Evolution des interactions mycorhiziennes et de la mycohétérotrophie chez les orchidées

Félix Lallemand

▶ **To cite this version:**

Félix Lallemand. Evolution des interactions mycorhiziennes et de la mycohétérotrophie chez les orchidées. Mycologie. Museum national d'histoire naturelle - MNHN PARIS, 2018. Français. NNT : 2018MNHN0019 . tel-02123918

HAL Id: tel-02123918

https://theses.hal.science/tel-02123918

Submitted on 9 May 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.

MUSEUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE

Ecole Doctorale Sciences de la Nature et de l'Homme – ED 227

Année 2018

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

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DU MUSEUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE

Spécialité : Physiologie et Biologie des Organismes – Populations Interactions

Présentée et soutenue publiquement par

Félix Lallemand

Le mardi 30 octobre 2018

Évolution des interactions mycorhiziennes et de la mycohétérotrophie chez les orchidées

---

Sous la direction de : **Monsieur Selosse, Marc-André, Professeur au Muséum national d'Histoire naturelle**

JURY :

Mme Bonfante, Paola	**Professeure, Université de Turin**	**Rapporteure**
Mr Bouchereau, Alain	**Professeur, Université Rennes 1**	**Rapporteur**
Mr Courty, Pierre-Emmanuel	**Chargé de Recherche, INRA Dijon**	**Examinateur**
Mme Dajoz, Isabelle	**Professeure, Université Paris 7**	**Examinatrice**
Mr Selosse, Marc-André	**Professeur, Muséum national d'Histoire naturelle**	**Directeur de thèse**

RÉSUMÉ DE LA THÈSE

Les plantes terrestres vivent en association avec des champignons du sol, formant ce que l'on appelle des symbioses mycorhiziennes. Elles échangent du carbone (photosynthétats) contre de l'eau et des minéraux. Ce mutualisme est toutefois troublé par certaines plantes, appelées mycohétérotrophes, capables de soutirer du carbone à leurs symbiontes fongiques. Le plus souvent non photosynthétiques, elles dépendent alors entièrement des champignons mycorhiziens. Certaines ont en revanche conservé la photosynthèse et obtiennent leur carbone par ces deux voies, on les appelle mixotrophes. Cette thèse est consacrée à l'étude des plantes mycohétérotrophes et mixotrophes chez les orchidées, avec des éléments de comparaison chez les éricacées. Les différents travaux qui la structurent précisent la phylogénie de certains groupes clés, s'intéressent aux évolutions génomiques, métaboliques et physiologiques accompagnant ces modes de nutrition originaux, et à leur sensibilité face aux conditions environnementales.

PHD THESIS SUMMARY

Terrestrial plants live in collaboration with soil fungi, forming associations called mycorrhizal symbioses. They exchange carbon (photosynthates) for water and nutrients. This mutualism is however disrupted by some plants, called mycoheterotrophs, which are able to obtain carbon from their fungal symbionts. Non-photosynthetic most of the time, then they entirely depend on mycorrhizal fungi. Some yet have retained photosynthesis and acquire carbon from these two ways, we called them mixotrophs. This PhD thesis is dedicated to the study of mycoheterotrophic and mixotrophic plants in orchids, with points of comparison in Ericaceae. This dissertation is structured around different kinds of work, which clarify the phylogeny of some key lineages, provide insights into the genomic, metabolic and physiologic evolution going along with these unusual nutrition types, and question how they respond to environmental parameters.

SOMMAIRE

Préambule.....7

Lexique.....9

Remerciements.....11

Introduction.....13

Positionnement scientifique et objectifs de la thèse.....53

Article I.....57

Article II.....75

Article III.....113

Article IV.....133

Article V.....149

Article VI.....161

Article VII.....187

Bilan et discussion.....199

Conclusion.....231

Annexes.....245

Références bibliographiques.....257

PRÉAMBULE

« Que faire quand votre monde commence à s'effondrer ? Moi, je pars me promener et, si j'ai vraiment de la chance, je trouve des champignons. »

Anna Lowenhaupt Tsing

Le champignon de la fin du monde (2018)

Cher lecteur, chère lectrice, quelques mots d'accueil avant de vous lâcher sans brassards dans la mare de ce pavé. Déjà, merci d'avoir eu le courage ou l'amabilité de tourner les premières pages. J'espère que vous trouverez dans les suivantes quelques histoires qui vous parlent, quelques loupes ou jumelles pour regarder d'un œil nouveau les plantes, les champignons, nous-mêmes ? Selon votre étiquette, vos bagages, votre humeur, la lecture peut prendre plusieurs couleurs. Voici quelques pistes, non limitantes, pour vous guider dans votre voyage.

Si vous êtes un ou une membre du jury : pas de bol, il va falloir tout lire en théorie. Pour une entrée en matière en douceur – si vous n'êtes pas familier des plantes mycohétérotrophes – vous pouvez commencer par l'annexe III, un petit article de vulgarisation. Pour la suite, une lecture linéaire est possible, ou bien, sauter le bloc d'articles et profiter des renvois présents dans la discussion pour s'y référer aux moments opportuns.

Si vous êtes un biologiste aguerri, une passionnée de physiologie végétale, d'écologie ou d'évolution : vous devriez trouver de quoi assouvir certains appétits dans l'introduction, et même pourquoi pas, dans la discussion. Les plus audacieux d'entre vous pourraient aller jusqu'à se frotter à un ou deux articles en cas de questionnements ontologiques sur les isotopes ou la phylogénie.

Si vous êtes comme moi, complètement perdu à la lecture du résumé de la page précédente : l'annexe III et la plupart de l'introduction devraient quand même vous être accessibles et – j'espère ! – vous apprendre plein de choses amusantes sur nos écosystèmes. Armez-vous quand même d'un bon dictionnaire.

Si vous cherchez juste une histoire pour endormir les enfants : rendez-vous à peu près où vous voulez, ça marche aussi ! Vous me direz si certaines parties sont plus efficaces que les autres…

Bonne lecture

Félix

LEXIQUE

Les mots définis ici seront rappelés par un astérisque à leur première occurrence dans les parties « Introduction » et « Discussion ».

Biotrophie : appliqué aux champignons, mode de nutrition basé sur l'interaction avec des cellules vivantes. Il peut s'agir de mutualisme (symbioses mycorhiziennes, certains endophytes), de commensalisme ou de parasitisme. On parle de *nécrotrophie* lorsque cette interaction aboutit à la mort des cellules partenaires.

Endophytisme : capacité de certains microorganismes à coloniser les tissus végétaux vivants sans provoquer de symptômes ou de changements morphologiques apparents (Selosse *et al.*, 2018). L'endophytisme ne préjuge pas du caractère mutualiste, commensal ou parasitaire de cette interaction (Hardoim *et al.*, 2015).

Fitness : voir valeur sélective

Nécrotrophie : voir biotrophie

Pédomorphose : rétention à l'âge adulte d'un trait propre à un stade de développement antérieur.

Phénologie : étude des phénomènes périodiques rencontrés dans le monde vivant en lien avec les variations saisonnières des conditions environnementales.

Protocorme : amas globulaire de cellules indifférenciées correspondant au premier stade de développement des orchidées après leur germination.

Saprophytisme / Saprotrophie : mode de nutrition de certains champignons basé sur la décomposition et l'absorption de matière organique inerte (résidus animaux et végétaux, particules humiques…). On peut restreindre le terme saprophytisme à la consommation de matière d'origine végétale, mais nous ne ferons pas de différence entre les deux mots ici.

Valeur sélective : de manière générale, propension d'un allèle, d'un génotype ou d'un trait individuel à être représenté numériquement dans les générations futures (Hunt et Hodgson, 2010). Le terme *fitness*, dérivé de l'anglais, est souvent employé. De nombreuses définitions existent selon les méthodes de calcul, les échelles et les organismes étudiés. La plupart intègrent le taux de survie jusqu'à la maturité sexuelle et le nombre moyen de descendants.

REMERCIEMENTS

Une sortie dans les bois il y a six ans déjà
Déguster les tannins, feuilles mortes et verre de vin
Un professant habile, pédagogue volubile
Sema de graines, de spores, les rêves de l'eau qui dort
Puis les choses se précisent, parenthèse mycorhizes
Placée sous la lorgnette de ce curieux mycète
Souplesse et liberté fixèrent l'accord tacite
Nous laissant voyager chacun vers mille orbites
Fertiles et dynamiques, échanges et retrouvailles
Défiant les statistiques, rythmèrent notre travail
Et à chaque pique-nique, bouteilles, bouchons m'entêtent
Une griserie hédonique : « J'veux des boutons d'manchette ! »

Mais foin de rimasses ! Halte au massacre ! Juste un merci massif, merci massue, par contumace. Tu m'a supporté avec diplomatie et accepté sans grimaces, ma cadence de limace macérée, les hématies à la ramasse. Ils voulaient que tu écumasses, pour toujours leurs océans, de Belle-Île aux Bahamas, ces microbes partout présents ! Merci Marc-André.

Merci à Paola, Alain, Pierre-Emmanuel et Isabelle de s'être prêtés au jeu de jurés. Merci de votre temps et de votre réactivité face à mes sollicitations.

Merci à Claire, Étienne, Mélanie et Jérôme, oreilles attentives et précieux conseillers lors des comités de suivi de thèse.

À tous les botanistes et orchidophiles de la SFO, du forum ophrys et de Tela Botanica avec qui j'ai eu le plaisir d'échanger et de partager. Cette thèse n'aurait pas pu se faire sans vous, j'espère qu'elle saura en retour gagner votre intérêt. Merci tout particulièrement à Christiane, Aimé, Florent, Franck, Alexandre, Adrien, Alain, Laurence, Eva, Henri, André, Jean-François, Jean-Marc et Jean-Michel pour m'avoir accueilli et aidé sur le terrain. Je garde un grand souvenir de chacune de ces rencontres.

Laure, camarade de croisière, de croisade, je suis sûr que petit à petit ça infuse dans la cafetière de notre fougueuse tornade ! Pauline, le temps d'une escale rayonnante. Isabel, Conrado, Tomáš, Alzbeta, couleurs chaleureuses de nos paysages. Florent, Chantal, Benoît, relève opportune pour les sorties champignons. Ninon et Élie, pour votre aide *fracassante* et ces voyages musicaux. Maxime et Denis pour les isotopes. Et toute l'équipe INEVEF et les collègues de l'herbier, en particulier Lucie pour les réveils discrets pendant les CU, Myriam pour ton accompagnement lors de mes débuts, Catherine pour ton enthousiasme indéfectible, Jean-Yves pour ton aide avec les orchidées, Cécile pour l'initiation aux visites, Thierry pour l'accès au labo, Sandrine pour les remplissages d'azote répétés, Joëlle et Hubert pour vos inlassables sourires.

L’équipe du SSM et ses satellites, Josie, Céline, Delphine, Agnès, Régis, Benoît, Jawad, Thomas, magiciennes, explorateurs, secouristes, solides à la paillasse comme à 23h.

Tous les collègues de l’IPS2 et l’EPGV avec un immense merci à Étienne pour son travail impressionnant sur les données de RNA-seq et son aide tout au long de ma thèse. Merci aussi à Katarina et Julita pour leurs invitations et leur confiance, bon courage pour vos projets !

Émilie, Christine et toute l’équipe des profs relais et des responsables des prépas agreg pour la confiance, la liberté et l’aide que vous nous avez données pour nos enseignements. Élie, Pauline, Julien, Emmanuelle, Laure, Olivier, Charline et Alice, votre présence fut lumineuse ! Suffisamment je l’espère, pour que quelques graines germent parmi les centaines semées à tous vents !

Anne-Marie, Alice, Nacer, Drissia, Samia, Sylvianne, Édith, Clémentine, Taoufik et Sabrina pour votre gestion exemplaire et souriante d’une équipe classée « à risques ». Sans vous, rien ne serait possible.

Laurent, Philippe, Hélène, Sophie, Clément et tous les jardiniers pour le spectacle quotidien, les outils prêtés, l’accès aux jardins avec nos classes ou nos sandwichs.

Merci également à l’ENS de Lyon pour le financement de cette thèse, à l’ED227 pour l’accueil au Muséum et au BDEM pour leur superbe travail.

Enfin, tout le réseau mycorhizien dense et généreux sur lequel je me repose au quotidien, ou à l’occasion d’une virée nocturne dans les rues de Paris, d’une note de musique, d’une décarbonation manifeste, d’un voyage au Crétacé, d’un retour aux sources ou aux champs, d’une péniche, d’un moulin, d’une île, d’une presqu’île, d’un volcan, d’une tente, d’un « Salut Maman ! », ou d’un regard complice, sous des boucles riantes.

INTRODUCTION

Plan détaillé de l'introduction

I. Les symbioses mycorhiziennes 15
1. De la découverte à la généralisation....15
2. Diversité des associations mycorhiziennes....15
a) Les mycorhizes arbusculaires....15
b) Les ectomycorhizes....17
c) Les mycorhizes d'orchidées....18
d) Les mycorhizes éricoïdes....18
3. Fonctionnement général de la symbiose....19
a) Mise en place, contrôle et durabilité de l'interaction....19
b) Fonctions de nutrition....20
c) Fonctions de protection....22
4. Les réseaux mycorhiziens....22
5. Entre mutualisme et parasitisme....24
a) Les facteurs influençant l'issue de la symbiose....24
b) Stabilité évolutive du mutualisme....25
6. Bilan sur les symbioses mycorhiziennes....25

II. La mycohétérotrophie 27
1. Découverte d'une association mycorhizienne à sens unique....27
2. Les plantes entièrement mycohétérotrophes....29
a) Généralités et diversité....29
b) Champignons associés et origine du carbone....30
c) Un vrai parasitisme ?....32
3. Les plantes mycohétérotrophes pendant leurs premiers stades de développement....32
a) Un dimanche en forêt....32
b) Seulement chez les orchidées ?....34
4. Les plantes partiellement mycohétérotrophes à l'âge adulte....34
a) Premiers indices, les plantes albinos....34
b) Une mixotrophie confirmée par les isotopes....35
c) Espèces concernées....37
5. Évolution de la mycohétérotrophie....39
a) Un scénario évolutif....39
b) Évolution des génomes plastidiaux....40
6. Bilan sur la mycohétérotrophie....41

III. Mycohétérotrophie et mixotrophie chez les orchidées 42
1. Récapitulons....42
2. Une réalité plus complexe....43
3. Les Neottieae, un groupe particulièrement étudié....44
a) Diversité des types de nutrition....44
b) Une originalité au sein des Neottieae : les plantes albinos....46
4. Les facteurs influençant la mixotrophie....48
a) La lumière....48
b) Phénologie et stade de développement....49
5. Physiologie des orchidées mixotrophes et mycohétérotrophes....49
a) Allocation différentielle du carbone....49
b) Nature des échanges et des voies métaboliques....50

I. Les symbioses mycorhiziennes

1. De la découverte à la généralisation

Au début des années 1840, le forestier allemand Theodor Hartig observe au microscope les racines fines de différentes espèces d'arbres et en décrit la structure. Ses dessins montrent un entrelacs compact de cellules qui s'immiscent entre les cellules du cortex racinaire (Hartig, 1840). Alors qu'il ignore la nature fongique de ce réseau cellulaire, Hartig vient à son insu de dévoiler une alliance fondamentale entre plantes et champignons. D'autres biologistes font des observations similaires au cours du XIX^{e} siècle et finissent par révéler l'identité fongique de l'organisme colonisant ainsi les racines des arbres. C'est finalement le botaniste allemand Albert Bernhard Frank qui en 1885 synthétise ces travaux et propose le terme mycorhize (du grec *myco* : champignon et *rhiza* : racine) pour désigner l'organe mixte plante-champignon, siège de cette association récurrente (Frank, 1885). Frank va même plus loin en démontrant expérimentalement le rôle bénéfique du champignon dans la croissance du pin sylvestre (*Pinus sylvestris* ; Frank, 1892a).

Depuis ces travaux précurseurs, des associations durables avec des champignons ont été observées chez plus de 90 % des familles d'Embryophytes : mycothalles et mycorhizoïdes chez les bryophytes *sensu lato*, mycorhizes arbusculaires chez les ptéridophytes *sensu lato*, mycorhizes arbusculaires, ectomycorhizes et autres types (voir définitions dans la partie suivante) chez les Spermatophytes (Wang et Qiu, 2006). Les mycorhizes sont une composante essentielle de la biologie des plantes terrestres, et ce, dans tous les grands biomes (Read, 1991). À cette omniprésence actuelle s'est ajoutée la découverte de structures semblables à certains types de mycorhizes parmi les fossiles des premiers végétaux terrestres connus (Kidston et Lang, 1921 ; Remy *et al.*, 1994), mettant ainsi en lumière le caractère ancestral de la symbiose mycorhizienne et son rôle capital dans la colonisation du milieu aérien par les végétaux (Pirozynski et Malloch, 1975 ; Selosse et Le Tacon, 1998).

2. Diversité des associations mycorhiziennes

On distingue classiquement quatre principaux types de mycorhizes : les mycorhizes arbusculaires, les ectomycorhizes, les mycorhizes d'orchidées et les mycorhizes éricoïdes (van der Heijden *et al.*, 2015). S'y rajoutent quelques associations particulières, restreintes à certains groupes, que nous ne traiterons pas ici.

a) Les mycorhizes arbusculaires

Ce type de mycorhize est de loin le plus fréquent puisqu'il concerne les trois quarts environ des espèces d'Angiospermes (Brundrett, 2009). Dans cette association, les hyphes des champignons

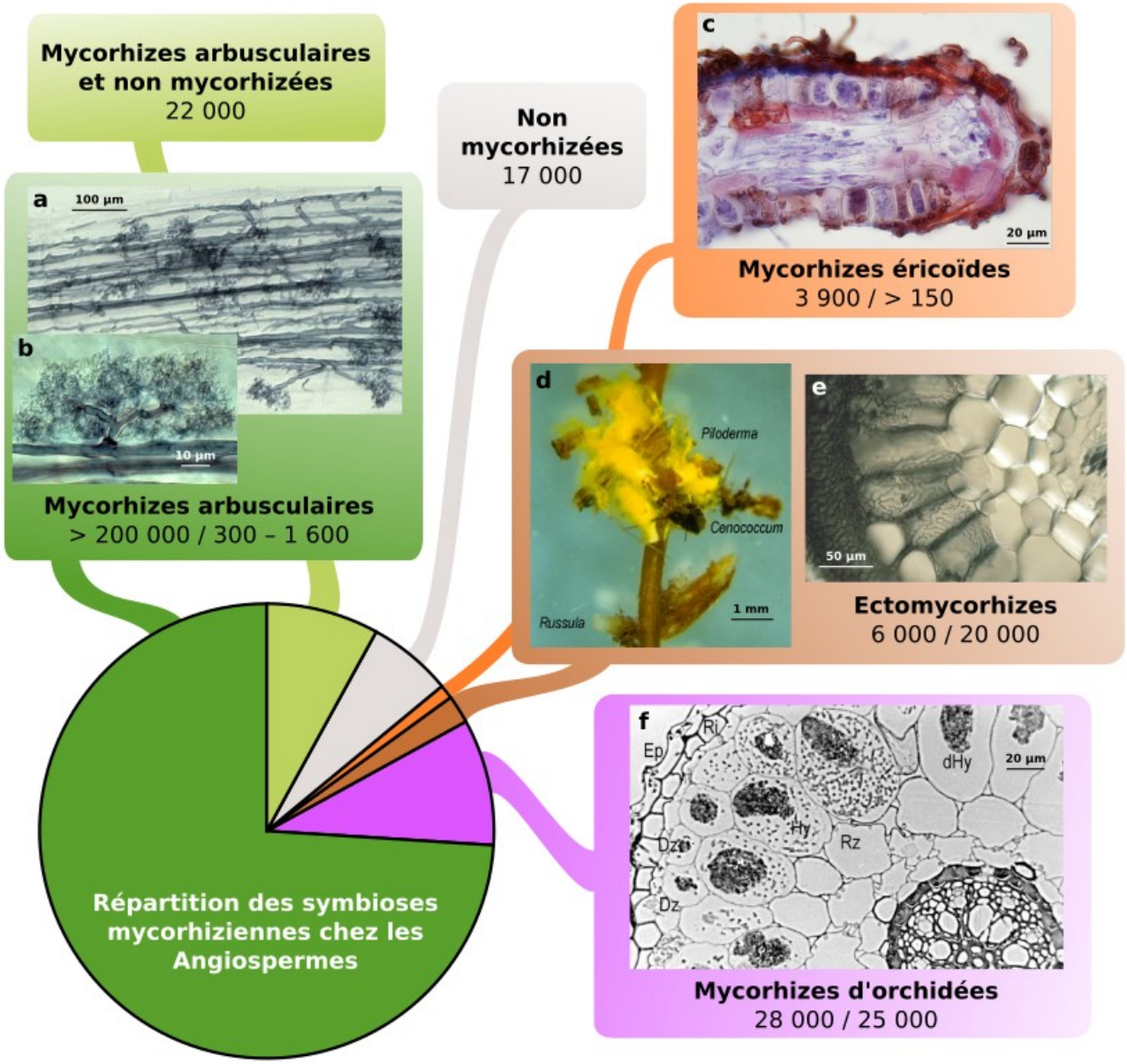


Figure 1 : diversité des associations mycorhiziennes chez les Angiospermes. Pour chaque type de mycorhize sont indiqués le nombre d'espèces de plantes / de champignons concernés (Brundrett, 2009 ; van der Heijden *et al.*, 2015). **a.** Colonisation d'une racine de poireau (*Allium porrum*) par le champignon *Glomus versiforme*. **b.** Vue de détail d'un arbuscule. **c.** Racine cheveu de myrtille (*Vaccinium myrtillus*) colonisée par un champignon mycorhizien (espèce non précisée). **d.** Racine de jeune épicéa (*Picea abies*) colonisée par trois champignons ectomycorhiziens différents. **e.** Réseau de Hartig dans une racine de peuplier (*Populus* sp.). **f.** Électronographie d'un racine d'orchidée (espèce non précisée) montrant des pelotons intacts (Hy) ou dégradés (dHy).
Photographies reproduites avec l'aimable autorisation de Mark Brundrett (a, b, e) et Martin Vohník (c ; Institute of Botany ASCR, Czech Republic) ou issues de Wikimedia Commons (d, f ; Ingrid Kottke).

colonisent le cortex de la racine, dégradent et traversent les parois végétales, puis pénètrent dans les cellules hôtes en développant des ramifications typiques en forme de petits arbres (*arbuscules* ; Figure 1). Le déploiement de cette interface importante – deux à quatre fois la surface initiale de la membrane plasmique (Toth *et al.*, 1990) – est un élément clé de la symbiose. Au cours de l'invasion par le champignon, la membrane plasmique de la cellule hôte est repoussée mais jamais rompue, de sorte que la cellule conserve son intégrité. Le terme *endomycorhize* qualifie ces interactions mycorhiziennes où le développement du champignon se fait *à l'intérieur* des cellules végétales. Les endomycorhizes ne sont pas visibles à l'œil nu par simple observation des racines, un examen au microscope est nécessaire pour en déceler les structures caractéristiques. Notons – et ceci est valable pour tous les types de mycorhizes – que la colonisation du champignon se limite au cortex de la racine, jamais les hyphes ne traversent l'endoderme et ne pénètrent dans le cylindre central.

Les champignons impliqués dans les mycorhizes arbusculaires appartiennent tous à la classe des Gloméromycètes, un groupe de champignons à hyphes non cloisonnés proche des Mucoromycètes (par exemple *Rhizopus*, *Mucor* ; Spatafora *et al.*, 2016). Ce sont des symbiontes obligatoires ne pouvant se développer, ou être cultivés en laboratoire, sans une plante hôte assurant leur nutrition carbonée (Bonfante et Genre, 2008). Selon les seuils de divergence et les marqueurs considérés, entre 300 et 1 600 espèces de gloméromycètes ont été décrites sur la base de données moléculaires (Kivlin *et al.*, 2011 ; Öpik *et al.*, 2013). Un chiffre étonnamment faible si on le compare aux plus de 200 000 espèces de plantes qui mettent en place des mycorhizes arbusculaires (Brundrett, 2009), soulignant le caractère généraliste des symbiontes fongiques.

b) Les ectomycorhizes

Ce type de mycorhize doit son nom au fait que les hyphes des champignons, bien qu'ils colonisent l'ensemble du cortex racinaire, ne traversent pas les parois végétales et prolifèrent donc *à l'extérieur* des cellules hôtes (Figure 1). C'est cet enchevêtrement d'hyphes que Hartig avait observé sans le savoir au XIX^{e} siècle et qui porte désormais son nom (réseau de Hartig). Contrairement aux mycorhizes arbusculaires et aux autres endomycorhizes, les ectomycorhizes peuvent être repérées à l'œil nu. En effet, en plus du réseau de Hartig interne, la racine colonisée est recouverte d'un manchon de mycélium dense et développé appelé *manteau* (Figure 1).

Les ectomycorhizes sont apparues à plusieurs reprises dans plus de 20 familles d'Angiospermes et de Gymnospermes et concernent environ 6 000 espèces de plantes (Wang et Qiu, 2006 ; Brundrett, 2009). La plupart de ces espèces sont des arbres et des arbustes des régions tempérées, boréales et tropicales, si bien que, malgré une richesse spécifique limitée, les ectomycorhizes ont une importance écologique majeure et structurent littéralement une grande partie des écosystèmes terrestres (Read, 1991 ; Courty *et al.*, 2010).

Entre 20 000 et 25 000 espèces de champignons seraient capables de former des ectomycorhizes (Rinaldi *et al.*, 2008 ; Tedersoo *et al.*, 2010). Toutes appartiennent aux Dikarya, des champignons à hyphes cloisonnés divisés en deux grandes lignées : les Ascomycètes et les Basidiomycètes. Comme chez les plantes partenaires, le passage à l'état ectomycorhizien a eu lieu

de nombreuses fois de manière indépendante à partir d'ancêtres saprotrophes* (Kohler *et al.*, 2015) et sans doute par des intermédiaires endophytes* (Selosse *et al.*, 2018). Les champignons ectomycorhiziens ont d'ailleurs pour la plupart conservé l'équipement enzymatique leur permettant de dégrader la matière organique présente dans le sol (Courty *et al.*, 2010).

c) Les mycorhizes d'orchidées

Parfois nommé « orchidoïde » ce type de mycorhize est l'apanage des orchidées. Avec près de 28 000 espèces décrites (The Plant List, 2018) – auxquelles s'ajoutent plusieurs centaines de nouvelles espèces chaque année ! (Chase *et al.*, 2015) – cela concerne toutefois une part importante de la biodiversité végétale. Les interactions mycorhiziennes chez les orchidées présentent par ailleurs des spécificités et des évolutions remarquables, ouvrant des portes vers une compréhension plus large de la symbiose mycorhizienne en général. Ces particularités seront largement développées au cours de cette thèse et nous présenterons ici simplement une première vue d'ensemble de l'association.

Comme pour les mycorhizes arbusculaires, les mycorhizes d'orchidées sont des endomycorhizes. Les hyphes s'immiscent dans les cellules racinaires en repoussant leur membrane plasmique et s'y développent en amas spiralés compacts appelés *pelotons* (Figure 1). Ces pelotons ont une durée de vie de seulement quelques jours, les hyphes étant alors dégradés par la cellule végétale qui reprend ensuite une forme normale (Dearnaley *et al.*, 2016). La recolonisation des cellules par le champignon se fait cependant rapidement et, de cette instabilité dynamique à l'échelle cellulaire, émerge une interaction stable à l'échelle de l'organe. L'interprétation biologique de ce renouvellement permanent est encore discutée. Il pourrait s'agir d'une réaction de défense de la plante hôte – réminiscence d'un parasitisme ancestral –, d'une forme de transfert de nutriment du champignon vers la plante, ou encore d'un mécanisme de contrôle du symbionte par la plante qui sélectionnerait les partenaires les plus profitables (Smith et Read, 2008 ; Dearnaley *et al.*, 2016).

La majorité des orchidées s'associent classiquement avec des champignons basidiomycètes appartenant à trois familles : les Tulasnellaceae, les Ceratobasidiaceae et les Serendipitaceae (Dearnaley *et al.*, 2012). Cette dernière forme avec les Sebacinaceae (famille sœur) l'ordre des Sebacinales et on retrouve fréquemment les appellations historiques respectives Sebacinales groupe B et Sebacinales groupe A (Weiß *et al.*, 2016). Les trois familles mentionnées ci-dessus correspondent à des lignées distinctes et relativement éloignées au sein des Basidiomycètes (Taylor *et al.*, 2002), néanmoins, on rassemble par commodité les champignons mycorhiziens d'orchidées qu'elles hébergent sous le nom de *rhizoctonias* (à ne pas confondre avec le genre saprotrophe ou parasite *Rhizoctonia*, Ceratobasidiaceae).

d) Les mycorhizes éricoïdes

Ce dernier type de mycorhize se rencontre chez cinq sous-familles d'éricacées : les Styphelioideae, les Vaccinioideae, les Harrimaneloideae, les Ericoideae et les Cassiopoideae (Smith et Read, 2008 ; Schwery *et al.*, 2014). Ces cinq sous-familles forment un groupe monophylétique

rassemblant la grande majorité des espèces de la famille (Schwery *et al.*, 2014). Les espèces de ce groupe ont la particularité de posséder des racines « cheveux » extrêmement fines (diamètre < 100 µm) dont le cylindre central est entouré d'un endoderme et d'une seule couche de cellules épidermiques. C'est dans cette dernière que se met en place l'interaction mycorhizienne : une endomycorhize où les hyphes fongiques forment des pelotons semblables à ceux des mycorhizes d'orchidées (Figure 1 ; Smith et Read, 2008). Les champignons impliqués sont pour la plupart des ascomycètes et des basidiomycètes de la famille des Serendipitaceae (Weiß *et al.*, 2016), mais d'autres espèces sont de temps en temps retrouvées dans les jeux de données moléculaires sans que leur nature mycorhizienne ou endophytique puisse être clairement tranchée (van der Heijden *et al.*, 2015).

Notons que les éricacées mycohétérotrophes (Monotropoideae) et mixotrophes (Pyroleae) dont il sera question par la suite ne forment pas de mycorhizes éricoïdes mais d'autres types de mycorhizes respectivement appelées *monotropoïdes* et *arbutoïdes* (ou *pyroloïdes* selon les auteurs ; Smith et Read, 2008 ; Imhof, 2009). Nous n'en détaillerons pas les caractéristiques ici, mais signalons tout de même que les mycorhizes éricoïdes et ces deux derniers types peuvent tous être considérés comme des dérivés de la symbiose ectomycorhizienne, dans lesquels les hyphes pénétreraient à différents degrés – mais toujours sans rupture de la membrane plasmique – dans les cellules racinaires (Imhof, 2009). Le terme de *groupe ectomycorhizien* peut s'employer pour considérer l'ensemble de ces types mycorhiziens apparentés (Imhof, 2009).

3. Fonctionnement général de la symbiose

Avant qu'il ne se passionne pour les mycorhizes, les travaux de Frank sur les lichens laissaient déjà entrevoir un talent certain du chercheur pour les néologismes mémorables. C'est lui qui en 1877 imagina le mot *symbiotismus* pour décrire cette association entre une algue et un champignon (Frank, 1877). Repris et reformulé en *symbiose* par son compatriote le microbiologiste Anton de Bary (de Bary, 1879), le terme se popularise et désigne de manière générale toute association de coexistence durable entre deux organismes (Selosse, 2017). En français, l'usage du terme s'est peu à peu circonscrit aux cas d'interactions à bénéfices réciproques, autrement dit, de mutualismes. C'est cette définition que nous retiendrons dans ce manuscrit. Le fonctionnement des interactions mycorhiziennes peut donc être envisagé selon ces deux facettes de la symbiose : durabilité de l'association et bénéfices pour les partenaires.

Sauf mention contraire, les caractéristiques générales de la symbiose mycorhizienne, succinctement développées ci-dessous, s'appliquent à tous les types de mycorhizes.

a) Mise en place, contrôle et durabilité de l'interaction

La rencontre et la reconnaissance mutuelle des partenaires est un prérequis indispensable à la symbiose mycorhizienne. Plantes et champignons synthétisent et sécrètent en permanence des petites molécules diffusant dans le sol. Certaines peuvent être reconnues par le partenaire,

déclenchant une cascade de réactions qui stimulent et orientent la croissance des hyphes ou des racines. Citons comme exemples de ces signaux sécrétés, côté plante, les strigolactones et certains flavonoïdes, et, côté champignon, l'auxine et les lipochitooligosaccharides (Valadares *et al.*, 2014 ; Bonfante et Genre, 2015 ; Martin *et al.*, 2016).

Une fois le mycélium au contact des racines, le processus de colonisation commence. Cela implique pour le champignon de dégrader la cellulose et d'autres composés pariétaux afin de progresser dans les tissus et, dans le cas des endomycorhizes, d'aller jusqu'au contact des cellules végétales. Cette intrusion provoque une réaction initiale de défense de la plante similaire à celle qu'un pathogène pourrait induire. Les champignons mycorhiziens ont toutefois évolué de telle sorte qu'ils sont en mesure de contourner ou de modérer la réaction immunitaire de l'hôte (Volpin *et al.*, 1995 ; Gianinazzi-Pearson, 1996 ; Dearnaley *et al.*, 2016). Cet équilibre délicat est admirablement illustré lors de la colonisation de racines de peuplier (*Populus trichocarpa*) par le champignon ectomycorhizien *Laccaria bicolor*. La pénétration des hyphes dans les tissus végétaux déclenche la synthèse de jasmonate, un médiateur de la réponse immunitaire de la plante qui, en tant normal, conduit à l'expression de gènes de défense (Plett *et al.*, 2014). *Laccaria bicolor* sécrète cependant une petite protéine (MiSSP7 pour mycorrhiza-induced small secreted protein 7) qui inhibe spécifiquement l'action du jasmonate, permettant ainsi à la symbiose de se mettre en place (Plett *et al.*, 2014). Des mécanismes similaires – ayant possiblement évolués indépendamment dans chaque lignée – sont pressentis chez les autres champignons ectomycorhiziens, et de manière générale, chez l'ensemble des symbiontes fongiques (Kohler *et al.*, 2015).

La durée de vie des structures mycorhiziennes est limitée. Cela résulte soit de la dégradation des arbuscules et des pelotons, soit du remplacement ou de la maturation des racines sièges des ectomycorhizes et des mycorhizes éricoïdes (Smith et Read, 2008). Le maintien de la symbiose au cours du temps nécessite donc en permanence le renouvellement des interfaces d'échange et la recolonisation des tissus végétaux. Cependant, malgré leur instabilité intrinsèque, la multiplicité des structures symbiotiques élémentaires à l'échelle de l'ensemble du système racinaire assure une interaction durable entre les partenaires (Garbaye, 2013). Par ailleurs, cette dynamique confère une certaine flexibilité à la symbiose mycorhizienne, tant du point de vue de l'intensité de l'interaction que des partenaires mis en jeu. Il s'agit donc, pour les organismes impliqués dans la symbiose, d'un facteur essentiel d'adaptation aux conditions environnementales et de sélection mutuelle des espèces ou des individus les plus coopératifs.

b) Fonctions de nutrition

Le rôle positif de la symbiose mycorhizienne dans la croissance des plantes est l'aspect le plus visible de cette interaction (Frank, 1892a). Les mycéliums des champignons mycorhiziens, grâce à leur ramification intense et à la finesse de leurs hyphes (diamètre < 10 µm, Figure 1), explorent un volume de sol considérable et s'insinuent dans des porosités inaccessibles au racines des plantes. L'eau et les éléments minéraux solubles qu'elle contient est ainsi efficacement récoltée et diffuse jusqu'aux racines via la surface hydrophile des hyphes ou par l'intermédiaire de structures spécialisées (cordons et rhizomorphes) chez les champignons ectomycorhiziens (Marschner et Dell,

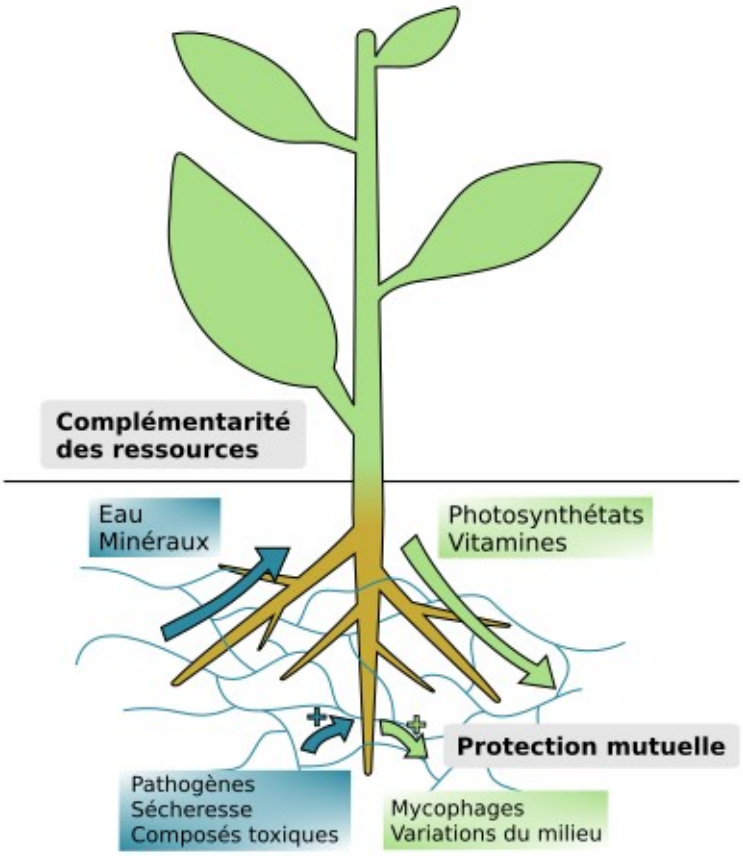


Figure 2 : fonctions de nutrition et de protection à l'œuvre lors de la symbiose mycorhizienne. Les hyphes du champignon mycorhizien sont représentés en bleu.

1994 ; Garbaye, 2013 ; Figure 2). Cette extension de la zone d'absorption des nutriments est cruciale pour les éléments rares et/ou peu solubles. Il en est ainsi du phosphate, dont les formes solubles – ions orthophosphates ($H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-}, PO_4^{3-}) – sont largement minoritaires dans le sol et rapidement épuisées à proximité des racines (Jungk et Classens, 1989). Parmi les différents types de mycorhizes, les plus déterminantes pour l'approvisionnement en phosphore sont les mycorhizes arbusculaires, qui assurent jusqu'à 80 % des apports de la plante (Li *et al.*, 1991 ; Jakobsen *et al.*, 1992).

Outre les éléments solubles, les ascomycètes et les basidiomycètes impliqués dans les symbioses ectomycorhiziennes, orchidoïdes et éricoïdes, sont également capables de récupérer des nutriments à partir de formes complexées, de minéraux ou encore de matière organique (Marschner et Dell, 1994 ; Jongmans *et al.*, 1997 ; Lindahl et Tunlid, 2015). Ils sécrètent pour ce faire un arsenal d'enzymes et d'acides organiques similaire à ceux des champignons saprotrophes avec lesquels ils partagent une origine commune (Courty *et al.*, 2010 ; Kohler *et al.*, 2015).

Symétriquement, les plantes assurent la nutrition des champignons mycorhiziens en leur allouant une part significative de leurs photosynthétats : 10 à 20 % dans le cas des mycorhizes arbusculaires et 20 % ou plus pour les ectomycorhizes et les mycorhizes éricoïdes (Leake *et al.*,

2004 ; van der Heijden *et al.*, 2015 ; Figure 2). La situation est plus nuancée chez les mycorhizes d'orchidées, sur lesquelles nous reviendrons. Par ailleurs, en plus de cet apport « calorifique » en sucres, certains micronutriments essentiels – comme des vitamines – peuvent parfois être fournis par la plante hôte (Nagae *et al.*, 2016).

c) Fonctions de protection

Les bénéfices que plantes et champignons retirent de la symbiose mycorhizienne vont au-delà d'un meilleur accès aux ressources. Cette association procure également aux deux partenaires certaines formes de protection, à commencer par une plus grande résistance aux stress abiotiques (Figure 2). Cela se conçoit sans mal pour le champignon qui profite, dans les tissus végétaux, d'un environnement stable. Un abri face aux variations des conditions physico-chimiques du sol. Pour la plante, la symbiose permet un meilleur accès à l'eau et aux éléments minéraux, et donc, une tolérance accrue à la sécheresse (Augé, 2001). Les ascomycètes et les basidiomycètes peuvent également jouer un rôle protecteur face à des composés toxiques du sol, comme les métaux lourds ou des polluants organiques, en les complexant ou en les dégradant (Garbaye, 2013).

La symbiose mycorhizienne favorise par ailleurs une résistance commune des partenaires aux stress biotiques (Figure 2). Le champignon est en effet protégé des organismes mycophages (collemboles, acariens…) et des espèces compétitrices. Il peut en retour augmenter la résistance de la plante hôte aux pathogènes de trois façons : (1) en gênant physiquement sa pénétration et sa progression, en particulier dans le cas des ectomycorhizes ; (2) en sécrétant des molécules à action antibiotique plus ou moins spécifique ; et (3) en stimulant la réponse immunitaire de la plante lors de la mise en place de la symbiose, favorisant ainsi une réponse ultérieure rapide et efficace dans le cas d'un organisme pathogène (Smith et Read, 2008 ; Jung *et al.*, 2012).

4. Les réseaux mycorhiziens

Mis à part certains cas particuliers, les interactions mycorhiziennes sont le plus souvent peu spécifiques. Une même espèce de champignon peut former une association stable avec de nombreuses espèces de plantes différentes, et inversement (Newman, 1988 ; Figure 1d). Cela est également vrai à l'échelle de l'individu : un *genet* fongique donné peut s'associer simultanément à de nombreuses plantes – potentiellement d'espèces différentes – et réciproquement. Par conséquent, la symbiose mycorhizienne doit davantage s'envisager comme un réseau complexe et changeant d'interactions entre de nombreux organismes (Figure 3).

L'existence de tels réseaux donne à la symbiose mycorhizienne une nouvelle dimension et pose de nombreuses questions quant aux interactions antagonistes et mutualistes pouvant survenir entre les organismes ainsi connectés (Selosse *et al.*, 2006). Une littérature abondante est consacrée à ce sujet passionnant qui continue de susciter recherches et controverses (Simard *et al.*, 2012 ; Horton, 2015 ; Bücking *et al.*, 2016). Au cœur du débat, la possibilité d'une allocation différentielle des ressources selon la « qualité » des partenaires se dessine (Lekberg *et al.*, 2010 ; Kiers *et al.*, 2011 ;

Figure 3 : un réseau mycorhizien simple. Dans ce microcosme obtenu en laboratoire, trois jeunes plantules de pin sylvestre (*Pinus sylvestris*) forment des mycorhizes avec un même genet de *Suillus bovinus* (Basidiomycètes). Photographie issue de Smith et Read (2008).

Fellbaum *et al.*, 2014 ; Jakobsen et Hammer, 2015), de même que l'existence de « tricheurs » pouvant échapper à ces mécanismes de sélection et profiter de ressources à bas coût (Walder *et al.*, 2012). Une grande variabilité dans les réponses des systèmes biologiques caractérise toutefois ces expériences, suggérant une flexibilité importante selon les partenaires en présence et les conditions environnementales (van der Heijden et Horton, 2009 ; Wagg *et al.*, 2015). La transposition de résultats issus de systèmes simples en laboratoire à la complexité des réseaux mycorhiziens naturels, est également une difficulté de taille, invitant à la prudence dans nos conclusions.

Un autre champ d'études concerne l'intervention des réseaux mycorhiziens dans les interactions entre plantes. Des transferts de diverses molécules d'une plante à une autre par l'intermédiaire d'un champignon mycorhizien commun ont en effet été mis en évidence. Parmi elles, des molécules carbonées (Simard *et al.*, 1997), des composés pouvant freiner la croissance d'autres espèces (Barto *et al.*, 2011) et des signaux d'alerte stimulant la réponse immunitaire (Babikova *et al.*, 2013 ; Song *et al.*, 2014). Des résultats fascinants qui suggèrent des mécanismes d'interaction originaux chez les végétaux, bien qu'ici aussi la prudence soit de mise avant toute généralisation. Ces découvertes font d'ailleurs l'objet d'un traitement médiatique croissant et rencontrent un public de plus en plus large et enthousiaste (Société Française d'Écologie et d'Évolution, 2018).

Notons également que les plantes mycohétérotrophes (dont il sera question dans la partie suivante) sont probablement la preuve la plus directe de l'existence des réseaux mycorhiziens et de leur importance biologique.

5. Entre mutualisme et parasitisme

a) Les facteurs influençant l'issue de la symbiose

En 2010, une équipe nord-américaine publie une méta-analyse de 2 000 études portant sur la réponse des plantes à l'inoculation par des champignons mycorhiziens (Hoeksema *et al.*, 2010). Dans la majorité des cas, la croissance de la plante est améliorée par l'inoculation. Cependant, certaines études montrent un effet quasiment nul, voire, une moins bonne croissance en présence de champignons mycorhiziens, suggérant une relation de parasitisme. Ces études portent sur certaines catégories de plantes – herbacées en C3 ou plantes ligneuses fixatrices d'azote – ou sur des sols ayant reçu des engrais azotés (Hoeksema *et al.*, 2010). Les conclusions de ce travail viennent confirmer à large échelle une idée déjà formalisée il y a plusieurs années et considérant l'association mycorhizienne comme un continuum entre parasitisme et mutualisme (Johnson *et al.*, 1997 ; voir également Smith et Smith, 2013 pour une mise à jour critique).

L'identité des partenaires, le stade développemental et les conditions environnementales (biotiques et abiotiques) dans lesquelles s'établit l'interaction mycorhizienne sont des facteurs essentiels pouvant en modifier l'issue. Ainsi, la croissance d'une plante est plus ou moins favorisée selon les espèces – voire les souches – de champignons avec lesquelles elle interagit (Marx, 1979 ; Bougher *et al.*, 1990 ; van der Heijden *et al.*, 1998). Mais une même association peut, selon l'âge de la plante, les autres espèces végétales en présence, ou les conditions du milieu, donner un résultat différent (Li *et al.*, 2005 ; Walder *et al.*, 2012 ; Martínez-García *et al.*, 2015). La fertilité du sol est un paramètre important à cet égard. Les avantages, en termes de croissance, d'une plante mycorhizée par rapport à la même plante non mycorhizée, sont en effet moins marqués dans des sols riches en nutriments (Smith et Read, 2008 ; Hoeksema *et al.*, 2010). Dans de telles conditions, la présence du symbionte n'améliore pas spécialement l'approvisionnement de la plante en nutriments, mais elle représente toujours un coût significatif en carbone.

Malgré tout l'intérêt de la notion de continuum parasitisme – mutualisme pour analyser de manière plus fine et plus réaliste les interactions mycorhiziennes, plusieurs écueils peuvent être soulignés. Premièrement, le biais du « phytocentrisme ». Faute de pouvoir facilement estimer les rapports coûts/bénéfices de la symbiose mycorhizienne pour les champignons, et souvent motivées par la recherche agronomique, la grande majorité des études se concentrent sur les végétaux. Deuxièmement, la difficulté de choisir un indicateur de fitness* biologiquement pertinent. Celle-ci est la plupart du temps ramenée à la croissance végétative, le gain en biomasse, parfois la teneur des plantes en phosphore. Les fonctions de protection précédemment évoquées sont très peu prises en compte malgré leurs conséquences possibles sur la fitness des partenaires, au-delà d'une meilleure

croissance. Troisièmement, la comparaison même d'un état mycorhizé à un état non mycorhizé obtenu artificiellement est paradoxale puisque ce dernier n'advient jamais en conditions naturelles. Quatrièmement, la dynamique intrinsèque des réseaux mycorhiziens et la diversité des partenaires en interaction, rend toute tentative d'attribution individuelle des coûts et des bénéfices en conditions réelles particulièrement hasardeuse.

En dépit de ces difficultés, un tel raisonnement sur le rapport coûts/bénéfices de l'association est fondamental pour envisager la symbiose mycorhizienne dans un cadre évolutif.

b) Stabilité évolutive du mutualisme

À l'origine des symbioses mycorhiziennes se trouvent probablement des situations de coexistence de type commensalisme ou parasitisme – comme c'est le cas pour de nombreuses autres symbioses (Selosse, 2000). Si l'évolution vers le mutualisme semble assez intuitive étant donné le bénéfice net global pour les deux partenaires, il faut garder à l'esprit l'instabilité inhérente à ce type d'interactions. En effet, l'émergence aléatoire d'individus qui investissent moins dans la relation tout en conservant les bénéfices associés, est inévitable. Ces tricheurs sont sélectionnés et peuvent envahir rapidement la population, provoquant alors l'arrêt de la symbiose, le passage à un parasitisme ou encore l'extinction des protagonistes (Ferriere *et al.*, 2002). Le fait que la symbiose mycorhizienne ait perduré pendant plus de 400 millions d'années (Remy *et al.*, 1994) et soit si répandue aujourd'hui implique donc en théorie l'existence de mécanismes permettant de contre-sélectionner les tricheurs éventuels.

Parmi ces mécanismes, la multiplicité des partenaires en interaction au sein des réseaux mycorhiziens est un point essentiel. Comme évoqué précédemment, la possibilité qu'a une plante ou un champignon d'allouer plus ou moins de ressources à ses partenaires s'apparente – anthropomorphiquement – à un processus de choix, de discrimination entre partenaires plus ou moins coopératifs (Werner et Kiers, 2015). Les relations trop dissymétriques sont délaissées par l'organisme exploité, qui interagit préférentiellement avec les partenaires concurrents plus fréquentables. Il en résulte une auto-organisation favorisant les échanges à bénéfices réciproques, un *marché biologique*, comme proposé par certains auteurs (Noë et Hammerstein, 1995 ; Selosse et Rousset, 2011).

6. Bilan sur les symbioses mycorhiziennes

L'avènement de la symbiose mycorhizienne a été une véritable révolution dans l'histoire de la vie. Plantes et champignons ont de conserve créé les premiers sols et, aujourd'hui encore, leur association structure *radicalement* l'essentiel des écosystèmes terrestres. Autour du thème originel « nutrition et protection réciproque », des variations se sont dessinées, impliquant de nouveaux partenaires, de nouvelles formes, de nouveaux dialogues. Plutôt qu'une monogamie exclusive convenue, l'étude des réseaux mycorhiziens nous révèle un manège polyamoureux tumultueux où bien des intrigues restent à découvrir.

Toutefois, la paisible idylle entre les plantes et leurs symbiontes fongiques peut également s'envisager – à l'instar de nombreux autres mutualismes – comme une exploitation mutuelle (Herre *et al.*, 1999). Loin d'être une évidence, les bénéfices réciproques que retirent les partenaires de l'association sont dus à des mécanismes de régulation, fruits d'une longue histoire commune, et sont soumis aux aléas environnementaux. Mais face à la concurrence du marché biologique, maintenir durablement une relation trop franchement inéquitable n'est pas chose aisée.

Pourtant, nous allons maintenant nous intéresser à certaines plantes qui, telles des voyous de la finance, ont appris à contourner les lois du marché et à instaurer des rapports peu orthodoxes avec leurs partenaires fongiques.

II. La mycohétérotrophie

1. Découverte d'une association mycorhizienne à sens unique

Au moment ou Hartig fait ses premières observations de mycorhizes dans les années 1840, une controverse s'installe sur la nature parasitaire ou non d'une plante originale : le monotrope (*Monotropa hypopitys*, Ericaceae ; Figure 4). Cette petite plante de sous-bois a de quoi rendre les naturalistes perplexes : dépourvue de chlorophylle, elle doit nécessairement disposer d'une source de carbone organique pour se développer. Les arbres alentours constituent alors une cible de choix (Lees, 1841). Pourtant, à la différence d'espèces hétérotrophes parasites (holoparasites) comme les orobanches – genre dans lequel il fut d'ailleurs initialement classé –, impossible de trouver chez le monotrope, des suçoirs greffés sur les racines des plantes voisines desquelles il aurait pu tirer subsistance (Newman, 1942 ; Rylands, 1942). On décèle en revanche un feutrage mycélien autour des racines du monotrope, rappelant celui des ectomycorhizes. Avec la formalisation du concept de symbiose mycorhizienne vers la fin du XIX^{e} siècle, se dégage l'hypothèse selon laquelle le monotrope est nourri par son symbionte racinaire (Kamieński, 1882 ; Frank, 1892b ; Kerner von Marilaun, 1894). La nature mutualiste ou parasitaire de l'association reste toutefois énigmatique, certains auteurs proposant une forme de « saprophytisme symbiotique » (MacDougal, 1899).

C'est seulement dans la seconde moitié du XX^{e} siècle, grâce à l'utilisation de traceurs isotopiques, que le monotrope livre ses secrets (Björkman, 1960). Comme supposé initialement, son carbone provient bien des arbres voisins, mais celui-ci transite jusqu'au monotrope par l'intermédiaire de champignons mycorhiziens qu'il partage avec les arbres ! Une preuve saisissante de l'existence des réseaux mycorhiziens et de l'importance qu'il peuvent avoir dans les interactions entre plantes. Ce mode de nutrition, d'abord qualifié d'épiparasitisme, est décrit chez de nombreuses autres plantes dans les années qui suivent. C'est finalement en 1994, dans un article de synthèse consacré au sujet, que Jonathan Leake propose le terme *mycohétérotrophie* (Leake, 1994). Dans son sens le plus large, il s'agit donc du **processus par lequel une plante obtient de la matière organique (du carbone) depuis un ou plusieurs champignons avec lesquels elle forme des mycorhizes**.

Il existe plusieurs façons pour une plante d'obtenir du carbone grâce à ses champignons mycorhiziens, et différents degrés de mycohétérotrophie. Nous allons les détailler au cours de cette deuxième partie introductive.

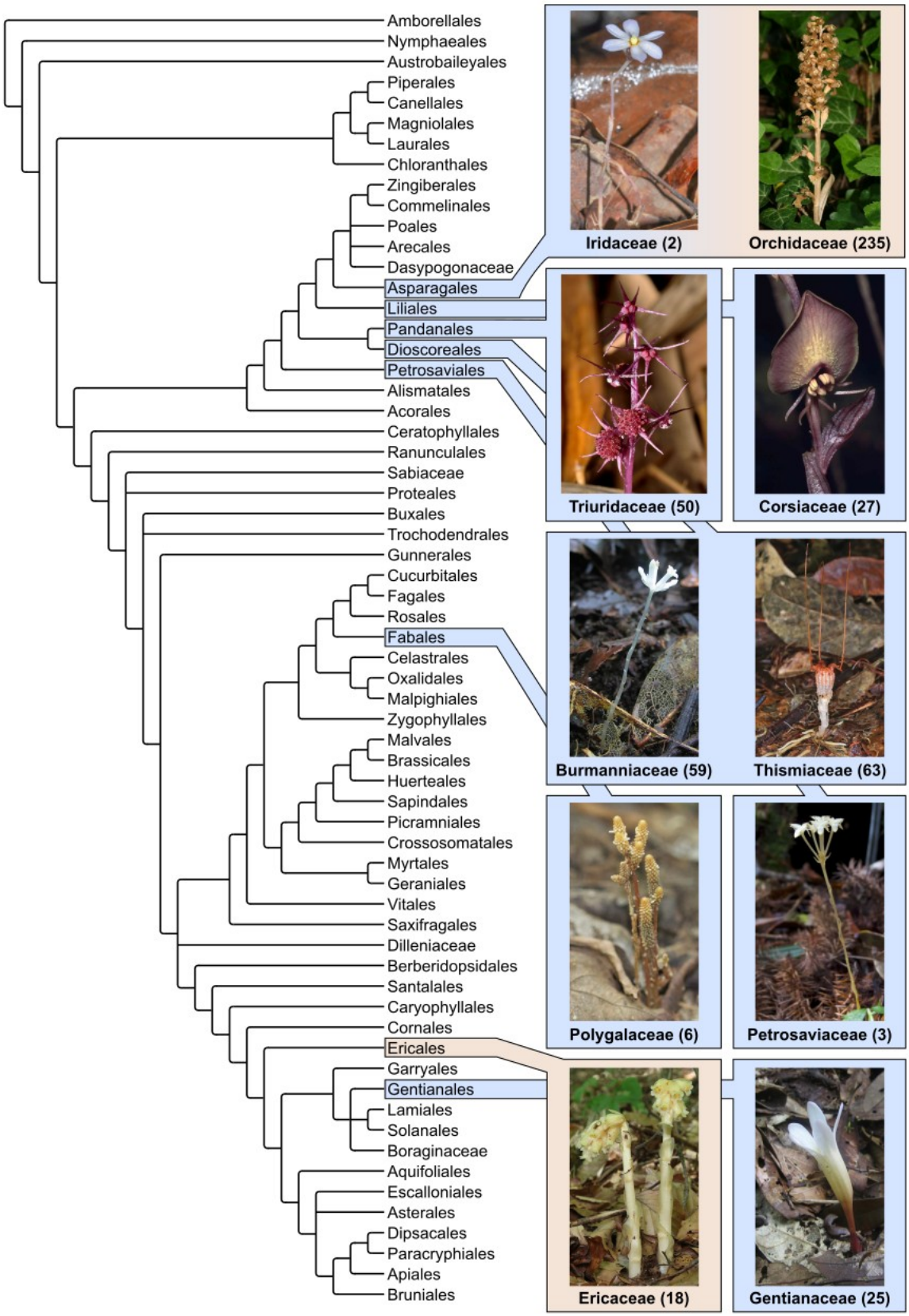


Figure 4 : diversité des plantes entièrement mycohétérotrophes chez les Angiospermes. Figure adaptée de Merckx *et al.* (2013b). La phylogénie est issue de APG (2009). Pour chaque famille le nombre d'espèces

(suite)

Figure 4 (suite) :
mycohétérotrophes est indiqué entre parenthèses (Merckx *et al.*, 2013a). La couleur de fond correspond au type de réseau mycorhizien exploité : arbusculaire (bleu) ou ectomycorhizien (marron), avec quelques cas de saprophytisme et de parasitisme chez les orchidées. Les espèces représentées sont, de gauche à droite et de haut en bas : *Geosiris australiensis* (photographie issue de Gray et Low, 2017), *Neottia nidus-avis* (Franz Xaver, Wikimedia Commons), *Sciaphila secundiflora* (Kuo-Chu Yueh, Wikimedia Commons), *Corsia ornata* (Thassilo Franke, Wikimedia Commons), *Burmannia congesta* (photographie aimablement fournie par Vincent Merckx), *Thismia neptunis* (photographie issue de Sochor *et al.*, 2018), *Epirixanthes cylindrica* (V. Merckx), *Petrosavia stellaris* (V. Merckx), *Monotropa hypopitys* (Holger Krisp, Wikimedia Commons), *Voyria clavata* (V. Merckx).

2. Les plantes entièrement mycohétérotrophes

a) Généralités et diversité

Cette catégorie correspond au cas du monotrope, et de manière générale, rassemble toutes les plantes qui dépendent entièrement de leurs champignons mycorhiziens tout au long de leur vie. C'est le type de mycohétérotrophie le plus facilement décelable puisque ces plantes non photosynthétiques ne sont la plupart du temps plus chlorophylliennes, le pigment restant parfois à l'état de traces. Souvent, l'homochromie a été sélectionnée, de même que d'autres caractères comme la disparition des feuilles, la réduction des tissus conducteurs et des tissus de soutien, un développement essentiellement souterrain avec des racines courtes et épaisses souvent groupées en amas autour d'un rhizome (Figure 4 ; Leake, 1994). Cette diminution du rapport surface sur volume des organes souterrains témoigne de leur rôle de stockage du carbone issu des champignons (généralement sous forme d'amidon), la fonction d'absorption ayant été intégralement sous-traitée à ces derniers (Leake, 1994).

À l'exception d'une hépatique, *Aneura mirabilis* (Aneuraceae), les plantes entièrement mycohétérotrophes ont été jusqu'à présent décrites uniquement chez les Angiospermes. On y compte plus de 500 espèces, la plupart monocotylédones, réparties dans dix familles différentes (Figure 4 ; Merckx *et al.*, 2013a). Les orchidées en rassemblent à elles seules près de la moitié (environ 235 espèces ; Merckx *et al.*, 2013a), et toutes – sauf les lianes du genre *Erythrorchis* – ont la particularité d'être terrestres, contrairement au nombre considérable d'espèces épiphytes de cette famille. D'un point de vue évolutif, l'apparition de plantes entièrement mycohétérotrophes a eu lieu au moins 46 fois de manières indépendantes dans l'histoire des Embryophytes (Merckx *et al.*, 2013b). La plupart de ces plantes vivent dans les forêts de la zone inter-tropicale. On retrouve dans les régions tempérées, les représentantes de la famille des éricacées et certaines orchidées (Merckx *et al.*, 2013a). Presque toutes les plantes mycohétérotrophes sont des espèces de sous-bois, la faible luminosité de ces milieux ayant de toute évidence constitué une pression de sélection favorisant l'émergence de la mycohétérotrophie.

b) Champignons associés et origine du carbone

On distingue plusieurs manières d'obtenir du carbone par mycohétérotrophie selon le type de champignons avec lesquelles s'associe la plante (Figure 5).

Le cas le plus commun implique des champignons formant également des mycorhizes avec les plantes autotrophes voisines. Le carbone est donc à l'origine issu de la photosynthèse de ces plantes, puis les espèces mycohétérotrophes le récupèrent en exploitant à leur profit le réseau mycorhizien (Leake, 2004). Ce processus a d'abord été décrit pour les réseaux *ectomycorhiziens*, avec le cas du monotrope. De manière générale, toutes les éricacées mycohétérotrophes s'associent à des champignons ectomycorhiziens pour obtenir leur carbone (Bidartondo et Bruns, 2001). Il en va de même pour la majorité des orchidées mycohétérotrophes, qu'elles soient tempérées ou tropicales (Dearnaley *et al.*, 2012 ; Waterman *et al.*, 2013). On assiste donc au sein de cette famille classiquement associée à des rhizoctonias (voir I.2.c), à des changements multiples et indépendants de symbiontes, permettant aux espèces mycohétérotrophes d'accéder à la manne carbonée du réseau ectomycorhizien. Pour les autres familles comportant des espèces mycohétérotrophes, celles-ci sont principalement tropicales et engagées dans des réseaux à mycorhizes *arbusculaires* par l'intermédiaire de gloméromycètes (Bidartondo *et al.*, 2002 ; Franke *et al.*, 2006 ; Merckx *et al.*, 2010 ; Merckx *et al.*, 2012 ; Figure 4). Il existe généralement un certain degré de spécificité entre une plante entièrement mycohétérotrophe et ses symbiontes fongiques. Ces derniers sont souvent restreints à une famille, voire à un genre donné (Bidartondo et Bruns, 2001 ; Leake, 2004).

Pour la majorité des groupes de champignons capables de former des mycorhizes arbusculaires ou des ectomycorhizes, il existe au moins une espèce de plante mycohétérotrophe pouvant s'associer avec eux (Waterman *et al.*, 2013). L'émergence de tricheurs est donc un phénomène récurrent quelque soit le réseau mycorhizien considéré et les organismes impliqués. Une exception notable concerne les mycorhizes éricoïdes, qui jusqu'à présent semblent épargnées (Waterman *et al.*, 2013). Le cas des orchidées est un peu différent dans le sens où ces plantes dominent rarement les écosystèmes et forment donc rarement des réseaux mycorhiziens spécifiques et étendus pouvant potentiellement entretenir des plantes mycohétérotrophes.

Le carbone obtenu par les plantes mycohétérotrophes peut avoir une origine différente lorsque leurs champignons mycorhiziens sont également saprotrophes dans le sol et la litière environnants. Dans ce cas, les plantes sont isolées des réseaux mycorhiziens et récupèrent une partie des ressources que leurs symbiontes prélèvent en dégradant la matière organique. Ce type de mycohétérotrophie a pour le moment été décrit uniquement pour quelques orchidées de forêts tropicales ou subtropicales (Yamato *et al.*, 2005 ; Martos *et al.*, 2009 ; Ogura-Tsujita *et al.*, 2009), mais pourrait s'avérer être assez répandu dans ces milieux (Lee *et al.*, 2015). Les conditions de chaleur et d'humidité qui y règnent favorisent une importante activité de décomposition, rendant possibles des flux de carbone suffisants pour assurer la nutrition de ces orchidées.

Il n'est pas exclu que certaines espèces mycohétérotrophes puissent également s'associer avec des champignons parasites d'autres plantes pour récupérer leur carbone. Ce cas est notamment

Figure 5 : champignons associés et sources de carbone chez les plantes mycohétérotrophes. Les lignes de couleurs symbolisent les hyphes de différentes catégories de champignons. Des formes de nutrition mixtes pourraient également avoir lieu. Les espèces représentées sont, à partir du quartier en haut à gauche puis dans le sens horaire : *Afrothismia hydra* (Vincent Merckx), *Sarcodes sanguinea* (V. Merckx), *Gastrodia elata* (Wikimedia Commons), *Gastrodia similis* (photographie aimablement fournie par Florent Martos).

soupçonné pour les orchidées du genre *Cyrtosia*, *Galeola* ou *Gastrodia*, qui forment des mycorhizes avec des espèces du genre *Armillaria*, des champignons connus pour leur potentiel pathogène (Cha et Igarashi, 1995 ; Cha et Igarashi, 1996 ; Umata *et al.*, 2013 ; Guo *et al.*, 2016). Enfin, notons que des modes de nutrition mixtes pourraient aussi se rencontrer : par exemple saprophytisme et parasitisme (Guo *et al.*, 2016) ou saprophytisme et exploitation d'un réseau mycorhizien (Dearnaley, 2006 ; Ogura-Tsujita *et al.*, 2018).

c) Un vrai parasitisme ?

Si la relation qu'entretiennent les plantes mycohétérotrophes avec leurs champignons mycorhiziens semble à première vue déséquilibrée, des doutes subsistent quant à la nature véritablement parasitaire de cette interaction (Gardes, 2002 ; Selosse et Roy, 2009). Il est en effet pratiquement impossible d'estimer en conditions naturelles, l'impact des plantes mycohétérotrophes sur la fitness des champignons ou des plantes autotrophes du réseau. Leur biomasse est négligeable face à celle des autres protagonistes et le carbone qu'elles reçoivent n'est probablement pas la ressource limitante des systèmes forestiers à la forte productivité dans lesquels elles vivent. Qui plus est, les associations multiples et la structure en réseaux impliquent un partage des coûts parmi les fournisseurs de carbone. Enfin, les plantes mycohétérotrophes pourraient potentiellement fournir à leurs champignons mycorhiziens des ressources essentielles comme des vitamines, ainsi qu'une protection face aux conditions biotiques et abiotiques du milieu (voir partie précédente).

3. Les plantes mycohétérotrophes pendant leurs premiers stades de développement

a) Un dimanche en forêt

Alors qu'il se promène un dimanche après-midi de printemps dans la forêt de Fontainebleau, le jeune botaniste français Noël Bernard, fait par hasard une observation qui donnera lieu a une découverte scientifique majeure (l'histoire de cette découverte est reprise et commentée dans Selosse *et al.*, 2017a). Une vieille tige de néottie nid d'oiseau (*Neottia nidus-avis*, Orchidaceae) enterrée dans la litière attire son attention. Cette plante date de la saison dernière et se trouve donc dans un état de décomposition relativement avancé. Elle porte néanmoins toujours des capsules, lesquelles sont remplies de milliers de graines minuscules, comme chez toutes les orchidées. Fait surprenant : un grand nombre d'embryons sont en train de se développer parmi les graines. On peut imaginer l'émotion de Bernard à cet instant, lui qui s'escrimait sans succès à faire germer des graines semblables issues d'autres espèces d'orchidées dans le cadre de ses travaux de thèse. Lors de leur examen en laboratoire, Bernard constate que ces embryons sont colonisés par des champignons dont les hyphes forment des pelotons dans les cellules végétales (Bernard, 1899 ; Figure 6). Le botaniste y reconnaît une interaction mycorhizienne, telle que décrite par Frank quinze ans plus tôt, et conclut que « les mycorhizes sont indispensables à la plante dès l'époque de sa germination » (Bernard, 1899).

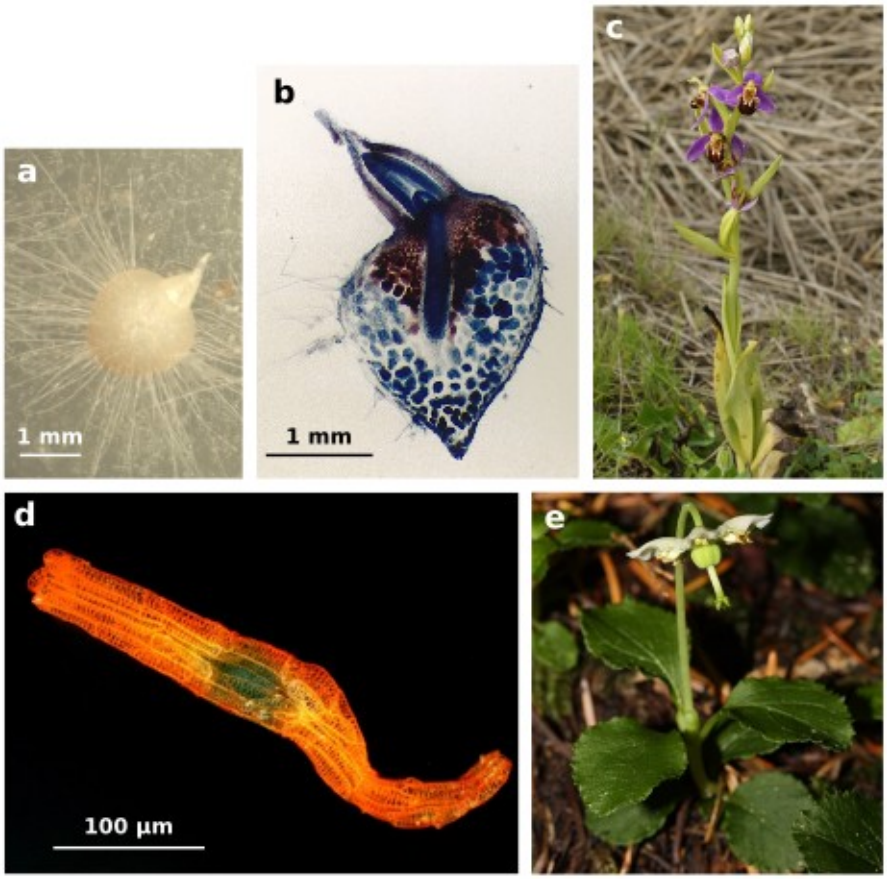


Figure 6 : la mycohétérotrophie initiale. Deux exemples d'espèces dépendantes de champignons mycorhiziens pour leurs premiers stades de développement : *Ophrys apifera* (Orchidaceae, en haut) et *Moneses uniflora* (Ericaceae, en bas). **a**. Croissance symbiotique d'un protocorme. Les filaments blancs rectilignes sont des rhizoïdes. Le mycélium du champignon est visible sur le milieu de culture (blanc) et colonise la partie du protocorme opposée à la première feuille (région foncée). Des graines non germées sont également visibles sur le milieu de culture (marron). **b**. Coupe d'un protocorme coloré au bleu de lactophénol et au lugol, marquant respectivement les parois fongiques (bleu) et l'amidon (marron). On peut observer des mycorhizes à pelotons typiques des orchidées. L'amidon est synthétisé à partir des sucres fournis par le champignon. **c**. Plante adulte photosynthétique. **d**. Graine-poussière colorée à l'iodure de propidium (bleu) et au diacétate de fluorescéine (orange), observée au microscope à fluorescence. **e**. Plante adulte photosynthétique.
Photographies aimablement fournies par Chantal Griveau (a, b) ou issues de Wikimedia Commons (c, Hans Hillewaert ; d, Tomas Figura ; e, Walter Siegmund)

La néottie nid d'oiseau que Bernard a étudiée est une orchidée sans chlorophylle, mycohétérotrophe à l'âge adulte (Figure 4). Le fait qu'elle dépende également du carbone de ses champignons mycorhiziens pour ses premiers stades de développement n'est donc guère surprenant. Pourtant, Bernard fait des observations similaires chez des orchidées *photosynthétiques* et en conclut qu'elles doivent elles aussi être mycohétérotrophes lors de la germination (Bernard, 1909). Des expériences ultérieures le confirment et mettent en évidence le rôle actif des champignons mycorhiziens dans l'approvisionnement en carbone des embryons d'orchidées chlorophylliennes (Beau, 1920 ; Smith, 1966). De manière générale, les orchidées ont la particularité de produire des graines de toute petite taille (le plus souvent inférieure à 1 mm) et d'une grande légèreté : des

graines-poussières (Eriksson et Kainulainen, 2011). Ces graines peuvent être transportées à grande distance par les vents mais elles sont en contrepartie quasiment dépourvues de réserves. La croissance des *protocormes**, premiers stades de développement des orchidées après leur germination, dépend donc de la bonne mise en place de la symbiose (Figure 6). Ainsi, toutes les orchidées commencent leur vie en tant que mycohétérotrophes. La plupart développent par la suite des organes photosynthétiques et remboursent leur « dette carbone », tandis que certaines – comme la néottie – exploitent le carbone fongique tout au long de leur existence.

b) Seulement chez les orchidées ?

Les orchidées ne sont pas les seules à produire des graines-poussières. On retrouve ce trait chez l'ensemble des plantes mycohétérotrophes à l'âge adulte, mais également chez de nombreuses plantes holoparasites (Eriksson et Kainulainen, 2011). Un bel exemple de convergence évolutive, même si, chez ces dernières, le carbone initial n'est pas issu de champignons mais directement de la plante hôte. Par ailleurs, plusieurs espèces, photosynthétiques cette fois, apparentées aux plantes mycohétérotrophes – au sein par exemple des éricacées ou des gentianacées – produisent aussi des graines-poussières (Kéry et Matthies, 2008 ; Johansson *et al.*, 2014 ; Figure 6). Ces plantes sont donc vraisemblablement mycohétérotrophes lors de leur germination. Si certaines études chez les Pyroleae (Ericaceae) le confirment (Hashimoto *et al.*, 2012 ; Johansson *et al.*, 2015), cela reste cependant à vérifier pour les autres groupes.

En dehors des Angiospermes, on rencontre plusieurs cas de mycohétérotrophie initiale chez certaines familles de ptéridophytes (*sensu lato*) : Lycopodiaceae, Ophioglossaceae, Psilotaceae (Winther et Friedman, 2008 ; Merckx *et al.*, 2013a). C'est alors le gamétophyte qui dépend de champignons mycorhiziens pour son développement, le sporophyte étant, dans tous les cas, photosynthétique.

Les plantes qui ont été présentées dans cette partie utilisent au cours de leur vie deux sources de carbone : organique lors des premiers stades, puis minéral dès lors que la photosynthèse est en route. **Ce type de nutrition porte le nom de mixotrophie**. Il s'agit ici d'un cas de mixotrophie par mycohétérotrophie. Nous venons de voir un exemple de mixotrophie successive – ou asynchrone –, nous allons maintenant nous intéresser à des plantes pouvant utiliser simultanément les deux sources de carbone.

4. Les plantes partiellement mycohétérotrophes à l'âge adulte

a) Premiers indices, les plantes albinos

Un phénomène rare peut être observé chez certaines espèces de plantes : l'apparition dans des populations naturelles d'individus totalement dépourvus de chlorophylle. Ces plantes mutantes sont appelées *albinos* et ont attisé la curiosité des botanistes depuis longtemps (Beau, 1920). Incapables de réaliser la photosynthèse, comment pouvaient-elles se nourrir ? Ce n'est en comparaison que

récemment que se fait le lien avec la mycohétérotrophie. En montrant que les champignons mycorhiziens d'individus verts ou albinos d'*Epipactis microphylla* sont les mêmes que ceux formant des ectomycorhizes avec les arbres voisins, des chercheurs français et italiens supposent que les albinos obtiennent l'ensemble de leur carbone grâce à leurs symbiontes (Selosse *et al.*, 2004). Ils prédisent que les individus verts pourraient eux aussi récupérer une partie de leur carbone de cette manière, et donc que l'espèce serait mixotrophe.

Nous reviendrons sur le cas des plantes albinos dans la dernière partie de cette introduction. Voyons maintenant comment ces prédictions se sont trouvées confortées par d'autres analyses.

b) Une mixotrophie confirmée par les isotopes

Les isotopes stables, notamment ceux du carbone (C) et de l'azote (N), sont des outils très pratiques pour l'étude des réseaux trophiques (Deniro et Schoeniger, 1983 ; Layman *et al.*, 2011). Malgré une différence de masse infime, les isotopes légers se trouvent thermodynamiquement et cinétiquement favorisés par rapport aux isotopes lourds au cours des innombrables réactions chimiques du vivant. Une des conséquences de cette discrimination est le faible rapport $^{13}C/^{12}C$ des tissus végétaux par rapport à celui du CO_2 atmosphérique (Farquhar *et al.*, 1989 ; Figure 7). Les organismes hétérotrophes quant à eux, dégradent et excrètent préférentiellement les isotopes légers et s'enrichissent donc généralement en isotopes lourds par rapport à la matière qu'ils consomment (McConnaughey et McRoy, 1979 ; Minagawa et Wada, 1984 ; Figure 7).

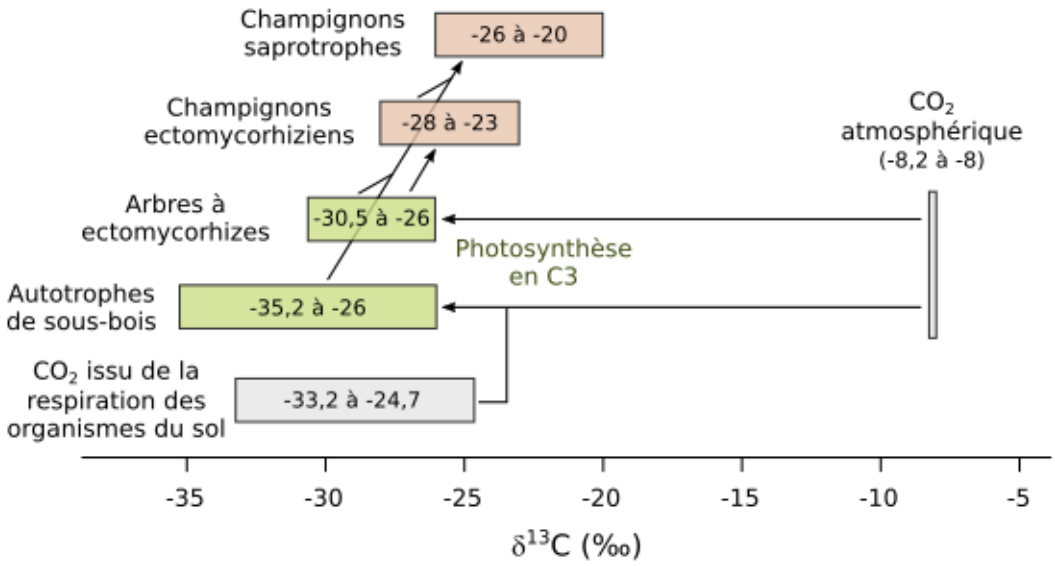


Figure 7 : enrichissement en ^{13}C au sein des réseaux trophiques. Le $\delta^{13}C$ est une mesure de l'enrichissement en ^{13}C par rapport au ^{12}C : plus les valeurs sont négatives, plus le matériel est appauvri en ^{13}C. Les valeurs sont issues des références suivantes : plantes et CO_2 (Hynson *et al.*, 2012), champignons (Högberg *et al.*, 1999 ; Hobbie *et al.*, 2001 ; Zeller *et al.*, 2007 ; Seitzman *et al.*, 2011).

Au début des années 2000, une équipe américaine montre que les plantes mycohétérotrophes n'échappent pas à la règle et se caractérisent par un enrichissement en ^{13}C et ^{15}N par rapport aux plantes autotrophes d'une même zone (Trudell *et al.*, 2003 ; Figure 8). Rejoignant les idées formulées par Leake dix ans plus tôt, ils émettent l'hypothèse que les analyses isotopiques pourraient permettre de détecter des cas de mycohétérotrophie chez des plantes photosynthétiques adultes, autrement dit de mixotrophie (Leake, 1994 ; Trudell *et al.*, 2003). Le suspense est de courte durée : une étude conduite en parallèle par une équipe allemande et publiée dans la même revue confirme l'existence de telles plantes chez les orchidées (Gebauer et Meyer, 2003). Ces espèces ont une signature isotopique intermédiaire entre celle des plantes autotrophes et celle des plantes mycohétérotrophes, trahissant une nutrition basée à la fois sur la photosynthèse et sur l'exploitation de réseaux mycorhiziens (Figure 8). Il s'agit donc bien d'une mixotrophie, synchrone, à l'âge adulte.

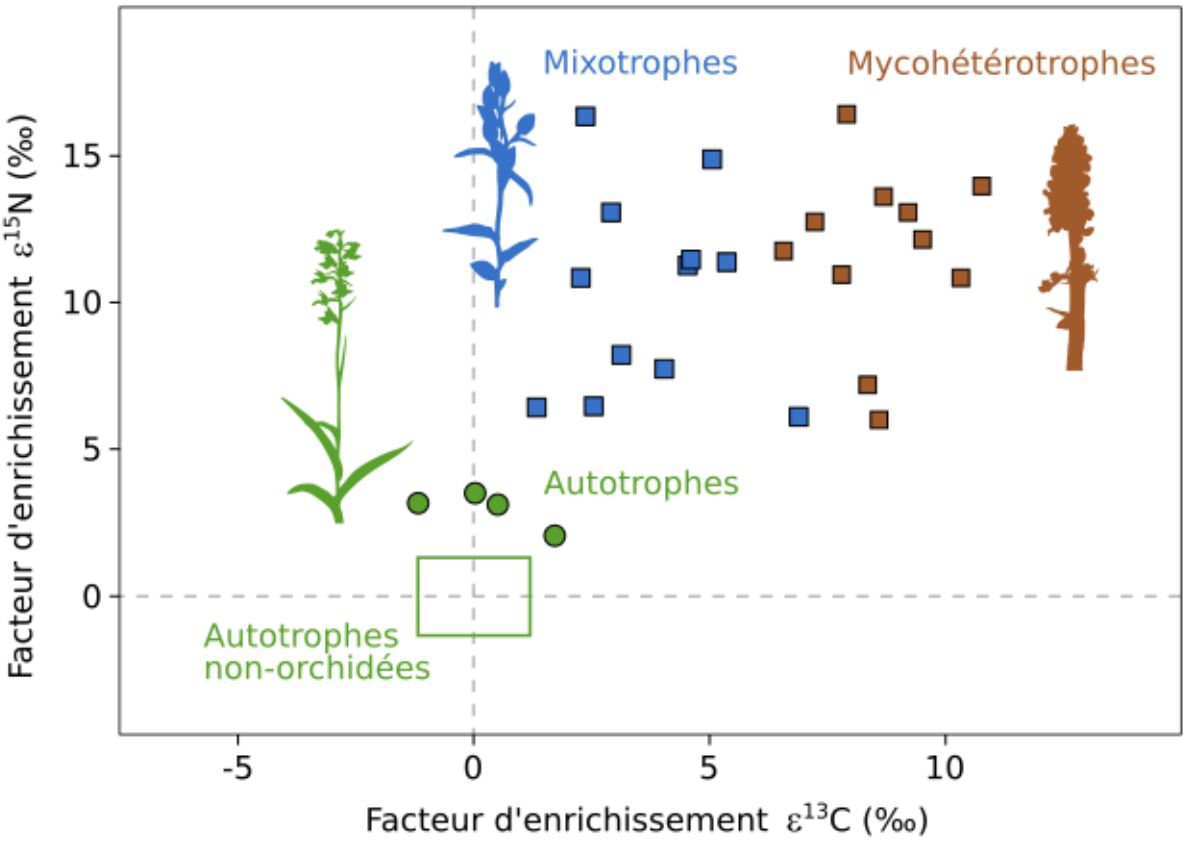


Figure 8 : signatures isotopiques et types de nutrition chez différentes orchidées. Figure adaptée de Hynson *et al.* (2013). Chaque point correspond à une espèce. Les valeurs sont des moyennes issues d'une méta-analyse d'études isotopiques. Le facteur d'enrichissement ε est une mesure de l'enrichissement en isotopes lourds ^{13}C et ^{15}N par rapport à des plantes autotrophes de référence (rectangle vert). Malgré des enrichissements en ^{13}C qui peuvent se recouper, les espèces mixotrophes et mycohétérotrophes se distinguent par leur capacité ou non à réaliser la photosynthèse. De même, d'autres critères permettent de différencier une orchidée autotrophe d'une mixotrophe (voir texte). Des résultats similaires ont été obtenus chez les éricacées (Hynson *et al.*, 2013).

Précisions sémantiques :

Nous utiliserons dorénavant, sauf mention contraire, le terme *mixotrophie* dans un sens restreint, pour désigner cette mycohétérotrophie partielle rencontrée chez des plantes matures. De même, par souci de simplification, nous qualifierons de *mycohétérotrophes* (adjectif) les plantes qui présentent ce mode de nutrition toute leur vie durant, autrement dit les plantes entièrement mycohétérotrophes. En revanche, le terme *mycohétérotrophie* (substantif) conserve son intérêt comme désignant le phénomène, au sens large, d'obtention de carbone issu de champignons mycorhiziens et englobe mycohétérotrophie initiale, partielle et totale.

c) Espèces concernées

Les analyses isotopiques ont permis de détecter des plantes mixotrophes chez les orchidées (Figure 9) et les éricacées. Lorsqu'on s'intéresse aux symbiontes fongiques de ces plantes, on relève presque toujours la présence de champignons ectomycorhiziens (Tedersoo *et al.*, 2007 ; Zimmer *et al.*, 2007 ; Vincenot *et al.*, 2008 ; Dearnaley *et al.*, 2012 ; Johansson *et al.*, 2017 ; Figure 9). Tout comme les espèces mycohétérotrophes dont elles sont proches, les orchidées et les éricacées mixotrophes exploitent donc les réseaux ectomycorhiziens. Espèces de sous-bois ou à l'appareil foliaire fortement réduit pour la plupart (Figure 9), leur faible activité photosynthétique est ainsi compensée par celle des arbres voisins.

Par ailleurs, plusieurs espèces proches – morphologiquement et phylogénétiquement – des plantes mycohétérotrophes exploitant un réseau mycorhizien arbusculaire sont potentiellement mixotrophes. C'est le cas de certaines gentianacées et burmanniacées, quasiment dénuées d'appareil foliaire, qui présentent des enrichissements isotopiques atypiques (Cameron et Bolin, 2010 ; Bolin *et al.*, 2017). Toutefois, ce genre d'analyse est moins évident à interpréter car la discrimination isotopique opérée par les gloméromycètes n'est pas aussi nette que dans le cas des champignons ectomycorhiziens (Merckx *et al.*, 2010 ; Courty *et al.*, 2011).

Les espèces mixotrophes peuvent être plus ou moins dépendantes du carbone fongique (Hynson *et al.*, 2013 ; Schiebold *et al.*, 2017a ; Figure 8). Il existe en réalité un continuum entre une nutrition entièrement autotrophe et une nutrition entièrement mycohétérotrophe. De plus, une espèce mixotrophe donnée voit son taux de mycohétérotrophie varier selon les milieux étudiés et selon d'autres paramètres que nous détaillerons dans la prochaine partie. Quoiqu'il en soit, la place intermédiaire occupée par les espèces mixotrophes suggère que ce type de nutrition a joué un rôle dans l'apparition des plantes entièrement mycohétérotrophes.

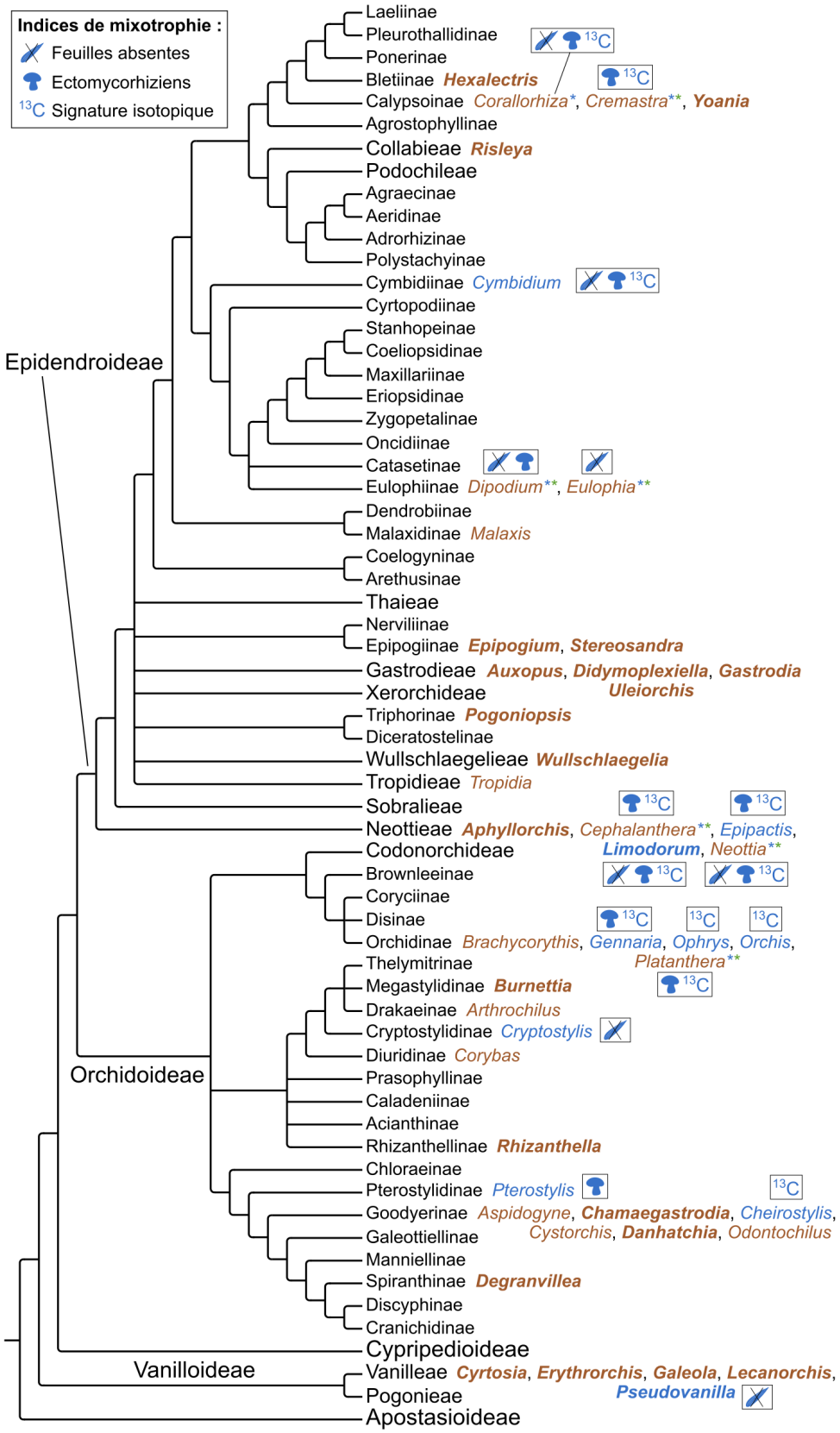


Figure 9 : mycohétérotrophie et mixotrophie chez les orchidées. La phylogénie est issue de Chase *et al.* (2015), les sous-familles, tribus et sous-tribus ont une taille de police décroissante. Un nom de genre en

(suite)

Figure 9 (suite) :
marron (resp. bleu) indique la présence d'au moins une espèce mycohétérotrophe (resp. mixotrophe). En gras, toutes les espèces sont concernées. Un genre avec au moins une espèce mycohétérotrophe peut également contenir une ou plusieurs espèces mixotrophes (astérisque bleue) ou un mélange d'espèces mycohétérotrophes, mixotrophes et autotrophes (astérisques bleue et verte). Les indices suggérant la mixotrophie peuvent être de natures différentes : absence ou forte réduction des feuilles, association avec des champignons ectomycorhiziens, enrichissement en ^{13}C par rapport aux plantes autotrophes voisines. Seules les orchidées mixotrophes avérées ou probables sont représentées. Lorsqu'un seul indice est présent, la mixotrophie éventuelle doit être envisagée avec prudence.
Référence pour les mycohétérotrophes : Merckx *et al.* (2013a). Références pour les indices de mixotrophie : appareils foliaires (Merckx *et al.*, 2013a), *Corallorhiza* (Zimmer *et al.*, 2008), *Cremastra* (Yagame *et al.*, 2013 ; résultats isotopiques non publiés, présentés à l'International Conference on Temperate Orchids Research & Conservation, Samos, 2015), *Cymbidium* (Motomura *et al.*, 2010 ; Suetsugu *et al.*, 2018) ; *Dipodium* (Bougoure et Dearnaley, 2005 ; Dearnaley et Le Brocque, 2006), *Gennaria* (Liebel *et al.*, 2010), *Ophrys* (Gebauer et Meyer, 2003 ; Gebauer *et al.*, 2016), *Orchis* (Liebel *et al.*, 2010 ; Girlanda *et al.*, 2011), *Platanthera* (Yagame *et al.*, 2012 ; Johansson *et al.*, 2015), *Pterostylis* (Irwin *et al.*, 2007), *Cheirostylis* (Roy *et al.*, 2009). Voir Annexe I pour les références relatives aux Neottieae.

5. Évolution de la mycohétérotrophie

a) Un scénario évolutif

Les orchidées mixotrophes sont pour la plupart apparentées à des espèces mycohétérotrophes (Figure 9). Il en va de même pour les éricacées mixotrophes, qu'on ne rencontre que dans une lignée : les Pyroleae. Cette lignée est plus apparentée avec le groupe monophylétique des éricacées mycohétérotrophes (Monotropoideae) qu'avec les autres éricacées (Liu *et al.*, 2011 ; Braukmann et Stefanović, 2012). Il semblerait donc qu'au delà des plantes mycohétérotrophes elles-mêmes, il existe au sein des groupes dans lesquelles elles ont émergé, des prédispositions à l'acquisition de carbone fongique. Les plantes mixotrophes ou celles ayant une germination mycohétérotrophes témoignent de ces prédispositions et permettent d'imaginer le scénario évolutif présenté dans la Figure 10.

Ce scénario esquisse les grandes étapes d'un processus évolutif possible, à partir de l'exemple des orchidées. Il convient de s'interroger sur son caractère généralisable et surtout, sur les mécanismes moteurs : pressions de sélection, spécificités des interactions mycorhiziennes, composés échangés, prédispositions… Nous reviendrons en détails sur ces aspects évolutifs au cours de la présentation de certains résultats (**Articles VI et VII**) et de la discussion générale de cette thèse.

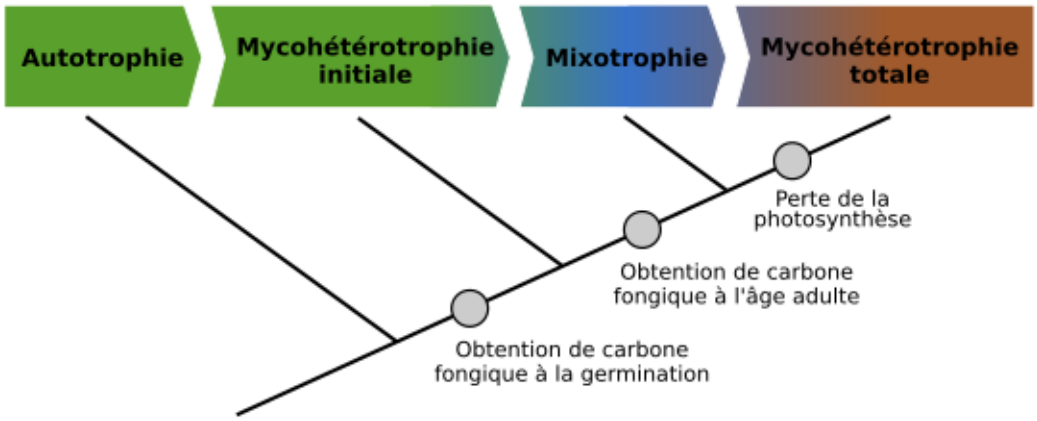


Figure 10 : un modèle d'évolution de la mycohétérotrophie. Figure adaptée de Merckx *et al.* (2013b).

b) Évolution des génomes plastidiaux

À mesure qu'une espèce se spécialise dans l'exploitation du carbone fongique, les pressions de sélection pesant sur sa capacité à réaliser la photosynthèse se relâchent. Les mutations touchant les gènes impliqués dans cette voie métabolique ne sont plus contre-sélectionnées et rendent rapidement ces derniers non fonctionnels. Les génomes plastidiaux des plantes mycohétérotrophes, facilement accessibles, illustrent à merveille ces transformations et ont été largement étudiés. L'analyse comparative des génomes plastidiaux de plus de vingt espèces d'Angiospermes mycohétérotrophes a notamment permis de mettre en évidence un processus séquentiel de simplification relativement bien conservé (Barrett et Davis, 2012 ; Graham *et al.*, 2017).

Un génome plastidial typique d'Angiosperme comporte un peu plus de 110 gènes qui peuvent se classer en cinq grandes catégories :

- les gènes codant des protéines essentielles au bon fonctionnement de la photosynthèse (photosystèmes, cytochrome b6f, Rubisco…)

- les gènes codant des sous-unités de l'ATP synthase (notés ATP)

- les gènes codant des sous-unités d'une ARN polymérase plastidiale (notés PEP pour *plastid-encoded RNA polymerase*)

- les gènes codant des sous-unités du complexe NADH déshydrogénase (notés NDH) impliqué dans la régulation des flux excessifs d'électrons

- les gènes de ménage (*housekeeping*) codant pour des ARNt, des ARNr, des protéines ribosomales et des enzymes impliquées dans l'expression des gènes plastidiaux ou dans des voies métaboliques spécifiques du plaste et indépendantes de la photosynthèse (par exemple la biosynthèse des acides gras)

Les gènes NDH sont les premiers à devenir non fonctionnels chez les espèces mycohétérotrophes. La perte des gènes NDH commence même chez certaines espèces mixotrophes (Barrett *et al.*, 2014) et semble également très répandue parmi les orchidées autotrophes (Luo *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2017). Les gènes de la photosynthèse sont ensuite perdus, le gène *rbcL* codant une sous-unité de la Rubisco étant l'un des derniers conservés. Viennent les gènes PEP et ATP puis, en dernier lieu, les gènes de ménage (Graham *et al.*, 2017).

L'analyse des génomes plastidiaux est un bon outil pour déterminer le type de nutrition d'une plante dans des cas ambigus. Par exemple, certaines orchidées sans feuilles du genre *Neottia* possèdent malgré tout de la chlorophylle (*N. camtschatea* et *N. listeroides*). Pouvant être considérées comme mixotrophes à première vue, les génomes de leurs plastes montrent cependant de nombreuses pertes de gènes liés à la photosynthèse (Feng *et al.*, 2016). Ces plantes sont donc totalement mycohétérotrophes, malgré les apparences et à la différence d'autres plantes aux traits morphologiques similaires comme les orchidées du genre *Limodorum* (Girlanda *et al.*, 2006 ; Bellino *et al.*, 2014) ou l'espèce *Cymbidium macrorhizon* (Kim *et al.*, 2018 ; Suetsugu *et al.*, 2018).

L'un des objectifs de cette thèse est d'étudier plus en détails la transformation des génomes plastidiaux chez les plantes mixotrophes, premiers stades d'évolution vers la mycohétérotrophie totale (**Article VI**).

6. Bilan sur la mycohétérotrophie

Dans un renversement spectaculaire de la symbiose mycorhizienne classique, la capacité d'une plante à obtenir du carbone grâce à ses symbiontes fongiques a vu le jour à de nombreuses reprises au cours de l'évolution. Si la forme rappelle les indélicatesses des plantes holoparasites, le champignon n'est pas nécessairement complètement perdant dans l'affaire. Outre certaines faveurs que pourrait lui accorder son hôte, la source ultime du carbone est bien souvent à chercher du côté des autres plantes – photosynthétiques elles – qui partagent le même réseau mycorhizien. Une telle dilution des coûts parmi les protagonistes rend l'éviction de ces tricheurs d'autant plus difficile.

La mycohétérotrophie se décline en plusieurs saveurs parmi les adeptes du carbone fongique. Certaines espèces en profitent à crédit au cours d'une insouciante jeunesse, jusqu'à ce que leur émancipation photosynthétique remette les flux dans l'ordre. D'autres, malgré quelques efforts louables pour fixer un peu de carbone, persévèrent à l'âge adulte. Une cuisine fusion qui laisse des traces au cœur de leurs atomes. Enfin, il y a celles chez qui la dépendance est devenue totale. Une addiction difficile à cacher tant elle transforme aussi bien l'apparence que les génomes des organismes qui s'y abandonnent.

Parmi les différents groupes de végétaux pratiquant la mycohétérotrophie, les orchidées s'illustrent à la fois par le nombre d'espèces concernées et la diversité des formes que prend ce type de nutrition. Nous allons voir en détails dans quelle mesure cette famille fait office de modèle pour comprendre le fonctionnement et l'évolution de la mycohétérotrophie.

III. Mycohétérotrophie et mixotrophie chez les orchidées

1. Récapitulons

Nous avons déjà abordé à plusieurs reprises au cours des parties précédentes certains aspects de la symbiose mycorhizienne et de la mycohétérotrophie chez les orchidées. Le moment est venu de faire un petit récapitulatif avant de voir comment les recherches sur cette famille de manière générale et mon travail de thèse ont permis d'enrichir notre compréhension de ces phénomènes.

Les orchidées se caractérisent tout d'abord par un type de mycorhize particulier : des endomycorhizes à pelotons. Elles produisent toutes des graines-poussières et commencent leur vie en tant que mycohétérotrophes. On distingue ensuite schématiquement trois cas de figure à l'âge adulte (Figure 11).

(1) La plante devient photosynthétique et fournit à son tour du carbone à ses partenaires fongiques, comme dans une symbiose mycorhizienne classique. La plante est donc **autotrophe**. Ce cas est le plus commun et les champignons alors impliqués appartiennent au groupe polyphylétique des rhizoctonias. Ces orchidées montrent généralement une teneur élevée en azote comparé aux autres plantes autotrophes ainsi qu'un enrichissement en ^{15}N mais pas en ^{13}C (Hynson *et al.*, 2013 ; Figure 8).

(2) La plante devient photosynthétique mais continue à recevoir du carbone fongique à l'âge adulte. De telles orchidées sont donc **mixotrophes**. Décrit majoritairement pour des orchidées tempérées terrestres, ce type de nutrition repose sur l'association avec des champignons ectomycorhiziens formant simultanément des ectomycorhizes avec les arbres voisins – source ultime du carbone – et des endomycorhizes à pelotons avec les orchidées. Ces orchidées mixotrophes montrent une teneur élevée en azote et un enrichissement en ^{15}N et en ^{13}C en comparaison des plantes autotrophes. Certaines présentent également une réduction des appareils photosynthétiques, pouvant être limités à la tige et aux fruits.

(3) La plante n'est plus capable de réaliser la photosynthèse et reste **mycohétérotrophe** toute sa vie durant. Là aussi, les symbiontes ne sont pas des rhizoctonias mais tantôt des champignons ectomycorhiziens, tantôt des champignons saprotrophes ou éventuellement parasites.

Dans tous les cas, la plante conserve un cortège de champignons mycorhiziens relativement stable tout au long de sa vie. Qu'ils appartiennent aux rhizoctonias ou aux champignons ectomycorhiziens, les symbiontes rencontrés chez la plante adulte sont donc sensiblement les mêmes que ceux qui interviennent lors de la germination, parfois un peu mois diversifiés (Bidartondo et Read, 2008).

