, seuls trois sont morts. Aucun effet de l'inoculation de sol sur le dépérissement ou la croissance des plants n'a été détecté. En revanche, une différence significative dans le ratio entre racines mortes et vivantes a été détectée entre les pots témoins et le traitement, l'inoculation de sols de forêt augmentant la proportion de racines mortes. Compte tenu de l'absence de symptômes caractéristiques et malgré des circonstances propices à une infection par un inoculat d'Oomycètes il n'a pas été possible de montrer une implication potentielle des Oomycètes du sol prélevés dans les taches de fontes de semis de Wacapou. De nombreux autres acteurs et mécanismes non testés peuvent être à l'origine de ces fontes de semis : mécanismes dépendants à la densité des semis, pathogènes aériens...

Mise en évidence par tests d'inoculation des mécanismes de feedback négatifs par la sélection de microorganismes du sol sur des plantules de *Vouacapoua americana*

Introduction

Comme il a déjà été expliqué précédemment, l'une des hypothèses majeures pour expliquer le maintien de la diversité végétale dans les forêts humides tropicales est l'hypothèse Janzen-Connell (Schupp 1992). Cette hypothèse considère les ennemis naturels des plantes (pathogènes et herbivores) comme des agents réduisant la fitness des plantes les plus abondantes, les empêchant ainsi de prendre le dessus sur les autres espèces des communautés végétales. Cette réduction de fitness se fait par deux types de mortalités de plantules: une mortalité dépendante de la distance, qui tue les plantules à proximité de leurs arbres-mères ; et une mortalité dépendante de la densité en plantules sur une certaine surface du sol. Deux prérequis, applicables aux ennemis pathogènes des plantes, sont nécessaires à la validation de cette hypothèse : i) ces pathogènes doivent faire preuve d'une spécialisation sur certaines plantes-hôtes, et ii) ils doivent avoir une distance de dispersion égale ou inférieure à celle des graines des plantes.

Dans les chapitres 2 et 3, nous avons employé le metabarcoding pour décrire les communautés de pathogènes dans des sols de forêts néo-tropicales guyanaises, en recherchant un éventuel effet de la plante hôte sur la structuration des communautés de pathogènes. Toutefois, cette méthode ne nous donne pas d'informations sur le véritable potentiel des pathogènes identifiés à induire de la mortalité chez les plantules et à vérifier en pratique l'hypothèse Janzen-Connell.

Le Wacapou (*Vouacapoua americana*) est une espèce d'arbre de la famille des Fabacées présente en Guyane Française et au Brésil en aval du bassin amazonien et intensément récoltée pour son bois. La répartition spatiale du wacapou présente des agrégats de quelques dizaines de mètres. Il produit des graines de taille assez importantes (3 à 4 cm de diamètre) qui tombent à proximité de l'arbre mère, et sont ensuite dispersées par des rongeurs à des distances n'excédant pas 30 mètres en général (Forget 1997). C'est une espèce ombrophile qui se développe de manière optimale sous un important couvert végétal. Au pied de groupements d'arbres adultes de wacapou, Traissac (2003) a observé des taches de

fontes de semis de cette espèce,. Ce phénomène suggère l'existence de mortalités dépendantes à la distance aux adultes conspécifiques et/ou à la densité des semis.

La forêt de Paracou est une forêt de Guyane Française ayant fait l'objet d'un inventaire forestier annuel depuis 1988. En particulier, des taches de mortalité juvénile de Wacapou ont été documentées et localisées par S. Traissac. En tirant partie de cette cartographie des taches de fontes de semis, nous avons collecté des sols à l'extérieur ou à l'intérieur de ces taches. Puis, nous avons mis au point une expérience consistant à planter des graines de Wacapou dans des pots inoculés par ces sols prélevés à l'intérieur ou à l'extérieur de ces taches. L'objectif était d'observer d'éventuelles mortalités ou symptômes de dépérissement dépendants de la distance de prélèvement des sols, et le cas échéant, d'identifier et d'isoler les pathogènes à l'origine de ces symptômes.

Matériel et méthode

Les sols servant à l'inoculation des pots de Wacapou ont été prélevés et mis en pot le 2 mai 2017. Deux types de sol ont été prélevés: des sols situés dans trois taches de fontes de semis de Wacapou et des sols situés dans trois sites à au moins 200 m de distance de ces taches (Fig 1). Pour chaque pot, 300 mL de sol prélevé à Paracou ont été mélangés avec 2700 mL de terre végétale prélevée en forêt et stérilisée à la vapeur. Pour chacun des six sols, 14 pots ont été préparés pour constituer nos répétitions biologiques. Six pots témoins ne contenant que de la terre végétale stérilisée ont aussi été préparés (FigS1).

Les graines de Wacapou ont été récoltées à Paracou et mises en pot le 15 mai 2017. Les graines ont été pesées et réparties par intervalles de 5 grammes, sur une gamme s'échelonnant de 15 à 40 grammes. Les graines ont alors été réparties en 6 lots contenant un nombre équivalent de graine de chaque classe de poids et ces lots ont été alloués aléatoirement aux traitements. Trois graines de même classe de poids ont été introduites dans chaque pot ; si plus d'une graine germait dans un pot, les plants supplémentaires ont été supprimés pour ne laisser qu'un individu par pot au final. A partir du 5 juin, la hauteur des plants de Wacapou a été mesurée chaque semaine, jusqu'au 6 novembre 2017. Les mesures ont été effectuées depuis le collet jusqu'à l'apex du bourgeon terminal de la plante. Un ennoyage des pots de 48 heures a

été réalisé le 11 août dans le but de réactiver les Oomycètes présents dans le sol, puis un deuxième ennoyage a été réalisé le 28 octobre 2017. Par ailleurs, 300 mL de sol de forêt prélevés dans les mêmes sites qu'en mai 2017 ont été rajoutés le 13 octobre 2017 dans les pots afin d'augmenter et rafraîchir l'inoculum pathogène.

En Janvier 2018, les Wacapou ont été observés de façon destructive. Les parties aériennes (tiges + feuilles) ont été prélevées, séchées 48h à 50°C puis pesées. Les systèmes racinaires de tous les plants ont été récoltés et lavés de toutes traces de substrat. Les racines fines, de moins de 1 mm de diamètre ont été séparées des racines plus grossières et du pivot. Elles ont alors été triées pour séparer les fines racines mortes des fines racines vivantes. Ces 2 fractions ont été séchées 48h à 50°C puis pesées. Les pivots et les racines grossières ont été examinés plus en détail pour détecter l'éventuelle présence de lésions liées à des agents pathogènes. Des tissus ont été également prélevés pour des analyses ultérieures quand des lésions étaient observées.

Résultats

La germination des graines n'a pas été affectée par l'inoculation de sol dans le pot ($p=0.7$), avec 29 % des plants hors tache et 29 % des plants en tache non germés. 17 % des plants témoins n'ont pas germé, mais le pourcentage de non-germination parmi les plants inoculés de même classe de poids est de 20 %. Sur les 90 plants obtenus, seuls 3 sont morts avant la fin de l'expérimentation ; par conséquent, aucune différence significative de mortalité n'a pu être observée entre les différents sols. 17 plantes ont développé des symptômes de taches foliaires dans la première semaine, mais, après chute des feuilles symptomatiques, aucun symptôme n'a été observé à partir de la cinquième semaine.

Les masses totales finales des plants dépendent très fortement du poids initial de la graine (Fig. 2D). Ceci est vrai pour toutes les variables analysées et les poids de graines ont donc été entrées en co-variable dans toutes les analyses réalisées. Les masses totales finales des plants ne sont pas significativement différentes entre les trois conditions (sol de tache, sol hors tache et témoins) ($p=0.2$) (fig 2A), de même que la biomasse de fines racines des plants ($p=0.6$) (fig 2B). En revanche, le ratio racines mortes/racines

vivantes est significativement plus élevé chez les plants inoculés par des sols de Paracou (de tache et hors tache) que chez les plants témoins (fig 2C). Ceci explique l'effet significatif du traitement sur ce paramètre (Table 1). Il n'y a par contre pas de différence significative de mortalité de fines racines entre les plants semés dans les substrats ensemencés avec du sol prélevé sous les houppiers de Wacapou et ceux ensemencés avec du sol prélevé loin des Wacapou ($p = 0.124$). Aucune lésion n'a été observée sur les racines grossières, que cela soit dans les modalités impliquant du sol provenant des taches de Wacapou, les modalités impliquant du sol prélevé loin des Wacapou ou bien les modalités témoins.

Discussion & conclusions

Un possible effet des pathogènes du sol est donc observable dans le ratio racines mortes/racines vivantes entre plants témoins et plants inoculés. Cette différence suggère qu'il existe peut-être un effet de la flore microbiologique du sol. Cependant, l'absence de mortalité et de symptôme sur les parties aériennes et les racines maîtresses, et la similarité des croissances des plants témoins, comme de ceux confrontés à la microflore tellurique de Paracou, ne viennent pas appuyer ce constat. En revanche, si cet effet existe, aucune dépendance à la distance à l'arbre mère n'a été mise en évidence dans cette expérience. Par conséquent, notre expérimentation ne permet pas de documenter l'existence d'une mortalité distance-dépendante due à des pathogènes du sol sur le Wacapou.

L'inoculation partielle de sols de forêt dans des sols stérilisés ne semble pas être problématique pour l'obtention de symptôme dus à des Oomycètes du sol, en particulier si des ennoyages sont réalisés (Reeksting *et al.* 2014). Il s'agit d'une procédure classique d'inoculation. Toutefois, le résultat dépend fortement de la présence et de la concentration de l'inoculum présent initialement dans le sol. Comme nous ne connaissons pas l'agent pathogène potentiel, cette donnée est inconnue. Il reste possible que l'inoculum n'ait été présent qu'en quantité très faible et que deux cycles d'ennoyage n'aient pas été suffisants pour induire des lésions significatives du système racinaire fin. Ceci est toutefois peu vraisemblable, vu l'absence totale de toute trace d'infection sur les racines fines ou les pivots. En conséquence, les Oomycètes présents dans les sols de Paracou ne semblent que peu ou pas affecter les

plantules de Wacapou, ce qui suggère des mécanismes dépendants à la distance créés par d'autres pathogènes, fongiques et/ou aériens, ou bien des mécanismes davantage dépendants de la densité que de la distance. Cette expérience exclut tous les éventuels pathogènes aériens présents dans la forêt, et l'ennoyage n'active pas forcément les pathogènes fongiques. Liu *et al.* (2011) trouvent que le fait de planter 12 plantules de *Castanopsis fissa* dans des pots inoculés par sols conspécifiques (de manière similaire à notre expérience), augmente significativement la mortalité par rapport à des pots où seules 4 plantules sont plantées. Ainsi, le fait de ne mettre qu'un seul plant par pot a également pu empêcher la création de mortalités densité-dépendantes. Il serait donc nécessaire de répéter l'expérience en réalisant une gamme de densité croissante de plants dans les pots, comme variable supplémentaire.

Les causes exactes ayant mené aux résultats négatifs de cette expérience requièrent donc plus d'expérimentations pour être identifiées. On peut en tirer la conclusion que les Oomycètes du sol ne sont vraisemblablement pas à l'origine de mortalités distance-dépendantes chez le Wacapou. D'autre part, les modalités expérimentales classiques utilisées pour mettre en évidence des mécanismes de feedback négatifs par sélection de microflore tellurique délétère restent complexes et donc peu prometteuses pour comprendre le recrutement du Wacapou à Paracou.

Références

Forget, P.-M. (1997). Ten years seedlings dynamics in *Vouacapoua americana* in French Guiana: an hypothesis. *Biotropica* 29: 124-126.

Liu, X., Etienne, R. S., Liang, M., Wang, Y., & Yu, S. (2011). *Experimental evidence for an intraspecific Janzen-Connell effect mediated by soil biota. Ecology*, 96(3), 662–671. doi:10.1890/14-0014.1

Reeksting, B. J., Coetzer, N., Mahomed, W., Engelbrecht, J., & van den Berg, N. (2014). De novo sequencing, assembly, and analysis of the root transcriptome of *Persea americana* (Mill.) in response to *Phytophthora cinnamomi* and flooding. *PloS one*, 9(2), e86399.doi:10.1371/journal.pone.0086399

Schupp, E., 1992, The Janzen-Connell Model for Tropical Tree Diversity: Population Implications and the Importance of Spatial Scale. *The American Naturalist*, 140(3) : 526-530

Traissac 2003, Dynamique spatiale de *Vouacapoua Americana* (Aublet), arbre de forêt tropicale humide à repartition agrégée.

