

Diversité et recrutement des symbiotes associés au lichen *Stereocaulon* spp.

Camille Lavoie^{1,2}, P.A. Picard^{1,2}, J. Gagnon^{2,3,4} et J.C. Villarreal A.^{1,2,3,5}

1- Département de biologie, Université Laval 2- Institut de Biologie Intégrative et des Systèmes (IBIS) 3- Herbarium Louis-Marie 4- Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs, Québec 5- Centre d'études nordiques (CEN)

CONTEXTE

Les lichens du genre *Stereocaulon*, ou lichens des neiges, sont une composante principale du couvert végétal des écosystèmes arctiques et subarctiques. Ces lichens fruticuleux, d'apparence blanchâtre, sont formés par les hyphes d'un champignon ascomycète abritant des algues vertes unicellulaires (souvent *Asterochloris* sp.), et des colonies de cyanobactéries, majoritairement du genre *Stigonema* - et minoritairement du genre *Nostoc*. Rappelons que la vie en symbiose est d'une importance capitale dans les écosystèmes nordiques appauvris en azote ; où l'activité bactérienne des sols est ralentie par le froid. Au sein du lichen, les algues seraient chargées de fournir les sucres par la photosynthèse, les cyanobactéries produiraient les biomolécules azotées et le champignon serait chargé de relier les parties tout en allant puiser l'eau et les minéraux dans le sol. Pour cette étude, nous avons voulu explorer la diversité ainsi que le patron de recrutement des symbiotes au sein des thalles de *Stereocaulon* grâce à des analyses phylogénétiques, via le séquençage des marqueurs ITS/*rbcl* pour les algues, et *rbclX/trnL* pour les cyanobactéries.