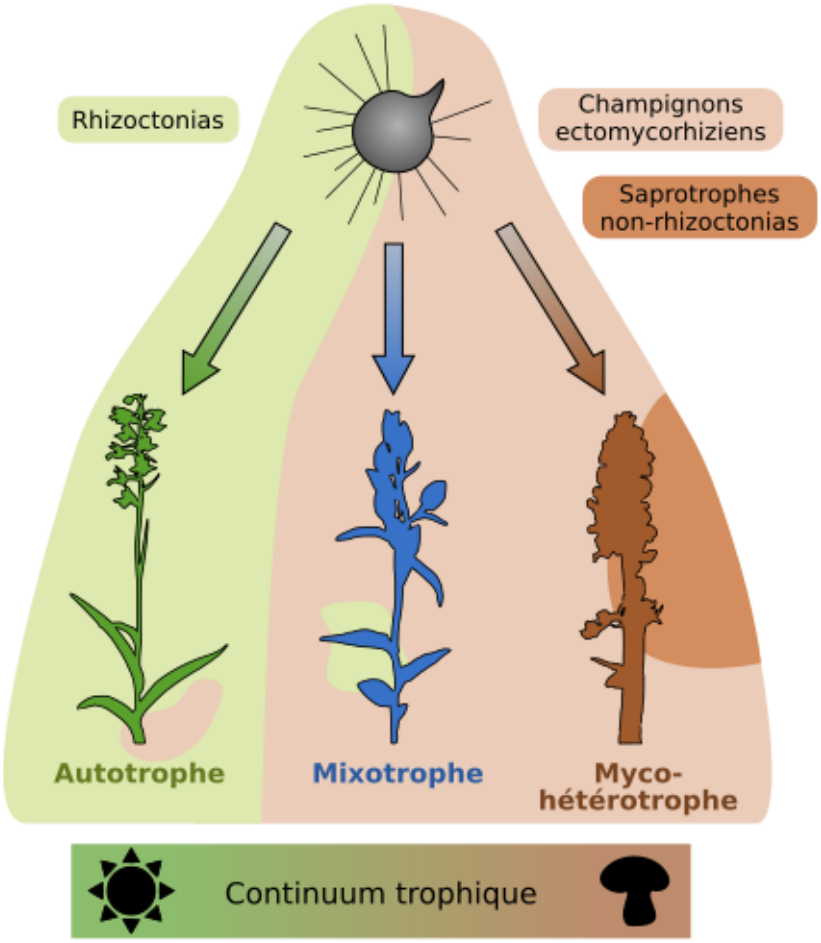


Figure 11 : nutrition et sources du carbone chez les orchidées. À partir d'une germination mycohétérotrophe, les orchidées deviennent autotrophes, mixotrophes ou restent mycohétérotrophes à l'âge adulte. La couleur de fond indique les champignons associés. Il existe un continuum entre une nutrition entièrement basée sur du carbone photosynthétique et une nutrition entièrement basée sur du carbone issu des réseaux ectomycorhiziens.

2. Une réalité plus complexe

Une telle catégorisation a évidemment ses limites, notamment en ce qui concerne la distinction entre plantes autotrophes et mixotrophes. Certaines espèces montrent en effet des signaux isotopiques et des partenaires mycorhiziens mixtes ou variables selon les analyses (Figure 11 et Annexe I) : par exemple *Neottia ovata* (Gebauer et Meyer, 2003 ; Abadie *et al.*, 2006 ; Liebel *et al.*, 2010 ; Těšitelová *et al.*, 2015 ; Gebauer *et al.*, 2016), *Neottia cordata* (Těšitelová *et al.*, 2015 ; Yagame *et al.*, 2016 ; Schiebold *et al.*, 2017b), *Ophrys insectifera* (Gebauer et Meyer, 2003 ; Abadie *et al.*, 2006 ; Gebauer *et al.*, 2016).

Par ailleurs, les outils isotopiques classiquement utilisés pour détecter la mixotrophie pourraient ne pas être adaptés dans le cas des orchidées à rhizoctonias. Il pourrait donc y avoir

davantage de **mixotrophes cachées** parmi les orchidées à rhizoctonias, une idée déjà développée il y a quelques années par certains auteurs (Selosse et Martos, 2014 ; Stöckel *et al.*, 2014). Nous reviendrons plus largement sur ce point et sur les limites des analyses isotopiques lors de la présentation de certains résultats et lors de la discussion de cette thèse (**Articles IV et V**).

3. Les Neottieae, un groupe particulièrement étudié

L'émergence d'espèces mycohétérotrophes a eu lieu indépendamment à de nombreuses reprises au cours de l'évolution des orchidées (Figure 9). Un groupe d'orchidées se démarque par la présence en son sein de nombreux représentants des trois types de nutrition décrits ci-dessus. Il s'agit de la tribu des Neottieae (Figure 9). Cette particularité a fait des Neottieae un groupe phare pour l'étude de la mycohétérotrophie et de la mixotrophie. Nous allons en faire une courte présentation avant de nous attarder sur les résultats obtenus.

a) Diversité des types de nutrition

La tribu des Neottieae comprend environ 200 espèces d'orchidées terrestres réparties en six genres (Tableau 1 ; Figure 12). On y retrouve de nombreuses espèces mycohétérotrophes ainsi que plusieurs mixotrophes, souvent au sein d'un même genre (Tableau 1 ; Figure 12 ; Annexe I). Chez les Neottieae, le passage à la mycohétérotrophie ou à la mixotrophie passe par le recrutement de champignons ectomycorhiziens.

Tableau 1 : mycohétérotrophie au sein des Neottieae.

Genre	*Palmorchis*	*Neottia*	*Cephalanthera*	*Epipactis*	*Limodorum*	*Aphyllorchis*
Distribution	Amazonie	Hémisphère nord tempéré	Hémisphère nord tempéré et sud-est asiatique	Hémisphère nord tempéré	Europe et bassin méditerranéen	Sud-est asiatique
Nombre d'espèces [a]	29	71	20	58	3	19
Espèces myco-hétérotrophes [b]	0	17	7	0	0	19
Espèces mixotrophes [c]	0	Plusieurs probables	Quatre avérées et plusieurs autres probables	Dix avérées et plusieurs autres probables	Trois avérées	0

[a] d'après la base de données WCSP (2018)

[b] d'après Merckx *et al.* (2013a) et WCSP (2018)

[c] références diverses, voir Annexe I pour un récapitulatif

Figure 12 : représentants des six genres de la tribu des Neottieae. a. *Palmorchis trilobulata* (photographie issue de La Selva Florula Digital). **b.** *Neottia ovata* (Hans Hillewaert, Wikimedia Commons, pour les photographies suivantes également). **c.** *Cephalanthera longifolia* (Joachim Lutz). **d.** *Epipactis helleborine* (Joachim Lutz). **e.** *Limodorum abortivum* (Olivier Pichard). **f.** *Aphyllorchis montana* (Vojtěch Zavadil).

La proximité phylogénétique entre les espèces présentant différents types de nutrition fait des Neottieae un groupe modèle pour étudier l'évolution de la mycohétérotrophie. Cependant, la phylogénie du groupe n'a – jusqu'à récemment – pas été clairement établie. L'un des objectifs de cette thèse a été d'y remédier, nous reviendrons donc plus en détails sur ce point dans les résultats et la discussion (**Article VI**).

Les nombreuses espèces mixotrophes que l'on retrouve chez les Neottieae permettent également de mener des études comparatives pour identifier les traits conservés et ceux plus variables liés à ce type de nutrition. Ce genre d'approche a déjà été utilisé dans des travaux antérieurs et constitue un point méthodologique majeur de cette thèse.

b) Une originalité au sein des Neottieae : les plantes albinos

Nous avons déjà évoqué dans la partie précédente l'existence des plantes albinos. Un terme qui porte d'ailleurs parfois à confusion puisque certains d'entre eux possèdent encore des anthocyanes et d'autres pigments (Figure 13). Malgré l'absence de chlorophylle et donc de capacités photosynthétiques, les albinos survivent néanmoins et peuvent même aller jusqu'à former des graines (Roy *et al.*, 2013 ; Shefferson *et al.*, 2016).

Figure 13 : exemples d'albinos chez les Neottieae. a. *Cephalanthera damasonium*. **b.** *Cephalanthera rubra*. **c.** *Epipactis helleborine*. **d.** *Epipactis purpurata*. Photographies : Félix Lallemand.

Comme expliqué précédemment, la nutrition des plantes albinos est en fait assurée par leurs champignons mycorhiziens. Il s'agit donc d'un cas de mycohétérotrophie totale. Leur existence témoigne des capacités mycohétérotrophes des individus verts normaux de la même espèce et constitue donc un très bon indicateur de mixotrophie. Autrement dit, les albinos sont des équivalents

totalement mycohétérotrophes de plantes mixotrophes. D'un point de vue pratique, les plantes albinos sont un formidable outil pour étudier la mycohétérotrophie et ont ainsi joué un rôle scientifique important aussi bien dans des travaux antérieurs qu'au cours de cette thèse (**Articles I et II**).

L'albinisme a jusqu'à présent été décrit de manière sûre et récurrente uniquement chez des espèces de Neottieae, et ce exclusivement au sein des genres *Cephalanthera*, *Epipactis* et *Limodorum* (Figure 13 ; Tableau 2). Il existe donc très probablement des particularités mycorhiziennes et physiologiques propres à ces Neottieae rendant possible l'existence de tels mutants. Des albinos ont toutefois été signalés dans d'autres groupes, par exemple au sein des genres *Ophrys* et *Platanthera* (Orchidinae ; Roy, 2009). Cependant, ils restent extrêmement rares et peuvent correspondre à des formes chlorotiques ou à des individus vivant sur les réserves de l'année passée. Leur mycohétérotrophie totale reste donc à démontrer.

Voyons maintenant ce que l'étude des Neottieae et des albinos nous ont appris sur le fonctionnement de la mycohétérotrophie, et plus particulièrement de la mixotrophie.

Tableau 2 : albinos chez les Neottieae.

Genre	Espèces	Références
Cephalanthera	*damasonium*	Julou *et al.* (2005) ; Tranchida-Lombardo *et al.* (2010) ; Roy *et al.* (2013) ; Shefferson *et al.* (2016)
	falcata	Sakamoto *et al.* (2016a)
	longifolia	Abadie *et al.* (2006) ; Tranchida-Lombardo *et al.* (2010) ; Shefferson *et al.* (2016)
	rubra	Observations personnelles (Figure 13), communication personnelle (Thibaud Aronson, 2018)
Epipactis	*albensis*	Jakubska et Schmidt (2005)
	atrorubens	Lewis (2015)
	bugacensis subsp rhodanensis	Communication personnelle (Jean-François Christians, 2016)
	dunensis	Lewis (2015)
	exilis	Communication personnelle (Alain Falvard, 2016)
	helleborine	Salmia (1989) ; Gonneau *et al.* (2014) ; Lewis (2015) ; Suetsugu *et al.* (2017)
	microphylla	Selosse *et al.* (2004)
	muelleri	Kohns et Schneider (1993)
	purpurata	Lewis (2015) ; observations personnelles (Figure 13)
	sanguinea	Lewis (2015)
Limodorum	*abortivum*	Communications personnelles (Marc-André Selosse, 2000 ; André Hasenfratz et Henri Mathé, 2018)

4. Les facteurs influençant la mixotrophie

Comme nous l'avons déjà évoqué à propos des signatures isotopiques, les espèces mixotrophes affichent des degrés de dépendance au carbone fongique variables, soulignant le continuum entre autotrophie et mycohétérotrophie totale (Hynson *et al.*, 2013 ; Schiebold *et al.*, 2017a). Plus encore, pour une espèce mixotrophe donnée, certains paramètres peuvent influencer le niveau d'hétérotrophie. Ces facteurs ont été particulièrement étudiés pour les Neottieae mixotrophes, en analysant les enrichissements naturels en ^{13}C.

a) La lumière

Chez les espèces autotrophes, une baisse de la luminosité induit une diminution de l'activité photosynthétique et une ouverture accrue des stomates. Cela favorise un meilleur équilibre entre les gaz de la chambre sous-stomatique et l'atmosphère ambiant, et donc, une meilleure discrimination des isotopes du carbone (Farquhar *et al.*, 1989). Les plantes autotrophes montrent ainsi un appauvrissement relatif en ^{13}C lorsqu'elles grandissent dans des milieux plus ombragés (Figure 14). Des études chez *Goodyera repens* et *Cypripedium calceolus*, des orchidées autotrophes à rhizoctonias, ont mis en évidence une réponse similaire (Preiss *et al.*, 2010 ; Liebel *et al.*, 2015).

On observe cependant une tendance opposée chez les Neottieae mixotrophes : un enrichissement en ^{13}C (Preiss *et al.*, 2010 pour *Cephalanthera damasonium* et *C. rubra* ; Gonneau *et al.*, 2014 pour *Epipactis albensis var fibri* ; **Article III** pour *E. atrorubens*) ou une absence de variation (Gonneau *et al.*, 2014 pour *Epipactis helleborine*) dans des milieux plus ombragés (Figure 14). Cela révèle une proportion plus importante de carbone fongique dans la nutrition de la plante, pouvant être expliquée d'une part par la diminution du carbone photosynthétique et d'autre part par une augmentation du carbone fongique. Les abondances naturelles ne permettent toutefois pas de discriminer les parts respectives de ces deux mécanismes.

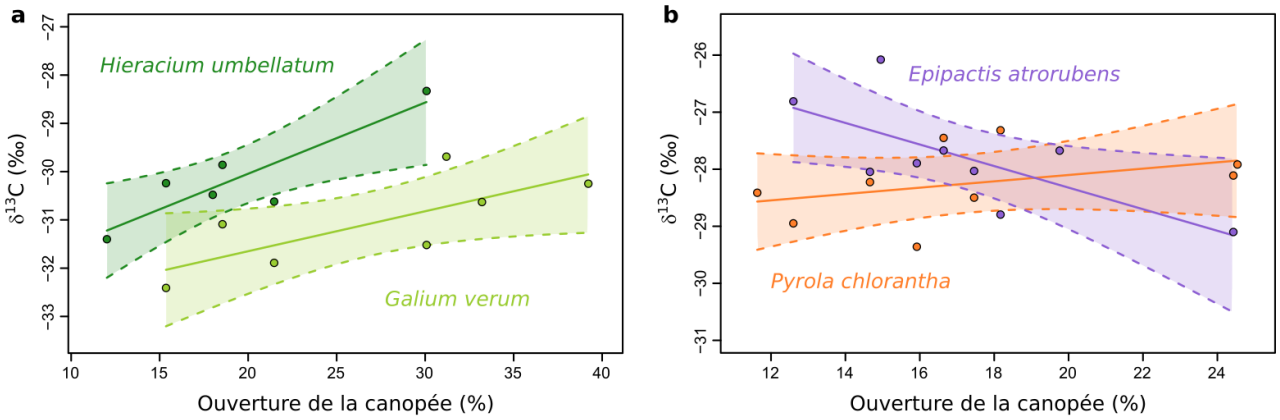


Figure 14 : enrichissement en ^{13}C en fonction de la luminosité pour différents types de nutrition. Droites de régression et bandes de confiance à 95 %. Le $\delta^{13}C$ est une mesure de l'enrichissement en ^{13}C par rapport au ^{12}C : plus les valeurs sont négatives, plus le matériel est appauvri en ^{13}C. **a.** Plantes autotrophes de référence. **b.** Orchidée mixotrophe (*E. atrorubens*, Neottieae) et éricacée du groupe des Pyroleae (*P. chlorantha*). Les données sont celles de l'**article III**, voir Tableau 2, sites Mändjala (**a**) et Kärla (**b**).

Une partie des travaux de cette thèse teste cet effet de la lumière sur les signatures isotopiques (i) d'une autre espèce d'orchidée à rhizoctonias, étroitement apparentée à des espèces mixotrophes (**Article V**) et (ii) d'éricacées mixotrophes (**Article III**).

b) Phénologie et stade de développement

La phénologie* d'une plante mixotrophe est un autre paramètre pouvant jouer sur son degré d'hétérotrophie. Celui-ci est en effet plus important lors des stades de développement précoces, au début de la saison végétative, pour des Neottieae mixotrophes vivaces à rhizome (Roy *et al.*, 2013 pour *Cephalanthera damasonium* ; Gonneau *et al.*, 2014 pour *Epipactis helleborine* et *E. albensis var fibri*). Cela coïncide chez *C. damasonium* avec une plus grande colonisation des racines par les champignons mycorhiziens en début de saison (Roy *et al.*, 2013).

Ces résultats semblent donc indiquer un rôle important du carbone fongique pour la mise en place de l'appareil photosynthétique des plantes mixotrophes. Le développement des nouvelles pousses reposant sur la mobilisation de réserves amylacées stockées dans les racines, celles-ci pourraient donc avoir été constituées à partir de carbone fongique, une hypothèse soulevée par Gonneau *et al.* (2014) et qui a été testée au cours de cette thèse (**Article I**).

5. Physiologie des orchidées mixotrophes et mycohétérotrophes

a) Allocation différentielle du carbone

L'hypothèse selon laquelle les réserves des orchidées mixotrophes pourraient être d'origine fongique s'intègre dans un modèle plus large d'allocation différentielle des sources carbonées chez ces espèces (Gonneau *et al.*, 2014 ; Figure 15). Le carbone fixé par photosynthèse serait préférentiellement alloué aux parties aériennes de la plante (feuilles, tige, fruits et graines) et jouerait par conséquent un rôle dans la reproduction. Le carbone issu des champignons mycorhiziens serait quant à lui préférentiellement alloué aux organes souterrains (rhizome, racines) et serait donc important pour la constitution de réserves et la survie de la plante.

Ce modèle, basé sur les enrichissements naturels en ^{13}C de différents organes de *Cephalanthera damasonium* et *Epipactis helleborine*, est soutenu par une autre expérience chez *Limodorum abortivum*. L'inhibition de la symbiose mycorhizienne suite à l'application d'un fongicide ne perturbe pas la maturation des fruits, notamment grâce à une augmentation des capacités photosynthétiques de la plante suite à une plus forte teneur en pigments des fruits (Bellino *et al.*, 2014). Des expériences complémentaires permettant de tester ce modèle ont été menées au cours de cette thèse (**Article I**).

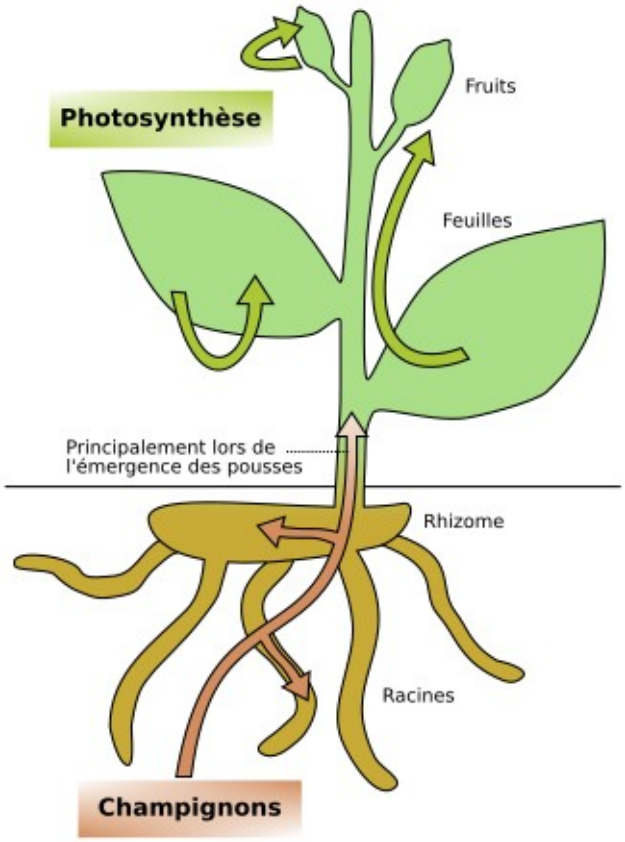


Figure 15 : modèle d'allocation du carbone chez les Neottieae mixotrophes. Figure adaptée de Gonneau *et al.* (2014). Les deux sources de carbone sont indiquées en vert (carbone photosynthétique) et en marron (carbone fongique).

b) Nature des échanges et des voies métaboliques

La nature des composés carbonés fournis par les champignons mycorhiziens aux orchidées pratiquant une forme de mycohétérotrophie a surtout été étudiée lors de la phase de germination, pour des orchidées à rhizoctonias. Des expériences utilisant du ^{14}C comme traceur ont montré que le tréhalose (deux molécules de glucose liées en α,α-1,1) était un bon candidat (Smith, 1967). Ce sucre est une forme de transport commune chez les champignons et pourrait être transmis comme tel au protocorme ou clivé en glucose dans le milieu extracellulaire avant son entrée dans les cellules végétales (Smith et Smith, 1973 ; Smith et Read, 2008).

Des expériences plus récentes, toujours chez une orchidée à rhizoctonias (*Serapias vomeracea*), ont montré que des composés organiques azotés sont également transmis au protocorme par le champignon (Fochi *et al.*, 2017). Des acides aminés comme l'arginine, la lysine ou l'histidine pourraient faire partie de ces molécules transférées (Fochi *et al.*, 2017). Un flux de carbone indirect, lié à cette nutrition azotée, pourrait donc également contribuer – en auto-stop – à la mycohétérotrophie initiale des orchidées (Selosse et Roy, 2009). Le maintien d'un tel transfert à l'âge adulte reste toutefois à éclaircir.

Nous l'avons vu, les orchidées mixotrophes et mycohétérotrophes s'associent pour bon nombre d'entre elles avec des champignons ectomycorhiziens et non avec des rhizoctonias. Des échanges d'une autre nature pourraient donc avoir lieu avec ces partenaires. De même, des voies métaboliques particulières ont pu se développer en lien avec la mycohétérotrophie. Face à l'absence de travaux sur le sujet, un des objectifs principaux de cette thèse a été d'étudier en détails le métabolisme des orchidées mixotrophes (**Article II**).

POSITIONNEMENT SCIENTIFIQUE ET OBJECTIFS DE LA THÈSE

Cette thèse s'inscrit dans la lignée des recherches visant à comprendre le fonctionnement et l'évolution de la mycohétérotrophie. La famille des orchidées, et plus particulièrement la tribu des Neottieae, constitue à cet égard un modèle d'étude de choix et l'essentiel des travaux présentés portent sur ce groupe. Des recherches complémentaires menées sur les éricacées complètent toutefois les résultats et permettent d'élargir le cadre de discussion. Un accent particulier est mis sur l'étude des plantes mixotrophes qui, par leur mode de nutrition intermédiaire, apparaissent comme une étape clé dans l'évolution vers la mycohétérotrophie.

Le premier objectif de cette thèse est de **renforcer nos connaissances sur la physiologie des plantes mixotrophes**. Plusieurs questions demeurent en effet à ce sujet : comment se répartissent le carbone photosynthétique et le carbone fongique dans la plante ? Quelle est l'importance respective de ces deux sources au cours des différents stades de développement ? Existe-t-il des voies métaboliques ou un type de photosynthèse particulier chez les plantes mixotrophes ? Quelle est la nature des échanges entre la plante et ses champignons mycorhiziens ? Les facteurs influençant le niveau d'hétérotrophie sont-ils les mêmes dans différents groupes de plantes mixotrophes ? Nous apporterons quelques éléments de réponse à ces questions à travers trois études :

- dans **l'article I**, nous testons chez l'orchidée mixotrophe *Cephalanthera damasonium* le modèle d'allocation différentielle du carbone photosynthétique et du carbone fongique présenté en introduction (voir III.5.a). Pour ce faire, nous avons d'une part réalisé des expériences de marquage et de suivi du carbone photosynthétique, et d'autre part mesuré les teneurs isotopiques naturelles des organes souterrains et des molécules de réserves.

- dans **l'article II**, nous étudions le métabolisme des plantes mixotrophes. L'existence d'albinos entièrement mycohétérotrophes nous a permis de mener une étude comparative *in situ* de grande ampleur entre individus verts et albinos chez trois espèces de Neottieae mixotrophes. Les différences physiologiques ont été analysées à large échelle grâce à des outils de transcriptomique et de métabolomique.

- dans **l'article III**, nous évaluons la flexibilité de la mixotrophie chez les éricacées. Nous avons pour cela mesuré les teneurs isotopiques naturelles de différentes espèces d'éricacées mixotrophes à différents stades de développement et dans des conditions d'éclairement variables.

Le deuxième objectif de cette thèse est de **discuter la notion de continuum écologique entre autotrophie et mixotrophie**, notamment l'hypothèse selon laquelle les orchidées à rhizoctonias classiquement considérées comme autotrophes, pourraient dans certains cas également pratiquer une forme de mixotrophie.

- dans **l'article IV**, nous apportons de nouvelles données sur les liens entre type de nutrition et partenaires fongiques chez plusieurs espèces d'orchidées d'un écosystème côtier peu étudié. Nous avons identifié sur la base de marqueurs génétiques les champignons mycorhiziens associés à ces espèces et avons estimé leur type de nutrition par analyses isotopiques.

- dans **l'article V**, nous examinons l'impact de la luminosité sur la nutrition d'*Epipactis palustris*, une orchidée à rhizoctonias considérée comme autotrophe mais étroitement apparentée à des espèces mixotrophes. Nous avons mesuré comment la signature isotopique de cette espèce variait en fonction des conditions locales d'éclairement.

Le troisième objectif de cette thèse est d'**apporter des précisions sur le contexte évolutif de la mycohétérotrophie**, en tachant notamment de répondre aux questions suivantes : quelle est l'histoire évolutive de la mixotrophie et de la mycohétérotrophie au sein des groupes ayant acquis ces types de nutrition ? Quels sont les traits morphologiques, écologiques ou moléculaires associés à cette évolution ? Peut-on dégager des prédispositions ou des conditions facilitant l'émergence de la mycohétérotrophie ? Si les résultats des travaux présentés ci-dessus permettent déjà de répondre en partie à ces interrogations, deux autres études menées au cours de cette thèse s'ancrent pleinement dans cette dimension évolutive :

- dans **l'article VI**, nous proposons une vision actualisée de l'évolution de la mycohétérotrophie chez les Neottieae. Grâce au séquençage des génomes plastidiaux de treize espèces de Neottieae, nous avons dessiné un cadre phylogénétique plus précis de ce groupe et analysé les transformations génomiques précoces chez les espèces mixotrophes.

- dans **l'article VII**, nous précisons le contexte d'émergence de la mycohétérotrophie chez les éricacées. Nous avons pour cela clarifié les relations phylogénétiques entre les éricacées mixotrophes et mycohétérotrophes en incluant de nouvelles espèces dans l'analyse et en séquençant de nouveaux marqueurs moléculaires.

ARTICLE I

Mixotrophic orchids do not use photosynthates for perennial underground organs

AVANT-PROPOS

En 2014, l'article de Gonneau *et al.* présentait un modèle d'allocation différentielle du carbone chez certaines Neottieae mixotrophes (Figure 15). Les auteurs proposaient que le carbone issu de la photosynthèse contribuait principalement au développement des parties aériennes et notamment à la formation des fruits, tandis que le carbone obtenu par l'intermédiaire des champignons mycorhiziens était principalement destiné aux organes souterrains. Nous avons voulu tester et enrichir ce modèle chez la Neottieae *Cephalanthera damasonium* de deux manières : (i) en mesurant la signature isotopique de l'amidon racinaire – principale molécule de réserve assurant la survie de la plante d'une année sur l'autre – et en vérifiant si elle différait de celle d'individus albinos chez qui ces réserves sont constituées uniquement à partir de carbone fongique ; (ii) en réalisant une expérience de marquage des feuilles avec du $^{13}CO_2$ et en suivant le devenir des photosynthétats au cours de la saison.

Ces deux approches ont apporté des résultats en accord avec le modèle de Gonneau *et al.* (2014) : un amidon synthétisé à partir de carbone fongique et des photosynthétats essentiellement alloués aux organes aériens. Cela suggère chez les Neottieae mixotrophes, un rôle toujours important de la photosynthèse par rapport à la formation des fruits et donc au succès reproducteur. L'évolution vers la mycohétérotrophie totale a donc nécessité des arrangements pour assurer une production suffisante de descendants et ne pas être contre-sélectionnée.

Ces travaux ont été acceptés par la revue *The New Phytologist* au mois d'août 2018.

L'échantillonnage pour la partie « amidon » a été réalisé avant le début de ma thèse. J'ai participé, avec d'autres, aux expériences d'extraction d'amidon et à l'analyse isotopique de ces molécules. L'expérience de marquage a quant à elle été réalisée en collaboration avec l'INRA de Nancy au cours de la deuxième année de cette thèse. Ces travaux ont également fait l'objet du stage de Ninon Fontaine, une étudiante de L3 que j'ai eu l'occasion d'encadrer pendant deux mois.

Mixotrophic orchids do not use photosynthates for perennial underground organs.

Félix Lallemand[1], Tomáš Figura[1,2], Claire Damesin[3], Chantal Fresneau[3], Chantal Griveau[1], Ninon Fontaine[1], Bernd Zeller[4], Marc-André Selosse[1,5,*,°]

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

[2] Department of Experimental Plant Biology, Faculty of Science, Charles University, Viničná 5, 128 44, Prague, Czech Republic

[3] Laboratoire Ecologie Systématique et Evolution, UMR 8079, Université Paris-Sud, CNRS, AgroparisTech, bât 362, F-91405, Orsay, France

[4] INRA Grand EST Nancy, UR 1138, Biogéochimie des Ecosystèmes Forestiers (BEF), 54280 Champenoux France

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

* Author for correspondence; email: ma.selosse@wanadoo.fr; tel : +33 607123418

° ORCID : https://orcid.org/0000-0003-3471-9067

Keywords: ^{13}C; Carbon allocation; *Cephalanthera damasonium*; Neottieae; isotopic enrichment; partial mycoheterotrophy; photosynthates labelling; starch.

Introduction

Most plants are autotrophic and interact with soil fungi, forming mycorrhizal symbioses (van der Heijden *et al.*, 2015) where plants gain mineral nutrients and provide photosynthates to fungi. Yet, plants repeatedly evolve heterotrophy (Těšitel *et al.*, 2018), and several lineages, especially in orchids, import carbon from their mycorrhizal fungi, a strategy called mycoheterotrophy (Merckx, 2013). Since two decades, green plants that are photosynthetic but also import carbon from their mycorrhizal fungi raise considerable interest (Julou *et al.*, 2005; Selosse & Roy, 2009). These plants with two carbon sources are called mixotrophic, and pave the evolutionary way to full mycoheterotrophy (Selosse & Roy, 2009). Mixotrophy enables them to adapt to shaded conditions (Julou *et al.*, 2005; Preiss *et al.*, 2010; with some exceptions: Girlanda *et al.*, 2011; Schiebold *et al.*, 2017) and sometimes drives reduction of photosynthetic abilities (Girlanda *et al.*, 2006). Their study is therefore of crucial interest to understand evolution to full mycoheterotrophy.

Some temperate forest orchids, *e.g.* from the genera *Epipactis* and *Cephalanthera*, are remarkable models of mixotrophy. Mixotrophy may be a common feature of all orchids (see discussions in Selosse & Martos, 2014; Gebauer *et al.*, 2016), but these forest orchids specifically display two strong lines of evidence for mixotrophy. First, their roots associate with ectomycorrhizal fungi that themselves associate with surrounding trees, which are the ultimate carbon source of the whole consortium. Since the carbon provided by such fungi is enriched in ^{13}C as compared to that fixed by photosynthesis (Hynson *et al.*, 2013), the ^{13}C enrichment in orchid biomass allows to estimate the proportion of carbon issued from mycorrhizal fungi. In aerial parts, the contribution of fungal carbon ranges from few percent to more than 90 % depending on species (Hynson *et al.*, 2013, 2016), light level (Preiss *et al.*, 2010; Gonneau *et al.*, 2014) and also time in the growing season, over which photosynthates increasingly contribute to aerial biomass (Roy *et al.*, 2013). A second feature supporting the importance of exploitation of fungal carbon is the survival in some species of achlorophyllous variants called ‘albinos’ (Samia, 1989; Selosse *et al.*, 2004; Suetsugu *et al.*, 2017), which behave as full mycoheterotrophs and, accordingly, show high ^{13}C enrichment in their biomass (*e.g.* Julou *et al.*, 2005).

A model for mixotrophic nutrition was proposed for these perennial orchids (Gonneau *et al.*, 2014; see their fig. 5) based on isotopic enrichments. The contribution of mycoheterotrophy and photosynthesis to the biomass of a given organ can indeed be calculated thanks to ^{13}C enrichment, using surrounding autotrophs and albinos as references, respectively, for enrichment of fully autotrophic and fungal-derived biomass. This approach showed that photosynthates are the main carbon source of shoots and fruits late in the growing season (Roy *et al.*, 2013; Gonneau *et al.*, 2014). Accordingly, albinos, which lack photosynthesis, undergo physiological problems late in the season, especially preventing successful fruiting and seeds ripening probably due to carbon limitation (Roy *et al.*, 2013). Moreover, fungicide application in soil eliminates mycorrhizal fungi without impairing fruit maturation (Bellino *et al.*, 2014). Less is known for underground parts. When they start sprouting, the young green shoots display strong contribution (*ca.* 80 %) of fungal carbon. Moreover, rhizomes of albino and green *Cephalanthera damasonium* revealed similar ^{13}C

enrichment, which did not differ from aerial parts of albinos, pointing a mycoheterotrophic nutrition for underground organs (Gonneau *et al.*, 2014; see their Table S1).

This carbon allocation model for mixotrophic *Epipactis* and *Cephalanthera* thus states that aerial parts and fruits rely on photosynthesis, while underground parts mostly rely on fungal carbon. Suetsugu *et al.* (2018) recently described a similar trend in an unrelated mixtrophic orchid, *Cymbidium macrorhizon*. Yet, this remains poorly supported by below-ground data, and the model is mostly based on natural isotopic enrichments, which represent indirect evidence (Lallemand *et al.* 2017). In this paper, we report two attempts to test this model in *C. damasonium*. First, we extracted root starch from green and albino individuals. Roots store most starch during winter (Rasmussen, 1995): the above-mentioned model predicts that ^{13}C enrichments should be identical, if fungi indeed support root nutrition and reserves (prediction 1). Second, we monitored photosynthetic carbon allocation, by *in situ* ^{13}C-labelling of photosynthates: following the model, this labelling should be abundantly directed to aboveground parts, but in lower amount to belowground ones (prediction 2). In this second experiment, the default expectation for an autotrophic plants would be a substantial migration belowground of photosynthates to contribute to reserves (e.g. Harris & Jeffcoat, 1972; Major *et al.*, 1978; Kandiah, 1979).

Similar starch origin in photosynthetic individuals and non-photosynthetic albinos.

Prediction 1 was tested on *C. damasonium* roots, by analyzing winter starch from three green individuals and three albinos at Boigneville (France). In this population studied by Julou *et al.* (2005) and Roy *et al.* (2013; see location herein), the two phenotypes are mycorrhizal with ectomycorrhizal Thelephoraceae and Cortinariaceae (Julou *et al.*, 2005). Different roots were also chosen as intra-individual replicates to account for between-roots variability. Underground sampling was carried out on 15th January 2015, *i.e.* at winter resting stage, together with roots of four autotrophic species for comparison: *Dioscorea communis*, *Hedera helix*, *Neottia ovata* (autotrophic orchid; Těšitelová *et al.*, 2015), *Rubia tinctorum* (four individuals each). Leaves from five individuals of each phenotype were also collected in the previous growing season for reference. Level of mycorrhizal colonization in *C. damasonium* (expressed as mean percentage of root section colonized by fungi) did not differ between green individuals and albinos (Fig. S1a; Kruskal-Wallis test: $\chi^2_{(1)} = 2.25$; $p = 0.13$), whose root sections were respectively colonized at 41 and 50 % on average.

Root starch was extracted as in Damesin & Lelarge (2003) from the roots of *C. damasonium* and autotrophic controls. In brief, 50 mg of tissue powder was suspended in 1 mL of distilled water. After centrifugation, starch was extracted from the pellet by HCl solubilisation. The starch powder obtained after desiccation of the precipitate was used for weighting and carbon isotope analysis. Although roots were mycorrhizal, the absence of starch in fungi allows to access the orchid's reserve exclusively. No significant difference was observed for starch content in green compared to albino roots (4.4±0.6 *versus* 5.4±1.0 %; mean percent of root dry weight ± 95 % confidence

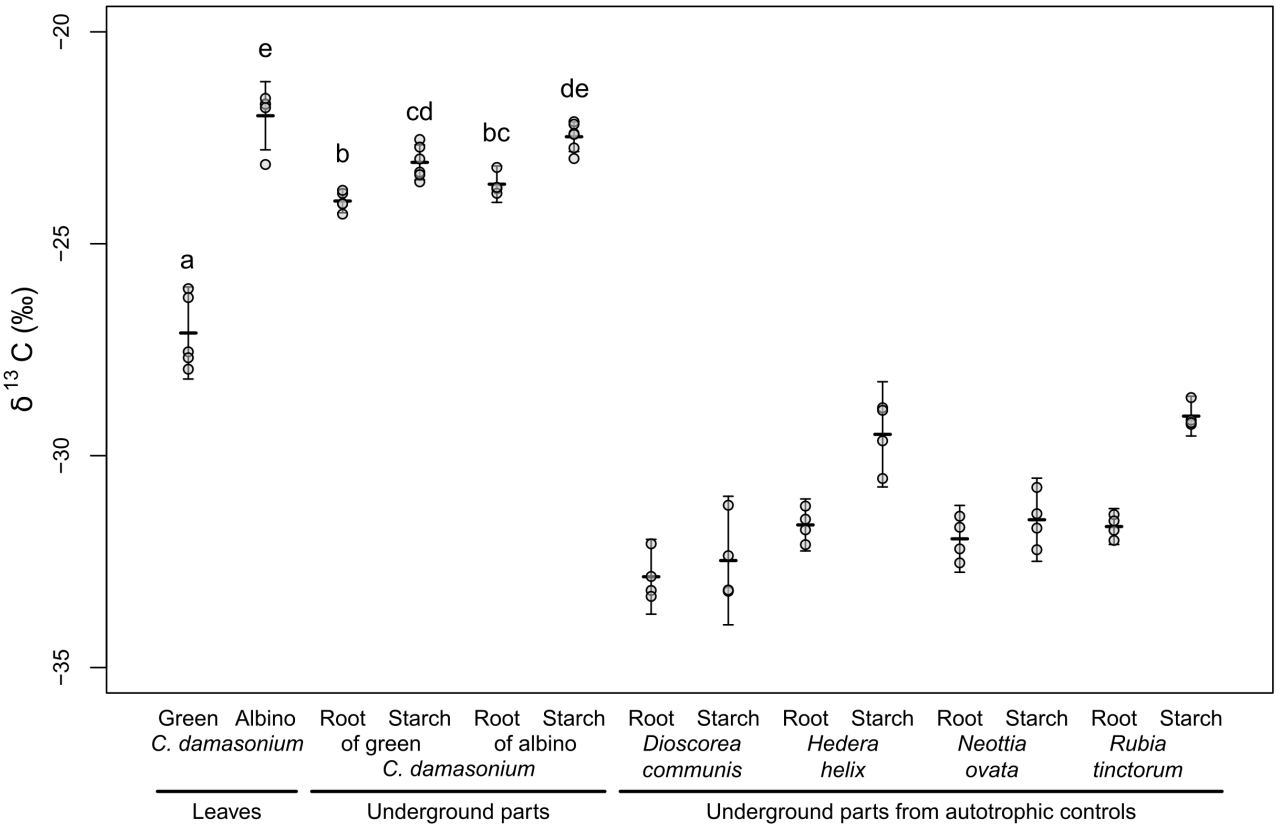


Figure 1. ^{13}C enrichments in leaves, roots (bulk material) and root starch extracts of green and albino *C. damasonium* (n = 3 individuals each) and autotrophic controls (*Dioscorea communis*, *Hedera helix*, *Neottia ovata* and *Rubia tinctorum*; n = 4 each) collected at Boigneville. Leaves were sampled on July 10th 2014, and underground parts in January 15th 2015. For underground parts, analyses were replicated twice, except for bulk roots in one green and two albino individuals due to insufficient material, so the number of replicates is respectively 5 and 4. Mean $\delta^{13}C$ ± 95% confidence intervals; individual values are shown with small transparent dots. Different letters indicate $P < 0.05$ according to pairwise comparisons of means from Tukey's HSD test; material from autotrophic controls showed obvious differences with other samples and were thus not included in the test.

interval; p = 0.07, Student's t-test).

Isotopic enrichments were estimated as in Lallemand *et al.* (2017). Considering leaves collected in the previous growth season (10th July 2014), albino leaves were enriched in ^{13}C as compared to green ones (Fig. 1), as expected due to the use of fungal resources. Considering underground material, bulk root material did not differ in ^{13}C enrichment between albino and green *C. damasonium* (Fig. 1). It was however much higher than roots from autotrophic controls (-32±0.6 *versus* -23.8±0.3 ‰; mean $\delta^{13}C$ ± standard deviation; Fig. 1), as expected from both presence of fungal hyphae and use of fungal resources. Starch extracts were richer in ^{13}C than corresponding bulk root material, but again material did not differ in ^{13}C enrichment between albino and green *C. damasonium* (Fig. 1). In comparison, in autotrophic controls, starch displayed similar or higher ^{13}C enrichment as compared to bulk root material (Fig. 1), confirming previous results (Bathellier *et al.*, 2007; Götlicher *et al.*, 2006). Moreover, starch in autotrophs showed significantly lower ^{13}C

enrichment than that of albino and green *C. damasonium*, congruently with the use of a carbon source derived from photosynthesis. The presence of photosynthesis did not change the high ^{13}C enrichment in *C. damasonium*, suggesting that the production of ^{13}C-depleted photosynthates did not detectably contribute to starch production.

The fact that neither quantity nor ^{13}C enrichment of starch depended on the photosynthetic phenotype thus verifies prediction 1 in *C. damasonium*, *i.e.* that carbon reserves in green individuals are built on the same fungal source as in albinos.

Photosynthates contribute massively to aerial parts, but much less to underground organs.

Prediction 2 that leaves photosynthates poorly migrate underground was tested in June, at time of starch accumulation in *C. damasonium* roots (Rasmussen, 1995): the percentage of root cortical cells containing starch shifts from < 40 % in late May to > 50 % in mid-July (M. Roy, C. Gonneau & M.-A. Selosse, unpublished data from Boigneville). We pulse-labelled green *C. damasonium* individuals as described in Le Tacon *et al.* (2013), on June 8th 2017 (early fruiting stage), in a population at Le Vésinet (France; 48°54'45"N, 2°06'27"E; same phenology as in Boigneville; Fig. S2a). Fifteen early fruiting individuals of similar shoot size were selected, with a minimum distance between them of 1.5 m. Each plant was partly enclosed (part of the stem and all leaves, but not fruits and bracts; Fig. 2a) in a chamber made from gastight polyethylene film (200 µm thick). The bottom and top of the stem were sealed with Terostat (a solvent-free, elastic silicone sealant; Henkel France SAS) in order to make a tight connection between the stem and the chamber (Fig. S2b). Pure $^{13}CO_2$ gas was then injected into each chamber during 1 minute at a flow rate of 0.01 L.min^{-1} (0.01 L in all) as in Le Tacon *et al.* (2013). Each plant was labelled during 6 hours (from 11 a.m. until 4 p.m.), after which each labelling chamber was carefully opened and removed.

We harvested three control plants just before labelling, and initially planned to harvest three labelled and three non-labelled plants per three dates after labelling, namely at 4, 25 and 126 days. Unfortunately, heavy grazing after labelling only allowed to harvest an intact labelled plant per date. Moreover, at day 126, senescent stems had dry and destroyed leaves (Fig. S2c). Total dry weights for all organs were recorded, and ^{13}C enrichments were estimated as in Lallemand *et al.* (2017). Considering all plants sampled at days 0 and 4 (n = 7), above and belowground biomasses were roughly equal (11.7 [6.4-23.2] *versus* 9.9 [5.7-19.8] g; mean dry weight [range]). At day 126 however, aerial parts had experienced considerable senescence and material loss, with 77 % mass loss (29 % only for roots; see note in Table 1).

Throughout all samplings, the ^{13}C enrichment in all organs of control plants remained in the range expected from for *C. damasonium* (*e.g.* Julou *et al.*, 2005; Roy *et al.*, 2013; Fig. 2b), i.e. higher than for C3 reference plants (as measured at day 0; Fig. S3). Organs from labelled plants were always enriched in ^{13}C compared to control ones ($P < 0.05$; Student's t-tests). At days 4 and 25, leaves (labelled), stems and fruits (immediately above the labelled zone; Fig. 2a) displayed very strong

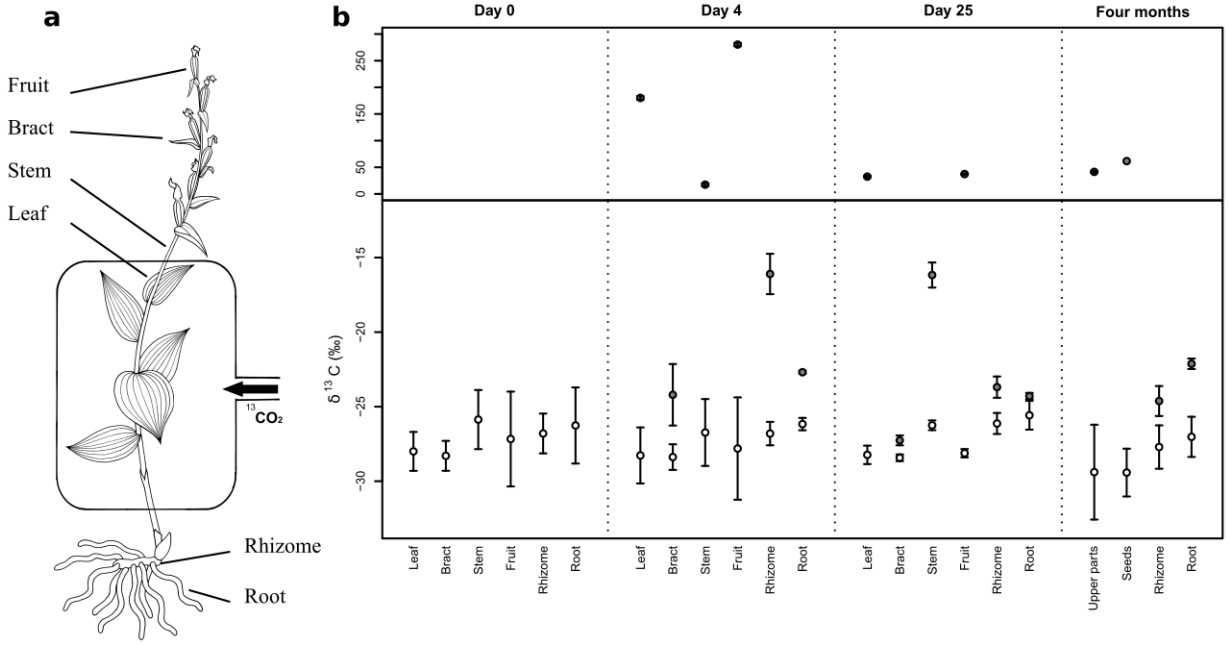


Figure 2. Labelling experiment carried out in a population of green *C. damasonium* at Le Vésinet. (**a**) Labelling experiment: only one shoot section and leaves (in the bag; see also fig. S2b) were labelled (drawing, courtesy by Alain Jouy). (**b**) ^{13}C enrichments in different organs and at various times after labelling of non-labelled controls (white circles, mean of 3 plants) or labelled plants (black circles, mean of three measures for one labelled plant). Day 0 is June 8th 2017. At day 126, all aerial parts were fully dry and sometime lost, and remnants pooled together after separating seeds. For each organ at each sampling time, labelled and control values always significantly differed according to a Student's t-test at $P < 0.05$. Bars indicate 95 % confidence intervals.

increase in ^{13}C enrichment ($\delta^{13}C$ > -20‰). Bracts were mildly labelled, as expected for source organs. Rhizomes and roots of labelled plants displayed limited ^{13}C enrichment (Fig. 2b), with exception for the rhizome of plant from day 4 (note that the plant on that day had the highest labelling level systemically). At day 126, dried upper parts and seeds were still labelled, whereas rhizomes and roots displayed only limited ^{13}C enrichment.

Based on the weight of the various plant parts, the distribution of labelled photosynthates to underground organs ranged from 1.7 % at day 4 to 7.6 % at day 126 (Table 1). In all, less than one tenth of photosynthates produced during the 6 hours labelling, at time of starch accumulation, were later detected in underground parts. This distribution is partly unexpected. On the one hand, labelled photosynthates, especially those from upper leaves, usually migrate to fruits (*e.g.* Major *et al.*, 1978; Addo-Quaye *et al.*, 1986) and the persistent labelling of fruits and seeds confirms that the same happens in *C. damasonium*. On the other hand, photosynthates, especially those from lower leaves, usually also migrate to belowground organs (Harris & Jeffcoat, 1972; Major *et al.*, 1978), especially in perennial species (*e.g.* Kandiah, 1979) that accumulate reserves such as the starch detected above in winter *C. damasonium*. Such a transfer to roots has been observed *in vitro* within days for the autotrophic orchid *Goodyera repens* (Cameron *et al.*, 2008): roots received *ca.* 20 % of ^{14}C-labelled carbon within 4 days (see Fig. 3 in Cameron *et al.*, 2008) instead of 1.6 % here.

Table 1. Percentage of the total ^{13}C found in the different organs of ^{13}C-labelled plants at days 4, 25 and 126 after labelling.

Organs	Day 4	Day 25	Day 126 *
Fruits **	71.1 %	70.2 %	0.1 % **
Bracts	0.1 %	0.3 %	
Stem	8.3 %	11.4 %	92.3 % *
Leaves	18.8 %	13.7 %	
Rhizome	0.1 %	0.2 %	0.2 %
Roots	1.6 %	4.2 %	7.4 %

* Taking into account a mass loss of 77 % in aerial parts and 29 % in roots by day 126. Large portions of the aerial parts, especially leaves, were lost by senescence or removed by grazing at day 126 (Fig. S2c). While average root mass per plant showed a mild decrease between fruiting time (days 0 to 25; 11.6±2.8 g, dry weight, mean ± 95 % confidence interval) and fall (day 126; 8.2±3.3 g; Student's t-test, $P = 0.085$), aerial parts, which did not differ between days 0, 4 and 25 (10.1±2.8 g on average), experienced an average mass reduction of 77 % in fall (2.4±0.9 g; Student's t-test, $P < 0.001$). Thus, we applied a correction for biomass assuming that only 23 % of the aerial parts and 71 % of the root parts remained at day 126.

** Seeds only at day 126

The very low carbon transfer to the rhizome and roots verifies prediction 2 in *C. damasonium*, *i.e.* that photosynthates are more abundantly allocated to aboveground parts than to belowground ones, even at the time of belowground starch accumulation.

Conclusions

We confirm that belowground structures in *C. damasonium* are supported by fungal carbon resources rather than by plant photosynthates since (1) starch ^{13}C enrichment is identical in albino and green plants, and (2) direct observation of photosynthates movements supports 1.7 % only allocation to belowground ones at time of starch accumulation (day 4). Some contribution of photosynthates to underground organs is of course not excluded: starch in green individuals is 0.6 ‰ depleted in ^{13}C as compared to albino ones (Fig. 1), and although not significant, this value may be a biologically relevant evidence for a minor contribution of ^{13}C-depleted photosynthates; indeed, a portion of photosynthates did reach rhizomes and roots in the labelling experiment (Table 1). An intriguing question, not addressed here, is that of the non-fruiting shoots occurring in this and other mixotrophic orchids (Samia, 1989; Roy et al., 2013): in such cases, photosynthates that cannot be allocated to fruits may reach rhizomes and roots in larger amount. Indeed, in our data, the percentage of labelled C belowground is raising till day 126, and this may reflect an

ability, especially very late in the season, to relocate a few photosynthates belowground. This deserves separate analysis, as it may demonstrate that shoot formation in plants that do not flower is not only a failed attempt to reproduce, but may be under positive selection due to its contribution to survival of underground organs.

Yet, in fruiting plants at least, the fungal contribution likely dominates belowground, explaining why starch accumulation is not reduced when photosynthesis is affected (Fig. S1). Fungal resources are thus (at least in part) converted into starch belowground, as observed in germinating orchids that are fully mycoheterotrophic, and accumulate starch after fungal colonization (Rasmussen, 1995; Richardson *et al.* 1992; Dearnaley *et al.*, 2016). Synthesis of starch from fungal resources was also claimed in mycorrhizae of another mixotrophic species, *Pyrola japonica* (Ericaceae; Matsuda *et al.*, 2012).

Our observations also explain why albinos survival is not impaired as compared to green individuals, both in direct observations over few years (Roy *et al.*, 2013) and in lifespan modelling approaches (Shefferson *et al.*, 2016). Our data provide two additional lines of evidence supporting the model by Gonneau *et al.* (2014) of divergent resources use: photosynthates are mainly invested in aerial parts (and contribute to fitness by seeds) while fungal resources are mainly invested in underground parts (and contribute to fitness by individual survival). Here, more direct evidence was obtained for underground parts, based on a labelling experiment and on an analysis of accumulated starch, which integrates longer time periods.

A simple system of source / sink distribution may apply, with C-consuming fruits and underground parts acting as sinks. The fungal resources available and/or the respective strength of the belowground *versus* aerial demands limit the ability of fungi to rescue the fruits. A partial rescue happens in albinos, allowing some seed production (Roy *et al.*, 2013). Yet, in normal, green individuals, photosynthetic resources are sufficient for fruit formation, and this likely did not select for a stronger fungal exploitation to evolve: especially, colonization in *C. damasonium* is at lowest at fruiting time (Roy *et al.*, 2013). This explains the persistence of intact photosynthesis in mixotrophic orchids (Bellino *et al.*, 2014 ; Lallemand *et al.*, 2018).

In the Neottieae tribe, to which *C. damasonium* belongs, full mycoheterotrophy evolved multiple times (Selosse & Roy, 2009), and mixotrophy predisposes to evolve to heterotrophy since underground survival is already largely independent of photosynthesis. Transition to full mycoheterotrophy mainly requires evolutionary novelties to maintain seed production, in order to produce new individuals. Indeed, many mycoheterotrophs, orchids and non-orchids, display active underground asexual reproduction (Klimešová, 2007), *e.g.* in orchids by far-reaching stolons bearing bulbils (*e.g.* in *Epipogium*; Roy *et al.*, 2009) or sprouting roots (*e.g.* in *Wullschlaegelia*; Martos *et al.*, 2010), or even by roots that develop into new rhizomes after separation from the mother rhizome (in *Neottia*; Champagnat, 1971). These various evolutionary bricolages recruit independent strategies to increase asexual reproduction using belowground organs. They may have compensated the reduced seed set at time of the transition to mycoheterotrophy. The underground use of fungal nutrition, already secured by mixotrophic ancestors, may have (at least transiently)

allowed to maintain the production of new individuals.

Acknowledgements

This research was funded by the Fondation de France (funds from the Fondation Ars Cuttoli & Paul Appell) and M.-A Selosse's research is also supported by the 2015/18/A/NZ8/00149 grant funded by National Science Centre (Poland). Tomas Figura is supported by grant LO1417 of the Czech Ministry of Education, Youth and Sports. We deeply acknowledge Alain Jouy for help with Figure 2A, Jean-Michel Hervouet for help in finding and monitoring sites for labelling, Jean-Philippe Gallais and Élie Grinfeder for preparing the samples for isotopic analyses, as well as three anonymous referees and Maarja Öpik for helpful corrections. The labeling experiment was supported by the mobile lab (M-POETE) of ANAEE-France. ANAEE-France is an infrastructure of the French Investment for the Future ("Investissements d'Avenir") program, overseen by the French National Research Agency (ANR; ANR-11-INBS-0001).

Author contributions

M.-A.S., C.D. and BZ planned and designed the research. M.-A.S. sampled for starch analyses; F.L., N.F., B.Z. and M.-A.S. performed labelling experiments. Starch and isotopic analyses were conducted by F.L., T.F., C.F., C.G. and N.F. M.-A.S. and F.L. wrote the first version of the manuscript that was later edited by all authors.

References

Addo-Quaye AA, Scarisbrick DH, Daniels RW. 1986. Assimilation and distribution of ^{14}C photosynthate in oilseed rape (*Brassica Napus* L.). *Field Crops Research* **13**: 205-215.

Bellino A, Alfani A, Selosse M-A, Guerrieri R, Borghetti M, Baldantoni D. 2014. Nutritional regulation in mixotrophic plants: new insights from *Limodorum abortivum*. *Oecologia* **175**:875-885.

Cameron DD, Johnson I, Read DJ, Leake JR. 2008. Giving and receiving: measuring the carbon cost of mycorrhizas in the green orchid, *Goodyera repens*. *New Phytologist* **180**: 176–184.

Champagnat M, 1971. Recherches sur la multiplication végétative de *Neottia nidus-avis* Rich. *Annales des Sciences Naturelles Botanique et Biologie Veìgeìtale* **12**: 209-248.

Damesin C, Lelarge C. 2003. Carbon isotope composition of current-year shoots from *Fagus sylvatica* in relation to growth, respiration and use of reserves. *Plant Cell Environment* **26**: 207–219.

Dearnaley JWD, Perotto S, Selosse M-A. 2016. Structure and development of orchid mycorrhizas, *in* F. Martin (ed.) Molecular mycorrhizal symbiosis, p. 63-86. Wiley-Blackwell, Hoboken, New Jersey.

Girlanda M, Segreto R, Cafasso D, Liebel HT, Rodda M, Ercole E, Cozzolino S, Gebauer G, Perotto S, 2011. Photosynthetic Mediterranean meadow orchids feature partial mycoheterotrophy and specific mycorrhizal associations. *American Journal of Botany* **98**: 1148–1163.

Girlanda M, Selosse M-A, Cafasso D, Brilli F, Delfine S, Fabian R, Ghigone P, Pinelli P, Segreto R, Loreto F *et al.* 2006. Inefficient photosynthesis in the Mediterranean orchid *Limodorum abortivum*

is mirrored by specific association to ectomycorrhizal Russulaceae. *Molecular Ecology* **15**: 491–504.

Gonneau C, Jersáková J, de Tredern E, Till-Bottraud I, Saarinen K, Sauve M, Roy M, Hájek T, Selosse M-A. 2014. Photosynthesis in perennial mixotrophic *Epipactis* spp. (Orchidaceae) contributes more to shoot and fruit biomass than to hypogeous survival. *Journal of Ecology* **102**: 1183-1194.

Göttlicher S, Knohl A, Wanek W, Buchmann N, Richter A. 2006. Short-term changes in carbon isotope composition of soluble carbohydrates and starch: from canopy leaves to the root system. *Rapid Communication in Mass Spectrometry* **20**: 653-660.

Harris GP, Jeffcoat B. 1972. Distribution of ^{14}C-labelled assimilates in flowering carnation plants. *Journal of Horticultural Science* **47**: 25-35.

Hynson NA, Madsen TP, Selosse M-A, Adam IKU, Ogura-Tsujita Y, Roy M, Gebauer G. 2013. The physiological ecology of mycoheterotrophy. In: Merckx VSFT, ed. Mycoheterotrophy: the biology of plants living on fungi. Berlin, Germany: Springer, 297–342.

Julou T, Burghardt B, Gebauer G, Berveiller D, Damesin C, Selosse M-A. 2005. Mixotrophy in orchids: insights from a comparative study of green individuals and nonphotosynthetic individuals of *Cephalanthera damasonium*. *New Phytologist* **166**: 639–653.

Kandiah S. 1979. Turnover of carbohydrates in relation to growth in apple trees. II. Distribution of ^{14}C assimilates labelled in autumn, spring and summer. *Annals of Botany* **44**: 185-195.

Klimešová J. 2007. Root-sprouting in myco-heterotrophic plants: prepackaged symbioses or overcoming meristem limitation? *New Phytologist* **173**: 8–10.

Lallemand F, Püttsepp Ü, Lang M, Luud A, Courty P.-E, Palancade C, Selosse M-A. 2017. Mixotrophy in Pyroleae (Ericaceae) from Estonian boreal forests does not vary with light or tissue age. *Annals of Botany* **120**: 361-371.

Lallemand F, Logacheva M, Zheleznaia E, Le Clainche I, Bérard A, Le Paslier MC, Selosse M-A. 2018. Thirteen new plastid genomes from mixotrophic and autotrophic species provide insights into heterotrophy evolution in Neottieae orchids. *Genome Biology and Evolution*, submitted.

Le Tacon F, Zeller B, Plain C, Hossann C, Brechet C, Robin C. 2013. Carbon transfer from the host to *Tuber melanosporum* mycorrhizas and ascocarps followed using a ^{13}C pulse-labeling technique. *PLoS ONE* **8**: e64626.

Major DJ, Bole JB, Charnetski WA. 1978. Distribution of photosynthates after $^{14}CO_2$ assimilation by stems, leaves, and pods of rape plants. *Revue Canadienne de Phytotechnie* **58**: 783-787.

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

Matsuda Y, Shimizu S, Mori M, Ito SI, Selosse M-A. 2012. Seasonal and environmental changes of mycorrhizal associations and heterotrophy levels in mixotrophic *Pyrola japonica* (Ericaceae) growing under different light environments. *American Journal of Botany* **99**: 1177–1188.

Maunoury-Danger F, Bathellier C, Laurette J, Fresneau C, Ghashghaie J, Damesin C, Tcherkez G. 2009. Is there any ^{12}C/^{13}C fractionation during starch remobilisation and sucrose export in potato tubers? *Rapid Communinaction in Mass Spectrometry* **23**: 2527-2533.

Merckx V, 2013. *Mycoheterotrophy, the biology of plants living on fungi*. Springer, New York.

Preiss K, Adam IKU, Gebauer G. 2010. Irradiance governs exploitation of fungi: fine-tuning of carbon gain by two partially myco-heterotrophic orchids. *Proceedings of the Royal Society of London B* **277**: 1333–1336.

Rasmussen HN. 1995. *Terrestrial Orchids – From Seed to Mycotrophic Plant.* Cambridge, UK: Cambridge University Press.

Richardson KA, Peterson RL, Currah RS. 1992. Seed reserves and early symbiotic protocorm development of *Platanthera hyperborea* (Orchidaceae). *Canadian Journal of Botany* **70**: 291–300.

Roy M, Gonneau C, Rocheteau A, Berveiller D, Thomas JC, Damesin C, Selosse M-A. 2013. Why do mixotrophic plants stay green? A comparison between green orchid and achlorophyllous individuals in situ. *Ecological Monographs* **83**: 95–117.

Roy, M., T. Yagame, M. Yamato, K. Iwase, C. Heinz, A. Faccio, P. Bonfante, and M-A. Selosse.

2009. Ectomycorrhizal *Inocybe* species associate with the mycoheterotrophic orchid *Epipogium aphyllum* but not with its asexual propagules. *Annals of Botany* **104**: 595–610.

Salmia, A. 1989. General morphology and anatomy of chlorophyll-free and green forms of *Epipactis helleborine* (Orchidaceae). *Anna Botanica Fennici*. **26**: 95-105.

Schiebold JM, Bidartondo M, Lenhard F, Makiola A, Gebauer G, 2017. Exploiting mycorrhizas in broad daylight: Partial mycoheterotrophy is a common nutritional strategy in meadow orchids. *Journal of Ecology* **106**: 168–178.

Selosse M-A, Faccio A, Scappaticci G, Bonfante P. 2004. Chlorophyllous and achlorophyllous specimens of *Epipactis microphylla* (Neottieae, Orchidaceae) are associated with ectomycorrhizal septomycetes, including truffles. *Microbial Ecology* **47**: 416–426.

Selosse M-A, Roy M. 2009. Green plants eating fungi: facts and questions about mixotrophy. *Trends in Plant Sciences* **14**: 64–70.

Selosse MA, Martos F. 2014. Do chlorophyllous orchids heterotrophically use mycorrhizal fungal carbon? *Trends in Plant Science* **19**: 683–685.

Shefferson RP, Roy M, Puttsepp Ü, Selosse M-A. 2016. Demographic shifts related to mycoheterotrophy and their fitness impacts in two *Cephalanthera* species. *Ecology* **97**: 1452–1462.

Suetsugu K, Ohta T, Tayasu I, 2018. Partial mycoheterotrophy in the leafless orchid *Cymbidium macrorhizon*. *American Journal of Botany*, in press. DOI: 10.1002/ajb2.1142.

Suetsugu K, Yamato M, Miura C, Yamaguchi K, Takahashi K, Ida Y, Shigenobu S, Kaminaka H, 2017. Comparison of green and albino individuals of the partially mycoheterotrophic orchid *Epipactis helleborine* on molecular identities of mycorrhizal fungi, nutritional modes and gene expression in mycorrhizal roots. *Molecular Ecology* **26**: 1652–1669.

Těšitel J, Těšitelová T, Minasiewicz J, Selosse M-A. 2018. Why do mixotrophic plants stay green? *Trends in Plant Sciences* **23**: 656-659.

Těšitelová T, Kotilínek M, Jersáková J, Joly F-X, Konar J, Tatarenko I, 2015. Two widespread green *Neottia* species (Orchidaceae) show mycorrhizal preference for Sebacinales in various habitats and ontogenetic stages. *Molecular Ecology* **24**:1122–1134.

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

Supporting Information Figs S1–S3

Figure S1. Mycorrhizal colonization and starch content in roots of albino and green *C. damasonium* collected at Boigneville on 15th January 2015 (n=3 each).

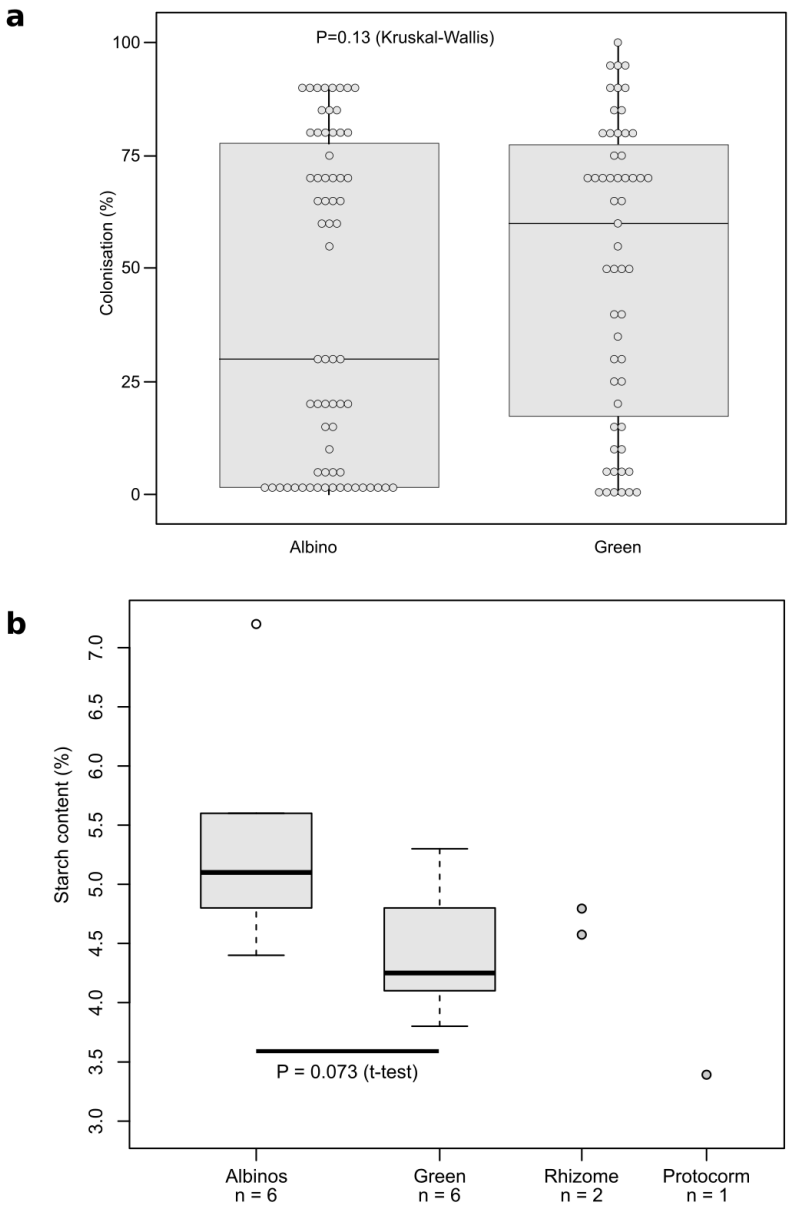


Figure S2. Labelling experiment carried out in a population of green *C. damasonium* at Le Vésinet.

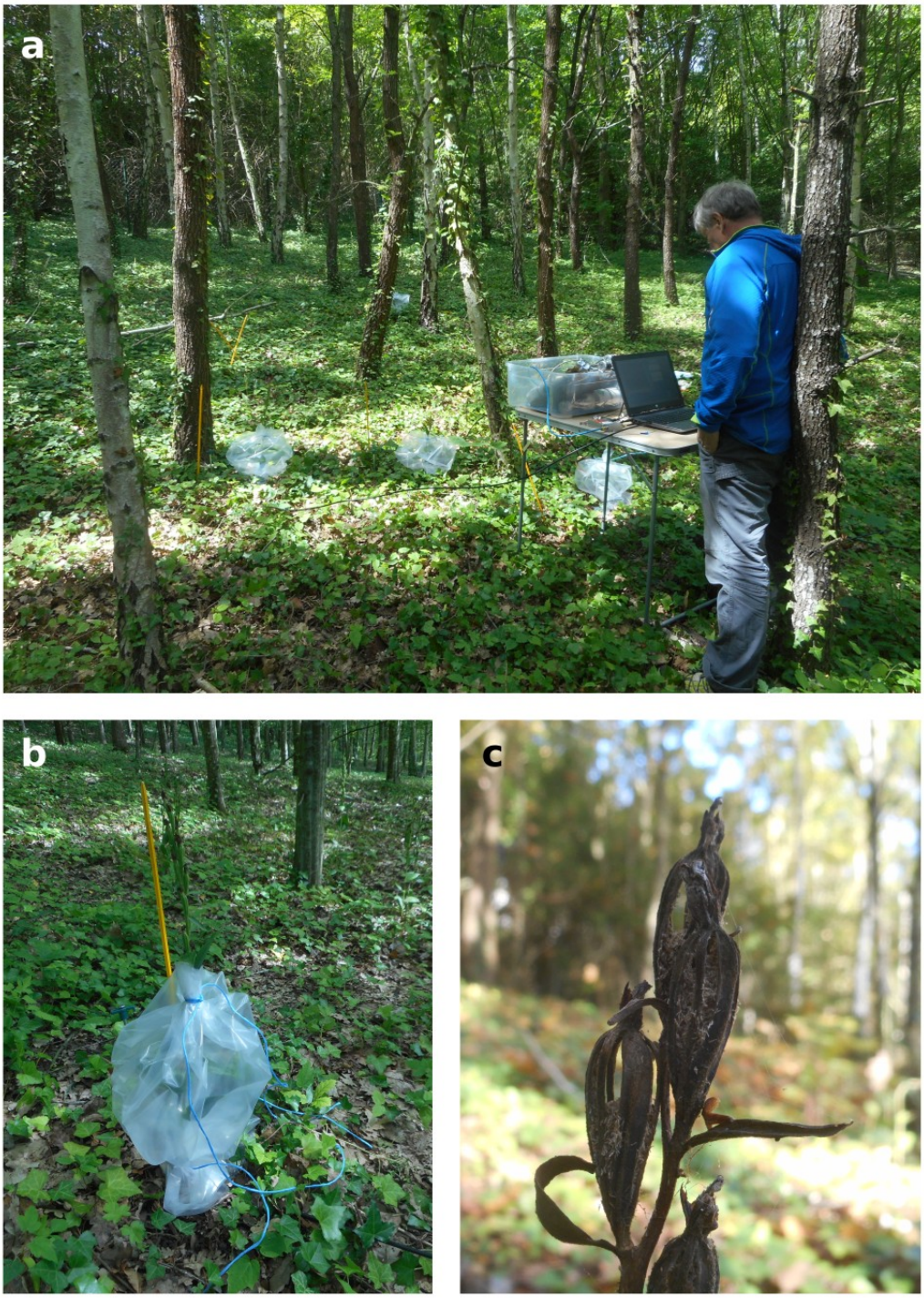
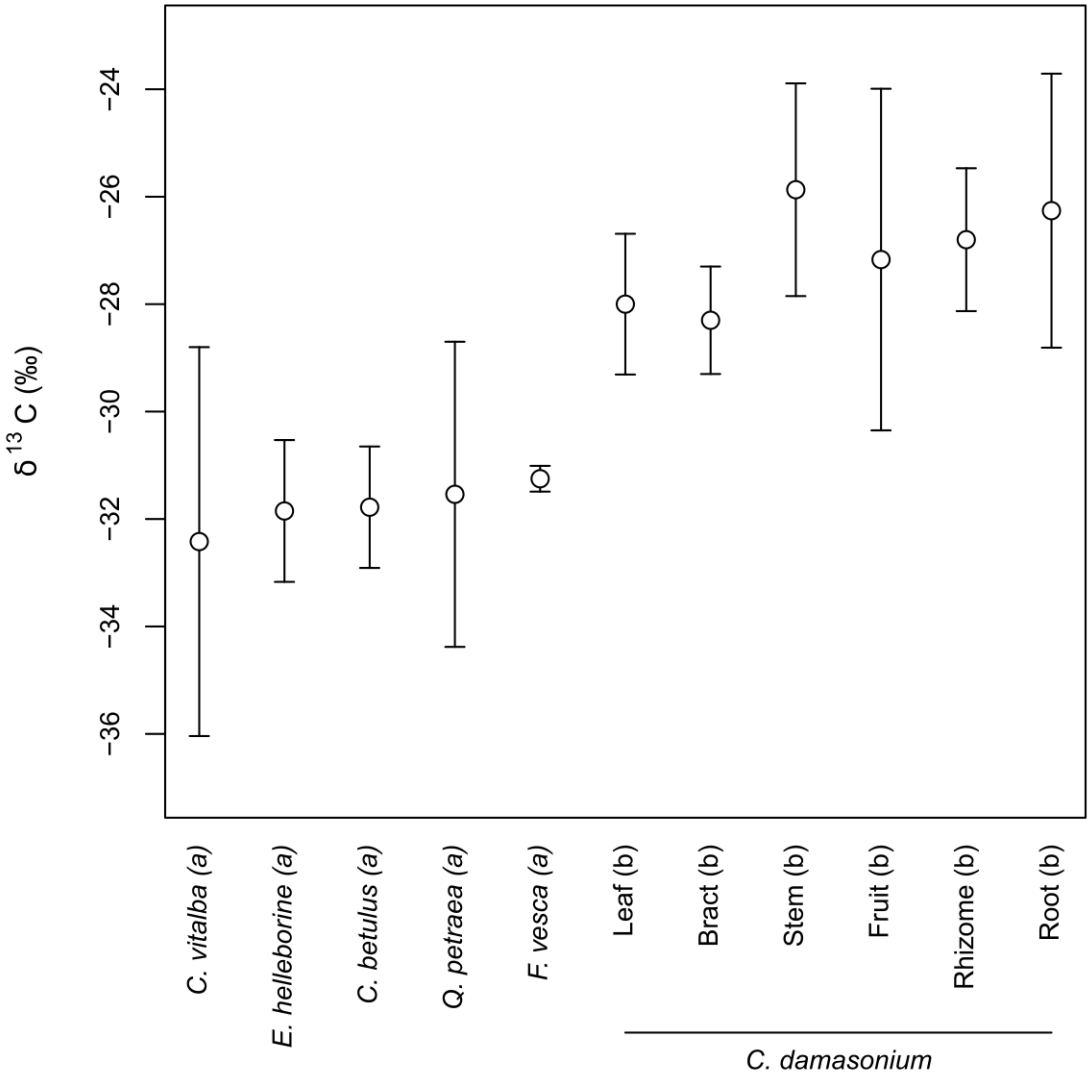


Figure S3. Mean ^{13}C enrichments of *C. damasonium* organs and leaves of reference autotrophic species at day of labelling at Le Vésinet.



ARTICLE II

In situ transcriptomic and metabolomic approach of the transition to the loss of photosynthesis in plants exploiting fungi

AVANT-PROPOS

Cet article présente les résultats de travaux exploratoires visant à mieux comprendre le métabolisme des plantes mixotrophes et l'évolution vers la mycohétérotrophie totale. Nous avons utilisé des techniques de biologie moléculaire à haut débit pour comparer l'expression des gènes (transcriptomique) et l'abondance des composés du métabolisme primaire (métabolomique) entre des individus mixotrophes classiques et des mutants albinos naturels. Trois espèces de Neottieae ont ainsi été analysées : *Cephalanthera damasonium*, *Epipactis helleborine* et *E. purpurata*.

Nous avons observé une réponse concertée à l'albinisme, commune aux trois espèces et aux différentes populations étudiées : induction de transporteurs de sucres et d'acides aminés, mobilisation de substrats énergétiques alternatifs (acides aminés, acides gras), induction des gènes promouvant l'autophagie... Ces changements se sont avérés très semblables à ceux provoqués par un albinisme partiel dans le cas de feuilles panachées et, plus largement, aux modifications induites par une carence en carbone. Cela suggère qu'il n'y a pas d'innovation métabolique majeure derrière l'émergence de la mycohétérotrophie totale ou partielle et souligne l'importance que pourrait avoir dans cette évolution le transfert vers la plante d'azote sous une forme organique.

Cette étude a été soumise à la revue *Molecular Plant* au mois d'août 2018.

J'ai réalisé les collectes de terrain nécessaires à ces travaux au cours de ma première année de thèse. Celles-ci n'auraient pas été possibles sans l’œil averti et l'aide généreuse de dizaines d'orchidophiles et de botanistes passionnés et je les en remercie sincèrement. J'ai participé à la préparation des échantillons pour les analyses de transcriptomique et de métabolomique. Le traitement des données brutes de transcriptomique a été réalisé par notre collaborateur Étienne Delannoy. Je me suis chargé des données métabolomiques et de l'analyse du jeu de données complet.

Title

In situ transcriptomic and metabolomic approach to the transition to the loss of photosynthesis in plants exploiting fungi.

Authors

Félix Lallemand[1], Marie-Laure Martin-Magniette[2,3,4], Françoise Gilard[2,5], Bertrand Gakière[2,5], Alexandra Launay-Avon[2,3], Étienne Delannoy[2,3], Marc-André Selosse[1,6]

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

[2] Institute of Plant Sciences Paris-Saclay (IPS2), CNRS, INRA, Université Paris-Sud, Université Evry, Université Paris-Saclay, 91405 Orsay, France

[3] Institute of Plant Sciences Paris-Saclay IPS2, Paris Diderot, Sorbonne Paris-Cité, 91405 Orsay, France

[4] UMR MIA-Paris, AgroParisTech, INRA, Université Paris-Saclay, Paris, France

[5] Plateforme Métabolisme Métabolome, Institute of Plant Sciences Paris-Saclay (IPS2), CNRS, INRA, Univ. Paris-Sud, Univ. Evry, Univ. Paris-Diderot, Univ. ParisSaclay, Bâtiment 630 Rue Noetzlin, 91192 Gif-sur-Yvette cedex, France

[6] Department of Plant Taxonomy and Nature Conservation, University of Gdansk, Wita Stwosza 59, 80-308 Gdansk, Poland

Contact

Corresponding author Félix Lallemand: felix.lallemand@protonmail.com

Running Title

Metabolic changes in mycoheterotrophy evolution

Abstract

Mycoheterotrophic plants have lost photosynthesis and obtain carbon through mycorrhizal fungi colonizing their roots. They evolved from mixotrophic ancestors, which rely on both photosynthesis and fungal carbon for their development. Whereas our understanding of the ecological and genomic changes associated with the evolutionary shift to mycoheterotrophy is deepening, little is known about the specific metabolic and physiological features driving this evolution. We investigated this issue in naturally occurring achlorophyllous variants of temperate mixotrophic orchids. We carried out an integrated transcriptomic and metabolomic analysis of the response to achlorophylly in the leaves of three species sampled *in natura*. Achlorophyllous leaves showed major impairment of their photosynthetic and mineral nutrition functions, strong accumulation of free amino acids, overexpression of enzymes and transporters related to sugars, amino acids and fatty acid catabolism, as well as induction of some autophagy-related and biotic stress genes. Such changes were reminiscent of these reported for variegated leaves and appeared to be symptomatic of a carbon starvation response. Rather than decisive metabolic innovations, we suggest that the evolution towards mycoheterotrophy in orchids more likely relies on the versatility of plant metabolism and an ability to exploit fungal organic resources, especially amino acids, to replace missing photosynthates.

Keywords

Mycorrhiza, mycoheterotrophy, mixotrophy, albinos, orchids, Neottieae, metabolomic, transcriptomic, carbon starvation response

Introduction

Most plants associate with soil fungi, forming so-called mycorrhizal symbiosis, where fungi provide mineral nutrients (water, N, P and K) in exchange for plant organic carbon (van der Heijden et al., 2015). Unlike the usual mycorrhizal symbiosis, mycoheterotrophic plants get both mineral nutrients and organic carbon from their mycorrhizal fungi (Merckx, 2013). With more than 500 fully mycoheterotrophic species, which have lost chlorophyll and photosynthesis, this remarkable evolutionary breakdown of mutualistic mycorrhizal interactions has arisen at least 50 times, in 17 plant families independently (Merckx et al., 2013a; Těšitel et al., 2018). However, we have yet to understand the metabolic evolution to mycoheterotrophy (Selosse et al., 2017).

Besides full mycoheterotrophs, some green plants obtain their carbon by adding photosynthesis and partial mycoheterotrophy in a strategy called mixotrophy (Selosse and Roy, 2009; Těšitel et al., 2018). Orchids have complex links with mycoheterotrophy and mixotrophy (Selosse et al., 2004; Bidartondo et al., 2004; Roy et al., 2013). All orchids produce reserveless seeds that support their germination and early growth by way of an initial mycoheterotrophy, thanks to fungi that later become their mycorrhizal partners (Dearnaley et al., 2016). Most species associate with rhizoctonias (a polyphyletic group of fungi; Smith and Read, 2008; Dearnaley et al., 2012), and

develop photosynthetic organs allowing autotrophy at adulthood (although their exact level of dependency on fungal carbon is debated; Selosse and Martos, 2014). Yet some species remain mycoheterotrophic or form green leaves but are mixotrophic at adulthood (Selosse and Roy, 2009). In temperate regions, these orchids do not associate with rhizoctonias, but with ecologically and taxonomically different fungi, which simultaneously form symbioses with surrounding tree roots called ectomycorrhizas (Julou et al., 2005; Waterman et al., 2013). Mixotrophic orchids are phylogenetically close to mycoheterotrophic species, and mixotrophy is thus considered an evolutionary step toward full mycoheterotrophy. Mixotrophy represents a precious model to understand how mycoheterotrophy evolved (Selosse and Roy, 2009).

Rare but compelling field evidence that mixotrophy is a step in the evolution to mycoheterotrophy is the observation, in some mixotrophic orchids that are normally green, of individuals fully devoid of chlorophyll (Selosse et al., 2004; Julou et al., 2005): these 'albinos' survive (Salmia, 1986; Shefferson et al., 2016) but produce fewer seeds (Roy et al., 2013). They especially occur in the closely related genera *Epipactis* (Selosse et al., 2004; Gonneau et al., 2014; Lewis 2015) and *Cephalanthera* (Julou et al., 2005; Abadie et al., 2006; Sakamoto et al., 2016).

Our understanding of mixotrophic physiology remains limited. Most studies have relied on natural stable isotopes as a proxy for the level of mycoheterotrophy, since the organic matter gained from fungi is naturally enriched in ^{13}C as compared to that obtained from photosynthesis (see Hynson et al. (2013) for a review). This allows calculation of the percentage of carbon recovered from mycorrhizal fungi in a given organ at a given stage (e.g., Roy et al., 2013; Gonneau et al., 2014). The level of mycoheterotrophy depends on species and environmental conditions and decreases with increasing light availability (Gonneau et al., 2014; Preiss et al., 2010; Lallemand et al., 2017) and during the growth season, as expected from the development of green leaves (Roy et al., 2013; Gonneau et al., 2014). Isotopic analysis, however, does not give access to the metabolism in mixotrophs, or especially in albinos, which mimic the emergence of mycoheterotrophy.

In a pioneer work, Suetsugu et al. (2017) compared the differences in gene expression in mycorrhizas between green and albino individuals of the mixotrophic *Epipactis helleborine* (L.) Crantz. Surprisingly, gene expression displayed rather little alteration in either the plant or the fungi in this symbiotic organ. Both roots and fungi showed upregulation of genes related to antioxidant function, possibly reflecting a higher lysis of hyphae in mycorrhizas. Both partners also exhibited a higher expression of genes encoding nutrient transporters, such as a bidirectional sugar transporter SWEET or transporters from the 'major facilitator' superfamily involved in the exchange of various organic (sugars, nucleosides, amino acids…) and inorganic (nitrates, phosphates…) nutrients (Pao et al. 1998). The minor changes entailed in mycorrhizas by such a dramatic loss of photosynthesis call for further investigations in other organs, especially in leaves whose metabolism may be more affected by albinism. Moreover, metabolite abundances are valuable data in interpreting changes in gene expression, calling for biochemical investigations of the mycoheterotrophic albino lifestyle.

Here we report a multi-omics, multi-population and multi-specific analysis comparing the leaf transcriptome and metabolome of albino and green individuals in mixotrophic orchids. By

Figure 1. An albino/green pair: *Epipactis helleborine* at Poncin. The albino stalk chosen for analysis is the one at the forefront. Picture: F. Lallemand.

combining transcriptomic and metabolomic profiling of albinos in three species (*Cephalanthera damasonium* (Mill.) Druce, *E. helleborine* and *E. purpurata* Sm.) collected *in situ* from different populations, we aimed to filter the RNA and biochemical variability due to species- or environment-specific features, in order to focus on the core physiological changes related to the shift toward full mycoheterotrophy. We discuss these results with regards to the evolution of mixotrophy and mycoheterotrophy in orchids.

Material and methods

Species analyzed and sampling procedure

Cephalanthera and *Epipactis* populations from France and Luxembourg for which albinos have been reported were visited during the spring and summer of 2016. For each site, we selected one (two for the population at Boigneville) albino and one (two at Boigneville) green counterpart growing nearby with similar size, phenology and light condition (Figure 1). Light condition was measured as photosynthetically active radiation (PAR) and expressed as photosynthetic photon flux

Table 1. Summary of the species and populations sampled.

Species	Site	Code	Sampling date	Sampling time	Localisation (decimal degrees WGS 84)	PAR (PPFD, µmol m^{-2} s^{-1})	Phenology
Cephalanthera damasonium	Mesnil-Soleil	CD1	25/05/16	11:00	48.9258 N, 0.1375 W	18	Flowering
	Boigneville [a] (two pairs)	CD2	06/06/16	12:20	48.3399 N, 2.3600 E	25	Flowering
		CD3					Flowering
Epipactis helleborine	Poncin	EH1	19/05/16	11:20	46.1074 N, 5.4519 E	245	Leaves development
	Villeneuve	EH2	30/05/16	10:40	43.3356 N, 2.4806 E	1220	Flower buds
	Kayl	EH3	22/07/16	11:00	49.4791 N, 6.0212 E	87	Flower buds
Epipactis purpurata	Hirtzbach	EP1	19/07/16	11:30	47.5856 N, 7.2139 E	136	Flower buds
	Evosges	EP2	21/07/16	15:20	45.9486 N, 5.5113 E	8	Flower buds
	Levier	EP3	04/08/16	15:00	46.9405 N, 6.0767 E	2	Flower buds

[a] this population has already been investigated for photosynthetic rates and mycorrhizal partners of albinos (Julou et al. 2005), genetic diversity (Tranchida-Lombardo et al. 2010), fitness (Roy et al. 2013) and survival (Shefferson et al. 2016)

density (PPFD) summed from 400 nm to 700 nm with a MQ-200 Quantum Meter (Apogee Instruments). For each selected individual, one leaf was cut and immediately frozen in liquid nitrogen. Care was taken to sample leaves with no senescence or pathogen damage mark, and to choose leaves of similar developmental stage for each albino/green pair. We ended up with a final set of three species with three biological replicates for each (Table 1).

N content measurements

N contents of albino and green leaves were estimated using a continuous flow elemental analyzer (EA Thermo Flash 2000). Samples were ground and around 1 mg of leaf powder was analyzed. Alanine was used as an internal standard. Mean values ± standard deviation for alanine N content were 15.82% ± 0.21 and 15.70% ± 0.39 (two runs, n = 15 for each) compared to an expected theoretical value of 15.72%. Data were consequently corrected.

Metabolomic gas chromatography – mass spectrometry (GC-MS) analyses

The ground frozen samples (60-66 mg FW) were resuspended in 1 mL of frozen (-20°C) water:acetonitrile:isopropanol (2:3:3) containing 4 pg/mL ribitol and extracted for 10 min at 4°C with shaking at 1500 rpm in an Eppendorf Thermomixer. Insoluble material was removed by centrifugation at 13500 rpm for 10 min. 100 µL was collected and 10 µL of 30 pg/mL myristic acid d27 was added as an internal standard for retention time locking. Extracts were dried for 4 h at 35 °C in a Speed-Vac and stored at -80°C.

All steps of GC-MS analyses were done as in Fiehn et al. (2006; 2008). Samples were taken out of -80°C, warmed for 15 min before opening and speed-vac dried again for 1.5 h at 35 °C before adding 10 µL of 20 mg/mL methoxyamine in pyridine to the samples and the reaction was performed for 90 min at 30 °C with continuous shaking in an Eppendorf thermomixer. 90 µL of N-methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamide (MSTFA) (Regis Technologies 1-270590-200 -10x1g) was then added and the reaction continued for 30 min at 37 °C. After cooling, 100 µL was transferred to an Agilent vial for injection.

Four hours after derivatization, 1 µL of sample was injected in splitless mode on an Agilent 7890B gas chromatograph coupled to an Agilent 5977A mass spectrometer. The column was an Rxi-5SilMS from Restek (30 m with 10 m Integra-Guard column - ref 13623-127). An injection in split mode with a ratio of 1:30 was systematically performed for saturated compound quantification. The oven temperature ramp was 60 °C for 1 min then 10 °C/min to 325 °C for 10 min. Helium constant flow was 1.1 mL/min. Temperatures were the following: injector: 250 °C, transfer line: 290 °C, source: 230 °C and quadrupole 150 °C. The quadrupole mass spectrometer was switched on after a 5.90 min solvent delay time, scanning from 50-600 u. Absolute retention times were locked to the internal standard d27-myristic acid using the RTL system provided in Agilent's Masshunter software. Retention time locking reduces run-to-run retention time variation. Samples were randomized. A fatty acid methyl ester mix (C8, C9, C10, C12, C14, C16, C18, C20, C22, C24, C26, C28, C30) was injected in the middle of the queue for external RI calibration.

Raw Agilent datafiles were analyzed with AMDIS (http://chemdata.nist.gov/mass- spc/amdis/). The Agilent Fiehn GC/MS Metabolomics RTL Library (version June 2008) was employed for metabolite identifications. Peak areas were determined with the Masshunter Quantitative Analysis (Agilent) in splitless and split 30 modes. Because automated peak integration was occasionally erroneous, integration was verified manually for each compound in all analyses. Resulting areas were compiled in one single Excel File for comparison. Peak areas were normalized to ribitol and fresh weight. Metabolite contents are expressed in arbitrary units (semi-quantitative determination).

RNA extraction

One hundred mg of fresh material per sample was extracted using the Nucleozol protocol (Macherey-Nagel, France). A DNase treatment (DNase Max, Qiagen, France) was then performed followed by a final purification with the Agencourt RNAclean xp kit (Beckman, France). The integrity of total RNAs was checked on an RNA_Nano chip using Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbroon, Germany).

Sequencing and quality trimming

The RNA-seq experiment was carried out at the Institute of Plant Sciences Paris-Saclay (IPS2, Saclay, France). The libraries were constructed with the TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-

Zero Plant Leaf kit (Illumina®, California, U.S.A.) following the supplier's instructions. They were then sequenced in multiplex with a NextSeq500 high output v2 kit in paired-end (PE) with a read length of 150 bases. After quality trimming with Trimmomatic (v0.36, parameters TruSeq3-PE.fa:2:30:10:2:true MINLEN:30; Bolger et al., 2014), between 21 684 667 and 27 138 011 (average 23.2 million) pairs of reads per sample were generated.

De novo transcriptome assembly and annotation

The *de novo* assembly of the transcriptome was performed following Roberts and Roalson (2017). Briefly, for each species, 16 assemblies were generated. One with Trinity (v2.3.2, default parameters except --SS_lib_type RF --min_kmer_cov 3; Haas et al., 2013) on all the samples and 15 with Velvet-Oases (v1.2.09; Schulz et al., 2012) corresponding to 5 assemblies (with kmers 25, 35, 45, 55 and 65) for each of the 3 sites. The assembly with Velvet-Oases on the pool of all the samples failed regardless of the parameters. These 16 assemblies were then combined with the tr2aacds.pl script (v2014.05.15) of the EvidentialGenes suite (Nakasugi et al., 2014). Only contigs classified as "main" were kept in the final unigene set. The quality of the unigene set for each species was assessed with BUSCO v3.0.2 (Waterhouse et al., 2018) using hmmer 3.1b2 against the embryophyta_odb9 dataset. The contigs were annotated with the Blast and Pfam analyses of Trinotate v3. The uniprot_sprot.pep and Pfam-A.hmm were generated in February 2017.

Mapping and counting

The reads were mapped on the unigene set and plastidial genome of the corresponding species (GenBank accession numbers: MH590351 for EH, MH590354 for EP and MH590345 for CD; sequences submitted for review). For plastidial genes, contigs were mapped on plastidial genomes using STARlong (v2.5.2 with parameters --quantMode TranscriptomeSAM --alignIntronMax 1 --outFilterMismatchNmax 100 --seedSearchLmax 30 --seedSearchStartLmax 30 --seedPerReadNmax 100000 --seedPerWindowNmax 100 --alignTranscriptsPerReadNmax 100000 --alignTranscriptsPerWindowNmax 10000 --alignEndsType Local; Dobin et al., 2013). These mapping contigs were removed from the unigene sets to avoid multi-mapping events. A GTF file corresponding to the non-plastidial contigs and the plastidial genome was created to perform the mapping of the reads with STAR (v2.5.2 with default parameters except --outFilterMultimapScoreRange 0 --alignIntronMax 1; Dobin et al., 2013). The mapping rates ranged from 71 to 93% with an average of 78% for albinos and 90% for green samples. Reads mapping on exons were counted with featureCounts (v1.5.0, parameters -M -s 2 -t exon -g gene_id; Liao et al., 2014). Between 54 and 84% of the mapped reads were assigned with an average of 64% for albinos and 73% for green samples.

Orthology

To improve the annotation and allow the comparison of the transcriptome response to albinism in

the 3 species, orthologs with rice (Oryza_sativa.IRGSP-1.0.pep.all), *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis_thaliana.TAIR10.pep.all) and *Phalaenopsis equestris* (GCF_001263595.1_ASM126359v1_protein) proteins were identified using OrthoFinder (v2.1.2; Emms and Kelly, 2015). 19 499 orthogroups out of 55 702 contained contigs of our 3 orchid species. They comprised 35 to 36% of all the contigs for each species, but between 69 and 94% of the reads with an average of 79% for the albinos and 90% for the green samples. For the transcriptome analysis, the count for an orthogroup was equal to the sum of counts of the contigs belonging to it.

Statistics

Only genes (orthogroups) for which read mapping was higher than 1 count per million in at least 3 samples were kept for further analysis. After normalization with the TMM method (Robinson et al., 2010) to correct the library size effect, the counts were transformed with the vst method of the coseq package v1.2 (Rau and Maugis-Rabusseau, 2018). The QQ-plots showed that the resulting transformed counts fitted a normal distribution. As the samples were paired, the log2ratios albino/green calculated from the transformed counts were analyzed using the lmFit contrasts.fit and eBayes functions of the limma package v3.34.9 (Smyth, 2004). In our model, the log2ratio was expressed as a linear combination of a species effect and the p-values corresponding to the contrasts described in Supplemental Table S2 were calculated. The distribution of the resulting p-values followed the quality criterion described by Rigaill et al. (2018). The Benjamini Hochberg correction was used to control false discovery rate (FDR; Benjamini and Hochberg, 1995). We considered the genes with an adjusted p-value ≤ 0.05 as being differentially expressed.

For metabolite abundance, log2 ratios between albinos and green counterparts were calculated for each pair. The same linear model as for gene expression analysis was fitted to each compound using functions lm and anova from R package stats v3.5.0 (R Core Team, 2018). The Benjamini Hochberg correction was used to control false discovery rate (Benjamini and Hochberg, 1995). We considered the metabolites with an adjusted p-value ≤ 0.05 as being differentially accumulated.

Principal component analyses shown in Supplemental Figure S1 were carried out using the PCA function of the R package FactoMineR v1.41 (Husson et al., 2010).

Vizualization

The omics results were further analyzed with Mapman v3.6.0RC1 (Thimm et al., 2004). To use the *A. thaliana* mapping (Ath_AGI_LOCUS_TAIR10_Aug2012), only the orthogroups containing *A. thaliana* genes were kept. When several *A. thaliana* genes belonged to the same orthogroup, they were all given the ratio of this orthogroup. The final Mapman file contained values for 13475 genes corresponding to 9081 orthogroups.

Data Availability

Raw transcriptomic data are available at SRA under the accession SRP140950. Raw metabolomic data are available upon request to the corresponding author.

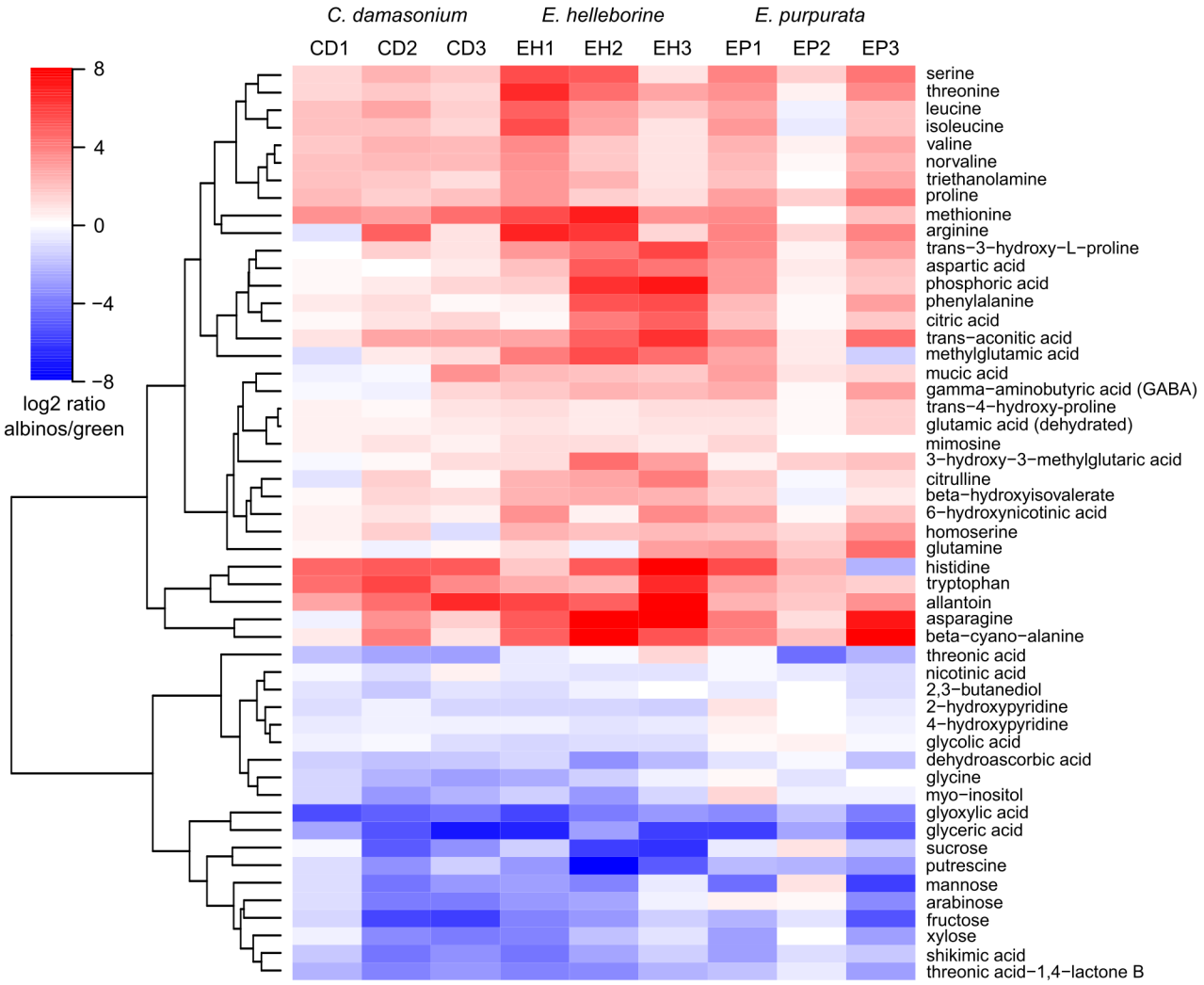


Figure 2. Metabolite abundance differences between albino and green leaves of the three orchid species studied based on GC-MS analysis. Each column corresponds to an albino/green pair (see Table 1 for correspondence with sampling sites). Only metabolites with significant differences are shown (see Supplemental Table S1 for FDR and fold changes). Red (resp. blue) indicates higher (resp. lower) abundance in albinos compared to greens. A hierarchical clustering by the complete linkage method is shown on the left.

Results

The response to albinism is globally shared by the three species

One hundred fifty-six compounds shared by all the samples, corresponding to 141 different metabolites, were identified by GC-MS analysis (Supplemental Table S1). This includes most of the

compounds from primary metabolism (see Supplemental Table S1 for exceptions). Thirty-three metabolites showed an over-accumulation in albinos compared to green counterparts, whereas 19 were less abundant (Figure 2; Supplemental Table S1).

The RNA-seq analysis showed that 3 060 genes were differentially expressed between albinos and green counterparts (Supplemental Table S2). When only plastid-encoded genes were considered, albinos and green counterparts clustered in two distinctive groups after PCA (Supplemental Figure S1). The distinction was less obvious for nuclear-encoded genes: the distances between individuals of same phenotype roughly equaled the distances between those within an albino/green pair (Supplemental Figure S1), suggesting that variability among populations and albinism affected gene expression to a similar extent. The same was true for metabolomic data (Supplemental Figure S1). For *C. damasonium*, individuals from the same site (CD2 and CD3, Boigneville) did not cluster together, indicating high intra-population variability and making them suitable biological replicates (Supplemental Figure S1). When comparing response to albinism in the three species, intraspecific variability equaled interspecific variability (Supplemental Figure S1), and we detected only a limited number of genes and no metabolite that differed in response to albinism between two species (329 genes for the comparison between CD and EH but only 3, 25 and 6 when comparing EP to CD, EP to EH or CD to the two *Epipactis*, respectively). This is probably caused by the statistical power associated with the low number of replicates per species, but it nevertheless suggests a conserved response to albinism in all populations for gene expression and metabolite abundance.

