

**Ministère de l'Enseignement Supérieur  
et de la Recherche Scientifique  
Université SAAD DAHLAB Blida 1  
Faculté des sciences de la nature et de la vie  
Département de Biologie et Physiologie Cellulaire**

***MÉMOIRE DE FIN D'ETUDES***

*En vue de l'obtention de Master*

*en Biologie*

*filière Sciences Biologiques*

*Option : Génétique et physiologie*

**Étude génomique de la phyllosphère du  
pistachier de l'atlas tout au long d'un  
gradient d'aridité croissant**

Présenté par :  
SEKKOUTI Salaheddine

Devant le jury :

-M <sup>me</sup> KHALDOUN H.	MCB	U BLIDA	Présidente
-M <sup>me</sup> EDDAÏKRA A.	MAA	U BLIDA	Examinatrice
-M <sup>r</sup> MOHAMED SAID R.	MCB	U BLIDA	Promoteur
-M <sup>me</sup> AIT OUAMER Y.	MAB	U MEDEA	Co-promotrice

Année Universitaire 2016 - 2017

## **Remerciement**

Au terme de ce travail, je tiens particulièrement à exprimer ma profonde gratitude à Monsieur MOHAMED SAID Ramadane, docteur en Biologie animale pour m'avoir donné l'occasion de traiter ce modeste travail à travers ses orientations, sa patience, sa confiance et ses conseils, tout au long de ce parcours scientifique.

J'exprime également mes sincères remerciements à madame AIT OUAMEUR Yasmine, Doctorante à l'université de Djelfa, qui m'a fait l'honneur d'accepter d'être ma Co-promotrice et de m'avoir permis de réaliser cette étude à partir de ces données de séquençage personnelles, aussi pour ses orientations, sa confiance et ses conseils, durant mon stage.

Que Monsieur BRAHIM ERRAHMANI Mohamed, docteur en Chimie-Physique à l'université Blida1 trouve ici l'expression de ma profonde gratitude pour avoir accepté de vérifier ce travail et les résultats obtenus et les outils utilisés en biostatistique.

Mes vifs remerciements vont également aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail Et de l'enrichir par leurs propositions.

Enfin, je tiens également à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

## **Dédicaces**

Je dédie ce travail à mes chers parents, qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde gratitude pour leur amour, leur encouragement et leur soutien tout au long de mes études, que DIEU les bénisse ; à :

- Mon regretté grand père,
- Ma grande mère,
- Mes frères,
- Tous mes amis.

## **Résumé**

Les microorganismes sont très présents dans notre quotidien, autour de nous, sur notre peau et absolument sur toutes les surfaces de notre environnement y compris les surfaces des feuilles des arbres, ces derniers sont appelés les microorganismes de la phyllosphère.

Le but de notre étude est de comparer la composition de ces colonies fongiques de la phyllosphère par rapport à leurs écosystème et leurs apparenté génétique.

Pour cela nous avons échantillonné selon un gradient d'aridité croissant entre le bioclimat aride de Djelfa et le subhumide de Médéa sur deux espèces de pistachiers, le pistachier lentisque et le pistachier de l'atlas, ce dernier est endémique de l'atlas algérien.

L'isolation des séquences fongiques phyllosphérique spécifiques de chaque station a démontré une corrélation entre leurs distributions et les paramètres environnementaux ainsi qu'à leurs spécificités-vis-à-vis des espèces hôtes.

Le traitement bio-informatique de nos données a généré des nouvelles espèces de champignons qui vont être indexé dans les banques de données et des séquences qui vont être sujets de correction.

**Les mots clés :** phyllosphère, Pistacia Lentiscus, Pistacia Atlantica, aridité

## **Abstract**

Microorganisms are very present in our dailies, around us, on our skin and absolutely on all the surfaces of our environment including the surfaces of the leaves of the trees, the latter are called the microorganisms of the phyllosphere.

The aim of our study is to compare the composition of these fungal colonies of the phyllosphere with their ecosystems and their related genetics.

For this we have sampled according to a gradient of increasing aridity between the arid bioclimate of Djelfa and the sub-humide of Médéa on two species of pistachio, the pistachio lentisque and the pistachio of the atlas, the latter is endemic of the Algerian atlas.