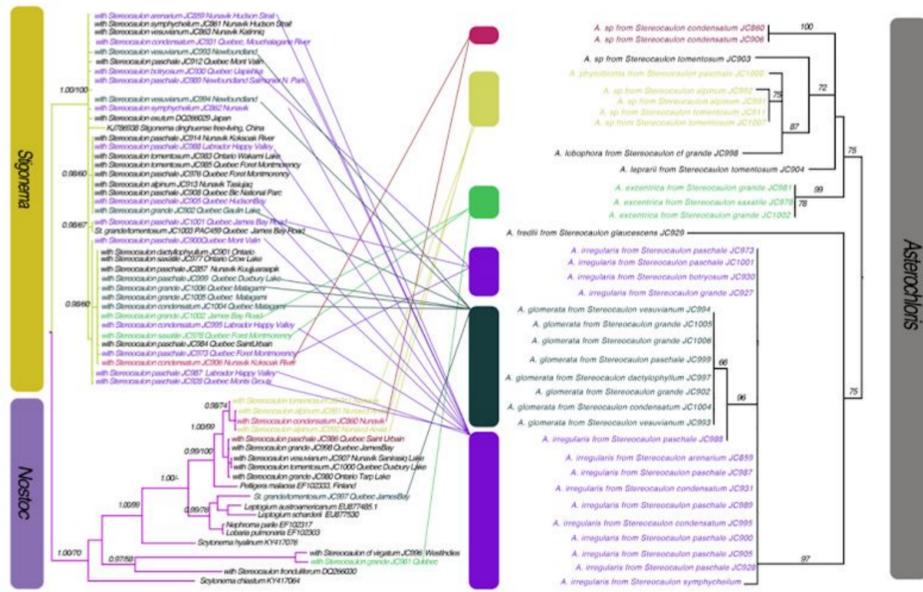


Figure 1. Arbres phylogénétiques comparés des symbiotes chez *Stereocaulon* spp. Les séquences des cyanobactéries et des algues ont été amplifiées à partir des mêmes extractions d'ADN provenant des thalles de *Stereocaulon*; certaines séquences peuvent ainsi être reliées d'un arbre à l'autre. À gauche : phylogénie des cyanobactéries sur la base de l'opéron *rbclX*. À droite : phylogénie d'*Asterochloris* sp. (algue verte) basée sur le gène ITS. On observe une grande polytomie du côté des séquences des cyanobactéries *Stigonema*. Les séquences de *Nostoc* sont cependant plus diverses et moins représentées. L'arbre du côté des algues présente également un groupe peu diversifié composé de *A. glomerata* et *A. irregularis*; celui-ci semble entretenir une certaine correspondance avec le clade de *Stigonema*. Il y a peu d'espèces chez les algues et celles-ci pourraient s'associer à *Stereocaulon* dans une vaste gamme de conditions climatiques (comme *Stigonema*). Selon Vančurová et al. (2018) *Asterochloris* serait un genre contenant des espèces psychrophiles.

RÉSULTATS

La phylogénie du gène *rbclX* des cyanobactéries associées à *Stereocaulon* montre une dichotomie entre deux clades bien soutenus ; le clade *Stigonema* et le clade *Nostoc* (Fig. 1, à gauche). La plupart des accessions font partie du clade *Stigonema* qui contient onze espèces différentes de *Stereocaulon*. Ce dernier montre peu de résolution et laisse entendre qu'un génotype quasi-identique est partagé entre tous les thalles séquencés. On remarque que les 19 accessions de *Stereocaulon paschale* se retrouvent de part et d'autre de l'arbre sans motif géographique particulier. Par ailleurs l'arbre du gène *trnL* des cyanobactéries (Fig. 3, à droite) est moins résolu, et montre une trichotomie entre *Stigonema* et deux clades de *Nostoc* (et d'*Anabaena* et d'autres genres) (Fig. 4). Cependant des clades différenciés semblent appartenir au genre *Stereocaulon*. Du côté des algues, la phylogénie basée sur le gène ITS (Fig.1, à droite) indique plus de structure génétique et également plus d'espèces d'*Asterochloris* impliquées dans la symbiose avec *Stereocaulon*. La distance évolutive entre les clades est plus importante que chez les cyanobactéries.



Figure 2. De gauche à droite : *S. grande* (@Carita Bergman), *S. tomentosum* (@Chris Wagner), *S. vesuvianum* (@Lairich Rig) et *S. paschale* (@Andres Saag). Photographies originales sous licence common creativ (CC BY-NC-ND 3.0).

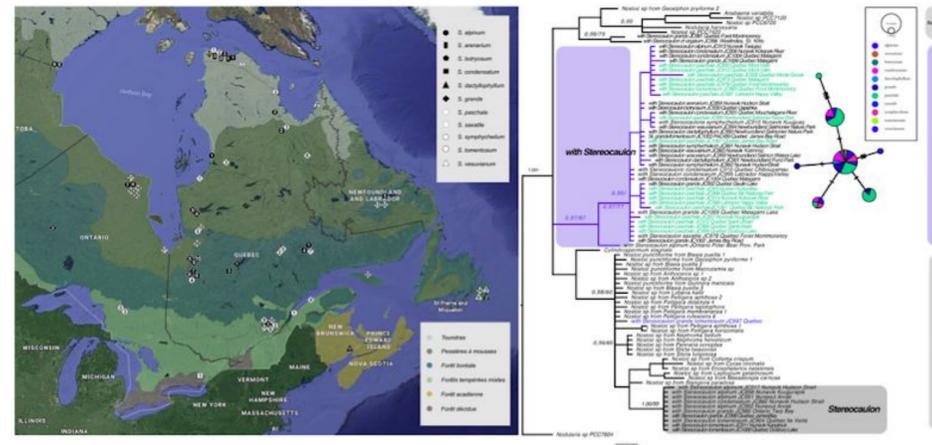


Figure 3. À gauche : Carte de récolte des 14 espèces - et 70 spécimens - utilisées pour cette étude ; *S. rivalurum*, *S. symphycheilum* et *S. subcaraloides* n'y figurent pas. Des efforts ont été déployés pour tenter de couvrir les principales zones écoforestières de l'Est du Canada malgré une surreprésentation du genre *Stereocaulon* dans les régions plus nordiques. À droite : Arbre phylogénétique des séquences *trnL* chez les cyanobactéries associées à *Stereocaulon*. Des séquences provenant de GENEBANK appartenant à des cyanobactéries associées à d'autres lichens ont été intégrées à l'arbre ; il est possible de constater que deux clades bien définis sont associés à *Stereocaulon* et qu'il existe peu de diversité au sein de ceux-ci. Le réseau d'haplotype n'indique pas d'appartenance spécifique des génotypes aux différentes espèces du genre *Stereocaulon*.