Shutdown of photosynthesis-related and mineral nutrition functions

Many genes involved in photosynthesis were repressed in albinos (Figure 3), e.g. nuclear-encoded components of the photosynthetic electron transport chain, enzymes of chlorophyll biosynthesis, the Calvin cycle, photorespiration and plastidial carbonic anhydrase (Supplemental Table S2). The plastidial genome expression was inhibited but still present in albinos with plastidial reads representing 52 ± 10% (mean ± confidence interval 95%) of the total library (compared to 83 ± 5% in green). Within the overall inhibition, plastidial genes transcribed by the plastid-encoded RNA polymerase were more strongly inhibited than plastidial genes transcribed by the nuclear-encoded RNA polymerase. Decrease in abundance of metabolic intermediates confirms this for photorespiration, but not for the Calvin cycle where only 3-phosphoglycerate was detected and did not differ (Figure 2, Supplemental Table S1). The inability of albinos to photosynthesize, verified by transcriptomic analysis, confirms their mycoheterotrophy.

In association with the photosynthesis shutdown, transporters involved in mineral nutrient uptake were repressed in albinos for nitrate (*NRT2.3*, *NPF6.2*, see Table 2 for detailed names and fold changes), phosphate (*PHO1-H1*, *PHT2-1*), sulfate (*SULTR3.1*, *SULTR3.3*), magnesium (*MRS2-3*, although *MRS2-10* was induced) and zinc (*ZIP2*).

Mineral nitrogen assimilation was inhibited in albinos as shown by repression of nitrite reductase

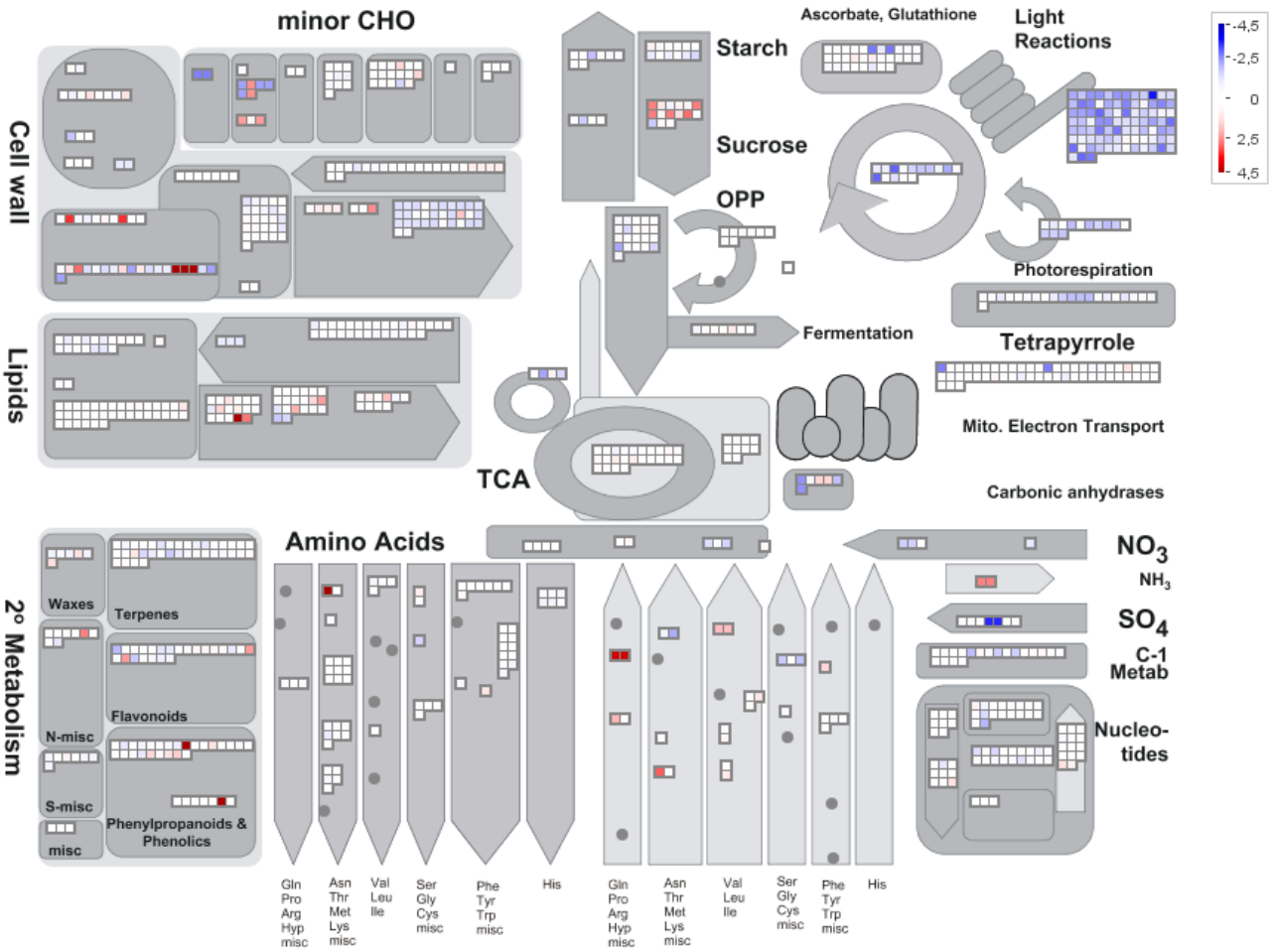


Figure 3. Overview of the average changes in the leave transcriptome of albinos compared to green individuals. In this summary of the plant primary metabolism, drawn with Mapman software (Thimm et al. 2004), each square represents a gene. Based on mean log2 ratio of the nine albino/green pairs studied, repressed genes are in blue and induced ones in red. See text and Table 2 for gene names and fold changes. CHO: carbohydrates; OPP: oxidative pentose phosphate pathway; TCA: tricarboxylic acid cycle.

(*NIR*, except in *E. purpurata*), ferredoxin-dependent glutamate synthase (*GLU*, but not the NADH-dependent glutamate synthase *GLT1*) and glutamine synthetase (*GLNA4_PHAVU*, Table 2).

Sulfate assimilation through cysteine biosynthesis was also strongly reduced in albinos (*APR3*, Table 2).

Major alterations of nitrogen metabolism

Metabolomic analysis revealed a striking increase in abundance of amino acids and their derivatives in albinos compared to green ones (Figure 2 and Figure 4; Supplemental Table S1). The largest increases were for asparagine (24x), histidine (16x), methionine (12x), tryptophan (11x) and

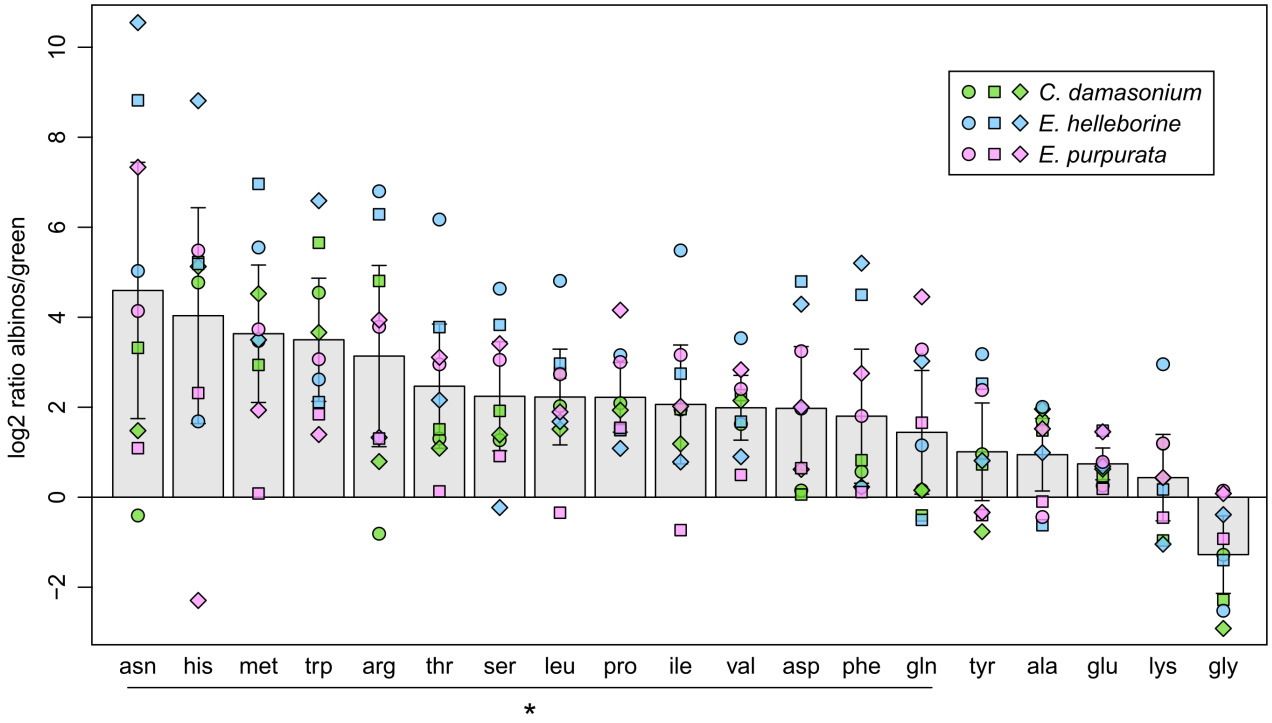


Figure 4. Changes in amino acids levels in albino leaves compared to green ones. Each point represents the log2 ratio of one albino/green pair. Mean values ± 95% confidence intervals for the nine replicates are shown. Colors indicate species and symbols populations. The bar with a star shows amino acids that are significantly more abundant in albino leaves (see Supplemental Table S1). Cysteine was not detected by GC-MS.

arginine (9x), whereas no difference was found for glutamate, alanine, tyrosine and lysine levels (Supplemental Table 1). Only glycine was less abundant in albinos (2x), probably due to low photorespiration, as revealed from gene expression (Supplemental Tables S1 and S2). The nitrogen-rich compound allantoin was 23x more abundant in albinos while the polyamine putrescine was 10x less abundant (Supplemental Table S1). These differences correlated with a higher N content in albinos compared to green (4.1 ± 0.66% mean dry weight ± 95% confidence interval *vs* 3.2 ± 0.38%, $p = 0.019$, $t = 3.03$, $df = 7$, paired two-sided Student's t-test; Supplemental Figure S2).

Asparagine synthetase (*ASNS_ASPOF*) and asparaginase (*ASPGB_ARATH*) showed respectively a strong induction (11x) and repression (8x), in line with high asparagine levels in albinos (Table 2). Shikimate abundance was lower in albinos, pointing to a possible inhibition of the shikimate pathway and the associated aromatic amino acid biosynthesis (Figure 2; Supplemental Table S1). The expression of most other amino acid biosynthesis enzymes was not altered, except for cysteine (repression of *APR3* and *RCS3*) and branched-chain amino acids (BCAA: valine, isoleucine, leucine), which showed contrasted results with some evidence of repression (*IPMSA*, *IIL1*) and uncertain induction (*BCAT3*, Table 2, see footnote b).

Table 2: List of the differentially expressed genes involved in major biological processes, which are reported in the main text. Fold changes are the mean log2 ratio of the nine albino/green pairs studied. When positive (resp. negative), genes are more (less) expressed in albino leaves. Compound names, gene names and enzyme commission (EC) numbers associated with each best blastP, were retrieved from the UniProt database.

Biological process	Subcategory	Compound [a]	blastP	Gene name	log2 ratio	FDR
Mineral nutrients	Magnesium	Magnesium transporter MRS2-10	MRS2A_ARATH	MRS2-10	0.76	0.004
		Magnesium transporter MRS2-3	MRS23_ARATH	MRS2-3	-1.44	0.001
	Nitrate	Protein NRT1/ PTR FAMILY 6.2	PTR27_ARATH	NPF6.2	-1.97	0.004
		High-affinity nitrate transporter 2.3	NRT23_ORYSJ	NRT2.3	-0.99	0.005
	Phosphate	Phosphate transporter PHO1 homolog 1	PHO11_ARATH	PHO1-H1	-3.22	0.001
		Inorganic phosphate transporter 2-1, chloroplastic	PHT21_ARATH	PHT2-1	-0.81	0.003
	Sulfate	Sulfate transporter 3.1	SUT31_ARATH	SULTR3;1	-2	0.001
		Probable sulfate transporter 3.3	SUT33_ARATH	SULTR3;3	-1.85	0.004
	Zinc	Zinc transporter 2	ZIP2_ORYSJ	ZIP2	-1.23	0.012
Nitrogen metabolism		Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing]	ASNS_ASPOF		3.5	0.001
		Glutamine synthetase leaf isozyme, chloroplastic	GLNA4_PHAVU		-1.71	0
		Probable isoaspartyl peptidase/L-asparaginase 2	ASPGB_ARATH		-3	0
		Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial (EP)	DHE1_ORYSJ	GDH1	1.05	0.097
		Glutamate synthase 1 [NADH], chloroplastic	GLUT1_ARATH	GLT1	0.16	0.769
		Ferredoxin-dependent glutamate synthase, chloroplastic	GLTB_ORYSJ	GLU	-0.92	0.004
		Ferredoxin--nitrite reductase, chloroplastic (EP)	NIR_MAIZE	NIR	-0.97	0.057
Amino acids biosynthesis	Cys	5'-adenylylsulfate reductase 3, chloroplastic	APR3_ARATH	APR3	-3.52	0
		Cysteine synthase (CD)	CYSK2_ORYSJ	RCS3	-1.11	0.014
	Val, Ile, Leu	Branched-chain-amino-acid aminotransferase 3, chloroplastic [b]	BCAT3_ARATH	BCAT3	2.22	0.002
		3-isopropylmalate dehydratase large subunit, chloroplastic	LEUC_ARATH	IIL1	-0.71	0.005
		2-isopropylmalate synthase A	LEU1A_SOLPN	IPMSA	-2.75	0
Sugar metabolism	Sucrose	Beta-fructofuranosidase, insoluble isoenzyme 3 (EP)	INV3_ORYSJ	CIN3	0.84	0.021
		Cytosolic invertase 1 (EP)	CINV1_ORYSJ	CINV1	0.74	0.055
		Beta-fructofuranosidase 1 (EP)	INV1_MAIZE	IVR1	1.65	0.014

Sugar metabolism	Sucrose	Neutral/alkaline invertase 1, mitochondrial (EP)	NIN1_ORYSJ	NIN1	1.65	0.014
		Sucrose-phosphate synthase	SPSA_MAIZE	SPS	-1.6	0
	Trehalose	Probable trehalase (EP: not detected)	TRE_ORYSJ		1.47	0.022
		Probable trehalose-phosphate phosphatase 2	TPP2_ORYSJ	TPP2	2.28	0.001
		Probable trehalose-phosphate phosphatase 6	TPP6_ORYSJ	TPP6	-2	0.003
		Alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase [UDP-forming] 5	TPS5_ARATH	TPS5	2.4	0.002
		Alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase [UDP-forming] 6	TPS6_ARATH	TPS6	0.78	0.013
		Alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase [UDP-forming] 6	TPS6_ARATH	TPS6	1.02	0.007
		Probable alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase [UDP-forming] 9	TPS9_ARATH	TPS9	1.97	0.002
Organic nutrients	Sugars	Sugar transporter ERD6-like 6	ERDL6_ARATH		1.61	0.001
		Sugar transport protein 13	STP13_ARATH	STP13	1.36	0.021
		Sucrose transport protein SUT1	SUT1_ORYSJ	SUT1	1.5	0.004
		Sucrose transport protein SUT2 (CD)	SUT2_ORYSI	SUT2	-0.78	0.004
		Bidirectional sugar transporter SWEET2a	SWT2A_ORYSJ	SWEET2A	1.31	0.024
	Amino acids	Probable proline transporter 2 (EH)	PROT2_ORYSJ		1.03	0.002
		Probable amino acid permease 7	AAP7_ARATH	AAP7	1.09	0.035
		Lysine histidine transporter-like 8 (EP)	LHTL8_ARATH	AATL1	1.02	0.004
		Amino-acid permease BAT1 homolog	BAT1_ORYSJ	BAT1	1.1	0.002
		Cationic amino acid transporter 2, vacuolar (EP)	CAAT2_ARATH	CAT2	0.7	0.057
Amino acids catabolism	Arg	Ornithine aminotransferase, mitochondrial	OAT_ORYSJ	OAT	1.44	0.006
	Lys	Alpha-aminoadipic semialdehyde synthase	AASS_ARATH	LKR/SDH	2.44	0.002
	Pro	Proline dehydrogenase 2, mitochondrial (EP)	PROD2_ARATH	POX2	2.1	0.01
	Tyr	Homogentisate 1,2-dioxygenase	HGD_ARATH	HGO	1.13	0.009
		4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (EP)	HPPD_ARATH	HPD	0.83	0.049
	Val, Ile, Leu	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit alpha 2, mitochondrial (EP)	ODBA2_ARATH		1.18	0.012
		2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit beta 1, mitochondrial (EP)	ODBB1_ARATH	BCDH BETA1	0.64	0.036
		Methylcrotonoyl-CoA carboxylase subunit alpha, mitochondrial (EP)	MCCA_ORYSJ	MCCA	0.77	0.025
		Methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial (EP)	MCCB_ARATH	MCCB	0.82	0.014

Lipid catabolism	Fatty acids	Glyoxysomal fatty acid beta-oxidation multifunctional protein MFP-a	MFPA_CUCSA		1.02	0.01
		Malate dehydrogenase, glyoxysomal	MDHG_CITLA		-2.26	0
		Acyl-coenzyme A oxidase 3, peroxisomal	ACOX3_ARATH	ACX3	1.13	0.02
		Long chain acyl-CoA synthetase 7, peroxisomal	LACS7_ARATH	LACS7	0.68	0.009
		3-ketoacyl-CoA thiolase 2, peroxisomal (EP)	THIK2_ARATH	PED1	0.68	0.026
	Galactolipids	Phospholipase A1-Ibeta2, chloroplastic	PLA14_ARATH		1.25	0.012
		Patatin-like protein 2	PLP2_ARATH	PLP2	3.79	0.002
	Mono-diacylglycerol	Monoacylglycerol lipase	MGLL_MYCTU		0.9	0.005
	Tri-acylglycerol	Lipase	LIP_RHIMI		0.71	0.016
		Lipase	LIP_RHIMI		2.57	0.004
		Triacylglycerol lipase SDP1 (EP)	SDP1_ARATH	SDP1	1.57	0.01
Lipid biosynthesis	Cuticle	Protein ECERIFERUM 26	CER26_ARATH	CER26	-1.86	0.005
		3-ketoacyl-CoA synthase 6	KCS6_ARATH	CUT1	-0.83	0.009
		3-ketoacyl-CoA synthase 10	KCS10_ARATH	FDH	-1.2	0.005
		Glycerol-3-phosphate 2-O-acyltransferase 6	GPAT6_ARATH	GPAT6	-1.31	0.003
	Fatty acids	Stearoyl-[acyl-carrier-protein] 9-desaturase, chloroplastic	STAD_ELAGV		-0.61	0.009
		Biotin carboxyl carrier protein of acetyl-CoA carboxylase	BCCP_NOSS1	accB	-0.66	0.007
		Biotin carboxyl carrier protein of acetyl-CoA carboxylase	BCCP_NOSS1	accB	-0.26	0.176
		acetyl-CoA carboxylase carboxyl transferase subunit beta	ACCD	accD	-1.02	0.004
		Omega-3 fatty acid desaturase, chloroplastic	FAD3C_SESIN	FAD7	-0.96	0.007
		3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase II, chloroplastic	KASC2_ARATH	KAS2	-1	0.006
		Palmitoyl-[acyl-carrier-protein] 4-desaturase 3, chloroplastic	STAD3_OPHSP	SAD3	-0.63	0.004
	Galactolipids	Digalactosyldiacylglycerol synthase 1, chloroplastic	DGDG1_SOYBN	DGD1	-0.53	0.047
		Probable monogalactosyldiacylglycerol synthase, chloroplastic	MGDG_SOYBN	MGD A	-1.06	0.001
Glyoxylate cycle		Malate synthase, glyoxysomal (EP)	MASY_CUCSA		1.5	0.009
		Isocitrate lyase (EP)	ACEA_DENCR	ICL	3.79	0
Gluco-neogenesis		Fructose-1,6-bisphosphatase, cytosolic	F16P2_ORYCO		-1.89	0
		Phosphoenolpyruvate carboxykinase	PCKA_ARATH	PCKA	0.76	0.038
		Pyruvate, phosphate dikinase, chloroplastic	PPDK_MESCR	PPD	-1.52	0.001

Oxidative stress	Ascorbate glutathione cycle	Probable L-ascorbate peroxidase 4, peroxisomal	APX4_ORYSJ	APX4	-0.88	0.004
		Putative L-ascorbate peroxidase 6	APX6_ARATH	APX6	-0.61	0.028
		Glutathione reductase, chloroplastic	GSHRP_TOBAC	GOR	-0.67	0.013
		Putative glutathione peroxidase 7, chloroplastic	GPX7_ARATH	GPX7	-1.04	0.001
	Antioxydant enzymes	Superoxide dismutase [Fe] 2, chloroplastic (CD)	SODF2_ORYSJ		-0.63	0.012
		OXIDATIVE STRESS 3 (OXS3)?	NA	OXS3	2.33	0.004
		Peroxidase 73	PER73_ARATH	PER73	2.37	0.023
		Peroxiredoxin-2C	PRX2C_ORYSJ	PRXIIC	-0.96	0.013
		Peroxiredoxin-2E, chloroplastic	PRX2E_ARATH	PRXIIE	-0.97	0.004
		Peroxiredoxin Q, chloroplastic	PRXQ_POPJC	PRXQ	-1.52	0.001
Biotic stress		Chitinase 2	CHIT2_TULBA		1.07	0.017
		Pathogen-related protein	PRPX_HORVU		0.7	0.138
		Nematode resistance protein-like HSPRO2	HSPR2_ARATH	HSPRO2	2.13	0
		Protein HYPER-SENSITIVITY-RELATED 4	HSR4_ARATH	HSR4	2.37	0
		Polygalacturonase inhibitor 1	PGIP1_ARATH	PGIP1	1.74	0.004
		Putative disease resistance protein RGA4 (CD)	RGA4_SOLBU	RGA4	0.93	0.018
		Putative disease resistance protein RGA4	RGA4_SOLBU	RGA4	0.32	0.137
		Probable WRKY transcription factor 23	WRK23_ARATH	WRKY23	1	0.008
		Probable WRKY transcription factor 28	WRK28_ARATH	WRKY28	2.15	0.001
		Probable WRKY transcription factor 35	WRK35_ARATH	WRKY35	2.08	0.012
		Probable WRKY transcription factor 40	WRK40_ARATH	WRKY40	1.6	0.023
		Probable WRKY transcription factor 48	WRK48_ARATH	WRKY48	1.01	0.004
		Probable WRKY transcription factor 50	WRK50_ARATH	WRKY50	1.64	0.007
		Probable WRKY transcription factor 70	WRK70_ARATH	WRKY70	1.14	0.007
		Probable WRKY transcription factor 75	WRK75_ARATH	WRKY75	2.34	0.001
Senescence		Apoptosis-inducing factor homolog A	AIFA_DICDI	aifA	1.5	0.014
		Apoptosis-inducing factor homolog A	AIFA_DICDI	aifA	1.58	0.008
		Autophagy-related protein 11	ATG11_ARATH	ATG11	0.65	0.007
		Autophagy-related protein 13a	AT13A_ARATH	ATG13A	0.83	0.017
		Autophagy-related protein 18a	AT18A_ARATH	ATG18A	0.82	0.004
		Autophagy-related protein 2	ATG2_ARATH	ATG2	0.8	0.007
		NAC transcription factor 29	NAC29_ARATH	NAC029	2.78	0.003
		Programmed cell death protein 4	PDCD4_CHICK	PDCD4	1.68	0.001
		WRKY transcription factor 6	WRKY6_ARATH	WRKY6	1.41	0.001
Senescence inhibition		BES1/BZR1 homolog protein 4	BEH4_ARATH	BEH4	-0.56	0.009

Nucleic acids degradation		Endonuclease 2	ENDO2_ARATH	ENDO2	3.12	0.003
Protein degradation	Proteasome	E3 ubiquitin-protein ligase ATL6	ATL6_ARATH	ATL6	0.89	0.002
		E3 ubiquitin-protein ligase ATL6	ATL6_ARATH	ATL6	1.23	0.001
		BTB/POZ and TAZ domain-containing protein 1 (EP: not detected)	BT1_ARATH	BT1	3.03	0.001
		Proteasome activator subunit 4	PSME4_ARATH	PA200	1.11	0.001
		F-box protein PP2-A13 (EP)	P2A13_ARATH	PP2A13	0.89	0.018
		F-box protein SKP2A	SKP2A_ARATH	SKP2A	1	0.001
	Protease	Cysteine proteinase 2	CYSP2_MAIZE	CCP2	-0.77	0.039
		Protease Do-like 1, chloroplastic	DEGP1_ARATH	DEGP1	-0.72	0.005
		Protease Do-like 8, chloroplastic	DEGP8_ARATH	DEGP8	-1.05	0.004
		ATP-dependent zinc metalloprotease FTSH 11, chloroplastic/mitochondrial	FTSHB_ARATH	FTSH11	-0.86	0.004
		ATP-dependent zinc metalloprotease FTSH 2, chloroplastic	FTSH2_ARATH	FTSH2	-0.87	0.006
		Subtilisin-like protease SBT1.4	SBT14_ARATH	SBT1.4	-1.03	0.005
		Subtilisin-like protease SBT1.7	SBT17_ARATH	SBT1.7	-1.23	0.006
		Subtilisin-like protease SBT2.6	SBT26_ARATH	SBT2.6	-1.66	0.003
		Subtilisin-like protease SBT3.17 (CD)	SBT3H_ARATH	SBT3.17	-0.92	0.013
		Serine carboxypeptidase-like 27	SCP27_ARATH	SCPL27	-1.13	0.006
		Serine carboxypeptidase-like 34 (CD)	SCP34_ARATH	SCPL34	-1.62	0
		Serine carboxypeptidase-like 45	SCP45_ARATH	SCPL45	-0.82	0.009

[a] species displaying a different result are indicated in brackets (CD: *C. damasonium*, EH: *E. helleborine*, EP: *E. purpurata*). See Supplemental Table S2 for pair-specific responses.

[b] this plastidial isoform of BCAA aminotransferase is normally involved in biosynthetic processes, however, we failed to detect isoforms involved in the catabolic pathway, raising the possibility that reads from catabolic isoforms have been wrongly associated with biosynthetic isoforms.

Higher hexoses, amino acids and fatty acid degradation for energy production

Sucrose and fructose were far less abundant in albinos (resp. 6x and 10x, Figure 2, Supplemental Table 1), and, indeed, sucrose-phosphate synthase was repressed (*SPS*, Table 2), consistently with the absence of photosynthesis. Some other secondary carbohydrates showed a similar response (mannose, xylose, arabinose), whereas many did not change (glucose, ribose, rhamnose, xylulose, trehalose, maltose, lactose), including glucose-6P and fructose-6P (Figure 2, Supplemental Table S1). Sucrose degradation enzymes were induced in *C. damasonium* and *E. helleborine* (*IVR1*, *CINV1*, *CIN3*, *NIN1*) as well as transporters of sucrose and other sugars (*SUT1*, but *SUT2* was repressed, *SWEET2A*, *STP13*, *ERDL6_ARATH*, Table 2). Trehalase was highly induced in albinos

(*TRE_ORYSJ*; not detected in *E. purpurata*), suggesting an increase in trehalose degradation (Table 2). As for trehalose-6P, both synthesis and degradation enzymes were induced in albinos (*TPS5*, *TPS6*, *TPS9*, *TPP2*, but *TPP6* was repressed, Table 2), pointing to a possible role of this intermediate in albino metabolism.

Cytosolic glycolysis, oxidative pentose phosphate pathway (OPPP) and tricarboxylic acid cycle (TCA) were not evidently altered from gene expression or metabolic intermediate abundance, whereas many plastidial isoforms of glycolytic and OPPP enzymes were repressed (Supplemental Table S1).

Several genes involved in amino acid catabolism were induced in albino *C. damasonium* and *E. helleborine* (while *E. purpurata* was generally less affected; see Table 2), such as those involved in the degradation of glutamate (*GDH1*, but repressed in *E. purpurata*), proline (*POX2*), arginine (*OAT*), lysine (*LKR/SDH*), BCAA (*ODBA2_ARATH*, *ODBB1_ARATH*, *MCCA*, *MCCB*, *PED1*, *ACX3*) and tyrosine (*HPD*, *HGO*). Besides, some amino acid transporters were also induced in albinos (*BAT1*, *AAP7*, *CAT2*, *AATL1*, *PROT2_ORYSJ*), suggesting a higher reliance on import and subsequent degradation of amino acids for energy production (Table 2).

Several lipases were induced, suggesting a higher production of fatty acids from galactolipids (*PLP2*, *PLA14_ARATH*), triacylglycerols (*SDP1*, except in *E. purpurata*, *LIP_RHIMI*), monoacylglycerols and diacylglycerols (*MGLL_MYCTU*, Table 2). The main enzymes for fatty acid degradation were also more expressed in albinos (*LACS7*, *ACX3*, *MFPA_CUCSA*, *PED1*, Table 2). Curiously, peroxisomal malate dehydrogenase (*MDHG_CITLA*), which ensures NAD^+ regeneration for β-oxidation, was strongly repressed in albinos (Table 2). Moreover, enzymes involved in fatty acid biosynthesis, which occurs in part in plastids, were generally repressed in albinos (*ACCB*, *ACCD*, *KAS2*, *SAD3*, *STAD_ELAGV*, *FAD7*) as well as those synthesizing galactolipids (*MGDA*, *DGD1*) and cuticle compounds (*GPAT6*, *CUT1*, *FDH*, *CER26*, Table 2).

Activation of the glyoxylate cycle in albinos

Peroxisomal isocitrate lyase (*ICL*) and malate synthase (*MASY_CUCSA*), two key enzymes of the glyoxylate cycle, were highly induced in *C. damasonium* and *E. helleborine* albinos, while this was less clear for *E. purpurata* (Table 2). The glyoxylate cycle produces succinate from acetyl-CoA (e.g. issuing from lipid catabolism), which, after conversion to oxaloacetate in mitochondria, can enter gluconeogenesis in the cytosol. Although PEP carboxykinase (*PCKA*) expression was slightly induced, the other gluconeogenesis enzymes pyruvate orthophosphate dikinase (*PPD*) and fructose-1,6-bisphosphatase (*F16P2_ORYCO*) were markedly repressed, making it uncertain that organic acids produced by the glyoxylate cycle were further processed into sugars.

Different responses to stress in albinos and possible autophagy induction

Lower dehydroascorbate level, lower expression of ascorbate-glutathione cycle enzymes (*GOR*, *APX4*, *APX6*, *GPX7*) and other antioxidant enzymes (*PRXIIC*, *PRXIIE*, *PRXQ*, *SODF2_ORYSJ*) indicated reduced level of oxidative stress in albinos, although induction of some other antioxidant genes occurred (*PER73*, *OXS3*, Table 2).

No clear evidence of alteration in other abiotic stress responses (especially drought) was observed in albinos (Supplemental Table S2). However, many genes induced during defense against pathogens were more expressed (*CHIT2_TULBA*, *PGIP1*, *HSR4*, *HSPRO2*, *PRPX_HORVU*, *RGA4*, several *WRKY* transcription factors), suggesting a higher level of pest attacks against albinos (Table 2).

A number of autophagy and senescence-related genes were also induced in albinos (*ATG2*, *ATG11*, *ATG13A*, *ATG18A*, *NAC029*, *WRKY6*, *PDCD4*, *AIFA*) as well as one endonuclease (*ENDO2*) and some proteasome-related genes (*PA200*, *PP2A13*, *BT1*, *SKP2A*, *ATL6*, Table 2). Although other peptidases potentially active during autophagy were repressed (*CCP2*, several members of the *SBT*, *DEGP*, *FTSH* and *SCPL* families), increase in proteolysis level characterizes albinos.

Discussion

The occurrence and growth of albinos *in natura* within mixotrophic orchids suggests a specific metabolism in these species, as compared to normal autotrophic plants. To identify possible specific features, we studied the physiology of spontaneous albinos through their transcriptome and metabolome, across three species and eight populations. We observed numerous conserved responses to albinism across these species, but only a comparison with other cases of photosynthesis loss can provide clues about possible specific features of mixotrophic orchids.

Albinos' response to photosynthesis loss is similar to that of white parts of variegated leaves

Our results are in particular reminiscent of studies on variegated plants. Variegation is another model of natural, non-lethal achlorophylly where leaves exhibit achlorophyllous sectors interspersed with green, photosynthetic ones. Variegation also occurs in plants with a juxtaposition of white and green leaves or twigs. Achlorophyllous sectors in variegated plants survive thanks to surrounding functional photosynthetic areas, and allow comparison with mixotrophic albinos that survive on fungal resources. Transcriptomic and metabolomic studies of variegated *Arabidopsis thaliana* (Aluru et al., 2009) and *Pelargonium x hortorum* (Tcherkez et al., 2012; Abadie et al., 2016) reveal trends remarkably similar to our observations. Achlorophyllous sectors show lower sugar level, higher uptake and degradation of sucrose, no evident alteration of glycolysis and TCA cycle, lower nitrogen assimilation, strong induction of asparagine synthetase, higher level of free

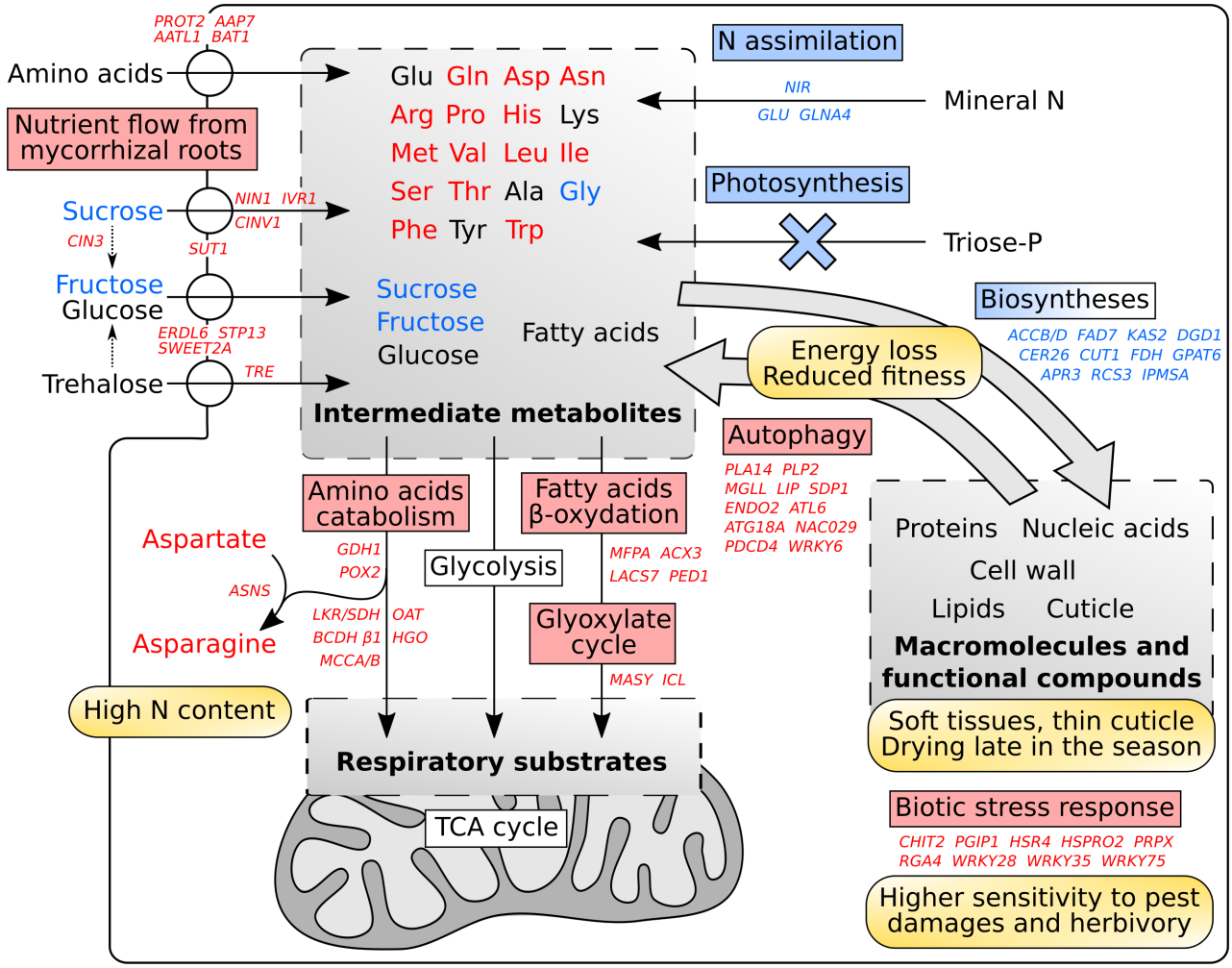


Figure 5. Summary of the metabolic changes triggered by albinism. Red (resp. blue) indicates higher (resp. lower) metabolite abundance or gene expression (Supplemental Table S1 and Table 2). Boxes indicate major molecular pathways that are induced (red), repressed (blue) or unaltered (white). Most of these changes are symptomatic of the carbon starvation response. Yellow rounded boxes draw links with phenotypic observations.

amino acids, higher (resp. lower) catabolism (resp. biosynthesis) of amino acids and fatty acids, induction of the glyoxylate cycle enzyme isocitrate lyase (Aluru et al., 2009, Tcherkez et al., 2012, Abadie et al., 2016). Variegated plants also show higher expression of genes involved in biotic stress: in albinos, higher herbivore pressure, expected from nitrogen enrichment and more conspicuous color, has indeed been documented together with higher fungal infection in albino *C. damasonium* (Roy et al., 2013).

A response to carbon starvation characterizes albino metabolism

Other metabolic changes strikingly parallel what occurs during the carbon starvation response, in a way also conserved in variegated plants (Figure 5). Some metabolic changes closely resemble

features of carbon-starving cells: increase in sugars and amino acid transporters (Contento et al., 2004; Buchanan-Wollaston et al., 2005), increase in sucrose-degrading enzymes (Buchanan-Wollaston et al., 2005; Beana-González et al., 2007), alteration of trehalose metabolism (Beana-González et al., 2007; Lunn et al., 2014; Garapati et al., 2015), increase in free amino acids (Brouquisse et al., 1998; Araújo et al., 2010; Hirota et al., 2018), induction of asparagine synthetase (Brouquisse et al., 1992; Beana-González et al., 2007), higher catabolism of amino acids (Contento et al., 2004; Beana-González et al., 2007; Araújo et al., 2010; Garapati et al., 2015; Hirota et al., 2018), induction of lipases (Buchanan-Wollaston et al., 2005; Beana-González et al., 2007), fatty acid β-oxidation enzymes (Pistelli et al., 1992; Beana-González et al., 2007), glyoxylate cycle enzymes (Pistelli et al., 1992; Chen et al., 2000; but not in Charlton et al., 2005), and higher expression (respectively repression) of autophagy-promoting (resp. inhibiting) genes (Garapati et al., 2015; Üstün et al., 2017; Hirota et al., 2018). Carbon-starved cells actively degrade their components, especially by enclosing them in autophagosomes addressed to the vacuole, where proteolysis releases amino acids as nutrients (Brouquisse et al., 1998; Diaz-Mendoza et al., 2016; Hirota et al., 2018). Although we detected no specific protease induction, an activation of autophagy-driven proteolysis in albinos would fit with the transcriptomic observations mentioned above as a consequence of the carbon starvation response.

The reduction in available sugars (especially sucrose and fructose) in albinos is likely to trigger cellular starvation, as would happen in a photosynthetic cell placed in the dark. Autophagy enables cell survival for up to several days, by releasing nutrients for energy production (Üstün et al., 2017), but if adverse conditions persist, carbon starvation ultimately leads to cell death. Albinos still receive enough nutrients from fungi to survive as long as purely autotrophic plants (Shefferson et al., 2016), and the sampled albinos displayed normal growth, without visible senescence. Yet, later in the growth season, many albino leaves and even some full shoots undergo a “drying” process (Roy et al., 2013) starting as local necrosis (see appendix B in Roy et al., 2013), which may arise from excessive autophagy.

Autophagy uses resources provided by the fungus that supported the early shoot growth in the spring (Roy et al., 2013; Gonneau et al., 2014), and it thus represents a delayed, indirect use of fungal resources. Continuous autophagy implies costly recycling of cellular components, and presumably harms or destroys structures vital for other cellular functions. This may enhance cell dysfunctions, especially late in the growth season where fungal colonization is at its lowest (Roy et al., 2013; Gonneau et al., 2014). Several observations of albinos support carbon limitation, because they sometimes display (i) lower size and flower number than green individuals (Salmia, 1989; Roy et al., 2013; Shefferson et al., 2016; but see Julou et al., 2005); (ii) less frequent shoot survival until seed production (Roy et al., 2013; Gonneau et al., 2014); (iii) reduced level of carbon-rich support tissues (Salmia, 1989) and a thinner cuticle (by ca. 2x; a trend congruent with our observations of lower expression of genes involved in biosynthesis of cuticle compounds; Roy et al., 2013); (iv) higher specific leaf area (4x lower leaf thickness, which may result from cell wall biosynthesis limitation and/or autolytic processes; Roy et al., 2013); and (v) a 3-4x reduction in basal

metabolism (as estimated from respiration in the dark; Julou et al., 2005; Roy et al., 2013).

Evolved as a way to cope with constraints on carbon supply, the starvation response ironically seems to act as a genetic burden in albinos, reducing their fitness. It furthermore hides any possible more subtle metabolic changes specific to mycoheterotrophy and makes challenging the determination of what is primarily used by albino cells.

Imported sugars and amino acids are major resources for albino leaves

Sugars, the main form of carbon transport in plants, likely fulfill large parts of albino carbon needs. Among them, sucrose is preferentially used in most plants, including orchids (Ng and Hew, 1996), and is thus expected to be transferred to albino sink tissues from mycorrhizal roots receiving fungal carbon. Whereas sucrose and fructose decreased in albino cells as a consequence of photosynthesis loss, glucose level remained unchanged, suggesting a specific compensatory flux independent of sucrose intake. In the absence of detected gluconeogenesis or any other glucose-producing pathway, glucose likely has an exogenous source. It could be transferred as such, or through complex sugars such as trehalose, whose level is not altered as compared to green individuals. However, the carbon starvation response blurs interpretations since it significantly alters trehalose metabolism: indeed, trehalose-6P (T6P) is a sensor of the cell's carbon status that mediates the starvation response and coordinates plant growth (Lunn et al., 2014; Garapati et al., 2015). Induction of both T6P synthesis and degradation enzymes (*TPS* and *TPP*) on the one hand, and trehalase on the other hand, may affect trehalose level by enabling interconversion of glucose and trehalose. It is therefore uncertain whether the inflow of carbohydrates into the leaf cells involves glucose or trehalose. Trehalose has nevertheless already been suggested as a form of sugar transported from fungi to orchids (Smith and Read, 2008) that can be assimilated in orchid leaves (Smith and Smith, 1973). Experimental testing (e.g. by fungal labeling) of long-distance sugar transport is needed to define the role of sugars in albinos better.

Albinos are dependent on external organic nitrogen, as supported by induction of amino acid transporters and repression of nitrogen assimilation. Fochi et al. (2017) recently showed that at the stage of mycoheterotrophic germination in the rhizoctonia-associated orchid *Serapias vomeracea*, organic nitrogen is transferred from rhizoctonias. N-rich amino acids such as arginine, lysine and histidine are probably exported from living fungal cells (Fochi et al., 2017). Although our albino orchids associate with non-rhizoctonia ectomycorrhizal fungi (e.g., Julou et al., 2005), a similar flow of organic nitrogen may occur so that leaves receive amino acids, either from fungi or following their processing in roots, as suggested by Suetsugu et al. (2017). Besides being a nitrogen source, amino acids also represent an energy source for albinos facing carbon limitation, since their carbon skeleton yields respiratory substrates (Araújo et al., 2011), while excessive nitrogen is diverted to N-rich storage molecules such as asparagine (Zrenner et al., 2006; Hildebrant et al., 2015). Among amino acids, lysine and BCAA degradation allow a particularly high energy yield by directly providing electrons to the mitochondrial electron transport chain during the oxidation of

their derivatives isovaleryl-CoA and hydroxyglutarate (Araújo et al., 2011; Hildebrant et al., 2015). Interestingly, lysine levels did not follow the general increase observed for other amino acids in albinos. Together with strong induction of the enzyme catalyzing the first step of lysine degradation, this supports major use of lysine as an energy source. A similar reasoning applies to BCAA, which is moderately accumulated in albinos as compared to other amino acids and whose degradation enzymes seem induced. We note that expression of the enzymes supplying electrons to the mitochondrial electron transport chain during lysine and BCAA catabolism showed no variation in albinos (*IVD_ORYSJ*, *D2HGDH*, *ETFA*, *ETFB*, *ETFQO_ORYSJ*, Supplemental Table 2), but this step may not be limiting.

Interestingly, in addition to sucrose, white parts of variegated *P.* x *hortorum* also receive amino acids from photosynthetic parts (Tcherkez et al., 2012; Abadie et al., 2016). This stresses the need for dedicated labeling experiments to clarify the nature of the transferred nitrogenous compounds in mixotrophic orchids. Amino acid uptake and catabolism, which are already important at mycoheterotrophic orchid germination (Fochi et al., 2017), may partly circumvent carbon limitation, and their use at adulthood may be crucial in the evolution of mycoheterotrophic orchids.

Evolutionary perspectives

Although usually lethal, albinism in mixotrophic orchids did not dramatically alter development and metabolism: (i) global change in transcriptome between albinos and greens was within the natural variability of gene expression for each phenotype among different sites (Supplemental Figure 1); (ii) induction of the carbon starvation response, a legacy from photosynthetic progenitors, explains most identified transcriptome changes; (iii) *E. purpurata*, whose lower chlorophyll content and isotopic content suggest higher fungal dependence (Schiebold et al., 2017) and thus lower dependence on photosynthesis, displayed no response for several starvation-induced genes (Table 2). Although we may have missed information for unknown genes, we observe no specific changes related to albinism. This parallels the investigations of Suetsugu et al. (2017) in albino roots. Thus, rather than major metabolic novelty, functional response to albinism relies on the existence of existing pathways and a suitable carbon source, namely the fungus that delivers sugars and amino acids, the latter especially helping to alleviate carbon starvation (Figure 5).

The absence of a major metabolic signature specific to albino orchids has to be considered in the framework of the mixotrophic status of these species, which inherently rely on fungal nutrients during early shoot development at least (Roy et al., 2013; Gonneau et al., 2014; Těšitel et al., 2018). Indeed, green individuals in mixotrophic species already handle restriction of photosynthesis during their vegetative growth, due to environmental conditions (Julou et al., 2005) or limited intrinsic photosynthetic abilities (Girlanda et al., 2006). However, fruits and seeds are more dependent on photosynthesis, especially from capsules and leaves (Bellino et al., 2014; Gonneau et al., 2014; Suetsugu et al., 2018; Těšitel et al., 2018), and make limited use of fungal nutrients, either for physiological reasons or because fungal mycorrhizal colonization reaches a minimum at fruiting

time (Roy et al., 2013; Gonneau et al., 2014).

Our results support an exaptation where nitrogen nutrition is used to get fungal carbon in mixotrophic orchids, in a way reminiscent of what happens at germination in rhizoctonia-associated autotrophic orchids (Fochi et al., 2017), as suggested in the "carbon hitchhiking" hypothesis of Selosse and Roy (2009). In this respect, mixotrophy would be a pedomorphosis, i.e. an evolutionary novelty extending to adulthood traits present at the juvenile stage in the ancestors and in the relatives. The shift in fungal partners in mixotrophs, from rhizoctonia partners to ectomycorrhizal fungi, may not reflect a different plant-fungal exchange, but simply result from other constraints such as a higher flow of resources (Merck et al., 2013b; Selosse and Martos, 2014).

Albinos fitness may be limited by the cost of a permanent starvation response and related autophagy. Any mutation impairing starvation stress sensing or autolytic processes would thus improve albinos fitness and favor speciation by way of albinism, as proposed earlier (Shefferson et al., 2016). Comparative genomic studies among Neottieae species would surely clarify the molecular bases of this evolution, since this lineage exhibits repeated independent shifts to mycoheterotrophy (Selosse and Roy, 2009; Feng et al., 2016). Lastly, replicating investigations on metabolic pathways involved in the nutrition of other partially or fully mycoheterotrophic lineages is crucial in future research.

Author Contributions

F.L., M.L.M.M., E.D. and M.A.S. conceived the research plan, experimental design and associated methodology; F.L. carried out field sampling; F.L., F.G., A.L.A. and E.D. performed the experiments; E.D. conducted transcriptomic data curation; F.L., M.L.M.M., F.G. and E.D. analyzed the data; F.L. wrote the original draft; M.L.M.M., F.G., B.G., E.D. and M.A.S reviewed and edited the paper; E.D. and M.A.S. supervised the research; M.A.S. obtained funding for the experiments.

Acknowledgments

We warmly thank the numerous field orchidologists who helped collect the data, especially the Société Française d'Orchidophilie, Tela Botanica and the ophrys.bbactif community for field surveys, and Florent Baume, Laurence Blanchard, Joël Cottin, Adrien Chateignier, Jean-François Christians, Christiane Chynel, Alain Falvard, André Hasenfratz, Henri Mathé, Jean-Marc Moingeon, Franck Ramon, and Eva Schaller for field work. This study benefited from the financial support of the Fondation de France (Fondation Ars Cuttoli, granted to M.-A. Selosse) and the LabEx Saclay Plant Sciences-SPS (ANR-10-LABX-0040-SPS, granted to the IPS2).

References

Abadie, J.-C., Püttsepp, Ü., Gebauer, G., Faccio, A., Bonfante, P., and Selosse, M.-A. (2006). *Cephalanthera longifolia* (Neottieae, Orchidaceae) is mixotrophic: a comparative study between green and nonphotosynthetic individuals. Can. J. Bot. **84**:1462–1477.

Abadie, C., Lamothe-Sibold, M., Gilard, F., and Tcherkez, G. (2016). Isotopic evidence for nitrogen exchange between autotrophic and heterotrophic tissues in variegated leaves. Funct. Plant. Biol. **43**:298–306.

Aluru, M. R., Zola, J., Foudree, A., and Rodermel, S. R. (2009). Chloroplast photooxidation-induced transcriptome reprogramming in Arabidopsis immutans white leaf sectors. Plant Physiol. **150**:904–923.

Araújo, W. L., Ishizaki, K., Nunes-Nesi, A., Larson, T. R., Tohge, T., Krahnert, I., Witt, S., Obata, T., Schauer, N., Graham, I. A., et al. (2010). Identification of the 2-hydroxyglutarate and isovaleryl-CoA dehydrogenases as alternative electron donors linking lysine catabolism to the electron transport chain of arabidopsis mitochondria. Plant Cell **22**:1549–1563.

Araújo, W. L., Tohge, T., Ishizaki, K., Leaver, C. J., and Fernie, A. R. (2011). Protein degradation – an alternative respiratory substrate for stressed plants. Trends Plant Sci. **16**:489–498.

Baena-González, E., Rolland, F., Thevelein, J. M., and Sheen, J. (2007). A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. Nature **448**:938–942.

Bellino, A., Alfani, A., Selosse, M.-A., Guerrieri, R., Borghetti, M., and Baldantoni, D. (2014). Nutritional regulation in mixotrophic plants: new insights from *Limodorum abortivum*. Oecologia **175**:875–885.

Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. J. R. Stat. Soc. B **57**:289–300.

Bidartondo, M. I., Burghardt, B., Gebauer, G., Bruns, T. D., and Read, D. J. (2004). Changing partners in the dark: isotopic and molecular evidence of ectomycorrhizal liaisons between forest orchids and trees. Proc. Royal Soc. B **271**:1799–1806.

Bolger, A. M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics **30**:2114–2120.

Brouquisse, R., James, F., Pradet, A., and Raymond, P. (1992). Asparagine metabolism and nitrogen distribution during protein degradation in sugar-starved maize root tips. Planta **188**:384–395.

Brouquisse, R., Gaudillère, J.-P., and Raymond, P. (1998). Induction of a carbon-starvation-related proteolysis in whole maize plants submitted to light/dark cycles and to extended darkness. Plant Physiol. **117**:1281–1291.

Buchanan-Wollaston, V., Page, T., Harrison, E., Breeze, E., Lim, P. O., Nam, H. G., Lin, J.-F., Wu, S.-H., Swidzinski, J., Ishizaki, K., et al. (2005). Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in Arabidopsis. Plant J. **42**:567–585.

Charlton, W. L., Johnson, B., Graham, I. A., and Baker, A. (2005). Non-coordinate expression of peroxisome biogenesis, β-oxidation and glyoxylate cycle genes in mature Arabidopsis plants. Plant Cell Rep. **23**:647–653.

Chen, Z.-H., Walker, R. P., Acheson, R. M., Técsi, L. I., Wingler, A., Lea, P. J., and Leegood, R. C. (2000). Are isocitrate lyase and phosphoenolpyruvate carboxykinase involved in gluconeogenesis during senescence of barley leaves and cucumber cotyledons? Plant Cell Physiol. **41**:960–967.

Contento, A. L., Kim, S.-J., and Bassham, D. C. (2004). Transcriptome profiling of the response of Arabidopsis suspension culture cells to suc starvation. Plant Physiol. **135**:2330–2347.

Dearnaley, J. D. W., Martos, F., and Selosse, M.-A. (2012). Orchid mycorrhizas: molecular ecology, physiology, evolution and conservation aspects. In Fungal Associations, B. Hock, ed. (Springer, Berlin, Heidelberg), pp. 207–230.

Dearnaley, J., Perotto, S., and Selosse, M.-A. (2016). Structure and development of orchid mycorrhizas. In Molecular Mycorrhizal Symbiosis,

F. Martin, ed. (Wiley-Blackwell), pp. 63–86.

Diaz-Mendoza, M., Velasco-Arroyo, B., Santamaria, M. E., González-Melendi, P., Martinez, M., and Diaz, I. (2016). Plant senescence and proteolysis: two processes with one destiny. Genet. Mol. Biol. **39**:329–338.

Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., and Gingeras, T. R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. Bioinformatics **29**:15–21.

Emms, D. M., and Kelly, S. (2015). OrthoFinder: solving fundamental biases in whole genome comparisons dramatically improves orthogroup inference accuracy. Genome Biol. **16**:157.

Feng, Y.-L., Wicke, S., Li, J.-W., Han, Y., Lin, C.-S., Li, D.-Z., Zhou, T.-T., Huang, W.-C., Huang, L.-Q., and Jin, X.-H. (2016). Lineage-specific reductions of plastid genomes in an orchid tribe with partially and fully mycoheterotrophic species. Genome Biol. Evol. **8**:2164–2175.

Fiehn, O. (2006). Metabolite profiling in Arabidopsis. In Arabidopsis Protocols, J. Salinas, and J.J. Sanchez-Serrano, eds. (Humana Press), pp. 439–447.

Fiehn, O., Wohlgemuth, G., Scholz, M., Kind, T., Lee, D. Y., Lu, Y., Moon, S., and Nikolau, B. (2008). Quality control for plant metabolomics: reporting MSI-compliant studies. Plant J. **53**:691–704.

Fochi, V., Chitarra, W., Kohler, A., Voyron, S., Singan, V. R., Lindquist, E. A., Barry, K. W., Girlanda, M., Grigoriev, I. V., Martin, F., et al. (2017). Fungal and plant gene expression in the *Tulasnella calospora–Serapias vomeracea* symbiosis provides clues about nitrogen pathways in orchid mycorrhizas. New Phytol. **213**:365–379.

Garapati, P., Feil, R., Lunn, J. E., Van Dijck, P., Balazadeh, S., and Mueller-Roeber, B. (2015). Transcription factor Arabidopsis Activating Factor1 integrates carbon starvation responses with trehalose metabolism. Plant Physiol. **169**:379–390.

Girlanda, M., Selosse, M.-A., Cafasso, D., Brilli, F., Delfine, S., Fabbian, R., Ghignone, S., Pinelli, P., Segreto, R., Loreto, F., et al. (2006). Inefficient photosynthesis in the Mediterranean orchid *Limodorum abortivum* is mirrored by specific association to ectomycorrhizal Russulaceae. Mol. Ecol. **15**:491–504.

Gonneau, C., Jersáková, J., de Tredern, E., Till-Bottraud, I., Saarinen, K., Sauve, M., Roy, M., Hájek, T., and Selosse, M.-A. (2014). Photosynthesis in perennial mixotrophic *Epipactis* spp. (Orchidaceae) contributes more to shoot and fruit biomass than to hypogeous survival. J. Ecol. **102**:1183–1194.

Haas, B. J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P. D., Bowden, J., Couger, M. B., Eccles, D., Li, B., Lieber, M., et al. (2013). *De novo* transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. Nat. Protoc. **8**:1494–1512.

Hildebrandt, T. M., Nunes Nesi, A., Araújo, W. L., and Braun, H.-P. (2015). Amino acid catabolism in plants. Mol. Plant **8**:1563–1579.

Hirota, T., Izumi, M., Wada, S., Makino, A., and Ishida, H. (2018). Vacuolar protein degradation via autophagy provides substrates to amino acid catabolic pathways as an adaptive response to sugar starvation in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol. **59**:1363–1376.

Husson, F., Lê, S., and Pagès, J. (2010). Exploratory Multivariate Analysis by Example Using R, (Chapman & Hall).

Hynson, N. A., Madsen, T. P., Selosse, M.-A., Adam, I. K. U., Ogura-Tsujita, Y., Roy, M., and Gebauer, G. (2013). The physiological ecology of mycoheterotrophy. In Mycoheterotrophy: The Biology of Plants Living on Fungi, V. S. F. T. Merckx, ed. (Springer, New York), pp. 297–342.

Julou, T., Burghardt, B., Gebauer, G., Berveiller, D., Damesin, C., and Selosse, M.-A. (2005). Mixotrophy in orchids: insights from a comparative study of green individuals and nonphotosynthetic individuals of *Cephalanthera damasonium*. New Phytol. **166**:639–653.

Lallemand, F., Püttsepp, Ü., Lang, M., Luud, A., Courty, P.-E., Palancade, C., and Selosse, M.-A. (2017). Mixotrophy in Pyroleae (Ericaceae) from Estonian boreal forests does not vary with light or tissue age. Ann. Bot. **120**:361–371.

Lewis, L. (2015). Some observations on the nomenclature of achlorophyllous forms of *Epipactis purpurata E. helleborine* and *E. dunensis*. J. Eur.

Orchid. **47**:111–122.

Liao, Y., Smyth, G. K., and Shi, W. (2014). featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. Bioinformatics **30**:923–930.

Lunn, J. E., Delorge, I., Figueroa, C. M., Dijck, P. V., and Stitt, M. (2014). Trehalose metabolism in plants. Plant J. **79**:544–567.

Merckx, V. S. F. T. (2013). Mycoheterotrophy: an introduction. In Mycoheterotrophy: The Biology of Plants Living on Fungi, V. S. F. T. Merckx, ed. (Springer, New York), pp. 1–17.

Merckx, V. S. F. T., Freudenstein, J. V., Kissling, J., Christenhusz, M. J. M., Stotler, R. E., Crandall-Stotler, B., Wickett, N., Rudall, P. J., Kamer, H. M. de, and Maas, P. J. M. (2013a). Taxonomy and classification. In Mycoheterotrophy: The Biology of Plants Living on Fungi, V. S. F. T. Merckx, ed. (Springer, New York), pp. 19–101.

Merckx, V. S. F. T., Mennes, C. B., Peay, K. G., and Geml, J. (2013b). Evolution and diversification. In Mycoheterotrophy: The Biology of Plants Living on Fungi, V. S. F. T. Merckx, ed. (Springer, New York), pp. 215–244.

Nakasugi, K., Crowhurst, R., Bally, J., and Waterhouse, P. (2014). Combining transcriptome assemblies from multiple *de novo* assemblers in the allo-tetraploid plant *Nicotiana benthamiana*. PLOS ONE **9**:e91776.

Ng, C. K. Y., and Hew, C. S. (1996). Pathway of phloem loading in the C3 tropical orchid hybrid *Oncidium* Goldiana. J. Exp. Bot. **47**:1935–1939.

Pao, S. S., Paulsen, I. T., and Saier, M. H. (1998). Major Facilitator Superfamily. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **62**:1–34.

Pistelli, L., Perata, P., and Alpi, A. (1992). Effect of leaf senescence on glyoxylate cycle enzyme activities. Funct. Plant Biol. **19**:723–729.

Preiss, K., Adam, I. K. U., and Gebauer, G. (2010). Irradiance governs exploitation of fungi: fine-tuning of carbon gain by two partially myco-heterotrophic orchids. Proc. Royal. Soc. B **277**:1333–1336.

R Core Team (2018). R: A Language and Environment for Statistical Computing.

Rau, A., and Maugis-Rabusseau, C. (2018). Transformation and model choice for RNA-seq co-expression analysis. Brief. Bioinform. **19**:425–436.

Rigaill, G., Balzergue, S., Brunaud, V., Blondet, E., Rau, A., Rogier, O., Caius, J., Maugis-Rabusseau, C., Soubigou-Taconnat, L., Aubourg, S., et al. (2018). Synthetic data sets for the identification of key ingredients for RNA-seq differential analysis. Brief. Bioinform. **19**:65–76.

Roberts, W. R., and Roalson, E. H. (2017). Comparative transcriptome analyses of flower development in four species of *Achimenes* (Gesneriaceae). BMC Genomics **18**:240.

Robinson, M. D., McCarthy, D. J., and Smyth, G. K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. Bioinformatics **26**:139–140.

Roy, M., Gonneau, C., Rocheteau, A., Berveiller, D., Thomas, J.-C., Damesin, C., and Selosse, M.-A. (2013). Why do mixotrophic plants stay green? A comparison between green and achlorophyllous orchid individuals in situ. Ecol. Monogr. **83**:95–117.

Sakamoto, Y., Ogura-Tsujita, Y., Ito, K., Suetsugu, K., Yokoyama, J., Yamazaki, J., Yukawa, T., and Maki, M. (2016). The tiny-leaved orchid *Cephalanthera subaphylla* obtains most of its carbon via mycoheterotrophy. J. Plant Res. **129**:1013–1020.

Salmia, A. (1989). General morphology and anatomy of chlorophyll-free and green forms of *Epipactis helleborine* (Orchidaceae). Ann. Bot. Fennici **26**:95–105.

Schiebold, J. M.-I., Bidartondo, M. I., Karasch, P., Gravendeel, B., and Gebauer, G. (2017). You are what you get from your fungi: nitrogen stable isotope patterns in *Epipactis* species. Ann. Bot. **119**:1085–1095.

Schulz, M. H., Zerbino, D. R., Vingron, M., and Birney, E. (2012). Oases: robust *de novo* RNA-seq assembly across the dynamic range of expression levels. Bioinformatics **28**:1086–1092.

Selosse, M.-A., and Martos, F. (2014). Do chlorophyllous orchids heterotrophically use mycorrhizal fungal carbon? Trends Plant Sci. **19**:683–685.

Selosse, M.-A., and Roy, M. (2009). Green plants that feed on fungi: facts and questions about mixotrophy. Trends Plant Sci. **14**:64–70.

Selosse, M.-A., Faccio, A., Scappaticci, G., and Bonfante, P. (2004). Chlorophyllous and achlorophyllous specimens of *Epipactis microphylla* (Neottieae, Orchidaceae) are associated with ectomycorrhizal septomycetes, including truffles. Microb. Ecol. **47**:416–426.

Selosse, M.-A., Charpin, M., and Not, F. (2017). Mixotrophy everywhere on land and in water: the grand écart hypothesis. Ecol. Lett. **20**:246–263.

Shefferson, R. P., Roy, M., Püttsepp, Ü., and Selosse, M.-A. (2016). Demographic shifts related to mycoheterotrophy and their fitness impacts in two *Cephalanthera* species. Ecology **97**:1452–1462.

Smith, S. E., and Read, D. J. (2008). Mycorrhizal Symbiosis, (London: Academic Press).

Smith, S. E., and Smith, F. A. (1973). Uptake of glucose, trehalose and mannitol by leaf slices of the orchid *Bletilla hyacinthina*. New Phytol. **72**:957–964.

Smyth, G. K. (2004). Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. Stat. Appl. Genet. Mol. Biol. **3**:Article3.

Suetsugu, K., Yamato, M., Miura, C., Yamaguchi, K., Takahashi, K., Ida, Y., Shigenobu, S., and Kaminaka, H. (2017). Comparison of green and albino individuals of the partially mycoheterotrophic orchid *Epipactis helleborine* on molecular identities of mycorrhizal fungi, nutritional modes and gene expression in mycorrhizal roots. Mol. Ecol. **26**:1652–1669.

Suetsugu, K., Ohta, T., and Tayasu, I. (2018). Partial mycoheterotrophy in the leafless orchid *Cymbidium macrorhizon*. Am. J. Bot. **105**:1–6.

Tcherkez, G., Guérard, F., Gilard, F., Lamothe, M., Mauve, C., Gout, E., and Bligny, R. (2012). Metabolomic characterisation of the functional division of nitrogen metabolism in variegated leaves. Funct. Plant Biol. **39**:959–967.

Těšitel, J., Těšitelová, T., Minasiewicz, J., and Selosse, M.-A. (2018). Mixotrophy in land plants: why to stay green? Trends Plant Sci. **23**:656-659.

Thimm, O., Bläsing, O., Gibon, Y., Nagel, A., Meyer, S., Krüger, P., Selbig, J., Müller, L. A., Rhee, S. Y., and Stitt, M. (2004). mapman: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. Plant J. **37**:914–939.

Tranchida-Lombardo, V., Roy, M., Bugot, E., Santoro, G., Püttsepp, Ü., Selosse, M., and Cozzolino, S. (2010). Spatial repartition and genetic relationship of green and albino individuals in mixed populations of *Cephalanthera* orchids. Plant Biol. **12**:659–667.

Üstün, S., Hafrén, A., and Hofius, D. (2017). Autophagy as a mediator of life and death in plants. Curr. Opin. Plant Biol. **40**:122–130.

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

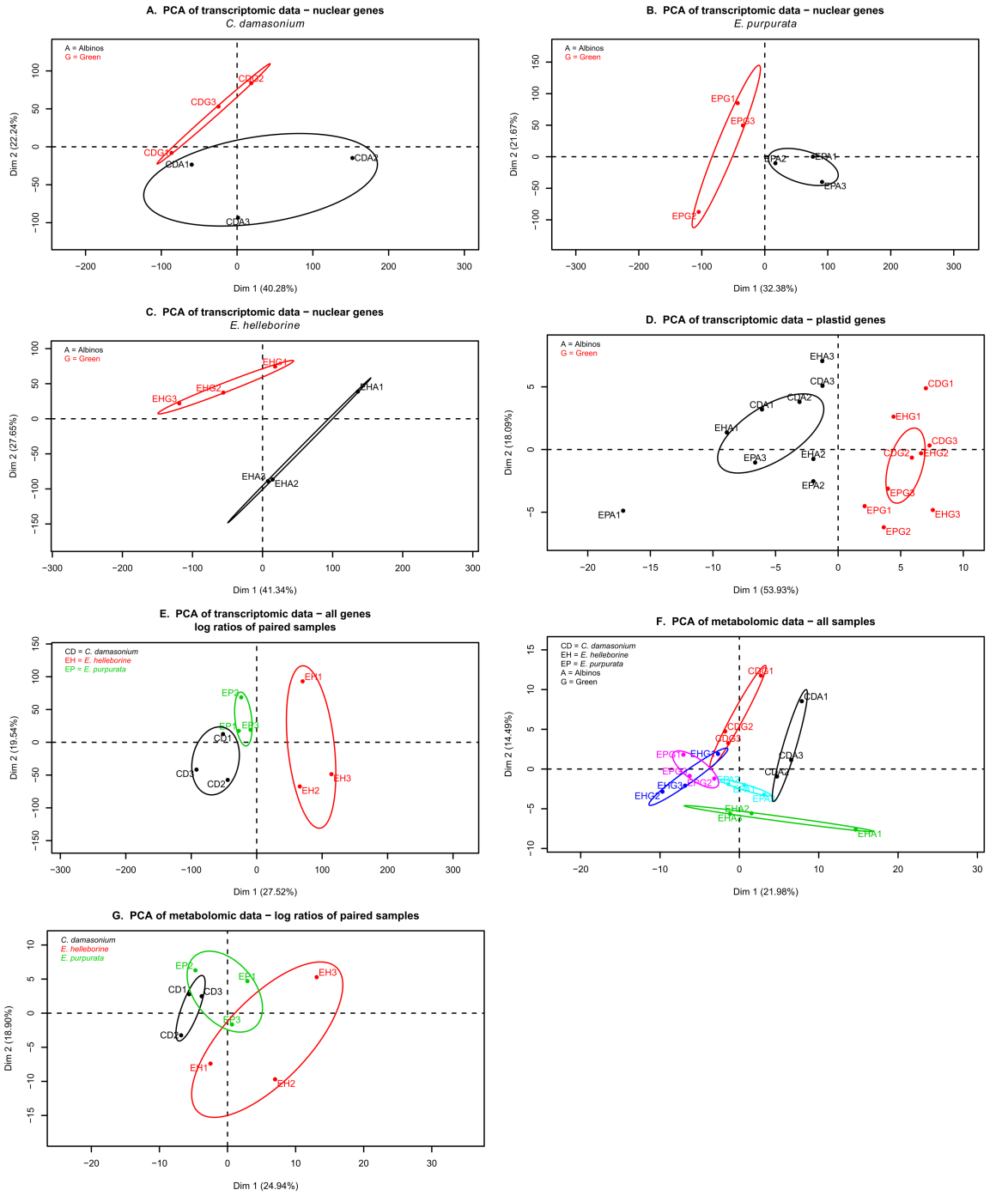
Waterhouse, R. M., Seppey, M., Simão, F. A., Manni, M., Ioannidis, P., Klioutchnikov, G., Kriventseva, E. V., and Zdobnov, E. M. (2018). BUSCO applications from quality assessments to gene prediction and phylogenomics. Mol. Biol. Evol. **35**:543–548.

Waterman, R. J., Klooster, M. R., Hentrich, H., and Bidartondo, M. I. (2013). Species interactions of mycoheterotrophic plants: specialization and its potential consequences. In Mycoheterotrophy: The Biology of Plants Living on Fungi, V. S. F. T. Merckx, ed. (Springer, New York), pp. 267–296.

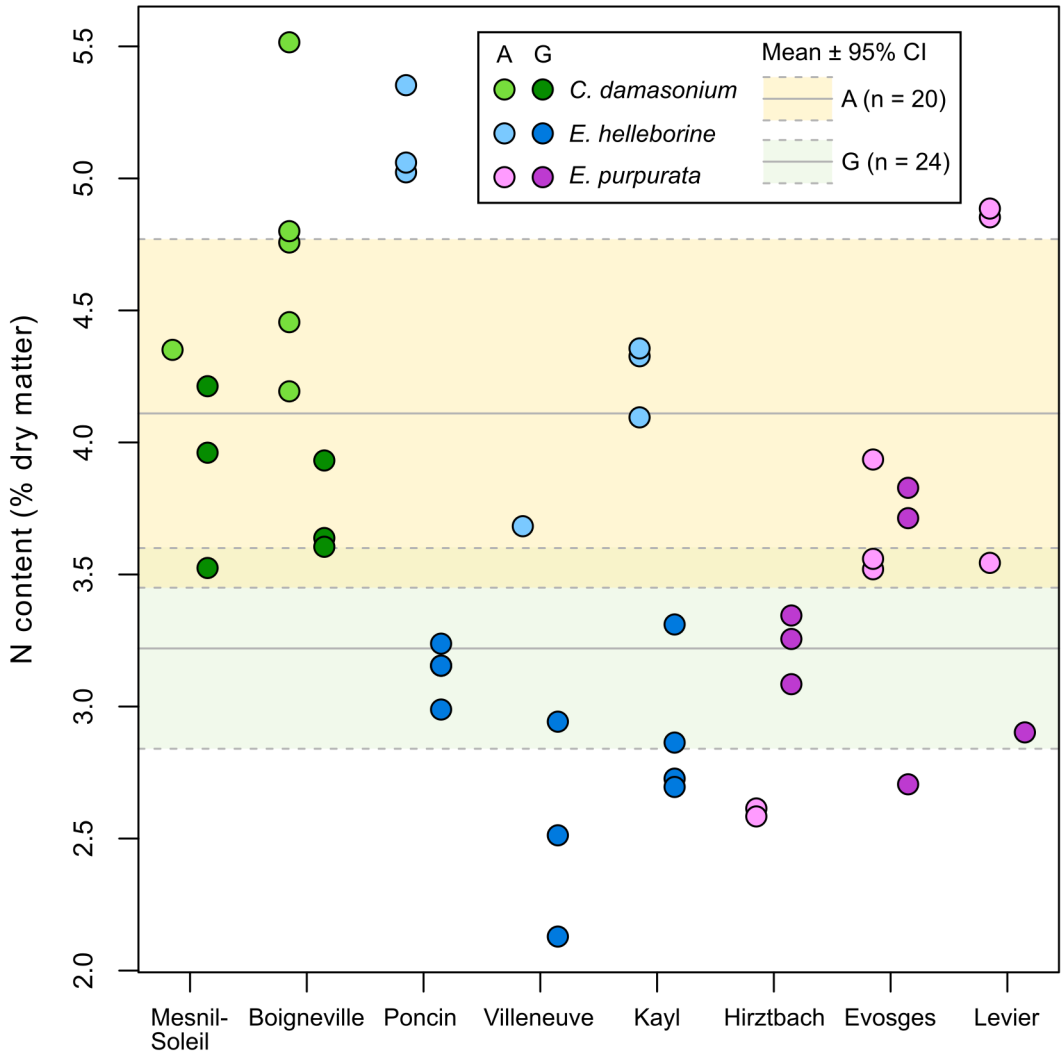
Zrenner, R., Stitt, M., Sonnewald, U., and Boldt, R. (2006). Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants. Annu. Rev. Plant Biol. **57**:805–836.

Supplemental Information

Supplemental Figure S1: Principal component analyses (PCA) of transcriptomic (A-E) and metabolomic (F-G) data. (A-C) normalized nuclear gene counts for each species studied. (D) normalized plastidial gene counts for all samples. (E) normalized count log ratios of all genes for the nine albino/green pairs. (F) metabolite abundance for all samples. (G) metabolite abundance for paired samples. When suitable, samples of a given species with the same number are from the same pair (see Table 1 for correspondence with sampling sites).



Supplemental Figure S2: Nitrogen content of albino (A, pale colors) or green (G, deep colors) leaves of the different individuals sampled in the studied sites. Colors indicate species. Mean values ± 95% confidence intervals are shown with pale boxes.



Supplemental Table S1: List of all metabolites detected by GC-MS analysis and corresponding changes between albino and green individuals (mean log2 ratio of the nine albino/green pairs studied). When positive (resp. negative), metabolites are more (less) abundant in albino leaves. Some compounds of the primary metabolism, which remained undetected, are indicated.

Metabolite	log2 ratio	FDR
1-hexadecanol	-0.12	0.571
1,3-bisphosphoglyceric acid	not detected	
1,3-diaminopropane	-1.08	0.052
1,3-dihydroxyacetone	-0.68	0.363
1,3-dihydroxyacetone-phosphate	not detected	
1,6-anhydro-glucose	-0.04	0.898
2-hydroxypyridine	-0.76	0.023
2-isopropylmalic acid	0.97	0.109
2,3-butanediol	-0.71	0.027
2,3-dihydroxypyridine	-0.51	0.227
3-hydroxy-3-methylglutaric acid	1.50	0.026
3-methylcatechol	0.39	0.112
3-phosphoglycerate	-0.33	0.736
3,4 dihydroxyphenylalanine (DOPA)	0.42	0.488
4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid	-0.45	0.069
4-hydroxy-3-methoxybenzyl alcohol	0.78	0.111
4-hydroxybenzaldehyde	0.54	0.193
4-hydroxybenzoic acid	0.54	0.193
4-hydroxycinnamic acid	-0.67	0.081
4-hydroxypyridine	-0.36	0.026
4-hydroxyquinoline-2-carboxylic	-0.70	0.248
6-hydroxynicotinic acid	1.59	0.035
acetohydroxamic acid	-0.49	0.394
acetyl-L-serine 1	-0.68	0.329
acetyl-L-serine 2	0.33	0.703
allantoin 1	3.76	0.021
allantoin 3	4.98	0.004
alpha ketoglutaric acid	-0.08	0.927
alpha tocophereol	-0.69	0.114
arabinose	-2.07	0.047
arbutin	0.67	0.248
aspartic acid 1	1.19	0.018

aspartic acid 2	2.19	0.019
benzoic acid	0.15	0.219
beta-alanine	0.76	0.215
beta-cyano-L-alanine	4.33	0.017
beta-gentiobiose	-0.81	0.052
beta-glycerolphosphate	-0.27	0.562
beta-hydroxyisovalerate	1.25	0.015
beta-sitosterol	0.35	0.287
biuret	-0.18	0.818
caffeic acid	-0.54	0.372
cis-aconitic acid	3.26	0.015
citramalic acid	-0.70	0.219
citric acid	1.70	0.047
citrulline	1.38	0.026
cysteine	not detected	
D-(+) trehalose	0.28	0.384
D-glucose 1	-0.71	0.192
D-glucose 2	-0.38	0.287
D-glucose-6-phosphate 1	0.40	0.637
D-glucose-6-phosphate 2	0.27	0.736
D-mannitol	0.81	0.352
D-mannose	-2.84	0.041
D-threitol	0.90	0.157
dehydroascorbic acid	-1.67	0.012
dioctyl phthalate	-0.02	0.966
DL-isoleucine	2.06	0.044
ethanolamine	-0.17	0.783
ferulic acid	-0.87	0.062
fructose 1	-3.17	0.019
fructose 2	-3.50	0.019
fructose-1,6-bisphosphate	not detected	
fructose-6P	0.33	0.637
fumaric acid	-0.38	0.345
galactonic acid	0.52	0.372
galacturonic acid 1	-0.45	0.081
galacturonic acid 2	-0.70	0.329
gamma-aminobutyric acid (GABA)	1.39	0.026
gluconic acid	0.92	0.249

Glyceraldehyde-3-phosphate	not detected	
glyceric acid	-5.04	0.010
glycerol	0.05	0.866
glycerol 1-phosphate	-0.20	0.531
glycine	-1.28	0.021
glycolic acid	-0.53	0.017
glycylproline	0.47	0.287
glyoxylic acid	-4.13	0.003
hexanoic acid	-0.03	0.759
isocitrate	not detected	
itaconic acid	0.54	0.125
L-(+) lactic acid	0.22	0.578
L-alanine	0.95	0.070
L-arginine	3.14	0.035
L-ascorbic acid	-0.57	0.150
L-asparagine	4.59	0.017
L-cystine	2.08	0.114
L-glutamic acid 2	0.86	0.103
L-glutamic acid 3 (dehydrated)	0.69	0.017
L-glutamine 1	0.82	0.252
L-glutamine 2	2.33	0.030
L-glutamine 3	1.44	0.047
L-histidine	4.03	0.028
L-homoserine	1.52	0.018
L-leucine	2.23	0.017
L-lysine	0.44	0.488
L-malic acid	-1.50	0.143
L-methionine	3.63	0.012
L-methionine sulfoxide	0.36	0.378
L-mimosine	0.66	0.025
L-proline	2.22	0.012
L-serine 1	1.09	0.062
L-serine 2	2.93	0.017
L-threonine 1	0.73	0.193
L-threonine 2	2.87	0.015
L-tryptophan	3.50	0.012
L-tyrosine 1	0.79	0.354
L-tyrosine 2	1.01	0.114

L-valine	1.99	0.015
lactose	-0.49	0.411
laricitrin	0.36	0.455
lauric acid	0.11	0.678
levoglucosan	-1.74	0.161
linoleic acid	-0.20	0.578
maleic acid	-0.70	0.092
malonic acid	0.51	0.103
maltose	-0.20	0.465
mucic acid	1.56	0.047
myo-inositol	-1.39	0.022
N-acetyl-D-glucosamine	-0.61	0.287
N-methylglutamic acid 1	0.38	0.366
N-methylglutamic acid 2	1.82	0.035
neohesperidin	0.37	0.345
nicotinic acid	-0.56	0.036
norvaline	1.86	0.015
O-phosphocolamine	0.81	0.261
orcinol	0.97	0.111
oxaloacetic acid	not detected	
p-cresol	-0.03	0.866
palmitic acid	0.25	0.329
phenylalanine 1	0.11	0.866
phenylalanine 2	2.06	0.047
phosphoenolpyruvic acid	-0.39	0.503
phosphoric acid	2.48	0.035
phytosphingosine	-0.07	0.856
pipecolic acid 1	0.67	0.465
pipecolic acid 2	1.72	0.157
putrescine	-3.37	0.015
pyruvic acid	-0.02	0.736
quinic acid	-0.04	0.866
rhamnose	-0.07	0.878
ribose	0.41	0.307
shikimic acid	-2.62	0.013
sinapinic acid	-0.29	0.678
stigmasterol	0.10	0.736
suberic acid	1.22	0.252

succinic acid	1.13	0.064
succinyl-CoA	not detected	
sucrose	-2.67	0.038
tartaric acid	0.76	0.125
threonic acid	-1.58	0.047
threonic acid-1,4-lactone B	-2.74	0.007
trans-3-hexenedioic acid	0.78	0.210
trans-3-hydroxy-L-proline	2.50	0.015
trans-4-hydroxy-L-proline	0.77	0.017
triethanolamine	1.74	0.018
trigonelline	-0.86	0.148
uracil	0.94	0.193
urea	1.36	0.096
uric acid	0.53	0.642
xanthotoxin	0.37	0.260
xylitol	0.40	0.534
xylose	-2.34	0.026
xylulose	-0.08	0.803

Supplemental Table S2: List of all orthogroups (OG) obtained in this work with corresponding fold changes of expression in the nine albino/green pairs (log2 ratio), mean fold changes and FDR. Best blastP hit is shown as well as compound names, gene names and enzyme commission (EC) numbers retrieved from the UniProt database. Reference genes from *A. thaliana*, *O. sativa* and *P. equestris* used during orthology analysis are indicated. OG called ATCGxxxxx are genes from *A. thaliana* plastidial genome.

This table is too large to be included in this PhD thesis manuscript, it is however available upon request.

ARTICLE III

Mixotrophy in Pyroleae (Ericaceae) from Estonian boreal forests does not vary with light or tissue age

AVANT-PROPOS

Avec ces travaux nous élargissons notre champ d'étude de la mycohétérotrophie en nous interrogeant sur son fonctionnement dans une autre famille d'Angiospermes : les éricacées. Nous nous sommes intéressés en particulier aux facteurs influençant le degré d'hétérotrophie chez des éricacées mixotrophes appartenant à la lignée des Pyroleae, seul groupe de la famille dans lequel de telles espèces ont été décrites. Nous avons mesuré les teneurs isotopiques de plusieurs espèces dans des environnements aux conditions lumineuses contrastées et pour des feuilles d'âges différents.

Contrairement à ce qui a été décrit pour les orchidées mixotrophes, nous n'avons pas observé chez les Pyroleae de variations du degré d'hétérotrophie avec la disponibilité en lumière ou avec le stade de développement. Ces résultats inattendus – au vu des signatures isotopiques semblables des orchidées et des Pyroleae mixotrophes – suggèrent un rôle physiologique moindre du carbone fongique chez les Pyroleae. Une interprétation possible est de considérer que ces espèces fournissent une quantité importante de carbone à leurs champignons mycorhiziens, davantage que ce qu'elles reçoivent et qui se traduit dans leur teneurs isotopiques. Le flux *net* de carbone serait donc nul ou au bénéfice des champignons, si bien que ces plantes se comporteraient *in fine* comme des autotrophes et réagiraient comme eux aux paramètres mentionnés. L'importance de ces résultats est double : (i) ils apportent des éléments de discussion sur la pertinence des outils isotopiques dans l'étude de la mixotrophie et (ii) ils permettent d'envisager une nouvelle forme d'échanges mycorhiziens qui préfigurent une véritable mixotrophie.

Cet article a été publié dans la revue *Annals of Botany* au mois de mai 2017.

Le matériel utilisé pour cette étude a été récolté avant le début de ma thèse. J'ai réalisé l'analyse isotopique de ces échantillons et l'analyse générale des données, une partie ayant été faite au cours du stage de M2 précédant le début de mon doctorat. Nos collaborateurs estoniens ont réalisé les traitements d'images permettant d'estimer le degré d'ouverture de la canopée sur les différents sites d'échantillonnage, notre proxy pour les conditions d'éclairement.

Annals of Botany **120**: 361–371, 2017
doi:10.1093/aob/mcx054, available online at www.academic.oup.com/aob

ANNALS OF BOTANY Founded 1887

Mixotrophy in Pyroleae (Ericaceae) from Estonian boreal forests does not vary with light or tissue age

Félix Lallemand[1,2,*], Ülle Puttsepp[3], Mait Lang[4,5], Aarne Luud[3], Pierre-Emmanuel Courty[6], Cécile Palancade[1] and Marc-André Selosse[1,7]

[1]Institut de Systématique, Évolution, Biodiversité (ISYEB), UMR 7205 CNRS MNHN UPMC EPHE, Muséum national d'Histoire naturelle, Sorbonne Universités, 57 rue Cuvier, CP39, 75005 Paris, France [2]Master BioSciences, Département de Biologie, École Normale Supérieure de Lyon, Université de Lyon, UCB Lyon1, 46 Allée d'Italie, Lyon, France [3]Institute of Agricultural and Environmental Sciences, Estonian University of Life Sciences, Street Kreutzwaldi 5, 51014, Tartu, Estonia [4]Institute of Forestry and Rural Engineering, Estonian University of Life Sciences, Street Kreutzwaldi 5, 51014 Tartu, Estonia [5]Tartu Observatory, 61602 Tõravere, Tartu County, Estonia [6]Agroécologie, AgroSupDijon, CNRS, INRA, Université de Bourgogne Franche-Comté, 21000 Dijon, France and [7]Department of Plant Taxonomy and Nature Conservation, University of Gdansk, ul. Wita Stwosza 59, 80-308 Gdańsk, Poland
[*]For correspondence. E-mail felix.lallemand@ens-lyon.org

Received: 15 February 2017 Returned for revision: 23 March 2017 Editorial decision: 29 March 2017 Published electronically: 31 May 2017

• **Background and Aims** In temperate forests, some green plants, namely pyroloids (Pyroleae, Ericaceae) and some orchids, independently evolved a mode of nutrition mixing photosynthates and carbon gained from their mycorrhizal fungi (mixotrophy). Fungal carbon is more enriched in ^{13}C than photosynthates, allowing estimation of the proportion of carbon acquired heterotrophically from fungi in plant biomass. Based on ^{13}C enrichment, mixotrophic orchids have previously been shown to increase shoot autotrophy level over the growth season and with environmental light availability. But little is known about the plasticity of use of photosynthetic versus fungal carbon in pyroloids.
• **Methods** Plasticity of mixotrophy with leaf age or light level (estimated from canopy openness) was investigated in pyroloids from three Estonian boreal forests. Bulk leaf ^{13}C enrichment of five pyroloid species was compared with that of control autotrophic plants along temporal series (over one growth season) and environmental light gradients (n=405 samples).
• **Key Results** Mixotrophic ^{13}C enrichment was detected at studied sites for *Pyrola chlorantha* and *Orthilia secunda* (except at one site for the latter), but not for *Chimaphila umbellata*, *Pyrola rotundifolia* and *Moneses uniflora*. Enrichment with ^{13}C did not vary over the growth season or between leaves from current and previous years. Finally, although one co-occurring mixotrophic orchid showed ^{13}C depletion with increasing light availability, as expected for mixotrophs, all pyroloids responded identically to autotrophic control plants along light gradients.
• **Conclusions** A phylogenetic trend previously observed is further supported: mixotrophy is rarely supported by ^{13}C enrichment in the *Chimaphila* + *Moneses* clade, whereas it is frequent in the *Pyrola* + *Orthilia* clade. Moreover, pyroloid mixotrophy does not respond plastically to ageing or to light level. This contrasts with the usual view of a convergent evolution with orchids, and casts doubt on the way pyroloids use the carbon gained from their mycorrhizal fungi, especially to replace photosynthetic carbon.

Key word: *Chimaphila*, Ericaceae, *Moneses*, mixotrophy, mycoheterotrophy, N content, orchids, *Orthilia*, *Pyrola*, response to light, stable isotopes, ^{13}C.

INTRODUCTION

Mycorrhizae are widespread symbioses where the roots of terrestrial plants associate with soil fungi (van der Heijden *et al.*, 2015). Fungi provide mineral elements and protection against soil stresses to plants, which usually reward the fungus with photosynthates: in most cases, partners reciprocally test the other's ability to provide the expected nutrients (Selosse and Rousset, 2011). However, some plants also recover carbon (C) from the fungus (Selosse and Roy, 2009; Hynson *et al.*, 2013*a*); these interactions reverse the usual exchange, question the mutualism of the association, and most importantly open a new chapter of plant nutritional strategies. Nutrition including fungal C has been reported in some fully achlorophyllous plants, the so-called mycoheterotrophic (MH) plants (Leake, 1994; Merckx, 2013), but more recently partial mycoheterotrophy was discovered in some green plants with photosynthetic abilities (Gebauer and Meyer, 2003; Julou *et al.*, 2005; Selosse *et al.*, 2016), a strategy called mixotrophy.

While several taxa of mycorrhizal fungi support MH and likely mixotrophic (MX) nutrition (Martos *et al.*, 2009; Selosse and Roy, 2009; Merckx, 2013; Bolin *et al.*, 2017), most physiological studies have hitherto focused on MX plants associated with Ascomycotas and Basidiomycotas that gain their C

by forming so-called ectomycorrhizae on tree roots (Hynson *et al.*, 2013*a*; Selosse *et al.*, 2016). These fungi fractionate against ^{12}C when recovering C from donating plants (Hobbie *et al.*, 2001; Mayor *et al.*, 2009), a particularity absent from other mycorrhizal fungal taxa (e.g. Courty *et al.*, 2015), and such isotopic abundance makes the fungal contribution to MX nutrition easier to detect in receiving plants. Plants deriving C from ectomycorrhizal fungi are indeed enriched in ^{13}C, especially MH species (Trudell *et al.*, 2003), but also MX ones (Gebauer and Meyer, 2003; Julou *et al.*, 2005). Moreover, the percentage of C coming from mycorrhizal fungi (hereafter, the 'heterotrophy level') can be estimated from ^{13}C enrichment in MX biomass, thanks to a linear mixing model and the use of appropriate enrichment references in fully MH and autotrophic nearby plants (Gebauer and Meyer, 2003; Hynson *et al.*, 2013*a*). Mixotrophic nutrition has mainly been investigated in forest orchids associated with ectomycorrhizal fungi, whose photosynthesis is limited due to either reduced intrinsic photosynthetic capacities (Girlanda *et al.*, 2006; Cameron *et al.*, 2009) or to low understorey light levels (Julou *et al.*, 2005). In some of these species, some variant individuals devoid of chlorophyll, the so-called albinos, survive by mycoheterotrophy over several years (Selosse *et al.*, 2004; Julou *et al.*, 2005; Abadie *et al.*, 2006; Shefferson *et al.*, 2016), which is further evidence of the ability to obtain significant levels of fungal C. Congruently, fully MH species have often evolved within MX lineages (Selosse and Roy, 2009; Motomura *et al.*, 2010), or from putative MX ancestors (Lallemand *et al.*, 2016). Finally, MX and MH plants are often enriched in total nitrogen compared with autotrophic plants (Abadie *et al.*, 2006; reviewed in Hynson *et al.*, 2013*a*). Mixotrophic and MH nutrition modify the way plants gain nitrogen (N) from fungi (as further suggested by a different ^{15}N enrichment in these plants; Abadie *et al.*, 2006; Hynson *et al.*, 2013*a*), and N content positively correlates with heterotrophy level in MX orchids at least (e.g. Gonneau *et al.*, 2014).

An important challenge is to understand the physiology of MX plants (Selosse *et al.*, 2017) and their use of fungal and photosynthetic C. These questions have hitherto been mainly investigated in MX orchids, using ^{13}C enrichment to estimate the heterotrophy level in various organs, and albinos as references for MH ^{13}C enrichment. First, the heterotrophy level is variable between species and populations (Hynson *et al.*, 2013*a*), and depends especially on the light level: the heterotrophy level increases with decreasing light level or after experimental shading (Preiss *et al.*, 2010; Gonneau *et al.*, 2014). Second, different organs rely differently on fungal C versus photosynthetic resources: while photosynthates do not detectably contribute to underground parts such as rhizomes (Gonneau *et al.*, 2014), they form a major part of flowers and fruit biomass (Roy *et al.*, 2013; Bellino *et al.*, 2014). Shoot nutrition and leaf nutrition vary over the growing season, shifting from using mostly fungal C at aboveground emergence to being mostly photosynthetic at fruiting time (Roy *et al.*, 2013; Gonneau *et al.*, 2014). Thus, MX nutrition is environmentally flexible and physiologically dynamic, in MX orchids at least.

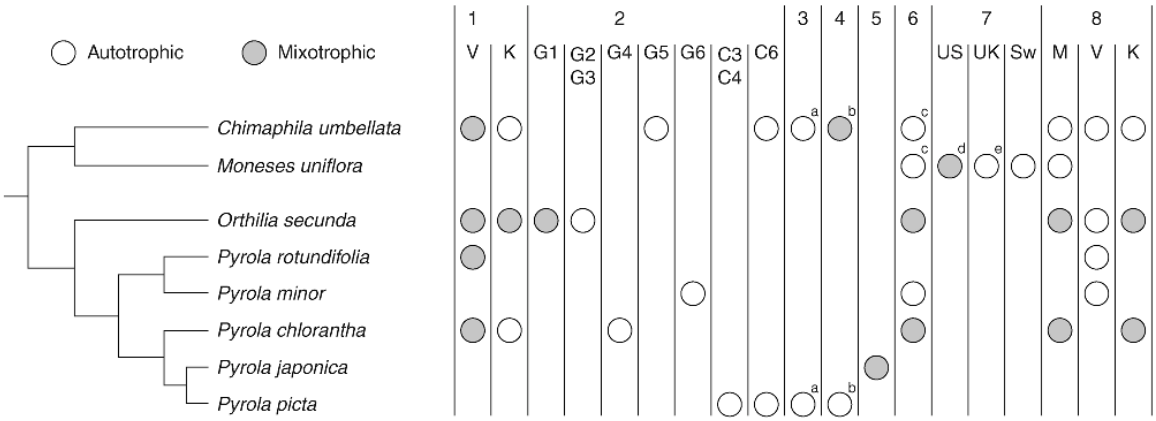
Mixotrophic nutrition supported by ectomycorrhizal fungi also occurs in Ericaceae of the tribe Pyroleae (hereafter, the pyroloids; Hynson and Bruns, 2009; Liu *et al.*, 2011; Lallemand *et al.*, 2016) which live in the forest understorey. To our best knowledge, photosynthetic abilities have not been assessed in pyroloids. However, ^{13}C enrichment provides evidence for MX nutrition in some species, although the heterotrophy level fluctuates more than in MX orchids, ranging for a given species from null to significant depending on the sampled populations (Tedersoo *et al.*, 2007; Zimmer *et al.*, 2007; Hynson *et al.*, 2015; Johansson *et al.*, 2015) (Fig. 1). There is limited and debated evidence that pyroloid MX nutrition follows the flexibility and dynamic patterns found in MX orchids. First, *Pyrola japonica* from a Japanese forest has ^{13}C enrichment inversely correlated with light availability (Matsuda *et al.*, 2012), meaning higher heterotrophy levels in shadier conditions. Congruently, plants in the darkest conditions were more densely colonized by the *Russula* fungal symbiont preferred by *P. japonica*. A similar scenario was supported by observations of a higher heterotrophy level in populations at lower irradiance in *Orthilia secunda* (Zimmer *et al.*, 2007), *Moneses uniflora* (Hynson *et al.*, 2015) and *Pyrola chlorantha* (Tedersoo *et al.*, 2007); however, the opposite was found for *O. secunda* and *Chimaphila umbellata* (Tedersoo *et al.*, 2007). Comparison between distant sites can be biased by local abiotic characteristics or fungal communities, so that comparisons should be made within a similar forest site, or after experimental shading. Indeed, no increase in leaf heterotrophy was detected in an experimental 50 % irradiance decrease on Californian *Pyrola picta* and *C. umbellata* (Hynson *et al.*, 2012); however, when examining only leaf sugars to avoid isotopic signals from polymers synthesized before the experiment, ^{13}C enrichment suggested that heterotrophy decreased in *C. umbellata* after shading, but paradoxically increased in *P. picta* (Hynson *et al.*, 2012). Moreover, a decrease in heterotrophy in shoots and leaves over the growing season, as observed in MX orchids, has rarely been seen in pyroloids: Hynson *et al.* (2012) did not detect significant variations in ^{13}C enrichment, and thus heterotrophy level, of bulk leaf tissues and sugars of *P. picta* and *C. umbellata* during their 44-days monitoring. Changes in heterotrophy level during shoot lifespan (which covers at least 2 years in these evergreen species) remain to be assessed more broadly in pyroloids.

In this study, we investigated MX nutrition in pyroloids at three Estonian circumscribed sites, to allow comparisons in relatively homogeneous environments, plant populations and fungal communities. We investigated how leaf age and light level impact heterotrophy level in five pyroloid species, using natural local gradients of light and seasonal monitoring over 1 year.

MATERIALS AND METHODS

Study sites

We investigated three sites in Estonia, each harbouring at least four evergreen pyroloid species (Table 1) and the MH species *Hypopitys monotropa*. In all, five pyroloid species were considered: *Chimaphila umbellata*, *Orthilia secunda*, *Moneses uniflora*, *Pyrola chlorantha* and *Pyrola rotundifolia*. The sites included three boreal *Pinus sylvestris* forests (Mändjala, 58°12′44″ N, 22°19′13″ E; Värska, 57°56′34″ N, 27°39′58″E;



[a]Based on the pooled data from four different Californian sites (*C. umbellata*) and six different Californian sites plus one from Oregon (*P. picta*).

[b]Based on th $\delta^{13}C$ of leaf soluble sugars. MX was not detectable from bulk tissues.

[c]Samples were depleted in ^{13}C compared to autotrophic references.

[d]Based on the pooled data from seven different sites.

[e]Based on the pooled data from two different sites. Samples were depleted in ^{13}C compared to autotrophic references.

FIG. 1. Trophic status of different pyroloid species including the five studied here, from current and previously published data, as deduced from bulk leaf ^{13}C enrichment. Open circles, autotrophic; grey circles, mixotrophic. The cladogram is based on Lallemand *et al.* (2016) for genera relationships and Liu *et al.* (2014) for *Pyrola* species relationships. References are as follows (with sites indicated below the reference number): 1, Tedersoo *et al.*, 2007 (V, Värska; K, Kärla); 2, Zimmer *et al.*, 2007 (same site names as in the referenced article); 3, Hynson *et al.*, 2009; 4, Hynson *et al.*, 2012; 5, Matsuda *et al.*, 2012; 6, Johansson *et al.*, 2015; 7, Hynson *et al.*, 2015 (Sw, Sweden); 8, this study (M, Mändjala; V, Värska; K, Kärla).

TABLE 1. *Species sampled for isotopic study at each of the three sampling sites, with number of individuals sampled. To investigate nutrition type by isotopic analysis, autotrophs, mixotrophs or mycoheterotrophs were sampled for reference species in addition to the pyroloid species studied. Young and old leaves were harvested for pyroloids, noted as 'y' and 'o', respectively. See Supplementary Data Table S1 for the seasonal sampling*

Site	Nutrition	Species (number of samples)
Mändjala (23 July 2009)	Pyroloid	*Orthilia secunda* (o: 14, y: 11), *Pyrola chlorantha* (o: 13, y: 13), *Chimaphila umbellata* (o: 14, y: 13), *Moneses uniflora* (o: 6, y: 6)
	Mycoheterotroph	*Hypopitys monotropa* (6)
	Autotroph	*Berberis vulgaris* (1), *Dianthus arenarius* (3), *Fragaria vesca* (1), *Frangula alnus* (1), *Galium album* (2), *Galium boreale* (1), *Galium pomeranicum* (1), *Galium verum* (7), *Hieracium umbellatum* (6), *Luzula pilosa* (5), *Quercus robur* (5), *Sorbus aucuparia* (3), *Thymus serpyllum* (3), *Vaccinium vitis-idaea* (1), *Viola rupestris* (1)
Värska (14 June 2009)	Pyroloid	*Orthilia secunda* (o: 10, y: 9), *Pyrola rotundifolia* (9), *Chimaphila umbellata* (7)
	Mycoheterotroph	*Hypopitys monotropa* (3)
	Autotroph	*Festuca rubra* (7), *Luzula pilosa* (10), *Lycopodium clavatum* (9)
Kärla (16 June 2009)	Pyroloid	*Orthilia secunda* (11), *Pyrola chlorantha* (9), *Chimaphila umbellata* (o: 9, y: 9)
	Mixotroph	*Epipactis atrorubens* (9)
	Mycoheterotroph	*Hypopitys monotropa* (9)
	Autotroph	*Hieracium umbellatum* (2), *Luzula pilosa* (9), *Pulsatilla pratensis* (3)

and Kärla, 58°20′36″ N, 22°17′59″ E). The last two were previously described by Tedersoo *et al.* (2007). The Mändjala and Kärla sites were of the *Cladina* type (type group of boreal heath forests; Paal, 1997) on poor sandy soils, covered by a Scots pine (*P. sylvestris*) forest [average age 100 (60–160) years] with sparse Norway spruce (*Picea abies*) undergrowth. The Värska site was of the *Vaccinium myrtillus* type (type group of dry boreal forests; Paal, 1997) on sandy soil, covered by a 70- to 90-year-old Scots pine and silver birch (*Betula pendula*) forest. The Mändjala site was on the Baltic seashore (<200 m). All soils were haplic podzols on sand. The sites experienced mean annual temperatures of +7.8 °C (Mändjala, Kärla) and +6.8 °C (Värska), and ~12 °C during vegetation periods (April to October inclusive). They received rainfall of 570 mm year^{-1} (Mändjala, Kärla) and 783 mm year^{-1} (Värska) during 2008–2009 (all measurements from the closest weather stations, 12 and 18 km from Mändjala and Kärla, respectively, and 40 km from Värska).

Sampling

Samples for isotopic studies were collected with records of light (see below) at Värska on 16 June 16, at Kärla on 18 June 2009 and at Mändjala on 23 July 2009 (Table 1 and Supplementary Data Table S1). At each site, some ten to 13 plots measuring 20 cm ×20 cm were identified that (1) displayed contrasting light levels between plots; (2) had similar light exposure over the plot itself; and (3) were situated >5 m from each other. In each plot, we sampled one leaf from up to two individuals from each available pyroloid species. Moreover, whenever available, in each plot we harvested one inflorescence of *H. monotropa*, one leaf of the MX orchid *Epipactis atrorubens* in Kärla plots only and one leaf from each available autotrophic species, as references for MH, MX and autotrophic nutrition, respectively (see Table 1 and Table S1 for samples actually harvested for each plot and raw data).