The isolation of the specific phyllospheric fungal sequences of each station demonstrated a correlation between their distributions and the environmental parameters as well as their specificities-vis-à-vis the host species.

The bioinformatics treatment of our data has generated new species of fungi that will be indexed in databases and sequences that will be subject to correction.

**Keywords:** phyllosphere, *Pistacia Lentiscus*, *Pistacia Atlantica*, aridity

## ملخص

الكائنات الحية الدقيقة متواجدة بكثرة في محيطنا، من حولنا، على بشرتنا وعلى الاطلاق على جميع الأسطح من بيئتنا بما في ذلك أسطح أوراق الأشجار، ويسمى هذا الأخير الكائنات الحية الدقيقة الفيلوسفيرية.

والهدف من دراستنا هو مقارنة تركيبة هذه المستعمرات الفطرية الفيلوسفيرية مع بيئتها الإيكولوجية وعلم الوراثة المتعلقة بها.

لهذا قمنا باختبار عينات وفقا لتدرج الجفاف المتزايد بين المناخ الجاف لمدينة الجلفة و المناخ الشبه رطب لمدينة المدية على نوعين من اشجار الفستق, شجرة الدرو و شجرة الفستق الأطلس و هذا الأخير مستوطن الأطلس الجزائري.

وقد اظهرت تفرقة المعسكرات الفطرية انه توجد علاقة شديدة بين المناخ البيئي و توزعها وايضا بين نوع الشجرة المستعمرة عليها.

وقد ولدت معالجة المعلوماتية الحيوية لبياناتنا أنواع جديدة من الفطريات التي سيتم فهرستها في القواعد البيانات وانواع ستكون عرضة للتصحيح في القواعد البيانية.

**الكلمات الرئيسية:** فيوسفير، بيستاسيا لينتيسكوس، بيستاسيا أتلانتيكا، جفاف

## Liste des Tableaux

**Tableau 1** : données climatiques et positions GPS des stations du Pistachier de l'Atlas

**Tableau 2** : données climatiques et positions GPS des stations du Pistachier Lentisque

**Tableau 3** : les répliques des OTUs dans les stations du pistachier de l'Atlas

**Tableau 4** : Résultats de l'RDP Classifier de certain séquences OTUs

**Tableau 5** : l'analyse des variances entre la composition fongique phyllosphérique et son site

**Tableau 6** : résultats de recherche sur BLASTn des séquences OTUs spécifique aux stations du pistachier de l'Atlas

**Tableau 7** : résultats de recherche sur BLASTn des séquences OTUs spécifique aux stations du pistachier Lentisque

**Tableau 8** : résultats de recherche sur BLASTn des séquences OTUs spécifique aux stations des deux espèces de pistachier

**Tableau 9** : Les OTUs correctement assigné sur BLAST spécifique au pistachier

**Tableau 10** : les OTUs spécifiques aux stations du pistachier de l'Atlas

**Tableau 11** : les OTUs spécifiques aux stations du pistachier lentisque

**Tableau 12** : les OTUs spécifiques aux stations du pistachier lentisque et au pistachier de l'atlas

**Tableau 13** : les OTUs qui ont une fausse attribution dans les bases de données

**Tableau 14** : les OTUs qui n'ont pas d'identification sur les bases de données

**Tableau 15** : tableau de statistiques descriptives des répliques par station

**Tableau 16** : matrice de l'AFC des séquences OTUs

## Liste des figures

**Figure 1** : Photo micrographique de la surface d'un fruit avec des bactéries (B), des levures (Y), et des champignons filamenteux (F). Issu de Buck et al. 2003.

**Figure 2** : Phylums fongiques et nombre d'espèces décrites (Classification extraite de Blackwell, 2011 et nombre d'espèces de, Kirk et al. 2008)

**Figure 3** : Illustration du concept d'espèce phylogénétique avec une phylogénie à trois gènes (adapté de Taylor et al. 2000). La transition entre congruence parmi les branches à l'incongruence (flèche vertes) permet de diagnostiquer le « cloisonnement » des échanges de gène et donc deux espèces phylogénétiques distinctes.