MÉTHODE

- 70 spécimens de *Stereocaulon* ont été récoltés dans l'est du Canada par les auteurs et collaborateurs et identifiés à l'aide de tests morphologiques et chimiques effectués selon Brodo et al. (2001).
- 14 espèces de *Stereocaulon* ont été séquencées avec 1-15 individus par espèce. Nous avons échantillonné la carte des zones de végétation (NRCAN, 2019) et géoréférencé tous les échantillons (Fig. 3, à gauche).
- Afin de fournir une description structurelle des symbiotes associés à *Stereocaulon*, des céphalodies de plusieurs espèces récoltées ont été photographiées à l'aide d'une caméra Olympus DP80 montée sur un microscope BX53 (Olympus Canada) (Fig. 4).
- Pour déduire les relations phylogénétiques des cyanobiontes de *Stereocaulon*, nous avons ciblé des séquences de l'opéron *rbclX* et de l'intron *trnL*. Les extractions d'ADN et les amplifications PCR ont été effectués selon des protocoles standards. Nous avons généré 56 séquences *rbclX* (Fig. 1, à gauche) et 56 séquences de *trnL* (à l'exclusion de la boucle hypervariable P6b) (Fig. 3, à droite).
- Pour les photobiontes, la région intergénique transcrite ITS a été employée (Peksa, O. & Škaloud, P., 2011) et 36 séquences ont été obtenues pour fin de comparaison de structure phylogénétique avec les cyanobiontes (Fig. 3, à droite).
- Nous avons analysé chaque locus et ensemble de données séparément selon le critère de vraisemblance maximale (ML) en utilisant l'approximation du modèle GTR-CAT mise en œuvre dans RaxML (Stamatakis, 2014) avec 500 réplicats bootstrap (MLB).

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Les lichens présentent une quantité de relations mutuelles et antagonistes complexes avec les eucaryotes et les procaryotes. En ce qui concerne la symbiose *Stereocaulon-Stigonema*, nos données suggèrent que le partenaire cyanobactérien évolue à un rythme plus lent que l'ascomycète. Dans chaque biome, sur tout le gradient latitudinal, nous avons trouvé très peu de génotypes de *Stigonema* en symbiose avec les différentes espèces du genre *Stereocaulon* (Fig. 1 et 3). Nous proposons ici deux explications possibles du modèle phylogénétique trouvé dans cette symbiose : 1) L'hypothèse du Roi Rouge (RKH) plaide en faveur d'une course évolutive asymétrique dans laquelle le partenaire en évolution lente tirerait davantage profit de la symbiose (Bergstromm & Lachmann, 2003). Le principe derrière la RKH est qu'un organisme symbiotique en évolution lente - dans ce cas, *Stigonema* - occuperait une position avantageuse dans un échange en offrant invariablement une même ressource à un partenaire qui lui, serait toujours «plus riche» évolutivement. 2) Un scénario de « symbiotes cultivés » propose que l'espèce ancestrale de *Stereocaulon* aurait rencontré une souche de *Stigonema* garante de son succès évolutif. L'ascomycète se serait ensuite dispersé et diversifié dans différentes zones avec ce cyanobionte «protégé». Diverses contraintes environnementales stochastiques peuvent avoir déclenché la diversification de l'ascomycète et optimisé lentement les cyanobiontes pour qu'ils effectuent rondement la tâche de fixation de l'azote sans co-spécier avec l'hôte (Hognegger, 1991; Rundel, 1978). Nos études morphologiques montrent également que les hyphes sont intimement agrégés autour des céphalodies et peuvent être co-dispersés aisément. De plus, il est possible que les cyanobactéries du genre *Stigonema* soient particulièrement bien adaptées aux climats nordiques, avec leur nitrogénase polyvalente (Darnajoux et al., 2017; Pandey et al., 2004), leur temps de génération lent et leur mucilage épais (Mareš et al., 2015). Pour ce qui est des cyanobactéries du genre *Nostoc*, il semblerait que leur patron de recrutement soit plus complexe et qu'il existe pour ce genre une façon de se diversifier qui soit indépendante du partenariat avec *Stereocaulon*. Quoiqu'il en soit, il apparaît que les lichens appartenant au genre *Stereocaulon* aient une préférence dans le choix de leur symbiote - tout en faisant preuve de flexibilité - et qu'ils participent à leur dispersion tout en les « jardinant ».