The effects of age on leaf isotopic abundance and N content were estimated (1) between years and (2) over a growth season. First, the difference between leaves of different years was addressed during the main sampling at each site (above), by collecting young and old leaves on each individual of *O. secunda* at Värska and *C. umbellata* at Kärla, as well as *O. secunda*, *P. chlorantha C. umbellata* and *M. uniflora* at Mändjala (Table 1): 'young' leaves were recently terminal leaves of the rosette, expanded during the spring (<2 months), while 'old' leaves were basal-most leaves from previous year(s) that did not show any sign of senescence. Second, seasonal isotopic variations of plant leaves were addressed in 2009 by obtaining additional plant samples in the same year on 24 April, 20 August and 4 November at Värska, and on 13 May, 25 July and 2 November at Kärla (see samplings in Table S1; unfortunately, the phenology of *E. atrorubens* at Kärla did not allow its use as a control in this seasonal monitoring).

Light analysis

Light conditions in each sampling plot for each sampling date were inferred from canopy openness to yield a value representative of the mean exposure to sunlight during the day. Digital hemispherical photographs were taken at ground level in the nadir view direction at sampling time using a Canon EOS 5D camera with a Sigma F3·5 EX DG lens. The camera was oriented so that the north–south direction could be determined later for each image. All image data were stored as sensor raw readings (raw data) so that we could use the linear ratio method (Cescatti, 2007; Lang *et al.*, 2010, 2013) to estimate the canopy gap fraction. Radiance measurements were corrected for sensor dark current. Corrections of lens projection distortion and vignetting were applied and a sky radiance reference image was constructed as in Lang *et al.* (2010). The procedure was carried out using Hemispherical Project Manager software (Lang, 2014). Canopy gap fraction images were then imported into Gap Light Analyzer (GLA) version 2.0 (Frazer *et al.*, 1999) to obtain values of gap light transmission. Input variables for GLA calculations included site coordinates, elevation, vegetation period length (15 April to 15 October), an assumed cloudiness index of 0·5, a spectral fraction of 0·5, a solar constant of 1367 W m^{-2} and a clear-sky transmission coefficient of 0·65. For diffuse radiation flux, the model of uniform overcast sky was selected.

Isotopic analyses, N content and mixotrophy assessment

Leaf and inflorescence samples were ground in 1.5-mL Eppendorf tubes using two 2-mm diameter glass balls in a Retsch MM301 vortexer (Retsch). Abundances of ^{13}C and ^{15}N were measured using an online continuous flow CN analyser (NA 1500; Carlo Erba) coupled with an isotope ratio mass spectrometer (Delta S; Finnigan). This measurement also quantified N content. Relative isotope abundances are denoted as δ values, which were calculated according to the following equation:

$$\delta^{13}C \text{ or } \delta^{15}N = (R_{sample} / R_{standard} - 1) \times 1000 [‰]$$

where R_{sample} and $R_{standard}$ are the ratios of heavy isotope to light isotope of the sample and the respective standard (Vienna Pee-Dee Belemnite or atmospheric N_2 for C and N, respectively). When appropriate, the enrichment factor ε (*sensu* Hynson *et al.*, 2013*a*) was used, following the equation:

$$\varepsilon^{13}C \text{ or } \varepsilon^{15}N = \delta_{sample} - \delta_{ref} [‰]$$

where δ_{sample} is the $\delta^{13}C$ or $\delta^{15}N$ of the sample and δ_{ref} is the mean $\delta^{13}C$ or $\delta^{15}N$ of all autotrophic reference plants occurring in the same plot. The standard deviations of the replicated standard samples were 0·021 ‰ for ^{13}C and 0·222 ‰ for ^{15}N. Mycoheteretrophic nutrition for MX species was quantified from $\delta^{13}C$ values based on a linear mixing model using autotrophic and MH references as in Gebauer and Meyer (2003; see also Hynson *et al.*, 2013*a*). Throughout this study, a population was considered MX exclusively if its average $\delta^{13}C$ value differed significantly from that of autotrophic references.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using the R environment for statistical computing (R Development Core Team, 2007). Analysis of variance (ANOVA) was performed to evaluate differences in mean $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ among species (function aov). Tukey's honestly significant difference (HSD) test was then used to make pairwise comparisons of the means (function TukeyHSD). For N content, given the heteroscedasticity of the data, the Games–Howell test was used for pairwise comparisons of the means using the source code of the function posthocTGH as implemented in the package userfriendlyscience v0.5-2 (Gjalt-Jorn, 2016). Differences between young and old leaves were assessed by pairing leaves according to their sampling plot. Paired Student's *t*-tests were thus used to compare $\delta^{13}C$, $\delta^{15}N$ and N content means (function t.test). We tested $\delta^{13}C$ for linear relationship with canopy openness using the lm function. The α type-I error threshold was set at 0·05.

RESULTS

Variation of MH level with species at each site

The following analyses were made using old leaves only for all species. In all three sites, the MH species *H. monotropa* was

significantly enriched in $\delta^{13}C$ compared with all other species and in $\delta^{15}N$ compared with all autotrophic references (Fig. 2). The five pyroloids investigated differed in isotopic signatures (Fig. 2). *Orthilia secunda* showed higher $\delta^{13}C$ than autotrophic references at Mändjala and Kärla, suggesting 41 and 34 % MH nutrition, respectively, based on a two-source linear mixing model, but was autotrophic at Värska; it showed higher $\delta^{15}N$ at Mändjala only. *Pyrola chlorantha*, studied at Mändjala and Kärla only, always had higher $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ than autotrophic references, suggesting 40 and 30 % MH nutrition, respectively. *Chimaphila umbellata* did not differ from autotrophic references at the three study sites, together with *P. rotundifolia* and *M. uniflora* (at Mändjala and Värska, respectively). The MX orchid *E. atrorubens* showed higher $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ values than autotrophs at Kärla, suggesting 39 % MH nutrition. Finally, considering total N content (Supplementary Data Fig. S1), only *E. atrorubens* and young *C. umbellata* leaves at Kärla and *C. umbellata* at Värska showed significant enrichment compared with autotrophic references. Thus, among pyroloids, only *O. secunda* and *P. chlorantha* were MX at Mändjala and Kärla based on $\delta^{13}C$ values.

Variation of mycoheterotrophy level with age

The canopy tended to open over the 2009 growth season at Kärla and Värska (Fig. 3A). The $\delta^{13}C$ values did not vary over the growth season at Kärla (Fig. 3C), but tended to decrease for all investigated species at Värska (significantly for only *C. umbellata* and *O. secunda*; Fig. 3B). For $\varepsilon^{13}C$, no variations were observed for any pyroloid at any site over the growth season (Supplementary Data Fig. S2). No differences were observed in N content or $\delta^{15}N$ over the growth season (not shown; Table S1). Furthermore, old and young leaves sampled at a given time in June or July 2009, depending on the site (Table 1), did not differ in $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ values for *O. secunda* at Värska and *C. umbellata* at Kärla, nor for these species, *P. chlorantha* and *M. uniflora* at Mändjala (Supplementary Data Fig. S3a, b), suggesting that the mixotrophy level did not change over leaf lifespan. However, in all species and sites, young leaves were richer in nitrogen than old ones (Supplementary Data Figs S2 and S3c).

Variation of mycoheterotrophy level with light availability

Mändjala was the site with the greatest gradient of light availability (median canopy openness 20 %, minimum 5 %, maximum 39 %), while Värska (14 %, 6–19 %) and Kärla (17 %, 12–25 %) were more shaded and less variable (Supplementary Data Fig. S4 and Table S1). In all, over the three sites we observed an order of magnitude of canopy openness (Supplementary Data Fig. S4).

All autotrophic and pyroloid species tended to increase in $\delta^{13}C$ with light availability at all sites, with the exceptions of *L. pilosa* and *O. secunda* at Kärla (no variation), while the MX species *E. atrorubens* underwent a significant decrease (Table 2). The MH species *H. monotropa* did not vary in $\delta^{13}C$ with light availability. The pyroloids *O. secunda* at Mändjala and Värska, *P. chlorantha* at Mändjala and *P. rotundifolia* at Värska all displayed a significant increase in $\delta^{13}C$ with light

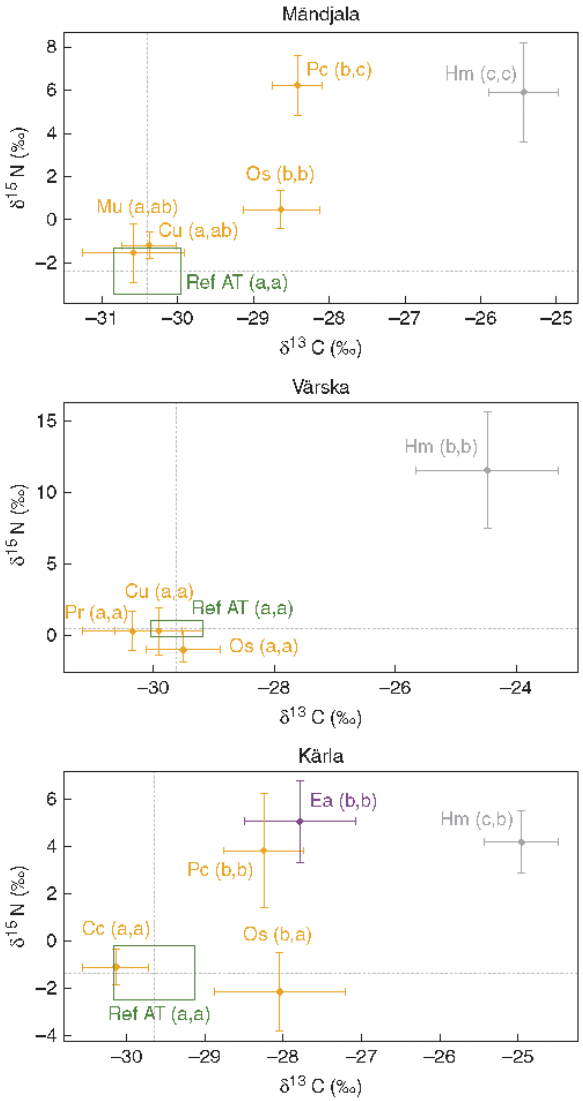


FIG. 2. Mean $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ values of bulk leaf tissues of the species investigated at the three sites of this study. Ref AT, reference for autotrophs pooling all autotrophic samples (see Table 1 for a list for each site); Mu, *Moneses uniflora*; Cu, *Chimaphila umbellata*; Os, *Orthilia secunda*; Pc, *Pyrola chlorantha*; Pr, *Pyrola rotundifolia*; Hm, *Hypopitys monotropa*; Ea, *Epipactis atrorubens*. Different letters in parentheses denote different means for, successively, $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$, according to Tukey's HSD test; bars (or rectangle sides for Ref AT) represent 95 % confidence intervals of the mean.

level, with substantial R^2 values (0·27, 0·29, 0·47 and 0·47, respectively; Table 2), as expected for autotrophic, but not MX, species. In order to contrast the response in MH nutrition of pyroloids to that of autotrophic references, we calculated the $\varepsilon^{13}C$ (*sensu* Hynson *et al.*, 2013*a*). Whatever the study site, the $\varepsilon^{13}C$ of pyroloids did not respond to light level (Supplementary Data Table S2), while the MX species *E. atrorubens* at Kärla showed a significant decrease in $\varepsilon^{13}C$ with increasing light (R^2=0·46, P=0·044; Table S2). Considering pyroloids found at

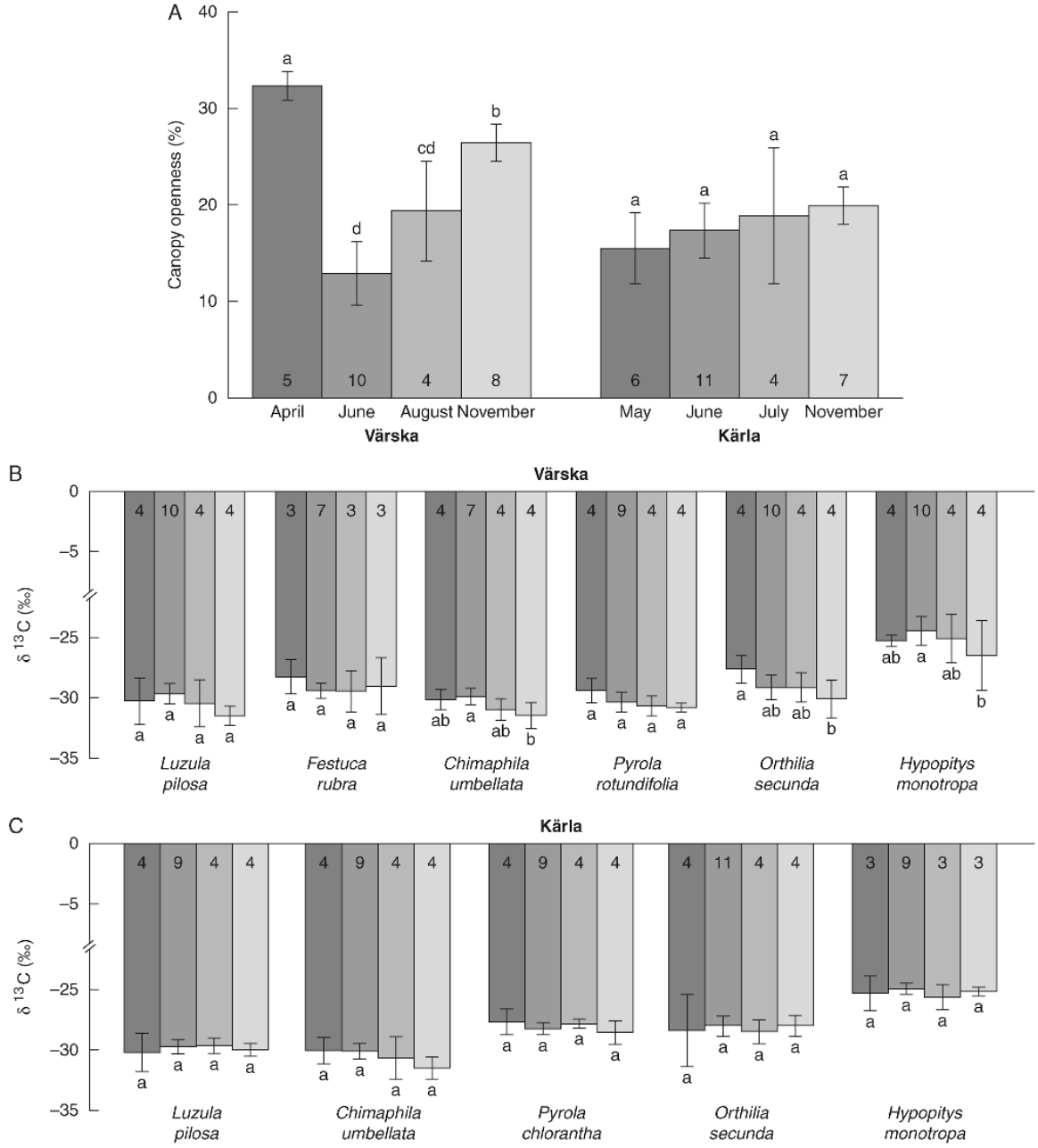


FIG. 3. Canopy openness (A) and changes in $\delta^{13}C$ mean values over the 2009 growth season at Värska (B) and Kärla (C). Successive samplings were in April, June, August and November at Värska and in May, June, July and November at Kärla (for exact dates see Materials and methods section; numbers in columns are sample numbers). For a given species at a given site, # indicates MX nutrition based on its isotopic signature (see Fig. 1). Different letters denote different means according to Tukey's HSD test; bars represent 95 % confidence intervals of the mean.

more than one site (*C. umbellata*, *O. secunda* and *P. chlorantha*) and pooling data from all plots at all sites, $\varepsilon^{13}C$ again did not show any response to light level (not shown). Finally, $\delta^{15}N$ did not respond to light in any species (Supplementary Data Table S3). Thus, pyroloids did not differ in light response from autotrophic species.

DISCUSSION

Our results, based on an analysis of bulk leaf ^{13}C enrichment of 405 samples, show that mixotrophy in pyroloids does not respond to age or light level. Our approach was very conservative, since we did not make any correction in statistical tests for multiple comparisons (any such correction would lower all

TABLE 2. *Summary of linear regressions for bulk leaf $\delta^{13}C$ values against light level at the three studied sites. When $P<0{\cdot}05$, the values of R^2 (left) and P (right) are given. + and − indicate a positive and negative relationship, respectively. When $P>0{\cdot}05$, an indication of R^2 is given as follows: +, $R^2>0{\cdot}1$ with a positive correlation; −, $R^2>0{\cdot}1$ with a negative correlation; 0, $R^2<0{\cdot}1$. The P values are not corrected for multiple comparisons. H. monotropa at Värska was too rare to test for linear regression*

Nutrition	Species	Mändjala	Värska	Kärla
Autotroph	*Galium verum*	+0·57; 0·05		
	Hieracium umbellatum	+0·79; 0·018		
	Luzula pilosa		+0·47; 0·03	0
	Festuca rubra		+	
	Lycopodium clavatum		+	
Pyroloid	*Moneses uniflora*	+		
	Chimaphila umbellata	+	+	+
	Pyrola chlorantha	+0·47; < 0·001 #		+ #
	Pyrola rotundifolia		+0·47; 0·041	
	Orthilia secunda	+0·27; 0·01#	+0·29; 0·017	0#
Mixotroph	*Epipactis atrorubens*			−0·5; 0·034
Mycoheterotroph	*Hypopitys monotropa*	0		0

#Species for which isotopic signature denotes mixotrophic nutrition at this site (see Fig. 1)

probabilities and reveal even less signal). We discuss these findings below in the complex framework of evolution of mixotrophy in pyroloids (Lallemand *et al.*, 2016).

A phylogenetic signal for mixotrophy in pyroloids

Only *O. secunda* and *P. chlorantha* displayed MX nutrition, with estimated heterotrophy levels around 30–40 %. Yet the former species was not MX at Värska, joining the list of studies supporting MX nutrition at one, but not all sites for a given pyroloid (e.g. Tedersoo *et al.*, 2007; Zimmer *et al.*, 2007; Hynson *et al.*, 2015; Fig. 1 and our unpublished data). The reasons for this are unclear, but may fall into three non-exclusive categories. First, some populations may simply have different genetic backgrounds, entailing variable MX abilities. Second, different environments may entail different heterotrophy levels, although our results discussed here do not support any impact of light conditions at least. Similarly, we investigated the impacts of soil C, N and phosphorus (P) contents in all three plots studied, but again this did not correlate with heterotrophy level (data not reported here). Finally, all associated fungi, even if mostly ectomycorrhizal (Tedersoo *et al.*, 2007), may not provide organic resources enriched in ^{13}C. A statement similar to the latter point was recently made in orchids, where fungal associates with $\delta^{13}C$ similar (or close) to that of photosynthetic resources are suspected to lead to hidden C inflow in orchids (Selosse and Martos, 2014). Furthermore, our results at Värska, where *C. umbellata*, *O. secunda* and *P. rotundifolia* were not MX, are somewhat at odds with previous analyses of populations from the same forest (Tedersoo *et al.*, 2007), where these species were MX (Fig. 1). Two factors may explain this: first, the sampling at slightly different subsites may drive these differences, but we disfavour this explanation since subsites were distributed over the same area in both years; second, unknown factors (biotic or fungal) may have changed over 6 years in this population, driving different heterotrophy levels. The latter explanation also strongly argues against the first reason (different genetic backgrounds) proposed above for variability in mixotrophy level between populations, since the samples in our two successive studies likely belong to the same genetic population for the three investigated species.

Our results further support the previous report suggesting a phylogenetic trend (Matsuda *et al.*, 2012). The genera *Orthilia* and *Pyrola*, on the one hand, and *Chimaphila* and *Moneses*, on the other hand, cluster together in pyroloid phylogeny (Freudenstein, 1999; Braukmann and Stefanović, 2012; Matsuda *et al.*, 2012; Lallemand *et al.*, 2016). While $\delta^{13}C$ analyses often reveal MX nutrition in the first cluster, the second less often displays such trends (although one can claim that this isotopic clue alone does not fully reject MX nutrition; see e.g. Hynson *et al.*, 2015). Yet exceptions to this pattern (Fig. 1) suggest complex evolutionary patterns (Lallemand *et al.*, 2016) and/or ecological variations. All these genera start their lifecycle through MH germination (Hashimoto *et al.*, 2012; Hynson *et al.*, 2013*b*), with MH seedlings enriched in ^{13}C (Johansson *et al.*, 2015), so that, assuming that fungal partners are the same at all ages, $\delta^{13}C$ values in adults suggest that *Chimaphila* and *Moneses* revert to autotrophy (or to undetectable levels of MH nutrition).

No evidence for change in mixotrophy over pyroloid leaf lifespan

Our default expectations based on MX orchids (Roy *et al.*, 2013; Gonneau *et al.*, 2014) were that (1) young leaves formed at the beginning of the growth season display a strong contribution of fungal C enriched in ^{13}C, and (2) with the rise in photosynthetic activity, a higher contribution of photosynthetic C reduces ^{13}C enrichment later in the growth season. However, we found no evidence for a change in heterotrophy level over leaf lifespan in bulk leaf tissues of MX pyroloids. Over the growth season, N content did not vary, but $\delta^{13}C$ values decreased somewhat in some pyroloids, suggesting a possible shift to higher autotrophy (because photosynthates are more ^{13}C-depleted than fungal resources). Variations in canopy openness are unlikely to explain this, since small increases should normally increase $\delta^{13}C$ (Farquhar *et al.*, 1989; see below effect of light on $\delta^{13}C$). However, the $\delta^{13}C$ decrease was rarely supported (i.e. *O. secunda* and *C. umbellata* at Värska only), and $\varepsilon^{13}C$ values

did not show a similar decrease, meaning that autotrophic references displayed similar behaviours. Thus, this more likely reflects the usual shift from using plant reserves (which are somewhat ^{13}C-enriched; Cernusak *et al.*, 2009; Gonneau *et al.*, 2014) during leaf ontogenesis to locally produced photosynthates, which is the common trend over a growth season even in autotrophs (Roy *et al.*, 2013). Indeed, the observed δ^{13}C shift over the growth season was of much lower amplitude than that of MX orchids (compare with Roy *et al.*, 2013; Gonneau *et al.*, 2014).

In the longer term, our comparison of young (<2 months) and old (>12 months) leaves did not reveal any shift in δ^{13}C values related to age, but in this case N content was lower in ageing leaves (no surrounding autotrophic species provided a relevant comparison as they do not have evergreen, sufficiently lasting leaves). Since we did not observe such a decrease in N content over the growth season, the decrease seems to occur at the beginning of the second year. However, given the stability of δ^{13}C values, this decrease in N content is not related to a variation in heterotrophy level. Indeed, such a diminution in N is reported in evergreen species, where leaves reach their highest N (and mineral) content and activity at beginning of their first year (e.g. Jonasson and Chapin, 1985; Hunter and Leehowiez, 1992), before a decrease starts, which can be partly explained by a progressive senescence process. Most importantly, even if unrelated to MX nutrition, the variations we observed in leaf N content demonstrate that our sampling can reveal developmental changes in evergreen leaves.

The absence of developmental shift in heterotrophy level for MX pyroloids suggests a constant contribution of fungal C to bulk leaf resources throughout the leaf lifespan. An alternative explanation is a bias due to the fact that abundant polymers with low turnover that are synthesized early in development, namely lignin and cellulose from the cell wall, buffer any further ^{13}C variation (a masking effect that does not apply to N content because they do not contain N). Indeed, compared with the forest orchid leaves analysed by Roy *et al.* (2013) and Gonneau *et al.* (2014), pyroloid leaves are much thicker and richer in sclerenchyma and cuticles. Such a possibility had already been considered by Hynson *et al.* (2012), who restricted their analyses to leaf sugars to avoid such bias, and revealed trends not observed in bulk tissues. However, in the latter study, sugars and bulk leaf δ^{13}C did not vary over the 44 d of their control condition (in which no experimental treatment was applied). Thus, our results are congruent with those of Hynson *et al.* (2012), although our monitoring was five times longer. This suggests a stable contribution of fungal and photosynthetic C to bulk leaf biomass over the growth season, and that leaf age is not an important parameter when sampling pyroloid leaves for isotopic studies.

No response of mixotrophy to light level in pyroloids

We followed an order of magnitude of canopy openness (Supplementary Data Fig. S4) over the different sites, where the monodominance of evergreen *Pinus* in the canopy limits seasonal light changes, especially in the weeks preceding our sampling. Measuring light availability by canopy opening takes into account the variations in solar positions and light flecks that can occur in the forest, more than instantaneous measurements of light values, but it limits comparisons with other studies dealing with spontaneous variations in the light environment (e.g. Preiss *et al.*, 2010; Matsuda *et al.*, 2012; Gonneau *et al.*, 2014; Liebel *et al.*, 2010) or experimental shading (Hynson *et al.*, 2012). Most autotrophic plants responded in the expected way, i.e. light and δ^{13}C decreased jointly, thanks to two mechanisms. Firstly, shade favours stomata opening and thereby improves equilibration of [$^{13}CO_2$] and [$^{12}CO_2$] in the stomatal chamber; secondly, low photosynthesis in the shade depletes $^{12}CO_2$ in the stomatal chamber in a slow process that can be compensated for by diffusion of external $^{12}CO_2$. In all, better fractionation produces photosynthates more depleted in ^{13}C (Farquhar *et al.*, 1989; Preiss *et al.*, 2010; Liebel *et al.*, 2010). In Kärla, the MX orchid *E. atrorubens* showed the opposite behaviour, as expected in MX plants: δ^{13}C increased with canopy closure since shaded plants contain relatively more ^{13}C-enriched fungal C, as reported in MX orchids (Preiss *et al.*, 2010; Gonneau *et al.*, 2014) and in the Japanese MX species *P. japonica* (Matsuda *et al.*, 2012).

Strikingly, all pyroloids responded to light like autotrophic plants, whatever their nutritional type as inferred from δ^{13}C, i.e. considered MX or autotrophic. The absence of dynamic response to light variation in MX pyroloids can be interpreted in several ways. First, the light reduction entailed by canopy closure may be insufficient to affect photosynthesis in these dark-adapted plants, but the observed response of the MX species *E. atrorubens*, which is also adapted to similar conditions, rejects this possibility (and, at least, emphasizes the difference between orchids and pyroloids). Second, *O. secunda* and *C. umbellata* have metric rhizomes (Henderson, 1919), and long-distance C exchange within the plant may homogenize the photosynthates over distances larger than the light patches. On the one hand, source organs such as leaves are unlikely to receive carbon, but on the other hand this could explain the discrepancy with *P. japonica*, a non-rhizomatous species that responds to light as expected for MX plants (Matsuda *et al.*, 2012). Third, Matsuda *et al.* (2012) suggested that pyroloids may react to shaded conditions by changing mycorrhizal partners: if such a change involves fungi whose biomass is less ^{13}C-enriched, then any higher input of fungal resources would go undetected by ^{13}C enrichment. As mentioned above, increasing indirect evidence suggests that some plants rely on fungal C that does not change δ^{13}C (Selosse and Martos, 2014), such as some green temperate orchids (Gebauer *et al.*, 2016). The fact that mycorrhizal fungi may provide resources with low δ^{13}C in some sites would also explain (1) the variable δ^{13}C for a given pyroloid species among sites, here (for *O. secunda*) and in other studies (Tedersoo *et al.*, 2007; Hynson *et al.*, 2015), and (2) the fact that δ^{13}C values of some pyroloids are even below these of surrounding autotrophic species (Hynson *et al.*, 2015; Johansson *et al.*, 2015). A last possibility is that pyroloids present a fixed, non-dynamic mixing ratio of fungal and photosynthetic C, a static mixotrophy we explore in the conclusion below.

Conclusions – a 'static' mixotrophy in pyroloids?

We cannot exclude the possibility that the gradients analysed or our sampling effort may have been too low for any effect to

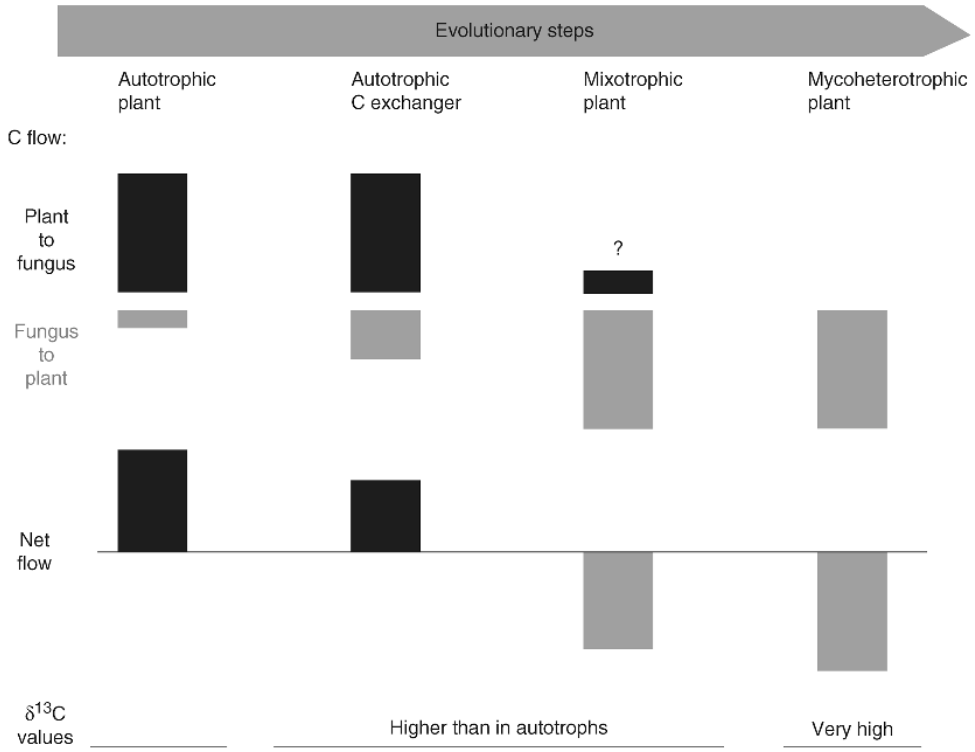


FIG. 4. A model of evolution to mixotrophy by way of an overlooked 'C-exchanger' autotrophic status that may explain the absence of dynamic response to light and ageing in pyroloids with elevated $\delta^{13}C$.

be seen. Yet the fact that *E. atrorubens* responds to the investigated light gradient suggests that MX pyroloids differ from MX orchids in light response. We faced a static response of pyroloids for the two investigated parameters (ageing and light level), although changes observed over 6 years at Värska or for a given species between sites (see above) suggest that some unknown parameters may affect heterotrophy level in pyroloids. The difference from MX orchids, which change heterotrophy level with ageing or light level, suggests a different meaning of MX/mixotrophy in pyroloids compared with orchids.

It is often overlooked that an elevated bulk $\delta^{13}C$ does not mean that there is a *net* flow of C from fungus to plant: it simply means that there is a *large raw flow*, so that a large part of the plant's C is of fungal origin. Yet some species may gain large quantities of fungal C as a by-product of a specific function of their mycorrhizal exchange, which they reward by even more photosynthetic C: thus, despite ^{13}C enrichment, such 'C-exchangers' would stay globally autotrophic, and not really MX (Fig. 4). It is clear in MX orchids (Hynson *et al.*, 2013*a*; Selosse *et al.*, 2016) that a net flow exists: this is demonstrated by albinos, i.e. achlorophyllous variants found in some MX orchid populations (Selosse *et al.*, 2004; Abadie *et al.*, 2006; Roy *et al.*, 2013; Gonneau *et al.*, 2014). The survival of such albinos (Shefferson *et al.*, 2016) obviously demonstrates a net C flow from fungus to plant. Strikingly, albinos were never reported in pyroloids, and it may be that pyroloids are such C-exchangers, where fungal C contributes poorly to the plant C budget.

Such C-exchangers may have a constant contribution of fungal C to their biomass that at least does not respond to light or phenology. Putting them in an evolutionary framework, C-exchangers are obviously predisposed to evolve into true MX species, with a net inflow from the fungus (like e.g. *P. japonica*; Matsuda *et al.*, 2012), or even into full MH species (like *P. aphylla*; Hynson and Bruns, 2009; Fig. 4). But their high level of C trade with fungal partners, which affects their $\delta^{13}C$ values, is not meaningful in terms of C nutrition and thus not responsive to ontogenetic time or environmental changes. This reasoning at least emphasizes that (1) multiple strategies can affect $\delta^{13}C$ values, and (2) ^{13}C enrichment does not necessarily mean net exploitation of fungal C.

More physiological analyses in pyroloids, focusing especially on circulating carbon to take into account the polymers with low turnover (Hynson *et al.*, 2012), are now required for further understanding of the fungal C dynamics within these plants. Fungal partners and their isotopic signatures also deserve further investigation to test whether any hidden C flow occurs in pyroloids displaying 'autotrophic' $\delta^{13}C$ values. Subsequent studies may clarify how, despite some convergences with MX orchids in physiology (Tedersoo *et al.*, 2007) and development (Hashimoto *et al.*, 2012; Hynson *et al.*, 2013*b*), pyroloids represent a quite distinct way of using fungal C, and do not detectably use C gained from their mycorrhizal fungi to replace photosynthetic C.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data are available online at www.aob.oxfordjournals.org and consist of the following. Figure S1: mean values of total N content in the three sites studied. Figure S2: changes in $\varepsilon^{13}C$ mean values over the 2009 growth season for the pyroloids found at Värska (a) and Kärla (b). Figure S3: average difference between old and young leaves from the same plot for (a) $\delta^{13}C$, (b) $\delta^{15}N$ and (c) N content. Figure S4: variability of light conditions in the three studied sites. Table S1: raw dataset used in this study. Table S2: summary of linear regressions of bulk leaf $\varepsilon^{13}C$ against light level in the three studied sites. Table S3: summary of linear regressions for bulk leaf $\delta^{15}N$ values against light level in the three studied sites.

ACKNOWLEDGEMENTS

Soil samples were analysed at the Laboratory of Biochemistry and Environmental Chemistry, the Laboratory of Plant Biochemistry and the Laboratory of Soil Science and Agrochemistry at the Estonian University of Life Sciences. We thank Professor Raimo Kõlli for valuable comments on soil properties of the study sites, Eric Garnier for comments on N content of perennial leaves, Leho Tedersoo and the late Vilmar Veldre for help and advice during sampling, David Marsh for English corrections, two anonymous referees for helpful comments, and Toomas Kukk for helping to identify plant species in some complicated cases. The work was supported by the following funding sources: Ecole Normale Supérieure de Lyon, Estonian Ministry of Education and Research grant SF1090050s07, National Science Centre (Poland) grant 2015/18/A/NZ8/00149, the Fondation Ars Cuttoli and the Fondation de France.

LITERATURE CITED

Abadie JC, Puttsepp U, Gebauer G, Faccio A, Bonfante P, Selosse MA. 2006. *Cephalanthera longifolia* (Neottieae, Orchidaceae) is mixotrophic: a comparative study between green and nonphotosynthetic individuals. *Canadian Journal of Botany* **84**: 1462–1477.

Bellino A, Baldantoni D, Selosse MA, Guerrieri R, Borghetti M, Alfani A. 2014. Photosynthesis regulation in mixotrophic plants: new insights from *Limodorum abortivum*. *Oecologia* **175**: 875–885.

Bolin JF, Tennakoon KU, Majid MBA, Cameron DD. 2017. Isotopic evidence of partial mycoheterotrophy in ***Burmannia coelestis*** (Burmanniaceae). *Plant Species Biology* **32**: 74–80.

Braukmann T, Stefanović S. 2012. Plastid genome evolution in mycoheterotrophic Ericaceae. *Plant Molecular Biology* **79**: 5–20.

Cameron DD, Preiss K, Gebauer G, Read DJ. 2009. The chlorophyll-containing orchid *Corallorhiza trifida* derives little carbon through photosynthesis. *New Phytologist* **138**: 358–364.

Cernusak LA, Tcherkez G, Keitel C, *et al.* 2009. Why are non-photosynthetic tissues generally ^{13}C enriched compared with leaves in C3 plants? Review and synthesis of current hypotheses. *Functional Plant Biology* **36**: 199–213.

Cescatti A. 2007. Indirect estimates of canopy gap fraction based on the linear conversion of hemispherical photographs – methodology and comparison with standard thresholding techniques. *Agricultural and Forest Meteorology* **143**: 1–12.

Courty PE, Doubková P, Calabrese S, Niemann H, Lehmann MF, Vosátka M, Selosse MA. 2015. Species-dependent partitioning of C and N stable isotopes between arbuscular mycorrhizal fungi and their C3 and C4 hosts. *Soil Biology & Biochemistry* **82**: 52–61.

Courty PE, Walder F, Boller T, Ineichen K, Wiemken A, Selosse MA. 2011. C and N metabolism in mycorrhizal networks and mycoheterotrophic plants of tropical forests: a stable isotope analysis. *Plant Physiology* **156**: 952–961.

Farquhar GD, Ehleringer JR, Hubick TK. 1989. Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **40**: 503–537.

Frazer GW, Canham CD, Lertzman KP. 1999. Gap Light Analyzer (GLA), Version 2.0: imaging software to extract canopy structure and gap light transmission indices from true-colour fish-eye photographs. *User's manual and program documentation*. Burnaby, British Columbia: Simon Fraser University; Millbrook, NY: Institute of Ecosystem Studies.

Freudenstein JV. 1999. Relationships and character transformation in Pyroloideae (Ericaceae) based on ITS sequences, morphology, and development. *Systematic Botany* **24**: 398–408.

Gebauer G, Meyer M. 2003. N-15 and C-13 natural abundance of autotrophic and mycoheterotrophic orchids provides insight into nitrogen and carbon gain from fungal association. *New Phytologist* **160**: 209–223.

Gebauer G, Preiss K, Gebauer AC. 2016. Partial mycoheterotrophy is more widespread among orchids than previously assumed. *New Phytologist* **211**: 11–15.

Girlanda M, Selosse MA, Cafasso D, *et al.* 2006. Inefficient photosynthesis in the Mediterranean orchid *Limodorum abortivum* is mirrored by specific association to ectomycorrhizal Russulaceae. *Molecular Ecology* **15**: 491–504.

Gjalt-Jorn P. 2016. *userfriendlyscience: quantitative analysis made accessible*. R package version 0.5-2. https://cran.r-project.org/web/packages/userfriendlyscience/index.html (last accessed 25 April 2017).

Gonneau C, Jersáková J, de Tredern E, *et al.* 2014. Photosynthesis in perennial mixotrophic Epipactis spp. (Orchidaceae) contributes more to shoot and fruit biomass than to hypogeous survival. *Journal of Ecology* **102**: 1183–1194.

Hashimoto Y, Fukukawa S, Kunishi A, *et al.* 2012. Mycoheterotrophic germination of ***Pyrola asarifolia*** dust seeds reveals convergences with germination in orchids. *New Phytologist* **195**: 620–630.

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

Henderson MW. 1919. A comparative study of the structure and saprophytism of the Pyrolaceae and Monotropaceae with reference to their derivation from the Ericaceae. *Contributions from the Botanical Laboratory and the Morris Arboretum of the University of Pennsylvania* **5**: 42–109.

Hobbie EA, Weber NS, Trappe JM. 2001. Mycorrhizal vs saprotrophic status of fungi: the isotopic evidence. *New Phytologist* **150**: 601–610.

Hunter AF, Leehowiez MJ. 1992. Foliage quality changes during canopy development of some northern hardwood trees. *Oecologia* **89**: 316–323.

Hynson NA, Bruns TD. 2009. Evidence of a myco-heterotroph in the plant family Ericaceae that lacks mycorrhizal specificity. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **276**: 4053–4059.

Hynson NA, Preiss K, Gebauer G, Bruns TD. 2009. Isotopic evidence of full and partial myco-heterotrophy in the plant tribe Pyroleae (Ericaceae). *New Phytologist* **182**: 719–726.

Hynson NA, Mambelli S, Amend AS, Dawson TE. 2012. Measuring carbon gains from fungal networks in understory plants from the tribe Pyroleae (Ericaceae): a field manipulation and stable isotope approach. *Oecologia* **169**: 307–317.

Hynson NA, Madsen TP, Selosse MA, *et al.* 2013a. The physiological ecology of mycoheterotrophy. In: Merckx VSFT. ed. *Mycoheterotrophy: the biology of plants living on fungi*. New York: Springer, 297–342.

Hynson NA, Weiss M, Preiss K, Gebauer G, Treseder KK. 2013b. Fungal host specificity is not a bottleneck for the germination of Pyroleae species (Ericaceae) in a Bavarian forest. *Molecular Ecology* **22**: 1473–1481.

Hynson NA, Bidartondo M, Read DJ. 2015. Are there geographic mosaics of mycorrhizal specificity and partial mycoheterotrophy? A case study in Moneses uniflora (Ericaceae). *New Phytologist* **208**: 1003–1007.

Johansson VA, Mikusinska A, Ekblad A, Eriksson O. 2015. Partial mycoheterotrophy in Pyroleae: nitrogen and carbon stable isotope signatures during development from seedling to adult. *Oecologia* **177**: 203–211.

Jonasson S, Chapin III FS, 1985. Significance of sequential leaf development for nutrient balance of the cotton sedge. *Eriophorum vaginatum* L. *Oecologia* **67**: 511–518.

Julou T, Burghardt B, Gebauer Y, Berveiller D, Damesin C, Selosse MA. 2005. Mixotrophy in orchids: insights from a comparative study of green individuals and non-photosynthetic individuals of *Cephalanthera damasonium*. *New Phytologist* **166**: 639–653.

Lallemand F, Gaudeul M, Lambourdière J, Matsuda Y, Hashimoto Y, Selosse MA. 2016. The elusive predisposition to mycoheterotrophy in Ericaceae. *New Phytologist* **212**: 314–319.
Lang M. 2014. *Hemispherical Project Manager*. Version 1.3.3. www.to.ee/eng/services/research_services/software (last accessed 25 April 2017).
Lang M, Kuusk A, Mõttus M, Rautiainen M, Nilson T. 2010. Canopy gap fraction estimation from digital hemispherical images using sky radiance models and a linear conversion method. *Agricultural and Forest Meteorology* **150**: 20–29.
Lang M, Kodar A, Arumäe T. 2013. Restoration of above canopy reference hemispherical image from below canopy measurements for plant area index estimation in forests. *Forestry Studies|Metsanduslikud Uurimused* **59**: 13–27.
Leake JR. 1994. Tansley Review No. 69. The biology of mycoheterotrophic ('saprophytic') plants. *New Phytologist* **127**:171–216.
Liebel HT, Bidartondo MI, Preiss K, Segreto R, Stöckel M, Rodda M, Gebauer G. 2010. C and N stable isotope signatures reveal constraints to nutritional modes in orchids from the Mediterranean and Macaronesia. *American Journal of Botany* **97**: 903–912.
Liu ZW, Wang ZH, Zhou J, Peng H. 2011. Phylogeny of Pyroleae (Ericaceae): implications for character evolution. *Journal of Plant Research* **124**: 325–337.
Liu ZW, Jolles D, Zhou J, Peng H, Milne R. 2014. Multiple origins of circumboreal taxa in ***Pyrola*** (Ericaceae), a group with a Tertiary relict distribution. *Annals of Botany* **114**: 1701–1709.
Martos F, Dulorme M, Pailler T, *et al*. 2009. Independent recruitment of saprotrophic fungi as mycorrhizal partners by tropical achlorophyllous orchids. *New Phytologist* **184**: 668–681.
Matsuda Y, Shimizu S, Mori M, Ito SI, Selosse MA. 2012. Seasonal and environmental changes of mycorrhizal associations and heterotrophy levels in mixotrophic *Pyrola japonica* (Ericaceae) growing under different light environments. *American Journal of Botany* **99**: 1177–1188.
Mayor JR, Schuur EAG, Henkel TW. 2009. Elucidating the nutritional dynamics of fungi using stable isotopes. *Ecology Letters* **12**: 171–183.
Merckx VSFT. 2013. *Mycoheterotrophy: the biology of plants living on fungi*. New York: Springer.
Motomura H, Selosse MA, Martos F, Kagawa A, Yukawa T. 2010. Mycoheterotrophy evolved from mixotrophic ancestors: evidence in *Cymbidium* (Orchidaceae). *Annals of Botany* **106**: 573–581.
Paal J. 1997. *Classification of Estonian vegetation site types [in Estonian]*. Tallinn: Keskkonnaministeerium, ÑRO Keskkonnaprogramm.
Preiss K, Adam IKU, Gebauer G. 2010. Irradiance governs exploitation of fungi: fine-tuning of carbon gain by two partially myco-heterotrophic orchids. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **277**: 1333–1336.
Roy M, Gonneau C, Rocheteau A, Berveiller D, Thomas JC, Damesin C, Selosse MA. 2013. Why do mixotrophic plants stay green? A comparison between green orchid and achlorophyllous individuals in situ. *Ecological Monographs* **83**: 95–117.
R Core Team. **2015**. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL https://www.R-project.org/ (last accessed 25 April 2017).
Shefferson RP, Roy M, Puttsepp U, Selosse MA. 2016. Demographic shifts related to mycoheterotrophy and their fitness impacts in two *Cephalanthera species*. *Ecology* **97**: 1452–1462.
Selosse MA, Faccio A, Scappaticci G, Bonfante P. 2004. Chlorophyllous and achlorophyllous specimens of Epipactis microphylla (Neottieae, Orchidaceae) are associated with ectomycorrhizal septomycetes, including truffles. *Microbial Ecology* **47**: 416–426.
Selosse MA, Roy M. 2009. Green plants that feed on fungi: facts and questions about mixotrophy. *Trends in Plant Science* **14**: 64–70.
Selosse MA, Rousset F. 2011. The plant–fungal marketplace. *Science* **333**: 828–829.
Selosse MA, Martos F. 2014. Do chlorophyllous orchids heterotrophically use mycorrhizal fungal carbon? *Trends in Plant Science* **19**: 683–685.
Selosse MA, Bocayuva MF, Kasuya MCM, Courty PE. 2016. Mixotrophy in mycorrhizal plants: extracting carbon from mycorrhizal networks. In: **Martin F.** ed. *Molecular mycorrhizal symbiosis*. Wiley-Blackwell, Hoboken, NY, 451–471.
Selosse MA, Charpin M, Not F. 2017. Mixotrophy everywhere on land and water: the grand écart hypothesis. *Ecology Letters* **20**: 246–263.
Tedersoo L, Pellet P, Kõljalg U, Selosse MA. 2007. Parallel evolutionary paths to mycoheterotrophy in understorey Ericaceae and Orchidaceae: ecological evidence for mixotrophy in Pyroleae. *Oecologia* **151**: 206–217.
Trudell SA, Rygiewicz PT, Edmonds RL. 2003. Nitrogen and carbon stable isotope abundances support the myco-heterotrophic nature and host-specificity of certain achlorophyllous plants. *New Phytologist* **160**: 391–401.
Zimmer K, Hynson NA, Gebauer G, Allen EB, Allen MF, Read DJ. 2007. Wide geographical and ecological distribution of nitrogen and carbon gains from fungi in pyroloids and monotropoids (Ericaceae) and in orchids. *New Phytologist* **175**: 166–175.

Supplementary Data

Figure S1: mean values of total N content (in %) in the three sites studied. Crosses indicate raw data; bars represent 95% confidence intervals of the mean (see Table 1). Different letters denote different means according to the Games-Howell test.

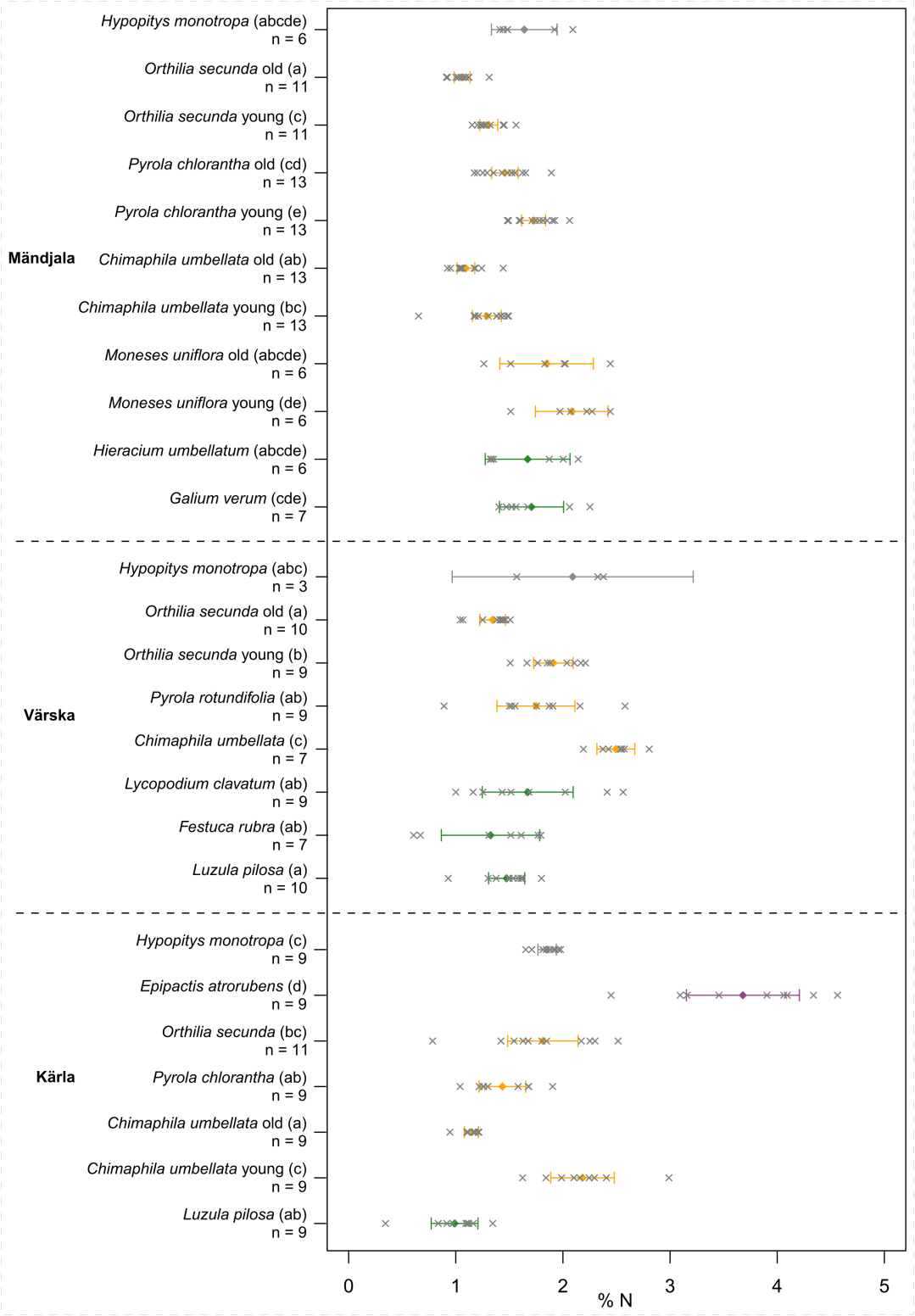


Figure S2: evolution of $\varepsilon^{13}C$ mean values over the 2009 growth season for the pyroloids found at Värska (a) and Kärla (b). Successive samplings were made in April, June, August and November at Värska and May, June, July and November at Kärla (see exact dates in Materials and Methods). For a given species at a given site, '#' indicates MX nutrition based on its isotopic signature (Fig. 2). Different letters denote different means according to Tukey's HSD test; bars represent 95% confidence intervals of the mean.

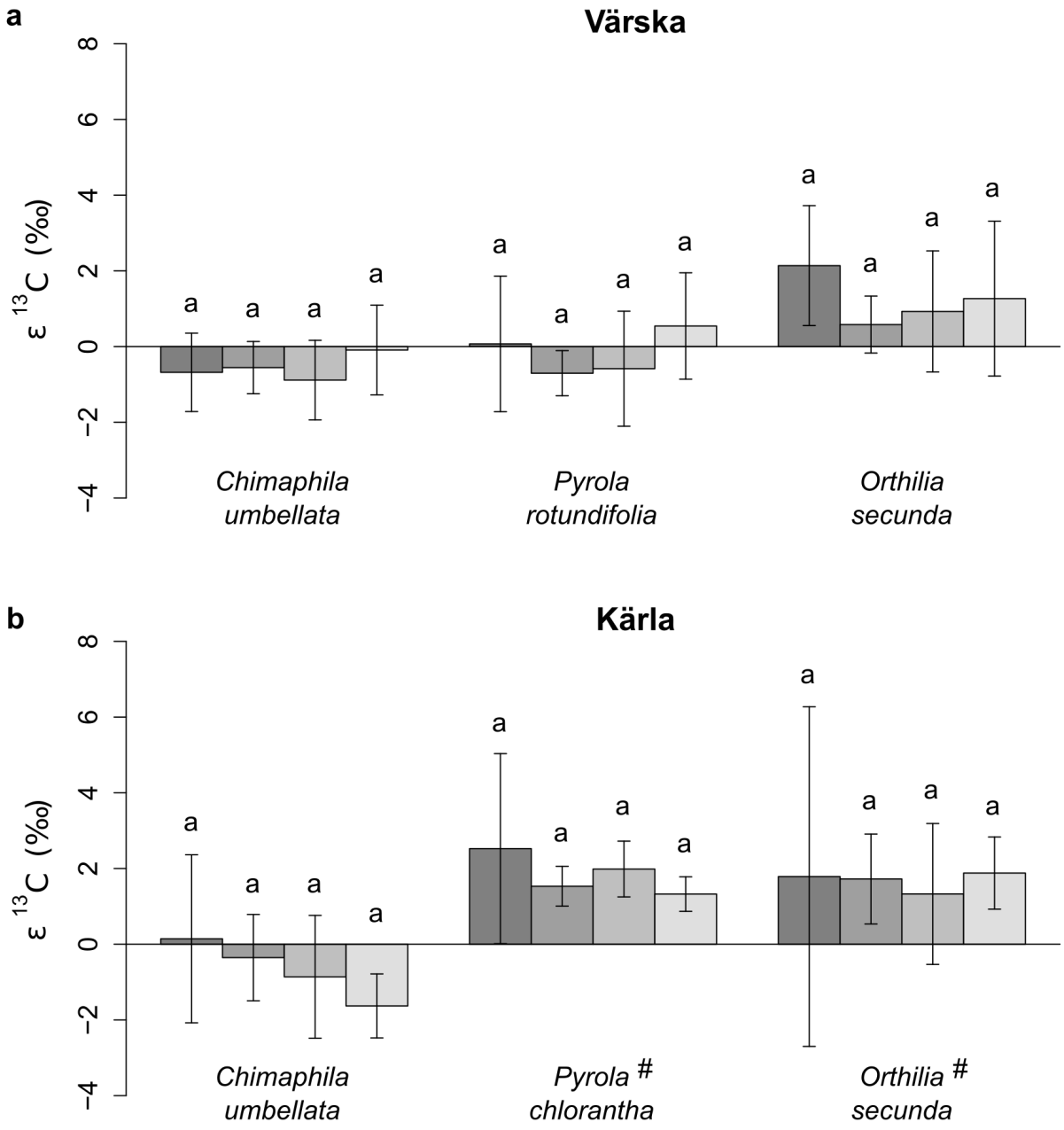


Figure S3: average difference between old and young leaves from the same plot for (a) $\delta^{13}C$, (b) $\delta^{15}N$ and (c) N content. Significant deviations from zero (*) were assessed using paired Student's t-tests. Mean values ± 95% confidence intervals are shown.

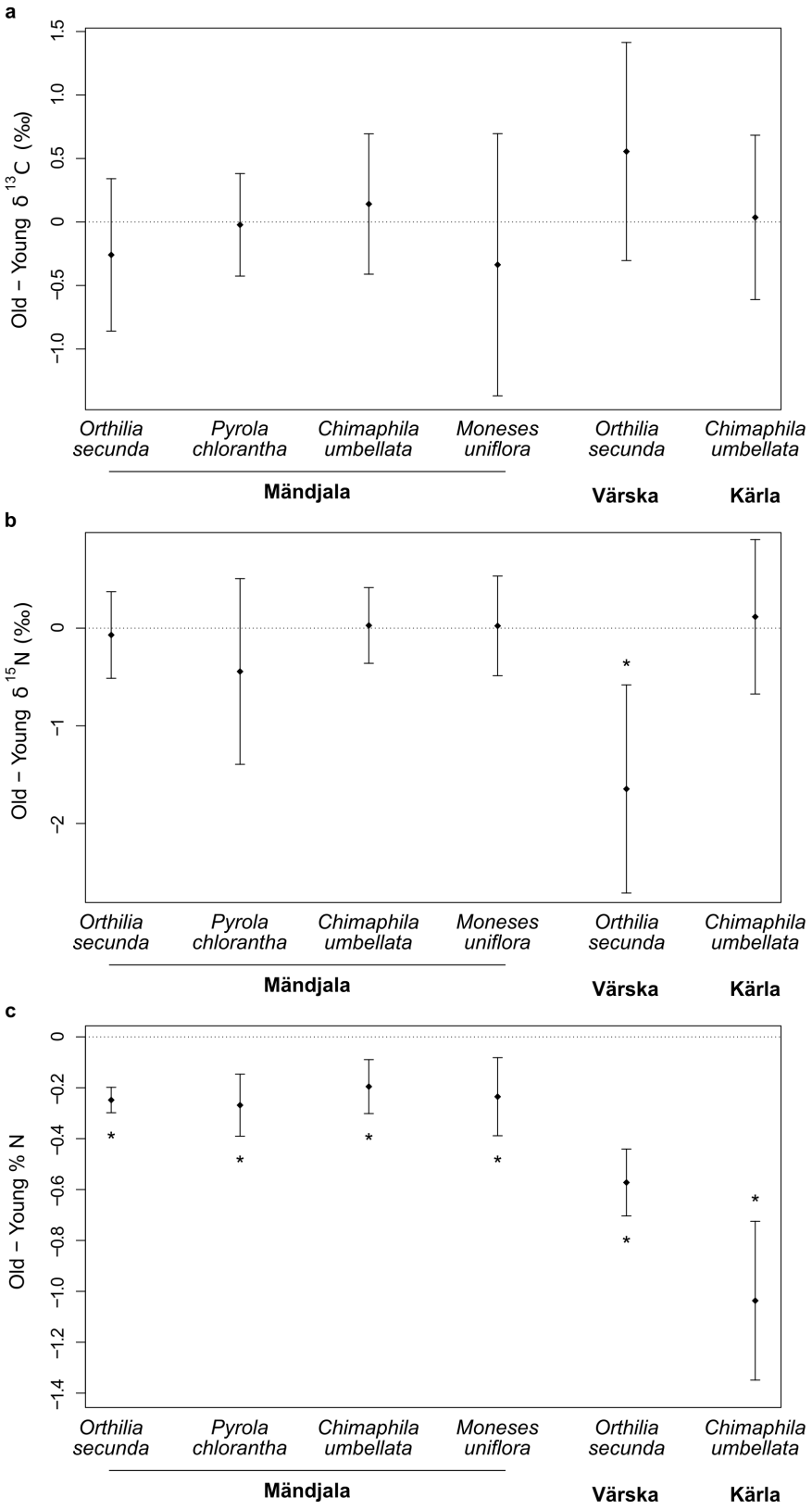


Figure S4: variability of light conditions in the three studied sites (with n, number of plots where environmental data have been collected).

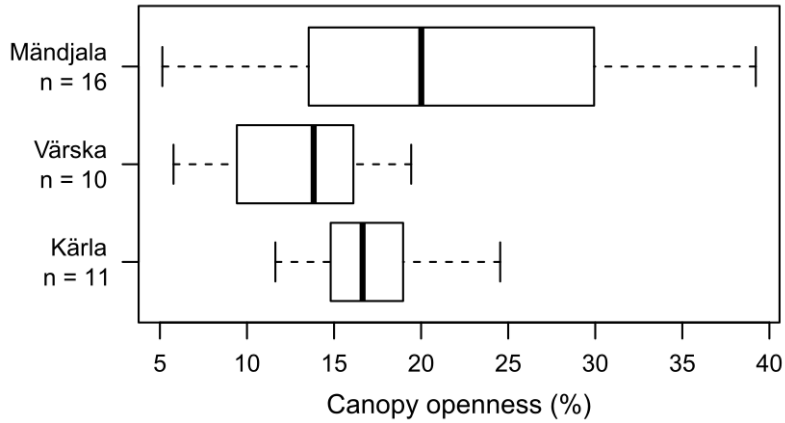


Table S1: raw dataset used in this study. **Too large to be part of the PhD thesis manuscript, available upon request.**

Table S2: summary of linear regressions of bulk leaf $\varepsilon^{13}C$ (*i.e.* difference in $\delta^{13}C$ to mean autotroph values of same plot) against light level in the three studied sites. Colors indicate a positive (light red) or negative (light blue) relationship between the parameters. When $p > 0.05$, an indication of R^2 is given as follows: '+', $R^2 > 0.1$ with a positive correlation; '-', $R^2 > 0.1$ with a negative correlation; or '0', $R^2 < 0.1$. The *p-values* are not corrected for multiple comparisons. For a given site, underlined species are MX based on their isotopic signatures (see Fig. 1).

Nutrition	Species	Mändjala	Värska	Kärla
Pyroloid	*Moneses uniflora*	-		
	Chimaphila umbellata	0	0	0
	Pyrola chlorantha	0 #		0 #
	Pyrola rotundifolia		0	
	Orthilia secunda	0 #	+	0 #
Mixotroph	*Epipactis atrorubens*			-0.46 ; 0.044 #

Species for which isotopic signature denotes a mixotrophic nutrition at this site (see Fig. 1)

Table S3: summary of linear regressions for bulk leaf $\delta^{15}N$ values against light level in the three studied sites. When $p < 0.05$, the values of R^2 (left) and p (right) are given. '+' or '-' indicates a positive or a negative relationship. When $p > 0.05$, an indication of R^2 is given as follows: '+', $R^2 > 0.1$ with a positive correlation; '-', $R^2 > 0.1$ with a negative correlation; or '0', $R^2 < 0.1$. The *p-values* are not corrected for multiple comparisons. *H. monotropa* at Värska was too rare to test for linear regression.

Nutrition	Species	Mändjala	Värska	Kärla
Autotroph	*Galium verum*	+		
	Hieracium umbellatum	0		
	Luzula pilosa		-	0
	Festuca rubra		0	
	Lycopodium clavatum		0	
Pyroloid	*Moneses uniflora*	+		
	Chimaphila umbellata	0	-	0
	Pyrola chlorantha	+ #		+ #
	Pyrola rotundifolia		-	
	Orthilia secunda	- #	0	- #
Mixotroph	*Epipactis atrorubens*			- #
Mycoheterotroph	*Hypopitys monotropa*	-		+

Species for which isotopic signature denotes a mixotrophic nutrition at this site (see Fig. 1)

ARTICLE IV

Mycorrhizal associations and trophic modes in coexisting orchids: an ecological continuum between auto- and mixotrophy

AVANT-PROPOS

Cet article illustre, chez plusieurs espèces d'orchidées d'un écosystème côtier, la démarche classiquement suivie pour détecter et caractériser la mixotrophie : détermination des espèces de champignons mycorhiziens associés et comparaison des enrichissement en ^{13}C et ^{15}N par rapport à des espèces autotrophes voisines. L'objectif de ces travaux était d'explorer les liens entre la nature des partenaires fongiques (rhizoctonias ou champignons ectomycorhiziens) et le type de nutrition indiqué par la signature isotopique.

Les communautés fongiques ont montré un continuum entre une domination par des rhizoctonias et un domination par des champignons ectomycorhiziens, avec notamment une répartition équilibrée chez *Herminium monorchis*. Cependant, un cortège essentiellement ectomycorhizien chez *Liparis loeselii* n'était pas associé à un enrichissement en ^{13}C typique d'une nutrition mixotrophe, comme c'était le cas chez *Epipactis neerlandica*. Ces résultats nous invitent à nuancer le caractère systématique du lien entre « présence de champignons ectomycorhiziens » et « mixotrophie ». Ils révèlent au contraire que des champignons ectomycorhiziens pourraient tout à fait coloniser les racines sans pour autant former de mycorhizes, en tant que simples endophytes. Cette association lâche et flexible pourrait toutefois constituer un terrain favorable à l'émergence d'une interaction plus étroite et donc à la mixotrophie.

Cet article a été publié dans la revue *Frontiers in Plant Science* au mois d'août 2017.

J'ai collaboré à cette étude au cours de ma deuxième année de thèse en prenant en charge le traitement des données isotopiques, la rédaction des résultats correspondants et la relecture générale de l'article.

frontiers in Plant Science

ORIGINAL RESEARCH
published: 29 August 2017
doi: 10.3389/fpls.2017.01497

Mycorrhizal Associations and Trophic Modes in Coexisting Orchids: An Ecological Continuum between Auto- and Mixotrophy

Hans Jacquemyn[1]†, Michael Waud[1], Rein Brys[2], Félix Lallemand[3], Pierre-Emmanuel Courty[4], Alicja Robionek[5,6] and Marc-André Selosse[3,6]*†*

[1] Plant Conservation and Population Biology, Department of Biology, KU Leuven, Leuven, Belgium, [2] Research Institute for Forest and Nature, Geraardsbergen, Belgium, [3] Institut de Systématique, Évolution, Biodiversité, UMR 7205, CNRS, MNHN, UPMC, EPHE, Muséum National d'Histoire Naturelle, Sorbonne Universités, Paris, France, [4] Department of Biology, University of Fribourg, Fribourg, Switzerland, [5] The Laboratory of Freshwater Ecology, Department of Plant Ecology, University of Gdańsk, Gdańsk, Poland, [6] Department of Plant Taxonomy and Nature Conservation, University of Gdańsk, Gdańsk, Poland

OPEN ACCESS

Edited by:
Essaid Ait Barka,
University of Reims Champagne-Ardenne, France

Reviewed by:
Richard S. Winder,
Natural Resources Canada, Canada
Raffaella Balestrini,
Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Italy

***Correspondence:**
Hans Jacquemyn
hans.jacquemyn@kuleuven.be
Marc-André Selosse
ma.selosse@wanadoo.fr

† These authors have contributed equally to this work.

Specialty section:
This article was submitted to Plant Microbe Interactions, a section of the journal Frontiers in Plant Science

Received: 17 June 2017
Accepted: 14 August 2017
Published: 29 August 2017

Citation:
Jacquemyn H, Waud M, Brys R, Lallemand F, Courty P-E, Robionek A and Selosse M-A (2017) Mycorrhizal Associations and Trophic Modes in Coexisting Orchids: An Ecological Continuum between Auto- and Mixotrophy. Front. Plant Sci. 8:1497. doi: 10.3389/fpls.2017.01497

Two distinct nutritional syndromes have been described in temperate green orchids. Most orchids form mycorrhizas with rhizoctonia fungi and are considered autotrophic. Some orchids, however, associate with fungi that simultaneously form ectomycorrhizas with surrounding trees and derive their carbon from these fungi. This evolutionarily derived condition has been called mixotrophy or partial mycoheterotrophy and is characterized by ^{13}C enrichment and high N content. Although it has been suggested that the two major nutritional syndromes are clearly distinct and tightly linked to the composition of mycorrhizal communities, recent studies have challenged this assumption. Here, we investigated whether mycorrhizal communities and nutritional syndromes differed between seven green orchid species that co-occur under similar ecological conditions (coastal dune slacks). Our results showed that mycorrhizal communities differed significantly between orchid species. Rhizoctonia fungi dominated in *Dactylorhiza* sp., *Herminium monorchis,* and *Epipactis palustris*, which were autotrophic based on ^{13}C and N content. Conversely, *Liparis loeselii* and *Epipactis neerlandica* associated primarily with ectomycorrhizal fungi but surprisingly, ^{13}C and N content supported mixotrophy only in *E. neerlandica*. This, together with the finding of some ectomycorrhizal fungi in rhizoctonia-associated orchids, suggests that there exists an ecological continuum between the two syndromes. The presence of a large number of indicator species associating with individual orchid species further confirms previous findings that mycorrhizal fungi may be important factors driving niche-partitioning in terrestrial orchids and therefore contribute to orchid coexistence.

Keywords: carbon nutrition, coexistence, mycoheterotrophy, orchids, partial mycoheterotrophy, rhizoctonia

INTRODUCTION

Since the early discoveries that orchids significantly rely on mycorrhizal fungi for seed germination and seedling establishment (Bernard, 1899; Burgeff, 1909), it has become increasingly clear that mycorrhizal fungi play an important role in carbon nutrition of orchids and therefore also in their population dynamics and spatial distribution (McCormick and Jacquemyn, 2014). In the early

stages of orchid development, fungi provide carbon to orchid seeds, which due to their tiny size lack the necessary nutritional resources to develop (Smith and Read, 2008; Dearnaley et al., 2016). Although several orchid species belonging to various, unrelated genera remain achlorophyllous at adulthood (Merckx, 2013) and maintain a continual reliance on fungal carbon (a nutrition called mycoheterotrophy), most orchids are green at adulthood and become photosynthetic after the first green leaves have developed. However, the extent to which mycorrhizal fungi contribute to carbon nutrition of adult green orchids remains unclear.

In general, two main nutritional syndromes have been described for adult green orchids (Selosse et al., 2016). In some green orchid species, often related to the above-mentioned achlorophyllous species, a partly heterotrophic syndrome has been described, called partial mycoheterotrophy or mixotrophy (Selosse and Roy, 2009; Hynson et al., 2013). Such species often grow in closed forest habitats with limited light-availability and associate with the same fungal guilds as achlorophyllous species, most often fungi that form ectomycorrhizae on surrounding trees (Bidartondo et al., 2004; Selosse et al., 2004). Direct evidence for mixotrophy comes from three observations. First, such orchids display reduced photosynthetic ability either due to intrinsic limitation (Girlanda et al., 2006; Cameron et al., 2008) or to environmental conditions (Julou et al., 2005). Secondly, achlorophyllous variants can survive in nature (Roy et al., 2013; Shefferson et al., 2016). Third, these orchids have ^{13}C and ^{15}N natural abundances and total N content that are intermediate between those of autotrophic plants and achlorophyllous orchids (Abadie et al., 2006; Hynson et al., 2013, 2016). The latter are highly enriched in both isotopes and have a high N content (Trudell et al., 2003; Hynson et al., 2016), likely because similar features characterize the biomass of the ectomycorrhizal fungi supporting them (Hynson et al., 2013). Thus, mixotrophic orchids combine photosynthesis and heterotrophic nutrition on ectomycorrhizal fungi.

The second syndrome, called autotrophy, concerns the vast majority of orchids that associate with basidiomycetous fungi collectively called 'rhizoctonias.' Rhizoctonia fungi belong to Tulasnellaceae, Ceratobasidiaceae (two families of the order Cantharellales), and Serendipitaceae (Sebacinales; Dearnaley et al., 2012) and behave as saprotrophs in the soil or as endophytes in non-orchid plants (Girlanda et al., 2011; Selosse and Martos, 2014). Based on *in vitro* evidence of mycorrhizal C flow observed in one species (Cameron et al., 2008), and on the fact that rhizoctonia-associated orchids do not show unusual ^{13}C enrichment, these orchids are usually considered autotrophic. Yet, this view has recently been questioned based on data that suggested orchid incorporation of organic matter issuing from a rhizoctonia source. Firstly, 'autotrophic' orchids still have minor deviations, either positive or negative, in ^{13}C abundance as compared to autotrophic species, coupled with high ^{15}N enrichment and high N content (Hynson et al., 2013; Selosse and Martos, 2014). Secondly, they display higher ^{2}H enrichment than autotrophic plants, a feature that may be explained if orchids receive ^{2}H-rich organic matter from their mycorrhizal fungi (Gebauer et al., 2016). Yet, despite evidence that rhizoctonia fungi are widespread orchid partners that support the nutrition during germination, they never fully support achlorophyllous adult orchids at maturity (see review in Dearnaley et al., 2012). Whenever a species from one of the families of rhizoctonia fungi was found to support full mycoheterotrophy, it belonged to species that by exception had ectomycorrhizal abilities (e.g., Bougoure et al., 2010; Yagame et al., 2012). Thus, the amount of C provided by rhizoctonia fungi to orchids may be limited by their specific saprotrophic or endophytic ecology (Selosse and Martos, 2014) and the occurrence of mixotrophy in rhizoctonia-associated orchids remains debated.

It has been suggested that the emergence of substantial levels of heterotrophy detectable by ^{13}C abundance is linked to a shift from rhizoctonia fungi, the ancestral orchids' partners, to ectomycorrhizal fungi, and that this shift has occurred frequently in orchid evolution (Hynson et al., 2013). Some orchid genera contain species with both types of nutritional syndrome and therefore support evidence for this evolutionary shift. Typical examples are species within *Cymbidium* (Ogura-Tsujita et al., 2012) or *Neottia* (Těšitelová et al., 2015). However, with the use of next-generation sequencing that considerably enhanced the depth of detection of fungal communities (Waud et al., 2014), there is increasing evidence that some ectomycorrhizal fungi can occur in rhizoctonia-associated orchids, and vice-versa (Jacquemyn et al., 2014, 2016a; Oja et al., 2015; Těšitelová et al., 2015). Clearly, this challenges the distinction between the two syndromes in terms of associated fungi.

In this study, we investigated the relationship between nutritional syndromes and the composition of mycorrhizal communities in a range of terrestrial green orchids that commonly co-occur in wet dune slacks. Dune slacks are linear depressions that lay close to sea level in coastal dune systems and are characterized by high irradiance levels. They often undergo a successional series. Young dune slacks are generally species-poor (Bossuyt et al., 2003), but as they age, the vegetation cover increases toward completion and a true soil begins to develop. Previous molecular investigations have shown that dune slacks contain very diverse mycorrhizal communities in the soil (Geml et al., 2014). More specifically, to assess whether each orchid species from dune slacks could be assigned to a definite fungal community and nutritional syndrome, we combined detailed assessments of the mycorrhizal communities associating with each orchid species with isotopic studies. Finally, we investigated the correlation between the dominant type of mycorrhizal fungi and the level of heterotrophy as detected by ^{13}C and N abundance.

MATERIALS AND METHODS

Study System

Molecular and isotopic data were collected from seven orchid species that co-occurred in two coastal dune slacks along the Belgian coast (Ter Yde: 51°8′18″ N – 2°42′14″ E; Westhoek: 51°5′16″ N – 2°33′48″ E). Both sampling sites were devoid of trees and had similar, high light conditions. The sampled orchid species included two *Epipactis* species (*E. neerlandica* and

E. palustris), three *Dactylorhiza* species (*D. fuchsii*, *D. incarnata*, and *D. praetermissa*), *Herminium monorchis*, and *Liparis loeselii*.

Mycorrhizal Sampling and Analyses

To assess differences in orchid mycorrhizal communities between the seven species, young roots of five replicate individuals were collected for each species in the most central part of each of the study populations in summer 2015. After roots were carefully excavated from the soil, they were transported to the laboratory and immediately surface sterilized (30 s submergence in 1% sodium hypochlorite, followed by three 30 s rinse steps in sterile distilled water). Mycorrhizal association was confirmed by detection of peloton structures using thin cross sections of orchid roots. These sections were gently cleared in hot alkali, stained using Trypan blue, and viewed with interference contrast microscopy (Brundrett et al., 1990). Subsequently, DNA was extracted from 0.5 g mycorrhizal root fragments using the UltraClean Plant DNA Isolation Kit as described by the manufacturer (Mo Bio Laboratories, Inc., Solana Beach, CA, United States) and 10 times diluted afterward. Amplicon libraries were created using the broad-spectrum internal transcribed spacer (ITS) primers ITS3 (5′-GCATCGATGAAGAACGCAG-3′) and ITS4OF (5′-TTACTAGGGGAATCCTTGTT-3′) (White et al., 1990; Taylor and McCormick, 2008). This primer pair has been shown to amplify substantial diversity of sequences and to detect a variety of orchid-associating mycorrhizal families (Waud et al., 2014). All samples (65 in total) were assigned unique MID (Multiplex Identifier) barcode sequences according to the guidelines for 454 GS-FLX Lib-L sequencing.

Polymerase chain reaction (PCR) amplification was performed in duplicate in a 25 μl reaction volume containing 0.15 mM of each dNTP, 0.5 μM of each primer, 1 U Titanium Taq DNA polymerase, 1X Titanium Taq PCR buffer (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, United States), and 1 μl of a 10-times diluted DNA extract. PCR conditions were as follows: initial denaturation of 2 min at 94°C followed by 30 cycles of 45 s at 94°C, 45 s at 59°C, and 45 s at 72°C. After resolving the amplicons by agarose gel electrophoresis, amplicons within the appropriate size range (∼250–500 bp) were cut from the gel and purified using the Qiaquick gel extraction kit (Qiagen, Hamburg, Germany). Purified dsDNA amplicons were quantified using the Qubit fluorometer (Invitrogen) and pooled in equimolar quantities of 1.00E+10 molecules per sample. This yielded two amplicon libraries, each representing one of the two PCR replicates. The quality of the amplicon libraries was assessed using an Agilent Bioanalyzer 2100 and high sensitivity DNA chip (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Each amplicon library was loaded onto 1/8th of a 454 Pico Titer Plate (PTP). Pyrosequencing was performed using the Roche GS FLX instrument and Titanium chemistry according to the manufacturer's instructions (Roche Applied Science, Mannheim, Germany).

Stable Isotope Analyses

Samples for isotopic analysis were collected from the same set of orchids at Ter Yde and Westhoek in summer 2015, at the same time that roots were collected for mycorrhizal analyses. At Ter Yde, we sampled *Epipactis palustris*, *E. neerlandica* and *Dactylorhiza praetermissa*, and at Westhoek, in addition to the two first previous species, we sampled *Dactylorhiza fuchsii*, *D. incarnata*, *H. monorchis*, and *L. loeselii*. At both sites, we also sampled representatives of several surrounding non-orchid autotrophic plants (see names in **Figure 4**). For each species, we collected five leaves, each from different plants. Samples were ground in 2 mL Eppendorf tubes in a ball mill (MM200, Retsch Gmbh, Haan, Germany) and analyzed for total N concentration, as well as $^{13}C/^{12}C$ and $^{15}N/^{14}N$ ratios using an elemental analyser (EA) coupled to a ThermoFinnigan DeltaV Advantage Continuous-Flow Isotope-ratio mass spectrometer, and expressed as δ-values (Hynson et al., 2013). Isotope values were calibrated using internal calibrated standards (EDTA and ammonium oxalate). The standard deviations of the replicated standard samples were 0.029‰ for ^{13}C and 0.215‰ for ^{15}N.

Data Analyses

Fungal Diversity

Sequences obtained from 454 pyrosequencing were assigned to the appropriate sample based on both barcode and primer sequences, allowing zero discrepancies, and were subsequently trimmed from the barcodes and primers using CUTADAPT 1.0 (Martin, 2011). Sequences were trimmed based on a minimum Phred score of 30 (base call accuracy of 99.9%) averaged over a 50 bp moving window. Sequences with ambiguous base calls or homopolymers longer than eight nucleotides were rejected, as were chimeric sequences detected by the UCHIME chimera detection program (*de novo* algorithm) (Edgar et al., 2011). Sequences which passed all quality control procedures were used as the basis for all further analyses. Minimum and maximum sequence lengths were set to 250 and 500 nucleotides, respectively. For further analysis, sequence data obtained for both PCR replicates were combined for each sample.

Operational taxonomic units (OTUs) were determined using UPARSE (Edgar, 2013), with sequences exceeding 97% sequence homology being clustered into the same OTU (Jacquemyn et al., 2015, 2016a,b; Oja et al., 2015). Global singletons and global doubletons (i.e., OTUs representing only one or two sequences in the whole dataset) were removed from further analysis since it has been shown that this improves the accuracy of diversity estimates (Ihrmark et al., 2012; Waud et al., 2014). The remaining OTUs were assigned taxonomic identities to the highest taxonomic rank possible based on BLAST (Altschul et al., 1990) results of representative sequences (as indicated by UPARSE) using GenBank (Benson et al., 2008), including uncultured/environmental entries. Finally, we manually screened OTUs for possible orchid-associating mycorrhizal families based on the data provided in Table 12.1 in Dearnaley et al. (2012) and information of previously detected mycorrhizal fungi from the roots, germinating seeds and protocorms of various *Epipactis* and *Dactylorhiza* species and *L. loeselii* (Kristiansen et al., 2001; Bidartondo et al., 2004; Selosse et al., 2004; Bidartondo and Read, 2008; Ogura-Tsujita and Yukawa, 2008; Ouanphanivanh et al., 2008; Shefferson et al., 2008;

Illyés et al., 2009; Bailarote et al., 2012; Těšitelová et al., 2012; Jacquemyn et al., 2012, 2016b; Waud et al., 2017). Only OTUs corresponding to known orchid-associating mycorrhizal families were retained for further analysis. No previous data were available for *H. monorchis*.

Fungal Community Composition

Based on presence–absence data of the observed orchid mycorrhizal fungi in each of the sampled individuals, the fungal community composition associating with the different orchid species was visualized by non-metric multidimensional scaling (NMDS) using the Bray-Curtis coefficient as distance measure in the R software package 'vegan' (Oksanen et al., 2013). To test the hypothesis that the mycorrhizal communities differed between the sampled orchid species, we performed permutational analysis of variance (PERMANOVA; Anderson, 2001) using the 'adonis' function in the software package 'vegan' (Oksanen et al., 2013). Finally, Species Indicator Analysis was used to investigate whether mycorrhizal fungi could be identified that were significantly associated with one of the investigated orchid species. The 'multipatt' function in the R package 'indicspecies' (De Cáceres et al., 2010) was used to define indicator species of both individual species and combinations of species.

Isotope Signatures

For species found at two different sites, a Student's *t*-test was used to test whether the mean $\delta^{13}C$ or $\delta^{15}N$ differed between sites. Analysis of variance (ANOVA) was used to evaluate differences in mean $\delta^{13}C$, $\delta^{15}N$, and % N among species from a given site. If the null hypothesis (no difference between means) was rejected, Tukey's honestly significant difference (HSD) test was used to make pairwise multiple comparisons of the means. The alpha type I error threshold was set at 0.05. All statistical analyses were performed using the R environment for statistical computing (R Development Core Team , 2013).

RESULTS

Mycorrhizal Diversity

The quality-filtered pyrosequencing data set comprised 556 fungal OTUs (89900 sequences), of which 104 (64732 sequences – 72.0%) were assigned to putatively orchid mycorrhizal OTUs according to Dearnaley et al. (2012) and information from previous studies that detected mycorrhizal fungi from the roots and protocorms of these and related orchid species (Supplementary Table S1). Individual samples contained on average 996 sequences of putatively orchid mycorrhizal OTUs, although there was substantial variation between samples (minimum: 101, maximum: 5489). Representative sequences for each mycorrhizal OTU found in this study were submitted to GenBank under the Accession Numbers KY083558 – KY083678 and MF567576 – MF567600.

The majority of the detected fungi belonged to the Ceratobasidiaceae (8 OTUs, 20671 sequences) and Tulasnellaceae (10 OTUs, 9701 sequences) among rhizoctonia fungi, and ectomycorrhizal fungi from the Thelephoraceae (23 OTUs, 13297 sequences), Sebacinaceae (26 OTUs, 8420 sequences) and Inocybaceae (14 OTUs, 8261 sequences) (**Figure 1**). Besides, a number of other ectomycorrhizal taxa previously shown to associate with these orchid species were detected, including members of the Cortinariaceae (8 OTUs, 2709 sequences), Tuberaceae (1 OTU, 376 sequences), and Pezizaceae (4 OTUs, 97 sequences). Additionally, a number of ectomycorrhizal or possibly endophytic fungi belonging to the Psathyrellaceae, Tricholomataceae, and Russulaceae were only sporadically observed (**Figure 1**).

Mycorrhizal communities associating with each species were diverse (**Figure 2**) (average number of OTUs per species per population: 37.8 ± 7.6, range: 23–48) and all sampled individuals associated with multiple fungi simultaneously. The relative abundances of the fungal genera differed between species (**Figure 2**). Members of the Tulasnellaceae and Ceratobasidiaceae were retrieved from all sampled species, but only in very low abundances in *E. neerlandica* and *L. loeselii* (**Figure 2**). *Tulasnella* fungi were the dominant community members of *Dactylorhiza* species, whereas members of the Ceratobasidiaceae fungi dominated the mycorrhizal community associating with *E. palustris* (**Figure 2**), none of which clustered with ectomycorrhizal Ceratobasidiaceae taxa (*sensu* Veldre et al., 2013). Members of the Inocybaceae reached high relative abundances in *L. loeselii* and *E. neerlandica* and to a lesser extent in *H. monorchis*. *Tuber* reached high relative abundances in *E. neerlandica*, but was absent in all other species. Finally, members of the Sebacinaceae reached high relative abundances in *E. neerlandica*, whereas members of the Thelephoraceae had the highest relative abundances in *L. loeselii*.

Because *Tulasnella* strains have very derived ITS sequences (Dearnaley et al., 2012), additional analyses were performed using primers specifically designed for ITS detection of other *Tulasnella* species, in particular *Tulasnella calospora*. This strain appeared to be a major fungal associate in *L. loeselii* (Ouanphanivanh et al., 2008; Illyés et al., 2009) and was sporadically observed in *Dactylorhiza* (Jacquemyn et al., 2012, 2016b). However, while these primers successfully detected positive controls, the *Liparis* and *Dactylorhiza* root samples displayed no detectable strains of the *T. calospora* clade (**Supplementary Figure S1**).

The NMDS ordination showed that the investigated orchid species associated with distinctive mycorrhizal communities (**Figure 3**). The mycorrhizal communities associating with *E. neerlandica* and *L. loeselii* were clearly different from the other species, which tended to cluster together in the central part of the plot. The PERMANOVA analysis confirmed that community composition of mycorrhizal fungi differed significantly between the investigated orchid species ($R^2 = 0.34$, pseudo-$F = 3.81$, $P < 0.001$). Species Indicator Analysis revealed 24 indicator species. *Dactylorhiza* species were significantly associated with *Tulasnella* spp. (members of the rhizoctonias). *E. neerlandica* was significantly associated with ectomycorrhizal *Tuber*, *Inocybe* and several *Thelephora* OTUs, whereas rhizoctonia *Ceratobasidium* was a significant indicator species for *E. palustris*. Finally, *L. loeselii* significantly associated with several ectomycorrhizal *Thelephora* and *Inocybe* OTUs.

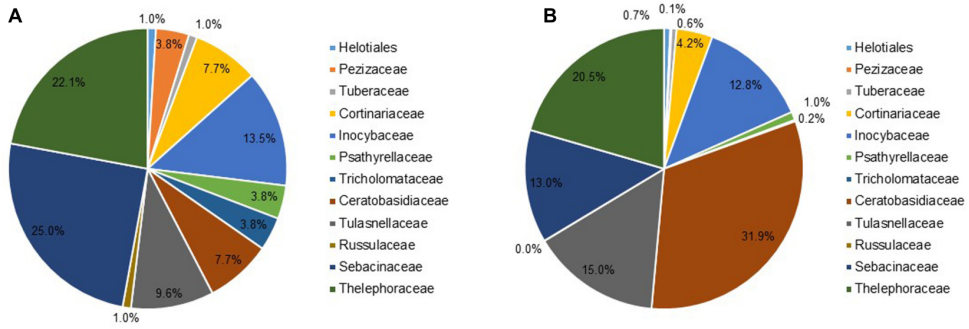


FIGURE 1 | Frequency distribution of **(A)** the number of OTUs and **(B)** the number of sequences for the different mycorrhizal families found associating with the seven orchid species (*Dactylorhiza fuchsii*, *D. incarnata*, *D. praetermissa*, *Epipactis neerlandica*, *E. palustris*, *Herminium monorchis*, and *Liparis loeselii*) investigated in this study.

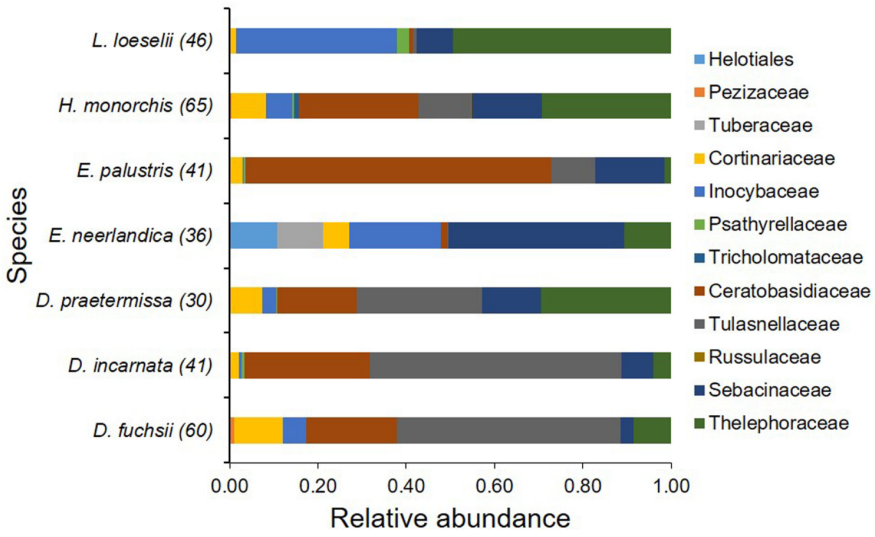


FIGURE 2 | Relative abundance of orchid mycorrhizal families associating with the seven orchid species that co-occur in dune slack communities. Relative abundance was calculated as the proportion of DNA sequences in each species assigned to each fungal family. The number of OTUs retrieved for each species is given between brackets.

Isotope and Total N Analyses of Coexisting Orchids at Westhoek and Ter Yde

At both sites, *E. neerlandica* was significantly more enriched in ^{13}C and ^{15}N than all other species ($P < 0.001$ for all comparisons), supporting a mixotrophic nutrition (**Figure 4**). $\delta^{13}C$ values for the species collected at the two sites did not differ significantly (namely for *E. neerlandica*, $P = 0.084$; *E. palustris*, $P = 0.227$; and *Rubus fruticosus* agg., $P = 0.342$). $\delta^{15}N$ values for *E. neerlandica* were significantly higher at Westhoek (6.48 ± 0.40; mean ± standard deviation) than at Ter Yde (4.57 ± 0.21; $P < 0.001$), whereas *E. palustris* showed lower values at Westhoek (-3.91 ± 0.20) compared to Ter Yde (-2.67 ± 0.22; $P < 0.001$), while *R. fruticosus* agg. had similar values at both sites ($P = 0.365$). Regarding autotrophic references, *Prunella vulgaris* at Westhoek had very low $\delta^{13}C$ (-32.01 ± 0.19; **Figure 4A**) compared to the mean value for other autotrophic species (-28.98 ± 0.75). At Westhoek, all orchids except *E. neerlandica* were depleted in ^{13}C relative to the autotrophic references except *P. vulgaris* ($P < 0.05$ for all comparisons). Notable exceptions were *D. fuchsii* and *E. palustris* that were not distinguishable from *Oenothera biennis* ($P = 0.616$; $P = 1$; **Figure 4A**). At Ter Yde, all orchids besides *E. neerlandica* were either depleted (compared to *Eupatorium cannabinum* and *R. fruticosus* agg., $P < 0.05$ for all comparisons) or enriched in ^{13}C (compared to *Senecio vulgaris*, $P < 0.05$ for both comparisons; **Figure 4B**) or showed no difference in ^{13}C (compared to *Leontodon* sp., $P > 0.05$ for both comparisons). As for ^{15}N, the orchids outside

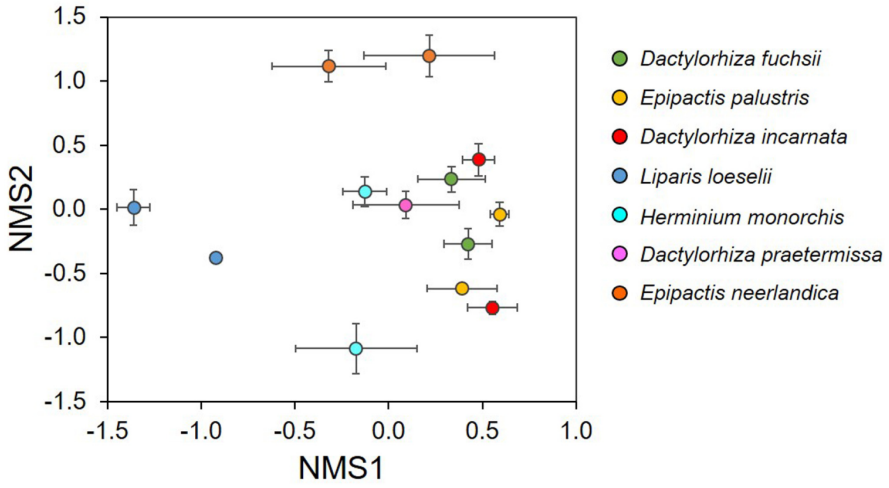


FIGURE 3 | Non-metric multidimensional scaling (NMDS) plot illustrating differences in mycorrhizal communities between seven orchid species that co-occur in dune slack communities. Each data point represents the average scores of five individual plants for each species and population.

E. neerlandica had higher $\delta^{15}N$ than most of the autotrophic references ($P < 0.05$ for all comparisons) at both sites; the only exceptions were *D. incarnata* and *H. monorchis* at Westhoek that were not distinguishable from *O. biennis* and *Salix repens* for the former ($P = 0.121$; $P = 0.998$) and *Salix* sp. for the latter ($P = 1$).

Considering total N concentrations, the orchids fell in three distinct groups at Westhoek (**Figure 5A**): *E. neerlandica* and *L. loeselii* had the highest N concentrations ($P < 0.001$ for all comparisons with other species); *D. fuchsii* and *E. palustris* had intermediate N concentrations ($P < 0.01$ for all comparisons with other species); and all other orchids did not significantly differ from most autotrophic non-orchid species ($P > 0.05$ for all comparisons with other species except *O. biennis*). The situation was similar at Ter Yde with *E. neerlandica* having the highest N concentration ($P < 0.001$ for all comparisons; **Figure 5B**), *E. palustris* having intermediate N concentrations ($P < 0.001$ for all comparisons), whereas *D. praetermissa* and autotrophic references had similar N concentrations ($P > 0.05$ for all comparisons) lower than those of the two former species. Overall, all orchids tended to be enriched in ^{15}N compared to surrounding autotrophic reference plants and four out of seven had higher total N concentrations, but only *E. neerlandica* also displayed the ^{13}C enrichment characterizing mixotrophy.

DISCUSSION

Rhizoctonia versus Ectomycorrhizal Fungi: A Continuum of Orchid-Fungus Associations in Dune Slacks

Our results showed that different orchid species co-occurring within dune slacks associated with diverse fungal communities. These fungi encompassed true rhizoctonia fungi (*sensu* Dearnaley et al., 2012), namely Tulasnellaceae and Ceratobasidiaceae (Serendipitaceae were absent), as well as various ectomycorrhizal clades (Thelephoraceae, Sebacinaceae, Inocybaceae, Tuberaceae, and Pezizaceae). The latter are likely supported by surrounding willows (*Salix repens*), which are ectomycorrhizal hosts to these taxa in dune ecosystems (Geml et al., 2014; Boonen et al., 2015) and which can provide them carbon. Their abundance in terms of reads and OTUs, given that they do not belong to usual contaminant fungi in soil samples, suggests that their presence has a true biological meaning. In *E. neerlandica* at least, the mycorrhizal status of these taxa can be supported since this species is phylogenetically close to, although ecologically isolated from *E. helleborine* (Jacquemyn et al., 2017). The latter commonly associates with ectomycorrhizal fungi (Bidartondo et al., 2004; Ogura-Tsujita and Yukawa, 2008; Těšitelová et al., 2012). Moreover, its isotopic values (see below) suggest that it belongs to mixotrophic species that receive organic matter from ectomycorrhizal fungi. In *L. loeselii*, the absence of rhizoctonia fungi also suggests that ectomycorrhizal fungi are the orchid's mycorrhizal partners.

Surprisingly, we did not observe a clear separation between orchids harboring rhizoctonia and ectomycorrhizal fungi, but rather a 'spectral' continuum of mycorrhizal communities was found, challenging the idea of a strict dichotomy between these two types of orchids. Our molecular analyses showed that all investigated species associated with both rhizoctonia and ectomycorrhizal fungi, although the prevalence of each fungal guild differed among species. At one extreme, *E. neerlandica* was nearly devoid of rhizoctonia fungi, whereas *L. loeselii* was very poor in rhizoctonia fungi; the same trend is also supported by analyses of this species at other sites (Waud et al., 2017). This trend contrasts with previous results from fen habitats in Hungary (Illyés et al., 2005, 2009), perhaps because the latter were obtained after *in vitro* isolation of the fungus: this procedure

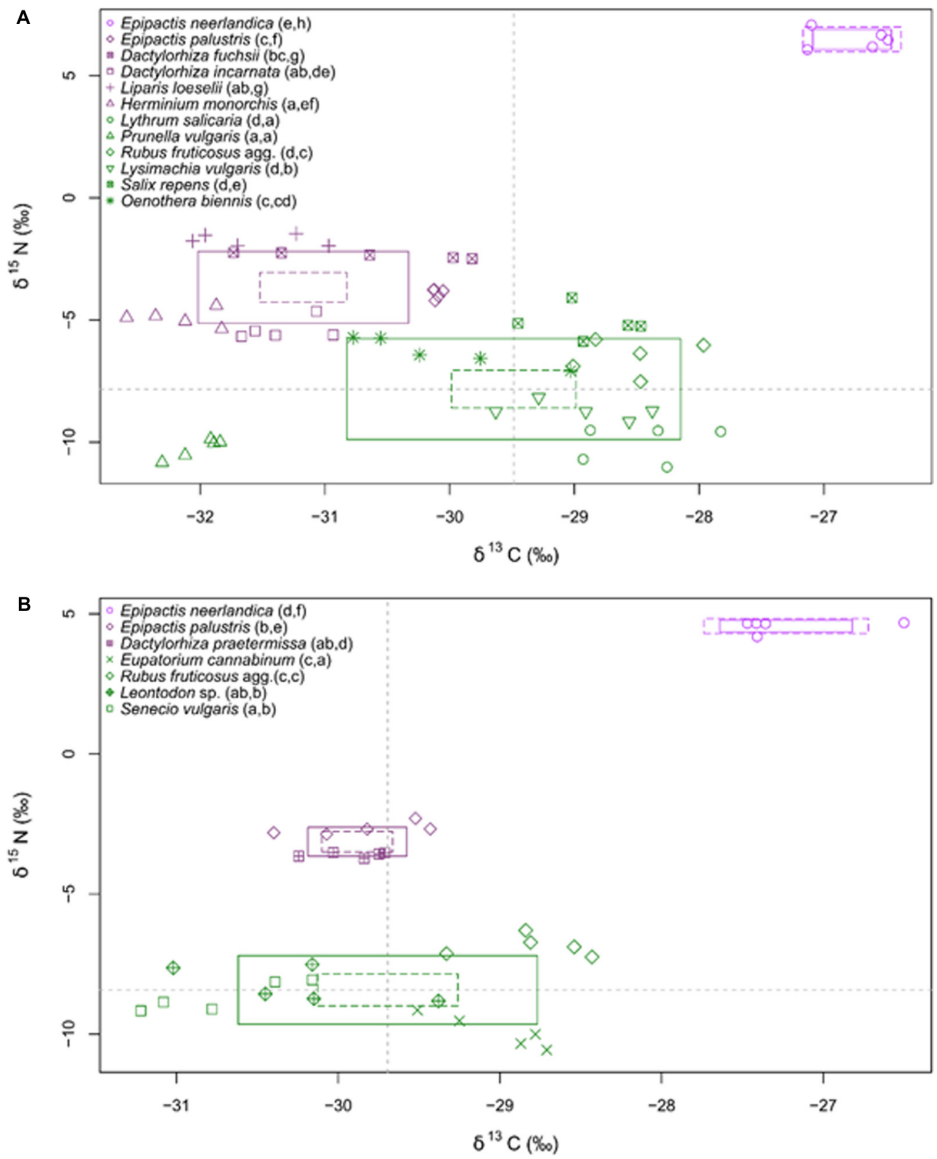


FIGURE 4 | $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ values of plants at Westhoek **(A)** and Ter Yde **(B)**. Values for autotrophic non-orchid species are in green, and for orchid species in violet (with *E. neerlandica* in pink violet); $n = 5$ replicates per species. The boxes show the 95% confidence interval (dotted line) and standard deviation (continuous line) for each category. The gray dotted lines indicate the mean $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ values for non-orchids autotrophs. Different letters in brackets following the names indicate significantly different values for, respectively, $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ ($P < 0.05$).

often screens against slow-growing ectomycorrhizal fungi. At the other extreme, *Dactylorhiza* spp. predominantly associated with rhizoctonia fungi, which largely supports previous works (e.g., Rasmussen, 1995; Kristiansen et al., 2001; Bidartondo et al., 2004; Shefferson et al., 2008; Bailarote et al., 2012; Jacquemyn et al., 2012, 2016b). *E. palustris* also showed a preference for rhizoctonia fungi, mainly fungi from the Ceratobasidiaceae and to a lesser extent from the Tulasnellaceae (Bidartondo et al., 2004; Jacquemyn et al., 2016a). An intermediate situation where both fungal guilds were present was found in *H. monorchis* (whose mycorrhizal fungi were never studied previously to the best of our knowledge; Rasmussen, 1995).

The presence of ectomycorrhizal fungi in rhizoctonia-associated orchids has only been reported sporadically before the rise of high-throughput barcoding methods (e.g., Kristiansen et al., 2001; Shefferson et al., 2007; Jacquemyn et al., 2010, 2011; Liebel et al., 2015; Těšitelová et al., 2015) and it was suggested that their presence should not be neglected in

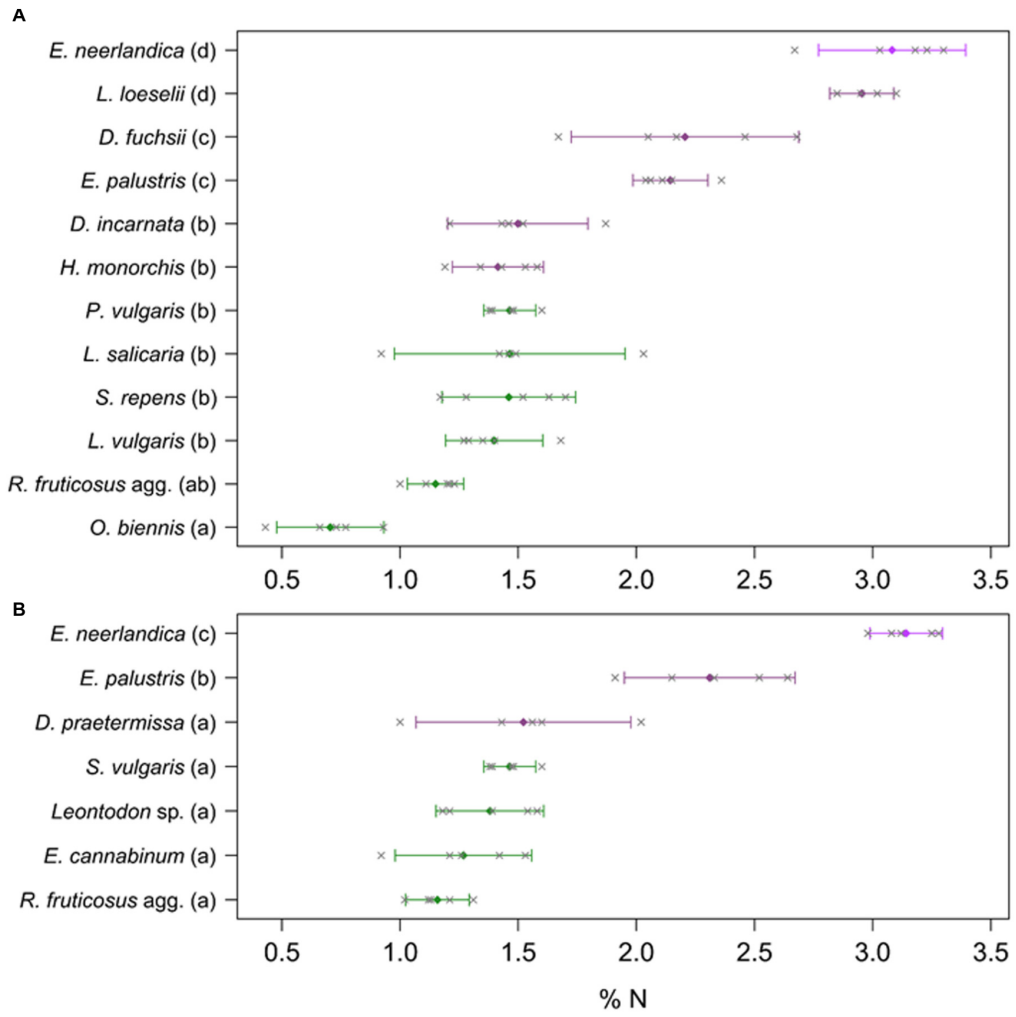


FIGURE 5 | Total N content of plants at Westhoek **(A)** and Ter Yde **(B)**. Non-orchids are in green and orchids are in violet (with *E. neerlandica* in pink violet); $n = 5$ replicates per species. Colored diamonds represent mean values whereas gray crosses show the five corresponding measures. Bars represent 95% confidence intervals; different letters indicate statistically significant differences ($P < 0.05$).

analyses of partner diversity (Selosse et al., 2010). The rise of next-generation sequencing, which significantly enhanced the sensitivity of detection and the ability to handle samples that are colonized by multiple fungi, confirmed this trend (e.g., Jacquemyn et al., 2014, 2015; Oja et al., 2015). Still, the exact interaction of ectomycorrhizal fungi with rhizoctonia-associated orchids, in terms of root (or even cell) colonization, and their functional importance remains unclear. It can be questioned whether they are simple intercellular endophytes or whether they form intracellular pelotons similar to true mycorrhizal fungi in orchids. More detailed microscopic and physiological investigations are now needed to investigate whether ectomycorrhizal fungi in rhizoctonia-associated orchids are simple root commensalists or whether they bring nutrients, as can be expected from their roles in mixotrophic orchid species that exclusively associate with them.