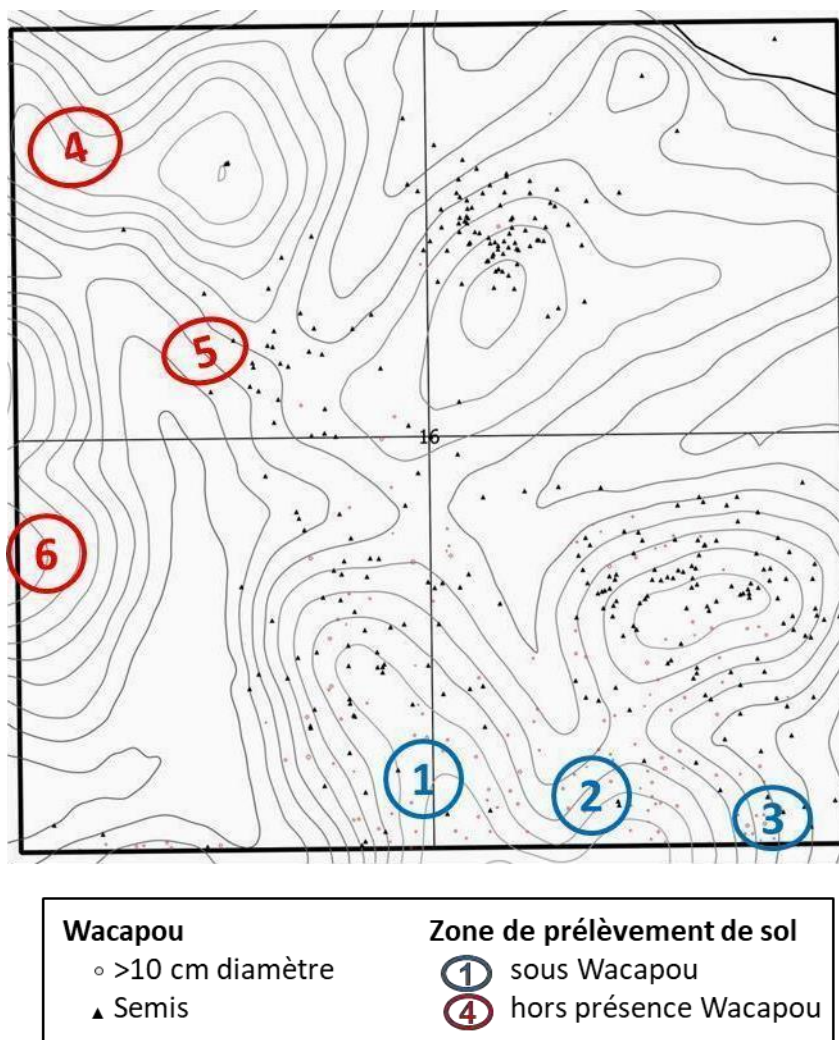


Fig.1. Localisation des prélèvements de sol dans la parcelle P6 de Paracou. Le sol a été prélevé au pied de 5 arbres dans chacune des zones de prélèvement. Le numéro correspond au numéro du bloc

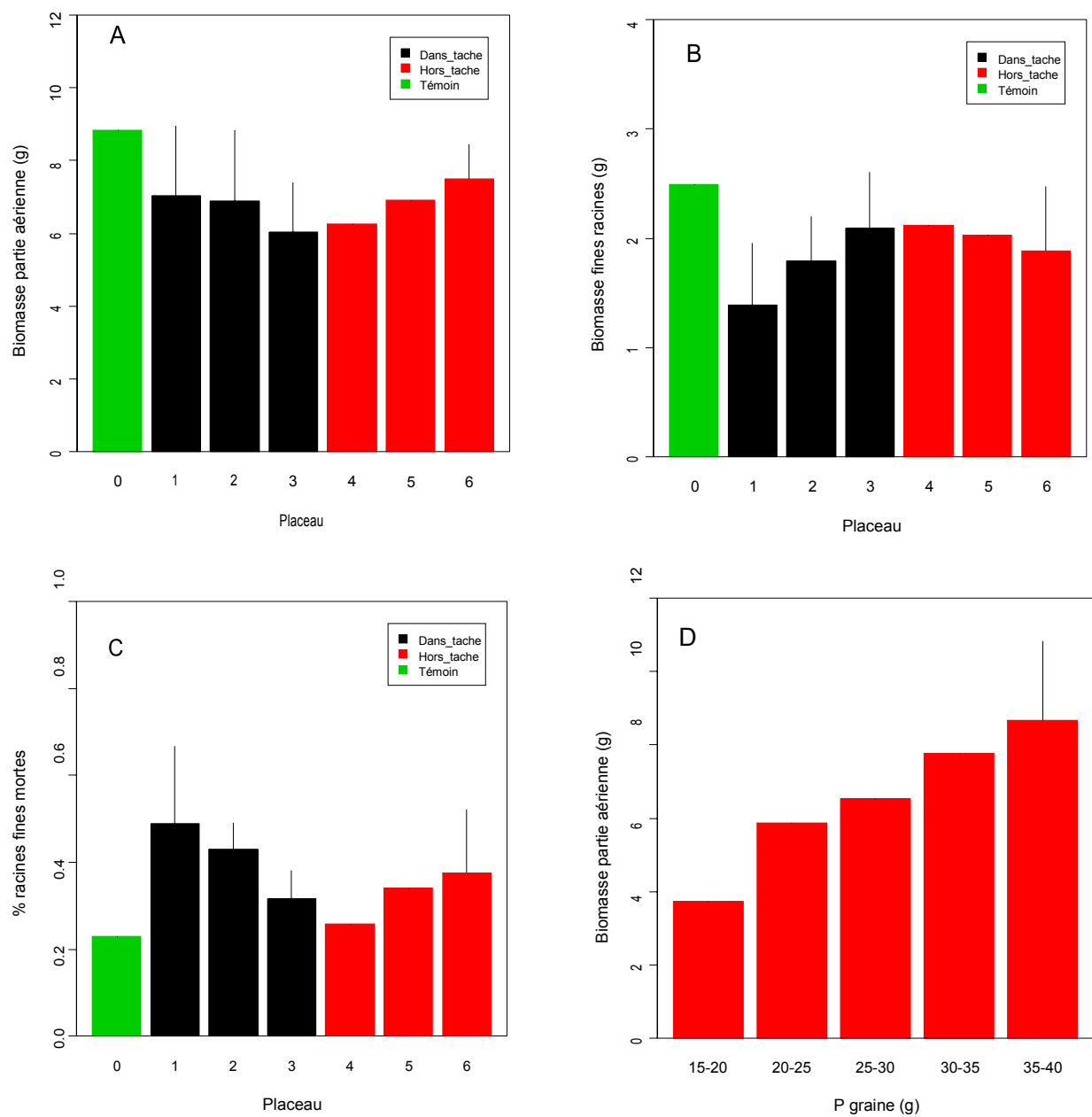


Fig 2 : (A) Biomasse moyenne en grammes des fines racines. (B) Poids de racines fines vivantes (g). (C) Pourcentage de fines racines mortes pour chaque modalité de traitement. (D) Effet du poids de la graine sur la biomasse aérienne finale

Table 1. Analyse de variance : effet des traitements sur la biomasse dDes parties aériennes (A), des racines fines (de moins de 1mm, B) et de la proportion de racine mortes (C). La proportion de racines mortes a été transformée en prenant le log avant analyse pour normalisation.

	Sum Square	df	F value	Pvalue
A				
Poids graine	57.1	1	10.20	0.002
Traitement (loin ou sous les Wacapou, témoin)	5.2	2	0.46	0.632
Bloc (Traitement)	19.2	6	0.57	0.752
Residuals	291.0	53		
B				
Poids graine	5.6	1	8.75	0.005
Traitement (loin ou sous les Wacapou, témoin)	1.4	2	1.11	0.336
Bloc (Traitement)	5.2	6	1.34	0.254
Residuals	33.9	53		
C				
Poids graine	0.16	1	0.92	0.340
Traitement (loin ou sous les Wacapou, témoin)	1.75	2	4.99	0.010
Bloc (Traitement)	1.35	6	1.29	0.280
Residuals	9.28	53		

modalité 6	14	9	5
	13	8	4
	12	T6	3
	11	7	2
	10	6	1
modalité 4	14	9	5
	13	8	4
	12	T5	3
	11	7	2
	10	6	1
modalité 3	14	9	5
	13	8	4
	12	T4	3
	11	7	2
	10	6	1
modalité 5	14	9	5
	13	8	4
	12	T3	3
	11	7	2
	10	6	1
modalité 1	14	9	5
	13	8	4
	12	T2	3
	11	7	2
	10	6	1
modalité 2	14	9	5
	13	8	4
	12	T1	3
	11	7	2
	10	6	1

A



B

Fig S1 : (A) Plan de la serre. Les modalités 1, 2 et 3 sont les plants inoculés par du sol en tache ; les modalités 4, 5 et 6 les plants inoculés par du sol hors tache. Chaque chiffre correspond à une classe de poids : les plants 5 correspondent à des graines de 15 à 20 grammes ; les plants 2 et 11 à des graines de 20 à 25 grammes ; les plants 3, 7, 9, 10, 12 à des graines de 25 à 30 grammes ; les plants 1, 4, 11, 14 et T (témoins) à des graines de 30 à 35 grammes ; et les plants 6 et 8 à des graines de 35 à 40 grammes. Les plants « T » sont les plants témoins n'ayant pas été inoculés par du sol de forêt de Paracou. (B) Photos des plants de Wacapou en serre.

DISCUSSION & CONCLUSIONS

Validation d'outils et méthodes permettant de décrire les communautés d'Oomycètes

Le premier objectif de cette thèse était de développer des outils et méthodes permettant d'analyser les communautés de *Phytophthora* et d'Oomycètes à partir de sol dans les forêts de Guyane. Dans le premier chapitre, l'efficacité d'amplification de nos jeux d'amorces pour décrire les communautés de *Phytophthora* a été démontrée sur une communauté artificielle de *Phytophthora*, ainsi que sur les ADN extraits de sols de forêts tempérées (Legeay *et al.*, 2019). L'efficacité des amorces ciblant les Péronosporomycètes n'a pas été prouvée de manière aussi catégorique, puisque la communauté artificielle n'était composée que d'extraits d'ADN de *Phytophthora*. Toutefois, les tests sur des sols forestiers montrent que nos amorces permettent de détecter de nombreuses espèces de *Pythium*, et qu'elles offrent une spécificité adéquate vis à vis de la communauté visée. Ces amorces sont les premières à notre connaissance à amplifier spécifiquement les Péronosporomycètes.

Les approches par metabarcoding se sont aussi montrées cohérentes avec les approches par piégeage/isolément dans les sols de Guyane, ce qui nous a conduit à considérer le metabarcoding comme une méthode valable et efficace pour décrire les communautés de *Phytophthora* dans ces sols (voir Figure 1). Comme les communautés que nous avons étudiées montraient une diversité assez pauvre, cette assertion n'est toutefois pas généralisable à d'autres environnements qui montreraient une communauté de *Phytophthora* plus diverse, et qui requerraient leur propre comparaison de méthodes. Bien que l'approche par piégeage/isolément reste plus laborieuse et longue que le metabarcoding, elle augmentait la proportion d'espèces rares retrouvées, mais sans pour autant augmenter la diversité totale. Il est possible que cet effet soit un biais de l'expérimentateur qui a tendance à davantage sélectionner les espèces rares lors de l'examen visuel des ré-isoléments (sous-cultures des souches). En conséquence, le coût supplémentaire en temps posé par le piégeage/isolément ne paraît pas forcément nécessaire pour ce type d'étude. Les amorces spécifiques des Péronosporomycètes se sont également montrées a priori satisfaisantes, permettant de décrire une trentaine d'espèces d'Oomycètes dans les sols et litières étudiés dans le chapitre 3.

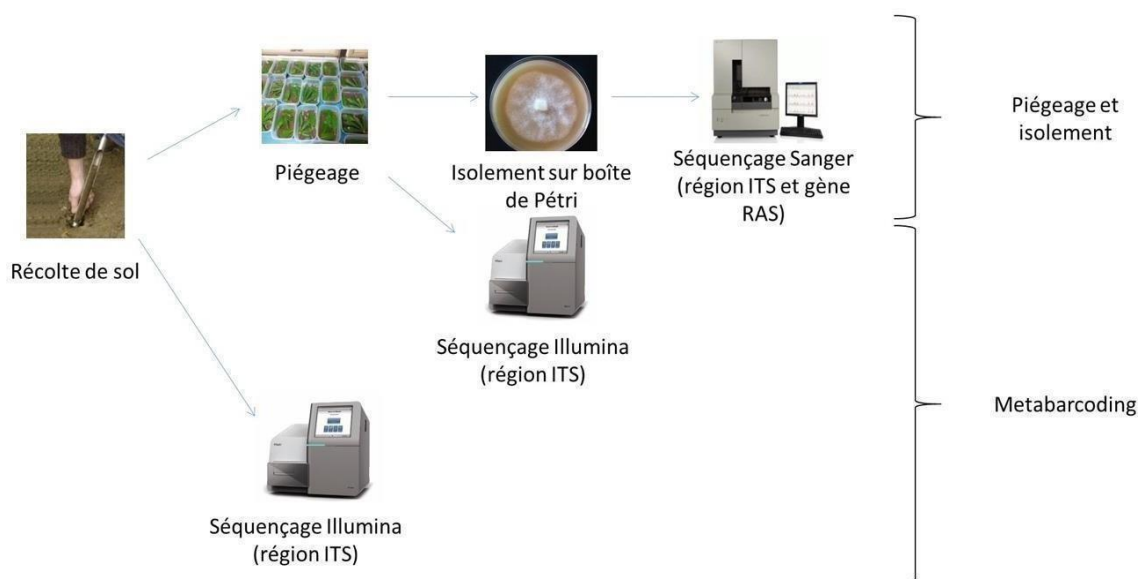


Figure 1 : Schéma des différentes méthodes employées pour étudier les communautés de *Phytophthora*. Le metabarcoding a été pratiqué à la fois sur les feuilles pièges et sur les échantillons de sol. Ces trois méthodes ont donné des résultats globalement similaires, avec pour chaque méthode une espèce rare particulière seulement détectée par cette méthode.