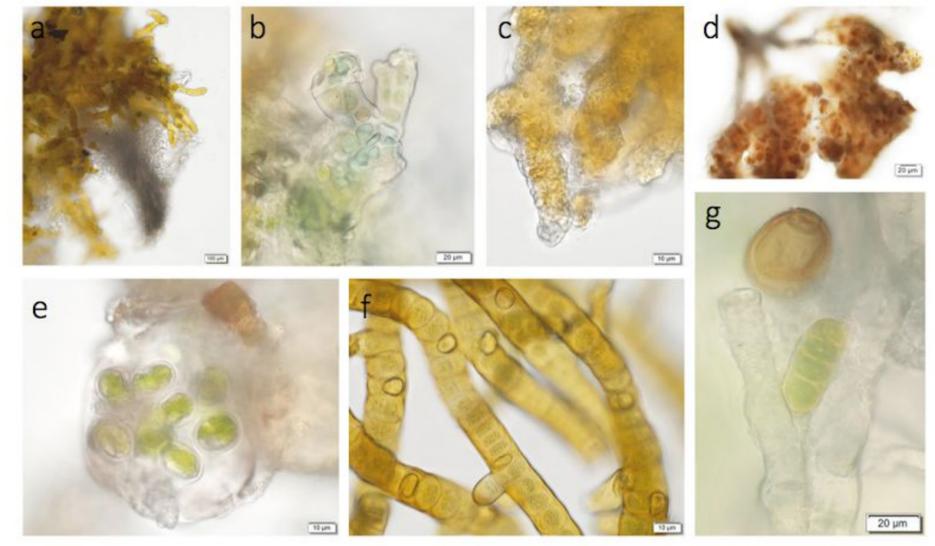


Figure 4. Photographies au microscope des différentes structures organismes symbiotiques retrouvés chez les lichens du genre *Stereocaulon* (@Villarreal Lab/Camille Lavoie) a) Céphalodie de *Stereocaulon paschale* formée de multiples filaments de cyanobactéries du genre *Stigonema* ; on observe une structure de support d'origine fongique. Chez *S. paschale*, les céphalodies sont bien visibles et logées sur la tige principale ou nichées dans les phylloclades b) Chez *Stereocaulon condensatum*, les hyphes de l'ascomycète renferment parfois un assemblage de cyanobactéries et autres bactéries d'origines diverses (*Nostocales* et bactéries pourpres) c) Les colonies de *Stigonema* au centre des céphalodies de *S. paschale* sont enrobées d'un mucilage chitineux d'origine fongique d) Céphalodie de *S. botryosum* ; les hyphes du champignon construisent un support et enrobent entièrement les colonies de cyanobactéries e) Cellules d'*Asterochloris* sp. à l'intérieur d'un pseudopodetion (équivalent du rameau) f) Filaments de *Stigonema* associés à *S. paschale*. Les cellules claires sont des hétérocystes (cellules spécialisées dans la fixation de l'azote) g) Cyanobactéries dans leur première phase de croissance nichées dans les hyphes de *Stereocaulon*.