The Guild of Fungal Associates Does Not Always Predict Nutrition Type

Isotopic abundances showed that, although most orchids were enriched in ^{15}N abundance and total N, ^{13}C enrichment was only present in *E. neerlandica*, supporting the idea that it was the only mixotrophic orchid species based on these features. This species is the only one that grows at the edges of dune slacks, where the water table is probably lower than in dune slacks, and it was mostly colonized by ectomycorrhizal fungi of the Thelephoraceae, Tuberaceae, and Inocybaceae. Thus, *E. neerlandica* perfectly fits the mixotrophic syndrome described in the introduction. At the opposite, *D. fuchsii*, *D. incarnata*

and *D. praetermissa*, *E. palustris* and *H. monorchis*, with total N content and ^{13}C enrichment close to that of autotrophic non-orchid plants, fitted the syndrome of autotrophic orchids (see the possible reservations and current debates over the exact autotrophy in this syndrome in Introduction). Orchids that mostly associated with rhizoctonia fungi only tended to have slightly lower ^{13}C enrichments as compared to non-orchid plants (discussed below), suggesting that ectomycorrhizal fungi did not contribute massively to their carbon budget. This is especially true for *H. monorchis* that, in spite of a high abundance of ectomycorrhizal fungi, turned out to be even significantly depleted in 13C as compared to autotrophic non-orchid plants.

The situation was less clear for *L. loeselii*, which mainly associated with members of the Thelephoraceae and Inocybaceae, with minor and infrequent occurrence of rhizoctonia fungi (see also Waud et al., 2017). Although its total N content was similarly high to that of the mixotrophic *E. neerlandica*, it was not enriched in ^{13}C, and was in this respect similar to the orchids that mostly associated with rhizoctonia fungi. *L. loeselii* mycorrhizal partners are normally enriched in ^{13}C as other ectomycorrhizal fungi (Kohzu et al., 1999), although we did not measure this in the investigated sites, so that no evidence for mixotrophy was found in *L. loeselii*. Thus, the investigated species set from dune slacks display a disconnection between the presence of ectomycorrhizal fungi and mixotrophy, as estimated from ^{13}C and total N enrichment.

The Evolutionary Lability of Nutritional Syndromes in Orchids

Our results further support previous results that have shown that *E. palustris* is autotrophic (Bidartondo et al., 2004; Hynson et al., 2013; Schiebold et al., 2017). The confirmation of autotrophy in *E. palustris* contrasts with the mixtrophy usually observed in other *Epipactis* spp. (Selosse et al., 2004; Bidartondo et al., 2004; Gonneau et al., 2014; see Hynson et al., 2013 for review). The genus *Epipactis* therefore represents another example of orchid genera that encompass both mixo- and autotrophic species, such as also observed in *Cymbidium* (Ogura-Tsujita et al., 2012) and *Neottia* (Těšitelová et al., 2015). These genera are relevant to study the shift to mixotrophy (since autotrophy is likely the ancestral state), and the possibility of reversions from mixo- to autotrophy.

Our data confirm previous reports that have shown the presence of ectomycorrhizal fungi in orchids that primarily associate with rhizoctonia-like fungi. Even if their exact role and influence remain unclear in autotrophic orchids, they may potentially indicate a first step in the evolution of mixotrophy assisted by ectomycorrhizal fungi, and suggest that the evolution to mixotrophy occurs in two consecutive steps. In such a scenario, ectomycorrhizal fungi would first gradually replace rhizoctonia fungi as mycorrhizal partners, without necessarily providing carbon, as suggested by the investigated *L. loeselii*. Subsequently, their indirect access to substantial nutrient resources from tree photosynthesis may allow the evolution of mixotrophy. However, whether ectomycorrhizal fungi in rhizoctonia-associated orchids represent a true predisposition remains to be assessed in other orchid lineages where mixotrophy has evolved. In this framework, the genus *Epipactis* represents, among others, an interesting taxon where the mix of species with different trophic modes and different symbionts, rhizoctonia and/or ectomycorrhizal fungi, offers possibilities to test this scenario thanks to phylogenetic reconstructions.

CONCLUSION

Overall, our data demonstrate that co-occurring orchid species have distinctive mycorrhizal communities and indicate that the association with rhizoctonia fungi versus ectomycorrhizal fungi is not an alternative, but rather a continuum between extremes that exists within a given ecosystem. Moreover, our combined analysis of isotopes and fungal communities revealed that the presence of ectomycorrhizal fungi does not entail evidence for mixotrophy, at least in terms of ^{13}C and N content, as shown by *L. loeselii*. There are thus intermediates between the two extreme syndromes, namely rhizoctonia-associated orchids, often considered autotrophic, versus mixotrophic orchids associated with ectomycorrhizal fungi. This questions whether a low level of colonization by ectomycorrhizal fungi in rhizoctonia-associated orchids may predispose to the evolutionary transition to an association with ectomycorrhizal fungi in some orchid phyla. Our results therefore call for a more precise understanding of the nature and physiological significance of ectomycorrhizal fungi present within rhizoctonia-associated orchids.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

HJ, RB, and M-AS designed the experiment, HJ and RB performed the field work, MW performed the molecular analyses, FL, P-EC, and AR performed the isotope analyses, HJ, MW, and FL performed the statistical analyses, HJ and M-AS wrote the first draft of the manuscript, all authors read and approved the final draft.

ACKNOWLEDGMENTS

M-AS laboratories are supported by the 2015/18/A/NZ8/00149 grant funded by National Science Centre (Poland) and the Fondation Ars Cuttoli & Paul Appell, under the umbrella of the Fondation de France. MW acknowledges funding from the European Research Council (ERC starting grant 260601 – MYCASOR granted to HJ) and KU Leuven Onderzoeksraad.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2017.01497/full#supplementary-material

FIGURE S1 | Gel results from PCR analyses conducted for verification of *Tulasnella* species presence/absence in **(A)** *Liparis loeselii* and **(B)** *Dactylorhiza* root samples using an enhanced version of the *Tulasnella* specific primer combination for ITS (namely ITS1ngs/ITS4-Tul2, described in Oja et al., 2015). Similar results were obtained using the primer pair ITS1/ITS4-Tul (data not shown). Expected *Tulasnella* species band size range from 600 to 1200 bp based on previous experiments. PCR reactions were conducted in duplicated 25 μl reactions containing 5 ng DNA extract, 1 U Titanium Taq (Takara, Bio, United States), 2 mM dNTPs, and 20 μM primer combination ITS1ngs/ITS4-Tul2. The amplification program was as follows: 2 min at 95°C, followed by 30 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 55°C, 1 min at 72°C and a final step at 72°C for 10 min. Duplicated PCR reactions were pooled and 5 μl of pooled PCR product was checked for amplification by separation on 1.5% agarose gel. Lane components for **(A)** are as follows: MM, SmartLadder reference (Eurogentec, Belgium); Lane 1, negative control – no template DNA; Lane 2, negative fungal DNA control – *Mortierella isabellina* isolate UAMH 5163; Lane 3, positive control – *Tulasnella calospora* isolate CBS 573.83; Lanes 4–5, non-*Tulasnella* mycorrhizal control – *Salix repens* root samples; Lanes 6–15, *Liparis loeselii* root samples. Lane components for *Dactylorhiza* species **(B)** are as follows: MM, SmartLadder reference (Eurogentec, Belgium); Lane 1, negative control – no template DNA; Lane 2, negative fungal DNA control – *Mortierella isabellina* isolate UAMH 5163; Lane 3, positive control – *Tulasnella calospora* isolate CBS 573.83; Lane 4, positive control – *Tulasnella* sp. isolate CBS 482.93; Lane 5, positive control – *Tulasnella* sp. isolate CBS 487.93; Lane 6, positive control – *Tulasnella* sp. isolate CBS 606.93; Lanes 7–8, non-*Tulasnella* mycorrhizal control – *Salix repens* root samples; Lanes 9–13, *Dactylorhiza fuchsii* (Westhoek) root samples; Lanes 14–18, *Dactylorhiza incarnata* (Westhoek) root samples; Lanes 19–23, *Dactylorhiza fuchsii* (Ter Yde) root samples; Lanes 24–28, *Dactylorhiza incarnata* (Ter Yde) root samples.

REFERENCES

Abadie, J. C., Puttsepp, U., Gebauer, G., Faccio, A., Bonfante, P., and Selosse, M.-A. (2006). *Cephalanthera longifolia* (Neottieae, Orchidaceae) is mixotrophic: a comparative study between green and nonphotosynthetic individuals. *Can. J. Bot.* 84, 1462–1477. doi: 10.1111/j.1438-8677.2009.00252.x

Altschul, S. F., Gish, G. W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2

Anderson, M. J. (2001). A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecol.* 26, 32–46.

Bailarote, B. C., Lievens, B., and Jacquemyn, H. (2012). Does mycorrhizal specificity affect orchid decline and rarity? *Am. J. Bot.* 99, 1655–1665. doi: 10.3732/ajb.1200117

Benson, D. A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., and Wheeler, D. L. (2008). GenBank. *Nucleic Acids Res.* 36, 25–30. doi: 10.1093/nar/gkm929

Bernard, N. (1899). Sur la germination du *Neottia nidus-avis*. Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'académie des sciences. *Paris* 128, 1253–1255.

Bidartondo, M. I., Burghardt, B., Gebauer, G., Bruns, T. D., and Read, D. J. (2004). Changing partners in the dark: isotopic and molecular evidence of ectomycorrhizal liaisons between forest orchids and trees. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 271, 1799–1806. doi: 10.1098/rspb.2004.2807

Bidartondo, M. I., and Read, D. J. (2008). Fungal specificity bottlenecks during orchid germination and development. *Mol. Ecol.* 17, 3707–3716. doi: 10.1111/j.1365-294X.2008.03848.x

Boonen, S., Kafserud, H., Carlsen, T., Blaalid, R., and Heiland, K. (2015). Mycorrhizal fungal communities in coastal sand dunes and heaths investigated by pyrosequencing analyses. *Mycorrhiza* 25, 447–456. doi: 10.1007/s00572-014-0624-1

Bossuyt, B., Honnay, O., and Hermy, M. (2003). An island biogeographical view of the successional pathway in wet dune slacks. *J. Veg. Sci.* 14, 781–788. doi: 10.1111/j.1654-1103.2003.tb02210.x

Bougoure, J. J., Brundrett, M. C., and Grierson, P. F. (2010). Carbon and nitrogen supply to the underground orchid, *Rhizanthella gardneri*. *New Phytol.* 186, 947–956. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03246.x

Brundrett, M. C., Murase, G., and Kendrick, B. (1990). Comparative anatomy of roots and mycorrhizae of common Ontario trees. *Can. J. Bot.* 68, 551–578. doi: 10.1139/b90-076

Burgeff, H. (1909). *Die Wurzpilze der Orchideen, ihre Kultur und ihr Leben in der Pflanze*. Jena: G. Fisher.

Cameron, D. D., Johnson, I., Read, D. J., and Leake, J. R. (2008). Giving and receiving: measuring the carbon cost of mycorrhizas in the green orchid, *Goodyera repens*. *New Phytol.* 180, 176–184. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02533.x

De Cáceres, M., Legendre, P., and Moretti, M. (2010). Improving indicator species analysis by combining groups of sites. *Oikos* 119, 1674–1684. doi: 10.1111/j.1600-0706.2010.18334.x

Dearnaley, J. W. D., Martos, F., and Selosse, M. A. (2012). "Orchid mycorrhizas: molecular ecology, physiology, evolution and conservation aspects," in *Fungal Associations*, ed. B. Hock (Berlin: Springer-Verlag), 207–230.

Dearnaley, J. W. D., Perotto, S., and Selosse, M. A. (2016). "Structure and development of orchid mycorrhizas," in *Molecular Mycorrhizal Symbiosis*, ed. F. Martin (Berlin: Springer-Verlag), 63–86. doi: 10.1002/9781118951446.ch5

Edgar, R. C. (2013). UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat. Methods* 10:996. doi: 10.1038/nmeth.2604

Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C., and Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 27, 2194–2200. doi: 10.1093/bioinformatics/btr381

Gebauer, G., Preiss, K., and Gebauer, A. C. (2016). Partial mycoheterotrophy is more widespread among orchids than previously assumed. *New Phytol.* 211, 11–15. doi: 10.1111/nph.13865

Geml, J., Gravendeel, B., van der Gaag, K. J., Neilen, M., Lammers, Y., Raes, N., et al. (2014). The contribution of DNA barcoding to fungal conservation: diversity assessment, habitat partitioning and mapping red-listed fungi in protected coastal *Salix repens* communities in the Netherlands. *PLoS ONE* 9:e99852. doi: 10.1371/journal.pone.0099852

Girlanda, M., Segreto, R., Cafasso, D., Liebel, H. T., Rodda, M., Ercole, E., et al. (2011). Photosynthetic Mediterranean meadow orchids feature partial mycoheterotrophy and specific mycorrhizal associations. *Am. J. Bot.* 98, 1148–1163. doi: 10.3732/ajb.1000486

Girlanda, M., Selosse, M. A., Cafasso, D., Brilli, F., Delfine, S., Fabbian, R., et al. (2006). Inefficient photosynthesis in the Mediterranean orchid *Limodorum abortivum* is mirrored by specific association to ectomycorrhizal Russulaceae. *Mol. Ecol.* 15, 491–504. doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02770.x

Gonneau, C., Jersáková, J., de Tredern, E., Till-Bottraud, I., Saarinen, K., Sauve, M., et al. (2014). Photosynthesis in perennial mixotrophic *Epipactis* spp. (Orchidaceae) contributes more to shoot and fruit biomass than to hypogeous survival. *J. Ecol.* 102, 1183–1194. doi: 10.1111/1365-2745.12274

Hynson, N. A., Madesen, T. P., Selosse, M. A., Adam, I. K. U., Ogura-Tsujita, Y., Roy, M., et al. (2013). "The physiological ecology of mycoheterotrophy," in *Mycoheterotrophy: The Biology of Plants Living on Fungi*, ed. V. S. F. T. Merckx (Berlin: Springer-Verlag), 297–342.

Hynson, N. A., Schiebold, J. M.-I., and Gebauer, G. (2016). Plant family identity distinguishes patterns of carbon and nitrogen stable isotope abundance and nitrogen concentration in mycoheterotrophic plants associated with ectomycorrhizal fungi. *Ann. Bot.* 118, 467–479. doi: 10.1093/aob/mcw119

Ihrmark, K., Bödeker, I. T. M., Cruz-Martinez, K., Friberg, H., Kubartova, A., Schenck, J., et al. (2012). New primers to amplify the fungal ITS2 region – evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* 82, 666–677. doi: 10.1111/j.1574-6941.2012.01437.x

Illyés, Z., Halász, K., Rudnóy, S., Ouanphanivanh, N., Garay, T., and Bratek, Z. (2009). Changes in the diversity of the mycorrhizal fungi of orchids as a function of the water supply of the habitat. *J. Appl. Bot. Food Qual.* 83, 28–36.

Illyés, Z., Rudnoy, S., and Bratek, Z. (2005). Aspects of in situ, in vitro germination and mycorrhizal partners of *Liparis loeselii*. *Acta Biol. Szeged.* 49, 137–139.

Jacquemyn, H., Brys, R., Merckx, V. S. F. T., Waud, M., Lievens, B., and Wiegand, T. (2014). Co-existing orchid species have distinct mycorrhizal communities and

display strong spatial segregation. *New Phytol.* 202, 616–627. doi: 10.1111/nph.12640

Jacquemyn, H., Brys, R., Waud, M., Busschaert, P., and Lievens, B. (2015). Mycorrhizal networks and coexistence in species-rich orchid communities. *New Phytol.* 206, 1127–1134. doi: 10.1111/nph.13281

Jacquemyn, H., De Kort, H., vanden Broeck, A., and Brys, R. (2017). Immigrant and extrinsic hybrid seed inviability contribute to reproductive isolation between forest and dune ecotypes of *Epipactis helleborine* (Orchidaceae). *Oikos*. doi: 10.1111/oik.04329

Jacquemyn, H., Deja, A., De Hert, K., Bailarote, B. C., and Lievens, B. (2012). Variation in mycorrhizal associations with tulasnelloid fungi among populations of five *Dactylorhiza* species. *PLoS ONE* 7:e42212. doi: 10.1371/journal.pone.0042212

Jacquemyn, H., Honnay, O., Cammue, B. P. A., Brys, R., and Lievens, B. (2010). Low specificity and nested subset structure characterize mycorrhizal associations in five closely related species of the genus *Orchis*. *Mol. Ecol.* 19, 4086–4095. doi: 10.1111/j.1365-294X.2010.04785.x

Jacquemyn, H., Merckx, V., Brys, R., Tyteca, D., Cammue, B. P. A., Honnay, O., et al. (2011). Analysis of network architecture reveals phylogenetic constraints on mycorrhizal specificity in the genus *Orchis* (Orchidaceae). *New Phytol.* 192, 518–528. doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.03796.x

Jacquemyn, H., Waud, M., Lievens, B., and Brys, R. (2016a). Differences in mycorrhizal communities between *Epipactis palustris*, *E. helleborine* and its presumed sister species *E. neerlandica*. *Ann. Bot.* 118, 105–114. doi: 10.1093/aob/mcw015

Jacquemyn, H., Waud, M., Merckx, V. S. F. T., Brys, R., Tyteca, D., Hedrén, M., et al. (2016b). Habitat-driven variation in mycorrhizal communities in the terrestrial orchid genus *Dactylorhiza*. *Sci. Rep.* 6:37182. doi: 10.1038/srep37182

Julou, T., Burghardt, B., Gebauer, G., Berveiller, D., Damesin, C., and Selosse, M.-A. (2005). Mixotrophy in orchids: insights from a comparative study of green individuals and nonphotosynthetic individuals of *Cephalanthera damasonium*. *New Phytol.* 166, 639–653. doi: 10.1111/j.1469-8137.2005.01364.x

Kohzu, A., Yoshioka, T., Ando, T., Takahashi, M., Koba, K., and Wada, E. (1999). Natural 13C and 15N abundance of field-collected fungi and their ecological implications. *New Phytol.* 144, 323–330. doi: 10.1046/j.1469-8137.1999.00508.x

Kristiansen, K. A., Taylor, D. L., Kjoller, R., Rasmussen, H. N., and Rosendahl, S. (2001). Identification of mycorrhizal fungi from single pelotons of *Dactylorhiza majalis* (Orchidaceae) using single-strand conformation polymorphism and mitochondrial ribosomal large subunit DNA sequences. *Mol. Ecol.* 10, 2089–2093. doi: 10.1046/j.0962-1083.2001.01324.x

Liebel, H. T., Bidartondo, M. I., and Gebauer, G. (2015). Are carbon and nitrogen exchange between fungi and the orchid *Goodyera repens* affected by irradiance? *Ann. Bot.* 115, 251–261. doi: 10.1093/aob/mcu240

Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet J.* 17, 10–12. doi: 10.14806/ej.17.1.200

McCormick, M. K., and Jacquemyn, H. (2014). What constrains the distribution of orchid populations? *New Phytol.* 202, 392–400. doi: 10.1111/nph.12639

Merckx, V. S. F. T. (2013). "Mycoheterotrophy: an introduction," in *Mycoheterotrophy: The Biology of Plants Living on Fungi*, ed. V. S. F. T. Merckx (Berlin: Springer-Verlag), 297–342. doi: 10.1007/978-1-4614-5209-6

Ogura-Tsujita, Y., Yokoyama, J., Miyoshi, K., and Yukawa, T. (2012). Shifts in mycorrhizal fungi during the evolution of autotrophy to mycoheterotrophy in *Cymbidium* (Orchidaceae). *Am. J. Bot.* 99, 1158–1176. doi: 10.3732/ajb.110046

Ogura-Tsujita, Y., and Yukawa, T. (2008). *Epipactis helleborine* shows strong preference towards ectomycorrhizal fungi with contrasting geographic distributions in Japan. *Mycorrhiza* 18, 331–338. doi: 10.1007/s00572-008-0187-0

Oja, J., Kohout, P., Tedersoo, L., Kull, T., and Kõljalg, U. (2015). Temporal patterns of orchid mycorrhizal fungi in meadows and forests as revealed by 454 pyrosequencing. *New Phytol.* 205, 1608–1618. doi: 10.1111/nph.13223

Oksanen, J., Blanchet, F. G., Kindt, R., Stevens, H., Legendre, P., Wagner, H., et al. (2013). *VEGAN: Community Ecology Package. R Package Version 2.1-43/r2893.* Available at: http://R-Forge.R-project.org/projects/vegan/

Ouanphanivanh, N., Merényi, Z., Orczán, Á. K., Bratek, Z., Szigeti, Z., and Illyés, Z. (2008). Could orchids indicate truffle habitats? Mycorrhizal association between orchids and truffles. *Acta Biol. Szeged.* 52, 229–232.

R Development Core Team (2013). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna: R Foundation for Statistical Computing.

Rasmussen, H. N. (1995). *Terrestrial Orchids: From Seed to Mycotrophic Plant*. New York, NY: Cambridge University Press. doi: 10.1017/CBO9780511525452

Roy, M., Gonneau, C., Rocheteau, A., Berveiller, D., Thomas, J. C., Damesin, C., et al. (2013). Why do mixotrophic plants stay green? A comparison between green and achlorophyllous orchid individuals in situ. *Ecol. Monogr.* 83, 95–117. doi: 10.1890/11-2120.1

Schiebold, J. M. I., Bidartondo, M. I., Karasch, P., Gravendeel, B., and Gebauer, G. (2017). You are what you get from your fungi: nitrogen stable isotope patterns in *Epipactis* species. *Ann. Bot.* 119, 1085–1095. doi: 10.1093/aob/mcw265

Selosse, M.-A., Bocayuva, M. F., Kasuya, M. C. M., and Courty, P. E. (2016). "Mixotrophy in mycorrhizal plants: extracting carbon from mycorrhizal networks," in *Molecular Mycorrhizal Symbiosis*, ed. F. Martin (Berlin: Springer-Verlag). doi: 10.1002/9781118951446.ch25

Selosse, M.-A., Faccio, G., Scappaticci, G., and Bonfante, P. (2004). Chlorophyllous and achlorophyllous specimens of *Epipactis microphylla* (Neottieae, Orchidaceae) are associated with ectomycorrhizal septomycetes, including truffles. *Microb. Ecol.* 47, 416–426. doi: 10.1007/s00248-003-2034-3

Selosse, M.-A., and Martos, F. (2014). Do chlorophyllous orchids heterotrophically use mycorrhizal fungal carbon? *Trends Plant Sci.* 19, 683–685.

Selosse, M.-A., Martos, F., Perry, B. A., Padamsee, M., Roy, M., and Pailler, T. (2010). Saprotrophic fungal symbionts in tropical achlorophyllous orchids: finding treasures among the 'molecular scraps'? *Plant Signal. Behav.* 5, 349–353. doi: 10.4161/psb.5.4.10791

Selosse, M.-A., and Roy, M. (2009). Green plants that feed on fungi: facts and questions about mixotrophy. *Trends Plant Sci.* 14, 64–70. doi: 10.1016/j.tplants.2008.11.004

Shefferson, R. P., Kull, T., and Tali, K. (2008). Mycorrhizal interactions of orchids colonizing Estonian mine tailings hills. *Am. J. Bot.* 95, 156–164. doi: 10.3732/ajb.95.2.156

Shefferson, R. P., Roy, M., Püttsepp, Ü., and Selosse, M.-A. (2016). Demographic shifts related to mycoheterotrophy and their fitness impacts in two *Cephalanthera* species. *Ecology* 97, 1452–1462. doi: 10.1890/15-1336.1

Shefferson, R. P., Taylor, D. L., Weiss, M., Garnica, S., McCormick, M. K., Adams, S., et al. (2007). The evolutionary history of mycorrhizal specificity among lady's slipper orchids. *Evolution* 61, 1380–1390. doi: 10.1111/j.1558-5646.2007.00112.x

Smith, S. E., and Read, D. J. (2008). *Mycorrhizal symbiosis*. Cambridge: Academic Press.

Taylor, D. L., and McCormick, M. K. (2008). Internal transcribed spacer primers and sequences for improved characterization of basidiomycetous orchid mycorrhizas. *New Phytol.* 177, 1020–1033. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02320.x

Těšitelová, T., Kotilínek, M., Jersáková, J., Joly, F.-X., Košnar, J., and Tatarenko, I. (2015). Two widespread green *Neottia* species (Orchidaceae) show mycorrhizal preference for Sebacinales in various habitats and ontogenetic stages. *Mol. Ecol.* 24, 1122–1134. doi: 10.1111/mec.13088

Těšitelová, T., Těšitel, J., Jersáková, J., Rihova, G., and Selosse, M.-A. (2012). Symbiotic germination capability of four *Epipactis* species (Orchidaceae) is broader than expected from adult ecology. *Am. J. Bot.* 99, 1020–1032. doi: 10.3732/ajb.1100503

Trudell, S. A., Rygiewicz, P. T., and Edmonds, R. L. (2003). Nitrogen and carbon stable isotope abundances support the myco-heterotrophic nature and host-specificity of certain achlorophyllous plants. *New Phytol.* 204, 882–889. doi: 10.1046/j.1469-8137.2003.00876.x

Veldre, V., Abarenkov, K., Bahram, M., Martos, F., Selosse, M.-A., Tamm, H., et al. (2013). Evolution of nutritional modes of Ceratobasidiaceae (Cantharellales, Basidiomycota) as revealed from publicly available ITS sequences. *Fungal Ecol.* 6, 256–268. doi: 10.1016/j.funeco.2013.03.004

Waud, M., Brys, R., Van Landuyt, W., Lievens, B., and Jacquemyn, H. (2017). Mycorrhizal specificity does not limit the distribution of an endangered orchid species. *Mol. Ecol.* 26, 1687–1701. doi: 10.1111/mec.14014

Waud, M., Busschaert, P., Ruyters, S., Jacquemyn, H., and Lievens, B. (2014). Impact of primer choice on characterization of orchid mycorrhizal

communities using 454 pyrosequencing. *Mol. Ecol. Resour.* 14, 679–699. doi: 10.1111/1755-0998.12229

White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S., and Taylor, J. W. (1990). "Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics," in *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, eds M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (San Diego, CA: Academic Press), 315–322.

Yagame, T., Orihara, T., Selosse, M.-A., Yamato, M., and Iwase, K. (2012). Mixotrophy of *Platanthera minor*, an orchid associated with ectomycorrhiza-forming Ceratobasidiaceae fungi. *New Phytol.* 193, 178–187. doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.03896.x

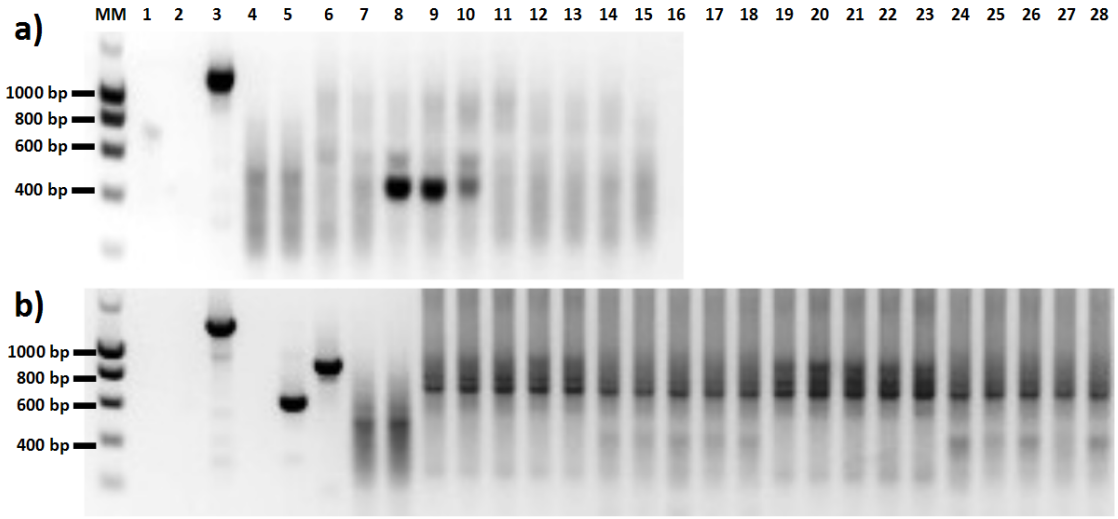
Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Jacquemyn, Waud, Brys, Lallemand, Courty, Robionek and Selosse. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Supplementary Material

Table S1: List of operational taxonomic units (OTUs) corresponding to orchid-associating mycorrhizal families discovered in this study. **Not shown in this PhD thesis manuscript.**

Figure S1: Gel results from PCR analyses conducted for verification of *Tulasnella* species presence/absence in **(a)** *Liparis loeselii* and **(B)** *Dactylorhiza* root samples using an enhanced version of the *Tulasnella* specific primer combination for ITS (namely ITS1ngs/ITS4-Tul2, described in Oja et al., 2015). Similar results were obtained using the primer pair ITS1/ITS4-Tul (data not shown). Expected *Tulasnella* species band size range from 600 to 1200 bp based on previous experiments. PCR reactions were conducted in duplicated 25 ml reactions containing 5 ng DNA extract, 1 U Titanium Taq (Takara, Bio, United States), 2 mM dNTPs, and 20 mM primer combination ITS1ngs/ITS4-Tul2. The amplification program was as follows: 2 min at 95C, followed by 30 cycles of 30 s at 95C, 30 s at 55C, 1 min at 72C and a final step at 72C for 10 min. Duplicated PCR reactions were pooled and 5 ml of pooled PCR product was checked for amplification by separation on 1.5% agarose gel. Lane components for **(a)** are as follows: MM, SmartLadder reference (Eurogentec, Belgium); Lane 1, negative control – no template DNA; Lane 2, negative fungal DNA control – *Mortierella isabellina* isolate UAMH 5163; Lane 3, positive control – *Tulasnella calospora* isolate CBS 573.83; Lanes 4–5, non-*Tulasnella* mycorrhizal control – *Salix repens* root samples; Lanes 6–15, *Liparis loeselii* root samples. Lane components for *Dactylorhiza* species **(b)** are as follows: MM, SmartLadder reference (Eurogentec, Belgium); Lane 1, negative control – no template DNA; Lane 2, negative fungal DNA control – *Mortierella isabellina* isolate UAMH 5163; Lane 3, positive control – *Tulasnella calospora* isolate CBS 573.83; Lane 4, positive control – *Tulasnella* sp. Isolate CBS 482.93; Lane 5, positive control – *Tulasnella* sp. isolate CBS 487.93; Lane 6, positive control – *Tulasnella* sp. isolate CBS 606.93; Lanes 7–8, non-*Tulasnella* mycorrhizal control – *Salix repens* root samples; Lanes 9–13, *Dactylorhiza fuchsii* (Westhoek) root samples; Lanes 14–18, *Dactylorhiza incarnata* (Westhoek) root samples; Lanes 19–23, *Dactylorhiza fuchsii* (Ter Yde) root samples; Lanes 24–28, *Dactylorhiza incarnata* (Ter Yde) root samples.



ARTICLE V

The ^{13}C content of the orchid *Epipactis palustris* (L.) Crantz responds to light as in autotrophic plants

AVANT-PROPOS

Au sein du genre *Epipactis* (Neottieae) ont principalement été décrites des espèces mixotrophes, associées à des champignons ectomycorhiziens et présentant des teneurs en ^{13}C supérieures à celles des plantes autotrophes voisines. Deux espèces étroitement apparentées, *E. palustris* et *E. gigantea*, font à ce jour figures d'exception en affichant des attributs typiques des orchidées autotrophes : association avec des rhizoctonias et absence d'enrichissement décelable en ^{13}C. Nous avons profité d'une situation inhabituelle où *E. palustris* – espèce de lumière – se trouvait à l'ombre de certains arbustes (*Salix* sp.) pour vérifier, sur la base de mesures isotopiques, si le caractère autotrophe de cette espèce se vérifiait également dans sa réponse à un plus faible éclairement.

Nous avons constaté que la teneur en ^{13}C d'*E. palustris* était inférieure à celle de la plupart de plantes autotrophes voisines et qu'elle diminuait avec la luminosité, d'une façon semblable à ce qui peut être observé chez les espèces autotrophes non-orchidées. Ces résultats confirment donc le syndrome d'autotrophie décrit chez *E. palustris* et mettent en exergue l'existence, au sein d'un même genre, d'une nutrition autotrophe et d'une mixotrophe. Leur origine évolutive reste à éclaircir mais un cas de réversion vers l'autotrophie chez *E. palustris* et *E. gigantea* n'est pas à exclure.

Cet article a été publié dans la revue *Botany Letters* au mois de janvier 2018.

Le matériel utilisé pour cette étude a été récolté avant le début de ma thèse. J'ai participé à la préparation des échantillons pour les mesures isotopiques et j'ai réalisé l'analyse générale des données.

BOTANY LETTERS, 2018
https://doi.org/10.1080/23818107.2017.1418430

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

Check for updates

The ^{13}C content of the orchid *Epipactis palustris* (L.) Crantz responds to light as in autotrophic plants

Félix Lallemand[a], Alicja Robionek[b], Pierre-Emmanuel Courty[c] and Marc-André Selosse[a]

[a]Institut de Systématique, Évolution, Biodiversité (ISYEB), UMR 7205 CNRS MNHN UPMC EPHE, Muséum national d'Histoire naturelle, Sorbonne Universités, Paris, France; [b]The Laboratory of Freshwater Ecology, Department of Plant Ecology, University of Gdańsk, ul. Wita Stwosza, Gdańsk, Poland; [c]Plant-Microorganism Interactions Department, UMR 1347 Agroécologie AgroSup/INRA/uB, INRA Dijon, Dijon Cedex, France

ABSTRACT

Most temperate green orchids form mycorrhizae with rhizoctonias fungi and are considered autotrophic. Some orchids, however, associate with fungi that also form ectomycorrhizae with surrounding trees and derive part of their carbon from these fungi. This evolutionarily derived condition, called mixotrophy, is characterized by natural ^{13}C enrichment and high N content. Some orchid genera display both syndromes depending on species. Here, we further document the isotopic features of a rhizoctonias-associated species, *Epipactis palustris*, in a genus otherwise encompassing many mixotrophic orchids. First, *E. palustris* in two wetland sites from Northern Europe displayed similar to slightly-depleted ^{13}C abundance and identical N content as compared with surrounding autotrophic plants, confirming published results on this species. Second, some individuals growing in darker conditions (63% reduced irradiation) revealed a decrease of ^{13}C abundance as expected (and observed at the same place) for autotrophic plants. The latter result expands previous observations on other rhizoctonias-associated orchid species. We discuss our results in relationship with the current views of the two nutritional syndromes of green orchids (especially, with the doubts on autotrophy of rhizoctonias-associated species) and in the framework of the phylogeny of *Epipactis* that evolved secondarily mixotrophy. The latter observation entails that the tribe Neottieae repeatedly evolved mixotrophy.

ARTICLE HISTORY
Received 15 September 2017
Accepted 9 December 2017

KEYWORDS
^{13}C; carbon nutrition; *Epipactis*; partial mycoheterotrophy; mixotrophy; mycoheterotrophy; orchids; response to shade

Introduction

Green terrestrial orchids of temperate regions display two nutritional syndromes (Selosse et al. 2016) correlating with the taxonomic affinities of their mycorrhizal fungi (Dearnaley, Perotto, and Selosse 2016). A growing literature is devoted to the understanding of these two syndromes (Hynson et al. 2013; Selosse and Martos 2014; Selosse et al. 2016), namely mixotrophy and supposed autotrophy.

Some green orchid species display a partly heterotrophic syndrome, since they recover carbon from their mycorrhizal fungi that adds to their photosynthesis, a nutrition called partial mycoheterotrophy or mixotrophy (Selosse and Roy 2009; Hynson et al. 2013; Hynson, Schiebold, and Gebauer 2016). Such species often grow in forest habitats and associate with fungi that usually form ectomycorrhizae on surrounding tree roots (Bidartondo et al. 2004; Selosse et al. 2004; Julou et al. 2005). Orchids showing this syndrome have ^{13}C and ^{15}N natural abundances and total N content that are higher than those of autotrophic plants (Hynson et al. 2013; Hynson, Schiebold, and Gebauer 2016). This reflects the fact that their mycorrhizal fungi are enriched in both isotopes and have a high N content (Trudell, Rygiewicz, and Edmonds 2003; Hynson et al. 2013). In some cases, individuals devoid of chlorophyll, the so-called albinos, survive in nature (Selosse et al. 2004; Julou et al. 2005; Abadie et al. 2006; Roy et al. 2013), with life spans similar to green individuals (Abadie et al. 2006; Shefferson et al. 2016). This provides additional evidence for a C flow from the mycorrhizal fungi to mixotrophic orchids.

At the opposite of mixotrophs, most green orchids associate with a different set of basidiomycetous fungi, collectively called rhizoctonias, namely belonging to Tulasnellaceae, Ceratobasidiaceae, and Serendipitaceae (Dearnaley, Martos, and Selosse 2012; Veldre et al. 2013; Weiß et al. 2016). These fungi behave as soil saprotrophs or as endophytes in non-orchid plants (Girlanda et al. 2011; Selosse and Martos 2014; Weiß et al. 2016). On the one hand, evidence for a net mycorrhizal C flow from plant to fungus obtained *in vitro* on one species (Cameron et al. 2008), and the absence of ^{13}C enrichment in rhizoctonias-associated orchids, often lead authors to consider these orchids as autotrophic. On the other hand, rhizoctonias-associated orchids display small deviations from the ^{13}C abundance values observed in autotrophic plants, either positive or negative, coupled with high ^{15}N enrichment and high N

content (Hynson et al. 2013; Selosse and Martos 2014). Moreover, rhizoctonias-associated orchids have higher ^{2}H enrichment, similar to that of fungi (Gebauer, Preiss, and Gebauer 2016). Altogether, this raises the question of a possible mixotrophy in rhizoctonias-associated orchids (Selosse and Martos 2014). In the absence of surviving albinos in rhizoctonias-associated orchids, the C flow from fungi to plants is expected to be less relevant than in mixotrophs associated with ectomycorrhizal fungi. For ease of reading, below we will consider these orchids as 'autotrophic'.

Mixotrophic orchids associated with ectomycorrhizal fungi also differ from autotrophic plants in the way their ^{13}C abundance responds to low-light conditions. In autotrophs, photosynthesis in shaded conditions is reduced, which allows a better equilibration between leaf intercellular and atmospheric $^{13}CO_2$ and $^{12}CO_2$ concentrations. Moreover, shaded conditions enhance stomatal opening, due to lower ambient air dryness, which again favours better equilibration of gas concentrations. As a result, shaded conditions enhance the isotopic discrimination during C fixation and thus decrease tissues' ^{13}C abundance (Farquhar, Ehleringer, and Hubick 1989). Such a response to shade was observed in rhizoctonias-associated autotrophic orchids, namely *Goodyera repens* (L.) R.Br. (Liebel, Bidartondo, and Gebauer 2015) and *Cypripedium calceolus* L. (Preiss, Adam, and Gebauer 2010). At the opposite of rhizoctonias-associated orchids, mixotrophs associated with ectomycorrhizal fungi tend to rely relatively more on fungal resources when placed in shaded conditions, and thus increase their ^{13}C abundance and N content (Preiss, Adam, and Gebauer 2010; Gonneau et al. 2014; Lallemand et al. 2017).

The two nutritional syndromes can occur within a single genus. The genus *Epipactis* contributed a lot to the discovery of mixotrophs associated with ectomycorrhizal fungi (Bidartondo et al. 2004; Selosse et al. 2004; Gonneau et al. 2014; Schiebold et al. 2017 – see Hynson et al. 2013 and Selosse et al. 2016 for reviews). Yet, at least one *Epipactis* species rather fits into the rhizoctonias-associated syndrome. *Epipactis palustris* (L.) Crantz, a species that grows in open dune and wetland habitats (Jacquemyn, Brys, and Hutchings 2014; Jacquemyn et al. 2017), displays rhizoctonias as mycorrhizal partners (Bidartondo et al. 2004; Illyés et al. 2009; Jacquemyn et al. 2017) and displays no ^{13}C enrichment (Bidartondo et al. 2004; Jacquemyn et al. 2017; Schiebold et al. 2017). Here, our aim is to test for additional physiological evidence for an autotrophic behaviour in *E. palustris*. We (1) further investigated ^{13}C and ^{15}N enrichment and N content in *E. palustris*, and (2) tested the response of *E. palustris* to shaded conditions in terms of ^{13}C abundance, which is expected to increase in mixotrophs due to higher relative fungal input (see above) and to decrease in autotrophs.

Material and methods

Study site and light levels

We sampled two European wetlands where *Epipactis palustris* typically occurs (Jacquemyn, Brys, and Hutchings 2014). The two sites are wetlands on siliceous sand deposits in Northern Europe (Poland), namely Biebrza (53°17'50"N – 22°35'31"E) and Galwica (53°29'36"N – 20°50'31"E). Both are open meadows exposed to sun with few very small individuals of *Betula pubescens* Ehrh., *Pinus sylvestris* Thund. and *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. in Biebrza and few local patches of 1 to 2 m-high trees belonging to *Salix* spp. and *Alnus glutinosa* in Galwica. In both cases, *E. palustris* formed dense populations and, at Galwica, this species was growing in two light conditions, i.e. in open places or under the shade of *Salix* sp. We compared these two light levels by two methods. First, we identified all co-occurring plant species over the 5 × 5 m area surrounding the sampling spot, and calculated an average, integrative Ellenberg light indicator on the basis of occurring species, as in Abadie et al. (2006). The Ellenberg indicator values represent the preferences of individual species, based on empirical field observations in Central Europe, ranging from 1 – deep shade, to 9 – full sunlight (Ellenberg et al. 1991). Second, more instantaneous light measurements were performed at the time of sampling, as in Matsuda et al. (2012): photosynthetic photo flux density (PPFD) was measured with a 1 m line quantum sensor with cosine correction (MQ-200 Apogee Instruments Inc., Logan, USA). Eight paired measurements (including the positions of sampling of *E. palustris*, see below) were taken in the shade and in sunlit at noon under clear sky conditions. Relative transmittance was calculated as the ratio of PPFD mean value in the shade to that in sunlit and expressed as a percentage.

Leaves sampling

We sampled about 0.2 g (fresh weight) of leaves from five individuals of various species (*E. palustris* and non-orchid autotrophic plants) in 2012, on 8 July at Biebrza and on 11 July at Galwica. In order to avoid isotopic bias due to photosynthesis rate and/or use of CO_2 from soil respiration, all leaf samples were collected (1) within a 2 × 2 m area (one area at Biebrza and two at Galwica, see below); (2) at similar light level; and (3) at the same distance from the soil. In addition to *E. palustris* nine reference autotrophic species were sampled at Biebrza: *Vaccinium oxycoccos* L., *Betula pubescens*. (young trees), *Pinus sylvestris* (young trees), *Sphagnum* sp., *Salix pentandra* L. (young trees), *Drosera rotundifolia* L., *Alnus glutinosa* (young trees), *Potentilla palustris* (L.) Lehm., *Thelypteris palustris* (A.Gray) Schott. All young trees were less than 20 cm in height. At Galwica, we sampled

four reference species: *Potentilla palustris*, *Lysimachia vulgaris* L., *Phragmites communis* Trin., *Menyanthes tr.foliata* L.; moreover, at this site, we duplicated the collection for *E. palustris* and *L. vulgaris* under shaded *Salix* sp. patches.

Stable isotope analyses

Samples were ground in 2 mL Eppendorf tubes in a ball mill MM200 (Retsch Gmbh, Haan, Germany) and analysed for total N concentration, as well as $^{13}C/^{12}C$ and $^{15}N/^{14}N$ ratios using an elemental analyser (EA) coupled to a ThermoFinnigan DeltaV Advantage Continuous-Flow Isotope-ratio mass spectrometer, and expressed as δ-values (Hynson et al. 2013). Isotope values were calibrated using internal calibrated standards (EDTA and ammonium oxalate). The standard deviations of the replicated standard samples were 0.029 ‰ for ^{13}C and 0.215 ‰ for ^{15}N. Statistical analyses were performed using R environment for statistical computing (R Core Team 2015). Analysis of variance (ANOVA) was used to evaluate differences in mean $\delta^{13}C$, $\delta^{15}N$ and % N among species from a given site (function aov {stats}). If the null hypothesis (no difference between means) was rejected, Tukey's honestly significant difference (HSD) test was used to make pairwise multiple comparisons of the means (function TukeyHSD {stats}). The alpha type I error threshold was set at 0.05.

Results

At Biebrza, *Epipactis palustris* did not differ in $\delta^{13}C$ from at least some autotrophic non-orchid species (namely, *Potentilla palustris*, $p = 0.150$; *Alnus glutinosa*, $p = 1$; *Drosera rotund.folia*, $p = 0.991$; and *Sphagnum* sp., $p = 0.547$), but was significantly depleted in ^{13}C as compared with the others (namely, *Betula pubescens*, $p = 0.012$; *Vaccinium oxycoccos*, *Pinus sylvestris*, *Salix pentandra* and *Thelypteris palustris*, $p<0.001$ for those four latter species; Figure 1a). Together with the N-fixing *A. glutinosa* and the carnivorous plant *D. rotund.folia*, *E. palustris* had higher $\delta^{15}N$ than other autotrophic non-orchid species ($p<0.05$ for each comparison; except *A. glutinosa* versus *Sphagnum* sp., $p = 0.064$). Nitrogen content did not significantly differ between *E. palustris* and all other autotrophic species (except *Sphagnum* sp., $p = 0.024$; Figure 2a).

At Galwica, considering samples in the sunlight, *Epipactis palustris* had significantly lower $\delta^{13}C$ (–30.04 ± 0.70 ‰; mean ± 5% confidence interval) and higher $\delta^{15}N$ (–0.41 ± 0.71 ‰) than all autotrophic non-orchid species (namely, *Potentilla palustris* in sunlight, *Lysimachia vulgaris*, *Menyanthes tr.foliata* and *Phragmites communis*; –27.54 ± 0.38 ‰ for $\delta^{13}C$ and –2.37 ± 0.32 ‰ for $\delta^{15}N$) by, respectively, 2.50 ‰ and 1.96 ‰ on average (Figure 1b). Nitrogen content did not significantly differ between *E. palustris* and other autotrophic species (Figure 2b).

We also sampled *Epipactis palustris* and *Lysimachia vulgaris* in a darker spot at Galwica: on the day of sampling, they received on average a 63% reduced irradiation according to PPFD measurements (see Material and methods), supporting the visual estimation of a reduced light level. Considering the Ellenberg index for light level, the value in open place was, on average, 7.78 (± 1.62; standard deviation), i.e. close to the usual value for *E. palustris* (8; Ellenberg et al. 1991), while it dropped to 6.37 (± 2.12; non-significant difference) in darker spot. Both *E. palustris* and *L. vulgaris* showed a reduction in their average $\delta^{13}C$ in the darker spot by 1.55 ‰ and 1.43 ‰ respectively ($p<0.001$ for both species), as expected for photosynthetic species placed in darker conditions. When compared together, shaded *E. palustris* still showed lower $\delta^{13}C$ than shaded *L. vulgaris* by 2.5 ‰ on average ($p<0.001$). Light condition did not alter $\delta^{15}N$ (Figure 1b), nor N content (Figure 2b).

Discussion

Isotopic content of Epipactis palustris fits the syndrome of rhizoctonias-associated orchids

Isotopic abundances of *Epipactis palustris* showed the usual trend for rhizoctonias-associated orchids, i.e. high ^{15}N abundance but ^{13}C abundance close to that of surrounding autotrophic plants. Moreover, no enrichment in total nitrogen was seen, as opposed to orchids associated with ectomycorrhizal fungi (Abadie et al. 2006; Hynson et al. 2013). These features are in agreement with previously published reports on this species (Bidartondo et al. 2004; Jacquemyn et al. 2017; Schiebold et al. 2017), and with the report of rhizoctonias as mycorrhizal fungi in *E. palustris* (Bidartondo et al. 2004; Illyés et al. 2009; Jacquemyn et al. 2016, 2017). Even if few ectomycorrhizal fungi may also occur in *E. palustris* roots (as shown, for example, by Jacquemyn et al. 2017), the isotopic value obtained here excludes any significant carbon flow from any potential such fungi. Thus, *E. palustris* fits the autotrophic syndrome described in the introduction.

More precisely, in both sites and at both light levels in Galwica, *Epipactis palustris* was slightly depleted in ^{13}C as compared with at least some surrounding autotrophic plants. Slight depletion or enrichment in ^{13}C has been observed in some other rhizoctonias-associated orchids (e.g. Girlanda et al. 2011; Liebel, Bidartondo, and Gebauer 2015 – see Hynson et al. 2013 for review), either due to idiosyncrasy of orchids' photosynthesis or to a fingerprint of another C source. This prompted the hypothesis that such deviations could result from C gain from the mycorrhizal fungi. Unfortunately, the ^{13}C abundance of rhizoctonias is unknown, due to the absence of fleshy tissues such as sporophores from which it could be measured. On the one hand, based on protocorms

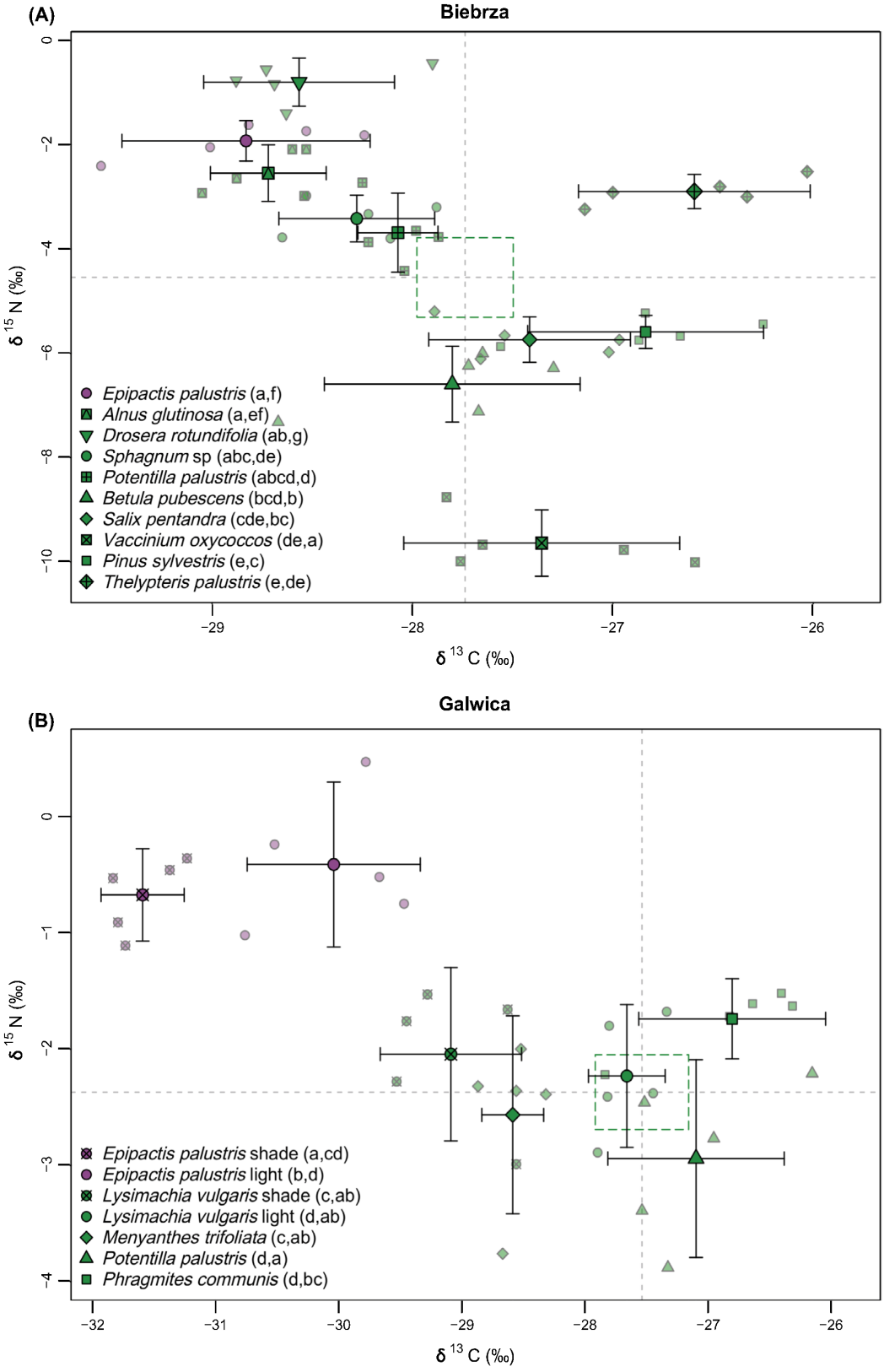


Figure 1. Mean $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ values of plants at Biebrza (a) and Galwica (b). Non-orchid autotrophs are in green and *Epipactis palustris* is in violet; $n = 5$ replicate individuals per species (transparent symbols). At Galwica (in b), crossed circles indicate the samples from shaded spot (63% reduced illumination). Bars represent the 95% confidence interval of the mean for each species. The grey dotted lines and the green dotted box show, respectively, the mean $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ values and their 95% confidence intervals for non-orchid autotrophs taken together. Different letters in brackets following the names indicate significantly different means for, respectively, $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$.

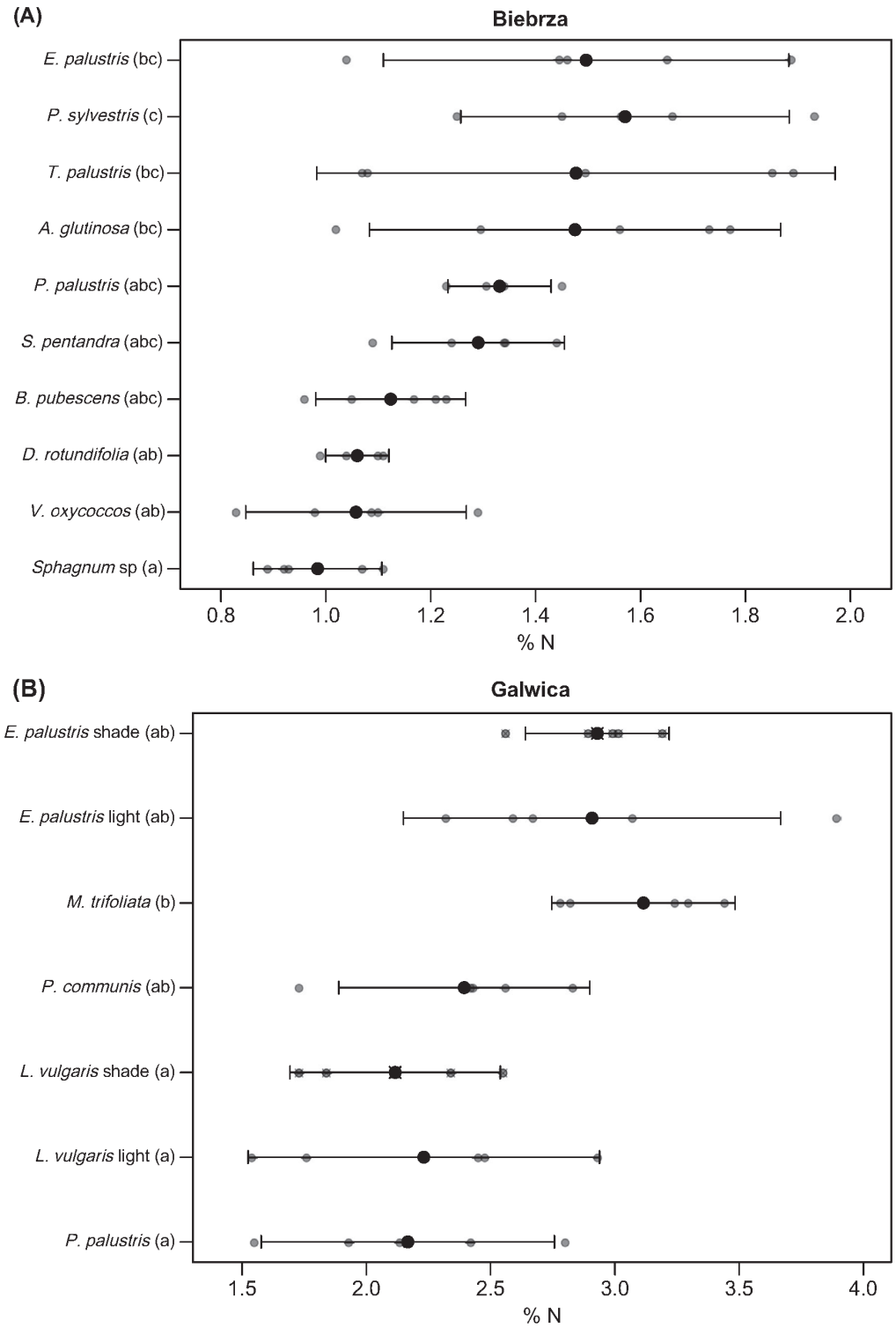


Figure 2. Mean total N contents of plants at Biebrza (a) and Galwica (b), $n = 5$ replicates per species (transparent symbols). At Galwica (in b), crossed circles indicate the samples from shaded spots (63% reduced irradiation). Bars represent the 95% confidence interval of the mean for each species. Different letters indicate statistically significant differences.

(young, achlorophyllous orchid seedlings that receive all C from fungi exclusively), Stöckel et al. (2014) provided evidence that the organic matter provided by rhizoctonias in the investigated species was slightly ^{13}C-enriched. On the other hand, assuming that rhizoctonias are also saprotrophic fungi that colonize endophytically non-orchid plants roots where they may receive plant C, Selosse and Martos (2014) speculated from ^{13}C

abundances available for endophytic fungi that the organic matter of rhizoctonias may display variable enrichments, i.e. slightly higher or slightly lower as compared with autotrophic plants (see Halbwachs et al. 2013). In addition, mixotrophy in rhizoctonias-associated orchids would also explain their higher ^{15}N abundance, such an enrichment being a regular feature of mixotrophic species associated with ectomycorrhizal fungi (Hynson et al. 2013). The debate is far from closed, but these considerations, together with the ^{2}H enrichment displayed by some rhizoctonias-associated orchids (Gebauer, Preiss, and Gebauer 2016), cast doubts on autotrophy of rhizoctonias-associated orchids: are the deviations of various isotopic abundances observed in some species possible evidence for mixotrophy?

Isotopic signatures may represent an influx of fungal organic matter, but the *net flux*, i.e. taking into account the reverse flux from orchid to fungus (Cameron et al. 2008), remains unclear. In other words, the physiological relevance of this plant-fungal exchange awaits further investigations.

Isotopic content of Epipactis palustris decreases in the shade, as in autotrophic plants

The response to light level of *Epipactis palustris* in Galwica followed the trend expected for autotrophic plants. We took advantage of an unusual situation where some growing willows placed wetland plants under their shade. Mixotrophic species should increase ^{13}C abundance in shaded conditions, due to a lower photosynthetic input and/or to an increased compensatory fungal exploitation (Preiss, Adam, and Gebauer 2010; Matsuda et al. 2012; Gonneau et al. 2014; Lallemand et al. 2017). At the opposite of mixotrophs, *E. palustris* at Galwica sampled in a spot with a 63% reduced irradiation displayed a typical response of autotrophic plants, namely a decreased ^{13}C enrichment similar to that observed for nearby autotrophic *L. vulgaris*. Photosynthesis in shaded conditions allows a better equilibration of relative concentrations of $^{13}CO_2$ and $^{12}CO_2$ between leaves and atmosphere (see the Introduction), and enhances the isotopic discrimination (Farquhar, Ehleringer, and Hubick 1989). A similar 'autotrophic' response to shade was previously observed in other rhizoctonias-associated orchids, namely *Goodyera repens* (Liebel, Bidartondo, and Gebauer 2015) and *Cypripedium calceolus* (Preiss, Adam, and Gebauer 2010).

Do such results confirm autotrophy in *Epipactis palustris*? Uncertainties on the ^{13}C abundance in rhizoctonias still limit any clear-cut conclusion. Indeed, if organic matter of the mycorrhizal rhizoctonias is depleted in ^{13}C, then the observed response could simply reflect an increased heterotrophy. However, the absence of an increase of ^{15}N abundance and N content indirectly supports that *E. palustris* did not increase the use of fungal resources, which would affect ^{15}N abundance and N content (Hynson et al. 2013; Gonneau et al. 2014).

The present discussion joins that of a recently observed trend in mixotrophic pyroloids, i.e. small perennials from the Pyroleae tribe (Ericaeae family; Lallemand et al. 2016) living in temperate forests. Investigating several mixotrophic pyroloid species along light gradients, Lallemand et al. (2017) showed that they exhibited the same response as surrounding autotrophic plants in ^{13}C abundance, although the co-occurring mixotrophic *Epipactis atrorubens* (Hoffm.) Besser showed ^{13}C enrichment with decreasing light availability, as expected for mixotrophs. One scenario is that in rhizoctonias-associated orchids, mixotrophy is similar to pyroloids, i.e. a 'static mixotrophy' as suggested by Lallemand et al. (2017), where the plant does not respond to light variation by changing uptake of fungal carbon.

The interpretation of the response to light level in *Epipactis palustris* remains pending to a better understanding of the exact physiology and isotopic content of rhizoctonias-associated orchids. Yet our results add up to the description of the syndrome of rhizoctonias-associated orchids by confirming that these orchids respond to shade by decreasing ^{13}C abundance (see also Liebel, Bidartondo, and Gebauer 2015 and Preiss, Adam, and Gebauer 2010), making them unlikely to use fungal C if the latter turns out to be enriched in ^{13}C.

Phylogenetic considerations

The observation that *Epipactis palustris* displays the rhizoctonia-associated syndrome contrasts with the mixotrophic syndrome modes observed in many other *Epipactis* spp. that are associated with ectomycorrhizal fungi (Selosse et al. 2004; Bidartondo et al. 2004; Gonneau et al. 2014; see Hynson et al. 2013 for review). Yet, *Epipactis gigantea* Douglas ex Hook also displays this syndrome (Schiebold et al. 2017). The genus *Epipactis* thus represents another orchid genera where the two nutritional syndromes coexist, together with *Cymbidium* L. (Ogura-Tsujita et al. 2012) and *Neottia* (Těšitelová et al. 2015).

Interestingly, all known mixotrophic *Epipactis* species belong to a monophyletic group (section *Epipactis*; Jin et al. 2014) while *E. palustris* and *E. gigantea* are close relatives in the paraphyletic section *Arthrochilium* which gathers species that are successive sisters to the *Epipactis* section (Pridgeon et al. 2005; Pedersen et al. 2009; Roy et al.; 2009; Jin et al. 2014). This argues for mixotrophy being an evolutionarily derived trait within the genus *Epipactis*. The same holds for the genus *Neottia* where known mixo- and heterotrophic species gather in a monophyletic group whose relatives show the rhizoctonias-associated autotrophic syndrome (Těšitelová et al. 2015; Feng et al. 2016).

Assuming that rhizoctonias symbiosis is the plesiomorphic state in orchids (e.g. Dearnaley, Martos, and Selosse 2012), the Neottieae tribe (Epidendroideae), to which both *Epipactis* and *Neottia* belong (Pridgeon et al.

2005), illustrates two independent shifts of this kind to ectomycorrhizal fungi, leading to mixotrophic nutrition. Available Neottieae phylogenies (Pridgeon et al. 2005; Roy et al. 2009; Xiang et al. 2012; Feng et al. 2016) suggest that mixotrophy in the closely related genera *Limodorum* Boehm. and *Cephalanthera* Rich. may also have arisen independently, despite limited support. This questions the existence and nature of a predisposition to mixotrophy in the whole Neottieae tribe, in a situation again strikingly paralleling that in Ericaceae, where a poorly-understood predisposition to mixotrophy led to at least two emergences of mixo- and heterotrophy (Lallemand et al. 2016).

Conclusion

We confirm that *Epipactis palustris* displays isotopic composition similar to rhizoctonias-associated orchids, making further evidence that mixotrophy and association to ectomycorrhizal fungi evolved secondarily in *Epipactis* and repetitively in Neottieae. Furthermore, we strengthened the isotopic description of the syndrome of rhizoctonias-associated orchids by confirming that the response to shade entails ^{13}C depletion, and not ^{13}C enrichment as in orchids associated with ectomycorrhizal fungi. All the available data, including response to shaded conditions, remain insufficient to definitively ascertain whether rhizoctonias-associated orchids are actually autotrophic, or gain some carbon from rhizoctonias. Moreover, if the latter were true, the physiological relevance of such a flux for the plant would still need to be elucidated. More in situ studies on the exact carbon exchange between orchids and rhizoctonias are now pending.

Acknowledgements

M.-A. Selosse is supported by the Fondation Ars Cuttoli & Paul Appell (France) and sampling was done during a field trip of the French botanical Society in Northern Poland. We thank Arnaud Mouly and two anonymous referees for helpful comments on an earlier version of this manuscript.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Notes on contributors

Félix Lallemand is a PhD student on mixotrophy at Muséum national d'Histoire naturelle in Paris, France. *Contribution*: isotopic analyses (contribution), figures and statistical analyses, revision of the manuscript.

Alicja Robionek is a PhD student on aquatic plants at University of Gdansk, Poland. *Contribution*: organization of the field trip and paper writing, revision of the manuscript.

Pierre-Emmanuel Courty is a researcher on mycorrhizae at INRA Dijon, France. *Contribution*: performed the isotopic analyses, revision of the manuscript.

Marc-André Selosse is researcher on mycorrhizal ecology at Muséum national d'Histoire naturelle, France, and University of Gdansk, Poland. *Contribution*: research design, field work, funding sources and paper writing.

References

Abadie, Jean-Claude, Ülle Püttsepp, Gerhard Gebauer, Antonella Faccio, Paola Bonfante, and Marc-André Selosse. 2006. "*Cephalanthera longifolia* (Neottieae, Orchidaceae) is Mixotrophic: A Comparative Study between Green and Nonphotosynthetic Individuals." *Canadian Journal of Botany* 84 (9): 1462–1477. doi:10.1139/b06-101.

Bidartondo, Martin I., Bastian Burghardt, Gerhard Gebauer, Thomas D. Bruns, and David J.Read. 2004. "Changing Partners in the Dark: Isotopic and Molecular Evidence of Ectomycorrhizal Liaisons between Forest Orchids and Trees" *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 271 (1550): 1799–1806. doi:10.1098/rspb.2004.2807.

Cameron, Duncan D., Irene Johnson, David J. Read, and Jonathan R. Leake. 2008. "Giving and Receiving: Measuring the Carbon Cost of Mycorrhizas in the Green Orchid, *Goodyera repens*." *New Phytologist* 180 (1): 176–184. doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02533.x.

Dearnaley, John D. W., Florent Martos, and Marc-André Selosse. 2012. "Orchid Mycorrhizas: Molecular Ecology, Physiology, Evolution and Conservation Aspects." In *Fungal Associations*, edited by Bertold Hock, 207–230. Berlin Heidelberg: Springer.

Dearnaley, John D. W., Silvia Perotto, and Marc-André Selosse. 2016. "Structure and Development of Orchid Mycorrhizas." In *Molecular Mycorrhizal Symbiosis*, edited by Francis Martin, 63–86. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell.

Ellenberg, Heinz, Heinrich E. Weber, Ruprecht Düll, Volkmar Wirth, Willy Werner, and Dirk Paulißen. 1991. "Zeigerwerte Von Pflanzen in Mitteleuropa [Ecological Ranges of Central European Plants]." *Scripta Geobotanica* 18: 1–248.

Farquhar, Graham D., James D. Ehleringer, and Kerry T. Hubick. 1989. "Carbon Isotope Discrimination and Photosynthesis." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40 (1): 503–537. doi:10.1146/annurev.pp.40.060189.002443.

Feng, Yan-Lei, Susann Wicke, Jian-Wu Li, Yu Han, Choun-Sea Lin, De-Zhu Li, Ting-Ting Zhou, Wei-Chang Huang, and Lu-Qi Huang. 2016. "Lineage-Specific Reductions of Plastid Genomes in an Orchid Tribe with Partially and Fully Mycoheterotrophic Species." *Genome Biology and Evolution* 8 (7): 2164–2175. doi:10.1093/gbe/evw144.

Gebauer, Gerhard, Katja Preiss, and Andreas C. Gebauer. 2016. "Partial Mycoheterotrophy is More Widespread among Orchids than Previously Assumed." *New Phytologist* 211 (1): 11–15. doi:10.1111/nph.13865.

Girlanda, Mariangela, Rossana Segreto, Donata Cafasso, Heiko Tobias Liebel, Michele Rodda, Enrico Ercole, Salvatore Cozzolino, Gerhard Gebauer, and Silvia Perotto. 2011. "Photosynthetic Mediterranean Meadow Orchids Feature Partial Mycoheterotrophy and Specific Mycorrhizal Associations." *American Journal of Botany* 98 (7): 1148–1163. doi:10.3732/ajb.1000486.

Gonneau, Cédric, Jana Jersáková, Eloïse de Tredern, Irène Till-Bottraud, Kimmo Saarinen, Mathieu Sauve, Mélanie Roy, Tomáš Hájek, and Marc-André Selosse. 2014. "Photosynthesis in Perennial Mixotrophic *Epipactis* spp. (Orchidaceae) Contributes More to Shoot and Fruit

Biomass than to Hypogeous Survival." *Journal of Ecology* 102 (5): 1183–1194. doi:10.1111/1365-2745.12274.

Halbwachs, Hans, Bryn T. M. Dentinger, Andrew P. Detheridge, Peter Karasch, and Gareth W. Griffith. 2013. "Hyphae of Waxcap Fungi Colonise Plant Roots." *Fungal Ecology* 6 (6): 487–492. doi:10.1016/j.funeco.2013.08.003.

Hynson, Nicole A., Thomas P. Madsen, Marc-André Selosse, Iris K. U. Adam, Yuki Ogura-Tsujita, Mélanie Roy, and Gerhard Gebauer. 2013. "The Physiological Ecology of Mycoheterotrophy." In *Mycoheterotrophy: The Biology of Plants Living on Fungi*, edited by Vincent S. F. T. Merckx, 297–342. Springer.

Hynson, Nicole A., Julienne M.-I. Schiebold, and Gerhard Gebauer. 2016. "Plant Family Identity Distinguishes Patterns of Carbon and Nitrogen Stable Isotope Abundance and Nitrogen Concentration in Mycoheterotrophic Plants Associated with Ectomycorrhizal Fungi." *Annals of Botany* 118 (3): 467–479. doi:10.1093/aob/mcw119.

Illyés, Zoltán, Krisztián Halász, Szabolcs Rudnóy, Noémi Ouanphanivanh, Tamás Márton Garay, and Zoltán Bratek. 2009. "Changes in the Diversity of the Mycorrhizal Fungi of Orchids as a Function of the Water Supply of the Habitat." *Journal of Applied Botany and Food Quality* 83 (1): 28–36.

Jacquemyn, Hans, Rein Brys, and Michael J. Hutchings. 2014. "Biological Flora of the British Isles: *Epipactis Palustris*." *Journal of Ecology* 102 (5): 1341–1355. doi:10.1111/1365-2745.12287.

Jacquemyn, Hans, Michael Waud, Bart Lievens, and Rein Brys. 2016. "Differences in Mycorrhizal Communities between *Epipactis* palustris, *E. helleborine* and Its Presumed Sister Species *E. neerlandica*." *Annals of Botany* 118 (1): 105–114. doi:10.1093/aob/mcw015.

Jacquemyn, Hans, Michael Waud, Rein Brys, Félix Lallemand, Pierre-Emmanuel Courty, Alicja Robionek, and Marc-André Selosse. 2017. "Mycorrhizal Associations and Trophic Modes in Coexisting Orchids: An Ecological Continuum between Auto- and Mixotrophy." *Frontiers in Plant Science* 8: 1497. doi:10.3389/fpls.2017.01497.

Jin, Xiao-Hua, Zong-Xin Ren, Song-Zhi Xu, Hong Wang, De-Zhu Li, and Zheng-Yu Li. 2014. "The Evolution of Floral Deception in *Epipactis veratr folia* (Orchidaceae): from Indirect Defense to Pollination." *BMC Plant Biology* 14 (1): 63. doi:10.1186/1471-2229-14-63.

Julou, Thomas, Bastian Burghardt, Gerhard Gebauer, Daniel Berveiller, Claire Damesin, and Marc-André Selosse. 2005. "Mixotrophy in Orchids: Insights from a Comparative Study of Green Individuals and Nonphotosynthetic Individuals of *Cephalanthera damasonium*." *New Phytologist* 166 (2): 639–653. doi:10.1111/j.1469-8137.2005.01364.x.

Lallemand, Félix, Myriam Gaudeul, Josie Lambourdière, Yosuke Matsuda, Yasushi Hashimoto, and Marc-André Selosse. 2016. "The Elusive Predisposition to Mycoheterotrophy in Ericaceae." *New Phytologist* 212 (2): 314–319. doi:10.1111/nph.14092.

Lallemand, Félix, Ülle Puttsepp, Mait Lang, Aarne Luud, Pierre-Emmanuel Courty, Cécile Palancade, and Marc-André Selosse. 2017. "Mixotrophy in Pyroleae (Ericaceae) from Estonian Boreal Forests Does Not Vary with Light or Tissue Age." *Annals of Botany* 120 (3): 361–371. doi:10.1093/aob/mcx054.

Liebel, Heiko T., Martin I. Bidartondo, and Gerhard Gebauer. 2015. "Are Carbon and Nitrogen Exchange between Fungi and the Orchid *Goodyera repens* Affected by Irradiance?" *Annals of Botany* 115 (2): 251–261. doi:10.1093/aob/mcu240.

Matsuda, Yosuke, Shoko Shimizu, Manami Mori, Shin-Ichiro Ito, and Marc-André Selosse. 2012. "Seasonal and Environmental Changes of Mycorrhizal Associations and Heterotrophy Levels in Mixotrophic *Pyrola japonica* (Ericaceae) Growing under Different Light Environments." *American Journal of Botany* 99 (7): 1177–1188. doi:10.3732/ajb.1100546.

Ogura-Tsujita, Yuki, Jun Yokoyama, Kazumitsu Miyoshi, and Tomohisa Yukawa. 2012. "Shifts in Mycorrhizal Fungi during the Evolution of Autotrophy to Mycoheterotrophy in *Cymbidium* (Orchidaceae)." *American Journal of Botany* 99 (7): 1158–1176. doi:10.3732/ajb.1100464.

Pedersen, Henrik A. E., Santi Watthana, Mélanie Roy, Somran Suddee, and Marc-André Selosse. 2009. "*Cephalanthera exigua* Rediscovered: New Insights in the Taxonomy, Habitat Requirements and Breeding System of a Rare Mycoheterotrophic Orchid." *Nordic Journal of Botany* 27 (6): 460–468. doi:10.1111/j.1756-1051.2009.00465.x.

Preiss, Katja, Iris K. U. Adam, and Gerhard Gebauer. 2010. "Irradiance Governs Exploitation of Fungi: Fine-Tuning of Carbon Gain by Two Partially Myco-Heterotrophic Orchids." *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 277 (1686): 1333–1336. doi:10.1098/rspb.2009.1966.

Pridgeon, Alec M., Phillip Cribb, Mark W. Chase, and Finn N. Rasmussen. 2005. *Genera Orchidacearum Volume 4: Epidendroideae*. Oxford: Oxford University Press.

R Core Team. 2015. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. http://www.r-project.org/.

Roy, Mélanie, Santi Watthana, Anna Stier, Franck Richard, Suyanee Vessabutr, and Marc-André Selosse. 2009. "Two Mycoheterotrophic Orchids from Thailand Tropical Dipterocarpacean Forests Associate with a Broad Diversity of Ectomycorrhizal Fungi." *BMC Biology* 7 (1): 51. doi:10.1186/1741-7007-7-51.

Roy, Mélanie, Cédric Gonneau, Alain Rocheteau, Daniel Berveiller, Jean-Claude Thomas, Claire Damesin, and Marc-André Selosse. 2013. "Why Do Mixotrophic Plants Stay Green? A Comparison between Green and Achlorophyllous Orchid Individuals *in Situ*." *Ecological Monographs* 83 (1): 95–117. doi:10.1890/11-2120.1.

Schiebold, Julienne M.-I., Martin I. Bidartondo, Peter Karasch, Barbara Gravendeel, and Gerhard Gebauer. 2017. "You Are What You Get from Your Fungi: Nitrogen Stable Isotope Patterns in *Epipactis* Species." *Annals of Botany* 119 (7): 1085–1095. doi:10.1093/aob/mcw265.

Selosse, Marc-André, and Florent Martos. 2014. "Do Chlorophyllous Orchids Heterotrophically Use Mycorrhizal Fungal Carbon?" *Trends in Plant Science* 19 (11): 683–685. doi:10.1016/j.tplants.2014.09.005.

Selosse, Marc-André, and Mélanie Roy. 2009. "Green Plants That Feed on Fungi: Facts and Questions about Mixotrophy." *Trends in Plant Science* 14 (2): 64–70. doi:10.1016/j.tplants.2008.11.004.

Selosse, Marc-André, Antonella Faccio, Gil Scappaticci, and Paola Bonfante. 2004. "Chlorophyllous and Achlorophyllous Specimens of *Epipactis microphylla* (Neottieae, Orchidaceae) Are Associated with Ectomycorrhizal Septomycetes, including Truffles." *Microbial Ecology* 47 (4): 416–426. doi:10.1007/s00248-003-2034-3.

Selosse, Marc-André, Melissa Bocayuva, Maria Catarina Kasuya, and Pierre-Emmanuel Courty. 2016. "Mixotrophy in Mycorrhizal Plants: Extracting Carbon from Mycorrhizal Networks." In *Molecular Mycorrhizal Symbiosis*, edited by Francis Martin, 451–471. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell.

Shefferson, Richard P., Mélanie Roy, Ülle Püttsepp, and Marc-André Selosse. 2016. "Demographic Shifts Related to Mycoheterotrophy and Their Fitness Impacts in Two *Cephalanthera* Species." *Ecology* 97 (6): 1452–1462.

Stöckel, Marcus, Tamara Těšitelová, Jana Jersáková, Martin I. Bidartondo, and Gerhard Gebauer. 2014. "Carbon and Nitrogen Gain during the Growth of Orchid Seedlings in Nature." *New Phytologist* 202 (2): 606–615. doi:10.1111/nph.12688.

Těšitelová, Tamara, Milan Kotilínek, Jana Jersáková, François-Xavier Joly, Jiří Košnar, Irina Tatarenko, and Marc-André Selosse. 2015. "Two Widespread Green *Neottia* Species (Orchidaceae) Show Mycorrhizal Preference for Sebacinales in Various Habitats and Ontogenetic Stages." *Molecular Ecology* 24 (5): 1122–1134. doi:10.1111/mec.13088.

Trudell, Steven A., Paul T. Rygiewicz, and Robert L. Edmonds. 2003. "Nitrogen and Carbon Stable Isotope Abundances Support the Myco-Heterotrophic Nature and Host-Specificity of Certain Achlorophyllous Plants." *New Phytologist* 160 (2): 391–401. doi:10.1046/j.1469-8137.2003.00876.x.

Veldre, Vilmar, Kessy Abarenkov, Mohammad Bahram, Florent Martos, Marc-André Selosse, Heidi Tamm, Urmas Kõljalg, and Leho Tedersoo. 2013. "Evolution of Nutritional Modes of Ceratobasidiaceae (Cantharellales, Basidiomycota) as Revealed from Publicly Available ITS Sequences." *Fungal Ecology* 6 (4): 256–268. doi:10.1016/j.funeco.2013.03.004.

Weiß, Michael, Frank Waller, Alga Zuccaro, and Marc-André Selosse. 2016. "Sebacinales - One Thousand and One Interactions with Land Plants." *New Phytologist* 211 (1): 20–40. doi:10.1111/nph.13977.

Xiang, Xiao-Guo, De-Zhu Li, Wei-Tao Jin, Hai-Lang Zhou, Jian-Wu Li, and Xiao-Hua Jin. 2012. "Phylogenetic Placement of the Enigmatic Orchid Genera *Thaia* and *Tangtsinia*: Evidence from Molecular and Morphological Characters." *Taxon* 61 (1): 45–54.

ARTICLE VI

Thirteen new plastid genomes from mixotrophic and autotrophic species provide insights into heterotrophy evolution in Neottieae orchids

AVANT-PROPOS

Il s'agit ici d'un des grands projets de ma thèse : comprendre l'évolution de la mycohétérotrophie au sein des Neottieae. Répondre à cet objectif impliquait de clarifier la phylogénie, jusqu'alors controversée, de ce groupe. Nous avons pour ce faire décidé de séquencer plusieurs génomes plastidiaux afin de bénéficier d'un large jeu de données pour réaliser nos analyses phylogénétiques. Une fois les séquences obtenues, nous avons pu en profiter pour tester si un relâchement des pressions de sélection était déjà à l'œuvre chez les plantes mixotrophes pour certains gènes liés à la photosynthèse, de manière semblable à ce qu'on observe chez les espèces mycohétérotrophes.

Les résultats des ces analyses nous ont doublement surpris. D'une part, malgré le nombre conséquent de sites utilisés pour la reconstruction phylogénétique, les relations de parenté entre les différents genres restaient difficile à établir avec certitude. Il semblerait que ces difficultés trouvent leur origine dans une évolution rapide, au début de l'histoire du groupe. Cela ne nous a néanmoins pas empêché de proposer plusieurs hypothèses relatives à l'émergence et à l'évolution des différents types de mycohétérotrophie (totale ou partielle) au sein des Neottieae. D'autre part, nous n'avons pas observé, dans les séquences plastidiales des espèces mixotrophes, de signes indiquant un relâchement des contraintes évolutives. Cela suggère que la photosynthèse est encore un élément clé de la fitness des Neottieae mixotrophes et rejoint nos précédents résultats sur son rôle dans la formation des fruits (**Article I**).

Ces travaux ont été soumis à la revue *Genome Biology and Evolution* au mois d'août 2018.

La plupart des espèces étudiées avaient déjà été échantillonnées avant mon arrivée au laboratoire. J'ai préparé les échantillons pour le séquençage, assemblé et annoté les génomes plastidiaux, réalisé les analyses phylogénétiques et mené les tests relatifs aux changements dans les pressions de sélection. Ces travaux ont été conduits progressivement au cours des trois années de thèse. Ils s'inscrivent dans un projet plus vaste sur la phylogénie des Neottieae et les indices de mixotrophie (champignons associés et isotopes), impliquant des collaborateurs japonais. Malheureusement, le timing de ce projet dépassait les échéances propres à mon doctorat et je ne pourrais en présenter que quelques éléments en discussion.

Title

Thirteen new plastid genomes from mixotrophic and autotrophic species provide insights into heterotrophy evolution in Neottieae orchids

Authors

Félix Lallemand[1,*], Maria Logacheva[2,3], Isabelle Le Clainche[4], Aurélie Bérard[4], Ekaterina Zheleznaia[5], Étienne Delannoy[6,7], Marie-Christine Le Paslier[4], Marc-André Selosse[1,8]

[1] Institut de Systématique, Evolution, Biodiversité (ISYEB), Muséum national d'Histoire naturelle, CNRS, Sorbonne Université, EPHE, CP 39, 57 rue Cuvier, 75005 Paris, France
[2] Institute for Information Transmission Problems, Moscow, Russia
[3] Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow Region, Russia
[4] Etude du Polymorphisme des Génomes Végétaux (EPGV), INRA, Université Paris-Saclay, 91000 Evry, France
[5] Peoples' Friendship University of Russia, Timiryazev State Biological Museum, Moscow, Russia
[6] Institute of Plant Sciences Paris-Saclay (IPS2), CNRS, INRA, Université Paris-Sud, Université Evry, Université Paris-Saclay, 91405 Orsay, France
[7] Institute of Plant Sciences Paris-Saclay IPS2, Paris Diderot, Sorbonne Paris-Cité, 91405 Orsay, France
[8] Department of Plant Taxonomy and Nature Conservation, University of Gdansk, Wita Stwosza 59, 80-308 Gdansk, Poland

* corresponding author

Data deposition

Annotated plastome sequences were submitted to GenBank under the accession numbers MH590345-MH590357 (Table 1).

Raw reads for *C. longibracteata*, *C. rubra*, *E. albensis*, *E. atrorubens*, *E. gigantea*, *E. microphylla*, *E. palustris*, *E. purpurata* and *P. pabstii* were submitted to the NCBI database: BioProject PRJNA484137, SRA accession number ongoing.

Alignments used for phylogenetic analyses are available upon request.

Abstract

Mixotrophic species use both organic and mineral carbon sources. Some mixotrophic plants combine photosynthesis and a nutrition called mycoheterotrophy, where carbon is obtained from fungi forming mycorrhizal symbiosis with their roots. These species can lose photosynthetic abilities and evolve full mycoheterotrophy. Besides morphological changes, the latter transition is associated with a deep alteration of the plastid genome. Photosynthesis-related genes are lost first, followed by housekeeping genes, eventually resulting in a highly reduced genome. Whether relaxation of selective constraints already occurs for the plastid genome of mixotrophic species, which remain photosynthetic, is unclear. This is partly due to the difficulty of comparing plastid genomes of autotrophic, mixotrophic and mycoheterotrophic species in a narrow phylogenetic frame. We address this question in the orchid tribe Neottieae, where this large assortment of nutrition types occurs. We sequenced 13 new plastid genomes, including nine mixotrophic species and covering all six Neottieae genera. We investigated selective pressure on plastid genes in each nutrition type and conducted a phylogenetic inference of the group. Surprisingly, photosynthesis-related genes did not experience selection relaxation in mixotrophic species compared to autotrophic relatives. Conversely, we observed evidence for selection intensification for some plastid genes. Photosynthesis is thus still under purifying selection, maybe because of its role in fruit formation and thus reproductive success. Phylogenetic analysis was conclusive for most relationships, but short branches at the base of the tree suggest an evolutionary radiation at the beginning of Neottieae history, which, we hypothesize, may be linked to mixotrophy emergence.

Keywords

Mycorrhiza, mycoheterotrophy, mixotrophy, phylogeny, Neottieae, plastome

Main Text

Introduction

Mixotrophic organisms grow by using either simultaneously or successively inorganic and organic carbon resources, and therefore represent intermediates between autotrophy and heterotrophy (Selosse et al. 2016; Těšitel et al. 2018). Land plants widely associate with fungi through mycorrhizal symbiosis, mostly exchanging their photosynthates for mineral nutrients (Smith and Read 2008). Repeatedly, plants evolved the ability to gain organic compounds also from their mycorrhizal fungi, a mixotrophic nutrition also called partial mycoheterotrophy (Selosse and Roy 2009; Hynson et al. 2013; Těšitel et al. 2018). We hereafter use the word mixotrophy specifically for these plants that combine photosynthetic and mycorrhizal carbon sources. In many mixotrophic lineages from different families, species eventually lost photosynthesis and became purely mycoheterotrophic (Merckx et al. 2013a). Besides morphological traits such as chlorophyll loss, reduction in leaf surface area, development of short clumpy roots or production of reserve-less

'dust' seeds (Merckx et al. 2013b), an increasing number of molecular data allow us to look at the genetic traits linked with the evolutionary steps toward mycoheterotrophy.

The plastid genomes (or plastomes) of 24 mycoheterotrophic species have been sequenced to date (Graham et al. 2017; Petersen et al. 2018). This has resulted in a model of sequential plastid genome degradation associated with mycoheterotrophy, which parallels what has been observed for heterotrophic parasitic plants (Barrett and Davis 2012; Barrett et al. 2014; Wicke et al. 2016; Graham et al. 2017). Genes encoding subunits of the NADH dehydrogenase-like (NDH) complex, which regulates excessive electron flow in the plastidial electron transfer chain, are the first to be lost, followed by most photosynthesis-related genes. Rubisco large subunit (*rbcL*), ATP synthase and plastid-encoded RNA polymerase (PEP) genes are often retained and then gradually lost; eventually, degradation encompasses housekeeping genes involved in plastid translation and other specific functions. This model summarizes well how the plastid genome evolves in mycoheterotrophs once they have lost photosynthetic abilities (Graham et al. 2017).

However, little is known about what occurs in the evolutionary steps prior to mycoheterotrophy, that is, in mixotrophic species, which retain photosynthetic abilities. Whether these species already experience relaxed selective pressure on photosynthesis remains unclear. This is a challenging question because of the scarcity of lineages that have retained together autotrophic, mixotrophic and mycoheterotrophic species in a single phylogenetic frame. Known examples include the genus *Burmannia* L. (Burmanniaceae; Bolin et al. 2017), the tribe Pyroleae (Ericaceae; Lallemand et al. 2016) and the tribe Neottieae (Orchidaceae; Selosse and Roy 2009; Gonneau et al. 2014). In the leafless genus *Corallorhiza* Gagnebin (Orchidaceae), where no full autotroph occurs, comparison of plastomes from mixotrophic (green) and mycoheterotrophic (non-green) species showed very limited gene loss in the former and relaxed selective constraints on photosynthesis and ATP synthase genes in the latter (Barrett et al. 2014). However, the selective regime does not differ between mixotrophic *Corallorhiza* and autotrophic outgroups (Barrett et al. 2014). In the orchid genus *Cymbidium* Sw., *C. macrorhizon* is leafless but still holds chlorophyll in the stem and fruits and the importance of its photosynthesis for fruiting has recently been demonstrated (Suetsugu et al. 2018). The plastome of this mixotrophic species shows no gene loss except for a few NDH genes and is mostly under purifying selection (Kim et al. 2018). These two examples (*Corallorhiza* and *Cymbidium*) question the idea that photosynthesis already undergoes relaxed selection in mixotrophic species and call for extensive analyses in other lineages.

We address this issue in Neottieae, an orchid tribe mostly found in northern hemisphere forests. Neottieae include six genera and *ca.* 200 species (WCSP, 2018) with various nutrition types: *Palmorchis* Barb. Rodr. (all putative autotrophs), *Neottia* Guett. (many mycoheterotrophs and some probable mixotrophs; Těšitelová et al. 2012; Yagame et al. 2016; Schiebold et al. 2017a), *Epipactis* Zinn (numerous mixotrophs and some autotrophs; Lallemand et al. 2018a), *Cephalanthera* Rich. (some mycoheterotrophs and many mixotrophs), *Limodorum* Boehm. (all mixotrophs; Girlanda et al. 2006), *Aphyllorchis* Blume (all mycoheterotrophs; Roy et al. 2009). Early studies on Neottieae significantly contributed to our understanding of mycoheterotrophy ecophysiology and evolution

Table 1. Length, GC content and genes lost of the 13 Neottieae plastomes sequenced.

		Length				GC content				
Species	**Accession**	Total	LSC	SSC	IR	Total	LSC	SSC	IR	**Gene loss**
P. pabstii	MH590357	163909	90710	18823	27188	37.3	35	31	43.3	
C. damasonium	MH590345	161699	88720	19085	26947	37.3	35.1	30.7	43.2	
C. longibracteata	MH590346	161986	88888	19138	26980	37.2	35	30.6	43.1	
C. rubra	MH590347	162277	88814	19199	27132	37.2	35	30.6	43.1	
E. albensis	MH590348	159763	87237	18782	26872	37.3	35.1	30.7	43.2	
E. atrorubens	MH590349	159790	87237	18803	26875	37.3	35.1	30.7	43.3	
E. gigantea	MH590350	158977	87101	18664	26606	37.3	35.2	30.8	43.2	
E. helleborine	MH590351	159822	87313	18785	26862	37.3	35.1	30.7	43.2	
E. microphylla	MH590352	159236	86706	18784	26873	37.4	35.2	30.7	43.3	ndhD, ndhE, ndhF, ndhH
E. palustris	MH590353	159134	87114	18702	26659	37.4	35.2	30.8	43.2	
E. purpurata	MH590354	159864	87246	18786	26916	37.3	35.1	30.7	43.2	
L. abortivum	MH590355	128822	85544	15099	27102	36.3	35.1	30.4	43.1	ndhA, ndhB, ndhC, ndhD, ndhE, ndhF, ndhG, ndhH, ndhI, ndhJ, ndhK, cemA
N. cordata	MH590356	147034	82416	12812	25903	37.5	35.1	29.3	43.4	ndhA, ndhB, ndhC, ndhD, ndhE, ndhF, ndhG, ndhH, ndhI, ndhJ, ndhK

(Selosse et al. 2002; Gebauer and Meyer 2003; Julou et al. 2005). The transition to mixotrophy in this group strongly correlates with a shift in mycorrhizal fungi. Autotrophic orchids associate with a polyphyletic group of saprotrophic and endophytic fungi, the rhizoctonias (Dearnaley et al. 2012), whereas mixotrophic Neottieae use ectomycorrhizal fungi from different genera, which simultaneously form mycorrhizas with surrounding trees (Selosse and Martos 2014).

Plastome sequencing of some Neottieae species by Feng et al. (2016) has yielded important results: (i) apparent clarification of the controversial phylogenetic relationships between Neottieae genera (Bateman et al. 2005; Roy et al. 2009; Gorniak et al. 2010; Xiang et al. 2012); (ii) patterns of gene loss in mycoheterotrophs matching the model described above; (iii) similar levels of plastome degradation in leafless *Neottia* species, independently of the presence or absence of chlorophyll (contrary to leafless *Corallorhiza*; Barrett et al. 2014). Their sampling, however, included only four out of six Neottieae genera and only one mixotrophic species (*Cephalanthera longifolia* (L.) Fritsch), precluding detailed discussion about plastome evolution during the early stages of the emergence of mycoheterotrophy. Here we sequenced 13 additional Neottieae plastomes, including representatives of the two remaining genera, as well as nine mixotrophic species (Table 1). We investigated how gene content and selective pressure are related to nutrition type and carried out a plastome-based phylogenetic reconstruction of Neottieae.

Plastome structure, gene content and selective regime

None of the plastomes of the 13 photosynthetic species sequenced displayed major structural alteration compared to related autotrophic Neottieae (Feng et al. 2016). Their sizes and GC contents were similar, with the exception of *N. cordata*, which had a smaller genome as a consequence of NDH gene loss (Table 1). Gene loss (pseudogenization or physical loss) was restricted to the NDH complex in a few species (Table 1): *N. cordata* (all 11 genes lost), *L. abortivum* (all genes) and *E. microphylla* (4 genes). An exception is *cemA* (chloroplast envelope membrane protein), which is lost in *L. abortivum* as in some mixotrophic *Corallorhiza* (Barrett et al. 2014), which may indicate a non-essential photosynthetic function. A 9-amino-acid deletion and a 28-amino-acid insertion occurred respectively in *rpoC1* for *C. rubra* and *accD* (which is highly variable in length; Kim and Lee 2004; Gurdon and Maliga 2014) for *N. cordata*. However, we did not find any stop codons and/or frameshift indels in their sequence, suggesting that the proteins are still functional.

The selective regime was analyzed for four main gene subsets (as in Graham et al. 2017): photosynthesis-related, ATP, PEP and housekeeping (Table 2). None of these showed a better fit for one of the models, except for the photosynthesis genes for M2 *vs* M1 (Table 2). M2 allowed different ω for outgroups (ω_0 = 0.12), *P. pabstii* (ω_p = 0.15), and the remaining Neottieae (ω_{N*} = 0.10; below noted as Neottieae* = Neottieae without *Palmorchis*; Table 2). These results were not supported by the RELAX analysis, which showed instead intensification of selective constraints for PEP genes comparing Neottieae* and *Palmorchis* (k = 1.98; P = 0.04) and for housekeeping genes comparing mixotrophic and autotrophic Neottieae* (k = 1.18; P = 0.02; Table 2).

Table 2: Analysis of selective pressure for different sets of genes conserved among autotrophic and mixotrophic Neottieae.

		PAML analysis			RELAX analysis	
Genes and models	**np[a]**	**lnL[b]**	**Λ[c]**	**P-value**	**k[d]**	**P-value**
Photosynthesis[e]						
M0: ω_0 = 0.11	43	-33266.07				
M1: ω_0 = 0.12, ω_N = 0.11	44	-33265.49	1.17	0.28	1.03	0.67
M2: ω_0 = 0.12, ω_p = 0.15, ω_{N*} = 0.10	45	-33263.31	4.35	0.04	1.13	0.44
M3: ω_0 = 0.12, ω_p = 0.15, ω_{Na} = 0.11, ω_{Nx} = 0.09	46	-33263	0.62	0.43	0.91	1
rbcL						
M0: ω_0 = 0.12	43	-2687.57				
M1: ω_0 = 0.21, ω_N = 0.09	44	-2685.94	3.26	0.07	0.57	0.03
M2: ω_0 = 0.20, ω_p = 0.52, ω_{N*} = 0.04	45	-2676.02	19.85	10^{-5}	5.24	10^{-4}
M3: ω_0 = 0.20, ω_p = 0.52, ω_{Na} = 0.05, ω_{Nx} = 0.01	46	-2675.11	1.82	0.18	10.97	0.04
ATP[f]						
M0: ω_0 = 0.13	43	-10149.71				
M1: ω_0 = 0.15, ω_N = 0.13	44	-10149.43	0.56	0.45	1.08	0.49

M2: $\omega_0 = 0.15$, $\omega_p = 0.12$, $\omega_{N*} = 0.13$	45	-10149.4	0.05	0.82	0.72	0.16
M3: $\omega_0 = 0.15$, $\omega_p = 0.12$, $\omega_{Na} = 0.13$, $\omega_{Nx} = 0.12$	46	-10149.36	0.09	0.76	1.01	0.93
PEP[g]						
M0: $\omega_0 = 0.26$	43	-22109.79				
M1: $\omega_0 = 0.23$, $\omega_N = 0.26$	44	-22109.33	0.92	0.34	0.93	0.83
M2: $\omega_0 = 0.23$, $\omega_p = 0.19$, $\omega_{N*} = 0.28$	45	-22107.93	2.8	0.09	1.98	0.04
M3: $\omega_0 = 0.23$, $\omega_p = 0.19$, $\omega_{Na} = 0.30$, $\omega_{Nx} = 0.25$	46	-22107.14	1.59	0.21	0.69	0.39
Housekeeping[h]						
M0: $\omega_0 = 0.26$	43	-25635.43				
M1: $\omega_0 = 0.23$, $\omega_N = 0.27$	44	-25634.46	1.94	0.16	1.16	0.56
M2: $\omega_0 = 0.22$, $\omega_p = 0.30$, $\omega_{N*} = 0.26$	45	-25634.21	0.49	0.48	1.1	0.75
M3: $\omega_0 = 0.22$, $\omega_p = 0.30$, $\omega_{Na} = 0.27$, $\omega_{Nx} = 0.25$	46	-25633.98	0.46	0.5	1.18	0.02
matK						
M0: $\omega_0 = 0.35$	43	-4121.08				
M1: $\omega_0 = 0.39$, $\omega_N = 0.34$	44	-4120.92	0.33	0.56	1.11	0.7
M2: $\omega_0 = 0.39$, $\omega_p = 0.37$, $\omega_{N*} = 0.34$	45	-4120.9	0.05	0.83	1.34	1
M3: $\omega_0 = 0.39$, $\omega_p = 0.37$, $\omega_{Na} = 0.45$, $\omega_{Nx} = 0.23$	46	-4118.08	5.63	0.02	0.48	0.52
ycf1 + ycf2						
M0: $\omega_0 = 0.68$	43	-27092.79				
M1: $\omega_0 = 0.78$, $\omega_N = 0.65$	44	-27091.67	2.23	0.14	1.12	0.46
M2: $\omega_0 = 0.78$, $\omega_p = 0.57$, $\omega_{N*} = 0.66$	45	-27091.38	0.59	0.44	1.1	1
M3: $\omega_0 = 0.78$, $\omega_p = 0.57$, $\omega_{Na} = 0.75$, $\omega_{Nx} = 0.55$	46	-27088.8	5.16	0.02	1.13	0.13

[a] number of parameters for the model

[b] log-likelihood of the data for the model

[c] log-likelihood ratio test statistic used to compute P-value

[d] selection intensity parameter

[e] *ccsA*, *petA*, *petB*, *petD*, *petG*, *petL*, *petN*, *psaA*, *psaB*, *psaC*, *psaI*, *psaJ*, *psbA*, *psbB*, *psbC*, *psbD*, *psbE*, *psbF*, *psbH*, *psbI*, *psbJ*, *psbK*, *psbL*, *psbM*, *psbN*, *psbT*, *psbZ*, *rbcL*, *ycf3*, *ycf4*

[f] *atpA*, *atpB*, *atpE*, *atpF*, *atpH*, *atpI*

[g] *rpoA, rpoB, rpoC1, rpoC2*

[h] *accD*, *clpP*, *infA*, *matK*, *rpl2*, *rpl14*, *rpl16*, *rpl20*, *rpl22*, *rpl23*, *rpl32*, *rpl33*, *rpl36*, *rps2*, *rps3*, *rps4*, *rps7*, *rps8*, *rps11*, *rps12*, *rps14*, *rps15*, *rps16*, *rps18*, *rps19*

The same analysis carried out for individual photosynthesis-related genes showed a variation in selective regime only for *rbcL* (Table 2 for *rbcL*, other genes not shown). *rbcL* data fitted models M2 much better than M1. In M2, ω was lower for Neottieae* ($\omega_{N*} = 0.04$) compared to outgroups ($\omega_0 = 0.20$) and *P. pabstii* ($\omega_p = 0.52$; Table 2). This was supported by the RELAX analysis, which

showed an intensification of selective constraints in Neottieae* compared to *Palmorchis* on the one hand ($k = 5.24$; $P = 10^{-4}$), and in mixotrophic compared to autotrophic Neottieae* on the other hand ($k = 10.97$; $P = 0.04$). Thus, *rbcL* experiences stronger purifying selection in Neottieae*, and more particularly in mixotrophic species. For individual non-photosynthesis genes, PAML analysis showed that both *matK* and *ycf1 + ycf2* fitted M3 better than M2, with higher ω for autotrophic ($\omega_{Na} = 0.45$, resp. 0.75) compared to mixotrophic Neottieae* ($\omega_{Nx} = 0.23$, resp. 0.55; Table 2). This was, however, not supported by the RELAX analysis (Table 2).