En revanche, ces deux chapitres confirment le fait que la région ITS1 n'est pas un barcode optimal pour décrire les oomycètes, en particulier parce qu'il discrimine imparfaitement les espèces de *Phytophthora*. En effet, le premier chapitre a montré que l'ITS1 n'était pas suffisamment polymorphe pour discriminer plusieurs espèces proches (*P. uniformis*, *P. fragariae* et *P. europeae*). Cette observation s'est vue confirmée par les analyses phylogénétiques sur 5 marqueurs génétiques d'isolats de *Phytophthora* du clade 5, dans le chapitre 2, où il s'est avéré que l'on avait probablement affaire à des complexes d'espèces non résolus par le marqueur ITS. Ce manque de discrimination de l'ITS entre les espèces du clade 5 n'est pas nouveau et avait déjà été remarqué sur trois espèces par Weir *et al.* (2015). Par conséquent, nos amorces sont capables de couvrir la diversité des séquences ITS correspondant aux *Phytophthora* d'un milieu, mais elles restent tout de même soumises à leurs limites intrinsèques de résolution d'espèce. Il serait donc utile de chercher de nouveaux marqueurs permettant

à la fois d'amplifier de manière satisfaisante les communautés de *Phytophthora* et de discriminer pleinement les espèces les composant. Parmi les marqueurs utilisés dans le chapitre 2, le gène Enolase était celui qui montrait le plus de discrimination entre les groupes de *Phytophthora* du clade 5. Cependant, sa présence en simple copie dans le génome de *Phytophthora* peut poser problème pour la détection d'espèces en faible quantité à partir de sols ; en revanche cela peut être un avantage si on cherche à faire des analyses quantitatives des communautés (Větrovský et al., 2016 ; Pérez-Izquierdo et al., 2017).

Une autre observation issue du chapitre 2 est qu'il existait de fortes incongruences entre les phylogénies établies par marqueurs mitochondriaux et marqueurs nucléaires, ce phénomène pouvant, de manière hypothétique, s'expliquer par des hybridations (Bachtrog *et al.*, 2006). Ce type d'incongruences et certaines limites d'utilisation des marqueurs mitochondriaux ont été déjà rapportés chez d'autres organismes (Hurst *et al.*, 2005 ; Rubinoff *et al.*, 2005). En conséquence, il paraît aussi nécessaire de prendre certaines précautions si l'on utilise les marqueurs mitochondriaux pour établir des phylogénies de *Phytophthora*, en particulier ceux du clade 5.

Faible diversité des *Phytophthora* et des pathogènes - Dominance du complexe *P. heveae*

L'un des résultats majeurs de cette thèse, confirmé dans plusieurs sites (CSG, Laussat et Paracou) et sur différentes essences forestières et types de sol, est la faible diversité des *Phytophthora* en Guyane, et surtout l'extrême dominance ubiquitaire du complexe d'espèce *P. heveae*. Il n'existe pas, à ma connaissance, d'environnement naturel dans lequel une telle dominance d'un complexe d'espèces de *Phytophthora* a été observé. Ce résultat n'apparaît pas dû à un biais de méthode, étant donné qu'il a été retrouvé à la fois par metabarcoding et par piégeage / isolement. Il faut toutefois noter que la phylogénie du complexe d'espèces *P. heveae* n'a pas été complètement résolue, et par conséquent, on ne sait pas exactement combien de taxons se retrouvent sous le nom « *P. heveae* ». La température optimale de croissance des *Phytophthora* étant l'un des facteurs abiotiques les plus significatifs de leur répartition (Fodor 2011), ce facteur climatique pourrait expliquer, en partie, cette faible diversité. En particulier, la

faible variation thermique des forêts de Guyane par rapport aux forêts tempérées pourrait rendre possible la dominance de quelques espèces de *Phytophthora*. Par ailleurs, à petite échelle dans la plantation de Paracou, on n'observe aucun effet hôte, bien que l'étude soit faite en plantation monospécifique. D'autres hypothèses explicatives peuvent être envisagées, comme la faible anthropisation des forêts guyanaises, ou le remplacement des espèces indigènes de *Phytophthora* par des espèces invasives. Ces hypothèses seront abordées plus loin dans les paragraphes suivants.

L'espèce/complexe d'espèces dominant, *P. heveae*, est souvent cité dans la littérature comme étant présent au pied d'arbres sans causer de symptômes (Zeng *et al.* 2009, Jung *et al.* 2016, Ko *et al.* 2006). Des symptômes divers sont parfois décrits dans la littérature, comme par exemple des atteintes de fruits sur avocatier (Ochoa-Ascencio *et al.*, 2011) ou sur cacaotier (Turner, 1968), des chancres de tiges sur avocatier (Zentmyer *et al.* 1978), ou encore des fontes de semis sur des espèces d'arbres néo-tropicaux (Davidson *et al.* 2000). En revanche, contrairement à ce qu'indique son nom, sa pathogénicité sur Hévée a été invalidée (Chee 1970). Par conséquent, le pouvoir pathogène des espèces de ce complexe n'est pas clairement défini, et nous ne pouvons pas en particulier connaître via la littérature le mode de dispersion de ces taxons (aérien ou tellurique). De même, *P. castaneae* est également retrouvé au pied d'arbres sains (Zeng *et al.* 2009, Jung *et al.* 2016, Ko *et al.* 2006), toujours en association à *P. heveae*, et les uniques atteintes documentées de ce taxon sont des pourritures du tronc sur des châtaigniers du Japon (Katsura 1976). En conséquence, ces espèces du clade 5 semblent surtout être des agents pathogènes peu agressifs et assez généralistes, pouvant être présents dans de nombreux sols tropicaux mais sans causer beaucoup de symptômes. Il faut toutefois noter que l'espèce *P. agathidicida*, autrefois identifiée comme *P. castaneae*, cause d'importants dépérissements en Nouvelle-Zélande sur l'espèce *Agathis australis* (Weir *et al.*, 2015). En conclusion, la dominance du complexe *P. heveae* dans les sols des forêts étudiées paraît donc plus liée à une capacité à investir le sol et à un comportement généraliste qu'à un pouvoir pathogène fort.

La diversité que nous avons observée dans les sols de Guyane diffère de celle observée par Wallace (2015) dans les forêts néo-tropicales au Costa Rica. Celui-ci observe en moyenne 6 espèces par site, ce qui est très proche de ce que nous avons observé en Guyane, avec 5 espèces par site. Par contre, sur

l'ensemble des 10 sites observés au Costa Rica, Wallace a identifié un total de 27 espèces. Par conséquent, il observe une diversité alpha similaire à la nôtre mais une diversité bêta supérieure. Par ailleurs, la composition des communautés est également différente, les espèces *P. heveae*, *P. castaneae* et *P. cinnamomi*, étant présentes dans les milieux qu'il étudie, mais de façon beaucoup plus marginale. Ceci peut s'expliquer par le fait que Wallace ait étudié une plus grande diversité de milieux, avec en particulier les forêts d'altitude, dans lesquelles il a observé la plus grande partie de la diversité en *Phytophthora*.. De plus, Wallace a principalement décrit les *Phytophthora* dans des niches écologiques différentes, à savoir des plantes vivantes, des feuilles tombées à terre et au sein des cours d'eau. Ses résultats ne sont donc pas pleinement comparables aux nôtres et il est difficile de conclure que les forêts néo-tropicales du Costa-Rica présentent des communautés de *Phytophthora* beaucoup plus diverses que celle de Guyane française. Une détection de la présence de *Phytophthora* directement dans les tissus des plantules nous aurait peut-être permis de révéler une diversité de *Phytophthora* plus forte dans nos sites Guyanais.

Au vu des autres études portant sur les communautés de *Phytophthora* dans les sols de forêt tropicales (Zeng *et al.* 2009, Jung *et al.* 2016, Burgess *et al.* 2017), toutes situées dans la zone Asie/Australie, on note une similarité des principales espèces en tête des communautés, en particulier le trio « *P. heveae*/*P. castaneae*/*P. cinnamomi* » se retrouvant dans toutes ces études. On peut également citer les travaux de Ko *et al.* (2006) qui trouvent *P. castaneae* et *P. heveae* en milieu naturel à Taiwan. Cette similarité dans des endroits très éloignés permet de supposer que les différences de composition des communautés observées par Wallace (2015) sont principalement dues à la différence de milieux échantillonnés. La concordance d'espèces entre l'Australie, l'Asie et la Guyane est cependant assez surprenante étant donné que ces trois zones tropicales sont localisées sur trois continents différents. Deux hypothèses peuvent être proposées : en premier lieu, on peut envisager une invasion biologique dans un sens ou dans l'autre. Si de telles invasions ont eu lieu, on peut éventuellement s'attendre à des perturbations des mécanismes Janzen-Connell dans les forêts envahies, et cela peut être un facteur explicatif de la faible diversité que nous avons observée. Cette hypothèse paraît vraisemblable pour *P. cinnamomi* en Guyane, dans la mesure où cette espèce ne montre aucun polymorphisme dans les marqueurs génétiques étudiés.

L'unique type sexuel de *P. cinnamomi* retrouvé est A2, celui associé aux invasions de *P. cinnamomi* (Jung *et al.* 2013). En revanche, étant donné que nous avons décrit « *P. heveae* » et « *P. castaneae* » comme des complexes d'espèces en Guyane, il paraît possible que nous n'ayons en fait pas affaire aux même espèces du clade 5 en Asie/Australie et en Amérique. La deuxième hypothèse serait donc que ce que l'on identifie comme *P. heveae* et *P. castaneae* soit en fait soumis à une spéciation cryptique entre ces deux zones. Cela nous ramène à l'utilité de développer d'autres marqueurs plus discriminants sur les *Phytophthora*, en particulier, pour notre cas, ceux du clade 5. Dans tous les cas, il est remarquable que les communautés de *Phytophthora* des régions tropicales du globe soient apparentées.

Toutefois, la diversité en Guyane reste faible par rapport aux trois études précédemment citées sur des sols de forêt tropicale (Zeng *et al.* 2009, Jung *et al.* 2016, Burgess *et al.* 2017). Une piste explicative serait la faible anthropisation de ces forêts, et sa récence historique. La Guyane est en effet assez peu exploitée en sylviculture, et protégée contre un changement d'usage des sols orienté vers l'agriculture. Un fort niveau d'anthropisation peut être corrélé à une plus forte diversité (Dale 2018, Redondo *et al.* 2018 a-b). Toutefois, à l'inverse, Bose *et al.* 2018 ont trouvé que les environnements naturels d'Afrique du Sud contenaient une diversité plus importante de *Phytophthora* que les plantations monospécifiques. Enfin, Mommer *et al.* (2018) trouvent que des plantations monospécifiques d'herbacées sont plus riches en OTUs pathogènes que les plantations plus diverses en espèces. Cet aspect « anthropisation » n'a pas pu être testé dans cette thèse, toutefois, nous pouvons nous aventurer à quelques observations sur les différences entre la parcelle de forêt naturelle P16 et les plantations monospécifiques dans le chapitre 3. En effet, une plus grande diversité d'Oomycètes est observée dans la plantation, entretenue annuellement pendant plusieurs décennies par le CIRAD. En revanche, l'indice de diversité de Shannon est plus élevé dans la P16. On aurait donc a priori un effet croisé de la diversité en arbres et de l'anthropisation, qui auraient toutes deux le potentiel d'augmenter la diversité en Oomycètes.

Facteurs structurant les communautés d'Oomycètes et de Champignons pathogènes

On a vu dans le chapitre 2 que le type d'environnement (terre ferme, sable blanc, bas-fonds) a plus d'effets sur la quantité de *Phytophthora* spp. que sur la composition des communautés, comme illustré par les environnements de terre ferme présentant la quantité la plus élevée de *Phytophthora*. Les environnements de bas-fonds inondés en saison humide ont toutefois un effet positif sur la diversité en espèces de *Phytophthora*, même si les communautés restent plutôt uniformes entre ces trois environnements. Le fait que les sables blancs semblent être l'environnement le moins propice aux *Phytophthora* pourrait être lié à leur pH plus élevé que les deux autres environnements (Randall 2017), les *Phytophthora* étant en général affectés négativement par les pH acides (Jung et al. 2000), et à une capacité de drainage élevé du sable. Une hypothèse serait donc que les sites à terre ferme sont très propices à la survie et la multiplication des *Phytophthora* et que l'inoculum se disperse ensuite via les fortes précipitations lors des saisons humides et le ruissellement vers les sites à proximité, engendrant une homogénéisation de la diversité des espèces dans les trois milieux étudiés. Les *Phytophthora* produisent des zoospores mobiles qui se disséminent aisément via les eaux de ruissellement (Erwin & Ribeiro 1996). Aucune espèce ne paraît spécialiste d'un des trois environnements, même si les espèces putatives des complexes « *P. castaneae* » et « *P. heveae* » montrent une préférence pour certains environnements. Les espèces putatives du clade 5 montreraient donc une certaine structuration de leurs communautés, mais pas par la plante-hôte. Le comportement des autres espèces étudiées reste lui inexpliqué.

La différence entre les compartiments de la litière et du sol est bien plus marquée chez les Champignons pathogènes que chez les Oomycètes. Deux facteurs peuvent expliquer ce fait : tout d'abord, les Oomycètes sont principalement connus comme étant des pathogènes du sol. Il existe certes des espèces de *Phytophthora* à dispersion aérienne, mais ici la plupart des espèces d'oomycètes retrouvées dans la litière appartiennent aux genres *Pythium* et *Phytopythium*, qui sont plus nombreux que les *Phytophthora* reconnus comme étant des organismes telluriques. A l'inverse, les Champignons pathogènes identifiés dans la litière comptent de nombreux pathogènes foliaires pouvant très bien s'être développés sur les feuilles, comme endophytes avant qu'elles tombent dans la litière. Ainsi Guerrero et al. (2017) montrent

que la majorité des champignons retrouvés dans une litière de hêtre âgée d'un an présentent un stade endophyte. De plus, de nombreux champignons pathogènes, ou endophytes ont aussi un caractère saprophyte, pouvant ainsi évoluer du compartiment phyllosphère vers celui des litières au sol (Voříšková et al. 2013). Par ailleurs, les Oomycètes sont très mobiles grâce aux flagelles de leurs zoospores, leur permettant sûrement de passer d'un compartiment à l'autre en conditions de forte hygrométrie.