**Figure 4** : Carte de distribution de Pistachier d'Atlas (*Pistacia atlantica*) dans le monde  
Source : Alyafi 1979

**Figure 5** : Certains caractères botaniques chez *P. atlantica* : A, inflorescence mâle ; B, arbre centenaire ; C, fruits à différents stades de maturation ; D, feuille.

**Figure 6** : Carte de distribution de lentisque (*Pistacia lentiscus*) dans le monde. Source : Alyafi 1979

**Figure 7** : Certains caractères botaniques chez *P. lentiscus*. A : inflorescence mâle B : arbuste en stade de fructification et C : fruits en stade de développement

**Figure 8** : Illustration des trois types de réponses possibles des espèces face au changement climatique.

**Figure 9** : Illustration du barcoding gap et du chevauchement. En bleu sont les comparaisons intraspécifique de séquences du marqueur utilisé et en orange les comparaisons interspécifiques.

**Figure 10** : Schéma de l'opéron ribosomal de l'ADN nucléaire des champignons. Le 18S, le 5.8S et le 28S sont des zones très conservées, alors que l'ITS1 et l'ITS2 sont très variables d'une espèce à l'autre, ce qui en fait une cible de choix pour le barcoding.

**Figure 11** : vu satellite en 3D de la station de Sidi Naâmane  
**Figure 12** : vu satellite en 3D de la station de Berrouaghia  
**Figure 13** : vu satellite en 3D de la station de Ain Oussera  
**Figure 14** : vu satellite en 3D de la station de Harbil  
**Figure 15** : vu satellite en 3D de la station de Berrouaghia 2  
**Figure 16** : vu satellite en 3D de la station de El Hamel  
**Figure 17** : mode d'échantillonnage  
**Figure 18** : les résultats du blastn  
**Figure 19** : les résultats de l'ORF dans le sens direct  
**Figure 20** : INTERPRO en cour de recherche d'information sur la protéine  
**Figure 21** : PROSITE en cour de recherche d'information sur la protéine  
**Figure 22** : PFAM en cour de recherche d'information sur la protéine d'étude  
**Figure 23** : les résultats de l'AFC de la distribution des stations en fonction des conditions climatiques  
**Figure 24** : *Alternaria* sp  
**Figure 25** : *Aureobasidium pullulans*  
**Figure 26** : Pleosporales sp  
**Figure 27** : *Phoma*  
**Figure 28** : *Microsphaeropsis olivacea* (*Coniothyrium olivaceum*)  
**Figure 29** : *Rhytidhysterium rufulum*  
**Figure 30** : Aucun résultat trouvé sur BLASTp pour notre séquence protéique  
**Figure 31** : Aucun résultat trouvé sur INTERPRO pour notre séquence protéique  
**Figure 32** : Aucun résultat trouvé sur PROSITE pour notre séquence protéique  
**Figure 33** : Aucun résultat trouvé sur PFAM pour notre séquence protéique  
**Figure 34** : BLAST Basic Local AlignmentSearchTool  
**Figure 35** : Sous-programme de BLAST  
**Figure 36** : BLAST Nucléotides suite  
**Figure 37** : SMS (Sequence Manipulation Suite) programme ORF Finder  
**Figure 38** : INTERPRO analyse des séquences protéiques et leur classification  
**Figure 39** : La base de données des domaines protéiques et familles et sites fonctionnelles  
**Figure 40** : La base de données des larges collections des familles protéique