Thus, we did not find evidence for relaxed selection in plastomes of mixotrophic species. On the contrary, both PAML and RELAX analyses showed stronger selective pressure in mixotrophic Neottieae* and even in the whole Neottieae* group for some genes.

Plastome evolution in mixotrophic Neottieae

The observed loss of NDH genes in three plastomes further demonstrates how this gene complex is sensitive to evolutionary decay in Neottieae (Feng et al. 2016) and more generally in orchids (Barrett et al. 2014; Luo et al. 2014; Kim et al. 2015; Lin et al. 2017; Kim et al. 2018). Interestingly, it does not correlate with species nutrition. For example, the 11 genes were lost in *L. abortivum* and *N. cordata*. The first is mixotrophic and highly dependent on fungal carbon since its photosynthesis does not even compensate for its respiration (Girlanda et al. 2006); the second displays a more versatile use of fungal resources (Schiebold et al. 2017a), which may even be optional (Těšitelová et al. 2015). Similarly, *E. microphylla* is the only species of the mixotrophic *Epipactis* section (*E. albensis*, *E. atrorubens*, *E. helleborine*, *E. purpurata*) for which NDH gene loss occurred, whereas some losses have been reported in *E. veratrifolia* and *E. mairei* (Feng et al., 2016) that are supposed autotrophic (but more investigations are needed). This suggests a species-specific decay of NDH genes in orchids, independently of their autotrophic or mixotrophic habit.

Considering photosynthesis-related genes, they are neither lost nor experience relaxed selective constraints in mixotrophic species. On the contrary, in Neottieae*, the photosynthesis-related genes showed a slightly lower ω and *rbcL* was under stronger purifying selection compared to *P. pabstii* (Table 2). Lower ω for *matK* and *ycf1 + ycf2* in mixotrophic *vs* autotrophic Neottieae* and $k > 1$ following the RELAX analyses of PEP and housekeeping genes suggest that some other parts of the plastomes, without photosynthetic functions, also experienced higher selective constraints in mixotrophs. These results are mostly concordant with what has been reported for mixotrophic *Corallorhiza*, which (i) retain all photosynthesis-related genes except *cemA* and *psbM*, (ii) display apparently unimpaired photosynthesis and (iii) show no difference in plastome selective regime compared to autotrophic references (Barrett et al. 2014). This also parallels the retention of purifying selection observed in the mixotrophic *Cymbidium macrorhizon* (Kim et al. 2018). However, our results contrast with other kinds of mixotrophy where relaxed purifying selection has been observed for photosynthesis, PEP and ATP-synthase genes, namely (1) in carnivorous plants (*psa*, *atp* and *rpo* genes in Wicke et al. 2014) and (2) in obligate hemiparasites (*psa*, *psb*, *pet*, *atp*,

rbcL in Petersen et al. 2015; photosynthesis and *atp* genes in Wicke et al. 2016). For this latter group, increased selective constraints have nevertheless also been reported in some housekeeping genes (*accD*, *cemA*, *clpP*, *ycf2*, Petersen et al. 2015).

In Neottieae, depending on the plastid genes considered, mixotrophic species thus feature either no change or a distinctive increase in selective pressure compared to other mixotrophic groups such as *Corallorhiza*, carnivorous or parasitic plants (Barrett et al. 2014; Wicke et al. 2014; Petersen et al. 2015; Wicke et al. 2016). Photosynthesis therefore seems to remain positively selected in mixotrophic Neottieae, and this is congruent with physiological evidence for the importance of photosynthetic carbon in fruit development and reproduction in these species (Roy et al. 2013; Bellino et al. 2014; Gonneau et al. 2014; Lallemand et al., 2018b). We hypothesize that the retention of genes and purifying selection in the plastome of *Cymbidium macrorhizon* (Kim et al. 2018) relies on the same reasons, as illustrated by Suetsugu et al. (2018).

Neottieae phylogeny and mycoheterotrophy evolution

Whole plastome analysis of the 28 species dataset confirmed Neottieae monophyly with *Palmorchis* in sister position (Figure 1A). *Neottia*, *Epipactis* and *Cephalanthera* genera were each monophyletic and most intra-generic relationships were well-defined. *Aphyllorchis* and *Limodorum* were sister genera but with mild support from ML analysis. However, very short branches with low support prevented strong conclusions about generic relationships (Figure 1A). When mycoheterotrophic *Neottia* species were removed to increase alignment length and quality, we obtained a similar tree with better support (Figure S2A). In particular, *Neottia*, *Epipactis*, *Aphyllorchis* and *Limodorum* clustered together in a monophyletic clade sister to *Cephalanthera*. When restricting the analysis to intact coding sequences of non-mycoheterotrophic species for maximum alignment quality, *Limodorum* was sister to *Epipactis* but *Neottia* no longer clustered with these genera in a monophyletic group (Figure S2B). Combining these results gives *Epipactis*, [*Aphyllorchis* + *Limodorum*], *Neottia* and *Cephalanthera* as successive sisters. Analysis based on nuclear ITS confirmed *Aphyllorchis* and *Limodorum* as sister genera, but failed to define further inter-generic relationships (Figure S2C).

Phylogenetic relationships between the different Neottieae genera have long been controversial. Bateman et al. (2005) in a first molecular phylogeny of Neottieae, based on nuclear ITS markers and the plastid *trnL* intron, obtained the same topology as our combined plastome analyses, but it is not clear whether these branches were supported (Fig. G.3 in Bateman et al. 2005). Subsequent studies using different species and marker combinations yielded sometimes contradictory results, without definitive evidence for any inter-generic relationships (ITS, *trnS-G* spacer and *rbcL* in Roy et al. 2009; ITS, *Xdh*, *rbcL*, *matK*, *psaB* and *trnL-F* spacer in Xiang et al. 2012; ITS, *rbcL* and *matK* in Zhou and Jin 2018). More confusingly, the phylogeny of Feng and colleagues (2016), based on a subset of the plastomes we analyzed, disagrees with our results. Feng et al. (2016) reported

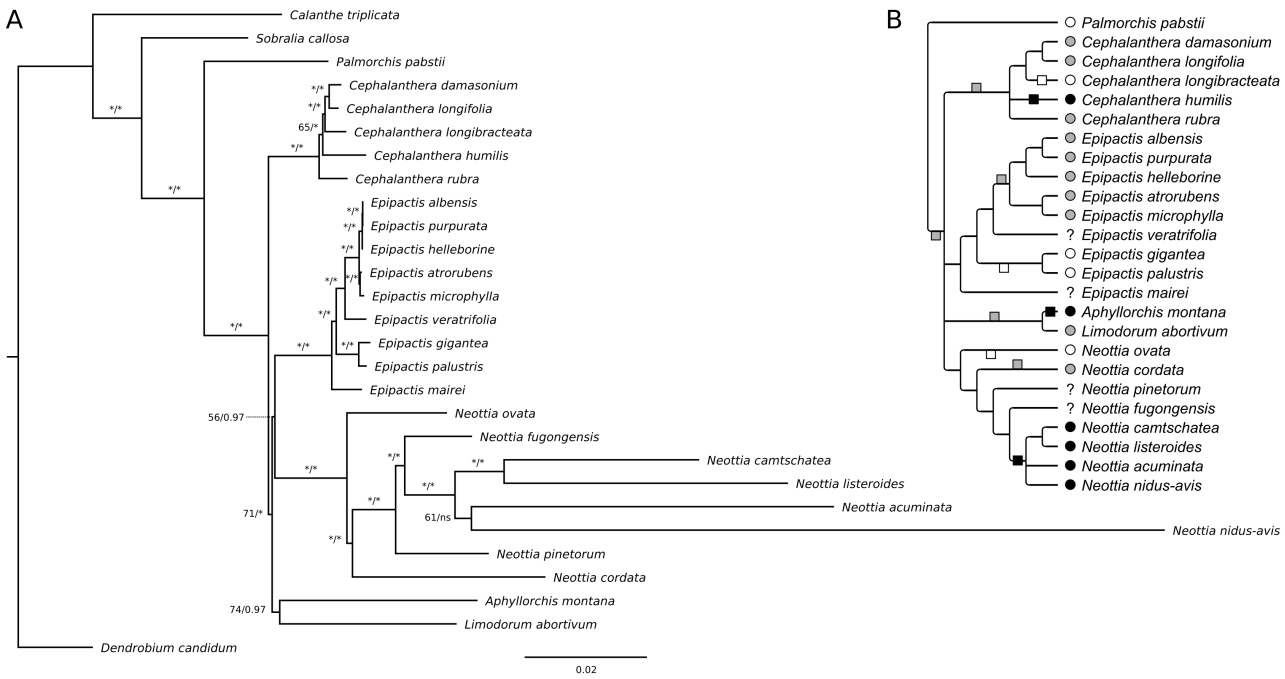


Fig. 1. A. Phylogeny of Neottieae based on whole plastome analysis. Numbers above or to the left of branches represent bootstrap values (1000 replicates) from maximum likelihood analysis (left, stars indicate numbers above 95) and posterior probabilities from Bayesian inference (right, stars indicate probabilities above 0.98), ns means that the branch was not recovered in the Bayesian analysis. Scale bar: number of substitutions per site. **B.** Two scenarios of mixotrophy and mycoheterotrophy evolution among Neottieae. Circles in front of species names indicate autotrophy (white), mixotrophy (gray) or mycoheterotrophy (black). Boxes above or below the branches show changes in trophic habit considering either an autotrophic or a mixotrophic ancestor.
Evidence for mixotrophy comes from the following references: *C. damasonium* and *C. longifolia* (Abadie et al. 2006; Bidartondo and Read 2008; Liebel et al. 2010), *C. rubra* (Preiss et al. 2010; Schiebold et al. 2017a), *E. albensis*, *E. purpurata*, *E. helleborine*, *E. atrorubens* and *E. microphylla* (Těšitelová et al. 2012; Gonneau et al. 2014; Lallemand et al. 2017; Schiebold et al. 2017b), *L. abortivum* (Girlanda et al. 2006; Liebel et al. 2010), *N. cordata* (Těšitelová et al. 2015; Yagame et al. 2016; Schiebold et al. 2017a).

Cephalanthera and *Aphyllorchis* as sister genera, with *Epipactis* and *Neottia* as successive sisters. This inconsistency may result from the difference in the number and diversity of species included in the analysis. We added 13 species, including two new genera (*Palmorchis* and *Limodorum*). But we did not manage to reproduce their results, even when considering only their subset of species, suggesting that this contradiction is rather due to differences in evolutionary signals conveyed by the plastome regions chosen for alignment and/or phylogenetic methods. Feng et al. (2016) selected conserved plastome regions, whereas we made a dual analysis of whole plastome alignment and CDS restricted alignment. Moreover, we chose not to filter or manually edit alignments following the recommendations of Tan et al. (2015) for accurate phylogenetic inferences, which may explain some differences.

Beyond these discrepancies, one has to acknowledge the reluctance of Neottieae to consent to phylogenetic reconstruction, at least for inter-generic relationships. Our plastome-based analysis

showed that the branches separating these genera are actually very short (< 10^{-3} substitutions per site). Thus, the common ancestor of Neottieae* (i.e. excluding *Palmorchis*) likely experienced rapid speciation, with little time for informative mutations to accumulate (Glor 2010). Moreover, such a fast evolution of the ancestral lineage made it prone to hybridization and incomplete lineage sorting (Glor 2010; Wang et al. 2014). This means that independent loci (e.g. nuclear and plastidial markers) are likely to encapsulate different phylogenetic stories and make any combined analysis unreliable. Although confident reconstruction of early speciation in Neottieae would thus be challenging, if not irrelevant, different gene trees could still provide interesting insights into early Neottieae evolution and possible hybridization events.

This points to an appealing hypothesis: could a shift towards mixotrophy have driven fast speciation in the ancestral lineage of Neottieae*? We first need to gauge how likely it is that mixotrophy is a plesiomorphic state of Neottieae*. Considering our plastid-based phylogeny and assuming an autotrophic common ancestor, mixotrophy evolved at least four times (Figure 1B): (i) in the ancestral lineage of all *Cephalanthera* species, with a reversion to autotrophy in *C. longibracteata*, (ii) in the *Epipactis* section of *Epipactis* (sensu Jin et al. 2014), (iii) in the *Aphyllorchis* + *Limodorum* clade and (iv) in *Neottia cordata* and/or related *Neottia* species. Conversely, assuming a mixotrophic common ancestor would give at least one reversion to autotrophy in the *E. palustris* + *E. gigantea* clade, one for *C. longibracteata* and one for *N. ovata* (Figure 1B). Unfortunately, the lack of information about the trophic status of some taxa hampers a more precise scenario. For example, green *Neottia* other than *N. cordata* or *Epipactis* species outside the *Epipactis* section may actually show some mixotrophic nutrition. The 'mixotrophic ancestor' scenario implies fewer changes than the 'autotrophic ancestor,' but includes evolutionary reversion to autotrophy. Regarding this possibility, mixotrophy shows flexibility and has to be seen as a continuum between autotrophy and mycoheterotrophy rather than a clear-cut category (Jacquemyn et al. 2017). In this context, and considering the selective pressure on photosynthesis genes reported here, mixotrophy emergence would not be irreversible and species would still be able to move back and forth along the continuum. The question whether mixotrophy is a plesiomorphy of Neottieae remains open.

If it holds true, could mixotrophy have been a key factor in the fast early diversification of Neottieae? Mixotrophy allows plants to grow in light-limited forest understorey and so to occupy a broad new ecological niche (Těšitel et al. 2018). Orchids show important dispersion abilities and most mixotrophic Neottieae do not seem very selective regarding the fungi they associate with (Těšitelová et al. 2012). One can therefore speculate that an early mixotrophic Neottieae lineage could have rapidly colonized distant and heterogeneous forest patches, thus favoring radiation.

Material and methods

DNA extraction and sequencing

Total DNA was extracted from the leaves or fruits of the following Neottieae species (Table 1 and Supplementary Table S1): *Palmorchis pabstii* Veyret, *Neottia cordata* (L.) Rich., *Epipactis albensis* Nováková & Rydlo, *E. atrorubens* (Hoffm.) Besser, *E. gigantea* Douglas ex Hook., *E. helleborine* (L.) Crantz, *E. microphylla* (Ehrh.) Sw., *E. palustris* (L.) Crantz, *E. purpurata* Sm., *Cephalanthera damasonium* (Mill.) Druce, *C. longibracteata* Blume, *C. rubra* (L.) Rich., *Limodorum abortivum* (L.) Sw. The following extraction kits and protocols were used (Supplemental Table S2): DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) with final elution in distilled water, NucleoSpin Plant II kit (Macherey-Nagel), CTAB extraction as in Porebski et al. (1997).

For most samples (Supplementary Table S2), given low yield and DNA degradation, the Accel-NGS® 1S Plus DNA Library Kit for Illumina with the 1S Plus Indexing kit (Swift Biosciences Inc., Ann Arbor, USA) was used for preparation of libraries, following the manufacturer's instructions. For other samples, the TruSeq DNA sample preparation kit (Illumina, USA) and the NEBNext Ultra DNA kit (New England Biolabs, USA) were used for preparation of libraries (Supplementary Table S2). Paired-end sequencing on multiplexed libraries was performed either on Illumina HiSeq 2000, Illumina Hiseq 2500 using the rapid run mode, Illumina HiSeq 4000 or Illumina MiSeq, depending on the samples (Supplementary Table S2). Raw sequences for *C. longibracteata*, *C. rubra*, *E. albensis*, *E. atrorubens*, *E. gigantea*, *E. microphylla*, *E. palustris*, *E. purpurata* and *P. pabstii* were submitted to the NCBI database: BioProject PRJNA484137, SRA accession number ongoing.

Read cleaning, plastome assembly and annotation

Redundant reads were removed. Trimming of the low-quality 3' end was done one base after the other until reaching a base with a Phred score > 30 or until the mean Phred score of the read was above 30. Pairs with at least one read shorter than 30 bp after this step or with N were removed.

For samples that were prepared with the Accel-NGS® 1S Plus DNA Library Kit, adapter trimming was conducted using BBDuk Trimmer plugin version 37.64 in Geneious version 11.1.3 (http://www.geneious.com, Kearse et al., 2012) with the following parameters: adapters=Illumina Truseq DNA adapters; ktrim=r; k=27; hdist=1; edist=0; mink=6; minlength=10; trimbyoverlap=t; minoverlap=6. Addition of a low complexity tail to the 3' end of fragments was part of the library preparation kit and had to be removed from the beginning of reads 2. Following the manufacturer's recommendations, trimming an additional 10 bp at the 5' end was done for all reads.

De novo assembly was done differently depending on the species (Supplementary Table S2). (i) a subset of 25% of the reads was assembled using the Geneious algorithm with medium-low sensitivity parameters. Resulting contigs were mapped on the plastome of *Neottia ovata* (L.) Bluff & Fingerh. (KU551271), *Cephalantera longifolia* (L.) Fritsch (KU551263) or *Epipactis veratrifolia*

Boiss. & Hohen (KU551267), depending on the species. Contigs corresponding to the plastome were then dissolved and reassembled with medium sensitivity parameters to increase assembly quality. The resulting contigs were again mapped to the reference genome and large single copy (LSC), inverted repeat B (IRB) and small single copy (SSC) regions were isolated. IRB was duplicated and reverse complemented to obtain inverted repeat A (IRA). Concatenation of LSC, IRB, SSC and IRA led to the final plastome sequence. (ii) the CLC Genomics Workbench *de novo* assembly procedure was used.

Depending on the species, the phylogenetically closest reference plastome was used for annotations transfer in Geneious with a 77% similarity threshold. Manual correction and addition of missing information was then carried out for each plastome. Annotated plastome sequences were submitted to GenBank under the accession numbers MH590345-MH590357 (Table 1).

Phylogenetic inferences

Including the 12 already published sequences, we ended up with a set of 25 Neottieae plastomes and added three outgroup species from the same subfamily Epidendroideae (Supplementary Table S1). The four mycoheterotrophic *Neottia* were either kept or removed to test whether their rapidly evolving plastomes and the increased length and quality of the alignment obtained without them alter phylogeny reconstruction. The second copy of the inverted repeat region (IRA) was removed from all plastomes and the resulting sequences were aligned a first time using the Mauve algorithm to detect potential rearrangements (Darling et al. 2004). The locally collinear blocks obtained were individually aligned a second time using the MAFFT online service (Katoh et al. 2017) with automatic selection of alignment strategy, gap opening penalty set to 3.0, offset value set to 0.1 and other parameters left as default. The resulting alignments were then concatenated. Model selection was done with the ModelFinder algorithm (Kalyaanamoorthy et al. 2017) implemented in the IQ-TREE program (Nguyen et al. 2015). The model with lowest Bayesian information criterion (BIC) score was used for maximum likelihood analysis with IQ-TREE (Nguyen et al. 2015). The first model with the lowest BIC compatible with MrBayes v3.2 parameters (Ronquist et al. 2012) was chosen for Bayesian inference with this program.

A complementary analysis using the nuclear marker ITS (internal transcribed spacer) was done using available Neottieae sequences (Supplementary Table S1).

Selective regime analyses

All coding sequences (CDS) were extracted from the same set of plastomes used for phylogeny reconstruction, except the six mycoheterotrophic species. Genes that were lost or pseudogenized in at least one of the remaining species were discarded from subsequent analyses. CDS were aligned based on their amino acid sequences with subsequent backtranslation using the AlignTranslation function (Wright 2015) of the DECIPHER package (Wright 2016) in the R environment for

statistical computing (R Development Core Team, 2007). Functional gene groups were built by concatenating CDS for photosynthesis, ATP synthase, PEP and housekeeping genes (Table 2). *ycf1* and *ycf2* were combined and analyzed independently because of their specific evolutionary rates (Barrett et al., 2014). In addition, some genes were analyzed individually when long enough for confident parameter estimation: *ccsA*, *psaA*, *psaB*, *psbA*, *psbB*, *psbC*, *psbD*, *rbcL*, *accD*, *matK*. ω, the ratio of non-synonymous substitutions per non-synonymous site (d_N) to synonymous substitutions per synonymous site (d_S), was used to estimate selective pressure for different sets of genes. The codeml program implemented in PAML version 4.9 (Yang 2007) was used, with the branch model and the tree shown in figure 1B. The codon frequency parameter was set to F3X4. Four nested models allowing the calculation of different ω values for some subsets of branches were defined: M0, the null model with a unique ω for the whole tree; M1, which allowed ω to differ between outgroups (ω_0) and Neottieae (ω_N); M2, same as M1 but allowing a different ω for *Palmorchis* (ω_p) and the remaining Neottieae (ω_{N*}); M3, same as M2 but allowing ω to differ between autotrophic (ω_{Na}) and mixotrophic Neottieae* (ω_{Nx}, see Figure 1B for species considered as mixotrophic). Models were compared by likelihood ratio tests following this scheme: M1 *vs* M0, M2 *vs* M1, M3 *vs* M2. The statistic of the test (Λ) was calculated as two times the difference in model likelihood and compared to a chi-squared distribution with degrees of freedom equaling the difference in parameters number between the two models. P-values were obtained using the function pchisq of the R stats package.

We completed the PAML analysis with a specific test dedicated to the detection of changes in selective pressure (relaxation or intensification). This was carried out with the program RELAX, available at the Datamonkey webserver http://datamonkey.org/relax. RELAX allows more subtle estimation of ω variations by considering different categories of sequence sites that can evolve under different selective constraints (Wertheim et al. 2015). ω distributions are estimated for a test (T) and a reference (R) subset of branches and a selection intensity parameter k such that $\omega_T = \omega_R^k$ is introduced. The program then compares the goodness of fit of the data to a branch-site evolutionary model with k = 1 (null model) or k being a free parameter (alternative model). When the alternative model shows a better fit following a likelihood-ratio test, k < 1(resp. k > 1) indicates a relaxation (resp. an intensification) of selective constraints in the test group. Three different tests were done with three different designs of test *vs* reference groups, copying what has been done with the PAML nested analysis (see Supplementary Figure S1 for group designs).

Author contributions

Conceptualization: F.L., M.A.S.; Formal Analysis: F.L.; Investigation: F.L., M.L., I.L.C, A.B., M.C.L.P.; Resources: M.L., I.L.C, A.B., E.Z., M.C.L.P.; Data Curation: F.L., M.L., A.B.; Writing – Original Draft: F.L.; Writing – Review & Editing; F.L., M.L., E.Z., E.D., M.C.L.P., M.A.S; Supervision: M.C.L.P., M.A.S.; Funding Acquisition: M.A.S.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Acknowledgments

We acknowledge Aurélie Chauveau for preparation of the libraries and Élodie Marquand and Aurélie Canaguier for data processing. This work was funded by the Fondation de France (funds from the Fondation Ars Cuttoli & Paul Appell). We thank the Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives – Institut de Génomique / Centre National de Génotypage for conducting the DNA quality control and for giving the INRA-EPGV group access to their Illumina Sequencing Platform.

References

Abadie J-C et al. 2006. *Cephalanthera longifolia* (Neottieae, Orchidaceae) is mixotrophic: a comparative study between green and nonphotosynthetic individuals. Can J Bot. 84:1462–1477.

Barrett CF et al. 2014. Investigating the path of plastid genome degradation in an early-transitional clade of heterotrophic orchids, and implications for heterotrophic angiosperms. Mol Biol Evol. 31:3095–3112.

Barrett CF, Davis JI. 2012. The plastid genome of the mycoheterotrophic *Corallorhiza striata* (Orchidaceae) is in the relatively early stages of degradation. Am J Bot. 99:1513–1523.

Bateman RM, Hollingsworth PM, Squirrel J, Hollingsworth M. 2005. Tribe Neottieae. In: *Genera Orchidacearum Volume 4: Epidendroideae*, Part 1. Pridgeon, A, Cribb, PJ, Chase, MW, & Rasmussen, FN, editors. Oxford University Press.

Bellino A et al. 2014. Nutritional regulation in mixotrophic plants: new insights from *Limodorum abortivum*. Oecologia. 175:875–885.

Bidartondo MI, Read DJ. 2008. Fungal specificity bottlenecks during orchid germination and development. Mol Ecol. 17:3707–3716.

Bolin JF, Tennakoon KU, Majid MBA, Cameron DD. 2017. Isotopic evidence of partial mycoheterotrophy in *Burmannia coelestis* (Burmanniaceae). Plant Species Biol. 32:74–80.

Darling ACE, Mau B, Blattner FR, Perna NT. 2004. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. Genome Res. 14:1394–1403.

Dearnaley JDW, Martos F, Selosse M-A. 2012. Orchid mycorrhizas: molecular ecology, physiology, evolution and conservation aspects. In: *Fungal Associations*. Hock, B, editor. The Mycota (A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research) Vol. 9 Springer, Berlin, Heidelberg pp. 207–230.

Feng Y-L et al. 2016. Lineage-specific reductions of plastid genomes in an orchid tribe with partially and fully mycoheterotrophic species. Genome Biol Evol. 8:2164–2175.

Gebauer G, Meyer M. 2003. ^{15}N and ^{13}C natural abundance of autotrophic and myco-heterotrophic orchids provides insight into nitrogen and carbon gain from fungal

association. New Phytol. 160:209–223.

Girlanda M et al. 2006. Inefficient photosynthesis in the Mediterranean orchid *Limodorum abortivum* is mirrored by specific association to ectomycorrhizal Russulaceae. Mol Ecol. 15:491–504.

Glor RE. 2010. Phylogenetic insights on adaptive radiation. Annu Rev Ecol Evol Syst. 41:251–270.

Gonneau C et al. 2014. Photosynthesis in perennial mixotrophic *Epipactis* spp. (Orchidaceae) contributes more to shoot and fruit biomass than to hypogeous survival. J Ecol. 102:1183–1194.

Górniak M, Paun O, Chase MW. 2010. Phylogenetic relationships within Orchidaceae based on a low-copy nuclear coding gene, *Xdh*: Congruence with organellar and nuclear ribosomal DNA results. Mol Phylogenet Evol. 56:784–795.

Graham SW, Lam VKY, Merckx VSFT. 2017. Plastomes on the edge: the evolutionary breakdown of mycoheterotroph plastid genomes. New Phytol. 214:48–55.

Hynson NA et al. 2013. The physiological ecology of mycoheterotrophy. In: *Mycoheterotrophy: The Biology of Plants Living on Fungi*. Merckx, VSFT, editor. Springer pp. 297–342.

Jacquemyn H et al. 2017. Mycorrhizal associations and trophic modes in coexisting orchids: an ecological continuum between auto- and mixotrophy. Front Plant Sci. 8.

Jin X-H et al. 2014. The evolution of floral deception in *Epipactis veratrifolia* (Orchidaceae): from indirect defense to pollination. BMC Plant Biol. 14:63.

Julou T et al. 2005. Mixotrophy in orchids: insights from a comparative study of green individuals and nonphotosynthetic individuals of *Cephalanthera damasonium*. New Phytol. 166:639–653.

Kalyaanamoorthy S, Minh BQ, Wong TKF, Haeseler A von, Jermiin LS. 2017. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. Nat Methods. 14:587–589.

Kearse M et al. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. Bioinformatics. 28:1647–1649.

Kim HT et al. 2015. Seven new complete plastome sequences reveal rampant independent loss of the *ndh* gene family across orchids and associated instability of the inverted repeat/small single-copy region boundaries. PLOS ONE. 10:e0142215.

Kim HT, Shin C-H, Sun H, Kim J-H. 2018. Sequencing of the plastome in the leafless green mycoheterotroph *Cymbidium macrorhizon* helps us to understand an early stage of fully mycoheterotrophic plastome structure. Plant Syst Evol. 304:245–258.

Kim K-J, Lee H-L. 2004. Complete chloroplast genome sequences from korean ginseng (*Panax schinseng* Nees) and comparative analysis of sequence evolution among 17 vascular plants. DNA Res. 11:247–261.

Lallemand F et al. 2017. Mixotrophy in Pyroleae (Ericaceae) from Estonian boreal forests does not vary with light or tissue age. Ann Bot. 120:361–371.

Lallemand F et al. 2016. The elusive predisposition to mycoheterotrophy in Ericaceae. New Phytol. 212:314–319.

Lallemand F, Robionek A, Courty P-E, Selosse M-A. 2018a. The ^{13}C content of the orchid *Epipactis palustris* (L.) Crantz responds to light as in autotrophic plants. Bot Lett. 0:1–9. doi: 10.1080/23818107.2017.1418430.

Lallemand F et al. 2018b. Mixotrophic orchids do not use photosynthates for perennial underground organs. New Phytol. In press.

Liebel HT et al. 2010. C and N stable isotope signatures reveal constraints to nutritional modes in orchids from the Mediterranean and

Macaronesia. Am J Bot. 97:903–912.

Luo J et al. 2014. Comparative chloroplast genomes of photosynthetic orchids: insights into evolution of the Orchidaceae and development of molecular markers for phylogenetic applications. PLOS ONE. 9:e99016.

Merckx VSFT. 2013. Mycoheterotrophy: an introduction. In: *Mycoheterotrophy: The Biology of Plants Living on Fungi*. Merckx, VSFT, editor. Springer, New York, NY pp. 1–17.

Merckx VSFT, Freudenstein JV, et al. 2013a. Taxonomy and classification. In: *Mycoheterotrophy: The Biology of Plants Living on Fungi*. Merckx, VSFT, editor. Springer, New York, NY pp. 19–101.

Merckx VSFT, Mennes CB, Peay KG, Geml J. 2013b. Evolution and diversification. In: *Mycoheterotrophy: The Biology of Plants Living on Fungi*. Merckx, VSFT, editor. Springer, New York, NY pp. 215–244.

Motomura H, Selosse M-A, Martos F, Kagawa A, Yukawa T. 2010. Mycoheterotrophy evolved from mixotrophic ancestors: evidence in *Cymbidium* (Orchidaceae). Ann Bot. 106:573–581.

Nguyen L-T, Schmidt HA, Haeseler A von, Minh BQ. 2015. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. Mol Biol Evol. 32:268–274.

Petersen G, Cuenca A, Seberg O. 2015. Plastome evolution in hemiparasitic mistletoes. Genome Biol Evol. 7:2520–2532.

Petersen G, Zervas A, Pedersen HÆ, Seberg O. 2018. Genome reports: contracted genes and dwarfed plastome in mycoheterotrophic *Sciaphila thaidanica* (Triuridaceae, Pandanales). Genome Biol Evol. 10:976–981.

Porebski S, Bailey LG, Baum BR. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. Plant Mol Biol Rep. 15:8–15.

Preiss K, Adam IKU, Gebauer G. 2010. Irradiance governs exploitation of fungi: fine-tuning of carbon gain by two partially myco-heterotrophic orchids. Proc Royal Soc B. 277:1333–1336.

R Development Core Team. 2007. R: a Language and Environment for Statistical Computing.

Ronquist F et al. 2012. MrBayes 3.2: efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. Syst Biol. sys029.

Roy M et al. 2009. Two mycoheterotrophic orchids from Thailand tropical dipterocarpacean forests associate with a broad diversity of ectomycorrhizal fungi. BMC Biol. 7:51.

Schiebold JM-I, Bidartondo MI, Karasch P, Gravendeel B, Gebauer G. 2017b. You are what you get from your fungi: nitrogen stable isotope patterns in *Epipactis* species. Ann Bot. 119:1085–1095.

Schiebold JM-I, Bidartondo MI, Lenhard F, Makiola A, Gebauer G. 2017a. Exploiting mycorrhizas in broad daylight: partial mycoheterotrophy is a common nutritional strategy in meadow orchids. J Ecol. 106:168–178.

Selosse M-A, Charpin M, Not F. 2017. Mixotrophy everywhere on land and in water: the grand écart hypothesis. Ecol Lett. 20:246–263.

Selosse M-A, Martos F. 2014. Do chlorophyllous orchids heterotrophically use mycorrhizal fungal carbon? Trends Plant Sci. 19:683–685.

Selosse M-A, Roy M. 2009. Green plants that feed on fungi: facts and questions about mixotrophy. Trends Plant Sci. 14:64–70.

Selosse M-A, Weiß M, Jany J-L, Tillier A. 2002. Communities and populations of sebacinoid basidiomycetes associated with the achlorophyllous orchid *Neottia nidus-avis* (L.)

L.C.M. Rich. and neighbouring tree ectomycorrhizae. Mol Ecol. 11:1831–1844.

Smith SE, Read DJ. 2008. Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press: London.

Suetsugu K, Ohta T, Tayasu I. 2018. Partial mycoheterotrophy in the leafless orchid *Cymbidium macrorhizon*. Am J Bot. 105:1–6.

Těšitel J, Těšitelová T, Minasiewicz J, Selosse M-A. 2018. Mixotrophy in land plants: why to stay green? Trends Plant Sci. 0. doi: 10.1016/j.tplants.2018.05.010.

Těšitelová T et al. 2015. Two widespread green *Neottia* species (Orchidaceae) show mycorrhizal preference for Sebacinales in various habitats and ontogenetic stages. Mol Ecol. 24:1122–1134.

Těšitelová T, Těšitel J, Jersáková J, RÍhová G, Selosse M-A. 2012. Symbiotic germination capability of four *Epipactis* species (Orchidaceae) is broader than expected from adult ecology. Am J Bot. 99:1020–1032.

Wang W, Li H, Chen Z. 2014. Analysis of plastid and nuclear DNA data in plant phylogenetics-evaluation and improvement. Sci China Life Sci. 57:280–286.

WCSP. 2018. World Checklist of Selected Plant Families. Facilited by the Royal Botanic Gardens, Kew. http://wcsp.science.kew.org/ (Accessed February 17, 2018).

Wertheim JO et al. 2015. RELAX: detecting relaxed selection in a phylogenetic framework. Mol Biol Evol. 32:820–832.

Wicke S et al. 2016. Mechanistic model of evolutionary rate variation en route to a nonphotosynthetic lifestyle in plants. PNAS. 201607576.

Wicke S, Schäferhoff B, dePamphilis CW, Müller KF. 2014. Disproportional plastome-wide increase of substitution rates and relaxed purifying selection in genes of carnivorous Lentibulariaceae. Mol Biol Evol. 31:529–545.

Wright ES. 2015. DECIPHER: harnessing local sequence context to improve protein multiple sequence alignment. BMC Bioinformatics. 16:322.

Wright ES. 2016. Using DECIPHER v2.0 to analyze big biological sequence data in R. The R Journal. 8:352–359.

Xiang X-G et al. 2016. Biogeographical diversification of mainland asian *Dendrobium* (Orchidaceae) and its implications for the historical dynamics of evergreen broad-leaved forests. J Biogeogr. 43:1310–1323.

Xiang X-G et al. 2012. Phylogenetic placement of the enigmatic orchid genera *Thaia* and *Tangtsinia*: Evidence from molecular and morphological characters. Taxon. 61:45–54.

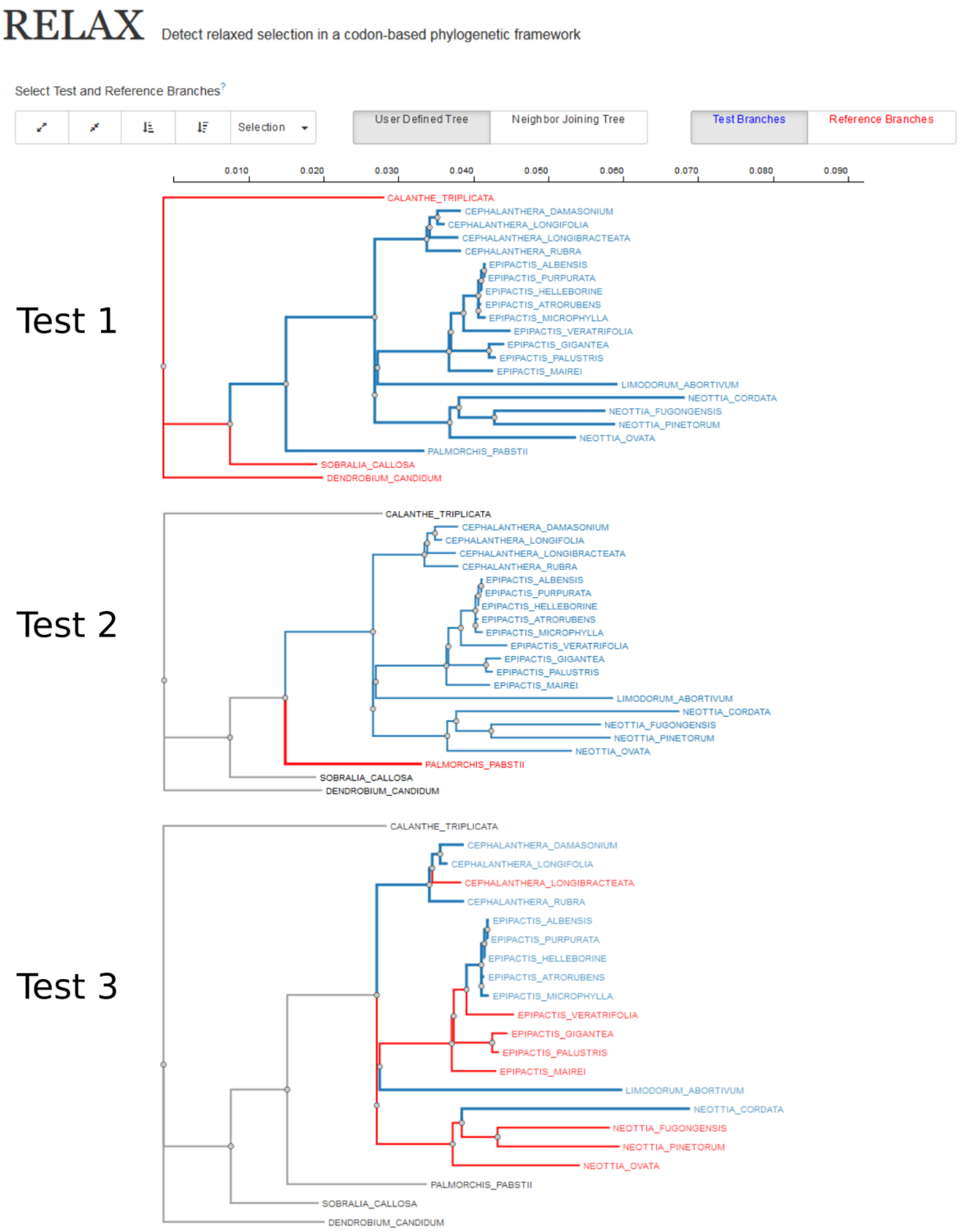
Yagame T, Ogura-Tsujita Y, Kinoshita A, Iwase K, Yukawa T. 2016. Fungal partner shifts during the evolution of mycoheterotrophy in *Neottia*. Am J Bot. 103:1630–1641.

Yang Z. 2007. PAML 4: Phylogenetic Analysis by Maximum Likelihood. Mol Biol Evol. 24:1586–1591.

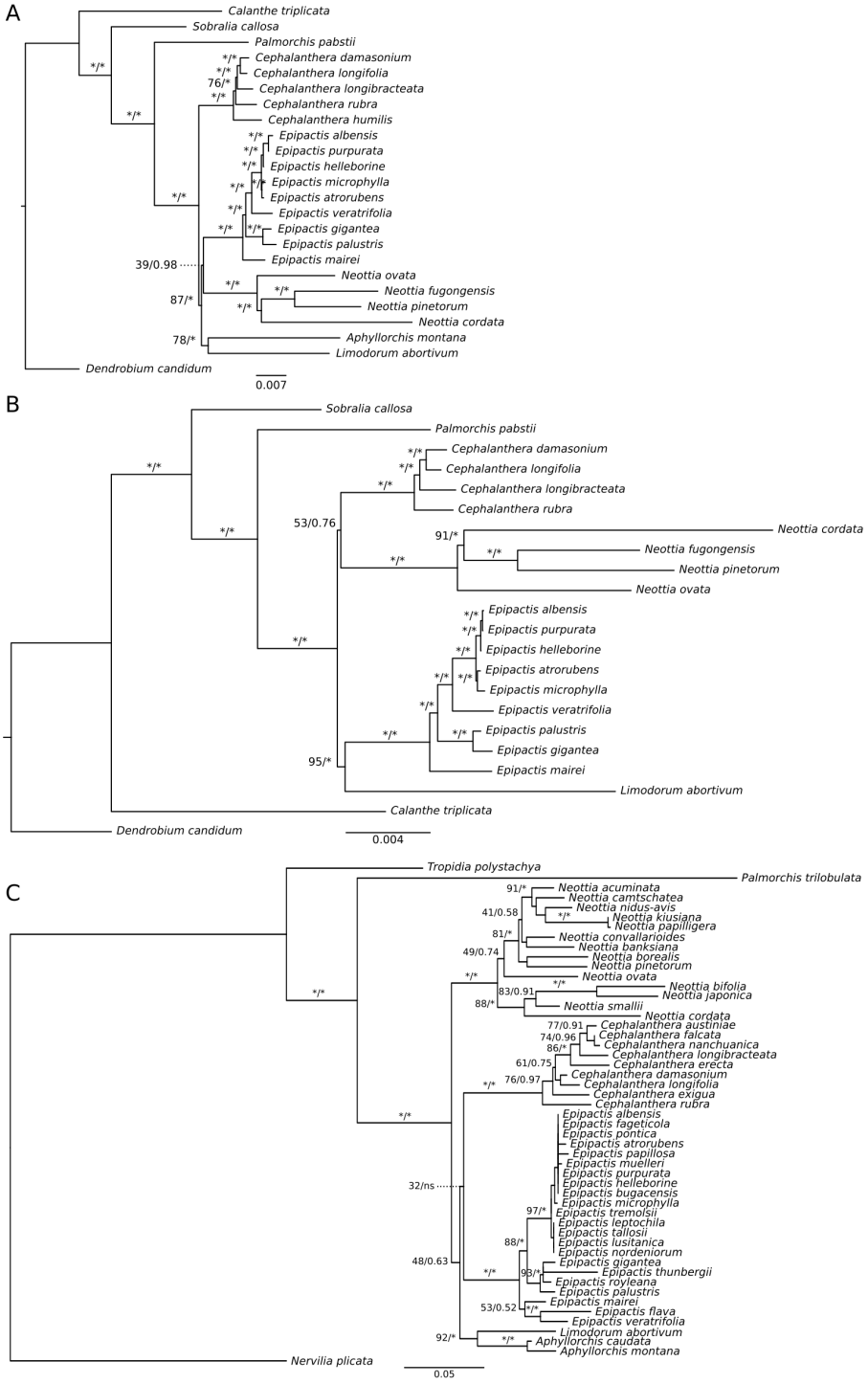
Zhou T, Jin X. 2018. Molecular systematics and the evolution of mycoheterotrophy of tribe Neottieae (Orchidaceae, Epidendroideae). PhytoKeys. 94:39–49.

Supplementary Material

Supplementary Figure S1: Test and reference groups used for the RELAX analysis of selective constraints.



Supplementary Figure S2: Different phylogenetic analyses of Neottieae. Numbers above or to the left of branches represent bootstrap values (1000 replicates) from maximum likelihood analysis (left, stars indicate numbers above 95) and posterior probabilities from Bayesian inference (right, stars indicate probabilities above 0.98), ns means that the branch was not recovered in the Bayesian analysis. Scale bar: number of substitutions per site. **A.** Whole plastome analysis with mycoheterotrophic *Neottia* removed. **B.** Intact coding sequences of non-mycoheterotrophic species. **C.** ITS analysis of available Neottieae (see Supplementary Table S1 for accession numbers).



Supplementary Table S1: Species used in this study and GenBank accession numbers for plastomes and ITS. Species whose plastome was sequenced for this work are in bold.

Group	Species	Sequence	Accession number
Neottieae	*Aphyllorchis montana*	Plastome	KU551262
	Cephalanthera damasonium	Plastome	MH590345
	Cephalanthera humilis	Plastome	KU551265
	Cephalanthera longibracteata	Plastome	MH590346
	Cephalanthera longifolia	Plastome	KU551263
	Cephalanthera rubra	Plastome	MH590347
	Epipactis albensis	Plastome	MH590348
	Epipactis atrorubens	Plastome	MH590349
	Epipactis gigantea	Plastome	MH590350
	Epipactis helleborine	Plastome	MH590351
	Epipactis mairei	Plastome	KU551264
	Epipactis microphylla	Plastome	MH590352
	Epipactis palustris	Plastome	MH590353
	Epipactis purpurata	Plastome	MH590354
	Epipactis veratrifolia	Plastome	KU551267
	Limodorum abortivum	Plastome	MH590355
	Neottia acuminata	Plastome	KU551268
	Neottia camtschatea	Plastome	KU551266
	Neottia cordata	Plastome	MH590356
	Neottia fugongensis	Plastome	KU551270
	Neottia listeroides	Plastome	KU551272
	Neottia nidus-avis	Plastome	JF325876
	Neottia ovata	Plastome	KU551271
	Neottia pinetorum	Plastome	KU551269
	Palmorchis pabstii	Plastome	MH590357
Outgroups	*Calanthe triplicata*	Plastome	KF753635
	Dendrobium candidum	Plastome	KY887994
	Sobralia callosa	Plastome	KM032623
Neottieae	*Aphyllorchis caudata*	ITS	FJ454866
	Aphyllorchis montana	ITS	FJ454867
	Cephalanthera austiniae	ITS	MG216351
	Cephalanthera damasonium	ITS	AY146446
	Cephalanthera erecta	ITS	AB856486
	Cephalanthera exigua	ITS	FJ454868
Neottieae	*Cephalanthera falcata*	ITS	AB856489
	Cephalanthera longibracteata	ITS	AB856492
	Cephalanthera longifolia	ITS	AY146447
	Cephalanthera nanchuanica	ITS	JN706696

	Cephalanthera rubra	ITS	AY146445
	Epipactis albensis	ITS	AY154384
	Epipactis atrorubens	ITS	JN847403
	Epipactis bugacensis	ITS	KP204479
	Epipactis fageticola	ITS	AY351382
	Epipactis flava	ITS	FJ454869
	Epipactis gigantea	ITS	MF963894
	Epipactis helleborine	ITS	AY154383
	Epipactis leptochila	ITS	KP204482
	Epipactis lusitanica	ITS	AY351381
	Epipactis mairei	ITS	KF419101
	Epipactis microphylla	ITS	FR750399
	Epipactis muelleri	ITS	FJ454871
	Epipactis nordeniorum	ITS	KP204483
	Epipactis palustris	ITS	AY146448
	Epipactis papillosa	ITS	KF419102
	Epipactis pontica	ITS	KP204484
	Epipactis purpurata	ITS	JN847416
	Epipactis royleana	ITS	KF419103
	Epipactis tallosii	ITS	KP204485
	Epipactis thunbergii	ITS	KT338697
	Epipactis tremolsii	ITS	AY351377
	Epipactis veratrifolia	ITS	KF727435
	Limodorum abortivum	ITS	AY351378
	Neottia acuminata	ITS	KT338755
	Neottia banksiana	ITS	MG216371
	Neottia bifolia	ITS	MG216639
	Neottia borealis	ITS	MG216431
	Neottia camtschatea	ITS	KJ023677
	Neottia convallarioides	ITS	MG216752
	Neottia cordata	ITS	KJ023678
	Neottia japonica	ITS	KT338756
	Neottia kiusiana	ITS	KT338757
Neottieae	*Neottia nidus-avis*	ITS	AY351383
	Neottia ovata	ITS	FJ694841
	Neottia papilligera	ITS	KT338758
	Neottia pinetorum	ITS	KT338759
	Neottia smallii	ITS	AF521058
	Palmorchis trilobulata	ITS	KM598431
Outgroups	*Tropidia polystachya*	ITS	EU490674
	Nervilia plicata	ITS	JN114620

Supplementary Table S2 : Extraction, sequencing and assembly protocols for the different species investigated in this study.

Species	Sampling	Tissue	DNA extraction	Libraries preparation	Sequencing platform	Read length (bp)	Assembly procedure
Cephalanthera damasonium	France	Leaf	NucleoSpin Plant II kit (Macherey-Nagel)	TruSeq DNA sample preparation kit (Illumina, USA)	HiSeq 2000	101, paired-end	CLC Genomics Workbench
Cephalanthera longibracteata	Russia	Leaf	DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)	Accel-NGS® 1S Plus DNA Library Kit (Swift Biosciences Inc., USA)	HiSeq 2500	150, paired-end	Geneious
Cephalanthera rubra	Czech Republic	Fruit	DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)	Accel-NGS® 1S Plus DNA Library Kit (Swift Biosciences Inc., USA)	HiSeq 2500	150, paired-end	Geneious
Epipactis albensis	Czech Republic	Fruit	DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)	Accel-NGS® 1S Plus DNA Library Kit (Swift Biosciences Inc., USA)	HiSeq 2500	150, paired-end	Geneious
Epipactis atrorubens	Czech Republic	Fruit	DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)	Accel-NGS® 1S Plus DNA Library Kit (Swift Biosciences Inc., USA)	HiSeq 2500	150, paired-end	Geneious
Epipactis gigantea	France (green-house)	Leaf	DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)	Accel-NGS® 1S Plus DNA Library Kit (Swift Biosciences Inc., USA)	HiSeq 2500	150, paired-end	Geneious
Epipactis helleborine	Russia	Leaf	NucleoSpin Plant II kit (Macherey-Nagel)	TruSeq DNA sample preparation kit (Illumina, USA)	HiSeq 2000	101, paired-end	CLC Genomics Workbench
Epipactis microphylla	France	Leaf	DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)	Accel-NGS® 1S Plus DNA Library Kit (Swift Biosciences Inc., USA)	HiSeq 2500	150, paired-end	Geneious
Epipactis palustris	France	Leaf	DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)	Accel-NGS® 1S Plus DNA Library Kit (Swift Biosciences Inc., USA)	HiSeq 2500	150, paired-end	Geneious
Epipactis purpurata	France	Leaf	DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)	Accel-NGS® 1S Plus DNA Library Kit (Swift Biosciences Inc., USA)	HiSeq 4000	150, paired-end	Geneious
Limodorum abortivum	France	Leaf	CTAB extraction protocola	NEBNext Ultra DNA kit (New England Biolabs, USA)	MiSeq	250, paired-end	CLC Genomics Workbench
Neottia cordata	Russia	Leaf	NucleoSpin Plant II kit (Macherey-Nagel)	TruSeq DNA sample preparation kit (Illumina, USA)	HiSeq 2000	101, paired-end	CLC Genomics Workbench
Palmorchis pabstii	French Guyana	Leaf	DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)	Accel-NGS® 1S Plus DNA Library Kit (Swift Biosciences Inc., USA)	HiSeq 2500	150, paired-end	Geneious

ARTICLE VII

The elusive predisposition to mycoheterotrophy in Ericaceae

AVANT-PROPOS

Nouvelle échappée chez les éricacées où nous avons essayé, comme pour les Neottieae, de consolider la phylogénie des groupes concernés par la mixotrophie et la mycohétérotrophie afin de mieux comprendre l'évolution de ces modes de nutrition. La mycohétérotrophie totale est, chez les éricacées, restreinte à une lignée supposée monophylétique : les Monotropeae. Toutes les Monotropeae sont mycohétérotrophes. S'y ajoutent deux espèces sœurs – *Pterospora andromedea* et *Sarcodes sanguinea* (Pterosporeae) – dont les relations avec les Monotropeae étaient controversées, et une espèce de Pyroleae : *Pyrola aphylla*. Les Pyroleae, que nous avons déjà abordées dans l'**article III**, comportent également des espèces autotrophes et d'autres supposées mixotrophes. Les liens de parenté entre Pyroleae et Monotropeae, n'étaient cependant pas clairs, de même que les relations avec un autre groupe proche contenant uniquement des espèces autotrophes : les Arbutoideae.

En incluant davantage de taxons dans l'analyse phylogénétique et en séquençant de nouveaux marqueurs nucléaires, nous sommes parvenus à obtenir un arbre bien résolu. Le scénario évolutif le plus probable suppose une double apparition indépendante de la mycohétérotrophie chez les Monotropeae + Pterosporeae et chez les Pyroleae. Il y aurait donc chez l'ancêtre commun de ces différents groupes, une prédisposition à l'obtention de carbone fongique. La nature de celle-ci sera discutée dans la dernière partie de cette thèse.

Cet article a été publié dans la revue *The New Phytologist* au mois d'octobre 2016.

Ces travaux ont été initiés lors du stage de M2 ayant précédé le début de ma thèse et finalisés au cours de ma première année de doctorat. J'ai récolté une partie des échantillons, séquencé les nouveaux marqueurs et réalisé les analyses phylogénétiques.

Forum

New Phytologist

Letters

The elusive predisposition to mycoheterotrophy in Ericaceae

The rise and diversification of land plants was accompanied by mycorrhizal symbiosis, from their emergence to their adaptation to various biomes and ecological situations (Selosse *et al.*, 2015). In most mycorrhizal associations, fungi provide soil minerals to the plant, in exchange for sugars derived from photosynthesis (Smith & Read, 2008; van der Heijden *et al.*, 2015). However, several plant species adapted to shaded forest conditions by secondarily reversing this exchange of carbohydrates: they became achlorophyllous thanks to carbon provided by the fungus. This so-called mycoheterotrophic nutrition is described in over 400 species and evolved at least 40 times independently (Merckx, 2013), raising the question of what predispositions underlie these convergences.

Evolution of mycoheterotrophy by way of mixotrophy?

The transition from autotrophy to mycoheterotrophy is considered to have occurred by way of an intermediate stage called mixotrophy. Indeed, some green, photosynthetic plants phylogenetically close to mycoheterotrophic plants are partially mycoheterotrophic (hereafter called mixotrophic; Selosse & Roy, 2009). Mixotrophy exists in green orchid taxa, where mycoheterotrophy arose several times (e.g. the Neottieae tribe; Gebauer & Meyer, 2003; Julou *et al.*, 2005), and in the tropical Burmaniaceae where many species are mycoheterotrophic (Bolin *et al.*, 2016). Within Ericaceae, the closely related Pterosporeae and Monotropeae tribes are mycoheterotrophic, and the supposedly close tribe Pyroleae harbours both mixotrophic and mycoheterotrophic species (Tedersoo *et al.*, 2007; Zimmer *et al.*, 2007; Hynson *et al.*, 2012; Table 1).

The hypothesis that mixotrophy precedes the evolution of full mycoheterotrophy has gained momentum (Selosse & Roy, 2009; Merckx, 2013), but a clear phylogenetic framework including both mycoheterotrophic and mixotrophic taxa is not always available to assess this rigorously. Such a framework exists for some orchids, retrieving mixotrophic species paraphyletic with respect to mycoheterotrophic ones within Neottieae (Selosse & Roy, 2009) and within the genus *Cymbidium* (Ogura-Tsujita *et al.*, 2012). Yet phylogenetic frameworks are lacking in other families, especially Ericaceae, although their mycoheterotrophic and mixotrophic species have attracted many studies on fungal associates and metabolism (see Merckx, 2013, for a review). Here, we aim to clarify the relationship between mixotrophic and mycoheterotrophic Ericaceae and to challenge the hypothesis that mycoheterotrophy evolved from mixotrophy. We reveal an unexpected topology of the Ericaceae phylogenetic tree, which supports that transition to mycoheterotrophic nutrition occurred at least twice independently from autotrophic ancestors.

Phylogenetic uncertainties for mycoheterotrophic Ericaceae

Ericaceae evolved different mycorrhizal associations: the earliest-diverging genus *Enkianthus* retained the ancestral arbuscular mycorrhizas with Glomeromycota (Obase *et al.*, 2013), while the remaining Ericaceae display two mycorrhizal types (Smith & Read, 2008; Table 1). Most Ericaceae form the so-called ericoid endomycorrhiza with fungi belonging to Helotiales and Sebacinales (van der Heijden *et al.*, 2015), and cluster in the monophyletic group hereafter called 'bulk Ericaceae' (or the 'Early Anther Inversion Clade' *sensu* Kron *et al.*, 2002). The remaining taxa encompass the subfamily Arbutoideae and the tribes Monotropeae, Pterosporeae and Pyroleae, whose phylogenetic relationships remain unclear. They display morphologically diverse mycorrhizal associations, mostly ectendomycorrhizal, with intracellular penetrations made of hyphal coils or shorter 'peg'-like structures (Smith & Read, 2008). Beyond morphological variability, these ectendomycorrhizas all involve ascomycetous and basidiomycetous taxa that usually form ectomycorrhizas on non-Ericaceae hosts (van der Heijden *et al.*, 2015). Full or partial mycoheterotrophy evolved among these taxa, making their nutrition at adulthood very diverse (Fig. 1; see references in Table 1). Arbutoideae germinate autonomously and, based on the fact that they do not display the natural ^{13}C enrichment in plant biomass characterizing mixotrophy, are fully autotrophic at adulthood. All Monotropeae and Pterosporeae are fully mycoheterotrophic, from germination to adulthood. Pyroleae undergo mycoheterotrophic germination because their minute seeds are devoid of reserves, but most of them are photosynthetic at adulthood (see references in Table 1): based on natural ^{13}C abundances, they range from most often autotrophic (in the genera *Chimaphila* and *Moneses*), to clearly mixotrophic (in the genera *Pyrola* and *Orthilia*), and even mycoheterotrophic for *Pyrola aphylla* (Hynson *et al.*, 2009).

The phylogenetic relationships between and within the latter taxa remain unclear. At the higher level (Fig. 1a–d), earlier attempts did not fully resolve the relationships (Cullings, 1994; Bidartondo & Bruns, 2001; Kron *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2011). The tribes Pyroleae, Pterosporeae and Monotropeae were sometime grouped together in the subfamily Monotropoideae, albeit with low bootstrap support (Kron *et al.*, 2002; Fig. 1b), suggesting that mixotrophy may have appeared once in the common ancestor of Monotropoideae (Tedersoo *et al.*, 2007). Yet recent phylogenies based on internal transcribed spacer (ITS) sequences (Liu *et al.*, 2011; Fig. 1c) *rbc*L and *matk* (Schwery *et al.*, 2014) and *PHYA* (Braukmann & Stefanovic, 2012; Fig. 1d) suggested that Pyroleae and perhaps even Pterosporeae were not closely related to Monotropeae. However, branching supports were low, leaving unclear the exact relationships (1) between Arbutoideae, Pyroleae, Pterosporeae and Monotropeae and (2) between these clades and

© 2016 The Authors
New Phytologist © 2016 New Phytologist Trust

New Phytologist

Letters Forum 3

Table 1 Mycorrhizal type and nutrition of the Ericaceae taxa discussed in this study: mycorrhizas are arbuscular (with Glomeromycota), ectendomycorrhizal (with ectomycorrhizal Ascomycota and Basidiomycota), or ericoid; nutrition at germination is either autonomous, based on seed resources (A), or mycoheterotrophic, due to minute and reserveless seeds (M; data according to Merckx (2013) and Johansson & Eriksson (2013)); nutrition at adulthood is based on published natural ^{13}C abundances[a]

Taxon	Mycorrhizas	Germination	Nutrition at adulthood
Genus *Enkianthus*	Arbuscular	A	Autotrophic (Obase *et al.*, 2013)
Early Anther Inversion Clade[b]	Ericoid	A	Autotrophic (Gebauer & Meyer, 2003; Tedersoo *et al.*, 2007; Zimmer *et al.*, 2007; Liebel *et al.*, 2010; Matsuda *et al.*, 2012; Hynson *et al.*, 2015; Těšitelová *et al.*, 2015)
Subfamily Arbutoideae	Ectendomyc.	A	Autotrophic (Tedersoo *et al.*, 2007; Zimmer *et al.*, 2007; Liebel *et al.*, 2010; our unpublished data)
Tribe Monotropeae	Ectendomyc.	M	Mycoheterotrophic (Merckx, 2013)
Tribe Pterosporeae	Ectendomyc.	M	Mycoheterotrophic (Merckx, 2013)
Tribe Pyroleae:	Ectendomyc.	M	Variable:
Genus *Chimaphila*			Autotrophic (Tedersoo *et al.*, 2007; Zimmer *et al.*, 2007; Johansson *et al.*, 2015; our unpublished data)[a]
Genus *Moneses*			Autotrophic (Hynson *et al.*, 2015; Johansson *et al.*, 2015; our unpublished data)[a]
Genus *Orthilia*			Mixotrophic (Tedersoo *et al.*, 2007; Zimmer *et al.*, 2007; Johansson *et al.*, 2015; our unpublished data)
Genus *Pyrola*			Mixotrophic (Tedersoo *et al.*, 2007; Zimmer *et al.*, 2007; Hynson *et al.*, 2012; Matsuda *et al.*, 2012; Johansson *et al.*, 2015; our unpublished data) with a mycoheterotrophic species (*P. aphylla*; Zimmer *et al.*, 2007; Hynson *et al.*, 2009)

[a]Taking into account that mixotrophic plants may have ^{13}C signatures similar to autotrophic plants in some environments, we consider a group as mixotrophic whenever plants are enriched in ^{13}C in at least two sites. We note that the status of the genera *Chimaphila* and *Moneses* remains debatable, since mixotrophy was found in one ecosystem for one species from each genus, respectively, by Tedersoo *et al.* (2007) and Hynson *et al.* (2015). However, they were autotrophic in all other reports and, given the previous rule, we consider them as autotrophic at adulthood.
[b]The 'Early Anther Inversion Clade' encompasses the subfamilies Cassiopoideae, Ericoideae, Harrimanelloideae, Styphelioideae and Vaccinioideae.

bulk Ericaceae. Moreover, within Pyroleae, many analyses support a unique acquisition of mixotrophy at adulthood in the ancestor of *Orthilia* and *Pyrola* (Freudenstein, 1999; Matsuda *et al.*, 2012; Braukmann & Stefanovic, 2012; Fig. 1e). However, Liu *et al.* (2011) raised the possibility that the genus *Orthilia* is sister-group to the three other genera (Fig. 1f), thus challenging this simple scenario.

Phylogenetic split between Pyroleae and mycoheterotrophic Ericaceae

To clarify phylogenetic relationships within Ericaceae, and since previous analyses supported monophyly of all genera under study, we used extensive sampling including at least one representative from all genera in Arbutoideae, Pyroleae and Pterosporeae and three out of the nine Monotropeae genera. Together with representatives of other bulk Ericaceae subfamilies, we considered a total of 24 species from 20 genera (Supporting Information Table S1). We made phylogenetic inferences using two sets of markers. First, the ITS region, the 5′ part of the large subunit 28S rDNA (28S), and the plastid *matK* gene were used to investigate relationships between the 24 species (i.e. covering all investigated subfamilies and tribes). Second, the nuclear sequences of ITS, 28S and the phytochrome A (*PHYA*) gene from nine species were used to clarify relationships between the four Pyroleae genera. New sequences were obtained from fresh and herbarium samples (see Table S1; GenBank accession numbers KX290466-0487) after DNA extraction using the Qiagen DNeasy Plant Mini Kit, PCR amplification (see Table S2 for methods) and sequencing procedures as in Těšitelová *et al.* (2015). Noncoding sequences were aligned with T-Coffee online server (Notredame *et al.*, 2000) and sites showing a score strictly below four following the implemented Transitive Consistency Score evaluation were discarded from further analysis (Chang *et al.*, 2014). Coding sequences were aligned manually using SeaView v.4 (Gouy *et al.*, 2010). Evolutionary model selection was carried out using IQ-Tree online server (Nguyen *et al.*, 2015) individually for each marker, and separately for the RNA-coding region and spacer regions within ribosomal DNA. Phylogenetic trees were reconstructed using maximum likelihood (ML) analysis with IQ-Tree, and Bayesian inference with MrBayes 3.2 (Ronquist *et al.*, 2012). All individual markers produced congruent topologies (not shown) and were thus concatenated for a global analysis, which yielded identical topologies by ML and Bayesian methods.

Analysis at the subfamily and tribe level (Fig. 2a) reveals paraphyly of the Monotropoideae subfamily (*sensu* Kron *et al.*, 2002): we thus uphold, with more robust support, the previous finding by Braukmann & Stefanovic (2012). Pterosporeae is sister to Monotropeae, likely with a mycoheterotrophic common ancestor, suggesting that the early divergence of Pterosporeae observed by Braukmann & Stefanovic (2012) in the *PHYA* phylogeny reflected a long-branch artefact (Fig. 1d), as suggested by these authors. The Monotropoideae subfamily should thus be emended to exclude Pyroleae (Fig. 2a). The remaining tribes, Pterosporeae and Monotropeae, are united by strict mycoheterotrophy and the presence of intracellular fungal pegs in mycorrhizas (Smith & Read, 2008), as opposed to hyphal coils found in Arbutoideae and Pyroleae. Since Arbutoideae are autotrophic, mycoheterotrophy evolution may have followed two alternative scenarios: (1) a reversion to autotrophy in Arbutoideae from a common mixotrophic ancestor to [Arbutoideae + Monotropeae + Pterosporeae + Pyroleae], or (2) an independent loss of

© 2016 The Authors
New Phytologist © 2016 New Phytologist Trust

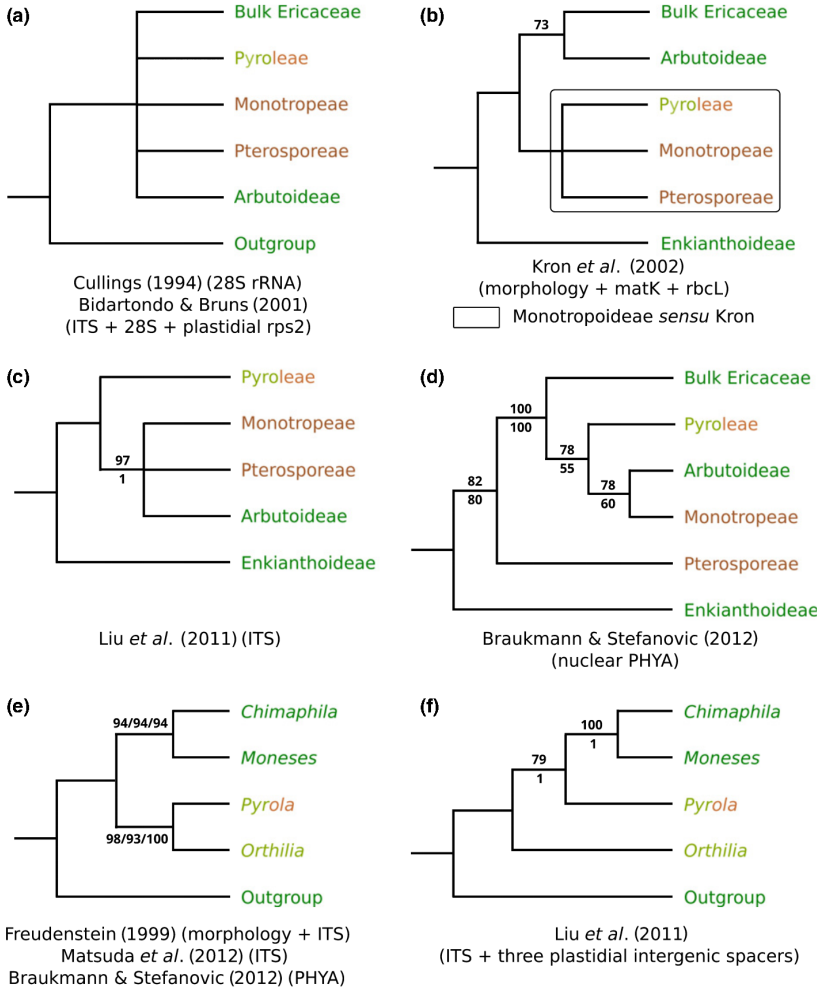


Fig. 1 Previously published phylogenetic hypotheses on (a–d) Ericaceae and (e–f) Pyroleae genera. The 'bulk Ericaceae' represents the monophyletic cluster of subfamilies with early anther inversion and typical ericoid mycorrhizas (the 'Early Anther Inversion Clade' *sensu* Kron *et al.*, 2002). The nutrition of the taxa at adulthood, based on published ^{13}C signatures (Table 1), is autotrophic (green), mixotrophic (pale green) or mycoheterotrophic (brown), with mixed letter colours when two strategies coexist, depending on the species. Numbers above and below branches represent supports when at least one bootstrap value (either from maximum likelihood (ML), maximum parsimony or both analyses depending on the studies) or posterior probability was above 70 or 0.95, respectively (in (e) the successive values are from the references listed, respectively).

autotrophy in Pterosporeae + Monotropeae on the one hand, and in Pyroleae on the other hand. We consider that relaxation on photosynthetic genes in mixotrophic and mycoheterotrophic species makes reversion to autotrophy unlikely, and thus favour the second scenario. Finally, our analysis suggests, but with low support in the ML analysis, that the clade forming ectendomycorrhizas [Arbutoideae + Monotropeae + Pterosporeae + Pyroleae] is not paraphyletic, but a sister-group to bulk Ericaceae. Other markers support this topology (J. Freudenstein, pers. comm.), which departs from the usual assumption that ericoid mycorrhizas arose secondarily from ectendomycorrhizal ancestors (e.g. Tedersoo *et al.*, 2007; van der Heijden *et al.*, 2015).

Within Pyroleae (Fig. 2b), our data support two clusters: (1) *Chimaphila* and *Moneses* in a clade that is autotrophic at adulthood (see note 'a' in Table 1); (2) *Pyrola* and *Orthilia* in a clade including species that are mixotrophic or in some cases mycoheterotrophic at adulthood, suggesting a single emergence of mixotrophy. This solves the problematic topology of Pyroleae in the previous, higher-level analysis, with robust support. It is also in agreement with the ITS-based topology from Matsuda *et al.* (2012) and the *PHYA*-restricted analysis by Braukmann & Stefanovic (2012; Fig. 1e), but it is incongruent with the phylogeny by Liu *et al.* (2011; Fig. 1f). The latter reconstruction included three plastid intergenic spacers, so the discrepancy possibly lies between nuclear and plastid genes. We favour the nuclear information and thus the topology from Fig. 2(b) for three reasons. First, the topology by Liu *et al.* (2011) received lower statistical support. Second, a phylogeny based on morphology (Freudenstein, 1999) also supported the topology of Fig. 2(b). Third, the rearrangements observed in plastid genomes of Pyroleae suggest evolutionary acceleration (Braukmann & Stefanovic, 2012), a process also reported in plastids of mycoheterotrophic species (Merckx, 2013) that entails high risks of sequence homoplasy. Alternatively, cytoplasmic introgression or incomplete lineage sorting of plastid markers might explain the discrepancy. Assuming the phylogenetic relationships from Fig. 2(b), a single, late origin of mixotrophy in the common ancestor of *Pyrola* + *Orthilia* clade would have given rise to mycoheterotrophy in *Pyrola aphylla* (Hynson & Bruns, 2009). Finally, some *Pyrola* species have so far not been proved to be mixotrophic based on their natural ^{13}C abundance (Matsuda *et al.*, 2012; Johansson *et al.*, 2015; our unpublished pers. obs.).

© 2016 The Authors
New Phytologist © 2016 New Phytologist Trust

New Phytologist Letters Forum 3

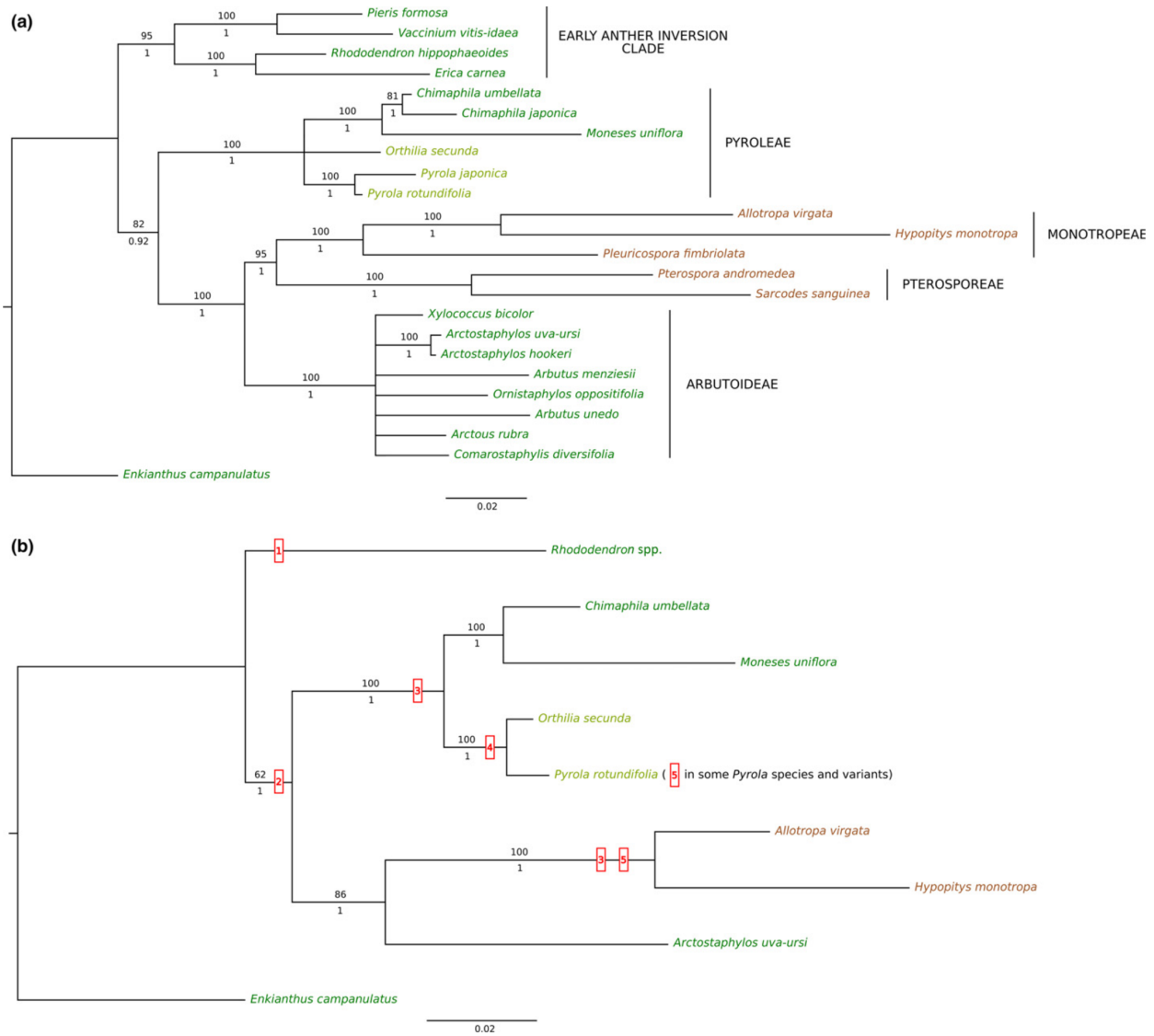


Fig. 2 (a) Phylogenetic placements of the subfamily Arbutoideae and the tribes Pyroleae, Pterosporeae and Monotropeae in the Ericaceae based on the combined analysis of two nuclear (internal transcribed spacer (ITS) + 28S) and one plastid (matK) loci. (b) Phylogeny of the tribe Pyroleae based on the combined analysis of three nuclear loci (ITS, 28S, and *PHYA*). Numbers above and below branches, respectively, represent bootstrap values (1000 replicates) from maximum likelihood (ML) analysis and posterior probabilities from Bayesian inference (if at least one was above 80 or 0.95, respectively). Polytomies are displayed when bipartitions received low support from both ML and Bayesian methods. The scale bar represents the number of substitutions per site. The nutrition of the taxa at adulthood, based on published ^{13}C signatures (Table 1), is autotrophic (green), mixotrophic (pale green) or mycoheterotrophic (brown). Boxed red numbers are the proposed apomorphies: 1, association with ericoid mycorrhizal fungi; 2, ectendomycorrhizas and unknown predisposition to mixotrophy and mycoheterotrophy; 3, mycoheterotrophic germination (= initial mycoheterotrophy); 4, mixotrophy at adulthood; 5, full mycoheterotrophy at adulthood (perhaps preceded by mixotrophy).

This may be due to local particularities of the studied populations, in species that are in fact mixotrophic (Hynson *et al.*, 2013). However, if some species proved consistently autotrophic, then mixotrophy could have emerged several times in the *Pyrola* + *Orthilia* clade or, less likely, could have reverted to autotrophy in some *Pyrola* spp. These possibly autotrophic *Pyrola* species deserve further analyses, together with the possibility that mixotrophy may occur in the *Chimaphila* + *Moneses* clade (see note 'a' in Table 1).

Elusive predispositions to metabolic evolution in symbiosis

Mycoheterotrophic and mixotrophic Ericaceae are separated in two clades, both of which are sister-groups to an autotrophic lineage: Pterosporeae + Monotropeae are sister to Arbutoideae, while *Pyrola* + *Orthilia* are sister to *Chimaphila* + *Moneses* (Fig. 2). Assuming that reversion from mixotrophy to autotrophy is unlikely, the most probable scenario is independent emergence of

© 2016 The Authors
New Phytologist © 2016 New Phytologist Trust

New Phytologist

mycoheterotrophy in the ancestor of Pterosporeae + Monotropeae, and of mixotrophy followed by mycoheterotrophy in the ancestor of *Pyrola* + *Orthilia*. Of course, this does not preclude evolution of mycoheterotrophy by way of mixotrophy in Pterosporeae + Monotropeae since an intermediate, mixotrophic step may have gone extinct. The scenario of evolution to mycoheterotrophy in Ericaceae turns out to be more complex than previously supposed (Tedersoo *et al.*, 2007). It suggests that at a previous step, a predisposition to mixotrophy and mycoheterotrophy existed in the ancestor of the whole ectendomycorrhizal Ericaceae clade, despite its likely autotrophic nutrition (see apomorphy 2 in Fig. 2b). The mycoheterotrophic germination found in Pyroleae, Pterosporeae and Monotropeae (Table 1) is unlikely to be of this predisposition, since this feature is absent from the Arbutoideae, and has thus arisen twice (apomorphy 3 in Fig. 2b).

A similar recurrent rise of mixotrophy may also have happened in the Neottieae orchid tribe, where the occurrences of autotrophic species in the mixotrophic genera *Epipactis* and *Neottia* suggest independent gains of mixotrophy (Selosse & Roy, 2009; Těšitelová *et al.*, 2015). Why would some clades be predisposed to such convergent evolution? The nature of this (likely physiological) predisposition to mixotrophy and mycoheterotrophy is unclear, but not unprecedented. This hidden predisposition makes a striking parallel with the predisposition to emergence of symbiotic nitrogen fixation, another symbiotic plant trait. All nitrogen-fixing clades, associated with *Frankia* actinomycetes (e.g. *Alnus* or *Hippophae*) or eubacterial *Rhizobium* (e.g. *Parasponia* or legumes), belong to four plant orders (Fabales, Rosales, Cucurbitales and Fagales) all within the Fabidae (or 'Rosids I'; Werner *et al.*, 2014). Thus, nitrogen (N) fixation evolved at least eight times (two with *Rhizobium* and six with actinomycetes) within a clade arising from a 100-million-year old ancestor, but what exactly predisposes its members to evolve N fixation remains unknown (Werner *et al.*, 2014). As for the evolution of mixotrophy, better knowledge of the physiology and nutrition of plants from such clades may, in the future, shed light on their physiological predispositions.

To summarize, we predict that there are further preliminary steps (predispositions) to be discovered in the evolution from autotrophy to mixotrophy and mycoheterotrophy. The predisposition to partial or full loss of photosynthesis may well go beyond land plants, since several algal taxa also undergo recurrent loss of photosynthesis (e.g. within Euglenales or Chlamydomonadales; Figueroa-Martinez *et al.*, 2015). Although it is difficult to predict the nature of such predispositions, we believe that the genomic area will provide working hypotheses. Mycoheterotrophy entails massive regressive modification of plastid genomes (e.g. Schelkunov *et al.*, 2015) and, although we are not aware of full sequence of mixotrophic plastids, there is evidence for genetic reorganization in plastid genomes of Pyroleae (Braukmann & Stefanovic, 2012): interestingly, reorganizations were observed in the autotrophic *Chimaphila* + *Moneses* clade, so such reorganizations may predate mixotrophy. Further studies of the plastid genomes as well as investigations on carbon metabolism in mixotrophic plants and closely related autotrophic taxa (such as Arbutoideae) may unravel the predispositions to mixotrophy and mycoheterotrophy in autotrophic land plants.

Acknowledgements

The authors apologize for the many papers not cited due to space constraints. The authors are grateful to Thomas Braukmann and to the curators of the University of Arizona (ARIZ), University of Utah (UT), Paris Muséum National d'Histoire Naturelle (P) herbaria and University of British Columbia Botanical Garden (UBC), for providing plant material. The authors thank three anonymous referees for helpful comments. The authors also thank the Ecole Normale Supérieure de Lyon for providing financial support. M-A.S. was supported by the Fondation Ars Cuttoli & Paul Appell and the Association des Membres de l'Ordre des Palmes Académiques.

Note added in proof

At the time this paper was submitted, a work by Freudenstein *et al.* (2016) was published with topology close to that of our Fig. 2, also supporting that the ectendomycorrhizal and ericoid mycorrhizal types each derived from the arbuscular type in Ericaceae.

Author contributions

M-A.S., F.L. and M.G. planned and designed the research that was conducted by F.L. and J.L. with advice and samples provided by Y.M. and Y.H. F.L. performed the analyses under M.G.'s supervision. M-A.S. and F.L. wrote the paper before corrections were made by all authors.

Félix Lallemand[1,2], Myriam Gaudeul[1], Josie Lambourdière[1], Yosuke Matsuda[3], Yasushi Hashimoto[4] and Marc-André Selosse[1,5]*

[1]Institut de Systématique, Évolution, Biodiversité (ISYEB), UMR 7205 CNRS MNHN UPMC EPHE, Muséum national d'Histoire naturelle, Sorbonne Universités, 57 rue Cuvier, CP39, Paris, F-75005, France;
[2]Master BioSciences, Département de Biologie, École Normale Supérieure de Lyon, Université de Lyon, UCB Lyon1, 46 Allée d'Italie, Lyon, France;
[3]Laboratory of Forest Mycology, Graduate School of Bioresources, Mie University, Kurimamachiya 1577, Tsu, Mie 514-8507, Japan;
[4]Department of Life Science and Agriculture, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Inada-cho, Obihiro, Hokkaido 080-8555, Japan;
[5]Department of Plant Taxonomy and Nature Conservation, University of Gdansk, ul. Wita Stwosza 59, Gdańsk 80-308, Poland
(*Author for correspondence: tel +33 607123418; email ma.selosse@wanadoo.fr)

References

Bidartondo MI, Bruns TD. 2001. Extreme specificity in epiparasitic Monotropoideae (Ericaceae): widespread phylogenetic and geographical structure. *Molecular Ecology* **10**: 2285–2295.

Bolin JF, Tennakoon KU, Bin Abdul Majid M, Cameron DD. 2016. Isotopic evidence of partial mycoheterotrophy in *Burmannia coelestis* (Burmanniaceae). *Plant Species Biology*. doi: 10.1111/1442-1984.12116.

Braukmann T, Stefanovic S. 2012. Plastid genome evolution in mycoheterotrophic Ericaceae. *Plant Molecular Biology* **79**: 5–20.

© 2016 The Authors
New Phytologist © 2016 New Phytologist Trust

Chang JM, Di Tommaso P, Notredame C. 2014. TCS: a new multiple sequence alignment reliability measure to estimate alignment accuracy and improve phylogenetic tree reconstruction. *Molecular Biology and Evolution* **31**: 1625–1637.

Cullings KW. 1994. Molecular phylogeny of the Monotropoideae (Ericaceae) with a note on the placement of the Pyroloideae. *Journal of Evolutionary Biology* **7**: 501–516.

Figueroa-Martinez F, Nedelcu AM, Smith DR, Adrian RP. 2015. When the lights go out: the evolutionary fate of free-living colorless green algae. *New Phytologist* **206**: 972–982.

Freudenstein JV. 1999. Relationships and character transformation in Pyroloideae (Ericaceae) based on ITS sequences, morphology, and development. *Systematic Botany* **24**: 398–408.

Freudenstein JV, Broe BB, Feldenkris ER. 2016. Phylogenetic relationships at the base of Ericaceae: implications for vegetative and mycorrhizal evolution. *Taxon*, in press.

Gebauer G, Meyer M. 2003. ^{15}N and ^{13}C natural abundance of autotrophic and mycoheterotrophic orchids provides insight into nitrogen and carbon gain from fungal association. *New Phytologist* **160**: 209–223.

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.

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

Hynson NA, Bidartondo M, Read DJ. 2015. Are there geographic mosaics of mycorrhizal specificity and partial mycoheterotrophy? A case study in *Moneses uniflora* (Ericaceae). *New Phytologist* **208**: 1003–1007.

Hynson NA, Bruns TD. 2009. Evidence of a myco-heterotroph in the plant family Ericaceae that lacks mycorrhizal specificity. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **276**: 4053–4059.

Hynson NA, Madsen TP, Selosse M-A, Adam IKU, Ogura-Tsujita Y, Roy M, Gebauer G. 2013. The physiological ecology of mycoheterotrophy. In: Merckx V, ed. *Mycoheterotrophy, the biology of plants living on fungi*. Berlin, Germany: Springer, 297–342.

Hynson NA, Mambelli S, Amend AS, Dawson TE. 2012. Measuring carbon gains from fungal networks in understory plants from the tribe Pyroleae (Ericaceae), a field manipulation and stable isotope approach. *Oecologia* **169**: 307–317.

Hynson NA, Preiss K, Gebauer G, Bruns TD. 2009. Isotopic evidence of full and partial myco-heterotrophy in the plant tribe Pyroleae (Ericaceae). *New Phytologist* **182**: 719–726.

Johansson VA, Eriksson O. 2013. Recruitment limitation, germination of dust seeds, and early development of underground seedlings in six Pyroleae species. *Botany-Botanique* **91**: 17–24.

Johansson VA, Mikusinska A, Ekblad A, Eriksson O. 2015. Partial mycoheterotrophy in Pyroleae: nitrogen and carbon stable isotope signatures during development from seedling to adult. *Oecologia* **177**: 203–211.

Julou T, Burghardt B, Gebauer G, Berveiller D, Damesin C, Selosse M-A. 2005. Mixotrophy in orchids: insights from a comparative study of green individuals and nonphotosynthetic individuals of *Cephalanthera damasonium*. *New Phytologist* **166**: 639–653.

Kron KA, Judd WS, Stevens PF, Crayn DM, Anderberg AA, Gadek PA, Quinn CJ, Luteyn JL. 2002. Phylogenetic classification of Ericaceae: molecular and morphological evidence. *Botanical Review* **68**: 335–423.

Liebel HT, Bidartondo MI, Preiss K, Segreto R, Stöckel M, Rodda M, Gebauer G. 2010. C and N stable isotope signatures reveal constraints to nutritional modes in orchids from the Mediterranean and Macaronesia. *American Journal of Botany* **97**: 903–912.

Liu ZW, Wang Z-H, Zhou J, Peng H. 2011. Phylogeny of Pyroleae (Ericaceae): implications for character evolution. *Journal of Plant Research* **124**: 325–337.

Matsuda Y, Shimizu S, Mori M, Ito S-I, Selosse M-A. 2012. Seasonal and environmental changes of mycorrhizal associations and heterotrophy levels in mixotrophic *Pyrola japonica* (Ericaceae) growing under different light environments. *American Journal of Botany* **99**: 1177–1188.

Merckx V. 2013. *Mycoheterotrophy, the biology of plants living on fungi*. Berlin, Germany: Springer.

Nguyen L-T, Schmidt HA, von Haeseler A, Minh BQ. 2015. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* **32**: 268–274.

Notredame C, Higgins DG, Heringa J. 2000. T-Coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *Journal of Molecular Biology* **302**: 205–217.

Obase K, Matsuda Y, Ito S. 2013. *Enkianthus campanulatus* (Ericaceae) is commonly associated with arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* **23**: 199–208.

Ogura-Tsujita Y, Yokoyama J, Miyoshi K, Yukawa T. 2012. Shifts in mycorrhizal fungi during the evolution of autotrophy to mycoheterotrophy in *Cymbidium* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* **99**: 1158–1176.

Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* **61**: 539–542.

Schelkunov MI, Shtratnikova VY, Nuraliev MS, Selosse A, Penin AA, Logacheva MD. 2015. Exploring the limits for reduction of plastid genomes: a case study of the mycoheterotrophic orchids *Epipogium aphyllum* and *Epipogium roseum*. *Genome Biology and Evolution* **7**: 1179–1191.

Schwery O, Ornstein RE, Bouchenak-Khelladi Y, Xing Y, Carter RJ, Linder HP. 2014. As old as the mountains: the radiations of the Ericaceae. *New Phytologist* **207**: 355–367.

Selosse M-A, Roy M. 2009. Green plants eating fungi, facts and questions about mixotrophy. *Trends in Plant Science* **14**: 64–70.

Selosse M-A, Strullu-Derrien C, Martin F, Kamoun S, Kenrick P. 2015. Plants and fungi: a 400 million year affair that shapes the biosphere? *New Phytologist* **206**: 501–506.

Smith SE, Read DJ. 2008. *Mycorrhizal symbiosis, 3rd edn*. London, UK: Academic Press.

Tedersoo L, Pellet P, Kõljalg U, Selosse M-A. 2007. Parallel evolutionary paths to mycoheterotrophy in understorey Ericaceae and Orchidaceae: ecological evidence for mixotrophy in Pyroleae. *Oecologia* **151**: 206–217.

Těšitelová T, Kotilínek M, Jersáková J, Joly F-X, Košnar J, Tatarenko I, Selosse M-A. 2015. Two widespread green *Neottia* species (Orchidaceae) show mycorrhizal preference for Sebacinales in various habitats and ontogenetic stages. *Molecular Ecology* **24**: 1122–1134.

Werner GD, Cornwell WK, Sprent JI, Kattge J, Kiers ET. 2014. A single evolutionary innovation drives the deep evolution of symbiotic N_2-fixation in angiosperms. *Nature Communications* **10**: 4087.

Zimmer K, Hynson NA, Gebauer G, Allen EB, Allen M, Read DJ. 2007. Wide geographical and ecological distribution of nitrogen and carbon gains from fungi in pyroloids and monotropoids (Ericaceae) and in orchids. *New Phytologist* **175**: 166–175.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found online in the Supporting Information tab for this article:

Table S1 Ericaceae species, vouchers and GenBank accession numbers of the sequences used in phylogenetic reconstructions

Table S2 Primer sequences and annealing temperatures

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

Key words: Ericaceae, evolutionary predisposition, mixotrophy, mycoheterotrophy, mycorrhizas.

© 2016 The Authors
New Phytologist © 2016 New Phytologist Trust

Supporting Information

Table S1: Ericaceae species, vouchers and GenBank accession numbers of the sequences used in phylogenetic reconstructions. Sequences acquired during this work are shown in bold (accession numbers KX290466-0487).

Species	Source	Voucher	ITS	28S	matK	PHYA
Arbutus menziesii	P [a]	P02434385	AF086828	AF086829	**KX290478**	
Arbutus unedo			AF091953	DQ067894	KF997315	
Arctostaphylos hookeri	P [a]	P02434386	AF106818	AF091977	**KX290479**	
Arctostaphylos uva−ursi			FJ378570	AY596455	JN966109	JQ248016
Arctous rubra			AF091944	AF091968	JN966115	
Comarostaphylis diversifolia	UT	Wallace 1404	AF091947	**KX290469**	**KX290481**	
Ornithostaphylos oppositifolia	ARIZ	Tilforth 1205	**KX290466**	**KX290471**	**KX290482**	
Xylococcus bicolor	ARIZ	Rebman 26064	AF091948	**KX290477**	**KX290487**	
Chimaphila japonica			FJ378566	**KX290468**	**KX290480**	
Chimaphila umbellata	P	P02434387	KC526986	**KX290467**	HQ593235	JQ248018
Moneses uniflora			FJ378568	**KX290470**	KJ664808	JQ248024
Orthilia secunda	P	P02434388	KF963969	**KX290472**	KC475046	JQ248026
Pyrola japonica	P	P02434389	FJ378593	**KX290474**	**KX290484**	
Pyrola rotundifolia			FJ378588	AF091963	U61328	JQ248029
Allotropa virgata			AF384122	AF351919	AF440410	JQ248014
Hypopitys monotropa			JF441052	AF351913	JN895975	JQ248022
Pleuricospora fimbriolata	UT	Tillett 504	AF352007	AF351928	**KX290483**	
Pterospora andromedea			AF352009	M98772	Pers. com.[c]	
Sarcodes sanguinea	UT	Windham 2583	AF352010	M98773	**KX290485**	
Enkianthus campanulatus			KF963947	AY804243	AB697674	JQ248020
Pieris formosa	P	Luo-Linbo 247	EU547690	**KX290473**	AB206600	
Vaccinium vitis−idaea	P	Faure	GU361898	**KX290476**	**KX290486**	
Erica carnea			AY520790	DQ065768	AJ429284	
Rhododendron hippophaeoides	P [b]	P02434390	JF978286	**KX290475**	U61353	
Rhododendron groenlandicum [d]						JQ248023

UBC: University of British Columbia, Vancouver (Canada) UT: University of Utah Herbarium, Salt Lake City (USA)

ARIZ: University of Arizona Herbarium, Tucson (USA) P: Herbarium of the Museum National d'Histoire Naturelle, Paris (France)

[a] Fresh leaves collected in UBC Botanical Garden, Vancouver (Canada), before their record in Paris herbarium collection

[b] Fresh leaves collected in the Jardin alpin of the Museum National d'Histoire Naturelle, Paris (France), before their record in Paris herbarium collection

[c] Personal communication, Thomas Braukmann

[d] For the restricted analysis, ITS and 28S sequences from *Rhododendron hippophaeoides* were used together with PHYA sequence from *Rhododendron groenlandicum*

Table S2: Primer sequences and annealing temperatures.

Locus	Annealing temperature	Direction	Primer	Sequence (5' − 3')
ITS	54°C	Forward	ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG
		Reverse	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
28S	52°C	Forward	28KJ	GGCGGTAAATTCCGTCC
		Reverse	28C	GCTATCCTGAGGGAAACTTC
matK	52°C	Forward	390F	CGATCTATTCATTCAATATTTC
		Reverse	1326R	TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT
		Forward	KIM389F [a]	ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTCC
		Reverse	KIM692R [a]	CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG

[a] Used only for *Pleuricospora fimbriolata*

PCR were carried out using Qiagen *Taq* polymerase in 20 µL reaction volumes containing 2 µL of 10X *Taq* buffer, 1 µL of 5 % dimethyl sulfoxide, 1 µL of 1 mg/mL bovine serum albumin, 1.5 µL of 25 mM MgCl2, 0.8 µL of 6.6 mM dNTP mix, 0.32 µL of 10 pM primers, 0.12 µL of 5 units/µL Qiagen *Taq* polymerase and 1 µL of extracted DNA. Initial denaturation was 3 min at 94°C, followed by 35 cycles with 94°C denaturation for 30 s, annealing for 30 s, 72°C elongation for 1 min and a final extension of 10 min at 72°C.

BILAN ET DISCUSSION

La discussion générale de cette thèse sera l'occasion de dresser un bilan sur différents aspects de la mycohétérotrophie, enrichi des résultats obtenus lors des travaux présentés ci-dessus. Nous soulignerons également les limites de certaines conclusions et proposerons de nouvelles perspectives de recherche. Cette discussion s'articulera autour des trois grands axes décrits plus haut dans la partie « Objectifs » : (i) la physiologie des plantes mixotrophes, (ii) les contours flous entre autotrophie et mixotrophie et (iii) l'évolution de la mycohétérotrophie.

Plan détaillé de la discussion

I. Physiologie des plantes mixotrophes 201
1. Une vision générale du métabolisme mixotrophe chez les Neottieae……201
a) Deux sources de carbone : sucres et acides aminés……201
b) Carbone fongique et carbone photosynthétique, deux destins différents……202
2. Réponse aux facteurs environnementaux……203
a) Chez le genre Epipactis……203
b) Chez les Pyroleae……204
3. Prochaines étapes……206
a) Molécules échangées……206
b) Autres facteurs influençant le niveau d'hétérotrophie……207
c) Physiologie des plantes entièrement mycohétérotrophes……207
d) Au delà des Neottieae……208

II. La mixotrophie est-elle plus répandue qu'on ne le croit ? 209
1. L'hypothèse d'une « mixotrophie généralisée » chez les orchidées……209
a) Naissance de l'idée……209
b) Un argument isotopique supplémentaire : le ^{2}H……210
c) Restons mesurés……211
2. La fiabilité des indices de mixotrophie……212
a) Mesures isotopiques……212
b) Champignons associés……214
c) Morphologie……214
3. Récapitulons……215
a) Il y a mixotrophie et mixotrophie……215
b) La boîte à outils du « mixologue »……215

III. Évolution de la mycohétérotrophie 217
1. Une première étape : obtenir du carbone fongique……217
a) Un sous-produit de la nutrition azotée……217
b) … ou un simple puits de carbone un peu plus profond ?……218
c) Inverser le différentiel de carbone……218
d) Être bien entouré……219
2. Le chemin vers la mixotrophie……221
a) Garder le contact symbiotique……221
b) Recevoir plus que l'on ne donne……222
3. La mycohétérotrophie totale : comment franchir le cap photosynthétique ?……224
a) La photosynthèse reste avantageuse chez les plantes mixotrophes……224
b) Les albinos : des monstres prometteurs ?……226
4. Synthèse des mécanismes évolutifs……227
5. Perspectives……229

I. Physiologie des plantes mixotrophes

1. Une vision générale du métabolisme mixotrophe chez les Neottieae

a) Deux sources de carbone : sucres et acides aminés

Notre étude de transcriptomique et de métabolomique chez les Neottieae albinos a permis de préciser la nature des composés fongiques reçus (**Article II**). La plupart des expériences ayant été jusque-là consacrées *in vitro* aux échanges ayant lieu lors de la germination (Smith et Read, 2008 ; Fochi *et al.*, 2017) ou sur des plantules (Cameron *et al.*, 2006, 2008), nos travaux permettent d'étendre certaines conclusions au stade adulte et *in situ* (Figure 16).

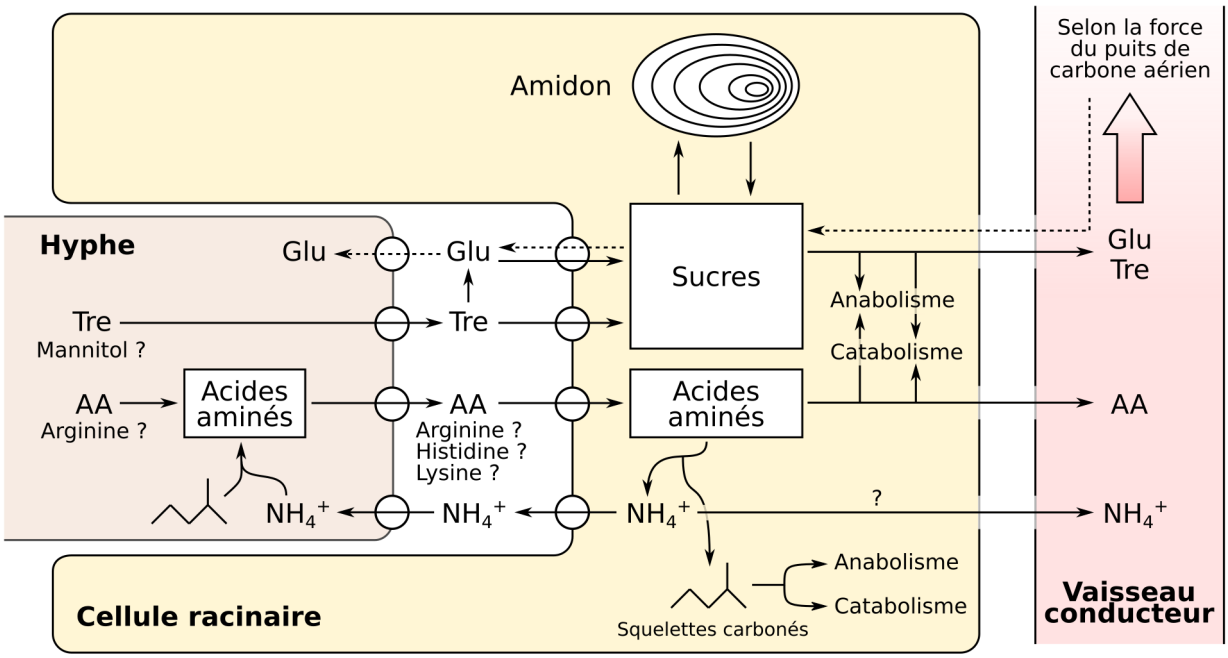


Figure 16 : une vision des échanges dans une mycorhize de Neottieae mixotrophe adulte. Le symbionte, un champignon ectomycorhizien, reçoit des sucres des arbres voisins et récupère de l'azote dans le sol sous forme minérale (préférentiellement de l'ammonium ; France et Reid, 1984 ; Finlay *et al.*, 1992) ou organique. Les formes de transport au sein du champignon seraient des molécules comme le tréhalose, le mannitol (carbone) ou l'arginine (azote ; Smith et Read, 2008). Ces composés sont libérés au niveau de l'interface plante-champignon et récupérés par la cellule racinaire, probablement par un phénomène de diffusion source-puits entretenu par les mécanismes suivants : (i) la synthèse de molécules de réserves (**Article I**), (ii) le métabolisme de la cellule racinaire avec en particulier une possible dégradation des acides aminés, (iii) un transfert des composés vers les parties aériennes (**Article II**). L'ammonium libéré lors du catabolisme des acides aminés est récupéré par le champignon et permet la synthèse de nouveaux acides aminés (Fochi *et al.*, 2017). Un flux de carbone inverse est également possible, depuis les organes photosynthétiques vers le champignon (flèches en pointillés ; **Article I**). Le flux net reste – dans le cas d'une espèce mixotrophe – en faveur de la plante. Notons que des mécanismes similaires sont vraisemblablement à l'œuvre lors de la germination mycohétérotrophe des orchidées à rhizoctonias.
Tre : tréhalose ; Glu : glucose ; AA : acides aminés

En premier lieu, l'absence de photosynthèse chez les albinos entraîne une diminution des concentrations en sucres (en particulier le saccharose et le fructose ; **Article II**). Le fait que le glucose et le tréhalose ne soient pas affectés par cette baisse **suggère l'existence d'un flux compensatoire de sucres en provenance des organes souterrains** (Figure 16). Le tréhalose ayant déjà été identifié comme une forme de transport de carbone lors de la germination des orchidées (Smith, 1967), il est possible que ce sucre continue à jouer un rôle important chez les Neottieae mixotrophes adultes. Une partie du tréhalose pourrait être clivée par les tréhalases intra ou extracellulaires, libérant du glucose et expliquant ce double flux pressenti chez les albinos. Le transport de composés intermédiaires, issus par exemple du catabolisme des acides aminés fongiques dans les cellules racinaires, est à moins sens moins probable. La dégradation de la plupart des acides aminés aboutit en effet à la production d'acides organiques (pyruvate, α-cétoglutarate, succinate, fumarate, malate, oxaloacétate) et d'acétyl-CoA (Hildebrandt *et al.*, 2015). Ces composés seraient, selon moi, plus probablement intégrés au cycle de Krebs racinaire que transférés aux organes aériens, où l'on observe qui plus est, une répression des enzymes de la néoglucogénèse chez les albinos.