Interactions plantes-pathogènes et spécialisation

En augmentant l'échelle de l'échantillonnage et le nombre d'hôtes étudiés, un effet hôte apparaît, mais demeure faible. Ces résultats penchent fortement vers un comportement généraliste des *Phytophthora* en Guyane, bien qu'il existe tout de même probablement une certaine préférence à l'hôte. Cette préférence ne serait qu'assez peu marquée et plutôt diffuse. Ce comportement généraliste est assez cohérent avec la faible diversité mesurée en comparaison de l'extrême diversité végétale à laquelle elle est associée. Les mêmes observations sont également applicables aux *Pythium* et *Phytophythium* dans le chapitre 3, bien qu'elles ne soient pas, dans ce cas, appuyées par une analyse à grande échelle. Il faut toutefois insister sur le fait que ces résultats ne proviennent que de descriptions des communautés du sol, et n'ont pas été testés directement par des tests de pathogénie. Il est possible, par exemple, que certaines lignées à l'intérieur d'une même espèce de *Phytophthora* puissent avoir des gammes d'hôte différentes (Kröner et al. 2017).

Les agents pathogènes fongiques semblent un peu plus spécialisés que les Oomycètes, avec un effet hôte significatif mis en évidence à Paracou. Cet effet reste cependant faible et de manière générale, le comportement spécialiste des pathogènes fongiques ne semble pas non plus très appuyé. Toutefois, dans ce cas, le fait de travailler avec la base de données FunGUILD (Nguyen *et al.*, 2016) pour identifier les Champignons pathogènes limite les conclusions que l'on peut en tirer, car elle ne contient que les espèces pathogènes documentées, qui peuvent potentiellement être les espèces les plus ubiquistes et les plus généralistes de ces forêts. L'effet hôte est plus grand dans les données de l'étude de Schimann *et al.* (2017), intégrant tous les statuts écologiques et également les mOTUS dont l'écologie n'est pas

renseignée. Il est toutefois notable qu'aucune espèce réellement spécialisée n'a été identifiée, autant chez les Champignons pathogènes que chez les Oomycètes.

Dans le chapitre 4, nous avons cherché à mettre en évidence des mortalités dépendantes à la distance sur des plans de Wacapou en serre, en les inoculant avec du sol prélevé à l'intérieur ou à distance de peuplements de Wacapou. Aucune mortalité, dépérissement ou symptôme dépendant à la distance n'a été observé. Notre expérimentation d'inoculations de plants en pots par apport aux sols a montré que les plants témoins ont un ratio racines vivantes/racines mortes plus élevé. Il existe donc bien un pouvoir pathogène du sol sur les plantules de Wacapou, qui cependant demeure assez faible et n'engendre pas de fonte de semis. De plus, il est identique dans tous les sites étudiés, le ratio racines vivantes/mortes étant partout similaire. Il est vrai que le Wacapou n'est peut-être pas l'espèce d'arbre de Guyane la plus appropriée pour étudier les mécanismes Janzen-Connell. En effet, il a un comportement plutôt agrégatif (Traissac 2003). Cependant, comme de fortes mortalités de semis de Wacapou ont été observées sous les adultes conspécifiques et dans les agrégats de semis de Wacapou en milieu naturel sur le site de Paracou, il pourrait exister un mécanisme impliquant des pathogènes à l'œuvre. Les espèces non- agrégatives sont difficilement étudiables par ce type d'expérimentation, car leurs graines sont nettement plus difficiles à récolter, étant plus petites et beaucoup moins concentrées au pied de l'arbre-mère. Il serait cependant très intéressant de pouvoir mener à bien une expérience sur de telles espèces non- agrégatives, les effets de type Janzen-Connell étant potentiellement beaucoup plus forts chez elles. A l'inverse, il serait également intéressant de comparer ces résultats avec ceux d'espèces extrêmement agrégatives telles que le *Spirotropis longifolia*, qui forme des peuplements monodominants dans les forêts guyanaises (Fonty 2011).

Plusieurs facteurs peuvent être envisagés afin d'expliquer pourquoi ces pathogènes n'ont pas affecté nos plants en serre. Tout d'abord, les pathogènes aériens, qui sont potentiellement fortement impliqués dans les mortalités juvéniles de Wacapou (communication personnelle de S. Traissac), ne sont pas testés dans notre expérience, seuls les sols ayant été ramenés de forêt et utilisés pour les tests d'inoculation. A titre d'exemple, on peut citer Marcais & Desprez-Loustau (2014) sur l'oïdium du chêne, champignon pathogène aérien attaquant les plantules de chêne et pouvant significativement impacter la régénération

des chênes. D'autres organismes « ennemis des plantes », tels que les insectes, n'ont pas non plus été apportés de la forêt et donc n'ont pas été testés. La mortalité des plantes peut également potentiellement être due à diverses synergies entre différents organismes, pathogènes, ravageurs, ou bien même saprophyte (voir Suffert & Guibert 2006 pour des synergies entre espèces de *Pythium*, Deniau *et al.* 2017 pour une synergie entre champignons saprophytes et insectes ravageurs) qui ne peuvent pas être reproduites en serre.

Dans les sols contenant les plants en pot lors de cette expérimentation, seul 10 % de sol de forêt ont été ajoutés aux pots pour inoculation. L'expérimentation était principalement concentrée sur les Oomycètes pathogènes qui devaient être largement favorisés par les ennoyages de sol pratiqués (Ferguson & Jeffers 1999). Si la dynamique explosive des Oomycètes nous permet de penser que leur impact sur la survie de la plante est relativement indépendant de leur inoculum initial, ce n'est pas forcément le cas pour d'autres importants pathogènes du sol tels que les *Fusarium*. Ainsi Ben-Yephet (1996) montre que les symptômes causés par *Fusarium oxysporum* sur l'œillet sont proportionnels à l'inoculum de *Fusarium* dans le sol, et cet effet est particulièrement fort en pot. Par conséquent, l'inoculation par seulement 10

% de sol de forêt pourrait empêcher certains pathogènes d'avoir un effet sur les plantules en serre. Il faut aussi tenir compte d'une éventuelle réduction de l'inoculum au cours du temps. Ainsi, on peut voir dans les travaux de Hu *et al.* (2019) que la quantité de champignons diminue fortement à partir de 14 jours dans un sol placé en microcosme. Finalement, on peut également envisager des effets d'allélopathie en conditions naturelles, qui seraient eux aussi mitigés par la dilution du sol de forêt dans le reste du substrat.

Enfin, une autre hypothèse pourrait être que les mortalités de plantules de Wacapou dépendent fortement de la densité des semis et que la densité de racines de Wacapou dans les pots n'ait pas été suffisante. Ces effets de densité pourraient être circonscrits dans le temps à des levées de plantules (dans notre cas, en forêt, la plupart des graines de Wacapou ont pourri avant de germer, et n'ont donc peut-être pas pu activer l'inoculum du sol). Par exemple, Krishnadas *et al.* (2018) trouvent que le maintien de la diversité dans une forêt tropicale d'Inde est essentiellement dû à des mécanismes dépendants de la densité intervenant principalement lors de la transition graine-plantule. Une manière d'adresser ce problème

serait de faire des pots contenant des nombres variables de plantules, afin de pouvoir observer l'effet densité (Liu *et al.* 2015). Toutefois, les résultats de cette expérience ont tout de même un certain accord avec ceux du chapitre 2 et 3 sur les *Phytophthora* et Oomycètes, puisque on a, a priori, une communauté pathogène identique dans tous les sols de forêt, et à pouvoir pathogène probablement faible.

Dans cette thèse, en nous focalisant majoritairement sur les *Phytophthora*, peu de faits venant corroborer l'hypothèse Janzen-Connell ont donc été observés. Seules de faibles spécificités à l'hôte des Oomycètes ou des Champignons ont été démontrées (et seulement à grande échelle pour les Oomycètes). De même, aucun effet distance-dépendant des pathogènes du sol sur le Wacapou n'a été démontré. Toutefois, différents acteurs et mécanismes Janzen-Connell n'ont pas été explorés. Ainsi, les pathogènes aériens, qui peuvent potentiellement jouer un rôle important, n'ont été décrits que de manière hypothétique, dans la litière. De plus, les mécanismes de Janzen-Connell pourraient être essentiellement liés à des mécanismes dépendants à la densité, qui seraient donc plus circonscrits dans le temps aux périodes de levées de plantules. Enfin, l'utilisation de la base de données FUNGuild a pu laisser de côté de nombreux Champignons pathogènes non documentés dans cette base, en particulier pour ces organismes issus des sols néo-tropicaux. Enfin, les insectes ravageurs, voire d'autres microorganismes pathogènes comme les bactéries, les phytoplasmes ou les virus ne sont pas non plus à exclure. Pour observer réellement les bioagresseurs infectant réellement les plantules, la solution optimale serait donc de directement les observer sur les hôtes symptomatiques ou malades ; ces symptômes peuvent peut-être être obtenus en plantant directement les graines en forêt naturelle. Toutefois, les résultats de cette thèse ne nous amènent pas à considérer les Oomycètes comme de probables acteurs du maintien de la diversité végétale dans les forêts néo-tropicales.

Messages à retenir

- Nous avons développé des amorces permettant de décrire de manière satisfaisante les communautés de *Phytophthora* dans les sols, même si le marqueur ITS1 n'a parfois pas une discrimination optimale entre espèces du même clade.
- La diversité des *Phytophthora*, dans ce hotspot de diversité végétale qu'est la Guyane, est relativement faible.
- Les communautés de *Phytophthora* sont très fortement dominées par un seul complexe d'espèces : *Phytophthora heveae* et les espèces putatives lui étant rattachées.
- L'effet-hôte sur les Oomycètes pathogènes est très faible voire inexistant.
- Nous n'avons pas pu mettre en évidence une implication des Oomycètes dans la mortalité des plantules de notre espèce testée, le Wacapou.

BIBLIOGRAPHIE

- Abdullah, A.S., Moffat, C.S., Lopez-Ruiz, F.J., Gibberd, M.R., Hamblin, J., Zerihun, A., 2017. Host–Multi-Pathogen Warfare: Pathogen Interactions in Co-infected Plants. *Front. Plant Sci.* 8, 1806. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01806>
- Adler, F.R., Muller-Landau, H.C., 2005. When do localized natural enemies increase species richness? *Ecol Letters* 8, 438–447. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2005.00741.x>
- Agrios, G.N., 2005. Plant pathology, 5th ed. ed. Elsevier Academic Press, Amsterdam ; Boston.
- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., Blackwell, M., 1996. Introductory mycology, 4th ed. ed. Wiley, New York.
- Arnold, A.E., Lutzoni, F., 2007. DIVERSITY AND HOST RANGE OF FOLIAR FUNGAL ENDOPHYTES: ARE TROPICAL LEAVES BIODIVERSITY HOTSPOTS? *Ecology* 88, 541–549. <https://doi.org/10.1890/05-1459>
- Arnold, A.E., Maynard, Z., Gilbert, G.S., Coley, P.D., Kursar, T.A., 2000. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? *Ecol Letters* 3, 267–274. <https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2000.00159.x>
- Arnold, A.E., Mejia, L.C., Kylo, D., Rojas, E.I., Maynard, Z., Robbins, N., Herre, E.A., 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 15649–15654. <https://doi.org/10.1073/pnas.2533483100>
- Augspurger, C.K., Wilkinson, H.T., 2007. Host Specificity of Pathogenic *Pythium* Species: Implications for Tree Species Diversity. *Biotropica* 39, 702–708. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.2007.00326.x>
- Bachtrog, D., Thornton, K., Clark, A., Andolfatto, P., 2006. EXTENSIVE INTROGRESSION OF MITOCHONDRIAL DNA RELATIVE TO NUCLEAR GENES IN THE *DROSOPHILA YAKUBA* SPECIES GROUP. *Evolution* 60, 292–302. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2006.tb01107.x>
- Bagchi, R., Swinfield, T., Gallery, R.E., Lewis, O.T., Gripenberg, S., Narayan, L., Freckleton, R.P., 2010. Testing the Janzen-Connell mechanism: pathogens cause overcompensating density dependence in a tropical tree: Pathogens cause overcompensating dynamics. *Ecology Letters* 13, 1262–1269. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2010.01520.x>
- Balci, Y., Balci, S., Eggers, J., MacDonald, W.L., Juzwik, J., Long, R.P., Gottschalk, K.W., 2007. *Phytophthora* spp. Associated with Forest Soils in Eastern and North-Central U.S. Oak Ecosystems. *Plant Disease* 91, 705–710. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-6-0705>
- Bayandala, Fukasawa, Y., Seiwa, K., 2016. Roles of pathogens on replacement of tree seedlings in heterogeneous light environments in a temperate forest: a reciprocal seed sowing experiment. *J Ecol* 104, 765–772. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12552>
- Becklund, Kristen. (2016). Interactions among tree species and pathogen-suppressive bacteria in tropical forest soils. Retrieved from the University of Minnesota Digital Conservancy, <http://hdl.handle.net/11299/182734>.
- Belbahri, L., Moralejo, E., Calmin, G., Oszako, T., García, J.A., Descals, E., Lefort, F., 2006. *Phytophthora polonica* , a new species isolated from declining *Alnus glutinosa* stands in Poland. *FEMS Microbiology Letters* 261, 165–174. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00349.x>
- Bell, T., Freckleton, R.P., Lewis, O.T., 2006. Plant pathogens drive density-dependent seedling mortality in a tropical tree. *Ecol Letters* 9, 569–574. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.00905.x>
- Benhamou, N., le Floch, G., Vallance, J., Gerbore, J., Grizard, D., Rey, P., 2012. *Pythium oligandrum*: an example of opportunistic success. *Microbiology* 158, 2679–2694. <https://doi.org/10.1099/mic.0.061457-0>