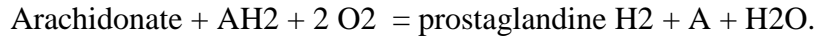


## **Abréviations**

**ADN** : Acide DésoxyriboNucléique  
**AFC** : Analyse Factorielle des Correspondances  
**ANOVA** : Analysis of Variance  
**ARNm** : Acide RiboNucléique messenger  
**BIOGECO** : biodiversité Gènes et Communautés  
**BLAST** : Basic Local Aligement Search Tool  
**BLASTn** : Basic Local Aligement Search Tool nucléotides  
**BLASTp** : Basic Local Aligement Search Tool protéine  
**BLAT** : BLAST Like Aligement Tool  
**CBOL** : Consortium International Barcode of Life  
**CE-SSCP** : Capillary Electrophoresis Single Strand Conformation Polymorphism  
**COX1** : cytochrome oxydase 1  
**DDBJ** : Dna Data Base of Japan  
**Df** : Degrees of Freedom  
**EBI** : Institut Européen de Bioinformatique  
**EMBL** : European Molecular Biology Laboratory  
**F** : F-tests  
**GIEC** : Groupe Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat  
**GPS** : Girault - Poupard/Paillès - Stern  
**HomoloGene** : Homologue Gène  
**HSPs** : High-scoring Segment Pair).  
**iBOL** : International Barcode Of Life  
**Ident** : Identité  
**IPCC** : Panel Intergouvernemental sur le Changement Climatique  
**ITS** : Internal Transcribed Spacer  
**LDL** : Low Density Lipoprotein  
**MOTU** : Molecular Operational Taxonomic Unit  
**MSP** : Maximal Segment Pair  
**NCBI** : National Center for Biotechnology Information  
**ORF** : Open Reading Frame  
**OTU** : Operational Taxonomic Unit  
**PCR** : Polymerase Chain Reaction  
**PFAM** : Protein Families database  
**PIR** : Protein Information Resource  
**Pm** : Pluviométrie moyenne  
**ProbCons** : Probabilistic Consistency-based Multiple Aligment of Amino Acid Sequences  
**PSI-BLAST** : Position-Specific Iterated BLAST  
**Q2** : quotient pluviométrique d'Emberger  
**SEG** : Structure et évolution des génomes  
**SMS** : Séquence Manipulation Suite  
**Sqs** : Sum of squares  
**SWISS-PROT** : Swiss Protein Data Bank  
**Tm** : Température moyenne  
**TrEMBL** : Translated European Molecular Biology Laboratory  
**UPS** : United Parcel Service  
**URL** : Uniform Resource Locator  
**UV-B** : Ultra-Violet B

## Glossaire

**Annotation génomique :** Annotation des génomes. L'annotation des génomes est une analyse informatique des séquences obtenues lors du séquençage permettant d'identifier les séquences informatives des génomes. Ces séquences sont principalement les gènes (on parle alors de prédiction de gènes).



**ARN ribosomique 16S :** L'ARN ribosomique 16S (ARNr 16S) est l'ARN ribosomique constituant la petite sous-unité des ribosomes des procaryotes. Les gènes codant cet ARN sont appelés ADNr 16S (16S rDNA en anglais) et leur séquence est très utilisée en phylogénie pour reconstruire l'histoire évolutive des organismes dans la mesure où sa vitesse d'évolution relativement lente permet d'établir des divergences génétiques anciennes. Ces gènes sont présents en plusieurs copies au sein de chaque organisme.

**BLAST :** il trouve des régions de similarité entre les séquences biologiques. Le programme compare les séquences nucléotidiques ou protéiques aux bases de données séquentielles et calcule la signification statistique.

**CE-SSCP :** CE-SSCP est une technique d'analyse structurale dans laquelle des fragments d'ADN monocaténares de même longueur sont séparés en fonction de leur séquence.

Cette enzyme permet la formation des prostanoïdes (prostaglandines et thromboxanes) à partir de l'acide arachidonique. Son action est inhibée par les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) comme l'aspirine.

**COX1 :** Une cyclo-oxygénase (COX), ou prostaglandine-endoperoxyde synthase (PTGS), est une oxydoréductase qui catalyse la réaction :

**Domaine protéique :** Un domaine protéique est une partie d'une protéine capable d'adopter une structure de manière autonome ou partiellement autonome du reste de la molécule. C'est un élément modulaire de la structure des protéines qui peuvent ainsi être composées de l'assemblage de plusieurs de ces domaines. On parle alors de protéine multidomaine.

**Endémique :** En médecine, une maladie est dite endémique d'une région si elle y sévit de manière permanente. En biologie, une espèce est dite endémique d'une région déterminée si elle n'existe que là.

**Endophytes :** Les endophytes sont des organismes (bactéries ou champignons en général) qui accomplissent tout ou partie de leur cycle de vie à l'intérieur d'une plante

**Phyllosphère :** En microbiologie, la phyllosphère est l'ensemble des parties des plantes situées au-dessus du niveau du sol et considéré comme habitat pour les micro-organismes

**Phylum :** En systématique, l'embranchement (ou phylum) est le deuxième niveau de classification classique des espèces vivantes. Un embranchement a été défini originellement comme correspondant à un plan d'organisation particulier. Embranchement et division sont synonymes mais ne sont pas utilisés dans les mêmes règnes.