Deuxièmement, la plus grande teneur en azote des albinos, et ce malgré une forte répression des voies d'assimilation de cet élément, **suggère un flux d'azote organique accru, issu des parties souterraines** (**Article II**). L'augmentation des transporteurs d'acides aminés chez les albinos et les travaux récents ayant mis en évidence le transfert de telles molécules lors de la germination (Fochi *et al.*, 2017), laissent ainsi penser que certains acides aminés seraient également transmis à l'âge adulte chez les Neottieae mixotrophes. Il s'agirait d'une pédomorphose*, leur assurant un approvisionnement en carbone supplémentaire (Figure 16). Estimer les parts respectives des sucres et des acides aminés dans le flux de carbone fongique est cependant un exercice délicat qui, outre les difficultés techniques pour mesurer indépendamment les contributions, nécessiterait de prendre en compte de nombreux paramètres pouvant modifier la balance (richesse en azote du milieu, force des puits de carbone, espèces de champignons concernées…).

Bien que la nature des composés transmis par les champignons soit à priori la même entre individus albinos et photosynthétiques, leur devenir diffère en fonction du phénotype et nous éclaire sur les flux de carbone entre organes chez les Neottieae mixotrophes.

b) Carbone fongique et carbone photosynthétique, deux destins différents

Nos travaux sur l'allocation du carbone chez *Cephalanthera damasonium* (**Article I**) ont confirmé et enrichi le modèle proposé par Gonneau *et al.* (2014 ; Figure 15). **Le carbone fongique est essentiellement dédié aux organes souterrains et participe tout particulièrement à la formation d'amidon dans les racines**, comme en témoigne l'enrichissement de cette molécule en ^{13}C similaire entre individus verts et albinos (**Article I**). L'amidon ainsi synthétisé (Figure 17), assure la survie des organes souterrains et la croissance au début de la belle saison, donnant aux jeunes pousses des teneurs elles aussi importantes en ^{13}C (Gonneau *et al.*, 2014).

Notre expérience de marquage et de suivi des photosynthétats, réalisée alors que les plantes

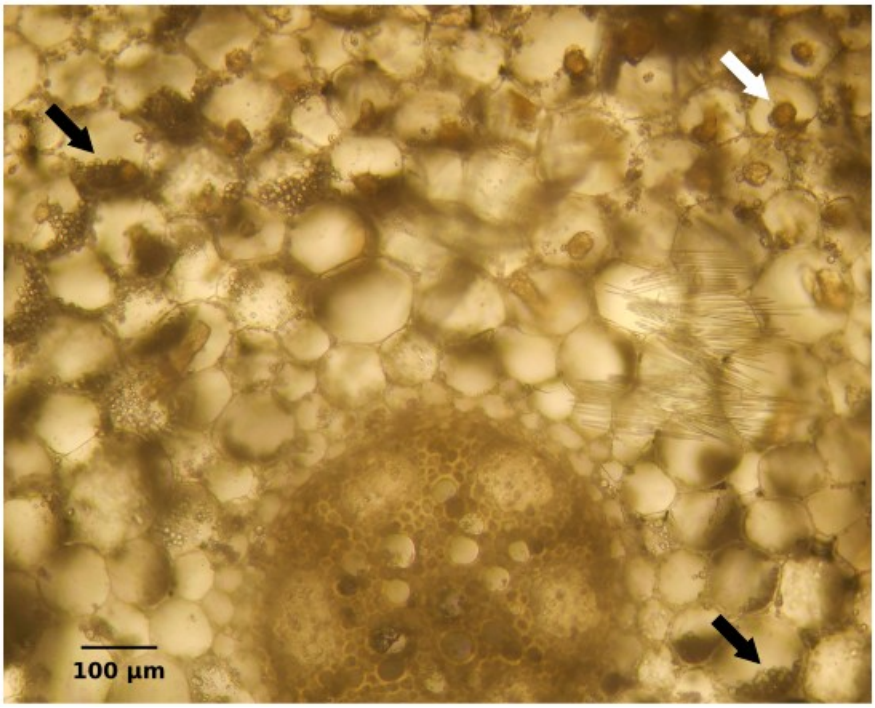


Figure 17 : coupe transversale d'une racine de *Cephalanthera damasonium*. La plante, prélevée au mois de juin 2017, est issue du site où a été réalisé le marquage au $^{13}CO_2$ présenté dans l'**article I**. On observe une quantité importante d'amidon, plutôt localisé dans les assises cellulaires internes du cortex (flèches noires). La colonisation par les champignons mycorhiziens se fait davantage dans les assises cellulaires externes. Les pelotons visibles ici sont en cours de lyse (flèche blanche). Photographie : Félix Lallemand.

commençaient à accumuler des réserves pour l'hiver, a donné des résultats particulièrement nets : moins de 2 % du carbone fixé se retrouvait dans les organes souterrains quatre jours après le marquage et plus de 70 % dans les fruits (**Article I**). **Le carbone photosynthétique est donc avant tout alloué aux organes aériens et joue un rôle important dans la formation des fruits et des graines.** Une expérience similaire sur une orchidée à rhizoctonias a quant à elle montré un transfert de l'ordre de 20 % du carbone photosynthétique vers les racines (Cameron *et al.*, 2008), ce qui souligne les différences physiologiques importantes entre espèces mixotrophes et autotrophes.

Il est intéressant de noter que ces deux voies d'acquisition du carbone contribuent respectivement à deux déterminants classiques de la valeur sélective* (fitness, Hunt et Hodgson, 2010) : survie (carbone fongique) et reproduction (carbone photosynthétique).

2. Réponse aux facteurs environnementaux

a) Chez le genre Epipactis

Une des caractéristiques de la mixotrophie est sa flexibilité, autrement dit, la capacité des plantes à obtenir plus ou moins de carbone fongique en fonction de certains paramètres comme la luminosité ou le stade de développement.

La réponse à la lumière a été bien étudiée chez les orchidées (voir introduction III.4.a). D'un côté, les orchidées à rhizoctonias, considérées comme autotrophes, montrent une baisse de leur teneur en ^{13}C avec la baisse de luminosité, à cause d'un meilleur fractionnement excluant le ^{13}C. De l'autre, les orchidées à champignons ectomycorhiziens, considérées comme mixotrophes, montrent une augmentation de cette teneur, traduisant une plus grande proportion de carbone fongique dans leurs tissus.

Nos résultats confirment ces deux types de réponse chez deux espèces d'*Epipactis* : *E. palustris*, associée avec des rhizoctonias (**Article V**) et *E. atrorubens*, associée avec des champignons ectomycorhiziens (**Article III** ; Figure 14). On observe donc, au sein d'un même genre, deux syndromes bien distincts chez des espèces chlorophylliennes (Figure 18). Notons que les *Epipactis* mixotrophes décrites jusqu'à présent appartiennent toutes à la section monophylétique *Epipactis* (définie par Jin *et al.*, 2014 ; Figure 18). Il est probable que toutes les espèces de ce groupe soient mixotrophes et que leur écologie soit liée à ce mode de nutrition. En effet, ce sont majoritairement des plantes de sous-bois contrairement à *E. palustris* qui est une espèce de lumière. On peut donc imaginer que la mixotrophie ait été sélectionnée par la faible luminosité du milieu forestier et/ou inversement, que la colonisation de ces écosystèmes ait été préalablement facilitée par la mixotrophie (**Article VI** et partie III de la discussion). Le fait que toutes les espèces de la section paraphylétique *Arthrochilium* soient autotrophes est cependant moins clair et mériterait des analyses supplémentaires (Figure 18). Il n'est en effet pas exclu que l'ancêtre commun des *Epipactis* ait été mixotrophe et que certaines espèces du groupe *palustris – gigantea* soient retournées à une nutrition autotrophe (**Article VI**).

b) Chez les Pyroleae

Nos travaux sur les éricacées mixotrophes (Pyroleae) ont mis en évidence des réponses plus inattendues (**Article III**). Contrairement à *E. atrorubens*, les éricacées supposées mixotrophes étudiées (*Pyrola chlorantha* et *Orthilia secunda*) voyaient leur teneur en ^{13}C baisser avec la luminosité du milieu, de la même façon que pour les plantes autotrophes. Par ailleurs, les teneurs en ^{13}C ne variaient pas au cours de la saison ou d'une année sur l'autre, contrairement aux orchidées mixotrophes chez qui le carbone d'origine fongique riche en ^{13}C est davantage mobilisé en début de saison (Roy *et al.*, 2013 ; Gonneau *et al.*, 2014).

Ces résultats étaient d'autant plus surprenants que des travaux antérieurs chez *Pyrola japonica* avaient montré une réponse à la lumière typique de plante mixotrophe (Matsuda *et al.*, 2012). Il se peut que nous n'ayons pas été en mesure de détecter des effets environnementaux dans notre étude pour différentes raisons : espèces à rhizomes étendus pouvant transporter du carbone sur de larges surfaces et tamponner les variations du milieu, changement selon les conditions environnementales des partenaires mycorhiziens et de la teneur isotopique du carbone fourni… Des expériences de manipulation *in situ* des paramètres environnementaux, suffisamment contrôlées, sont donc souhaitables pour confirmer nos conclusions.

Si nos résultats s'avèrent finalement traduire avec justesse le comportement de *Pyrola*

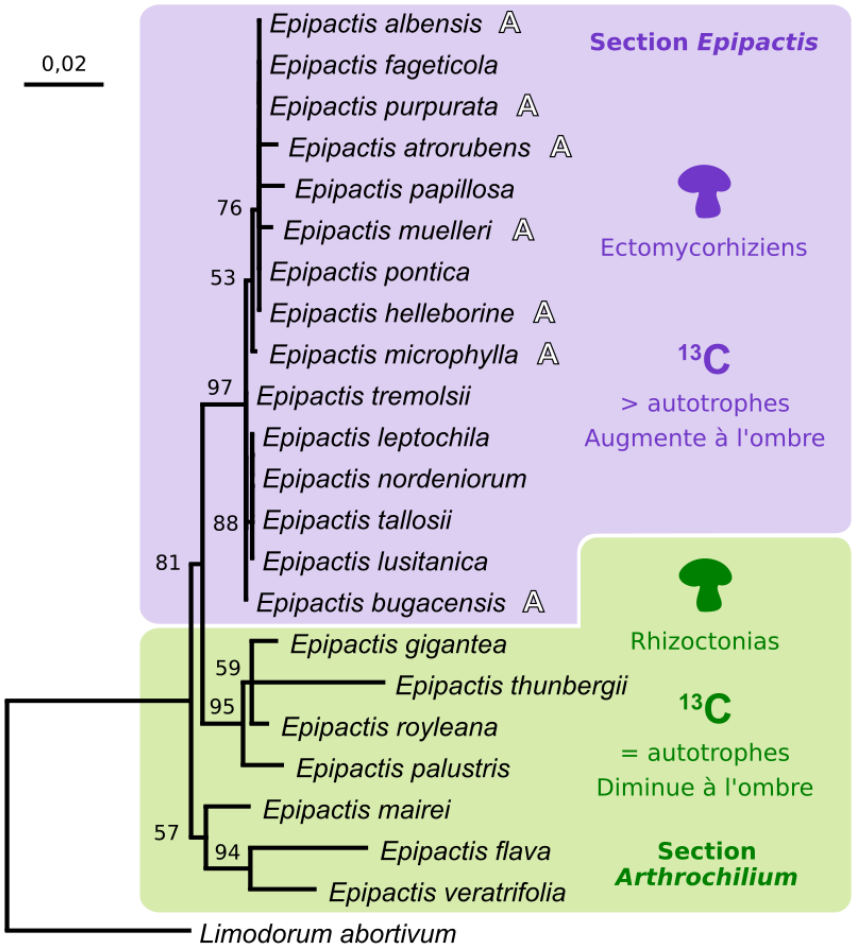


Figure 18 : autotrophie et mixotrophie au sein du genre *Epipactis*. La phylogénie est le résultat d'une analyse de maximum de vraisemblance (programme IQ-TREE, Nguyen *et al.*, 2015) basée sur le marqueur nucléaire ITS (*internal transcribed spacer*, voir **Article VI** pour les références des séquences et la méthode d'analyse). Un nombre supérieur à 95 indique un support élevé pour une branche donnée (*ultrafast bootstrap*, Minh *et al.*, 2013). La barre d'échelle correspond au nombre de substitutions par site. Les deux sections ont été définies par Jin *et al.* (2014). La présence d'albinos ("**A**" blanc), les champignons mycorhiziens associés, la signature isotopique (^{13}C) et sa réponse à la lumière sont précisés (voir texte principal et Tableau 2 pour les références). Les espèces de la section *Epipactis* (resp. *Arthrochilium*) présentent toutes les caractéristiques d'une nutrition mixotrophe (resp. autotrophe). Cependant, peu de données existent pour les espèces *E. mairei*, *E. flava* et *E. veratrifolia*.

chlorantha et *Orthilia secunda*, une interprétation possible est la suivante : les Pyroleae étudiées reçoivent bien du carbone de la part de leurs champignons mycorhiziens – ce qui leur donne une signature isotopique typique de plantes mixotrophes – mais elles fournissent en retour davantage de carbone à leurs partenaires. Il en résulte un flux net en faveur des champignons, autrement dit, malgré leurs signatures isotopiques intermédiaires, ces plantes ne seraient pas mixotrophes. Le carbone issu des champignons n'ayant ainsi pas de rôle significatif dans la nutrition de ces plantes, cela expliquerait l'absence de sensibilité aux paramètres étudiés.

Un argument en faveur de cette dernière interprétation est l'absence – à notre connaissance – d'albinos chez les Pyroleae. Une différence majeure avec les Neottieae mixotrophes qui suggère

que les flux nets de carbone sont bien en direction des champignons ou alors trop faibles pour assurer pleinement le développement d'un individu. Il existe toutefois chez certaines espèces de pyroles, des formes dépourvues ou quasiment dépourvues de feuilles (*Pyrola picta f aphylla*, Jolles et Wolfe, 2012 ; *P. japonica f subaphylla*, Shutoh *et al.*, 2016) qui pourraient indiquer, à l'instar des albinos, de véritables capacités mixotrophes chez les individus feuillés des espèces en question, mais pas nécessairement chez les autres. Il y aurait donc un continuum chez les Pyroleae entre espèces autotrophes, espèces autotrophes recevant néanmoins du carbone fongique (mais en donnant davantage) et espèces mixotrophes, avec certains cas de spéciation en cours vers la mycohétérotrophie totale.

3. Prochaines étapes

L'état des lieux que nous avons dressé de la physiologie des plantes mixotrophes laisse entrevoir plusieurs zones sur lesquelles les recherches futures pourraient se pencher.

a) Molécules échangées

Malgré les indices qui s'accumulent, la nature des composés échangés entre les plantes mixotrophes et leurs partenaires mycorhiziens n'est toujours qu'indirectement établie. En particulier, une analyse métabolomique (ou une étude restreinte aux sucres et aux acides aminés) comparant (i) les mycorhizes des plantes vertes et d'albinos ou (ii) les mycorhizes de plantes autotrophes, mixotrophes et mycohétérotrophes partageant les mêmes champignons, devrait pouvoir confirmer le rôle supposé du tréhalose et de certains acides aminés tout en permettant une certaine quantification de ces échanges. L'analyse des sèves brute et élaborée pourrait de plus permettre de voir dans quelle mesure ces composés s'intègrent directement, ou après transformation, au métabolisme général de la plante.

Des preuves plus directes et des mesures plus précises des flux nécessiteraient de réaliser des marquages des molécules fongiques, et donc de passer par les plantes autotrophes sources. Le fait que ces associations tripartites entre plantes autotrophes, champignons mycorhiziens et plantes mixotrophes ne soient reproductibles en laboratoire qu'au prix d'efforts démesurés, implique cependant de réaliser des expériences *in situ*. La tâche n'est pas aisée, mais un système artificialisé isolé par des tranchées et réduit aux espèces d'intérêt pourrait donner des résultats sans ambiguïté justifiant de tels efforts.

Un point plus anecdotique par rapport à la nutrition, mais toujours en suspens, concerne les composés éventuels transmis par les plantes mixotrophes ou mycohétérotrophes à leurs champignons. L'enjeu est ici de préciser les possibles contreparties que ces derniers pourraient retirer de ces associations et donc de clarifier la nature parasitaire ou non des mixotrophes et des mycohétérotrophes.

b) Autres facteurs influençant le niveau d'hétérotrophie

Dans le cas où une part non négligeable du carbone fourni à la plante s'avère effectivement être un sous-produit du transfert de molécules organiques azotées, on pourrait s'attendre à ce que la quantité de carbone fongique reçue augmente en fonction du ratio azote organique / azote minéral du milieu. Cela n'a pour le moment pas été rigoureusement testé, peut-être à cause de la difficulté des expérimentations *in situ* où l'existence de nombreux facteurs confondants empêche d'isoler des effets spécifiques liés à la richesse en nutriments. Il y a pourtant là un sujet d'étude prometteur, et des expériences contrôlées chez des orchidées à rhizoctonias – un système plus facilement manipulable – permettraient sûrement de vérifier cette hypothèse, clarifiant au passage le lien entre nutritions carbonée et azotée.

Il est également probable que la capacité d'une plante mixotrophe à obtenir du carbone fongique diffère selon les espèces de champignons ectomycorhiziens avec lesquels elle s'associe. En témoigne le fait que l'on observe souvent une forme de spécialisation envers certains champignons chez les plantes entièrement mycohétérotrophes. Ces associations préférentielles peuvent s'expliquer d'une part par un ajustement de la plante aux symbiontes les plus profitables, et d'autre part, par un mécanisme d'évitement de la part des champignons, seuls subsistant ceux n'ayant pas les moyens de contourner le « piège » mycohétérotrophe (Leake, 2004). Toutefois, tester l'effet de l'identité des partenaires fongiques sur la quantité de carbone transmise – et pourquoi pas sa nature – est extrêmement compliqué en pratique. Contrairement à ce qu'il est possible de faire pour les orchidées à rhizoctonias, un système orchidée mixotrophe / champignons ectomycorhiziens n'a encore jamais été réalisé en laboratoire, les champignons étant rarement cultivables sans leurs hôtes. La manipulation *in situ* des cortèges de champignons pose quant à elle des problèmes techniques hors norme, tandis que faire avec les communautés naturelles – inconnues à priori – impliquerait, pour s'affranchir des multiples facteurs confondants, un nombre de réplicats propre à décourager le plus enthousiaste des thésards.

c) Physiologie des plantes entièrement mycohétérotrophes

Si beaucoup de travaux – dont ceux ayant fait l'objet de cette thèse – ont porté sur les plantes mixotrophes, cela s'est peut-être fait au détriment des plantes entièrement mycohétérotrophes (voir cependant Bougoure *et al.*, 2010). Les espèces mixotrophes sont, il est vrai, des formes intermédiaires d'un grand intérêt pour comprendre l'évolution vers la mycohétérotrophie. Mais n'oublions pas que les espèces mycohétérotrophes représentent justement l'aboutissement du processus que l'on cherche à étudier ! Les spécificités physiologiques de ces plantes mériteraient donc d'être davantage étudiées et nous éclaireraient sûrement sur les molécules échangées et sur leur utilisation une fois dans les cellules végétales. Elles ont par ailleurs l'avantage d'être plus diversifiées que les plantes mixotrophes actuellement connues, offrant ainsi une gamme de « réplicats phylogénétiques » opportune pour dégager des caractères conservés, et donc, de possibles mécanismes physiologiques et étapes évolutives clés. Leur rareté et leur distribution rendent malheureusement leur étude plus délicate.

À cet égard, les plantes albinos sont souvent prises comme références mycohétérotrophes. Elles héritent cependant du bagage génétique de plantes mixotrophes et peuvent présenter des comportements, des réponses à certains signaux, ayant été perdus chez les plantes mycohétérotrophes. Ce biais, difficile à estimer, peut selon les études, brouiller les interprétations voire nous induire en erreur dans nos conclusions. Les albinos restent toutefois un modèle précieux et permettent d'orienter utilement les recherches pouvant être ensuite menées chez les plantes mycohétérotrophes.

d) Au delà des Neottieae

La plupart de nos connaissances sur la mixotrophie proviennent de travaux menés sur la tribu des Neottieae. D'autres orchidées mixotrophes ont néanmoins été étudiées et permettent d'élargir le champs des conclusions, ou de fournir des pistes de recherche pertinentes. Nous en détaillerons quelques exemples ci-dessous.

Le genre *Cymbidium* comprend de nombreuses espèces autotrophes, quelques espèces mixotrophes (*C. goeringii*, *C. lancifolium*), et une espèce chlorophyllienne mais ne possédant pas de feuilles (*C. macrorhizon* ; Motomura *et al.*, 2010). Initialement considérée comme étant mycohétérotrophe (Motomura *et al.*, 2010 ; Ogura-Tsujita *et al.*, 2012), il s'avère que *C. macrorhizon* possède un génome plastidial intact (Kim *et al.*, 2018) et que la photosynthèse de la tige et des capsules participe significativement à la formation des fruits (Suetsugu *et al.*, 2018). Cette espèce serait donc plutôt à un stade de mixotrophie avancé. Le rôle du carbone photosynthétique dans la reproduction de *C. macrorhizon* constitue un parallèle remarquable avec le modèle d'allocation différentielle établi pour les Neottieae mixotrophes et ouvre la voie à une possible généralisation de ce modèle parmi les orchidées.

De façon similaire, il existe au sein du genre mycohétérotrophe *Corallorhiza*, plusieurs espèces sans feuilles mais toujours chlorophylliennes (*C. odontorhiza*, *C. trifida*, *C. wisteriana* ; Barrett *et al.*, 2014). Leur génome plastidial intact (Barrett *et al.*, 2014) et certaines données isotopiques (Zimmer *et al.*, 2008 ; Cameron *et al.*, 2009) indiquent là aussi un stade de mixotrophie avancée plutôt qu'une mycohétérotrophie totale. Il reste à voir dans quelle mesure, chez ces espèces également, le maintien de la photosynthèse est liée à son rôle dans la reproduction.

Citons enfin des espèces mixotrophes comme *Gennaria diphylla* (Liebel *et al.*, 2010) ou *Platanthera minor* (Yagame *et al.*, 2012), qui, par la présence d'un appareil foliaire développé, se rapprochent davantage des *Epipactis* et des *Cephalanthera* mixotrophes. Peu étudiées, il serait notamment judicieux de voir si le degré de mycohétérotrophie de ces plantes est sensible à la lumière, la phénologie*, ou d'autres paramètres comme la richesse en nutriments du substrat ou les espèces de champignons avec lesquelles elles interagissent.

Les études comparatives restent toutefois limitées par le nombre, finalement assez faible, d'espèces mixotrophes connues. Et un tel constat soulève un point de discussion majeur : sommes-nous sûrs que nos outils pour les détecter soient fiables et n'en négligent pas certaines ?

II. La mixotrophie est-elle plus répandue qu'on ne le croit ?

1. L'hypothèse d'une « mixotrophie généralisée » chez les orchidées

a) Naissance de l'idée

Un caractère conservé parmi les orchidées mixotrophes décrites jusqu'à présent est leur association avec des champignons ectomycorhiziens (Figures 11 et 18). Les orchidées à rhizoctonias – autrement dit la grande majorité – sont quant à elles, malgré leur germination mycohétérotrophe, classiquement considérées comme étant autotrophes à l'âge adulte. Depuis quelques années, l'idée selon laquelle les orchidées à rhizoctonias pourraient finalement s'avérer elles aussi mixotrophes, a pris place dans le débat scientifique. Cette hypothèse a été avancée indépendamment par deux équipes à la fin de l'année 2014 (Selosse et Martos, 2014 ; Stöckel *et al.*, 2014), leurs arguments étaient les suivants.

L'analyse isotopique de protocormes* d'orchidées – stade mycohétérotrophe chez toutes les espèces (Figure 6) – a montré que ceux associés à des rhizoctonias étaient sensiblement appauvris en ^{13}C par rapport à ceux associés à des champignons ectomycorhiziens (Stöckel *et al.*, 2014 ; Figure 19). Pour des raisons biochimiques inconnues, le carbone fourni par les rhizoctonias est donc plus pauvre en ^{13}C que celui fourni par les champignons ectomycorhiziens. Cette composition isotopique plus proche du carbone des plantes autotrophes non-orchidées rendrait donc un éventuel flux de carbone à l'âge adulte plus difficilement détectable chez les orchidées à rhizoctonias.

Les orchidées à rhizoctonias sont enrichies en azote et en ^{15}N par rapport aux plantes autotrophes non-orchidées (Hynson *et al.*, 2013 ; Figure 8). Cela pourrait résulter d'un flux de matière organique en provenance des champignons, un gain de carbone associé à la nutrition azotée (Selosse et Martos, 2014 ; Stöckel *et al.*, 2014). Une étude en microcosme de l'association entre *Goodyera repens* (une orchidée à rhizoctonias) et *Ceratobasidium cornigerum* (Ceratobasidiaceae) est à ce titre éclairante (Cameron *et al.*, 2006). Dans cette expérience, le champignon – et lui seul – avait accès à un patch contenant de la glycine marquée (^{13}C et ^{15}N à plus de 99 %). Après 14 jours de culture, une partie des éléments marqués était détectée dans les parties aériennes de l'orchidée. Il y avait donc bien eu transfert de carbone et d'azote, probablement combinés sous forme d'acides aminés, du champignon vers la plante. Notons au passage que dans ce même article, une expérience complémentaire de marquage des photosynthétats au $^{14}CO_2$ a montré qu'un flux de carbone de la plante vers le champignon avait également lieu, son ampleur étant probablement supérieure au flux inverse (Cameron *et al.*, 2006).

Bien que d'ordinaire considérés comme saprotrophes*, les rhizoctonias sont régulièrement retrouvés en tant qu'endophytes* dans les racines de nombreuses plantes non-orchidées (Selosse *et al.*, 2009 ; Girlanda *et al.*, 2011 ; Veldre *et al.*, 2013 ; Weiß *et al.*, 2016). Du carbone pourrait ainsi

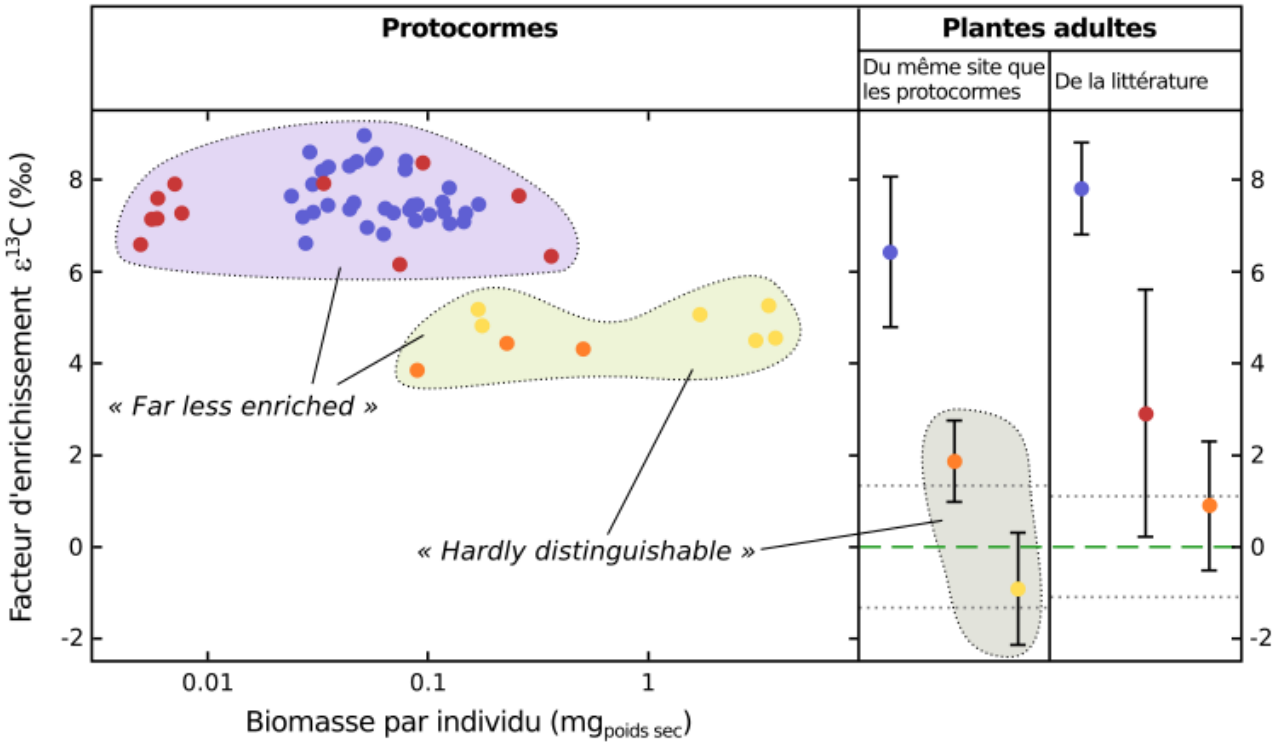


Figure 19 : enrichissement en ^{13}C de protocormes d'orchidées par rapport aux plantes adultes et à des plantes autotrophes non-orchidées. Figure adaptée de Stöckel *et al.* (2014), citations issues de Stöckel *et al.* (2014) et Gebauer *et al.* (2016). Les espèces sur fond bleu (resp. vert) sont associées avec des champignons ectomycorhiziens (resp. rhizoctonias) : *Neottia nidus-avis* (mycohétérotrophe, points bleus), *Epipactis helleborine* (mixotrophe, points rouges), *Serapias parviflora* (points orange), *Pseudorchis albida* (points jaunes). Les données pour les plantes adultes sont soit issues du même site que pour les protocormes, soit tirées de la littérature (moyenne ± écart-type). La ligne verte en tirets représente la moyenne des plantes autotrophes non-orchidées (zéro, par construction du facteur d'enrichissement ε ; Hynson *et al.*, 2013), les lignes en pointillés de part et d'autre donnent une idée de la variabilité des mesures (écarts-types).

être transféré aux orchidées depuis ces plantes, par l'intermédiaire de champignons partagés (Selosse et Martos, 2014). Les champignons endophytes montrant des enrichissements en ^{13}C variables mais relativement proches des plantes autotrophes (Seitzman *et al.*, 2011), un tel transfert passerait inaperçu dans la signature isotopique des orchidées à rhizoctonias. Ce mécanisme pourrait par ailleurs expliquer l'étrange appauvrissement en ^{13}C observé de manière récurrente chez certaines orchidées à rhizoctonias, comme par exemple les *Goodyera* (Selosse et Martos, 2014 ; Liebel *et al.*, 2015 ; **Article IV**).

b) Un argument isotopique supplémentaire : le ^{2}H

Peu de temps après la formalisation de cette hypothèse, un article publié dans *The New Phytologist* présente les résultats d'analyses isotopiques basées sur l'enrichissement en ^{2}H et en ^{18}O (Gebauer *et al.*, 2016). Menée chez plusieurs espèces d'orchidées photosynthétiques à rhizoctonias ou à champignons ectomycorhiziens, cette étude montre un enrichissement en ^{2}H chez toutes les orchidées – de façon semblable à ce qui a été observé jusqu'alors pour le ^{15}N. Les auteurs concluent

que toutes les espèces qu'ils ont étudiées sont mixotrophes (Gebauer *et al.*, 2016).

De là à considérer l'ensemble des orchidées comme étant mixotrophes, le pas n'a plus qu'à être franchi. Je pense toutefois qu'il convient de modérer cet enthousiasme et vais tâcher de mettre en lumière quelques limites de ces travaux, et donc, des conclusions qui en découlent.

c) Restons mesurés

Premièrement, l'étude de Stöckel *et al.* (2014) sur les protocormes d'orchidées souffre selon moi d'une interprétation exagérée de certains résultats. L'un des messages clés, que l'on retrouve dans le résumé de l'article, est le suivant (en gras) :

« *Seedlings of saprotroph-associated orchids were also enriched in ^{13}C and ^{15}N, but unexpectedly their enrichment was significantly lower* [compared to ectomycorrhizal fungi-associated orchids]*, **making them hardly distinguishable from their respective adult stages and neighbouring autotrophic plants***. » (Stöckel *et al.*, 2014)

Ici, saprotrophe est synonyme de rhizoctonias. Cette conclusion se base essentiellement sur le résultat de comparaisons de médianes par des tests non-paramétriques (test U de Mann-Whitney) sur des échantillons de faibles tailles (n = 3 et n = 6) et après correction de Bonferroni. Les auteurs obtiennent dans deux cas sur trois des P-values corrigées supérieures à 0,05 et en tirent la conclusion ci-dessus. Outre qu'une P-value supérieure à 0,05 n'implique aucunement d'accepter l'hypothèse nulle (ici l'égalité des médianes ; Motulsky, 2014 ; Greenland *et al.*, 2016), la faible puissance des tests utilisés réduit – par construction même – à peau de chagrin la possibilité d'obtenir une P-value corrigée inférieure à 0,05. Cette insistance mise sur les P-values ne permet par ailleurs pas de rendre compte de *la taille* des effets mesurés. Les données indiquent selon moi de façon assez nette un enrichissement des protocormes d'orchidées à rhizoctonias en ^{13}C par rapport aux adultes, bien qu'il est vrai, leurs teneurs en ^{13}C n'atteignent pas celles des mycohétérotrophes (Figure 19).

Or il s'agit là d'un point majeur : si les protocormes d'orchidées à rhizoctonias sont bien enrichis en ^{13}C par rapport aux adultes, alors le carbone fourni par les rhizoctonias a une signature distincte du carbone photosynthétique. Dès lors, un flux important de carbone fongique chez une orchidée adulte à rhizoctonias ne passerait pas inaperçu et d'éventuelles mixotrophes montreraient un certain enrichissement en ^{13}C, bien que moins ostensible que chez les mycohétérotrophes.

Deuxièmement, les analyses isotopiques sont soumises à un biais important : elles nous renseignent sur le flux brut obtenu par la plante pour un élément donné, **mais elles n'intègrent pas le flux inverse de la plante vers les champignons**. Je dois ici rendre hommage à Isabel Mujica, une doctorante chilienne qui a mis en lumière cette limite avec courage et aplomb au cours d'un congrès rassemblant de nombreux spécialistes de la question à Samos (Grèce), en 2015. Un enrichissement en ^{2}H – ou en un autre isotope lourd – témoigne certes d'un flux brut, mais ne permet pas de conclure quant à la balance carbonée des échanges, et donc de la nature mixotrophe

ou non de la plante.

Enfin, rappelons que l'on ne retrouve jamais de rhizoctonias parmi les symbiontes des orchidées devenues entièrement mycohétérotrophes, seulement des champignons ectomycorhiziens (Waterman *et al.*, 2013). Cela laisse dubitatif quant aux capacités des rhizoctonias à assurer un approvisionnement important en carbone chez une orchidée photosynthétique adulte (voir III.2.b).

En résumé, il semblerait que chez les orchidées à rhizoctonias, les protocormes soient bien enrichis en ^{13}C par rapport aux plantes adultes et que l'explication la plus simple à cette différence se trouve **dans la diminution du flux de carbone fongique à mesure que croissent les capacités photosynthétiques de la plante et que celle-ci devient autotrophe**. Les enrichissements en ^{2}H et en ^{15}N des adultes par rapport aux autotrophes non-orchidées résulteraient du maintien d'un flux de matière organique – probablement associé à la nutrition azotée – **qui serait à priori contrebalancé dans la plupart des espèces, par un flux de carbone plus important au bénéfice des champignons** (Cameron *et al.*, 2006). Cette idée est par ailleurs en accord avec les résultats d'une autre étude *in vitro* menée sur l'association entre *Goodyera repens* et *Ceratobasidium cornigerum* (Cameron *et al.*, 2008). Les mesures bidirectionnelles du carbone transféré ont en effet permis de mettre en évidence un flux brut du champignon vers la plante, mais également un flux cinq fois supérieur de la plante vers le champignon (Cameron *et al.*, 2008). Ces résultats sont-ils représentatifs des interactions *in situ* entre la plante et son cortège de symbiontes ? Les autres orchidées à rhizoctonias présentent-elles un syndrome similaire ? Ces questions restent ouvertes et promettent de nouvelles études de cas qui ne manqueront probablement pas de raviver le débat !

Les réflexions qui ont nourri ces questionnements sur la nutrition des orchidées à rhizoctonias restent pertinentes à plusieurs égards, et il n'est pas exclu que dans certains cas, ces plantes puissent faire preuve d'une authentique mixotrophie. Elles posent également la question de la véritable niche écologique des rhizoctonias (Figure 20), celle-ci pouvant s'avérer plus diversifiée qu'initialement supposée et conduire à des différences isotopiques marquées selon l'origine du carbone : mycorhizes sur d'autres plantes, saprophytisme, endophytisme biotrophe* ou nécrotrophe*…

2. La fiabilité des indices de mixotrophie

a) Mesures isotopiques

En plus du problème majeur évoqué ci-dessus concernant la différence entre flux brut et flux net, les analyses isotopiques sont soumises à d'autres biais dont il faut avoir conscience.

D'une part, il existe une variabilité assez forte des teneurs en ^{13}C ou en ^{15}N au sein des individus d'une même population, généralement de l'ordre de 1 ‰ (voir par exemple les figures des **articles IV et V**). Malgré les précautions prises pendant la récolte, les causes de ces différences peuvent être multiples : variabilité locale de certains paramètres comme la lumière ou le niveau de respiration du sol, individus ou organes d'âges différents, hétérogénéité des tissus, plus ou moins

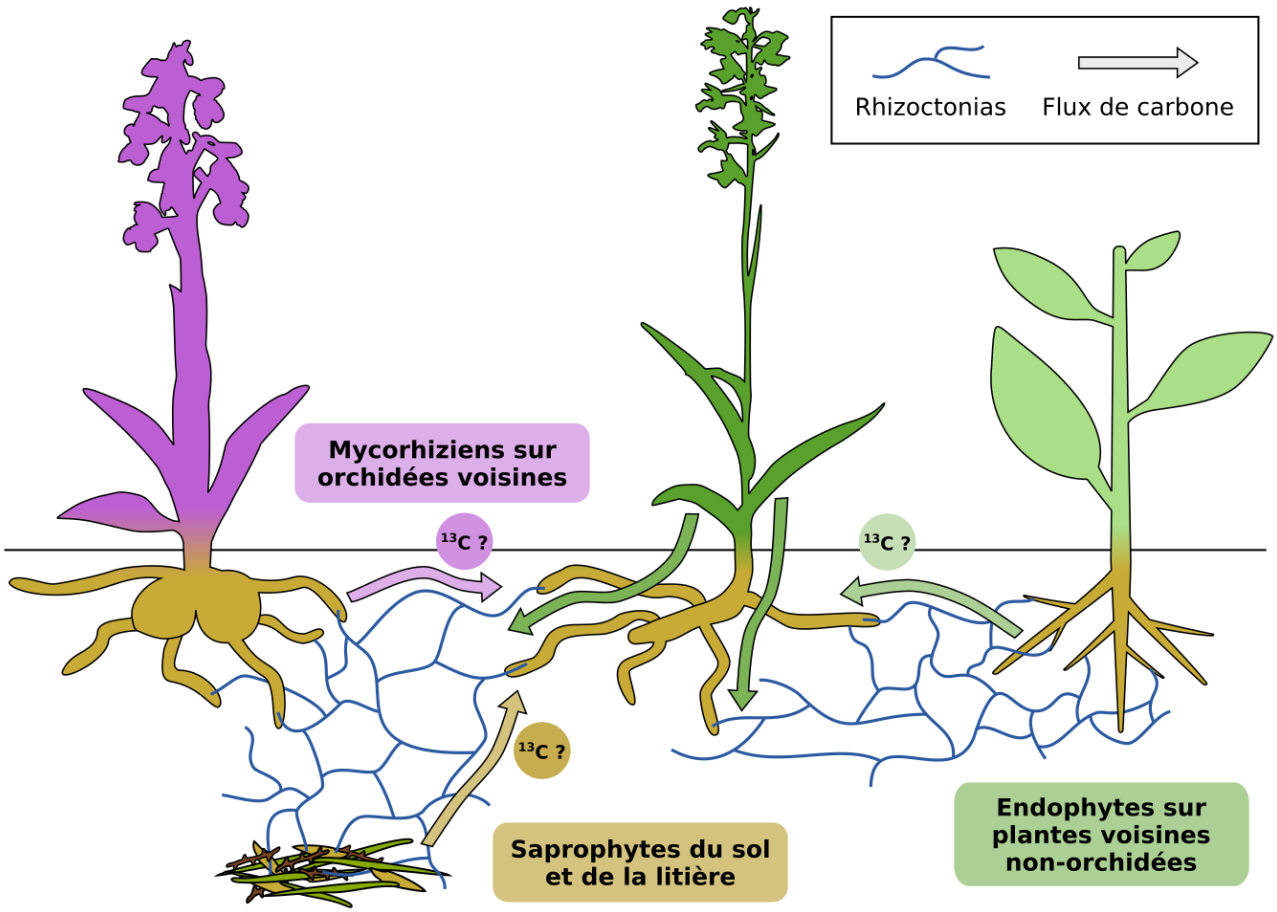


Figure 20 : niches écologiques des rhizoctonias et échanges de carbone avec leurs hôtes. Au centre (et à gauche), une orchidée associée à des rhizoctonias (filaments bleus). Trois possibles niches écologiques supplémentaires sont représentées pour ces derniers. Des flux de carbone peuvent exister depuis les symbiontes vers l'orchidée (Cameron *et al.*, 2008). Selon l'origine de ce carbone, son enrichissement en ^{13}C peut différer et donner à l'orchidée hôte une signature isotopique particulière. Le flux net global de carbone reste à priori au bénéfice des rhizoctonias (Cameron *et al.*, 2008).

riches en molécules de soutien ou de réserve… Obtenir un jeu de données représentatif nécessite donc d'échantillonner un nombre suffisamment grand d'individus – une dizaine dans l'idéal – ce qui n'est évidemment pas toujours possible sur le terrain et pose des contraintes en termes de coût et de traitement (chronophage) des échantillons.

D'autre part, les teneurs isotopiques intègrent tous les flux ayant eu lieu au cours de la formation du matériel étudié. Elles donnent donc un signal général, moyenné sur une longue période. Il n'est par conséquent pas possible de détecter ainsi une éventuelle mixotrophie temporaire, à moins d'analyser certaines molécules spécifiques comme des sucres ou des acides aminés libres. Notons qu'une étude de ce genre a été réalisée par une équipe américaine chez deux espèces de Pyroleae (*Pyrola picta* et *Chimaphila umbellata* ; Hynson *et al.*, 2012) : l'analyse de la teneur en ^{13}C des sucres solubles des feuilles n'a pas cependant pas montré de variation en fonction de l'éclairement ou de la connexion ou non avec le réseau ectomycorhizien (Hynson *et al.*, 2012).

Les analyses isotopiques restent donc un outil utile pour mettre sur la piste de la mixotrophie, mais elles ne peuvent à elles seules en apporter une preuve définitive.

b) Champignons associés

Nos travaux sur les communautés de champignons associés à certaines orchidées d'un écosystème côtier ont montré que la présence de champignons ectomycorhiziens n'impliquait pas nécessairement un enrichissement en ^{13}C typique des orchidées mixotrophes (**Article IV**). Il est en effet possible que ces champignons colonisent les racines en tant qu'endophytes, sans former de mycorhizes, ou simplement quelques pelotons ça et là mais sans fournir de carbone. Les capacités endophytiques des champignons ectomycorhiziens sont d'ailleurs un sujet émergent en écologie microbienne (Schneider-Maunoury *et al.*, 2018 ; Selosse *et al.*, 2018).

Inversement, les discussions qui ont précédé sur la nature des rhizoctonias soulignent que ces champignons pourraient, dans certaines conditions, fournir du carbone à leur hôte. Un tel flux serait toutefois difficile à identifier si, comme supposé, la signature isotopique du carbone ainsi transféré varie en fonction des niches écologiques occupées par les rhizoctonias (Figure 20).

Le critère « champignons associés » est donc lui aussi insuffisant pour conclure avec certitude de la nature mixotrophe d'une espèce, mais demeure une donnée essentielle pour aiguiller le diagnostic. Notons que la colonisation, en simples endophytes, d'orchidées à rhizoctonias par des champignons ectomycorhiziens pourrait être un phénomène courant (Bidartondo *et al.*, 2004 ; Shefferson *et al.*, 2007 ; Liebel *et al.*, 2010 ; Selosse *et al.*, 2010 ; Schiebold *et al.*, 2017b ; **Article IV**), ouvrant la voie à une véritable interaction mycorhizienne et donc, potentiellement, à la mixotrophie.

c) Morphologie

La diminution du nombre et de la taille des feuilles (*Epipactis microphylla*, *Neottia cordata*, *Corallorhiza trifida*, *Cymbidium macrorhizon*) ou de la teneur en chlorophylle (*Limodorum abortivum*, *Epipactis purpurata*) est souvent associée à une évolution vers la mycohétérotrophie (voir partie III). Les plantes présentant ces particularités sont donc de bonnes candidates à la mixotrophie.

Comme toujours, on constate cependant des exceptions avec d'une part des plantes mixotrophes à l'appareil foliaire développé (notamment chez certaines *Epipactis* et *Cephalanthera*), et d'autre part, des plantes sans feuilles, chlorophylliennes, mais dont la photosynthèse n'est plus fonctionnelle, comme l'atteste la perte de nombreux gènes plastidiaux (*Neottia camtschatea* et *Neottia listeroides* ; Feng *et al.*, 2016).

3. Récapitulons

a) Il y a mixotrophie et mixotrophie

En essayant de savoir si la mixotrophie était plus répandue qu'on ne le croyait, nous avons vu que la réponse dépendait – comme souvent – de la définition que l'on faisait de ce type de nutrition. Il semblerait bien que les orchidées à rhizoctonias reçoivent elles aussi une certaine quantité de matière organique, et donc de carbone, en provenance de leurs champignons mycorhiziens. Sont-elles pour autant mixotrophes ? Si la quantité de carbone transférée par la plante aux champignons est supérieure à celle reçue, le carbone fongique ne participe guère à la nutrition du végétal. **Je préfère ici restreindre l'emploi du terme mixotrophie aux situations les moins ambiguës, celles où plusieurs indices convergents permettent de supposer un flux net en faveur de la plante.**

Cette problématique fait remarquablement écho aux discussions portant sur la mixotrophie des Pyroleae (voir I.2.b). Les orchidées à rhizoctonias pourraient elles aussi correspondre à ces cas de figure intermédiaires, dans un continuum entre autotrophie « pure » et mixotrophie « vraie » : des plantes recevant d'un côté du carbone fongique, mais en fournissant davantage de l'autre. Malheureusement, étudier en routine la balance carbonée d'une association mycorhizienne *in situ* relève peu ou prou de l'utopie, étant donné le nombre de partenaires en jeu et les difficultés techniques que cela impliquerait. Nous sommes donc contraints à nous satisfaire d'hypothèses. Celles-ci peuvent néanmoins être étayées par plusieurs indices, de différentes natures, leur assurant cohérence et robustesse.

b) La boîte à outils du « mixologue »

Malgré les limites et les biais précédemment évoqués, les indices classiquement utilisés pour détecter la mixotrophie se montrent fiables lorsqu'ils pointent tous dans la même direction. **On peut dès lors dresser le profil type de l'orchidée assurément mixotrophe comme suit :**

- elle est enrichie en ^{13}C et en ^{15}N par rapport aux plantes autotrophes voisines ;

- elle s'associe préférentiellement avec des champignons ectomycorhiziens ;

- elle montre un appareil foliaire réduit ;

- sa signature isotopique affiche une sensibilité à certains paramètres, notamment la lumière et le stade de développement (**Articles III et V**) ;

- son génome plastidial conserve les gènes nécessaires à la photosynthèse (**Article VI**) ;

- des individus albinos, ou dépourvus de feuilles, peuvent survivre, parfois plusieurs années.

Bien que les espèces mixotrophes ne remplissent pas nécessairement tous les critères, **le fait de baser une conclusion sur un seul d'entre eux est un pari – selon moi – relativement risqué** (**Articles III et IV** ; Gebauer *et al.*, 2016). Gardons aussi à l'esprit que le degré d'hétérotrophie peut

être plus ou moins important selon les espèces, les champignons associés ou les conditions du milieu. Les critères peuvent donc différer entre une espèce faiblement hétérotrophe et une espèce fortement hétérotrophe. La première pouvant par exemple ne jamais montrer d'individus albinos.

Cette liste d'éléments convient à l'étude des orchidées mixotrophes et dans une certaine mesure aux éricacées, chez qui la mycohétérotrophie repose également sur l'exploitation d'un réseau ectomycorhizien. Il reste à voir dans quelle mesure elle peut s'appliquer à la détection de plantes mixotrophes dans les familles formant des endomycorhizes arbusculaires, comme les gentianacées ou les burmanniacées (Figure 4). Certains critères comme la signature isotopique naturelle ou le changement de partenaires fongiques risquent en effet de ne plus être applicables. D'autres, comme la réponse à la lumière, pourraient en revanche s'avérer davantage diagnostiques et gagneraient à être étudiés plus en détails.

III. Évolution de la mycohétérotrophie

1. Une première étape : obtenir du carbone fongique

Dans cette dernière partie, nous allons nous intéresser aux grandes étapes qui jalonnent l'évolution vers la mycohétérotrophie totale. Nous verrons dans quelle mesure les résultats obtenus au cours de cette thèse permettent de nuancer et d'enrichir le modèle présenté en introduction (Figure 10). À l'origine de ce processus évolutif se trouve la possibilité pour une plante d'obtenir du carbone de ses champignons mycorhiziens. Voyons quelles formes peut prendre un tel transfert et dans quelle mesure certaines espèces y seraient plus disposées que d'autres (**Article VII**).

a) Un sous-produit de la nutrition azotée…

Nous avons déjà vu à plusieurs reprises au cours de cette thèse que des formes organiques d'azote pouvaient être transmises par les champignons mycorhiziens à leurs plantes hôtes. Cette particularité est semble-t-il partagée par les champignons impliqués dans les symbioses ectomycorhiziennes, éricoïdes et orchidoïdes, et serait directement liée aux capacités saprotrophes de ces espèces (Read et Perez-Moreno, 2003 ; Smith et Read, 2008). Les composés ainsi transférés – par exemple des acides aminés comme l'arginine, l'histidine ou la lysine (Figure 16) – véhiculent par la même occasion du carbone et constituent donc une voie d'entrée prometteuse vers la mycohétérotrophie.

Il est cependant frappant de constater que, parmi toutes les plantes pouvant recevoir du carbone fongique de la sorte, seules les orchidées et certaines éricacées ont développé des formes de mycohétérotrophie (initiale, partielle ou totale). À l'exception des Monotropoideae et des Pyroleae (Ericaceae, **Article VII** ; voir également partie I.2.d de l'introduction), rien de tel dans les nombreux autres groupes ayant évolué indépendamment vers la symbiose ectomycorhizienne ou ses dérivés ! D'un point de vue quantitatif, de nombreux indices suggèrent que le transfert d'azote organique est en effet particulièrement actif chez les orchidées à rhizoctonias : forte teneur en azote (Hynson *et al.*, 2013), expériences de marquage (Cameron *et al.*, 2006) et analyse des gènes exprimés lors de la symbiose (Fochi *et al.*, 2017). S'agit-il d'une spécificité de la symbiose mycorhizienne des orchidées ayant favorisé l'émergence de la mycohétérotrophie ? Difficile de l'affirmer, car le processus inverse peut également s'envisager : la sélection de ce trait chez des plantes ayant déjà commencé à obtenir du carbone fongique par d'autres moyens. Un renforcement mutuel entre flux d'azote organique en provenance des champignons et dépendance à une source externe de carbone chez l'ancêtre commun des orchidées, est peut-être l'hypothèse la plus probable.

Quoiqu'il en soit, les autres plantes mycohétérotrophes nous montrent que des voies de détournement alternatives – et peut être plus générales – du carbone fongique pourraient bien exister.

b) … ou un simple puits de carbone un peu plus profond ?

En effet, contrairement aux orchidées, ni les éricacées mycohétérotrophes (**Article III** ; Hynson *et al.*, 2016), ni les espèces mycohétérotrophes formant des mycorhizes arbusculaires (Courty *et al.*, 2011), ne sont particulièrement enrichies en azote par rapport aux plantes autotrophes. Un flux de carbone reposant sur un transfert de molécules azotées organiques est donc plus hypothétique pour ces espèces, et supposerait une récupération très efficace par les champignons de l'azote ainsi transmis. L'enrichissement en ^{15}N des éricacées mycohétérotrophes (**Article III** ; Hynson *et al.*, 2016) suggère, il est vrai, une origine organique d'une partie de l'azote fourni par le champignon. Mais une *origine* organique n'implique pas un *transfert* sous forme organique, et donc un flux de carbone associé. L'absence d'expérience de marquage rend l'interprétation de ce signal délicate et, à nouveau, difficile de savoir s'il s'agit là d'une cause ou d'une conséquence de la mycohétérotrophie (voir III.1.a). Un raisonnement plus parcimonieux, et à portée plus générale, serait de considérer l'obtention de carbone fongique comme résultant de simples transferts entre sources et puits de carbone.

Les orchidées nous montrent que les échanges de sucres au niveau de l'interface plante-champignon peuvent se faire dans les deux sens : vers l'orchidée lors de la germination, vers le champignon à l'âge adulte (Smith et Smith, 1973 ; Smith et Read, 2008). Les transporteurs impliqués n'ont à priori pas de raison d'être différents entre les deux stades – bien qu'il nous manque là une étude détaillée de la question. On peut donc supposer qu'à tout moment, les sucres circulent par diffusion facilitée dans le sens des concentrations décroissantes. Quel que soit le type de mycorhize, les hexoses captés par le champignon sont de manière générale rapidement convertis en d'autres molécules (tréhalose, mannitol, acides gras ; Smith et Read, 2008), elles-mêmes diffusant dans les parties distales du mycélium. Il en résulte un puits de carbone stable, au bénéfice du champignon. Lors de la germination des orchidées en revanche, le métabolisme de l'embryon et la synthèse active d'amidon (Rasmussen, 1990 ; Richardson *et al.*, 1992 ; Figure 6) entretiennent vraisemblablement un puits de carbone suffisant pour surpasser celui des symbiontes fongiques et permettre la nutrition de la plante.

On peut intuitivement imaginer un mécanisme semblable pour l'ensemble des plantes mycohétérotrophes. **L'obtention de carbone fongique reposerait ainsi fondamentalement sur une différence de concentration en sucres en faveur de la plante.** Une conséquence immédiate – et légèrement effrayante – de cette idée est que, derrière toute plante, il y a une mycohétérotrophe qui sommeille ! Il convient donc de s'interroger sur les facteurs à même de faire pencher la balance des échanges au profit des végétaux, et ceux au contraire, permettant aux champignons de garder la situation « sous contrôle » dans la majorité des cas.

c) Inverser le différentiel de carbone

Côté plante, le carbone n'est généralement pas une ressource limitante. En temps normal, les photosynthétats suffisent à pourvoir aux besoins métaboliques des racines, et le maintien actif de faibles concentrations en hexoses dans les hyphes fongiques oriente les échanges de carbone vers

ces derniers. On peut imaginer deux voies – non exclusives – par lesquelles le puits racinaire se creuse : une augmentation des besoins en carbone lors de la constitution de réserves, et une disponibilité moindre en photosynthétats provoquant une situation de carence. Les facteurs favorisant l'obtention de carbone fongique pourraient donc être entre autres : la saisonnalité, l'aridité et l'accès à la lumière. Sans surprise, on retrouve les paramètres influençant le niveau d'hétérotrophie chez les Neottieae mixotrophes.

Côté champignon, c'est au contraire l'abondance de carbone qui permettrait de réduire le différentiel avec les racines et de générer un flux inverse. Le fait d'être intégré à un réseau mycorhizien et de recevoir ainsi du carbone de nombreux hôtes, constitue de ce point de vue un premier pas. La situation semble d'autant plus favorable que les hôtes en question présentent une forte productivité, comme les arbres d'une forêt (Figure 21). Une autre possibilité, illustrée par certaines orchidées mycohétérotrophes, réside dans l'abondance de carbone que peuvent générer des conditions propices à la décomposition de la matière organique chez les champignons saprophytes tropicaux (Martos *et al.*, 2009).

Cette approche « puits de carbone » pourrait expliquer le fait qu'on ne retrouve pas – à l'exception de quelques éricacées – de mycohétérotrophes parmi les plantes à ectomycorhizes (et types apparentés, voir III.1.a). Ces dernières sont en effet pour la grande majorité des arbres ou des arbustes (avec quelques rares exceptions ; Wang et Qiu, 2006 ; Brundrett, 2009), elles accèdent donc en général relativement bien à la lumière et produisent assez de photosynthétats pour que les situations de carence aux niveau des racines restent rares. Suffisamment rares du moins pour ne pas amorcer une ébauche de mycohétérotrophie. Un autre obstacle pourrait être leur biomasse bien supérieure à celle des plantes herbacées : le coût en carbone deviendrait trop élevé et faciliterait la défection des symbiontes (voir III.2.a). Ceci dit, des transferts bruts – mais pas nets – de carbone des champignons ectomycorhiziens vers leurs hôtes ont pu être mis en évidence, que ce soit pour du carbone issu des arbres voisins (Simard *et al.*, 1997) ou de la litière forestière (Bréda *et al.*, 2013). Des cas de mycohétérotrophie transitoire, et donc de mixotrophie, pourraient bien être plus fréquents qu'on ne le pense chez les plantes à ectomycorhizes.

Que ce soit par un accès limité à la lumière ou par un flux de carbone considérable en provenance des arbres, **les écosystèmes forestiers apparaissent donc particulièrement favorables à un renversement, au moins temporaire, des échanges carbonés entre les plantes du sous-bois et leurs symbiontes fongiques** (Figure 21). Mais encore faut-il pour pouvoir mettre les pieds sous la table, que ces dernières s'associent aux bons champignons afin d'être en mesure d'infiltrer le réseau mycorhizien !

d) Être bien entouré

Dans les forêts tempérées, boréales et méditerranéennes, les arbres dominants forment essentiellement des ectomycorhizes (Courty *et al.*, 2010). La capacité à s'associer à des champignons ectomycorhiziens est donc un prérequis pour pouvoir accéder au carbone circulant dans le réseau propre à ces organismes (Figure 21). **C'est probablement là l'obstacle principal**

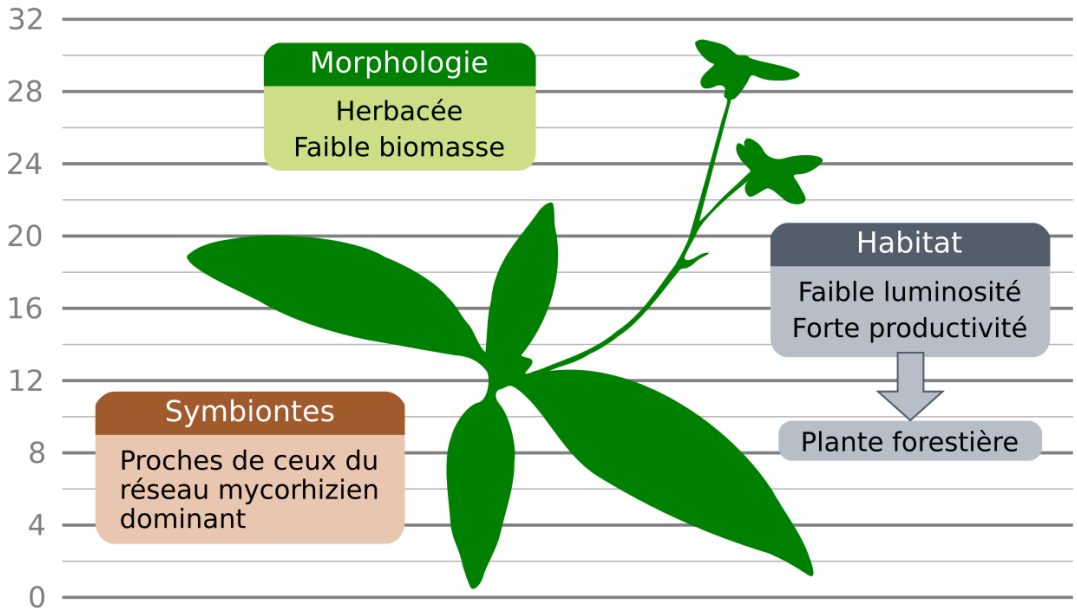


Figure 21 : quelques prédispositions à la mixotrophie. Lorsque ces caractéristiques sont réunies, il en résulte un fort différentiel de carbone entre les cellules racinaires de la plante et les hyphes de ses symbiontes mycorhiziens. Les conditions pour obtenir du carbone fongique sont alors remplies, ouvrant la voie vers une nutrition mixotrophe. D'autres paramètres peuvent jouer, comme par exemple la capacité de la plante à acquérir du carbone par l'intermédiaire de formes organiques d'azote (orchidées). L'échelle de gauche est en centimètres.

qui explique à la fois la rareté des plantes mycohétérotrophes dans ces milieux et le fait qu'elles soient cantonnées à deux familles : les orchidées et les éricacées.

En effet, en dehors de ces deux familles, les herbacées de sous-bois forment toutes des mycorhizes arbusculaires avec des gloméromycètes ou ne sont pas mycorhizées (Brundrett, 2009). Changer de partenaires pour s'associer aux ascomycètes et basidiomycètes ectomycorhiziens nécessite un long processus évolutif permettant à la symbiose de se mettre en place. Il est très peu probable qu'un tel changement se fasse spontanément chez des plantes adaptées aux mycorhizes arbusculaires. En revanche, les orchidées et les éricacées ont toutes deux abandonné les mycorhizes arbusculaires au cours de leur histoire et ont noué des alliances avec des ascomycètes et des basidiomycètes, plus – voire parfois très – proches phylogénétiquement des champignons ectomycorhiziens, par exemple au sein des Ceratobasidiaceae ou des Serendipitaceae (Sebacinales ; Yagame *et al.*, 2008 ; Kohler *et al.*, 2015 ; Weiß *et al.*, 2016). De là à s'associer avec ces derniers, le pas a été franchi à plusieurs reprises dans ces deux familles de plantes et a ainsi permis l'émergence d'espèces entièrement mycohétérotrophes.

Les forêts tropicales sont quant à elles dominées la plupart du temps par des essences à mycorhizes arbusculaires, avec localement des arbres à ectomycorhizes (Read, 1991). Il est donc beaucoup plus facile pour des plantes de sous-bois formant elles aussi la plupart du temps des mycorhizes arbusculaires (Brundrett, 2009), d'avoir accès aux ressources transférées par les arbres à leurs symbiontes. Cela d'autant plus que la spécificité des interactions avec les gloméromycètes est

supposée assez lâche au vu de leur diversité relativement restreinte (Kivlin *et al.*, 2011 ; Öpik *et al.*, 2013). **Les apparitions indépendantes en milieu tropical de plantes mycohétérotrophes dans plusieurs familles à mycorhizes arbusculaires ne sont donc à cet égard pas surprenantes.**

2. Le chemin vers la mixotrophie

Nous avons vu que, de manière générale, une plante pouvait obtenir du carbone fongique à deux conditions : (i) qu'elle entretienne un puits de carbone suffisant au niveau de ses racines, et (ii) qu'elle s'associe à des champignons bénéficiant eux-même d'un approvisionnement conséquent en carbone. On peut tirer de ces conclusions un portrait-robot de la plante prédisposée à devenir mixotrophe (Figure 21), faisant ainsi écho à l'une des questions ayant émergé au début de mes travaux de thèse (**Article VII**).

Voyons à présent comment la mixotrophie, prélude à une mycohétérotrophie totale, a pu évoluer dans ce contexte.

a) Garder le contact symbiotique

Les conditions évoquées ci-dessus ne sont finalement pas si difficiles à remplir, et nombre de plantes de sous-bois des forêts tropicales, associées à des gloméromycètes, pourraient prétendre – même partiellement – à la mycohétérotrophie. Or, celle-ci reste limitée à huit familles en ce qui concerne l'exploitation des réseaux mycorhiziens arbusculaires. Il existe donc vraisemblablement des mécanismes susceptibles d'entraver l'essor de ce type de nutrition.

Nous avons vu en introduction que la mise en relation de nombreux partenaires aux sein des réseaux mycorhiziens pouvait donner naissance à des mécanismes de discrimination, favorisant les interactions mutualistes (Selosse et Rousset, 2011 ; Werner et Kiers, 2015). Il est donc probable qu'une plante se comportant plus ou moins régulièrement en puits de carbone connaisse en parallèle un désinvestissement de la part des champignons mycorhiziens (Lekberg *et al.*, 2010 ; Fellbaum *et al.*, 2014). La diminution de l'approvisionnement en azote et en phosphore qui en résulterait suffirait à contre-sélectionner de telles velléités mycohétérotrophes.

Les plantes mycohétérotrophes que nous observons aujourd'hui ont donc manifestement su contourner ces mécanismes de sanction afin de maintenir le contact avec leurs champignons mycorhiziens : soit par un leurre, une parade moléculaire, soit en leur procurant d'autres bénéfices. Une faible biomasse est également un trait avantageux dans ces conditions puisqu'elle permet d'amoindrir le coût global pour les symbiontes et donc de limiter les risques d'être contre-sélectionné (Figure 21). **Cette étape de crible des associations compatibles est décisive pour les candidats à la mycohétérotrophie** : un succès leur permettra de sécuriser durablement leur approvisionnement en carbone non photosynthétique, tandis qu'un échec les enverra assez rapidement rejoindre le grand charnier de l'évolution.

Soulignons à ce titre que la spécificité entre les orchidées et les rhizoctonias pourrait être une conséquence de ces sélection et contre-sélection mutuelles chez l'ancêtre commun des orchidées actuelles – les associations avec des basidiomycètes proches des rhizoctonias chez les plantes à ectomycorhizes sont en effet beaucoup plus diversifiées. L'obtention de carbone fongique aurait donc été possible relativement tôt dans l'histoire des orchidées et aurait rapidement conduit à la mise en place d'une germination mycohétérotrophe (voir III.2.b ci-après).

b) Recevoir plus que l'on ne donne

Nos travaux sur les Pyroleae (Ericaceae ; **Article III** et partie I.2.b de la discussion) ont montré que, malgré un enrichissement en ^{13}C significatif, le caractère mixotrophe de certaines espèces n'était pas si évident. Il est possible qu'elles fournissent davantage de carbone à leurs symbiontes qu'elles n'en reçoivent. Par ailleurs, bien que les preuves formelles manquent encore, les orchidées à rhizoctonias pourraient elles aussi se trouver dans cette situation (voir II.3.a). Autrement dit, ces plantes représenteraient un puits de carbone se rapprochant de celui de leurs champignons mycorhiziens. Globalement de moindre ampleur, il pourrait éventuellement s'accroître dans certaines conditions et permettre un flux net – temporaire – en faveur des cellules racinaires. Nous qualifions ces plantes « d'échangeuses de carbone » (**Article III**) ou de « proto-mixotrophes » (Figure 22). **Le passage à une mixotrophie constitutive nécessite un accroissement du différentiel de carbone au niveau de l'interface entre hyphe et cellule racinaire, permettant un flux net permanent au bénéfice du végétal.** Les éricacées et les orchidées nous montrent deux façons différentes de franchir ce seuil (Figure 22).

Chez les Pyroleae, où sont rassemblées les espèces d'éricacées proto-mixotrophes (**Articles III et VII**), les symbiontes sont tous des champignons ectomycorhiziens (Tedersoo *et al.*, 2007 ; Zimmer *et al.*, 2007 ; Vincenot *et al.*, 2008 ; Johansson *et al.*, 2017). Le passage à la mixotrophie semble donc plus un problème lié au développement d'un puits racinaire suffisant, qu'à une disponibilité restreinte en carbone. La réduction de l'appareil foliaire ou de la concentration en chlorophylle peut être le genre de transformation pouvant conduire à un flux permanent dirigé vers la plante. La forme *aphylla* de l'espèce *Pyrola picta* semble avoir suivi cette trajectoire. Des formes à petites feuilles sont parfois visibles (Hynson *et al.*, 2009 ; Jolles et Wolfe, 2012 ; Figure 23), variants mixotrophes qui laissent penser que la transition vers la mycohétérotrophie n'est pas complète et pourrait même suivre un chemin inverse dans certaines populations. Pour l'espèce *Pyrola japonica* – supposée mixotrophe d'après son enrichissement en ^{13}C plus important à l'ombre (Matsuda *et al.*, 2012) – des formes plus ou moins feuillées et plus ou moins chlorophylliennes peuvent également se rencontrer (Shutoh *et al.*, 2016). Il serait judicieux de quantifier les capacités photosynthétiques de ces plantes et de les comparer aux autres Pyroleae. De manière générale, une analyse plus approfondie de la physiologie des espèces de ce groupe – notamment celles du genre *Pyrola* où les types d'importation de carbone fongique sont sans doute variés – est aujourd'hui nécessaire, à la fois pour clarifier leur statut mixotrophe ou non et pour comprendre, au-delà des spéculations, comment ce type de nutrition a pu émerger au sein des Pyroleae.

Chez les orchidées, le problème est différent. L'absence systématique de rhizoctonias parmi

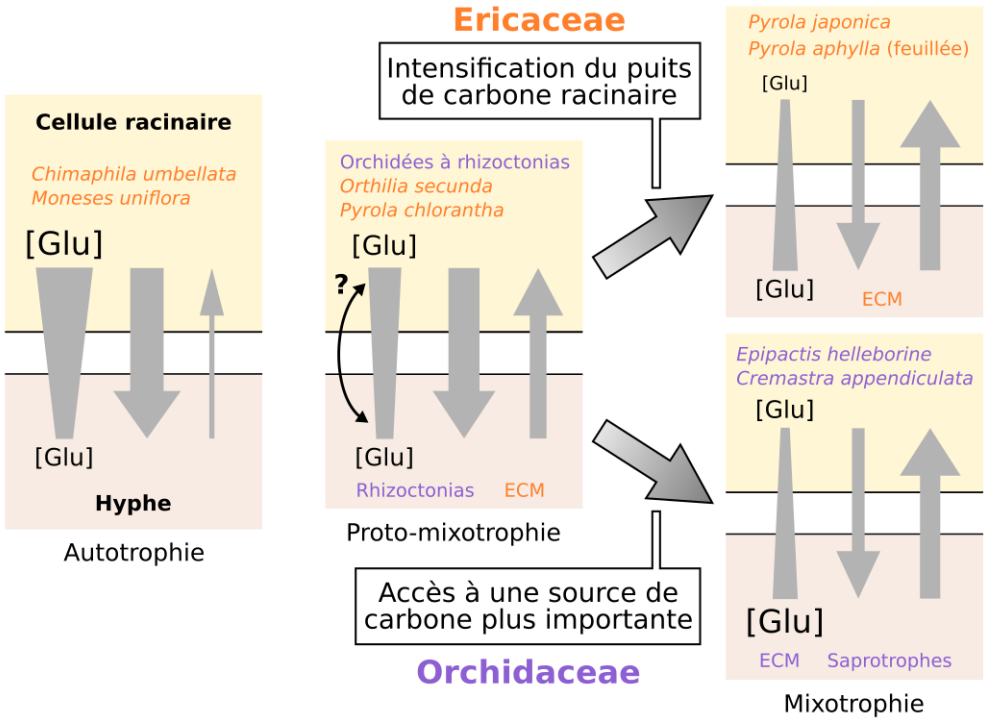


Figure 22 : comparaison du passage à la mixotrophie chez les éricacées et les orchidées. Les flux de carbone sont supposés assimilables aux transports de sucres par diffusion facilitée selon les gradients de concentrations (par simplification ils sont réduits ici à celui du glucose [Glu] et nous ne prenons pas en compte d'éventuels flux combinés carbone-azote). On trouve chez les deux familles des cas intermédiaires (proto-mixotrophie) où le différentiel en carbone est moins important que chez les autotrophes. Globalement au bénéfice du champignon, le flux net pourrait éventuellement s'inverser sous certaines conditions. Chez les éricacées, le passage à une véritable mixotrophie est semble-t-il lié à une réduction des capacités photosynthétiques, provoquant l'accroissement du puits de carbone racinaire. Chez les orchidées, c'est le changement de symbiontes fongiques, donnant accès à une plus grande source de carbone, qui est déterminant. Des exemples d'espèces et les groupes de champignons associés sont indiqués pour les éricacées (orange ; **Article III** ; Hynson *et al.*, 2009 ; Matsuda *et al.*, 2012) et les orchidées (violet ; **Article IV** ; Yagame *et al.*, 2013).
ECM : champignons ectomycorhiziens

les symbiontes des espèces mixotrophes ou mycohétérotrophes suggère fortement que ces champignons sont incapables de fournir des quantités importantes de carbone. Suffisantes pour assurer les besoins – somme toute modestes – des protocormes, les ressources fournies par les rhizoctonias ne pourraient, semble-t-il, qu'avoir un rôle mineur dans la nutrition des orchidées adultes. L'association progressive avec des champignons ectomycorhiziens (**Article IV**), ou avec des saprotrophes en milieu tropical, a permis à certaines espèces d'accéder à une plus grande source de carbone et ainsi de franchir le pas vers la mixotrophie. Comme chez les éricacées, il est cependant possible que le simple changement de partenaires fongiques ne soit pas suffisant et qu'une intensification du puits racinaire soit également nécessaire afin d'inverser véritablement le flux de carbone. C'est peut-être la situation dans laquelle se trouve l'orchidée *Liparis loeselii* (**Article IV** ; Schiebold *et al.*, 2017b).

Notons que les trajectoires évolutives vers la mixotrophie présentées ici, n'impliquent pas une

étape préalable de mycohétérotrophie initiale. Comme certains auteurs le soulignent, il s'agit plutôt d'un renforcement mutuel : la réduction de la taille des graines est limitée à un seuil, que seule permet de franchir une relation mycorhizienne stabilisée, permettant d'obtenir du carbone fongique lorsque le puits de carbone des cellules végétales est suffisant (Eriksson et Kainulainen, 2011). Le développement des graines-poussières s'envisagerait donc davantage comme un cheminement parallèle, facilement sélectionné dès lors que l'approvisionnement en carbone fongique est possible. Cette réduction de la taille des graines présente en effet le double avantage d'améliorer leur capacité de dispersion et d'augmenter leur production sans compromettre leurs chances de se développer, puisque le carbone des champignons compense le moindre investissement maternel. On comprend donc aisément pourquoi ce trait a systématiquement accompagné l'évolution des plantes mycohétérotrophes (**Article VII**). La fécondation préalable de nombreux ovules a été facilitée par le développement parallèle de formes de transport en masse des grains de pollen : pollinies des orchidées, tétrades et autres formes d'aggrégats chez les Pyroleae et les Gentiannaceae (Takahashi, 1986 ; Knudsen et Olesen, 1993 ; Selosse, 2014).

3. La mycohétérotrophie totale : comment franchir le cap photosynthétique ?

Dernière étape incontournable pour aboutir à la mycohétérotrophie totale : l'abandon définitif de la photosynthèse. Étonnamment, alors que l'on pourrait penser qu'il s'agit là d'une simple formalité pour des plantes mixotrophes dont la nutrition repose déjà en bonne partie sur le carbone de leurs champignons mycorhiziens, les travaux menés au cours de cette thèse et ceux qui l'ont précédée, nous montrent qu'il ne leur est pas si facile, de se passer de chlorophylle.

a) La photosynthèse reste avantageuse chez les plantes mixotrophes

Plusieurs éléments nous indiquent que la photosynthèse demeure sous sélection positive chez les plantes mixotrophes.

Premièrement, certaines espèces, apparentées aux mycohétérotrophes, présentent une morphologie caractéristique : feuilles absentes mais présence de chlorophylle dans la tige et les fruits (Figure 23). Chez de nombreuses espèces, ces organes contribuent de manière non négligeable à l'approvisionnement en carbone (Aschan et Pfanz, 2003). La photosynthèse des fruits par exemple, assure régulièrement entre 10 et 30 % de leurs propres besoins en carbone (Aschan et Pfanz, 2003). Même réduite à minima, la photosynthèse reste donc le dernier trait que conservent les espèces mixotrophes de leur passé autotrophe. On peut légitimement penser qu'elle aurait été perdue plus tôt si elle ne jouait pas un rôle significatif dans la valeur sélective de ces plantes.

Deuxièmement, les études sur la physiologie des Neottieae mixotrophes nous montrent que le carbone issu de la photosynthèse est principalement alloué aux parties aériennes – en particulier aux fruits et aux graines – et participe ainsi notablement au succès reproducteur (**Article I** ; Gonneau *et al.*, 2014). Un constat similaire a pu être récemment dressé chez l'orchidée *Cymbidium macrorhizon* (Suetsugu *et al.*, 2018), suggérant la possibilité d'un mécanisme général chez les

Figure 23 : quelques espèces illustrant le passage de la mixotrophie à la mycohétérotrophie. a. *Pyrola aphylla*, forme feuillée (Ericaceae ; photographie issue de Hynson *et al.*, 2009). **b, c.** *Dipodium variegatum*, inflorescence et fruits (Orchidaceae ; Wikimedia Commons). **d.** *Burmannia capitata* (Burmanniaceae ; Vincent Merckx). **e.** *Neottia camtschatea*, espèce chlorophyllienne mais dont la photosynthèse n'est plus fonctionnelle (Orchidaceae ; Feng *et al.*, 2016). **f.** *Cephalanthera exigua* (Orchidaceae ; Nuraliev *et al.*, 2014).

plantes mixotrophes.

Troisièmement, les génomes plastidiaux des espèces mixotrophes conservent l'ensemble des gènes nécessaires à la photosynthèse et ne montrent pas de signe de relâchement des pressions de sélection comme l'accumulation de mutations non-synonymes (**Article VI** ; Barrett *et al.*, 2014 ; Kim *et al.*, 2018).

Quatrièmement, les mutants albinos spontanés chez les Neottieae mixotrophes montrent généralement (Salmia, 1986 ; Roy *et al.*, 2013) – mais pas systématiquement (Shefferson *et al.*, 2016) – une moindre fitness que les individus photosynthétiques, et présentent les signes d'une carence en carbone et d'une plus grande sensibilité aux pathogènes, à l'herbivorie et à la sécheresse (**Article II** ; Salmia, 1986 ; Roy *et al.*, 2013). Plusieurs facteurs seraient à l'origine de ces difficultés : dysfonctionnement de la régulation de l'ouverture des stomates favorisant l'évapotranspiration, elle-même aggravée par la surface foliaire importante (Roy *et al.*, 2013), visibilité de la plante et haute teneur en azote des tissus les rendant plus attractifs auprès des consommateurs (**Article II** ; Roy *et al.*, 2013), réponses métaboliques inadaptées (**Article II**)…

Cinquièmement, la colonisation des racines par les champignons pourvoyeurs de carbone peut varier au cours de la saison. Des indices chez *Cephalanthera damasonium* suggèrent que celle-ci

pourrait être minimale au moment de la formation des fruits (Roy *et al.*, 2013 ; Gonneau *et al.*, 2014). L'absence combinée de carbone fongique et photosynthétique à ce stade aurait des conséquences désastreuses en termes de reproduction.

Ainsi, il semble clair que la photosynthèse reste avantageuse chez les plantes mixotrophes. Un abandon trop brutal serait contre-sélectionné dans la plupart des cas. **La transition vers la mycohétérotrophie peut donc s'envisager davantage comme l'évolution contingente de plusieurs traits, permettant un affranchissement progressif par rapport à la photosynthèse.** L'appareil foliaire se réduirait ainsi petit à petit, offrant une meilleure résistance au stress hydrique et à l'herbivorie (avec éventuellement des mécanismes de défense supplémentaires), jusqu'à disparaître. L'association avec les symbiontes se maintiendrait tout au long de la saison, assurant un flux de carbone permanent. La diversification des stratégies de reproduction, avec des formes de multiplication végétative souterraine utilisant le carbone fongique (**Article I**), favoriserait quant à elle le saut final : la perte des capacités photosynthétiques et l'avènement d'une mycohétérotrophie totale.

Soulignons toutefois qu'il n'est peut-être pas nécessaire de chercher à tout prix une justification, des avantages éventuels, qui compenseraient un succès reproducteur amoindri et orienteraient l'évolution des plantes mixotrophes vers plus d'hétérotrophie. Les capacités de dispersion à longue distance des graines-poussières – déjà présentes chez les mixotrophes – favorisent une forme de colonisation en patchs isolés, des populations de faible taille dans lesquelles des traits légèrement défavorables pourraient donc néanmoins se maintenir (maladaptation ; Tremblay *et al.*, 2005). L'émergence des espèces mycohétérotrophes serait ainsi une des nombreuses expressions des aléas de l'évolution, loin d'une optimisation implacable, une idée qui pourrait être particulièrement bien illustrée par les mixotrophes albinos.

b) Les albinos : des monstres prometteurs ?

L'hypothèse de « monstres prometteurs » a été proposée comme l'un des mécanismes de l'évolution par le biologiste Richard Goldschmidt. Selon cette idée, la transformation des espèces serait principalement due à des mutations systémiques – gènes du développement par exemple – produisant des individus très différents. Nos albinos ne sont clairement pas dans la norme de leur espèce, pourraient-ils pour autant être à l'origine d'événements de spéciation ?

On observe au sein du genre *Cephalanthera* (Orchidaceae, Neottieae) des espèces mycohétérotrophes intrigantes : contrairement aux autres mycohétérotrophes – et bien qu'elles aient comme elles, perdu leur chlorophylle – elles possèdent encore des feuilles plus ou moins vestigiales (*C. austiniae*, Coleman, 1995 ; *C. exigua*, Pedersen *et al.*, 2009 ; *C. humilis*, Jin *et al.*, 2011 ; Figure 23). Il semblerait que chez ces espèces, la perte de la photosynthèse ait été beaucoup plus soudaine comparée à la disparition progressive de l'appareil foliaire classiquement observée chez les mycohétérotrophes. Or, les espèces de *Cephalanthera* chlorophylliennes sont pour la plupart mixotrophes et des mutants albinos y sont fréquemment signalés (Tableau 2). **Un scénario de spéciation à partir d'une population riche en albinos et relativement isolée est donc tout à fait**

envisageable pour les *Cephalanthera* mixotrophes, et pourquoi pas, pour les ancêtres d'autres mycohétérotrophes actuelles.

Étrangement, aucune espèce mycohétérotrophe n'a pour le moment été observée au sein du groupe d'*Epipactis* mixotrophes également sujet à l'albinisme (Figure 18, Tableau 2). Il se peut que ce groupe se soit diversifié plus récemment et que l'apparition d'espèces mycohétérotrophes ne soit plus qu'une affaire de temps, ou bien cela peut suggérer des obstacles à la spéciation – obstacles qui auraient été levés chez *Cephalanthera* pour une raison inconnue. De tels freins pourraient trouver leur origine dans l'inadéquation entre la carence en carbone induite par la perte brutale de la photosynthèse, et les réponses métaboliques héritées d'un « génotype photosynthétique » qui ne feraient qu'aggraver le problème (**Article II**). La sensibilité des albinos a différents stress biotiques et abiotiques pourrait également compromettre leur fitness de manière rédhibitoire (**Article II** ; Roy *et al.*, 2013).

Les albinos n'ont donc pas encore livré tous leurs mystères ! En particulier, nous ne connaissons toujours pas les déterminants génétiques de ce phénotype et la façon dont il se transmet d'une génération à l'autre. Il s'agit pourtant là d'un élément essentiel pour comprendre comment des événements de spéciation pourrait avoir lieu. À ce titre, l'existence d'individus panachés, mêlant le blanc et le vert (Stöckel *et al.*, 2011), soulève la possibilité d'une origine épigénétique, même si ces phénotypes-là relèvent peut-être d'un déterminisme différent. Soyons confiants, et gageons que les tentatives de germination de graines issues d'albinos – en cours au sein de l'équipe, malgré des difficultés techniques souvent signalées dans la littérature (Rasmussen, 1995) – permettront d'avancer sur cette question.

4. Synthèse des mécanismes évolutifs

Ce cheminement progressif à travers différents type de nutrition, parmi différents groupes de végétaux, nous a permis de dégager quelques éléments qui, de mon point de vue, ont joué un rôle plus ou moins marqué dans l'évolution des différentes formes de mycohétérotrophie. J'ai tenté de résumer ces idées dans un schéma général illustrant une possible trajectoire évolutive des plantes mycohétérotrophes (Figure 24).

Certaines espèces végétales se trouvent prédisposées à obtenir du carbone de leurs champignons mycorhiziens (Figure 21). Il s'agit des herbacées de sous-bois dont les symbiontes sont suffisamment apparentés – voire identiques – à ceux associés aux arbres environnants. Des variantes existent chez les orchidées qui peuvent, d'une part s'associer à des champignons saprotrophes, d'autre part obtenir du carbone grâce au transfert d'azote sous forme organique. Le flux net de carbone reste dans tous les cas au bénéfice des partenaires fongiques.

La plupart du temps contre-sélectionnées par les champignons, certaines espèces parviennent toutefois à réduire le différentiel de carbone entre elles et quelques symbiontes compatibles. Dans certaines conditions, ce différentiel peut aller jusqu'à s'inverser et donner lieu à un flux net de

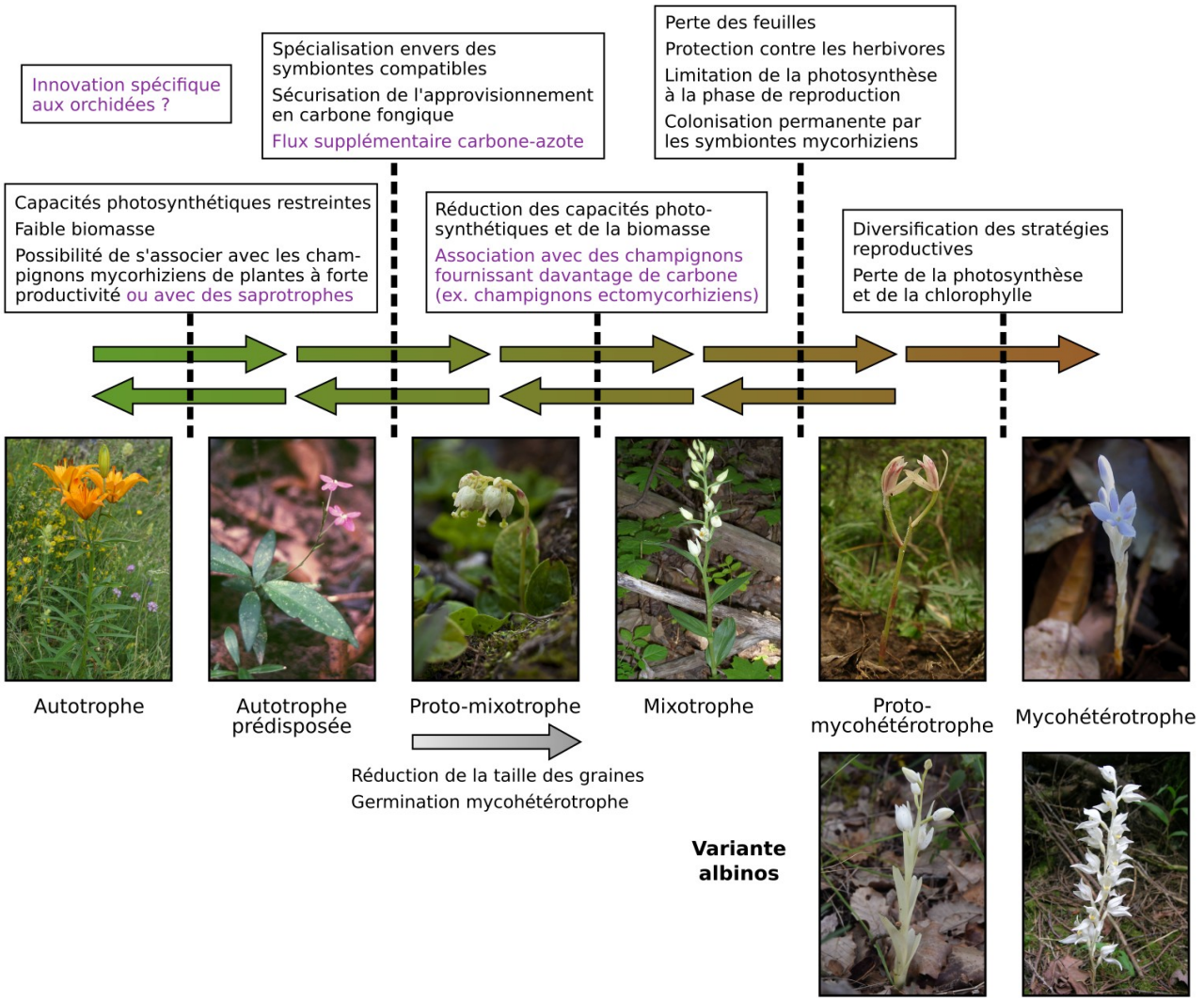


Figure 24 : une trajectoire évolutive possible de l'autotrophie à la mycohétérotrophie. Plusieurs « états » nutritionnels intermédiaires sont proposés avec certaines étapes clés de leur évolution. En violet sont indiquées des innovations qui seraient propres aux orchidées. L'évolution vers la mycohétérotrophie est évidemment un processus bien plus souple et contingent que ce que l'aspect séquentiel et déterministe de ce scénario pourrait suggérer. La chronologie des transformations peut être non linéaire, et différente de celle présentée. Des réversions peuvent également avoir lieu entre certains états. La réduction de la taille des graines suit en parallèle dès lors que l'approvisionnement en carbone est assuré, et aboutit rapidement à une germination mycohétérotrophe. Dans certains cas, une population de mutants albinos pourrait se maintenir et donner lieu à une spéciation.
Les espèces représentées sont, de gauche à droite et de haut en bas : *Lilium bulbiferum* (Liliaceae, herbacée de milieux ouverts à mycorhizes arbusculaires ; Wang et Qiu, 2006 ; photographie Félix Lallemand), *Pseuderanthemum crenulatum* (Acanthaceae, herbacée de sous-bois tropicaux à mycorhizes arbusculaires ; Wang et Qiu, 2006 ; Franz Xaver, Wikimedia Commons), *Orthilia secunda* (Ericaceae ; **Articles III et VII** ; Jacob Frank, Wikimedia Commons), *Cephalanthera damasonium* (Orchidaceae ; **Articles I et VI** ; Joachim Lutz, Wikimedia Commons), *Cymbidium macrorhizon* (Orchidaceae ; Suetsugu *et al.*, 2018 ; Wikimedia Commons), *Campylosiphon purpurascens* (Burmanniaceae ; Vincent Merckx), *Cephalanthera longifolia* albinos (Orchidaceae ; Daniel Tyteca) et *Cephalanthera austiniae* (Orchidaceae ; Wikimedia Commons).

carbone au bénéfice de la plante (Figure 22). Cette situation peut notamment se rencontrer dans le cas de graines moins bien pourvues en réserves. Une compensation permettant à ce trait d'être continuellement sélectionné, jusqu'à ce que la germination devienne totalement dépendante des champignons

La mixotrophie, c'est-à-dire un flux net de carbone en permanence en faveur de la plante, se développe à mesure que se creuse le différentiel de carbone entre la plante et ses symbiontes. Cela peut par exemple provenir d'une réduction des capacités photosynthétiques côté plante, ou d'un accès à une plus grande source de carbone côté champignon (Figure 22).

L'évolution vers la mycohétérotrophie totale est entre autres freinée par les avantages que procure la photosynthèse, notamment en ce qui concerne la reproduction. Certaines plantes parviennent néanmoins à s'en affranchir progressivement : leur appareil foliaire se réduit, l'association avec leurs symbiontes se maintient tout au long de la saison, des stratégies de reproduction asexuée se développent… Jusqu'au jour où une mutation touchant la photosynthèse n'est plus suffisamment délétère pour être contre-sélectionnée, l'émergence d'une nouvelle espèce mycohétérotrophe n'est alors plus qu'une question de quelques générations. Certaines espèces ont connu une version accélérée de ce processus grâce à la survie d'individus albinos, suffisamment viables pour entamer une spéciation.

Cette évolution graduelle est dans une certaine mesure réversible, comme le suggèrent des exemples au sein des orchidées à rhizoctonias (**Article IV**), des Neottieae (**Article VI**) et des Pyroleae (**Article VII**).

5. Perspectives

Certains aspects de l'évolution vers la mycohétérotrophie développés ci-dessus demeurent plus ou moins spéculatifs. Quelques pistes recherche devraient permettre à l'avenir d'affiner notre compréhension du phénomène.

Malgré les nombreuses études dont elles ont déjà fait l'objet (Annexe I), les Neottieae ont encore des choses à nous apprendre. Bien des espèces pourraient livrer de nouveaux profils isotopiques et de nouveaux cortèges de champignons mycorhiziens. Nous pourrions ainsi savoir si la mixotrophie est, ou non, une plésiomorphie du groupe (**Article VI**). Comprendre le rôle des albinos dans la transition vers la mycohétérotrophie chez le genre *Cephalanthera*. Déterminer la nutrition des *Epipactis* du groupe *Arthrochilium* et ainsi envisager, dans un cadre phylogénétique restreint, le passage de l'autotrophie à la mixotrophie, et pourquoi pas, des événements de réversion. Clarifier les types de nutrition des nombreuses *Neottia* chlorophylliennes, principalement tropicales, afin de comprendre l'émergence et la diversification en leur sein d'un clade entièrement mycohétérotrophe.

À l'échelle de l'ensemble des orchidées, d'autres questions voient le jour. Dans quelle mesure

ce rapport particulier entre nutrition azotée et obtention de carbone est-il spécifique à cette famille ? Les rhizoctonias sont loin d'être les seuls champignons mycorhiziens à pouvoir dégrader la matière organique du sol. Est-ce simplement une différence *quantitative*, ou existe-t-il quelque chose d'autre, de propre à la symbiose mycorhizienne orchidoïde ? Par ailleurs, un ensemble considérable de données a été progressivement acquis sur la nature des symbiontes associés à de très nombreuses orchidées, dans une grande diversité de groupes. Une méta-analyse de ces interactions – la tâche n'est pas simple ! – livrerait sans nul doute de précieuses informations sur l'écologie des rhizoctonias, les facteurs influençant les associations, et dévoilerait probablement une diversité inattendue de partenaires occasionnels.

Enfin, si l'on élargit encore notre champ de vision, nous en revenons à la question fondamentale des éléments qui permettent à une association mycorhizienne, en moyenne mutualiste et équilibrée, de basculer vers de tout autres échanges. L'étude de la mycohétérotrophie nous a permis d'en identifier quelques uns : pluralité et diversité des partenaires, coûts modérés et partagés par les protagonistes, défaillance des mécanismes de sanction des tricheurs, contreparties de nature différente (protection, molécules d'intérêt…), etc. Il s'agit donc d'un très bel exemple de trajectoire alternative que peut prendre une symbiose. Un point de comparaison remarquable pour quiconque s'intéresse au fonctionnement des interactions spécifiques et en particulier à l'émergence de l'hétérotrophie, chez les plantes ou dans d'autres groupes (Selosse *et al.*, 2017b ; Těšitel *et al.*, 2018).

Le rôle structurant du mutualisme dans l'évolution des êtres vivants étant par ailleurs aujourd'hui bien établi (Selosse, 2017 ; Servigne et Chapelle, 2017), les modestes plantes mycohétérotrophes, et les histoires qu'elles nous racontent, pourraient bien s'avérer source d'inspiration pour les évolutionnistes, et pourquoi pas – avec les écueils inhérents à ce genre de démarches –, pour les économistes, les sociologues et les philosophes, que l'on croise le dimanche en forêt.

CONCLUSION

La Forêternelle

Il était une forêt… Il y a fort longtemps, était une forêt. Bien avant que le monde ne se couvre de fourmis, il était une forêt. Oh ! Ce n'était pas une petite forêt de fagotins, un bosquet perdu ou une sylve anodine. C'était une forêt comme la Terre n'en avait jamais portée jusqu'alors. C'était une forêt immense, colossale, luxuriante ! Si vaste, que lorsque le soleil se couchait d'un côté, il était déjà debout de l'autre ! Si belle, que tous les animaux de l'époque, des nématodes aux tétrapodes, se dépêchèrent d'avoir des yeux pour pouvoir l'admirer ! C'était la forêt de toutes les légendes. C'était… la *Forêternelle*. Tous les arbres connus et inconnus y poussaient. On y voyait des pins gigantesques, qui récupéraient directement l'eau des nuages ; des moabis multicolores, couverts de milliers d'épiphytes iridescentes ; des falassoles grands comme des châteaux, creusés par les âges, où les escargots et les tritons bâtissaient leurs cités. C'était une forêt où régnait l'abondance. Une profusion de feuilles, de fruits et de graines, que les arbres partageaient volontiers avec les autres habitants, ou offraient à leurs animaux de compagnie. Il y avait parmi eux une espèce de poilu, les Tom'bé, qui les amusait beaucoup depuis qu'ils avaient décidé de ne plus vivre dans les branches. Tout patauds, perchés sur leurs deux tiges, ils trébuchaient sur la moindre racine et faisaient le bonheur des tigres, des ours, des aigles, des coyotes, des couleuvres, des taupes et des larves de coccinelles. Parfois ils ramassaient un peu de bois et essayaient de se construire un abri. Mais les cabanes s'envolaient au premier coup de vent, et de toute façon, ils préféraient de loin passer leurs journées à faire des batailles de cailloux… Bon, à part pour les Tom'bé, c'était une forêt où il faisait bon vivre. Quand les arbres commençaient à être à l'étroit dans la canopée, il leur suffisait à tous de grandir un petit peu pour profiter ensemble d'un plus grand espace où étaler leurs feuilles. Bien sûr, de temps en temps, un arbre un peu à la traîne ne poussait pas aussi vite que les autres. Le feuillage de ses voisins finissait par le recouvrir, le coupant du soleil. Et là, le malheureux n'avait plus qu'à attendre la chandeleur… Bien sûr, les plantes du sous-bois ne faisaient pas vraiment partie de la fête. Elles vivotaient ici-bas, ramassant les miettes de lumière qui arrivaient jusqu'à elles. Mais comme après tout, elles n'avaient jamais vu le soleil, cette vie-là leur allait bien et seules quelques lianes intrépides partaient de temps en temps à la conquête des cimes. En tout cas, pour les arbres, la Forêternelle c'était la forêt de leurs rêves. Et ce rêve grandissait, année après année, se rapprochant toujours un peu plus du soleil. Évidemment, vous l'aurez deviné, les arbres ne poussaient pas tout seuls ! Les mycorhizes étaient de mises pour courir les photons. Le sol épais et plein d'humus de la Forêternelle abritait une quantité fabuleuse de mycélium. Associés aux arbres, les champignons recevaient de leur part un flot continu de molécules organiques dont – en bons hétérotrophes – ils se régalaient. En retour, les hyphes innombrables parcouraient la terre, s'insinuaient dans la roche, et récupéraient l'eau, l'azote, le phosphore, le zirconium et tout ce dont les arbres avaient besoin pour gagner quelques centimètres supplémentaires. Ça marchait plutôt très bien, et ce qu'on avait coutume d'appeler la « Belle Alliance Sylvo-Fongique » était promise à un avenir radieux.

Un beau jour, alors qu'elle pointait dehors quelques carpophores étoilés pour faire son affaire, la vieille Géastride remarqua quelque chose d'étrange. Les Tom'bé – qui déjà en temps normal, lui faisaient toujours un peu peine à voir – étaient là franchement en piteux état. Le chapeau tout bleu, ils grelottaient comme le muguet. Certains se regroupaient et formaient des petits tas pour se tenir chaud, mais ils réussissaient surtout à se refiler des capsides virales… Attristée par le sort de ces pauvres Tom'bé, la vieille Géastride s'en alla voir Casimir, le satyre savant :

« Casimir ! Les Tom'bé sont en train de mourir de froid ! Ne peut-on pas faire quelque chose pour les aider ?

— Gégé, ton empathie t'honore, mais tu sais bien que depuis le fiasco de l'opération Psilo, nous nous sommes jurés de ne plus intervenir dans les problèmes des Tom'bé. Désolé, mais je ne risquerai pas de me faire radier de l'ordre des Phallales pour ces poilus. Et puis de toute façon, ils finissent toujours par s'en sortir d'une manière ou d'une autre ! Crois-moi, il faudra plus qu'une petite vague de froid pour en venir à bout. »

Alors que, sur ces paroles rassurantes, il congédiait la vieille Géastride, Casimir était pensif. Cela faisait la troisième année consécutive qu'on venait le voir pour lui dire que les Tom'bé se les pelaient. Casimir se fichait un peu de leurs mésaventures, c'est vrai, mais manifestement, il se passait un truc pas normal en surface. Le satyre chassa les mouches de son chapeau et se mit à réfléchir. Il sortit des ouvrages poussiéreux de sa biblyphotèque, posa des équations, traça des schémas, sortit de nouveaux livres. Pendant deux jours et deux nuits, il se tortura l'hyménium à la recherche d'une explication, jusqu'à ce que, épuisé, il tomba de fatigue.

« Casimir ! Casimir ! Phosphore ! »

Le signal réveilla le savant en sursaut. Avec tout ça il avait complètement oublié d'envoyer des nutriments aux arbres voisins ! Un noisetier qui commençait à prendre un peu de retard là-haut avait particulièrement besoin de lui.

« Ça vient ! Ça vient ! Désolé Crysoul ! »

Alors qu'il envoyait une bonne dose d'orthophosphate vers les racines de Crysoul, Casimir eu une révélation :

« Bon syncytium ! Mais c'est bien sûr ! »

Le lendemain, il convoqua tous les arbres et tous les champignons de la Forêternelle et leur fit part de sa théorie :

« Mes amis, l'heure est grave. J'ai découvert qu'au fur et à mesure que notre forêt grandissait, les arbres absorbaient de plus en plus de dioxyde de carbone pour fabriquer les molécules organiques qui nous sont indispensables. Nous, les champignons, recyclons une bonne partie de ce carbone, mais il en reste qui s'accumule sans relâche dans les troncs toujours plus grands et le sol toujours plus épais. L'atmosphère est donc de plus en plus pauvre en CO_2. Or, nous savons depuis mes travaux de doctorat en surfaçologie comparative que le climat de notre planète est en bonne partie contrôlé par la concentration atmosphérique en CO_2. C'est le fameux « effet Casimir ». Plus il y a de CO_2, plus il fait chaud, moins il y en a, plus il fait froid. Si nous ne faisons rien et que la concentration en CO_2 tombe sous un certain seuil, le système climatique risque de s'emballer et la Terre pourrait se couvrir de glace en quelques siècles ! »

Une secousse parcourut les troncs plusieurs fois millénaires. Dans quelques siècles… Autant dire demain ! Impressionnés par la démonstration de Casimir et par l'imminence du danger annoncé, les arbres et les champignons décidèrent de créer un groupe interspécifique de chercheurs, chargé d'étudier le problème du refroidissement climatique : le CRACCCCC (Comité de Recherche Arbres-Champignons sur les Causes et les Conséquences du Changement Climatique). Les chercheurs du CRACCCCC se mirent immédiatement au travail. Ils étudièrent en détails l'effet Casimir, les évolutions passées de la concentration en CO_2 atmosphérique, les risques liés à un refroidissement du climat… En trois lunes, ils eurent assemblé suffisamment d'éléments pour confirmer les craintes du satyre savant : le refroidissement avait bel et bien commencé, et, au rythme où grandissait la Forêternelle, les sols finiraient par geler en 743 ans, plus ou moins six mois.