- Ben-Yephet, Y., Shtienberg, D., 1997. Effects of the host, the pathogen, the environment and their interactions, on fusarium wilt in carnation. *Phytoparasitica* 25, 207–216. <https://doi.org/10.1007/BF02981734>
- Béreau, M., Garbaye, J., 1997. Les symbioses mycorhiziennes des arbres de la forêt tropicale humide de Guyane française. *Canadian Journal of Botany*. *Canadian Journal of Botany*. mai 1997;75(5):711-6. <https://doi.org/10.1051/forest:19940406>
- Béreau, M., Garbaye, J., 1994. First observations on the root morphology and symbioses of 21 major tree species in the primary tropical rain forest of French Guyana. *Ann. For. Sci.* 51, 407–416. <https://doi.org/10.1051/forest:19940406>
- Blair, J.E., Coffey, M.D., Park, S.-Y., Geiser, D.M., Kang, S., 2008. A multi-locus phylogeny for *Phytophthora* utilizing markers derived from complete genome sequences. *Fungal Genetics and Biology* 45, 266–277. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2007.10.010>
- Boixel, A.-L., Delestre, G., Legeay, J., Chelle, M., Suffert, F., 2019. Phenotyping Thermal Responses of Yeasts and Yeast-like Microorganisms at the Individual and Population Levels: Proof-of-Concept, Development and Application of an Experimental Framework to a Plant Pathogen. *Microb Ecol* 78, 42–56. <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1253-6>
- Bose, T., Wingfield, M.J., Roux, J., Vivas, M., Burgess, T.I., 2018. Community composition and distribution of *Phytophthora* species across adjacent native and non-native forests of South Africa. *Fungal Ecology* 36, 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2018.09.001>
- Brown, J.H., 2014. Why are there so many species in the tropics? *J. Biogeogr.* 41, 8–22. <https://doi.org/10.1111/jbi.12228>
- Buée, M., De Boer, W., Martin, F., van Overbeek, L., Jurkevitch, E., 2009. The rhizosphere zoo: An overview of plant-associated communities of microorganisms, including phages, bacteria, archaea, and fungi, and of some of their structuring factors. *Plant Soil* 321, 189–212. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-9991-3>
- Burgess, T.I., McDougall, K.L., Scott, P.M., Hardy, G.E.St.J., Garnas, J., 2019. Predictors of *Phytophthora* diversity and community composition in natural areas across diverse Australian ecoregions. *Ecography* 42, 565–577. <https://doi.org/10.1111/ecog.03904>
- Burgess, T.I., White, D., McDougall, K.M., Garnas, J., Dunstan, W.A., Català, S., Carnegie, A.J., Worboys, S., Cahill, D., Vettraino, A.-M., Stukely, M.J.C., Liew, E.C.Y., Paap, T., Bose, T., Migliorini, D., Williams, B., Brigg, F., Crane, C., Rudman, T., Hardy, G.E.St.J., 2017. Distribution and diversity of *Phytophthora* across Australia. *Pac. Conserv. Biol.* 23, 150. <https://doi.org/10.1071/PC16032>
- de Carvalho, A.L.G., de Britto, M.R., Fernandes, D.S., 2013. Biogeography of the Lizard Genus *Tropidurus* Wied-Neuwied, 1825 (Squamata: Tropiduridae): Distribution, Endemism, and Area Relationships in South America. *PLoS ONE* 8, e59736. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059736>
- Catalá García, S., 2017. Development of DNA massive sequencing techniques and Real-Time PCR for the detection, identification and quantitation of *Phytophthora* spp. in environmental samples. Universitat Politècnica de València, Valencia (Spain). <https://doi.org/10.4995/Thesis/10251/90644>
- Català, S., Pérez-Sierra, A., Abad-Campos, P., 2015. The Use of Genus-Specific Amplicon Pyrosequencing to Assess *Phytophthora* Species Diversity Using eDNA from Soil and Water in Northern Spain. *PLoS ONE* 10, e0119311. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119311>
- Chee K. H. *Phytophthora Heveae* and *Pythium Vexans* of *Hevea* ,1970. *Rubb. Res, Inst. Malaya*, **23(1)**,13- 14

- Choi, Y.-J., Beakes, G., Glockling, S., Kruse, J., Nam, B., Nigrelli, L., Ploch, S., Shin, H.-D., Shivas, R.G., Telle, S., Voglmayr, H., Thines, M., 2015. Towards a universal barcode of oomycetes - a comparison of the *cox 1* and *cox 2* loci. *Mol Ecol Resour* 15, 1275–1288. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12398>
- Coffua, L.S., Veterano, S.T., Clipman, S.J., Mena-Ali, J.I., Blair, J.E., 2016. Characterization of *Pythium* spp. Associated with Asymptomatic Soybean in Southeastern Pennsylvania. *Plant Disease* 100, 1870–1879. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-15-1355-RE>
- Coince, A., Caël, O., Bach, C., Lengellé, J., Cruaud, C., Gavory, F., Morin, E., Murat, C., Marçais, B., Buée, M., 2013. Below-ground fine-scale distribution and soil versus fine root detection of fungal and soil oomycete communities in a French beech forest. *Fungal Ecology* 6, 223–235. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2013.01.002>
- Comita, L.S., Queenborough, S.A., Murphy, S.J., Eck, J.L., Xu, K., Krishnadas, M., Beckman, N., Zhu, Y., Gómez-Aparicio, L., 2014. Testing predictions of the Janzen-Connell hypothesis: a meta-analysis of experimental evidence for distance- and density-dependent seed and seedling survival. *J. Ecol.* 102, 845–856. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12232>
- Cooke, D.E.L., Drenth, A., Duncan, J.M., Wagels, G., Brasier, C.M., 2000. A Molecular Phylogeny of *Phytophthora* and Related Oomycetes. *Fungal Genetics and Biology* 30, 17–32. <https://doi.org/10.1006/fgbi.2000.1202>
- Dale, J.M., 2018, Using genomic data to understand anthropogenic influences on Oomycete and *Phytophthora* communities, and the evolution of an alien invasive species responsible for sudden oak death, *Phytophthora ramorum*, <https://doi.library.ubc.ca/10.14288/1.0365770>
- Davidson, J.M., Rehner, S.A., Santana, M., Lasso, E., Ureña de Chapet, O., Herre, E.A., 2000. First Report of *Phytophthora heveae* and *Pythium* spp. on Tropical Tree Seedlings in Panama. *Plant Disease* 84, 706–706. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.6.706C>
- de Cock, A.W. a. M., Lodhi, A.M., Rintoul, T.L., Bala, K., Robideau, G.P., Abad, Z.G., Coffey, M.D., Shahzad, S., Lévesque, C.A., 2015. *Phytophthora*: molecular phylogeny and systematics. *Persoonia* 34, 25–39. <https://doi.org/10.3767/003158515X685382>
- Delaye, L., García-Guzmán, G., Heil, M., 2013. Endophytes versus biotrophic and necrotrophic pathogens—are fungal lifestyles evolutionarily stable traits? *Fungal Diversity* 60, 125–135. <https://doi.org/10.1007/s13225-013-0240-y>
- Deniau, M., Jung, V., Le Lann, C., Kellner, H., Béchade, B., Morra, T., Prinzing, A., 2018. Janzen-Connell patterns can be induced by fungal-driven decomposition and offset by ectomycorrhizal fungi accumulated under a closely related canopy. *Funct Ecol* 32, 785–798. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13003>
- Denslow, J.S., 1987. Tropical Rainforest Gaps and Tree Species Diversity. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18, 431–451. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.18.110187.002243>
- Dick, M.W., Ali-Shtayeh, M.S., 1986. Distribution and frequency of *Pythium* species in parkland and farmland soils. *Transactions of the British Mycological Society* 86, 49–62. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(86\)80117-6](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(86)80117-6)
- Doumbou, C.L., Hamby Salove, M.K., Crawford, D.L., Beaulieu, C., 2001. Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. *Phytoprotection* 82, 85. <https://doi.org/10.7202/706219ar>
- Edgar, R.C., 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26, 2460–2461. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461>

- Elegbede CF, Pierrat J-C, Aguayo J, Husson C, Halkett F, Marçais B. A Statistical Model to Detect Asymptomatic Infectious Individuals with an Application in the *Phytophthora alni* -Induced Alder Decline, 2010, *Phytopathology*;100(11):1262-9.
- Ferguson, A.J., Jeffers, S.N., 1999. Detecting Multiple Species of *Phytophthora* in Container Mixes from Ornamental Crop Nurseries. *Plant Disease* 83, 1129–1136. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1999.83.12.1129>
- Fonty E., 2011, Etude de l'écologie du *Spirotropis longifolia* DC Baill. (Leguminosae-Papilionoideae), espèce monodominante dans les forêts de Guyane Française
- Fricke, E.C., Tewksbury, J.J., Rogers, H.S., 2014. Multiple natural enemies cause distance-dependent mortality at the seed-to-seedling transition. *Ecol Lett* 17, 593–598. <https://doi.org/10.1111/ele.12261>
- Fröhlich, J., Hyde, K.D., Petrini, O., 2000. Endophytic fungi associated with palms. *Mycological Research* 104, 1202–1212. <https://doi.org/10.1017/S095375620000263X>
- García-Guzmán, G., Espinosa-García, F.J., 2011. Incidence of Fungal Necrotrophic and Biotrophic Pathogens in Pioneer and Shade-tolerant Tropical Rain Forest Trees: Fungal Pathogens in Tropical Rain Forest Trees. *Biotropica* 43, 604–611. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.2011.00758.x>
- García-Guzmán, G., Heil, M., 2014. Life histories of hosts and pathogens predict patterns in tropical fungal plant diseases. *New Phytol* 201, 1106–1120. <https://doi.org/10.1111/nph.12562>
- Gaston, K.J., 2000. Global patterns in biodiversity. *Nature* 405, 220–227. <https://doi.org/10.1038/35012228>
- Gentry, A. H., 1988. Tree species richness of upper Amazonian forests. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85, 156–159. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.1.156>
- Gentry, Alwyn H., 1988. Changes in Plant Community Diversity and Floristic Composition on Environmental and Geographical Gradients. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 75, 1. <https://doi.org/10.2307/2399464>
- Gentry, A.H., 1982. Neotropical Floristic Diversity: Phytogeographical Connections Between Central and South America, Pleistocene Climatic Fluctuations, or an Accident of the Andean Orogeny? *Annals of the Missouri Botanical Garden* 69, 557. <https://doi.org/10.2307/2399084>
- Ghimire, S.R., Richardson, P.A., Moorman, G.W., Lea-Cox, J.D., Ross, D.S., Hong, C.X., 2009. An *in-situ* baiting bioassay for detecting *Phytophthora* species in irrigation runoff containment basins. *Plant Pathology* 58, 577–583. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2008.02016.x>
- Gilbert, G.S., 1996. A Canker Disease of Seedlings and Saplings of *Tetragastris panamensis* (Burseraceae) Caused by *Botryosphaeria dothidea* in a Lowland Tropical Forest. *Plant Dis.* 80, 684. <https://doi.org/10.1094/PD-80-0684>
- Gilbert, G.S., Foster, R.B., Hubbell, S.P., 1994. Density and distance-to-adult effects of a canker disease of trees in a moist tropical forest. *Oecologia* 98, 100–108. <https://doi.org/10.1007/BF00326095>
- Godfray, H.C., Lewis, T., Memmott, J., 1999. Studying insect diversity in the tropics. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 354, 1811–1824. <https://doi.org/10.1098/rstb.1999.0523>
- Gripenberg, S., Bagchi, R., Gallery, R.E., Freckleton, R.P., Narayan, L., Lewis, O.T., 2014. Testing for enemy-mediated density-dependence in the mortality of seedlings: field experiments with five Neotropical tree species. *Oikos* 123, 185–193. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2013.00835.x>
- Guerreiro, M.A., Brachmann, A., Begerow, D., Peršoh, D., 2018. Transient leaf endophytes are the most active fungi in 1-year-old beech leaf litter. *Fungal Diversity* 89, 237–251. <https://doi.org/10.1007/s13225-017-0390-4>