Les conclusions du CRACCCCC provoquèrent une décharge de jasmonate dans toute la forêt. Les réseaux mycorhiziens ne parlaient que de ça. Même les plantes du sous-bois, qui d'habitude ne se mêlaient guère aux débats forestiers, finirent par être au courant. Elles avaient toutes les raisons d'être inquiètes, car le rapport du CRACCCCC précisait bien qu'elles seraient les premières victimes en cas de chutes de neige importantes. Menées par Yvette, une ivraie volutionnaire, plusieurs graminées demandèrent aux arbres d'arrêter de grandir pour laisser le temps aux champignons et aux animaux de remettre du CO_2 dans l'atmosphère. Mais les graminées étaient plus douées pour prendre de l'herbe que la parole, et la plupart d'entre elles étaient de toute façon shootées à la C4 ou au LSD. On les écouta poliment, puis on les renvoya à leurs pelouses pendant que les gens sérieux s'occupaient du problème. De toute façon, s'arrêter de grandir c'était prendre le risque que les voisins ne jouent pas le jeu. Et aucun arbre n'avait envie de finir à l'ombre en attendant les nettoyeurs… Non, ce n'était clairement pas une option envisageable. Heureusement les chercheurs du CRACCCCC avaient mis les bouchées doubles pour trouver une solution au problème, et bientôt, ils convièrent toute la Forêternelle pour présenter leur plan de sauvetage. C'est Pedro-Maria, un-e araucaria aimant bien faire l'original-e, qui prit la parole :

« Cher écosystème, le refroidissement climatique en cours est une menace comme jamais nous n'en avons connue auparavant. Mais rassurez-vous, travaillant nuits et jours sur le problème, mes collègues et moi avons mis au point une solution simple et imparable. Voyez-vous, le CO_2 n'est pas le seul gaz à effet Casimir, il en existe un autre, beaucoup, beaucoup, beaucoup plus puissant : le protoxyde d'azote, N_2O. Nous avons discuté avec les bactéries endogées, et, moyennant quelques retouches sur un ou deux plasmides, elles n'auraient aucune difficulté à produire du N_2O à partir d'un peu de nitrate ou d'ammonium. Le problème c'est que nous avons aussi besoin de nitrate et d'ammonium pour grandir, il a donc fallu trouver une source d'azote complémentaire. Eh bien, figurez-vous que notre atmosphère en est pleine ! Des kilomètres cubes de diazote à ne pas savoir qu'en faire. Nous avons fait appel à Henri Zobium et à son équipe de procaryotes, et ils sont rapidement parvenus à élaborer un procédé de rétroréduction quantique extrêmement prometteur pour transformer tout ce diazote en bel ammonium : la réaction de *Berboscha*. Il ne nous restait plus qu'à trouver un endroit pour installer tout ce petit monde. Nous avons tiré à court-poil, et c'est avec joie que nous vous annonçons que le grand honneur de sauver la Forêternelle revient aux… acacias ! »

Tout le monde leva les branches et les chapeaux pour saluer le discours de Pedro-Maria et les prouesses techniques du CRACCCCC. Les acacias de leur côté se regardaient un peu hagards, ne sachant trop ce qui les attendait. L'une d'eux demanda :

« Si j'ai bien compris, on héberge et on nourrit toutes ces bactéries pour qu'elles puissent transformer le diazote de l'air en ammonium, puis l'ammonium en protoxyde d'azote ?

— Exactement Laeticia ! Coup double ! répondit Pedro-Maria.

— Houlà ! Moi je veux bien, mais vous étannez pas si ça sent l'éthylène !

— Voilà qui est entendu. Nous commençons dès demain. »

Et c'est ainsi que les acacias – bientôt rejoints par toute la petite famille – associés à une ribambelle de bactéries ingénieuses, se mirent à produire du N_2O pour maintenir l'effet Casimir à un niveau optimal. Le climat redevint doux et agréable, les arbres s'élancèrent de plus belle vers les cieux, et la Forêternelle était, de l'avis de tous, plus resplendissante que jamais dans leurs rêves les plus fous. Même les Tom'bé – qui n'avaient évidemment rien panné du funeste destin auquel ils venaient d'échapper – avaient l'air particulièrement contents. En tout cas, ils passaient leur temps à rigoler, surtout quand ils allaient se promener sous les acacias.

Il s'écoula ainsi plusieurs siècles de paisible insouciance. Les arbres étaient toujours de plus en plus gros, de plus en plus grands. Ils dépassaient maintenant tous les plus hautes montagnes qui se soient jamais dressées sur Terre. Comme la Forêternelle grandissait, le CO_2 de l'atmosphère lui, continuait à diminuer. Mais Henri Zobium – qui avait entre temps été nommé chef en chef du dégazage – s'assurait que les quantités de protoxyde d'azote produites par les acacias et leurs bactéries compensaient exactement la baisse du CO_2. Le climat restait donc stable et propice à toutes les formes de vie. Cependant, malgré ces conditions favorables permanentes, quelque chose commença à changer dans la forêt. D'abord imperceptible. Seuls certains vieux arbres, qui se disaient vaguement fatigués. On mettait ça sur le compte d'une année un peu plus rude que les autres et on demandait à leurs champignons de leur faire une petite cure de magnésium. Ça passait vite. Mais petit à petit, le phénomène prit de l'ampleur. Au bout d'un certain temps, la plupart des arbres se sentirent faiblards, ils ne poussaient plus aussi bien qu'avant. Ils étaient de plus en plus nombreux à prendre du retard dans la grande course à la lumière, laissant les plus gros d'entre eux devenir chaque jour davantage menaçants. La situation continua à se dégrader, progressivement, si bien que gagner ne serait-ce qu'un petit centimètre par an devint un vrai défi. Et pourtant, jamais les champignons n'avaient fourni autant de nutriments à leurs partenaires. C'est simple, la Forêternelle stagnait, et personne ne comprenait pourquoi… Un jour, un petit rameau de l'année, tout chétif mais vaillant malgré tout dans sa phototropie naissante, demanda à sa branche-mère :

« Dis maman, qu'est-ce qu'on va manger quand il n'y aura plus de CO_2 dans l'air ? »

La branche-mère se creusa la moelle mais elle dut bien admettre son ignorance :

« C'est une bonne question ça mon petit bourgeon de phloème, mais tu sais, il est loin le temps de mes cours de physiologie, je vais demander à la branche-maîtresse. »

La branche-mère alla donc poser la question à la branche-maîtresse, qui se mit à son tour à réfléchir :

« Hum, quand il n'y aura plus de CO_2… Du méthane peut-être ? Ou alors on passera à une chimie du silicium ? Non, il doit y avoir plus simple quand même. Allons plutôt demander au tronc, il doit savoir ce genre de choses depuis le temps qu'il est planté là. »

La branche-maîtresse alla donc poser la question au tronc. Celui-ci répondit de sa voix lourde et craquelée :

« Aaaaah oui, la fin du carbone… Je me souviens… Quelqu'un avait posé la question au CRACCCCC à l'époque du grand refroidissement… Mais c'était il y a quelques siècles déjà, et ma mémoire commence à me jouer des tours… J'ai oublié tu vois, ça ne devait pas être très important. Allons quand même demander aux autres s'ils s'en rappellent. »

Le tronc alla donc poser la question aux troncs voisins et à ses champignons mycorhiziens. Vous vous doutez bien que, quelques jours plus tard, la question du petit rameau résonnait dans chaque feuille et chaque brindille de la Forêternelle. Mais on dut se rendre à l'évidence, personne n'avait la réponse. Personne ne savait ce que les arbres allaient bien pouvoir manger quand il n'y aurait plus de CO_2 dans l'air… Et là, les ennuis commencèrent. Un peu inquiets, les chercheurs du CRACCCCC – qui avaient pris quelques vacances bien méritées – se remirent au travail. Ils se rendirent vite compte que si la croissance des arbres était si faible, c'était parce que le CO_2 atmosphérique avait atteint des concentrations ridiculement basses, jamais vues dans l'histoire de la Terre. Pas le choix, il fallait que les champignons, les bactéries et les animaux s'activent pour dégrader un maximum de matière organique et ainsi libérer du CO_2. Malheureusement, il y avait un problème de taille. Avec tout le protoxyde d'azote que les acacias et leurs bactéries avaient balancé dans l'air pour lutter contre le refroidissement, rajouter du CO_2 provoquerait un surplus d'effet Casimir, autrement dit, un réchauffement du climat. Les modèles du CRACCCCC étaient catégoriques, ce réchauffement serait très rapide et aurait comme principale conséquence une sécheresse intense touchant l'ensemble de la Forêternelle. Et ça, la sécheresse, ce n'était vraiment pas une bonne nouvelle pour la forêt et ses habitants. Non décidément, il fallait trouver une autre solution. Dire aux arbres d'arrêter de grandir ? Non plus, c'était bien une idée de graminée ça. Si les arbres ne grandissaient plus ensemble, la compétition allait devenir beaucoup trop forte. Certains, les FAGAles, avaient d'ailleurs déjà pris le dessus. Des pacaniers immenses, tentaculaires, dont les feuilles captaient chaque murmure de la forêt. Des chênes massifs, prodigieusement prolifiques, dont les Tom'bé s'arrachaient les glands pour en faire des fétiches. On ne pouvait pas prendre le risque de les laisser dominer trop longtemps, passer à l'ombre serait le coup de grâce pour de nombreux arbres déjà affaiblis. Le CRACCCCC faisait face à un dilemme insoluble : sauver les arbres en relâchant du CO_2 mais subir derrière une sécheresse insoutenable ? Ou bien leur dire de se serrer la ceinture un moment, au risque que les FAGAles finissent par étouffer la majeure partie d'entre eux ? La situation semblait sans issue, et là-haut, le carbone se faisait de plus en plus rare.

Nul n'avait jamais vraiment fait attention à lui auparavant, un palmier comme les autres, plutôt discret et sans histoires. Quand Xénif vint voir les chercheurs du CRACCCCC et leur annonça qu'il avait la solution au problème du carbone, tous le regardèrent avec un mélange d'incrédulité, de c'est-pas-bientôt-fini-ces-blagues-de-mauvais-goût, et aussi, il faut bien le dire, d'un peu d'espoir. Xénif s'adressa au CRACCCCC en ces termes :

« Chercheurs, chercheuses, j'ai bien conscience du péril qui nous guette et, croyez-moi, je ne serais pas venu vous déranger si je n'étais pas sûr de pouvoir proposer quelque chose pour nous sortir de cette impasse. »

Silence dans le CRACCCCC.

« Voyez-vous, il y a parmi les plantes de sous-bois qui poussent à mon pied, une certaine Noetina Dmitrov. Une excentrique. Elle a décidé il y a bien longtemps de ne plus recourir à la photosynthèse, un vieux tabou végétiste d'après ce que j'ai compris. À la place, elle s'associe à nos champignons mycorhiziens, qui – bons princes – lui offrent quelques molécules carbonées qui suffisent à ses modestes besoins. Je ne sais pas trop pourquoi nos amis fongiques se prêtent à ce petit jeu, peut-être qu'elle s'occupe de menues besognes en échange, ou peut-être par simple charité, allez savoir ! Toujours est-il que cette Noetina Dmitrov (Xénif parlait bien sûr sans le savoir d'une petite mycohétérotrophe !), avec ses bizarreries, nous montre comment résoudre notre affaire. Il suffit que les champignons envoient directement aux arbres les molécules carbonées nécessaires à leur croissance. Le sol est littéralement truffé de matière organique, ça ne sera pas un problème, j'ai fait les calculs. Comme ça, pas besoin d'émettre du CO_2 et la forêt peut continuer à grandir ! »

Xénif n'en avait pas l'air, mais il fallait admettre qu'il était drôlement futaie pour une monocotylédone. Les chercheurs du CRACCCCC mirent un moment à assimiler l'ampleur de ce qu'ils venaient d'entendre. C'était trop beau pour être vrai, il devait y avoir une faille dans le raisonnement. Solonge, une oronge à qui on faisait pas prendre des vesses pour des entolomes, remarqua, pragmatique :

« La solution paraît réaliste et on pourrait la mettre en place dès aujourd'hui. C'est de toute façon la seule piste que nous ayons jusqu'à présent. Cependant, quelque chose me gène. D'habitude, ce sont nous, les champignons, qui récupérons une partie de votre carbone, et qui vous fournissons des nutriments. Là, on vous donnerait tout sans rien recevoir en échange ? Appelons un Tom'bé un Tom'bé, ça ne serait pas du parasitisme ce que vous nous proposez là ? »

Les autres champignons présents opinèrent du chapeau, ils n'allaient quand même pas réduire leur peuple à l'esclavage pour permettre aux arbres d'aller chatouiller le soleil ! Xénif avait de toute évidence anticipé l'objection :

« Du parasitisme ? Que la Forêternelle nous en préserve ! Bien sûr que non ! Vous ne feriez que nous *prêter* du carbone. Le temps simplement pour tous les arbres de sortir de la zone de déplétion carbonique. Une fois que nous aurons retrouvé du CO_2 dans les hautes strates sphériques, nous nous empresserons de vous rendre ce que vous nous avez prêté, et avec des intérêts ! J'ai appelé ce système *la datte*. »

Personne parmi les chercheurs du CRACCCCC n'avait entendu parler d'une prétendue zone de déplétion carbonique ou d'éventuelles hautes strates sphériques, mais personne, pas même Solonge, ne voulait passer pour un conocybe en demandant des précisions au palmier. D'ailleurs Xénif avait l'air tellement sûr de lui, et puis ses calculs étaient justes, et il avait même trouvé un nom sympa pour sa solution, alors bon, il fallait lui faire confiance.

Le lendemain, le CRACCCCC convoqua tous les arbres et les champignons pour leur expliquer le principe de la datte. Quelques uns comprirent, les autres étaient d'accord. De toute

façon, la situation était devenue invivable, il fallait absolument essayer la méthode de la petite Noetina Dmitrov. Les champignons se mirent donc à récupérer toutes les molécules organiques qui leur passaient à portée d'hyphes. Le sol en était effectivement bourré après tout ce temps à recevoir des feuilles mortes, des bout de bois de toutes tailles, des crottes d'animaux et des pluies de graines et de spores. Ils s'appliquaient à décomposer chaque petite particule d'humus afin d'en tirer le carbone si précieux et de le transmettre aux arbres. Rien de très compliqué, exactement comme l'avait expliqué Xénif, le système de la datte marchait du tonnerre. Le sol de la Forêternelle était en fait tellement riche, que le carbone abondait de toutes parts. C'était spectaculaire. Là-haut, tout redevenait possible. Les arbres rattrapèrent vite leur retard, côtoyant à nouveau les FAGAles d'égal à égal. Et à nouveau ils se synchronisèrent, pour monter ensemble, sans ombrage, vers les hautes strates sphériques. Le rythme était intense, il faut dire que la pénurie que les arbres avaient endurée avait laissé pas mal de troncs meurtris et de mauvais souvenirs. Tout le monde n'avait qu'une envie, les enterrer bien profondément sous d'épaisses couches de lignine. Alors ça y allait ! Ça je peux vous dire que ça y allait ! Besoin d'une nouvelle branche ? Augmentez la datte ! D'élargir la taille de votre stipe ? Augmentez la datte ! Un houppier plus vert que vert ? Augmentez la datte ! Plus de lipides dans vos thylakoïdes ? Augmentez la datte ! Augmentez la datte ! En réalité, on ne faisait même plus vraiment attention à ce qu'on faisait de tout ce carbone. Certains se paraient d'écorces sublimes, toutes subérifiées, qu'ils abandonnaient au bout d'un an pour en faire de nouvelles. D'autres avaient complètement laissé tomber la photosynthèse et essayaient tous les pigments possibles et imaginables : des anthocyanes, des caroténoïdes, des mélanines, et même des psittacofulvines pour les plus audacieux ! D'autres enfin, jouaient avec leurs voisins à celui qui ferait les plus gros fruits. Ils étaient bien entendu beaucoup trop haut maintenant pour que les animaux puissent venir les manger, mais ça les amusait beaucoup de les voir tomber et s'écraser au sol dans un barouf pas possible. Bref, autant vous dire qu'à l'époque de la datte, la Forêternelle avait une sacrée allure. Les Tom'bé eux, ne rigolaient plus vraiment et se cachaient dans des grottes pour éviter de se prendre une courge de trois tonnes sur la calebasse. Après plusieurs saisons de festin, les arbres avaient accumulé une datte astronomique. Mais quand les champignons leur demandaient :

« Alors, vous en sortez bientôt de la zone de déplétion ? »

Ou :

« Ça y est ? Vous apercevez les hautes strates sphériques ? »

Ils étaient bien en peine de leur répondre. Xénif, qui avait entre temps reçu la palme du Grand Sauveur, se montrait rassurant :

« Pas d'inquiétudes les amis, je sens qu'on se rapproche du but. Voyez comme la turbulence des couches exolimbiques s'est accentuée ? C'est le genre d'indice qui ne trompe pas ! »

Alors on continuait à lui faire confiance, après tout, c'était grâce à lui qu'on en était là. Enfin, il y en avait quand même parmi les champignons qui commençaient à grincer du mycélium. Solonge évidemment, en faisait partie. Elle alla voir Casimir le satyre savant. Vous vous souvenez ? C'était lui qui, le premier, avait alerté la forêt du risque de refroidissement climatique. Solonge se disait qu'avec lui et deux trois autres fongeux bien dans leur chapeau, ils allaient tirer au clair cette histoire de hautes strates sphériques. Le groupe de l'oronge se replongea dans les vieux écrits des

premiers champignons explorateurs : la bouillonnante *Olivina pangeanica*, dont les hyphes avaient traversé la lithosphère ; l'étonnant *Lichaenus symbiosis*, qui avait participé aux côtés des cyanobactéries à la Grande Sortie des Eaux, et qui y était retourné deux fois ; l'opiniâtre *Tintinia apollonza*, qui fut la première mycète à envoyer des spores dans l'espace… Ils recoupèrent les informations, posèrent de nouveaux calculs, firent appel à d'obscurs principes thermodynamiques oubliés depuis longtemps… Après toute une après-midi de dur labeur, leur conclusion ne laissait pas de place au doute : la zone de déplétion, les couches exolimbiques, le carbone promis, tout ça c'était du flan. Une vaste entourloupe. Tout ce qui attendait les arbres là-haut c'était le vide sidérostellaire, deux trois atomes d'hydrogène puis plus rien avant la prochaine supernova. Xénif s'était joué d'eux. La datte, abyssale, des arbres envers les champignons ne serait jamais remboursée.

Alors que la vérité apparaissait dans toute sa perfidie à Solonge et ses compères, celle-ci fulminait :

« Oh la raclure d'endoderme ! La sinistre adventice ! L'infect lusus ! Le rejet galeux de chancre suintant ! La glaire putréfiée de myxomycète ! Je vais aller mettre le sbeul dans sa rhizosphère, il va voir ce qu'il va voir, nom d'un gyromitre à basides !

— Du calme Solonge ! Du calme ! intervint Casimir. Pas la peine de s'exciter sur Xénif, nous avons mieux à faire. Il faut envoyer dès ce soir un message cryptogamé à toute la fonge pour les avertir. Nous déciderons demain des mesures à prendre, le chapeau froid, la colère est mauvaise conseillère. »

Le lendemain les chapeaux n'étaient pas froids du tout. La réunion de crise mycélienne interforestière se tint dans une clairière secrète, l'une des rares au sein de la Forêternelle. À l'abri des arbres. Et pour encore plus de sécurité, ils continuaient à se parler en crypto :

« Camarades champignons ! commença Solonge. Vous avez tous reçu l'information par vos réseaux : les arbres nous ont trahis ! Il n'y pas de hautes strates sphériques pleines de CO_2 ! Et la datte n'est qu'une fumisterie de palmiste bien huilée. Ce que nous sommes en train de vivre porte un nom : du parasitisme ! »

Huées dans la fonge. *Parasites ! Parasites !*

« Allons-nous rester les hyphes croisés à attendre du carbone qui ne viendra jamais ? Non, nous ne le resterons pas ! Allons-nous effacer d'un trait des années de spoliation ? De fausses promesses et de mensonges ? Non, nous ne l'effacerons pas ! Allons-nous nous soumettre encore longtemps au joug inique de ces tyrans de bois ? À leur folie des hauteurs ? À cette hubris ligno-célestrielle ? Non ! Nous ne nous soumettrons plus ! »

Clameurs dans la fonge. *Tyrans ! Parasites ! Hubris !* Les spores volaient dans tous les sens, Solonge s'enflammait :

« Mes amis, je ne vois pour nous qu'une seule issue honorable à cette histoire. Coupez les liens ! Définitivement. »

Vivats dans la fonge. Exaltée, elle scandait determinée :

« Cou-pons ! Cou-pons ! Cou-pons ! »

C'est alors qu'Amadou-vieux-sage, qui voyait la catastrophe arriver gros comme une domatie,

demanda la parole. C'était un vénérable nettoyeur, respecté de tous, et le silence se fit pour l'écouter :

« Champignons, mes chers amis, je partage votre colère. Mais ne nous fourvoyons pas, il y a d'autres chemins possibles. Coupons les liens, et les arbres ne tiendront pas dix jours. En quelques semaines, c'est la forêt entière qui s'effondre. Aussi légitime soit notre combat, nous ne pouvons pas prendre ce risque. Il faut aller mettre les arbres devant leurs responsabilités, porter nos revendications, négocier et trouver un accord, c'est la seule solution pour éviter un drame. La seule. »

La fonge était partagée. Amadou-vieux-sage n'avait pas tort. Personne ne voulait que la Forêternelle ne s'effondre. Mais Solonge revint à la charge :

« Amadou-vieux-sage a de justes paroles, mais il est malheureusement bien naïf ! Que croyez-vous camarades ? Que lorsque les arbres auront eu vent de nos revendications, ils s'y plieront, dociles comme le roseau ? Bien sûr que non ! Ils auront tôt fait de trouver un nouveau stratagème pour nous asservir. Quelques molécules bien conçues et nous serons piégés à nouveau. D'ailleurs, je suis prête à parier qu'ils ont déjà prévu le coup, qu'ils ont tout l'arsenal nécessaire derrière les fagots. Au moindre soupçon de mutinerie, hop ! Bons pour jouer les tuyaux jusqu'à ce que l'évolution nous donne des pattes. Non, il faut agir par surprise, dès aujourd'hui. Mettons leur un coup de pression, ils seront bien mûrs pour les négociations après trois jours de sevrage. Et rassure-toi Amadou, on se rebranchera avant que les problèmes n'arrivent. Mais seulement une fois en position de force. »

Solonge avait convaincu. La fonge dans sa grande majorité se prononça pour la décarbonation immédiate des arbres, le temps d'arriver à un accord équilibré. Amadou-vieux-sage avait réussi à tempérer un peu leur fougue vengeresse, mais, d'après sa vieille expérience en dendropsychologie, il était toujours inquiet. Très inquiet.

Ce que les arbres appelèrent par la suite la *Grande Salerie Fongique* commença donc le jour même. D'abord, il ne se passa rien. Le temps que les dernières molécules organiques montent jusqu'aux cimes, au-delà des nuages. Puis, les arbres se rendirent compte que quelque chose clochait. Ils demandèrent à leurs champignons d'appuyer sur l'accélérateur, mais en guise de réponse, ils reçurent ce message :

« Nous sommes en grève. Tant que nous n'aurons pas trouvé ensemble une solution au problème de la datte, le carbone restera sous terre. Nous viendrons négocier à la prochaine lune. »

Une vague de panique déferla sur la canopée. Sans carbone, fini les belles écorces de liège ! Fini les feuillages multicolores ! Fini les concours de drupes ! D'ailleurs, fini tout court. La peur, la colère, se mélangeaient dans les sèves, mais les arbres savaient bien qu'ils n'avaient pas le choix. Ils allaient devoir trouver un compromis. Lequel ? Nul ne le savait. Nul ne pouvait imaginer un monde où la forêt s'arrêtait de grandir. Enfin, c'était compter sans Xénif et ses idées lumineuses :

« Arbres ! Les champignons nous ont trahis ! Leur grève n'a aucune raison d'être. Tout ce qu'ils veulent, c'est augmenter les intérêts de la datte. Comme si elle n'était déjà pas assez grosse comme ça ! Allons-nous laisser ces grouillots chitineux nous imposer leur diktat ? Non, évidemment ! Montrons-leur plutôt de quel bois nous sommes faits ! Je vais vous dire la vérité mes amis, nous n'avons plus besoin des champignons. Regardez au dessus de vos feuilles, regardez comme notre

soleil est grand et majestueux ! Nous sommes à deux rameaux de conquérir l'espace ! Savez-vous ce que cela signifie ? Plus besoin de troncs, pour lutter contre cette pesanteur qui nous accable ! Plus besoin de racines, pour nous prévenir d'un coup de vent maraud et d'une mauvaise chute ! Plus besoin de fermer les stomates quand vient la nuit, puisque nous ne subirons plus l'ombrage quotidien et humiliant de notre planète ! Et bien sûr, plus besoin de ces champignons fielleux ! Imaginez… Imaginez cette vie dans l'infini cosmique. Cette liberté vertigineuse d'aller où bon nous semble. Ces étoiles innombrables à explorer. Nous récupérerons les poussières organiques des astéroïdes et nous boirons l'eau des comètes. Nous drageonnerons sans entraves et nos houppiers baigneront dans un zénith perpétuel. Mes amis ! Oublions les mycètes ! Notre avenir est là-haut, et nous avons bien assez de réserves dans nos rayons pour y parvenir. »

Le discours de Xénif embrasa la sylve. Les phéromones fusaient tous azimuts. *Liberté ! Zénith ! Stomates !* La callose vint obstruer les racines, claquemurant définitivement les arbres dans leur solitude. Les auxines se mirent à affluer, les méristèmes se multiplièrent, hors de tout contrôle, de partout les sèves, gorgées de sucres, convergèrent à l'extrémité des tiges. Et les arbres s'élancèrent comme jamais ils ne s'élancèrent, vers le plus beau des astres.

Bien entendu, les arbres n'atteignirent jamais l'espace. Les premiers à tomber furent les mikados, avec leurs troncs grêles et bariolés. Puis vint le tour des ailantes, des peupliers et des bambous, des cycas, des kapokiers et des banians, des pernamboucs, des érables et des sagoutiers… Les arbres s'entraînaient les uns les autres dans leurs chutes. Le fracas était épouvantable. Chaque tronc qui se brisait faisait trembler la terre. Les racines se soulevaient dans la chute, laissant dans le sol des cratères béants. Le bois mort s'accumulait, formant des montagnes de lignine et de cellulose. Lorsque vint la saison sèche, tout pris feu. Un brasier phénoménal, des flammes démesurées, se perdant dans une couche de fumée de plusieurs kilomètres d'épaisseur. Les troncs furent calcinés, les plantes du sous-bois réduites en cendres. Les Tom'bé priaient leurs glands fétiches pour être épargnés. L'incendie dégagea une telle quantité de CO_2, qu'immédiatement, le système climatique bascula. Les températures montèrent, la sécheresse s'intensifia, le sol se craquela sur toute sa profondeur. Les arbres qui avaient résisté jusque-là tombèrent à leur tour. Les sugis, les frênes et les flamboyants, les platanes, les durians et les eucalyptus, les baobabs, les cyprès et les palétuviers. Xénif, devenu sec comme un lichen, chuta lui aussi. Puis, ce fut le tour des FAGAles… Ces hêtres, ces noyers, ces aulnes titanesques. Ces châtaigniers et ces bouleaux qui s'étaient gavés de carbone pendant des siècles, qui s'étaient hissés si haut dans le ciel, là où nul être vivant n'avait jamais mis les cellules, qui avaient accumulé tellement de bois, de rameaux et de feuilles que les lois de la mécanique et de l'évolution n'avaient plus d'emprise sur eux. Les FAGAles, elles aussi, s'effondrèrent. Dans un dernier craquement, grave, lugubre, interminable… une onde de choc, qui balaya la Terre entière, provoquant séismes et tsunamis sur son passage. Puis, plus rien. Un silence de mort.

Les années passèrent, puis les siècles, les millénaires. Le CO_2 fut absorbé par les océans, le climat retrouva sa clémence d'autrefois. La Forêternelle n'était plus. À sa place, une terre nue, légèrement noire, des grands lacs, là où s'étaient jadis dressés les géants de bois, quelques rivières où l'on voyait de temps en temps patiner des gerris et vrombir des libellules. Puis, les premières

graines germèrent. Les hyphes des champignons revinrent des profondeurs. La photosynthèse n'avait pas changé de recette, et le sol regorgeait de minéraux. Il en va des forêts comme de ces filets d'eau courant les karsts. On les suit à la trace, ils se rejoignent et grossissent, puis, sans crier gare, disparaissent. Ce n'est qu'en nous éloignant un peu, en prenant de la hauteur sur le paysage, que l'on peut déceler ça et là, par quelques sapins isolés, quelques herbes hautes, les indices délicats d'une résurgence féconde. Bientôt un premier étagement vit le jour, une canopée modeste, quelques arbustes, un sous-bois touffu. Les arbres et les champignons s'étaient remis à collaborer, sans rien dire, comme si cela avait toujours été dans l'ordre des choses. Personne n'osait trop parler de ce qui s'était passé. La souffrance, la honte, les remords, l'envie d'oublier. Pourtant, il fallait bien aborder le sujet un jour ou l'autre. En tirer des leçons. C'est Amadou-jeune-cacou qui finit par prendre les choses en main, comme l'aurait sûrement fait son père. Il organisa une grande assemblée interdomaniale, invita les plantes, les algues, les champignons, les animaux, les autres eucaryotes bizarroïdes, les bactéries et même les archées les plus extrêmes, qui n'avaient rien remarqué de particulier ces trois derniers milliards d'années et ne comprenaient pas trop ce qu'elles faisaient là, mais si ça peut rendre service… Amadou-jeune-cacou raconta à ceux qui l'ignoraient, l'histoire de la Forêternelle, de sa grandeur et de sa chute, comme on la lui avait racontée au plus profond du sous-sol, pendant l'ère mikado. Lorsqu'il eut terminé, on décida de fixer une limite à la croissance des arbres, afin que plus jamais la Terre ne connaisse telle débâcle. On essaya de répartir équitablement les tailles entre les espèces, pour que chacune trouve sa strate. On en profita pour laisser un peu de soleil aux plantes du sous-bois à certaines périodes de l'année. Et tant qu'on y était, on révisa à la hausse les conditions d'hébergement des fourmis et des acariens. La famille des acacias était finalement très contente de ses bactéries fixatrices d'azote, et réciproquement. L'union fut validée, en ayant quand même pris soin de renvoyer dans le sol les bactéries qui fabriquaient du N_2O. Le sort de la symbiose mycorhizienne, à l'origine de cette tragédie, était quant à lui incertain. Pourtant, c'est à l'unanimité qu'arbres et champignons décidèrent de continuer à s'entraider – enfin, à part les divers saprotrophes et parasites, mais eux ça comptait pas vraiment pour le vote. On rajouta juste une règle de tannin : laisser à Noetina Dmitrov – et à elle seule ! – la possibilité de demander de temps en temps, un peu de carbone à ses champignons. Pour sceller cette alliance, Amadou-jeune-cacou se mit à faire la toupie d'utopie, une danse très populaire chez les mycètes. Il y mit tellement d'enthousiasme que, sous l'effet de la force centrifuge, des morceaux de son chapeau se détachèrent et s'envolèrent loin à l'horizon, ce qui fit beaucoup rire Amadou-jeune-cacou et le reste de l'assemblée. L'un des morceaux atterrit au milieu d'une bande de Tom'bé en pleine bataille de cailloux – ils avaient survécu par on ne sait quel miracle à l'ère mikado. Lorsque les pierres s'entrechoquèrent, et que le bout d'Amadou s'enflamma, les Tom'bé s'arrêtèrent net, et, curieux, s'approchèrent de cette douce chaleur.

ANNEXES

Annexe I

Synthèse des données sur la nutrition des Neottieae

Genre [a]	Espèce [a]	Symbiontes [a]	Signature isotopique [a]	Génome plastidial [a]
Aphyllorchis	***caudata***	Roy *et al.* (2009)	Roy *et al.* (2009)	
	montana	Roy *et al.* (2009)	Roy *et al.* (2009)	**Feng *et al.* (2016)**
Cephalanthera	*damasonium*	Bidartondo *et al.* (2004) Bidartondo et Read (2008)	Gebauer et Meyer (2003) Liebel *et al.* (2010) Preiss *et al.* (2010) Gebauer *et al.* (2016)	**Article VI**
	erecta	Matsuda *et al.* (2009) Sakamoto *et al.* (2016a)	Motomura *et al.* (2010) Sakamoto *et al.* (2016b)	
	erecta f subaphylla	Sakamoto *et al.* (2016a)	Sakamoto *et al.* (2016b)	
	exigua	Roy *et al.* (2009)	Roy *et al.* (2009)	
	falcata	Matsuda *et al.* (2009) Sakamoto *et al.* (2016a)	Sakamoto *et al.* (2016b)	
	humilis			**Feng *et al.* (2016)**
	longibracteata	Sakamoto *et al.* (2015)	Sakamoto *et al.* (2016b) Données non publiées [b]	**Article VI**
	longifolia	Abadie *et al.* (2006) Bidartondo et Read (2008) Liebel *et al.* (2010) Sakamoto *et al.* (2016a)	Abadie *et al.* (2006) Liebel *et al.* (2010) Sakamoto *et al.* (2016b)	Feng *et al.* (2016)
	rubra	Bidartondo *et al.* (2004) Schiebold *et al.* (2017b)	Gebauer et Meyer (2003) Preiss *et al.* (2010) Gebauer *et al.* (2016) Schiebold *et al.* (2017b)	**Article VI**
Epipactis	*albensis*	Těšitelová *et al.* (2012) Gonneau *et al.* (2014)	Gonneau *et al.* (2014)	**Article VI**
	atrorubens	Bidartondo *et al.* (2004) Bidartondo et Read (2008) Shefferson *et al.* (2008) Těšitelová *et al.* (2012)	Bidartondo *et al.* (2004) Tedersoo *et al.* (2007) Gebauer *et al.* (2016) **Article III**	**Article VI**
	dunensis	Bidartondo et Read (2008)		
	gigantea	Bidartondo *et al.* (2004)	Zimmer *et al.* (2007) Schiebold *et al.* (2017a)	**Article VI**
	helleborine	Ogura-Tsujita et Yukawa (2008) Liebel *et al.* (2010) Těšitelová *et al.* (2012) Jacquemyn *et al.* (2016) Schiebold *et al.* (2017a)	Bidartondo *et al.* (2004) Abadie *et al.* (2006) Liebel *et al.* (2010) Těšitelová *et al.* (2015) Schiebold *et al.* (2017a)	**Article VI**
	helleborine subsp neerlandica	Jacquemyn *et al.* (2016) **Article IV**	**Article IV**	
	leptochila	Schiebold *et al.* (2017a)	Hynson *et al.* (2016)	
	mairei			Feng *et al.* (2016)

Genre [a]	Espèce [a]	Symbiontes [a]	Signature isotopique [a]	Génome plastidial [a]
Epipactis	*microphylla*	Selosse *et al.* (2004) Schiebold *et al.* (2017a)	Schiebold *et al.* (2017a)	**Article VI**
	muelleri	Schiebold *et al.* (2017a)	Schiebold *et al.* (2017a)	
	palustris	Bidartondo *et al.* (2004) Jacquemyn *et al.* (2016) **Article IV**	Bidartondo *et al.* (2004) **Article IV**	
	purpurata	Těšitelová *et al.* (2012) Schiebold *et al.* (2017a)	Schiebold *et al.* (2017a)	
	veratrifolia			Feng *et al.* (2016)
Limodorum	*abortivum*	Liebel *et al.* (2010)	Liebel *et al.* (2010)	**Article VI**
	trabutianum	Liebel *et al.* (2010)	Liebel *et al.* (2010)	
Neottia	***acuminata***	Yagame *et al.* (2016)		**Feng *et al.* (2016)**
	camtschatea	Těšitelová *et al.* (2015)		**Feng *et al.* (2016)**
	cordata	Těšitelová *et al.* (2015) Yagame *et al.* (2016) Schiebold *et al.* (2017b)	Těšitelová *et al.* (2015) Schiebold *et al.* (2017b)	**Article VI**
	fugongensis			Feng *et al.* (2016)
	furusei	Yagame *et al.* (2016)	Données non publiées [b]	
	inagakii	Yagame *et al.* (2016)	Données non publiées [b]	
	japonica	Yagame *et al.* (2016)	Données non publiées [b]	
	kiusiana	Yagame *et al.* (2016)		
	listeroides			**Feng *et al.* (2016)**
	makinoana	Yagame *et al.* (2016)	Données non publiées [b]	
	nidus-avis	Selosse *et al.* (2002) Těšitelová *et al.* (2015) Yagame *et al.* (2016)	Gebauer et Meyer (2003) Schiebold *et al.* (2017b)	**Logacheva *et al.* (2011)**
	nipponica	Yagame *et al.* (2016)		
	ovata	Jacquemyn *et al.* (2015) Těšitelová *et al.* (2015)	Gebauer et Meyer (2003) Abadie *et al.* (2006) Tedersoo *et al.* (2007) Liebel *et al.* (2010) Těšitelová *et al.* (2015) Gebauer *et al.* (2016)	Feng *et al.* (2016)
	papilligera	Yagame *et al.* (2016)	Données non publiées [b]	
	pinetorum			Feng *et al.* (2016)
	puberula	Yagame *et al.* (2016)	Données non publiées [b]	
Palmorchis	*pabstii*			**Article VI**

[a] **Légende**

	Rhizoctonias	^{13}C = autotrophes	Intact
Absence de chlorophylle	Ectomycorhiziens	^{13}C > autotrophes	**Photosynthèse altérée**

[b] Données isotopiques non publiées issues d'une collaboration avec Tomohisha Yukawa (Japon)

Annexe II

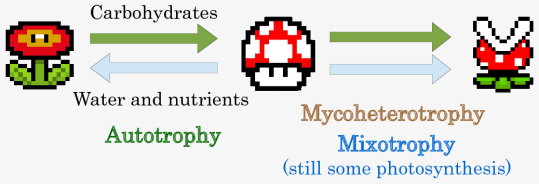
Poster présenté à la neuvième
International Conference on Mycorrhiza (ICOM 9)
s'étant tenue à Prague du 30 juillet au 4 août 2017

The evolution of mixotrophy in Ericaceae

Félix Lallemand[1], Myriam Gaudeul[1], Josie Lambourdière[1], Ülle Püttsepp[2], Pierre-Emmanuel Courty[3], Marc-André Selosse[1,4]

Contact: felix.lallemand@ens-lyon.org

[1] Institut de Systématique, Évolution, Biodiversité (ISYEB), UMR 7205 CNRS MNHN UPMC EPHE, Muséum national d'Histoire naturelle, Sorbonne Universités, 57 rue Cuvier, CP39, 75005 Paris, France ; [2] Institute of Agricultural and Environmental Sciences, Estonian University of Life Sciences, Street Kreutzwaldi 5, 51014, Tartu, Estonia ; [3] Agroécologie, AgroSupDijon, CNRS, INRA, Université de Bourgogne Franche-Comté, 21000 Dijon, France ; [4] Department of Plant Taxonomy and Nature Conservation, University of Gdansk, ul. Wita Stwosza 59, 80-308 Gdańsk, Poland



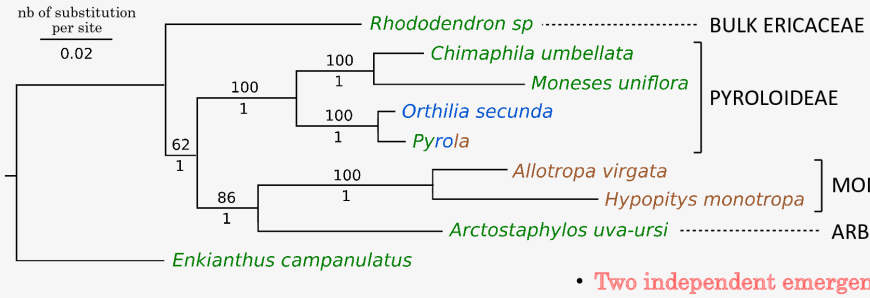
► Mixotrophy, an evolutionary step towards mycoheterotrophy?

Ericaceae

Close relatives with contrasting nutritions

Unclear phylogeny

How does the balance between fungal and photosynthetic C vary?



Combined analysis of three nuclear loci: ITS, 28S and PHYA. ML bootstraps (1000 rep) above and bayesian posterior probabilities below

Phylogenetic background

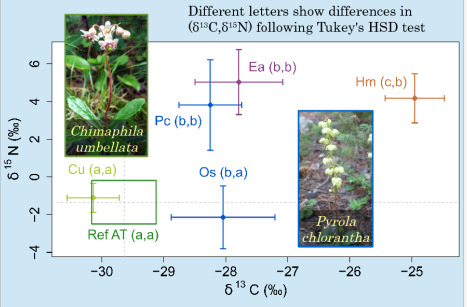
Lallemand et al. 2016. *New Phytologist*, 212:314-319

- Two independent emergences of mycoheterotrophy
- Adaptation to dark environments
- Some predispositions in the common ancestor?

How plastic is mixotrophy?

Lallemand et al. 2017. *Annals of Botany*, in press

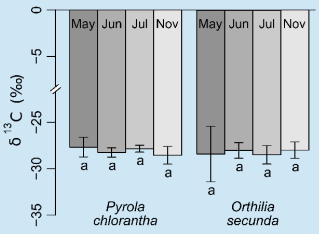
Estimating heterotrophy level with stable isotopes



• The highest ^{13}C abundance, the more C from mycorrhizal fungi

Mixotrophy does not vary with phenology

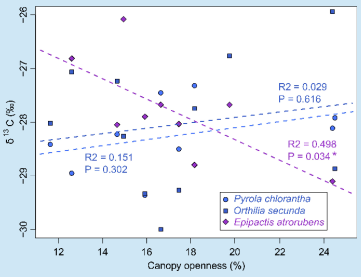
► More C from photosynthesis towards the end of the growing season?



• No variation along the growing season in pyroloids, contrasting with mixotrophic orchids

Mixotrophy does not vary with light availability

► More C from mycorrhizal fungi under low light levels?



• No increase in heterotrophy level in shade for pyroloids, contrasting with mixotrophic orchids, such as here *Epipactis atrorubens*

Pyroloids differ from mixotrophic orchids by a more static fungal exploitation.

One caveat: isotopes do not give information about the *net* flow.

The "C-exchanger" hypothesis

Thanks to the New Phytologist Trust for its financial support to attend the congress and to the Service de Systématique Moléculaire (UMS 2700) for their technical support

Annexe III

Article de vulgarisation sur la mycohétérotrophie publié sur le site naturaliste *Le Saule Causeur*

https://saulecauseur.org/le-mystere-des-orchidees-albinos/

Cephalanthera damasonium dans sa tenue de tous les jours.

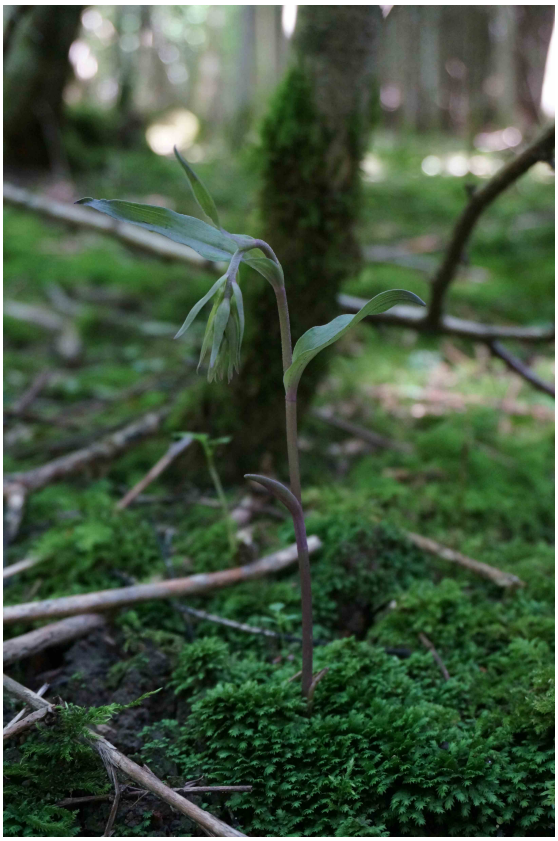
Aux oreilles des non-botanistes, le mot « orchidée » évoque souvent d'exotiques créatures aux mœurs exubérantes, une image relayée par les innombrables *Phalaenopsis* et autres *Cymbidium* vendues par les fleuristes. Pourtant, avec plus de 120 espèces, cette famille se rencontre facilement sur le territoire métropolitain. Beaucoup moins commun en revanche, certaines de ces orchidées dévoilent en de rares occasions un aspect étonnant de leur personnalité aux promeneurs chanceux. Une curiosité unique dans le monde végétal que le Saule vous invite à découvrir…

Prenons la Céphalanthère de Damas (*Cephalanthera damasonium*) ci-dessus, une orchidée de sous-bois qui ressemble à n'importe quelle plante. Sauf que, de temps en temps, émergent dans une population des individus pour le moins excentriques !

Blanc-crème, l'intégral. Une petite révolution dans l'univers de la mode végétale.

Immaculé des pieds à la tête, on a ici affaire à un véritable albinos. Basta chlorophylla, le pigment officiel des prairies, forêts et autres écosystèmes à l'abondante verdure est étrangement absent… Le résultat est chez notre Céphalanthère, cet aspect fantomatique lui donnant l'air d'un esprit des bois (et ce n'est pas Montesquieu qui dirait le contraire). Chez d'autres espèces en revanche, l'absence de chlorophylle laisse le champ libre à d'autres pigments, notamment des anthocyanes, qui n'en attendent pas moins pour exprimer leur propre sensibilité chromatique. Le terme « albinos » n'est alors plus vraiment approprié. Voyez plutôt.

Epipactis helleborine verte (à droite) et blanche. Les anthocyanes donnent à la tige cette couleur violet peu ordinaire.



Epipactis pupurata classique, on peut déjà deviner ce qui se cache sous la chlorophylle…

Epipactis purpurata, forme *rosea*. Éclatant délire pigmentaire !

Ces histoires de pigments ne sont pas sans rappeler ce qui se passe à l'automne dans les feuilles des arbres !

Tout cela est certes fort joli, mais, n'y a-t-il pas quelque chose qui vous chiffonne ? Sans chlorophylle, pas de photosynthèse, donc rien à se mettre sous la dent. En dehors de ces orchidées particulières, une mutation touchant à la synthèse de la chlorophylle est immédiatement létale, la plante étant incapable de se nourrir. Il y en a bien certaines comme les orobanches ou les cuscutes qui sont naturellement dépourvues de l'illustre pigment vert (ça ne vous rappelle rien ?), mais c'est le résultat d'un long processus évolutif, d'une spécialisation poussée vers un mode de vie parasite. Ici, nos orchidées sont vertes dans l'immense majorité des cas, faire de la photosynthèse constitue donc leur pain quotidien, et pourtant, lorsqu'il leur manque un maillon essentiel de cette réaction complexe, elle survivent et parviennent même à fleurir et à produire des graines. Alors ? Quel secret se cache derrière leur blancheur ?

La réponse va venir d'une autre orchidée de nos forêts : la Néottie nid d'oiseau (*Neottia nidus-avis*).

Neottia nidus-avis, vu sa dégaine, on se doute qu'il y a entourloupe !

Comme les plantes parasites que nous évoquions, la Néottie est naturellement dépourvue de chlorophylle, on s'attendrait donc à retrouver chez cette orchidée un mode de vie similaire où la plante colonise les tissus des voisines pour en détourner la sève et ses précieux sucres. Sauf que, rien de tout cela chez la Néottie, ses racines charnues forment un entrelacs compact (lui ayant donné son nom) et ne vont pas s'immiscer dans l'intimité d'autrui. C'est même plutôt l'inverse ! Quand on y regarde de plus près (au microscope par exemple), on peut voir que les cellules des racines de la Néottie sont abondamment colonisées par des filaments de champignons. Il s'agit d'une association

que l'on retrouve chez la grande majorité des plantes terrestres et que l'on appelle « mycorhize » (de *myco* : champignon et *rhiza* : racine). Le fonctionnement classique d'une mycorhize est le suivant : le champignon explore un grand volume de sol grâce à son mycélium (l'ensemble des filaments) et fournit à la plante de l'eau et des sels minéraux, la plante utilise ces ressources lors de la photosynthèse et le champignon récupère une partie des sucres ainsi produits. Un deal gagnant-gagnant en somme. Pourtant, nous l'avons vu, la Néottie ne s'embarrasse pas avec ces histoires de photosynthèse et ce n'est clairement pas chez elle que les champignons vont trouver pitance. Mieux vaut pour eux aller sonner chez des partenaires plus arrangeants, les arbres par exemple. Avec eux, pas de lézard, leur feuillage est une véritable usine à sucre, très gourmande en eau et en nutriments. Les champignons sont donc non seulement bienvenus, mais indispensables pour répondre à une telle demande, en témoignent la profusion de mycorhizes que l'on peut observer sur les racines des arbres.

Ces jeunes fructifications d'amanite tue-mouches (*Amanita muscaria*), un champignon mycorhizien, se développent grâce aux sucres issues des arbres voisins.

Récapitulons, les arbres produisent des sucres par photosynthèse et en fournissent une partie à leurs partenaires souterrains : les champignons mycorhiziens. La Néottie forme elle aussi des mycorhizes avec ces mêmes champignons et récupère à son tour des sucres qu'elle utilise pour se développer. Est-ce que les champignons reçoivent quelque chose en échange ? Pour l'instant rien ne semble l'indiquer, mais la question est loin d'être tranchée !

Avec tout ça, le secret de nos orchidées mutantes est levé. Les albinos et autres raretés sans chlorophylle se nourrissent exactement comme la Néottie, elles extorquent sans concessions (en apparence du moins) leurs moyens de subsistance à de pauvres hères fongiques habitués à des voisins plus urbains. Et les individus « normaux », sous leurs airs d'honnêtes chlorobiontes, ne sont pas en reste ! Eux aussi prennent part à cet obscur racket. En effet, la plupart des orchidées chez lesquelles on retrouve des individus achlorophylliens sont des espèces de sous-bois où la luminosité

est très faible et la photosynthèse peu efficace (plus sur les plantes de sous-bois). Elles compensent donc naturellement cette faible productivité grâce aux sucres qu'elles obtiennent de leurs champignons mycorhiziens, une stratégie mixte en quelque sorte, et un bel exemple d'adaptation à un milieu où la lumière est le principal facteur limitant.

Epipactis purpurata lorgnant goulûment sur la chanterelle à ses pieds. Même si cette plante fait toujours un peu de photosynthèse, elle complémente ses besoins en sucres grâce aux champignons alentours. Crédit photo : Henri Mathé

En guise de conclusion, les champignons mycorhiziens, en s'associant à plusieurs partenaires, sont à l'origine d'un véritable réseau d'interactions. Bien que la majorité des organismes impliqués dans ce réseau soit dans la réciprocité (ils échangent une ressource contre une autre), certains aigrefins profitent de l'aubaine pour se livrer à quelques détournements de fonds. C'est le cas de nos orchidées ayant perdu leur capacité photosynthétique au gré de l'évolution (chez la Néottie) ou suite à un rare accident génétique (chez les Épipactis et les Céphalanthères « albinos »). Mais n'allez pas croire que les champignons sont condamnés à être les dindons chitineux de la farce, nombre d'entre eux peuvent aussi dans certains cas profiter du réseau mycorhizien sans pour autant en supporter les coûts. Comme souvent, ces relations à bénéfices réciproques sont instables et dynamiques. L'émergence de « tricheurs » qui en tirent parti sans payer le coût de la collaboration est quasiment inévitable car la survie et les capacités reproductrices de ces derniers sont alors meilleures. Néanmoins, trop de tricheurs et le système s'effondre… Des mécanismes limitant leur prolifération ont par conséquent accompagné l'évolution des réseaux mutualistes que l'on observe aujourd'hui et permis leur stabilité sur le long terme. Mais là il nous faudrait un autre article !

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abadie J-C, Püttsepp Ü, Gebauer G, Faccio A, Bonfante P, Selosse M-A (2006) *Cephalanthera longifolia* (Neottieae, Orchidaceae) is mixotrophic: a comparative study between green and nonphotosynthetic individuals. *Can J Bot* **84**: 1462–1477

APG (2009) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Bot J Linn Soc* **161**: 105–121

Aschan G, Pfanz H (2003) Non-foliar photosynthesis – a strategy of additional carbon acquisition. *Flora* **198**: 81–97

Augé RM (2001) Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* **11**: 3–42

Babikova Z, Gilbert L, Bruce TJA, Birkett M, Caulfield JC, Woodcock C, *et al.* (2013) Underground signals carried through common mycelial networks warn neighbouring plants of aphid attack. *Ecol Lett* **16**: 835–843

Barrett CF, Davis JI (2012) The plastid genome of the mycoheterotrophic *Corallorhiza striata* (Orchidaceae) is in the relatively early stages of degradation. *Am J Bot* **99**: 1513–1523

Barrett CF, Freudenstein JV, Li J, Mayfield-Jones DR, Perez L, Pires JC, *et al.* (2014) Investigating the path of plastid genome degradation in an early-transitional clade of heterotrophic orchids, and implications for heterotrophic angiosperms. *Mol Biol Evol* **31**: 3095–3112

Barto EK, Hilker M, Müller F, Mohney BK, Weidenhamer JD, Rillig MC (2011) The fungal fast lane: common mycorrhizal networks extend bioactive zones of allelochemicals in soils. *PLOS ONE* **6**: e27195

de Bary A (1879) *Die Erscheinung der Symbiose*. Trübner: Strassburg.

Beau C (1920) Sur le rôle trophique des endophytes d'Orchidées. *C-R Hebd Sc Acad Sci* **171**: 675–677

Bellino A, Alfani A, Selosse M-A, Guerrieri R, Borghetti M, Baldantoni D (2014) Nutritional regulation in mixotrophic plants: new insights from *Limodorum abortivum*. *Oecologia* **175**: 875–885

Bernard N (1899) Sur la germination du *Neottia nidus-avis*. *C-R Hebd Sc Acad Sci* **128**: 1253–1255

Bernard N (1909) L'évolution dans la symbiose. Les orchidées et leurs champignons commensaux. In: van Tieghem P (ed) *Annales des Sciences Naturelles : Botanique*, Masson et Cie: Paris Vol 9

Bidartondo MI, Bruns TD (2001) Extreme specificity in epiparasitic Monotropoideae (Ericaceae): widespread phylogenetic and geographical structure. *Mol Ecol* **10**: 2285–2295

Bidartondo MI, Redecker D, Hijri I, Wiemken A, Bruns TD, Domínguez L, *et al.* (2002) Epiparasitic plants specialized on arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* **419**: 389–392

Bidartondo MI, Burghardt B, Gebauer G, Bruns TD, Read DJ (2004) Changing partners in the dark: isotopic and molecular evidence of ectomycorrhizal liaisons between forest orchids and trees. *Proc Royal Soc B* **271**: 1799–1806

Bidartondo MI, Read DJ (2008) Fungal specificity bottlenecks during orchid germination and development. *Mol Ecol* **17**: 3707–3716

Björkman E (1960) *Monotropa hypopitys* L. – an epiparasite on tree roots. *Physiol Plant* **13**: 308–327

Bolin JF, Tennakoon KU, Majid MBA, Cameron DD (2017) Isotopic evidence of partial mycoheterotrophy in *Burmannia coelestis* (Burmanniaceae). *Plant Species Biol* **32**: 74–80

Bonfante P, Genre A (2008) Plants and arbuscular mycorrhizal fungi: an evolutionary-developmental perspective. *Trends Plant Sci* **13**: 492–498

Bonfante P, Genre A (2015) Arbuscular mycorrhizal dialogues: do you speak 'plantish' or 'fungish'? *Trends Plant Sci* **20**: 150–154

Bougher NL, Grove TS, Malajczuk N (1990) Growth and phosphorus acquisition of karri (*Eucalyptus diversicolor* F. Muell.) seedlings inoculated with ectomycorrhizal fungi in relation to phosphorus supply. *New Phytol* **114**: 77–85

Bougoure JJ, Dearnaley JDW (2005) The fungal endophytes of Dipodium variegatum (orchidaceae). *Aust Mycol* **24**: 15–19

Bougoure JJ, Brundrett MC, Grierson PF (2010) Carbon and nitrogen supply to the underground orchid, *Rhizanthella gardneri*. *New Phytol* **186**: 947–956

Braukmann T, Stefanović S (2012) Plastid genome evolution in mycoheterotrophic Ericaceae. *Plant Mol Biol* **79**: 5–20

Bréda N, Maillard P, Montpied P, Bréchet C, Garbaye J, Courty P-E (2013) Isotopic evidence in adult oak trees of a mixotrophic lifestyle during spring reactivation. *Soil Biol Biochem* **58**: 136–139

Brundrett MC (2009) Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant Soil* **320**: 37–77

Bücking H, Mensah JA, Fellbaum CR (2016) Common mycorrhizal networks and their effect on the bargaining power of the fungal partner in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Commun Integr Biol* **9**: e1107684

Cameron DD, Leake JR, Read DJ (2006) Mutualistic mycorrhiza in orchids: evidence from plant-fungus carbon and nitrogen transfers in the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. *New Phytol* **171**: 405–416

Cameron DD, Johnson I, Read DJ, Leake JR (2008) Giving and receiving: measuring the carbon cost of mycorrhizas in the green orchid, *Goodyera repens*. *New Phytol* **180**: 176–184

Cameron DD, Preiss K, Gebauer G, Read DJ (2009) The chlorophyll-containing orchid *Corallorhiza trifida* derives little carbon through photosynthesis. *New Phytol* **183**: 358–364

Cameron DD, Bolin JF (2010) Isotopic evidence of partial mycoheterotrophy in the Gentianaceae: *Bartonia virginica* and *Obolaria virginica* as case studies. *Am J Bot* **97**: 1272–1277

Cha J, Igarashi T (1995) *Armillaria* species associated with *Gastrodia elata* in Japan. *Eur J For Path* **25**: 319–326

Cha JY, Igarashi T (1996) *Armillaria jezoensis*, a new symbiont of *Galeola septentrionalis* (Orchidaceae) in Hokkaido. *Mycoscience* **37**: 21–24

Chase MW, Cameron KM, Freudenstein JV, Pridgeon AM, Salazar G, van den Berg C, *et al.* (2015) An updated classification of Orchidaceae. *Bot J Linn Soc* **177**: 151–174

Coleman RA (1995) *The Wild Orchids of California*. Cornell University Press: Ithaca.

Courty P-E, Buee M, Diedhiou AG, Frey-Klett P, Le Tacon F, Rineau F, *et al.* (2010) The role of ectomycorrhizal communities in forest ecosystem processes: new perspectives and emerging concepts. *Soil Biol Biochem* **42**: 679–698

Courty P-E, Walder F, Boller T, Ineichen K, Wiemken A, Rousteau A, *et al.* (2011) Carbon and nitrogen metabolism in mycorrhizal networks and mycoheterotrophic plants of tropical forests: a stable isotope analysis. *Plant Physiol* **156**: 952–961

Dearnaley J (2006) The fungal endophytes of *Erythrorchis cassythoides* - is this orchid saprophytic or parasitic? *Austral Mycol* **25**: 51–57

Dearnaley JDW, Le Brocque AF (2006) Molecular identification of the primary root fungal endophytes of *Dipodium hamiltonianum* (Orchidaceae). *Aust J Bot* **54**: 487–491

Dearnaley JDW, Martos F, Selosse M-A (2012) Orchid mycorrhizas: molecular ecology, physiology, evolution and conservation aspects. In: Hock B (ed) *Fungal Associations*, The Mycota (A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research). Springer, Berlin, Heidelberg Vol 9, pp 207–230

Dearnaley J, Perotto S, Selosse M-A (2016) Structure and development of orchid mycorrhizas. In: Martin F (ed) *Molecular Mycorrhizal Symbiosis*, Wiley-Blackwell, pp 63–86

Deniro MJ, Schoeniger MJ (1983) Stable carbon and nitrogen isotope ratios of bone collagen: Variations within individuals, between sexes, and within populations raised on monotonous diets. *J Archaeol Sci* **10**: 199–203

Eriksson O, Kainulainen K (2011) The evolutionary ecology of dust seeds. *Perspect Plant Ecol Syst* **13**: 73–87

Farquhar GD, Ehleringer JD, Hubick KT (1989) Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **40**: 503–537

Fellbaum CR, Mensah JA, Cloos AJ, Strahan GE, Pfeffer PE, Kiers ET, *et al.* (2014) Fungal nutrient allocation in common mycorrhizal networks is regulated by the carbon source strength of individual host plants. *New Phytol* **203**: 646–656

Feng Y-L, Wicke S, Li J-W, Han Y, Lin C-S, Li D-Z, *et al.* (2016) Lineage-specific reductions of plastid genomes in an orchid tribe with partially and fully mycoheterotrophic species. *Genome Biol Evol* **8**: 2164–2175

Ferriere R, Bronstein JL, Rinaldi S, Law R, Gauduchon M (2002) Cheating and the

evolutionary stability of mutualisms. *Proc Biol Sci* **269**: 773–780

Finlay RD, Frostegård Å, Sonnerfeldt A-M (1992) Utilization of organic and inorganic nitrogen sources by ectomycorrhizal fungi in pure culture and in symbiosis with *Pinus contorta* Dougl. ex Loud. *New Phytol* **120**: 105–115

Fochi V, Chitarra W, Kohler A, Voyron S, Singan VR, Lindquist EA, *et al.* (2017) Fungal and plant gene expression in the *Tulasnella calospora–Serapias vomeracea* symbiosis provides clues about nitrogen pathways in orchid mycorrhizas. *New Phytol* **213**: 365–379

France RC, Reid CPP (1984) Pure culture growth of ectomycorrhizal fungi on inorganic nitrogen sources. *Microb Ecol* **10**: 187–195

Frank AB (1877) Über die biologischen Verhältnisse des Thallus einiger Krustenflechten. *Beitr Biol Pflanz* **2**: 123–200

Frank AB (1885) Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze. *Ber Dtsch Bot Ges* **3**: 128–145

Frank AB (1892a) Die Ernährung der Kiefer durch ihre Mykorhizapilze. *Ber Dtsch Bot Ges* **10**: 577–583

Frank AB (1892b) *Lehrbuch der Botanik*. Engelmann: Leipzig.

Franke T, Beenken L, Döring M, Kocyan A, Agerer R (2006) Arbuscular mycorrhizal fungi of the *Glomus*-group A lineage (Glomerales; Glomeromycota) detected in myco-heterotrophic plants from tropical Africa. *Mycol Progress* **5**: 24–31

Garbaye J (2013) *La symbiose mycorhizienne. Une association entre les plantes et les champignons*. Quae.

Gardes M (2002) An orchid-fungus marriage-physical promiscuity, conflict and cheating. *New Phytol* **154**: 4–7

Gebauer G, Meyer M (2003) ^{15}N and ^{13}C natural abundance of autotrophic and myco-heterotrophic orchids provides insight into nitrogen and carbon gain from fungal association. *New Phytol* **160**: 209–223

Gebauer G, Preiss K, Gebauer AC (2016) Partial mycoheterotrophy is more widespread among orchids than previously assumed. *New Phytol* **211**: 11–15

Gianinazzi-Pearson V (1996) Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: getting to the roots of the symbiosis. *Plant Cell* **8**: 1871–1883

Girlanda M, Selosse M-A, Cafasso D, Brilli F, Delfine S, Fabbian R, *et al.* (2006) Inefficient photosynthesis in the Mediterranean orchid *Limodorum abortivum* is mirrored by specific association to ectomycorrhizal Russulaceae. *Mol Ecol* **15**: 491–504

Girlanda M, Segreto R, Cafasso D, Liebel HT, Rodda M, Ercole E, *et al.* (2011) Photosynthetic Mediterranean meadow orchids feature partial mycoheterotrophy and specific mycorrhizal associations. *Am J Bot* **98**: 1148–1163

Gonneau C, Jersáková J, de Tredern E, Till-Bottraud I, Saarinen K, Sauve M, *et al.* (2014) Photosynthesis in perennial mixotrophic *Epipactis* spp. (Orchidaceae) contributes more to shoot and fruit biomass than to hypogeous survival. *J Ecol* **102**: 1183–1194

Graham SW, Lam VKY, Merckx VSFT (2017) Plastomes on the edge: the evolutionary breakdown of mycoheterotroph plastid genomes. *New Phytol* **214**: 48–55

Gray B, Low YW (2017) First record of *Geosiris* (Iridaceae: Geosiridoideae) from Australasia : a new record and a new species from the Wet Tropics of Queensland, Australia. *Candollea* **72**: 249–255

Greenland S, Senn SJ, Rothman KJ, Carlin JB, Poole C, Goodman SN, *et al.* (2016) Statistical tests, *P* values, confidence intervals, and power: a guide to misinterpretations. *Eur J Epidemiol* **31**: 337–350

Guo T, Wang HC, Xue WQ, Zhao J, Yang ZL (2016) Phylogenetic analyses of *Armillaria* reveal at least 15 phylogenetic lineages in China, seven of which are associated with cultivated *Gastrodia elata*. *PLOS ONE* **11**: e0154794

Hardoim PR, van Overbeek LS, Berg G, Pirttilä AM, Compant S, Campisano A, *et al.* (2015) The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiol Mol Biol Rev* **79**: 293–320

Hartig T (1840) *Vollständige Naturgeschichte der forstlichen Culturpflanzen Deutschlands*. A. Förstner'sche Verlagsbuchhandlung: Berlin.

Hashimoto Y, Fukukawa S, Kunishi A, Suga H,

Richard F, Sauve M, *et al.* (2012) Mycoheterotrophic germination of *Pyrola asarifolia* dust seeds reveals convergences with germination in orchids. *New Phytol* **195**: 620–630

van der Heijden MGA, Klironomos JN, Ursic M, Moutoglis P, Streitwolf-Engel R, Boller T, *et al.* (1998) Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* **396**: 69–72

van der Heijden MGA, Horton TR (2009) Socialism in soil? The importance of mycorrhizal fungal networks for facilitation in natural ecosystems. *J Ecol* **97**: 1139–1150

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

Herre EA, Knowlton N, Mueller UG, Rehner SA (1999) The evolution of mutualisms: exploring the paths between conflict and cooperation. *Trends Ecol Evol* **14**: 49–53

Hildebrandt TM, Nunes Nesi A, Araújo WL, Braun H-P (2015) Amino acid catabolism in plants. *Mol Plant* **8**: 1563–1579

Hobbie EA, Weber NS, Trappe JM (2001) Mycorrhizal vs saprotrophic status of fungi: the isotopic evidence. *New Phytol* **150**: 601–610

Hoeksema JD, Chaudhary VB, Gehring CA, Johnson NC, Karst J, Koide RT, *et al.* (2010) A meta-analysis of context-dependency in plant response to inoculation with mycorrhizal fungi. *Ecol Lett* **13**: 394–407

Högberg P, Plamboeck AH, Taylor AFS, Fransson PMA (1999) Natural ^{13}C abundance reveals trophic status of fungi and host-origin of carbon in mycorrhizal fungi in mixed forests. *PNAS* **96**: 8534–8539

Horton TR (Ed.) (2015) *Mycorrhizal Networks*. Springer.

Hunt J, Hodgson D (2010) What is fitness and how do we measure it? In: Westneat DF, Fox CW (eds) *Evolutionary Behavioral Ecology*,, pp 46–70

Hynson NA, Preiss K, Gebauer G, Bruns TD (2009) Isotopic evidence of full and partial myco-heterotrophy in the plant tribe Pyroleae (Ericaceae). *New Phytol* **182**: 719–726

Hynson NA, Mambelli S, Amend AS, Dawson TE (2012) Measuring carbon gains from fungal networks in understory plants from the tribe Pyroleae (Ericaceae): a field manipulation and stable isotope approach. *Oecologia* **169**: 307–317

Hynson NA, Madsen TP, Selosse M-A, Adam IKU, Ogura-Tsujita Y, Roy M, *et al.* (2013) The physiological ecology of mycoheterotrophy. In: Merckx VSFT (ed) *Mycoheterotrophy: The Biology of Plants Living on Fungi*, Springer, pp 297–342

Hynson NA, Schiebold JM-I, Gebauer G (2016) Plant family identity distinguishes patterns of carbon and nitrogen stable isotope abundance and nitrogen concentration in mycoheterotrophic plants associated with ectomycorrhizal fungi. *Ann Bot* **118**: 467–479

Imhof S (2009) Arbuscular, ecto-related, orchid mycorrhizas – three independent structural lineages towards mycoheterotrophy: implications for classification? *Mycorrhiza* **19**: 357–363

Irwin M, Bougoure J, Dearnaley JDW (2007) Pterostylis nutans (Orchidaceae) has a specific association with two *Ceratobasidium* root-associated fungi across its range in eastern Australia. *Mycoscience* **48**: 231–239

Jacquemyn H, Waud M, Merckx VSFT, Lievens B, Brys R (2015) Mycorrhizal diversity, seed germination and long-term changes in population size across nine populations of the terrestrial orchid *Neottia ovata*. *Mol Ecol* **24**: 3269–3280

Jacquemyn H, Waud M, Lievens B, Brys R (2016) Differences in mycorrhizal communities between *Epipactis palustris*, *E. helleborine* and its presumed sister species *E. neerlandica*. *Ann Bot* **118**: 105–114

Jacquemyn H, Waud M, Brys R, Lallemand F, Courty P-E, Robionek A, *et al.* (2017) Mycorrhizal associations and trophic modes in coexisting orchids: an ecological continuum between auto- and mixotrophy. *Front Plant Sci* **8**

Jakobsen I, Abbott LK, Robson AD (1992) External hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum* L. *New Phytol* **120**: 371–380

Jakobsen I, Hammer EC (2015) Nutrient dynamics in arbuscular mycorrhizal networks. In: Horton TR (ed) *Mycorrhizal Networks*, Ecological Studies. Springer, pp 91–131

Jakubska A, Schmidt I (2005) Chlorophyll-free form of *Epipactis albensis* Nováková et Rydlo

(Orchidaceae, Neottieae) in the 'Skarpa Storczyków' nature reserve near Orsk (Lower Silesia, Poland). *Acta Bot Siles* **2**: 151–154

Jin X-H, Dai Z-Q, Liu Q-Y, Ju X-Y, Xiang X-G (2011) *Cephalanthera humilis* sp. nov. (Orchidaceae) from Yunnan, China. *Nord J Bot* **29**: 598–600

Jin X-H, Ren Z-X, Xu S-Z, Wang H, Li D-Z, Li Z-Y (2014) The evolution of floral deception in *Epipactis veratrifolia* (Orchidaceae): from indirect defense to pollination. *BMC Plant Biol* **14**: 63

Johansson VA, Müller G, Eriksson O (2014) Dust seed production and dispersal in Swedish Pyroleae species. *Nord J Bot* **32**: 209–214

Johansson VA, Mikusinska A, Ekblad A, Eriksson O (2015) Partial mycoheterotrophy in Pyroleae: nitrogen and carbon stable isotope signatures during development from seedling to adult. *Oecologia* **177**: 203–211

Johansson VA, Bahram M, Tedersoo L, Kõljalg U, Eriksson O (2017) Specificity of fungal associations of Pyroleae and *Monotropa hypopitys* during germination and seedling development. *Mol Ecol* **26**: 2591–2604

Johnson NC, Graham J-H, Smith FA (1997) Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism–parasitism continuum. *New Phytol* **135**: 575–585

Jolles DD, Wolfe AD (2012) Genetic differentiation and crypsis among members of the myco-heterotrophic *Pyrola picta* species complex (Pyroleae: Monotropoideae: Ericaceae). *Syst Bot* **37**: 468–477

Jongmans AG, van Breemen N, Lundström U, van Hees PAW, Finlay RD, Srinivasan M, *et al.* (1997) Rock-eating fungi. *Nature* **389**: 682–683

Julou T, Burghardt B, Gebauer G, Berveiller D, Damesin C, Selosse M-A (2005) Mixotrophy in orchids: insights from a comparative study of green individuals and nonphotosynthetic individuals of *Cephalanthera damasonium*. *New Phytol* **166**: 639–653

Jung SC, Martinez-Medina A, Lopez-Raez JA, Pozo MJ (2012) Mycorrhiza-induced resistance and priming of plant defenses. *J Chem Ecol* **38**: 651–664

Jungk A, Claassen N (1989) Availability in soil and acquisition by plants as the basis for phosphorus and potassium supply to plants. *Z Pflanzenernähr Bodenkd* **152**: 151–157

Kamieński F (1882) Les organes végétatifs du *Monotropa hypopitys* L. In: *Mémoires de la Société nationale des sciences naturelles et mathématiques de Cherbourg, 26*, Imprimerie Ch. Seyffert: Cherbourg, pp 1–40

Kerner von Marilaun A (1894) *The natural history of plants. Their forms, growth, reproduction, and distribution.* (FW Oliver, Trad.). Blackie & Son: London.

Kéry M, Matthies D (2008) Reduced fecundity in small populations of the rare plant *Gentianopsis ciliate* (Gentianaceae). *Plant Biol* **6**: 683–688

Kidston R, Lang WH (1921) On old red sandstone plants showing structure, from the Rhynie chert bed, Aberdeenshire. Part V. The Thallophyta occurring in the peat-bed; the succession of the plants throughout a vertical section of the bed, and the conditions of accumulation and preservation of the deposit. *Trans R Soc Edinb* **52**: 855–902

Kiers ET, Duhamel M, Beesetty Y, Mensah JA, Franken O, Verbruggen E, *et al.* (2011) Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis. *Science* **333**: 880–882

Kim HT, Kim JS, Moore MJ, Neubig KM, Williams NH, Whitten WM, *et al.* (2015) Seven new complete plastome sequences reveal rampant independent loss of the ndh gene family across orchids and associated instability of the inverted repeat/small single-copy region boundaries. *PLOS ONE* **10**: e0142215

Kim HT, Shin C-H, Sun H, Kim J-H (2018) Sequencing of the plastome in the leafless green mycoheterotroph *Cymbidium macrorhizon* helps us to understand an early stage of fully mycoheterotrophic plastome structure. *Plant Syst Evol* **304**: 245–258

Kivlin SN, Hawkes CV, Treseder KK (2011) Global diversity and distribution of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biol Biochem* **43**: 2294–2303

Knudsen J, Olesen J (1993) Buzz-pollination and patterns in sexual traits in North European Pyrolaceae. *Am J Bot* **80**: 900–913

Kohler A, Kuo A, Nagy LG, Morin E, Barry KW, Buscot F, *et al.* (2015) Convergent losses of decay mechanisms and rapid turnover of symbiosis genes in mycorrhizal mutualists. *Nat Genet* **47**: 410–415

Kohns P, Schneider P (1993) *Epipactis muelleri* Godfery *var. chlorotica*. *Die Orchidee* **44**: 104–105

Lallemand F, Gaudeul M, Lambourdière J, Matsuda Y, Hashimoto Y, Selosse M-A (2016) The elusive predisposition to mycoheterotrophy in Ericaceae. *New Phytol* **212**: 314–319

Lallemand F, Püttsepp Ü, Lang M, Luud A, Courty P-E, Palancade C, *et al.* (2017) Mixotrophy in Pyroleae (Ericaceae) from Estonian boreal forests does not vary with light or tissue age. *Ann Bot* **120**: 361–371

Lallemand F, Figura T, Damesin C, Fresneau C, Griveau C, Fontaine N, *et al.* (2018) Mixotrophic orchids do not use photosynthates for perennial underground organs. *New Phytol* **In press**

Lallemand F, Robionek A, Courty P-E, Selosse M-A (2018) The ^{13}C content of the orchid *Epipactis palustris* (L.) Crantz responds to light as in autotrophic plants. *Bot Lett* **0**: 1–9. doi :10.1080/23818107.2017.1418430

Layman CA, Araujo MS, Boucek R, Hammerschlag-Peyer CM, Harrison E, Jud ZR, *et al.* (2011) Applying stable isotopes to examine food-web structure: an overview of analytical tools. *Biol Rev* **87**: 545–562

Leake JR (1994) The biology of myco-heterotrophic ('saprophytic') plants. *New Phytol* **127**: 171–216

Leake JR (2004) Myco-heterotroph/epiparasitic plant interactions with ectomycorrhizal and arbuscular mycorrhizal fungi. *Curr Opin Plant Biol* **7**: 422–428

Leake JR, Johnson D, Donnelly DP, Muckle GE, Boddy L, Read DJ (2004) Networks of power and influence: the role of mycorrhizal mycelium in controlling plant communities and agroecosystem functioning. *Can J Bot* **82**: 1016–1045

Lee Y-I, Yang C-K, Gebauer G (2015) The importance of associations with saprotrophic non-Rhizoctonia fungi among fully mycoheterotrophic orchids is currently under-estimated: novel evidence from sub-tropical Asia. *Ann Bot* **116**: 423–435

Lees E (1841) On the parasitic growth of *Monotropa hypopitys*. *Phytologist* **1**: 97–101

Lekberg Y, Hammer EC, Olsson PA (2010) Plants as resource islands and storage units – adopting the mycocentric view of arbuscular mycorrhizal networks. *FEMS Microbiol Ecol* **74**: 336–345

Lewis L (2015) Some observations on the nomenclature of achlorophyllous forms of *Epipactis purpurata E. helleborine* and *E. dunensis*. *J Eur Orchid* **47**: 111–122

Li X-L, George E, Marschner H (1991) Extension of the phosphorus depletion zone in VA-mycorrhizal white clover in a calcareous soil. *Plant Soil* **136**: 41–48

Li HY, Zhu YG, Marschner P, Smith FA, Smith SE (2005) Wheat responses to arbuscular mycorrhizal fungi in a highly calcareous soil differ from those of clover, and change with plant development and P supply. *Plant Soil* **277**: 221–232

Liebel HT, Bidartondo MI, Preiss K, Segreto R, Stöckel M, Rodda M, *et al.* (2010) C and N stable isotope signatures reveal constraints to nutritional modes in orchids from the Mediterranean and Macaronesia. *Am J Bot* **97**: 903–912

Liebel HT, Bidartondo MI, Gebauer G (2015) Are carbon and nitrogen exchange between fungi and the orchid *Goodyera repens* affected by irradiance? *Ann Bot* **115**: 251–261

Lin C-S, Chen JJW, Chiu C-C, Hsiao HCW, Yang C-J, Jin X-H, *et al.* (2017) Concomitant loss of NDH complex-related genes within chloroplast and nuclear genomes in some orchids. *Plant J* **90**: 994–1006

Lindahl BD, Tunlid A (2015) Ectomycorrhizal fungi – potential organic matter decomposers, yet not saprotrophs. *New Phytol* **205**: 1443–1447

Liu Z, Wang Z, Zhou J, Peng H (2011) Phylogeny of Pyroleae (Ericaceae): implications for character evolution. *J Plant Res* **124**: 325–337

Logacheva MD, Schelkunov MI, Penin AA (2011) Sequencing and analysis of plastid genome in mycoheterotrophic orchid *Neottia nidus-avis*. *Genome Biol Evol* **3**: 1296–1303

Lowenhaupt Tsing A (2017) *Le champignon de la fin du monde. Sur la possibilité de vivre dans les ruines du capitalisme.* La Découverte: Paris.

Luo J, Hou B-W, Niu Z-T, Liu W, Xue Q-Y, Ding X-Y (2014) Comparative chloroplast genomes of photosynthetic orchids: insights into evolution of the Orchidaceae and development of molecular markers for phylogenetic applications. *PLOS ONE* **9**: e99016

MacDougal DT (1899) Symbiotic saprophytism.

Ann Bot **13**: 1–48

Marschner H, Dell B (1994) Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant Soil* **159**: 89–102

Martin F, Kohler A, Murat C, Veneault-Fourrey C, Hibbett DS (2016) Unearthing the roots of ectomycorrhizal symbioses. *Nat Rev Microbiol* **14**: 760–773

Martínez-García LB, Ochoa-Hueso R, Manrique E, Pugnaire FI (2015) Different mycorrhizal fungal strains determine plant community response to nitrogen and water availability. *J Plant Nutr Soil Sci* **178**: 146–154

Martos F, Dulormne M, Pailler T, Bonfante P, Faccio A, Fournel J, *et al.* (2009) Independent recruitment of saprotrophic fungi as mycorrhizal partners by tropical achlorophyllous orchids. *New Phytol* **184**: 668–681

Marx DH (1979) *Synthesis of ectomycorrhizae by different fungi on northern red oak seedlings*, USDA, SE 282. Forest Service Research Note, USDA, SE 282.

Matsuda Y, Amiya A, Ito S (2009) Colonization patterns of mycorrhizal fungi associated with two rare orchids, *Cephalanthera falcata* and *C. erecta*. *Ecol Res* **24**: 1023

Matsuda Y, Shimizu S, Mori M, Ito S-I, Selosse M-A (2012) Seasonal and environmental changes of mycorrhizal associations and heterotrophy levels in mixotrophic *Pyrola japonica* (Ericaceae) growing under different light environments. *Am J Bot* **99**: 1177–1188

McConnaughey T, McRoy CP (1979) Food-Web structure and the fractionation of Carbon isotopes in the bering sea. *Mar Biol* **53**: 257–262

Merckx VSFT, Stöckel M, Fleischmann A, Bruns TD, Gebauer G (2010) ^{15}N and ^{13}C natural abundance of two mycoheterotrophic and a putative partially mycoheterotrophic species associated with arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* **188**: 590–596

Merckx VSFT, Janssens SB, Hynson NA, Specht CD, Bruns TD, Smets EF (2012) Mycoheterotrophic interactions are not limited to a narrow phylogenetic range of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mol Ecol* **21**: 1524–1532

Merckx VSFT, Freudenstein JV, Kissling J, Christenhusz MJM, Stotler RE, Crandall-Stotler B, *et al.* (2013a) Taxonomy and classification. In: Merckx VSFT (ed) *Mycoheterotrophy: The Biology of Plants Living on Fungi*, Springer, New York, NY, pp 19–101

Merckx VSFT, Mennes CB, Peay KG, Geml J (2013b) Evolution and diversification. In: Merckx VSFT (ed) *Mycoheterotrophy: The Biology of Plants Living on Fungi*, Springer, New York, NY, pp 215–244

Minagawa M, Wada E (1984) Stepwise enrichment of ^{15}N along food chains: further evidence and the relation between $\delta^{15}N$ and animal age. *Geochim Cosmochim Acta* **48**: 1135–1140

Minh BQ, Nguyen MAT, von Haeseler A (2013) Ultrafast approximation for phylogenetic bootstrap. *Mol Biol Evol* **30**: 1188–1195

Motomura H, Selosse M-A, Martos F, Kagawa A, Yukawa T (2010) Mycoheterotrophy evolved from mixotrophic ancestors: evidence in *Cymbidium* (Orchidaceae). *Ann Bot* **106**: 573–581

Motulsky HJ (2014) Common misconceptions about data analysis and statistics. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **387**: 1017–1023

Nagae M, Parniske M, Kawaguchi M, Takeda N (2016) The relationship between thiamine and two symbioses: root nodule symbiosis and arbuscular mycorrhiza. *Plant Signal Behav* **11**: e1265723

Newman E (1842) Notes on the supposed parasitism of *Monotropa hypopitys*. *Phytologist* **1**: 297–299

Newman EI (1988) Mycorrhizal links between plants: their functioning and ecological significance. In: Begon M, Fitter AH, Ford ED, Macfadyen A (eds) *Advances in Ecological Research*, Academic Press Vol 18, pp 243–270

Nguyen L-T, Schmidt HA, Haeseler A von, Minh BQ (2015) IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol Biol Evol* **32**: 268–274

Noë R, Hammerstein P (1995) Biological markets. *Trends Ecol Evol* **10**: 336–339

Nuraliev M, Efimov P, Averyanov LV, Kuznetsov A, P Kuznetsova S (2014) *Cephalanthera exigua* (Orchidaceae), a new species and genus in the flora of Vietnam. *Wulfenia* **21**: 95–102

Ogura-Tsujita Y, Yukawa T (2008) *Epipactis helleborine* shows strong mycorrhizal preference towards ectomycorrhizal fungi with contrasting

geographic distributions in Japan. *Mycorrhiza* **18**: 331–338

Ogura-Tsujita Y, Gebauer G, Hashimoto T, Umata H, Yukawa T (2009) Evidence for novel and specialized mycorrhizal parasitism: the orchid *Gastrodia confusa* gains carbon from saprotrophic *Mycena*. *Proc Biol Sci* **276**: 761–767

Ogura-Tsujita Y, Yokoyama J, Miyoshi K, Yukawa T (2012) Shifts in mycorrhizal fungi during the evolution of autotrophy to mycoheterotrophy in *Cymbidium* (Orchidaceae). *Am J Bot* **99**: 1158–1176

Ogura-Tsujita Y, Gebauer G, Xu H, Fukasawa Y, Umata H, Tetsuka K, *et al.* (2018) The giant mycoheterotrophic orchid *Erythrorchis altissima* is associated mainly with a divergent set of wood-decaying fungi. *Mol Ecol* **27**: 1324–1337

Öpik M, Zobel M, Cantero JJ, Davison J, Facelli JM, Hiiesalu I, *et al.* (2013) Global sampling of plant roots expands the described molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* **23**: 411–430

Pedersen HAE, Watthana S, Roy M, Suddee S, Selosse M-A (2009) *Cephalanthera exigua* rediscovered: new insights in the taxonomy, habitat requirements and breeding system of a rare mycoheterotrophic orchid. *Nord J Bot* **27**: 460–468

Pirozynski KA, Malloch DW (1975) The origin of land plants: A matter of mycotrophism. *Biosystems* **6**: 153–164

Plett JM, Daguerre Y, Wittulsky S, Vayssières A, Deveau A, Melton SJ, *et al.* (2014) Effector MiSSP7 of the mutualistic fungus *Laccaria bicolor* stabilizes the *Populus* JAZ6 protein and represses jasmonic acid (JA) responsive genes. *PNAS* **111**: 8299–8304

Preiss K, Adam IKU, Gebauer G (2010) Irradiance governs exploitation of fungi: fine-tuning of carbon gain by two partially myco-heterotrophic orchids. *Proc Royal Soc B* **277**: 1333–1336

Rasmussen HN (1990) Cell differentiation and mycorrhizal infection in *Dactylorhiza majalis* (Rchb. f.) Hunt & Summerh. (Orchidaceae) during germination *in vitro*. *New Phytol* **116**: 137–147

Rasmussen HN (1995) *Terrestrial Orchids: From Seed to Mycotrophic Plant*, 1ère édition. Cambridge University Press: Cambridge, New York.

Read DJ (1991) Mycorrhizas in ecosystems. *Experientia* **47**: 376–391

Read DJ, Perez-Moreno J (2003) Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems-a journey towards relevance? *New Phytol* **157**: 475–492

Remy W, Taylor TN, Hass H, Kerp H (1994) Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *PNAS* **91**: 11841–11843

Richardson KA, Peterson RL, Currah RS (1992) Seed reserves and early symbiotic protocorm development of *Platanthera hyperborea* (Orchidaceae). *Can J Bot* **70**: 291–300

Rinaldi AC, Comandini O, Kuyper TW (2008) Ectomycorrhizal fungal diversity: seperating the wheat from the chaff. *Fungal Divers* **33**: 1–45

Roy M (2009) *Évolution de la mycohétérotrophie chez les orchidées*. Thèse de doctorat en biologie des populations et écologie, sous la direction de Marc-André Selosse. Université Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc.

Roy M, Watthana S, Stier A, Richard F, Vessabutr S, Selosse M-A (2009) Two mycoheterotrophic orchids from Thailand tropical dipterocarpacean forests associate with a broad diversity of ectomycorrhizal fungi. *BMC Biol* **7**: 51

Roy M, Gonneau C, Rocheteau A, Berveiller D, Thomas J-C, Damesin C, *et al.* (2013) Why do mixotrophic plants stay green? A comparison between green and achlorophyllous orchid individuals *in situ*. *Ecol Monogr* **83**: 95–117

Rylands TG (1842) On the mode of growth of *Monotropa hypopitys*. *Phytologist* **1**: 329–330

Sakamoto Y, Yokoyama J, Maki M (2015) Mycorrhizal diversity of the orchid *Cephalanthera longibracteata* in Japan. *Mycoscience* **56**: 183–189

Sakamoto Y, Yamazaki J, Yamada T, Yokoyama J, Ogura-Tsujita Y, Maki M (2016a) The diversity of mycorrhizal fungi in Japanese *Cephalanthera* species. *Plant Species Biol* **32**: 81–86

Sakamoto Y, Ogura-Tsujita Y, Ito K, Suetsugu K, Yokoyama J, Yamazaki J, *et al.* (2016b) The tiny-leaved orchid *Cephalanthera subaphylla* obtains most of its carbon via mycoheterotrophy. *J Plant Res* **129**: 1013–1020

Salmia A (1986) Chlorophyll-free form of *Epipactis helleborine* (Orchidaceae) in SE Finland. *Ann Bot Fennici* **23**: 49–57

Salmia A (1989) General morphology and anatomy of chlorophyll-free and green forms of *Epipactis helleborine* (Orchidaceae). *Ann Bot Fennici* **26**: 95–105

Schiebold JM-I, Bidartondo MI, Karasch P, Gravendeel B, Gebauer G (2017a) You are what you get from your fungi: nitrogen stable isotope patterns in *Epipactis* species. *Ann Bot* **119**: 1085–1095

Schiebold JM-I, Bidartondo MI, Lenhard F, Makiola A, Gebauer G (2017b) Exploiting mycorrhizas in broad daylight: partial mycoheterotrophy is a common nutritional strategy in meadow orchids. *J Ecol* **106**: 168–178

Schneider-Maunoury L, Leclercq S, Clément C, Covès H, Lambourdière J, Sauve M, *et al.* (2018) Is *Tuber melanosporum* colonizing the roots of herbaceous, non-ectomycorrhizal plants? *Fungal Ecol* **31**: 59–68

Schwery O, Onstein RE, Bouchenak-Khelladi Y, Xing Y, Carter RJ, Linder HP (2014) As old as the mountains: the radiations of the Ericaceae. *New Phytol* **207**: 355–367

Seitzman BH, Ouimette A, Mixon RL, Hobbie EA, Hibbett DS (2011) Conservation of biotrophy in Hygrophoraceae inferred from combined stable isotope and phylogenetic analyses. *Mycologia* **103**: 280–290

Selosse M-A (2000) *La symbiose. Structures et fonctions, rôle écologique et évolutif*. Vuibert: Paris.

Selosse M-A (2014) The latest news from biological interactions in orchids: in love, head to toe. *New Phytol* **202**: 337–40

Selosse M-A (2017) *Jamais seul. Ces microbes qui construisent les plantes, les animaux et les civilisations*, Actes Sud.

Selosse M-A, Le Tacon F (1998) The land flora: a phototroph-fungus partnership? *Trends Ecol Evol* **13**: 15–20

Selosse M-A, Weiß M, Jany J-L, Tillier A (2002) Communities and populations of sebacinoid basidiomycetes associated with the achlorophyllous orchid *Neottia nidus-avis* (L.) L.C.M. Rich. and neighbouring tree ectomycorrhizae. *Mol Ecol* **11**: 1831–1844

Selosse M-A, Faccio A, Scappaticci G, Bonfante P (2004) Chlorophyllous and achlorophyllous specimens of *Epipactis microphylla* (Neottieae, Orchidaceae) are associated with ectomycorrhizal septomycetes, including truffles. *Microb Ecol* **47**: 416–426

Selosse M-A, Richard F, He X, Simard SW (2006) Mycorrhizal networks: des liaisons dangereuses? *Trends Ecol Evol* **21**: 621–628

Selosse M-A, Dubois M-P, Alvarez N (2009) Do Sebacinales commonly associate with plant roots as endophytes? *Mycol Res* **113**: 1062–1069

Selosse M-A, Roy M (2009) Green plants that feed on fungi: facts and questions about mixotrophy. *Trends Plant Sci* **14**: 64–70

Selosse M-A, Martos F, Perry BA, Padamsee M, Roy M, Pailler T (2010) Saprotrophic fungal mycorrhizal symbionts in achlorophyllous orchids: finding treasures among the 'molecular scraps'? *Plant Signal Behav* **5**: 349–353

Selosse M-A, Rousset F (2011) The plant-fungal marketplace. *Science* **333**: 828–829

Selosse M-A, Martos F (2014) Do chlorophyllous orchids heterotrophically use mycorrhizal fungal carbon? *Trends Plant Sci* **19**: 683–685

Selosse M-A, Minasiewicz J, Boullard B (2017a) An annotated translation of Noël Bernard's 1899 article 'On the germination of *Neottia nidus-avis*'. *Mycorrhiza* **27**: 611–618

Selosse M-A, Charpin M, Not F (2017b) Mixotrophy everywhere on land and in water: the grand écart hypothesis. *Ecol Lett* **20**: 246–263

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

Servigne P, Chapelle G (2017) *L'entraide, l'autre loi de la jungle*. Les Liens qui Libèrent: Paris.

Shefferson RP, Taylor DL, Weiß M, Garnica S, McCormick MK, Adams S, *et al.* (2007) The evolutionary history of mycorrhizal specificity among lady's slipper orchids. *Evolution* **61**: 1380–1390

Shefferson RP, Kull T, Tali K (2008) Mycorrhizal interactions of orchids colonizing Estonian mine tailings hills. *Am J Bot* **95**: 156–164

Shefferson RP, Roy M, Püttsepp Ü, Selosse M-A (2016) Demographic shifts related to

mycoheterotrophy and their fitness impacts in two *Cephalanthera* species. *Ecology* **97**: 1452–1462

Shutoh K, Kaneko S, Suetsugu K, I Naito Y, Kurosawa T (2016) Variation in vegetative morphology tracks the complex genetic diversification of the mycoheterotrophic species *Pyrola japonica sensu lato*. *Am J Bot* **103**: 1618–1629

Simard SW, Perry DA, Jones MD, Myrold DD, Durall DM, Molina R (1997) Net transfer of carbon between ectomycorrhizal tree species in the field. *Nature* **388**: 579–582

Simard SW, Beiler KJ, Bingham MA, Deslippe JR, Philip LJ, Teste FP (2012) Mycorrhizal networks: Mechanisms, ecology and modelling. *Fungal Biol Rev* **26**: 39–60

Smith SE (1966) Physiology and ecology of orchid mycorrhizal fungi with reference to seedling nutrition. *New Phytol* **65**: 488–499

Smith SE (1967) Carbohydrate translocation in orchid mycorrhizas. *New Phytol* **66**: 371–378

Smith SE, Read DJ (2008) *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press: London.

Smith SE, Smith FA (1973) Uptake of glucose, trehalose and mannitol by leaf slices of the orchid *Bletilla hyacinthina*. *New Phytol* **72**: 957–964

Smith FA, Smith SE (2013) How useful is the mutualism-parasitism continuum of arbuscular mycorrhizal functioning? *Plant Soil* **363**: 7–18

Sochor M, Egertová Z, Hroneš M, Dančák M (2018) Rediscovery of *Thismia neptunis* (Thismiaceae) after 151 years. *Phytotaxa* **340**: 71–78

Société Française d'Écologie et d'Évolution (2018) Regards sur le livre de Peter Wohlleben, La Vie secrète des arbres. https://www.sfecologie.org/regard/ro5-mars-2018-j-tassin-p-donadieu-aaf/

Song YY, Ye M, Li C, He X, Zhu-Salzman K, Wang RL, *et al.* (2014) Hijacking common mycorrhizal networks for herbivore-induced defence signal transfer between tomato plants. *Sci Rep* **4**: 3915

Spatafora JW, Chang Y, Benny GL, Lazarus K, Smith ME, Berbee ML, *et al.* (2016) A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia* **108**: 1028–1046

Stöckel M, Meyer C, Gebauer G (2011) The degree of mycoheterotrophic carbon gain in green, variegated and vegetative albino individuals of *Cephalanthera damasonium* is related to leaf chlorophyll concentrations. *New Phytol* **189**: 790–796

Stöckel M, Těšitelová T, Jersáková J, Bidartondo MI, Gebauer G (2014) Carbon and nitrogen gain during the growth of orchid seedlings in nature. *New Phytol* **202**: 606–615

Suetsugu K, Yamato M, Miura C, Yamaguchi K, Takahashi K, Ida Y, *et al.* (2017) Comparison of green and albino individuals of the partially mycoheterotrophic orchid *Epipactis helleborine* on molecular identities of mycorrhizal fungi, nutritional modes and gene expression in mycorrhizal roots. *Mol Ecol* **26**: 1652–1669

Suetsugu K, Ohta T, Tayasu I (2018) Partial mycoheterotrophy in the leafless orchid *Cymbidium macrorhizon*. *Am J Bot* **105**: 1–6

Takahashi H (1986) Pollen polyads and their variation in *Chimaphila* (pyrolaceae). *Grana* **25**: 161–169

Taylor DL, Bruns TD, Leake JR, Read DJ (2002) Mycorrhizal specificity and function in myco-heterotrophic plants. In: van der Heijden MGA, Sanders IR (eds) *Mycorrhizal Ecology*, Ecological Studies (Analysis and Synthesis). Springer, Berlin, Heidelberg Vol 157, pp 375–413

Tedersoo L, Pellet P, Kõljalg U, Selosse M-A (2007) Parallel evolutionary paths to mycoheterotrophy in understorey Ericaceae and Orchidaceae: ecological evidence for mixotrophy in Pyroleae. *Oecologia* **151**: 206–217

Tedersoo L, May TW, Smith ME (2010) Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza* **20**: 217–263

Těšitel J, Těšitelová T, Minasiewicz J, Selosse M-A (2018) Mixotrophy in land plants: why to stay green? *Trends Plant Sci* **23**: 656–659

Těšitelová T, Těšitel J, Jersáková J, RÍhová G, Selosse M-A (2012) Symbiotic germination capability of four *Epipactis* species (Orchidaceae) is broader than expected from adult ecology. *Am J Bot* **99**: 1020–1032

Těšitelová T, Kotilínek M, Jersáková J, Joly F-X, Košnar J, Tatarenko I, *et al.* (2015) Two

widespread green *Neottia* species (Orchidaceae) show mycorrhizal preference for Sebacinales in various habitats and ontogenetic stages. *Mol Ecol* **24**: 1122–1134

The Plant List (2018) http://www.theplantlist.org/

Toth R, Doane C, Bennett E, Alexander T (1990) Correlation between host-fungal surface areas and percent colonization in VA mycorrhizae. *Mycologia* **82**: 519–522

Tranchida-Lombardo V, Roy M, Bugot E, Santoro G, Püttsepp Ü, Selosse M-A, *et al.* (2010) Spatial repartition and genetic relationship of green and albino individuals in mixed populations of *Cephalanthera* orchids. *Plant Biol* **12**: 659–667

Tremblay RL, Ackerman J, Zimmerman J, Calvo RN (2005) Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. *Biol J Linn Soc Lon* **84**: 1–54

Trudell SA, Rygiewicz PT, Edmonds RL (2003) Nitrogen and carbon stable isotope abundances support the myco-heterotrophic nature and host-specificity of certain achlorophyllous plants. *New Phytol* **160**: 391–401

Umata H, Ota Y, Yamada M, Watanabe Y, Gale SW (2013) Germination of the fully myco-heterotrophic orchid *Cyrtosia septentrionalis* is characterized by low fungal specificity and does not require direct seed-mycobiont contact. *Mycoscience* **54**: 343–352

Valadares RBS, Perotto S, Santos EC, Lambais MR (2014) Proteome changes in *Oncidium sphacelatum* (Orchidaceae) at different trophic stages of symbiotic germination. *Mycorrhiza* **24**: 349–360

Veldre V, Abarenkov K, Bahram M, Martos F, Selosse M-A, Tamm H, *et al.* (2013) Evolution of nutritional modes of Ceratobasidiaceae (Cantharellales, Basidiomycota) as revealed from publicly available ITS sequences. *Fungal Ecol* **6**: 256–268

Vincenot L, Tedersoo L, Richard F, Horcine H, Kõljalg U, Selosse M-A (2008) Fungal associates of *Pyrola rotundifolia*, a mixotrophic Ericaceae, from two Estonian boreal forests. *Mycorrhiza* **19**: 15–25

Volpin H, Phillips DA, Okon Y, Kapulnik Y (1995) Suppression of an isoflavonoid phytoalexin defense response in mycorrhizal alfalfa roots. *Plant Physiol* **108**: 1449–1454

Wagg C, Veiga R, van der Heijden MGA (2015) Facilitation and antagonism in mycorrhizal networks. In: Horton TR (ed) *Mycorrhizal Networks*, Ecological Studies. Springer Vol 224, pp 203–226

Walder F, Niemann H, Natarajan M, Lehmann MF, Boller T, Wiemken A (2012) Mycorrhizal networks: common goods of plants shared under unequal terms of trade. *Plant Physiol* **159**: 789–797

Wang B, Qiu Y-L (2006) Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* **16**: 299–363

Waterman RJ, Klooster MR, Hentrich H, Bidartondo MI (2013) Species interactions of mycoheterotrophic plants: specialization and its potential consequences. In: Merckx VSFT (ed) *Mycoheterotrophy: The Biology of Plants Living on Fungi*, Springer, New York, NY, pp 267–296

WCSP (2018) World Checklist of Selected Plant Families. Facilited by the Royal Botanic Gardens, Kew. http://wcsp.science.kew.org/

Weiß M, Waller F, Zuccaro A, Selosse M-A (2016) Sebacinales – one thousand and one interactions with land plants. *New Phytol* **211**: 20–40

Werner GDA, Kiers ET (2015) Partner selection in the mycorrhizal mutualism. *New Phytol* **205**: 1437–1442

Winther JL, Friedman WE (2008) Arbuscular mycorrhizal associations in Lycopodiaceae. *New Phytol* **177**: 790–801

Yagame T, Yamato M, Suzuki A, Iwase K (2008) Ceratobasidiaceae mycorrhizal fungi isolated from nonphotosynthetic orchid *Chamaegastrodia sikokiana*. *Mycorrhiza* **18**: 97–101

Yagame T, Orihara T, Selosse M-A, Yamato M, Iwase K (2012) Mixotrophy of *Platanthera minor*, an orchid associated with ectomycorrhiza-forming Ceratobasidiaceae fungi. *New Phytol* **193**: 178–187

Yagame T, Funabiki E, Nagasawa E, Fukiharu T, Iwase K (2013) Identification and symbiotic ability of Psathyrellaceae fungi isolated from a photosynthetic orchid, *Cremastra appendiculata* (Orchidaceae). *Am J Bot* **100**: 1823–1830

Yagame T, Ogura-Tsujita Y, Kinoshita A, Iwase K, Yukawa T (2016) Fungal partner shifts during the evolution of mycoheterotrophy in *Neottia*. *Am J Bot* **103**: 1630–1641

Yamato M, Yagame T, Suzuki A, Iwase K (2005) Isolation and identification of mycorrhizal fungi associating with an achlorophyllous plant, *Epipogium roseum* (Orchidaceae). *Mycoscience* **46**: 73–77

Zeller B, Brechet C, Maurice J-P, Tacon FL (2007) ^{13}C and ^{15}N isotopic fractionation in trees, soils and fungi in a natural forest stand and a Norway spruce plantation. *Ann For Sci* **64**: 419–429

Zimmer K, Hynson NA, Gebauer G, Allen EB, Allen MF, Read DJ (2007) Wide geographical and ecological distribution of nitrogen and carbon gains from fungi in pyroloids and monotropoids (Ericaceae) and in orchids. *New Phytol* **175**: 166–175

Zimmer K, Meyer C, Gebauer G (2008) The ectomycorrhizal specialist orchid *Corallorhiza trifida* is a partial myco-heterotroph. *New Phytol* **178**: 395–400