- Hansen, D.M., Kaiser, C.N., Müller, C.B., 2008. Seed Dispersal and Establishment of Endangered Plants on Oceanic Islands: The Janzen-Connell Model, and the Use of Ecological Analogues. *PLoS ONE* 3, e2111. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002111>
- Hansen, E.M., 2015. Phytophthora Species Emerging as Pathogens of Forest Trees. *Curr Forestry Rep* 1, 16–24. <https://doi.org/10.1007/s40725-015-0007-7>
- Hansen, Everett; Reeser, Paul; Sutton, Wendy; Sims, Laura, 2014. Host and Habitat Index for Phytophthora Species in Oregon: Supplemental Spreadsheet. <https://doi.org/10.7267/n99g5jr4>
- Hardham, A.R., 2005. *Phytophthora cinnamomi*. *Mol Plant Pathol* 6, 589–604. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2005.00308.x>
- Hardham, A.R., 2001. [No title found]. *Austral. Plant Pathol.* 30, 91. <https://doi.org/10.1071/AP01006>
- Hawkins, B.A., Porter, E.E., Felizola Diniz-Filho, J.A., 2003. PRODUCTIVITY AND HISTORY AS PREDICTORS OF THE LATITUDINAL DIVERSITY GRADIENT OF TERRESTRIAL BIRDS. *Ecology* 84, 1608–1623. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2003\)084\[1608:PAHAPO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2003)084[1608:PAHAPO]2.0.CO;2)
- Hendrix, F.F., Campbell, W.A., 1973. Pythiums as Plant Pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 11, 77–98. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.11.090173.000453>
- Ho, H.-H., 2009. The genus *Pythium* in Taiwan, China (1) — a synoptic review. *Front. Biol. China* 4, 15–28. <https://doi.org/10.1007/s11515-009-0009-6>
- Hu, P., Wu, L., Hollister, E.B., Wang, A.S., Somenahally, A.C., Hons, F.M., Gentry, T.J., 2019. Fungal Community Structural and Microbial Functional Pattern Changes After Soil Amendments by Oilseed Meals of *Jatropha curcas* and *Camelina sativa*: A Microcosm Study. *Front. Microbiol.* 10, 537. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00537>
- Hurst, G.D.D., Jiggins, F.M., 2005. Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 272, 1525–1534. <https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3056>
- Hyatt, L.A., Rosenberg, M.S., Howard, T.G., Bole, G., Fang, W., Anastasia, J., Brown, K., Grella, R., Hinman, K., Kurdziel, J.P., Gurevitch, J., 2003. The distance dependence prediction of the Janzen-Connell hypothesis: a meta-analysis. *Oikos* 103, 590–602. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2003.12235.x>
- Janzen, D.H., 1970. Herbivores and the Number of Tree Species in Tropical Forests. *The American Naturalist* 104, 501–528. <https://doi.org/10.1086/282687>
- Jumpponen, A., 2001. Dark septate endophytes - are they mycorrhizal? *Mycorrhiza* 11, 207–211. <https://doi.org/10.1007/s005720100112>
- Jung, T., Blaschke, H., Osswald, W., 2000. Involvement of soilborne *Phytophthora* species in Central European oak decline and the effect of site factors on the disease. *Plant Pathology* 49, 706–718. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2000.00521.x>
- Jung, T., Chang, T.T., Bakonyi, J., Seress, D., Pérez-Sierra, A., Yang, X., Hong, C., Scanu, B., Fu, C.H., Hsueh, K.L., Maia, C., Abad-Campos, P., Léon, M., Horta Jung, M., 2017a. Diversity of *Phytophthora* species in natural ecosystems of Taiwan and association with disease symptoms. *Plant Pathol* 66, 194–211. <https://doi.org/10.1111/ppa.12564>

Jung, T., Colquhoun, I.J., Hardy, G.E.St.J., 2013. New insights into the survival strategy of the invasive soilborne pathogen *Phytophthora cinnamomi* in different natural ecosystems in Western Australia. For. Path. 43, 266–288. <https://doi.org/10.1111/efp.12025>

Jung, T., Durán, A., Sanfuentes von Stowasser, E., Schena, L., Mosca, S., Fajardo, S., González, M., Navarro Ortega, A.D., Bakonyi, J., Seress, D., Tomšovský, M., Cravador, A., Maia, C., Horta Jung, M., 2018. Diversity of *Phytophthora* species in Valdivian rainforests and association with severe dieback symptoms. For. Path. 48, e12443. <https://doi.org/10.1111/efp.12443>

Jung, T., Jung, M.H., Scanu, B., Seress, D., Kovács, G.M., Maia, C., Pérez-Sierra, A., Chang, T.-T., Chandelier, A., Heungens, K., Van Poucke, K., Abad-Campos, P., León, M., Cacciola, S.O., Bakonyi, J., 2017b. Six new *Phytophthora* species from ITS Clade 7a including two sexually functional heterothallic hybrid species detected in natural ecosystems in Taiwan. persoonia 38, 100–135. <https://doi.org/10.3767/003158517X693615>

Jung, T., Orlikowski, L., Henricot, B., Abad-Campos, P., Aday, A.G., Aguin Casal, O., Bakonyi, J., Cacciola, S.O., Cech, T., Chavarriaga, D., Corcobado, T., Cravador, A., Decourcelle, T., Denton, G., Diamandis, S., Doğmuş-Lehtijärvi, H.T., Franceschini, A., Ginetti, B., Green, S., Glavendekić, M., Hantula, J., Hartmann, G., Herrero, M., Ivic, D., Horta Jung, M., Lilja, A., Keca, N., Kramarets, V., Lyubenova, A., Machado, H., Magnano di San Lio, G., Mansilla Vázquez, P.J., Marçais, B., Matsiakh, I., Milenkovic, I., Moricca, S., Nagy, Z.Á., Nechwatal, J., Olsson, C., Oszako, T., Pane, A., Paplomatas, E.J., Pintos Varela, C., Prospero, S., Rial Martínez, C., Rigling, D., Robin, C., Rytkönen, A., Sánchez, M.E., Sanz Ros, A.V., Scanu, B., Schlenzig, A., Schumacher, J., Slavov, S., Solla, A., Sousa, E., Stenlid, J., Talgø, V., Tomic, Z., Tsopelas, P., Vannini, A., Vettraino, A.M., Wenneker, M., Woodward, S., Pérez-Sierra, A., 2016. Widespread *Phytophthora* infestations in European nurseries put forest, semi-natural and horticultural ecosystems at high risk of *Phytophthora* diseases. For. Path. 46, 134–163. <https://doi.org/10.1111/efp.12239>

Katsura, K., Two new species of *Phytophthora* causing damping-off of cucumber and trunk rot of chestnut, 1978. Trans. Mycol. Soc. Jap. 17 :238-242

Klironomos, J.N., 2002. Feedback with soil biota contributes to plant rarity and invasiveness in communities. Nature 417, 67–70. <https://doi.org/10.1038/417067a>

Ko, Wen-hsiung, Shao Yun Wang and Potashkin Judith Ann., 2006. “The Possible Origin and Relation of *Phytophthora katsurae* and *P. heveae*, Discovered in a Protected Natural Forest in Taiwan.”

Köljal, 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., Dueñas, M., Grebenc, 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>

König, S., Schwenkbier, L., Pollok, S., Riedel, M., Wagner, S., Popp, J., Weber, K., Werres, S., 2015. Potential of *Ypt1* and ITS gene regions for the detection of *Phytophthora* species in a lab-on-a-chip DNA hybridization array. Plant Pathol 64, 1176–1189. <https://doi.org/10.1111/ppa.12357>

Konno, M., Iwamoto, S., Seiwa, K., 2011. Specialization of a fungal pathogen on host tree species in a cross-inoculation experiment: Specialization of a fungal pathogen on tree species. Journal of Ecology 99, 1394–1401. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2011.01869.x>

Krishnadas, M., Bagchi, R., Sridhara, S., Comita, L.S., 2018. Weaker plant-enemy interactions decrease tree seedling diversity with edge-effects in a fragmented tropical forest. Nat Commun 9, 4523. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06997-2>

- Kröner, A., Mabon, R., Corbière, R., Montarry, J., Andrivon, D., 2017. The coexistence of generalist and specialist clonal lineages in natural populations of the Irish Famine pathogen *Phytophthora infestans* explains local adaptation to potato and tomato. *Mol Ecol* 26, 1891–1901. <https://doi.org/10.1111/mec.14004>
- Legeay, J., Husson, C., Cordier, T., Vacher, C., Marcais, B., Buée, M., 2019. Comparison and validation of Oomycetes metabarcoding primers for *Phytophthora* high throughput sequencing. *J Plant Pathol.* <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00276-9>
- Liang, M., Liu, X., Etienne, R.S., Huang, F., Wang, Y., Yu, S., 2015. Arbuscular mycorrhizal fungi counteract the Janzen-Connell effect of soil pathogens. *Ecology* 96, 562–574.
- Liu, X., Etienne, R.S., Liang, M., Wang, Y., Yu, S., 2015. Experimental evidence for an intraspecific Janzen-Connell effect mediated by soil biota. *Ecology* 96, 662–671. <https://doi.org/10.1890/14-0014.1>
- Liu, Y., Fang, S., Chesson, P., He, F., 2015. The effect of soil-borne pathogens depends on the abundance of host tree species. *Nat Commun* 6, 10017. <https://doi.org/10.1038/ncomms10017>
- Madden, L.V., 1997. Effects of rain on splash dispersal of fungal pathogens. *Canadian Journal of Plant Pathology* 19, 225–230. <https://doi.org/10.1080/07060669709500557>
- Mangan, S.A., Schnitzer, S.A., Herre, E.A., Mack, K.M.L., Valencia, M.C., Sanchez, E.I., Bever, J.D., 2010. Negative plant–soil feedback predicts tree-species relative abundance in a tropical forest. *Nature* 466, 752–755. <https://doi.org/10.1038/nature09273>
- Marçais, B., Desprez-Loustau, M.-L., 2014. European oak powdery mildew: impact on trees, effects of environmental factors, and potential effects of climate change. *Annals of Forest Science* 71, 633–642. <https://doi.org/10.1007/s13595-012-0252-x>
- Margulis, Lynn, and Karlene V. Schwartz (1997). *Five Kingdoms: An Illustrated Guide to the Phyla of Life on Earth*, W.H. Freeman & Company, [ISBN 0-613-92338-3](https://doi.org/10.1007/s13595-012-0252-x)
- Martin, F.N., Abad, Z.G., Balci, Y., Ivors, K., 2012. Identification and Detection of *Phytophthora* Reviewing Our Progress, Identifying Our Needs. *Plant Disease* 96, 1080–1103. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-11-1036-FE>
- Martin, F.N., Blair, J.E., Coffey, M.D., 2014. A combined mitochondrial and nuclear multilocus phylogeny of the genus *Phytophthora*. *Fungal Genetics and Biology* 66, 19–32. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.02.006>
- Martin, F.N., Tooley, P.W., 2003. Phylogenetic relationships of *Phytophthora ramorum*, *P. nemorosa*, and *P. pseudosyringae*, three species recovered from areas in California with sudden oak death. *Mycological Research* 107, 1379–1391. <https://doi.org/10.1017/S0953756203008785>
- McCarthy, C.G.P., Fitzpatrick, D.A., 2017. Phylogenomic Reconstruction of the Oomycete Phylogeny Derived from 37 Genomes. *mSphere* 2. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00095-17>
- McGuire, K.L., Henkel, T.W., Granzow de la Cerda, I., Villa, G., Edmund, F., Andrew, C., 2008. Dual mycorrhizal colonization of forest-dominating tropical trees and the mycorrhizal status of non-dominant tree and liana species. *Mycorrhiza* 18, 217–222. <https://doi.org/10.1007/s00572-008-0170-9>
- Mommer, L., Cotton, T.E.A., Raaijmakers, J.M., Termorshuizen, A.J., van Ruijven, J., Hendriks, M., van Rijssel, S.Q., van de Mortel, J.E., van der Paauw, J.W., Schijlen, E.G.W.M., Smit-Tiekstra, A.E., Berendse, F., de Kroon, H., Dumbrell, A.J., 2018. Lost in diversity: the interactions between soil-borne fungi, biodiversity and plant productivity. *New Phytol* 218, 542–553. <https://doi.org/10.1111/nph.15036>

- Nguyen, D., Castagneyrol, B., Bruelheide, H., Bussotti, F., Guyot, V., Jactel, H., Jaroszewicz, B., Valladares, F., Stenlid, J., Boberg, J., 2016. Fungal disease incidence along tree diversity gradients depends on latitude in European forests. *Ecol Evol* 6, 2426–2438. <https://doi.org/10.1002/ece3.2056>
- Nijjer, S., Rogers, W.E., Siemann, E., 2007. Negative plant–soil feedbacks may limit persistence of an invasive tree due to rapid accumulation of soil pathogens. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 274, 2621–2627. <https://doi.org/10.1098/rspb.2007.0804>
- Nilsson, R.H., Kristiansson, E., Ryberg, M., Hallenberg, N., Larsson, K.-H., 2008. Intraspecific ITS variability in the kingdom fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. *Evol. Bioinform. Online* 4, 193–201.
- Norghauer, J.M., Malcolm, J.R., Zimmerman, B.L., Felfili, J.M., 2006. An experimental test of density- and distant-dependent recruitment of mahogany (*Swietenia macrophylla*) in southeastern Amazonia. *Oecologia* 148, 437–446. <https://doi.org/10.1007/s00442-006-0395-2>
- Ochoa-Ascencio, 2011, *Phytophthora heveae* causing basal rot of avocado fruit in Mexico. *Proceedings VII World Avocado Congress 2011 (Actas VII Congreso Mundial del Aguacate 2011)*. Cairns, Australia. 5 – 9 September
- Packer, A., Clay, K., 2000. Soil pathogens and spatial patterns of seedling mortality in a temperate tree. *Nature* 404, 278–281. <https://doi.org/10.1038/35005072>
- Patterson, D.J., and M.L. Sogin. 1992. Eukaryote Origins and Protistan Diversity. Pp. 13-46. In: *The Origin and Evolution of Prokaryotic and Eukaryotic Cells*. Eds. H. Hartman and K. Matsuno. World Scientific, Singapore
- Paulitz, T.C., Adams, K., 2003. Composition and Distribution of *Pythium* Communities in Wheat Fields in Eastern Washington State. *Phytopathology* 93, 867–873. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.7.867>
- Peay, K.G., Baraloto, C., Fine, P.V., 2013. Strong coupling of plant and fungal community structure across western Amazonian rainforests. *ISME J* 7, 1852–1861. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.66>
- Pérez-Izquierdo, L., Morin, E., Maurice, J.P., Martin, F., Rincón, A., Buée, M., 2017. A new promising phylogenetic marker to study the diversity of fungal communities: The *Glycoside Hydrolase* 63 gene. *Mol Ecol Resour* 17, e1–e11. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12678>
- Petermann, J.S., Fergus, A.J.F., Turnbull, L.A., Schmid, B., 2008. JANZEN-CONNELL EFFECTS ARE WIDESPREAD AND STRONG ENOUGH TO MAINTAIN DIVERSITY IN GRASSLANDS. *Ecology* 89, 2399–2406. <https://doi.org/10.1890/07-2056.1>
- Piepenbring, M., Hofmann, T.A., Unterseher, M., Kost, G., 2012. Species richness of plants and fungi in western Panama: towards a fungal inventory in the tropics. *Biodivers Conserv* 21, 2181–2193. <https://doi.org/10.1007/s10531-011-0213-y>
- Piepenbring, Meike & Hofmann, Tina Antje & Kirschner, Roland & Mangelsdorff, Ralph & Perdomo, Omar & Justavino, D & Trampe, T.. Diversity patterns of Neotropical plant parasitic microFungi, 2011. *Ecotropica*. 17. 27-40.

- Pimm, S.L., 2004. ECOLOGY: Domains of Diversity. *Science* 304, 831–833. <https://doi.org/10.1126/science.1095332>
- Porras-Alfaro, A., Bayman, P., 2011. Hidden Fungi, Emergent Properties: Endophytes and Microbiomes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 49, 291–315. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081831>
- Prigigallo, M.I., Abdelfattah, A., Cacciola, S.O., Faedda, R., Sanzani, S.M., Cooke, D.E.L., Schena, L., 2016. Metabarcoding Analysis of *Phytophthora* Diversity Using Genus-Specific Primers and 454 Pyrosequencing. *Phytopathology* 106, 305–313. <https://doi.org/10.1094/PHTO-07-15-0167-R>
- Randall, W.M., 2017. A comparison of the forest soils in the Peruvian Amazon: Terra firme, palm, white sand and igap. *J. Soil Sci. Environ. Manage.* 8, 130–134. <https://doi.org/10.5897/JSSEM2017.0644>
- Redondo, M.A., Boberg, J., Stenlid, J., Oliva, J., 2018. Functional traits associated with the establishment of introduced *Phytophthora* spp. in Swedish forests. *J Appl Ecol* 55, 1538–1552. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13068>
- Ribeiro, O.K., 1978. A source book of the genus *Phytophthora*. J. Cramer; ISBS, Hirschberg [Ger.]Forest Grove, OR.
- Richards PW. The tropical rain forest: an ecological study, 1996. 2nd ed. Cambridge ; New York: Cambridge University Press;575 p.
- Riit, T., Tedersoo, L., Drenkhan, R., Runno-Paurson, E., Kokko, H., Anslan, S., 2016. Oomycete-specific ITS primers for identification and metabarcoding. *MC* 14, 17–30. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.14.9244>
- Rodriguez, R.J., White Jr, J.F., Arnold, A.E., Redman, R.S., 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles: *Tansley review*. *New Phytologist* 182, 314–330. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x>
- Rubioff, D., Holland, B.S., 2005. Between Two Extremes: Mitochondrial DNA is neither the Panacea nor the Nemesis of Phylogenetic and Taxonomic Inference. *Systematic Biology* 54, 952–961. <https://doi.org/10.1080/10635150500234674>
- Sapkota, R., Nicolaisen, M., 2015. An improved high throughput sequencing method for studying oomycete communities. *Journal of Microbiological Methods* 110, 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.01.013>
- Sarmiento, C., Zalamea, P.-C., Dalling, J.W., Davis, A.S., Stump, S.M., U'Ren, J.M., Arnold, A.E., 2017. Soilborne fungi have host affinity and host-specific effects on seed germination and survival in a lowland tropical forest. *Proc Natl Acad Sci USA* 114, 11458–11463. <https://doi.org/10.1073/pnas.1706324114>
- Scanu, B., Linaldeddu, B.T., Deidda, A., Jung, T., 2015. Diversity of *Phytophthora* Species from Declining Mediterranean Maquis Vegetation, including Two New Species, *Phytophthora crassamura* and *P. ornamentata* sp. nov. *PLoS ONE* 10, e0143234. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143234>
- Schadt, C.W., Rosling, A., 2015. Comment on “Global diversity and geography of soil fungi.” *Science* 348, 1438–1438. <https://doi.org/10.1126/science.aaa4269>
- Schimann, H., Bach, C., Lengelle, J., Louisanna, E., Barantal, S., Murat, C., Buée, M., 2017. Diversity and Structure of Fungal Communities in Neotropical Rainforest Soils: The Effect of Host Recurrence. *Microb Ecol* 73, 310–320. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0839-0>
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G., Van Horn, D.J., Weber, C.F., 2009.

Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 7537–7541.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09>

Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., Chen, W., Fungal Barcoding Consortium, Fungal Barcoding Consortium Author List, Bolchacova, E., Voigt, K., Crous, P.W., Miller, A.N., Wingfield, M.J., Aime, M.C., An, K.-D., Bai, F.-Y., Barreto, R.W., Begerow, D., Bergeron, M.-J., Blackwell, M., Boekhout, T., Bogale, M., Boonyuen, N., Burgaz, A.R., Buyck, B., Cai, L., Cai, Q., Cardinali, G., Chaverri, P., Coppins, B.J., Crespo, A., Cubas, P., Cummings, C., Damm, U., de Beer, Z.W., de Hoog, G.S., Del-Prado, R., Dentinger, B., Dieguez-Urbeondo, J., Divakar, P.K., Douglas, B., Duenas, M., Duong, T.A., Eberhardt, U., Edwards, J.E., Elshahed, M.S., Fliegerova, K., Furtado, M., Garcia, M.A., Ge, Z.-W., Griffith, G.W., Griffiths, K., Groenewald, J.Z., Groenewald, M., Grube, M., Gryzenhout, M., Guo, L.-D., Hagen, F., Hambleton, S., Hamelin, R.C., Hansen, K., Harrold, P., Heller, G., Herrera, C., Hirayama, K., Hirooka, Y., Ho, H.-M., Hoffmann, K., Hofstetter, V., Hognabba, F., Hollingsworth, P.M., Hong, S.-B., Hosaka, K., Houbraken, J., Hughes, K., Huhtinen, S., Hyde, K.D., James, T., Johnson, E.M., Johnson, J.E., Johnston, P.R., Jones, E.B.G., Kelly, L.J., Kirk, P.M., Knapp, D.G., Koljalg, U., Kovacs, G.M., Kurtzman, C.P., Landvik, S., Leavitt, S.D., Ligginstoffer, A.S., Liimatainen, K., Lombard, L., Luangsa-ard, J.J., Lumbsch, H.T., Maganti, H., Maharachchikumbura, S.S.N., Martin, M.P., May, T.W., McTaggart, A.R., Methven, A.S., Meyer, W., Moncalvo, J.-M., Mongkolsamrit, S., Nagy, L.G., Nilsson, R.H., Niskanen, T., Nyilasi, I., Okada, G., Okane, I., Olariaga, I., Otte, J., Papp, T., Park, D., Petkovits, T., Pino-Bodas, R., Quaedvlieg, W., Raja, H.A., Redecker, D., Rintoul, T.L., Ruibal, C., Sarmiento-Ramirez, J.M., Schmitt, I., Schussler, A., Shearer, C., Sotome, K., Stefani, F.O.P., Stenroos, S., Stielow, B., Stockinger, H., Suetrong, S., Suh, S.-O., Sung, G.-H., Suzuki, M., Tanaka, K., Tedersoo, L., Telleria, M.T., Tretter, E., Untereiner, W.A., Urbina, H., Vagvolgyi, C., Vialle, A., Vu, T.D., Walther, G., Wang, Q.-M., Wang, Y., Weir, B.S., Weiss, M., White, M.M., Xu, J., Yahr, R., Yang, Z.L., Yurkov, A., Zamora, J.-C., Zhang, N., Zhuang, W.-Y., Schindel, D., 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 6241–6246.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>

Schupp, E.W., 1992. The Janzen-Connell Model for Tropical Tree Diversity: Population Implications and the Importance of Spatial Scale. *The American Naturalist* 140, 526–530. <https://doi.org/10.1086/285426>

Schwingle, B.W., Blanchette, R.A., 2008. Host Range Investigations of New, Undescribed, and Common *Phytophthora* spp. Isolated from Ornamental Nurseries in Minnesota. *Plant Disease* 92, 642–647.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-92-4-0642>

Scibetta, S., Schena, L., Chimento, A., Cacciola, S.O., Cooke, D.E.L., 2012a. A molecular method to assess *Phytophthora* diversity in environmental samples. *Journal of Microbiological Methods* 88, 356–368.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.12.012>

Sedio, B.E., Ostling, A.M., 2013. How specialised must natural enemies be to facilitate coexistence among plants? *Ecol Lett* 16, 995–1003. <https://doi.org/10.1111/ele.12130>

Sims, L.L., Sutton, W., Reeser, P., Hansen, E.M., 2015. The *Phytophthora* species assemblage and diversity in riparian alder ecosystems of western Oregon, USA. *Mycologia* 107, 889–902. <https://doi.org/10.3852/14-255>

Slik, J.W.F., Arroyo-Rodríguez, V., Aiba, S.-I., Alvarez-Loayza, P., Alves, L.F., Ashton, P., Balvanera, P., Bastian, M.L., Bellingham, P.J., van den Berg, E., Bernacci, L., da Conceição Bispo, P., Blanc, L., Böhning-Gaese, K., Boeckx, P., Bongers, F., Boyle, B., Bradford, M., Brearley, F.Q., Breuer-Ndoundou Hockemba, M., Bunyavejchewin, S., Calderado Leal Matos, D., Castillo-Santiago, M., Catharino, E.L.M., Chai, S.-L., Chen, Y., Colwell, R.K., Chazdon, R.L., Clark, C., Clark, D.B., Clark, D.A., Culmsee, H., Damas, K., Dattaraja, H.S., Dauby, G., Davidar, P., DeWalt, S.J., Doucet, J.-L., Duque, A., Durigan, G., Eichhorn, K.A.O., Eisenlohr, P.V., Eler, E., Ewango, C., Farwig, N., Feeley, K.J., Ferreira, L., Field, R., de Oliveira Filho, A.T., Fletcher, C., Forshed, O., Franco, G., Fredriksson, G., Gillespie, T., Gillet, J.-F., Amarnath, G., Griffith, D.M., Grogan, J., Gunatilleke, N., Harris, D., Harrison, R., Hector, A., Homeier, J., Imai, N., Itoh, A., Jansen, P.A., Joly, C.A., de Jong, B.H.J.,

- Kartawinata, K., Kearsley, E., Kelly, D.L., Kenfack, D., Kessler, M., Kitayama, K., Kooyman, R., Larney, E., Laumonier, Y., Laurance, S., Laurance, W.F., Lawes, M.J., Amaral, I.L. do, Letcher, S.G., Lindsell, J., Lu, X., Mansor, A., Marjokorpi, A., Martin, E.H., Meilby, H., Melo, F.P.L., Metcalfe, D.J., Medjibe, V.P., Metzger, J.P., Millet, J., Mohandass, D., Montero, J.C., de Morisson Valeriano, M., Mugerwa, B., Nagamasu, H., Nilus, R., Ochoa-Gaona, S., Onrizal, Page, N., Parolin, P., Parren, M., Parthasarathy, N., Paudel, E., Permana, A., Piedade, M.T.F., Pitman, N.C.A., Poorter, L., Poulsen, A.D., Poulsen, J., Powers, J., Prasad, R.C., Puyravaud, J.-P., Razafimahaimodison, J.-C., Reitsma, J., dos Santos, J.R., Roberto Spironello, W., Romero-Saltos, H., Rovero, F., Rozak, A.H., Ruokolainen, K., Rutishauser, E., Saiter, F., Saner, P., Santos, B.A., Santos, F., Sarker, S.K., Satdichanh, M., Schmitt, C.B., Schöngart, J., Schulze, M., Sukanuma, M.S., Sheil, D., da Silva Pinheiro, E., Sist, P., Stevart, T., Sukumar, R., Sun, I.-F., Sunderland, T., Suresh, H.S., Suzuki, E., Tabarelli, M., Tang, J., Targhetta, N., Theilade, I., Thomas, D.W., Tchouto, P., Hurtado, J., Valencia, R., van Valkenburg, J.L.C.H., Van Do, T., Vasquez, R., Verbeeck, H., Adekunle, V., Vieira, S.A., Webb, C.O., Whitfeld, T., Wich, S.A., Williams, J., Wittmann, F., Wöll, H., Yang, X., Adou Yao, C.Y., Yap, S.L., Yoneda, T., Zahawi, R.A., Zakaria, R., Zang, R., de Assis, R.L., Garcia Luize, B., Venticinque, E.M., 2015. An estimate of the number of tropical tree species. *Proc Natl Acad Sci USA* 112, 7472–7477. <https://doi.org/10.1073/pnas.1423147112>
- Smahi, Hadjer & Belhoucine, Latifa & Franceschini, Antonio & Scanu, Bruno, 2017. *Phytophthora* species associated with cork oak decline in a Mediterranean forest in western Algeria. *Integrated Protection in Oak Forests IOBC-WPRS Bulletin*. 127. 123-129.
- Spear, E.R., Mordecai, E.A., 2018. Foliar pathogens are unlikely to stabilize coexistence of competing species in a California grassland. *Ecology* 99, 2250–2259. <https://doi.org/10.1002/ecy.2427>
- Stevens, G.C., 1989. The Latitudinal Gradient in Geographical Range: How so Many Species Coexist in the Tropics. *The American Naturalist* 133, 240–256. <https://doi.org/10.1086/284913>
- Stump, S.M., Chesson, P., 2015. Distance-responsive predation is not necessary for the Janzen–Connell hypothesis. *Theoretical Population Biology* 106, 60–70. <https://doi.org/10.1016/j.tpb.2015.10.006>
- Suffert, F., Guibert, M., 2007. The ecology of a *Pythium* community in relation to the epidemiology of carrot cavity spot. *Applied Soil Ecology* 35, 488–501. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2006.10.003>
- Svenning, J.-C., 2001. On the role of microenvironmental heterogeneity in the ecology and diversification of neotropical rain-forest palms (Arecaceae). *Bot. Rev* 67, 1–53. <https://doi.org/10.1007/BF02857848>
- Szabó, I., Lakatos, F., Sipos, G., 2013. Occurrence of soilborne *Phytophthora* species in declining broadleaf forests in Hungary. *Eur J Plant Pathol* 137, 159–168. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0228-1>
- Tedersoo, L., Bahram, M., Polme, S., Koljalg, U., Yorou, N.S., Wijesundera, R., Ruiz, L.V., Vasco-Palacios, A.M., Thu, P.Q., Suija, A., Smith, M.E., Sharp, C., Saluveer, E., Saitta, A., Rosas, M., Riit, T., Ratkowsky, D., Pritsch, K., Poldmaa, K., Piepenbring, M., Phosri, C., Peterson, M., Parts, K., Partel, K., Otsing, E., Nouhra, E., Njouonkou, A.L., Nilsson, R.H., Morgado, L.N., Mayor, J., May, T.W., Majuakim, L., Lodge, D.J., Lee, S.S., Larsson, K.-H., Kohout, P., Hosaka, K., Hiiesalu, I., Henkel, T.W., Harend, H., Guo, L. -d., Greslebin, A., Grelet, G., Geml, J., Gates, G., Dunstan, W., Dunk, C., Drenkhan, R., Dearnaley, J., De Kesel, A., Dang, T., Chen, X., Buegger, F., Brearley, F.Q., Bonito, G., Anslan, S., Abell, S., Abarenkov, K., 2014. Global diversity and geography of soil fungi. *Science* 346, 1256688–1256688. <https://doi.org/10.1126/science.1256688>
- ter Steege, H., Pitman, N.C.A., Sabatier, D., Baraloto, C., Salomao, R.P., Guevara, J.E., Phillips, O.L., Castilho, C.V., Magnusson, W.E., Molino, J.-F., Monteagudo, A., Nunez Vargas, P., Montero, J.C., Feldpausch, T.R., Coronado, E.N.H., Killeen, T.J., Mostacedo, B., Vasquez, R., Assis, R.L., Terborgh, J., Wittmann, F., Andrade, A., Laurance, W.F., Laurance, S.G.W., Marimon, B.S., Marimon, B.-H., Guimaraes Vieira, I.C., Amaral, I.L., Brien, R., Castellanos, H., Cardenas Lopez, D., Duivenvoorden, J.F., Mogollon, H.F., Matos, F.D. d. A., Davila, N., Garcia-Villacorta, R., Stevenson Diaz, P.R., Costa, F., Emilio, T., Levis, C., Schietti, J., Souza, P., Alonso, A., Dallmeier, F., Montoya, A.J.D., Fernandez Piedade, M.T., Araujo-Murakami, A., Arroyo, L., Gribel, R., Fine,

- P.V.A., Peres, C.A., Toledo, M., Aymard C., G.A., Baker, T.R., Ceron, C., Engel, J., Henkel, T.W., Maas, P., Petronelli, P., Stropp, J., Zartman, C.E., Daly, D., Neill, D., Silveira, M., Paredes, M.R., Chave, J., Lima Filho, D. d. A., Jorgensen, P.M., Fuentes, A., Schongart, J., Cornejo Valverde, F., Di Fiore, A., Jimenez, E.M., Penuela Mora, M.C., Phillips, J.F., Rivas, G., van Andel, T.R., von Hildebrand, P., Hoffman, B., Zent, E.L., Malhi, Y., Prieto, A., Rudas, A., Ruschell, A.R., Silva, N., Vos, V., Zent, S., Oliveira, A.A., Schutz, A.C., Gonzales, T., Trindade Nascimento, M., Ramirez-Angulo, H., Sierra, R., Tirado, M., Umana Medina, M.N., van der Heijden, G., Vela, C.I.A., Vilanova Torre, E., Vriesendorp, C., Wang, O., Young, K.R., Baider, C., Balslev, H., Ferreira, C., Mesones, I., Torres-Lezama, A., Urrego Giraldo, L.E., Zagt, R., Alexiades, M.N., Hernandez, L., Huamantupa-Chuquimaco, I., Milliken, W., Palacios Cuenca, W., Pauletto, D., Valderrama Sandoval, E., Valenzuela Gamarra, L., Dexter, K.G., Feeley, K., Lopez-Gonzalez, G., Silman, M.R., 2013. Hyperdominance in the Amazonian Tree Flora. *Science* 342, 1243092–1243092. <https://doi.org/10.1126/science.1243092>
- Ter Steege, H., Sabatier, D., Castellanos, H., Van Andel, T., Duivenvoorden, J., Adalardo De Oliveira, A., Ek, R., Lilwah, R., Maas, P., Mori, S., 2000. An analysis of the floristic composition and diversity of Amazonian forests including those of the Guiana Shield. *J. Trop. Ecol.* 16, 801–828. <https://doi.org/10.1017/S0266467400001735>
- Terborgh, J., 2012. Enemies Maintain Hyperdiverse Tropical Forests. *The American Naturalist* 179, 303–314. <https://doi.org/10.1086/664183>
- Tilman, D., & Pacala, S. (1993). The maintenance of species richness in plant communities. *Species diversity in ecological communities*, 13-25.
- Torti, S.D., Coley, P.D., 1999. Tropical Monodominance: A Preliminary Test of the Ectomycorrhizal Hypothesis. *Biotropica* 31, 220–228. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.1999.tb00134.x>
- Traissac 2003, Dynamique spatiale de Vouacapoua Americana (Aublet), arbre de forêt tropicale humide à repartition agrégée.
- Turner, P.D. , 1968, Pod rot of cacao in Malaysia caused by *Phytophthora heveae*. *Pi. Prot. Bull. F.A.O.*, 16(2), 33.
- Vannini, A., Bruni, N., Tomassini, A., Franceschini, S., Vettrano, A.M., 2013. Pyrosequencing of environmental soil samples reveals biodiversity of the *Phytophthora* resident community in chestnut forests. *FEMS Microbiol Ecol* 85, 433–442. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12132>
- Větrovský, T., Kolařík, M., Žifčáková, L., Zelenka, T., Baldrian, P., 2016. The *rpb2* gene represents a viable alternative molecular marker for the analysis of environmental fungal communities. *Mol Ecol Resour* 16, 388–401. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12456>
- Vettrano, A.M., Barzanti, G.P., Bianco, M.C., Ragazzi, A., Capretti, P., Paoletti, E., Luisi, N., Anselmi, N., Vannini, A., 2002. Occurrence of *Phytophthora* species in oak stands in Italy and their association with declining oak trees. *Forest Pathol* 32, 19–28. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0329.2002.00264.x>
- Voříšková, J., Baldrian, P., 2013. Fungal community on decomposing leaf litter undergoes rapid successional changes. *ISME J* 7, 477–486. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.116>
- Wallace, S.F., 2015. Diversity of *Phytophthora* Species in Costa Rica's Tropical Forest. <https://doi.org/10.13016/m2fw79>
- Weiland, J.E., 2011. Influence of Isolation Method on Recovery of *Pythium* Species from Forest Nursery Soils in Oregon and Washington. *Plant Disease* 95, 547–553. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-10-0242>
- Weir, B.S., Paderes, E.P., Anand, N., Uchida, J.Y., Pennycook, S.R., Bellgard, S.E., Beaver, R.E., 2015. A taxonomic revision of *Phytophthora* Clade 5 including two new species, *Phytophthora agathidicida* and *P. cocois*. *Phytotaxa* 205, 21. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.205.1.2>

- Whitmore, T.C., 1990. An introduction to tropical rain forests. Clarendon Press ; Oxford University Press, Oxford : New York.
- Wilson EO, Peter FM, 1988, National Academy of Sciences (U.S.), Smithsonian Institution, éditeurs., Biodiversity. Washington, D.C: National Academy Press. 521 p.
- Wright, J.S., 2002. Plant diversity in tropical forests: a review of mechanisms of species coexistence. *Oecologia* 130, 1–14. <https://doi.org/10.1007/s004420100809>
- Xiao, Z., Mi, X., Holyoak, M., Xie, W., Cao, K., Yang, X., Huang, X., Krebs, C.J., 2017. Seed–predator satiation and Janzen–Connell effects vary with spatial scales for seed-feeding insects. *Ann Bot* 119, 109–116. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw224>
- Yang, X., Tyler, B.M., Hong, C., 2017. An expanded phylogeny for the genus *Phytophthora*. *IMA Fungus* 8, 355–384. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2017.08.02.09>
- Yephet, Y., 1996. Effects of Initial Inoculum and Cultivar Resistance on Incidence of Fusarium Wilt and Population Densities of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* on Carnation and in Soil. *Phytopathology* 86, 751. <https://doi.org/10.1094/Phyto-86-751>
- Zeng, H., Ho, H., Zheng, F.-C., 2009. A Survey of *Phytophthora* Species on Hainan Island of South China. *Journal of Phytopathology* 157, 33–39. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2008.01441.x>
- Zentmyer, George Aubrey, L. J. Klure and Eleanor C. Pond., 1978, “A new canker disease of avocado caused by *Phytophthora heveae*.”

Résumé :

Les mécanismes expliquant le maintien de la diversité végétale dans les forêts tropicales sont mal connus. Une hypothèse particulièrement étudiée est l'hypothèse Janzen-Connell qui postule que ces mécanismes sont essentiellement causés par les interactions entre les plantes et leurs ennemis naturels, en particulier les organismes pathogènes. Dans cette thèse, nous nous sommes donc intéressés aux agents pathogènes présents dans les sols d'une forêt guyanaise et à leur lien de spécificité avec les plantes. Dans le cas où l'hypothèse Janzen-Connell serait vérifiée, on peut s'attendre à ce que les plantes structurent les communautés de micro-organismes pathogènes. Nos travaux se sont focalisés sur les Oomycètes et en particulier les *Phytophthora*, pathogènes des arbres très importants, mais nous nous sommes aussi intéressés aux champignons pathogènes.

Ainsi, nous avons développé et comparé des jeux d'amorces PCR spécifiques des *Phytophthora* et des Péronosporomycètes afin d'étudier ces organismes par metabarcoding. Ces amorces ont ensuite servi à étudier la diversité des communautés de *Phytophthora* dans des échantillons de sols de deux sites forestiers de Guyane Française prélevés au pied d'arbres appartenant à 10 familles végétales. Une faible diversité a été retrouvée, avec seulement 8 taxons en tout, et la très large dominance d'un complexe d'espèces *Phytophthora heveae*. La structuration par la plante-hôte de ces communautés est plutôt faible. Dans une étude complémentaire, nous avons analysé la diversité des Oomycètes et des champignons pathogènes dans les sols et les litières de six plantations monospécifiques et au sein d'une forêt naturelle de Guyane. La structuration par l'hôte s'est avérée nulle pour les Oomycètes et faible pour les champignons pathogènes. Enfin, nous n'avons pas réussi à déclencher expérimentalement des mortalités ou dépérissements par des Oomycètes sur le wacapou, une espèce d'arbre guyanaise, via des inoculations de sols de forêt.

Au final, les résultats de cette thèse ne supportent pas l'hypothèse selon laquelle les Oomycètes seraient d'importants acteurs du maintien de la diversité végétale dans les forêts tropicales. Par ailleurs, ils nous interrogent sur la faible diversité de ce groupe de microorganismes dans les sols et litières dans un hotspot de diversité végétale.

Mots-clés : *Phytophthora*, forêts néo-tropicales, metabarcoding, pathogènes des plantes, spécificité à l'hôte, hypothèse Janzen-Connell

Abstract :

The mechanisms implied in the maintenance of plant diversity in tropical forests are still poorly known. One particularly studied hypothesis is the Janzen-Connell hypothesis, which posits that these mechanisms are essentially caused by the interactions between plant and their natural enemies, including pathogenic organisms. In this thesis, we looked at the pathogenic organisms present in the soils of a Guyanese forest, and the specificity of their interactions with plants. In the case where the Janzen-Connell hypothesis would be verified, we could expect that pathogenic micro-organisms communities would be structured by plants. Our works focused on Oomycetes and especially the *Phytophthora*, which are very important pathogens of trees, but we also took an interest on pathogenic Fungi.

Thus, we developed PCR primer sets specific of the *Phytophthora* and Peronosporomycete groups, in order to study these organisms through metabarcoding. These primers were then used to investigate the community of *Phytophthora* in soils sampled from two French Guiana sites, near trees belonging to 10 families. A low diversity was described, with a total of only 8 taxa, and the overwhelming dominance of the species complex *P. heveae*. A weak host effect was detected. In a complementary study, we looked at the diversity of Oomycetes and Fungi in soils and litters of six monospecific tree plantations and a Guianese natural forest. Structuration by host appeared to be null for Oomycetes and weak for pathogenic Fungi. Finally, we did not succeed in trying to experimentally provoke, through forest soil inoculations, Janzen-Connell mortalities due to Oomycetes on the Wacapou, a Guianese tree species.

In the end, the results of this thesis do not support the hypothesis that Oomycetes may be important agents of the maintenance of tree diversity in tropical forests. Moreover, they bring some questions about the low diversity of this group of micro-organisms in a tree diversity hotspot.

Keywords : *Phytophthora*, neo-tropical forests, metabarcoding, plant pathogens, host specificity, Janzen-Connell hypothesis