**Pyroséquençage :** Le pyroséquençage est une technique qui permet d'effectuer un séquençage rapide et à moindre coût qu'un séquençage par la méthode de Sanger. En effet, cette technique ne nécessite pas de clonage (donc gain de temps et d'argent), et permet une lecture directe de la séquence obtenue après le séquençage.

**Rhizosphère :** La rhizosphère est la région du sol directement formée et influencée par les racines et les micro-organismes associés qui font partie du microbiote des végétaux. Cette zone est réduite à une ou deux dizaines de centimètres d'épaisseur sous des pelouses ou des prairies, mais elle est parfois beaucoup plus épaisse dans les forêts des zones tempérées.

**Séquences homologues :** La similarité est une quantité qui se mesure en % d'identité, identité elle-même définie comme une ressemblance parfaite entre deux séquences. L'homologie quant à elle est une propriété de séquences qui a une connotation évolutive. Deux séquences sont dites homologues si elles possèdent un ancêtre commun.

# Sommaire

## Chapitre I : Synthèse Bibliographique

Introduction .....	1
La phyllosphère	
1.1 Définitions phyllosphère, endophytes, épiphytes .....	2
1.2 La colonisation de la phyllosphère durant la saison végétative .....	3
1.3 Diversité et variabilité spatiale des assemblages fongiques de la phyllosphère .....	3
1.4 Rôle écologique des champignons de la phyllosphère .....	4
Les champignons	
2.1 Les phylums fongiques .....	5
2.2 Le concept d'espèce chez les champignons .....	6
2.3 Fonctions écologiques de certains champignons phyllosphériques .....	7
2.4 Communautés fongiques dans la phyllosphère .....	8
Le Pistachier	
3.1 Intérêt médicinal du pistachier .....	8
3.2 Pistachier d'Atlas ( <i>Pistacia atlantica</i> ) .....	8
3.2.1 Etymologie .....	9
3.2.2 Systématique .....	9
3.2.3 Caractère botanique et écologique .....	10
3.3 Pistachier lentisque ( <i>Pistacia lentiscus</i> ) .....	10
3.3.1 Etymologie .....	11
3.3.2 Systématique .....	11
3.3.3 Caractère botanique et écologique .....	11
Changement climatique & impacts écologiques sur la phyllosphère du pistachier	
4.1 Définition et scénarios .....	12
4.2 Réponses possibles des espèces .....	13
4.3 La singularité du climat méditerranéen .....	14
4.4 Les indices climatiques .....	14
4.4.1 L'indice d'aridité d'E. de Martonne .....	14
4.4.2 Le quotient pluviométrique d'Emberger .....	15
5. Pyroséquençage .....	15
6. Barcoding .....	15
i. Définition & historique .....	15
ii. Les points faibles du barcoding .....	16
iii. Barcoding chez les champignons .....	17

## Chapitre II : Matériels & méthodes

1. Objectif .....	19
2. Les stations d'étude .....	19
a. Stations du pistacher de l'Atlas .....	20
i. Station Sidi Naâmane .....	20
ii. Station Berrouaghia 1 .....	21
iii. Station Ain Oussara .....	21
b. Stations de l'espèce du pistacher Lentisque .....	22
i. Station de Harbil .....	22
ii. Station Berrouaghia 2 .....	23
iii. Station El Hamel .....	23
c. L'échantillonnage .....	24
i. Préparation des échantillons .....	25
3. Matériels .....	28
4. Méthodes .....	28
a. Annotation génomique .....	28
i. Le BLAST de séquences OTUs .....	28
b. Les ORFs des séquences OTUs .....	29
c. Les domaines protéiques des séquences OTUs .....	30
i. INTERPRO .....	30
ii. PROSITE .....	31
iii. PFAM.....	32

## Chapitre III : Résultats et discussions

### Etude d'ensembles statistiques des assemblages fongiques

1. Statistique descriptive .....	33
2. ANOVA multifactoriel.....	33
3. AFC Analyse Factorielle des Correspondances .....	33
4. Isolation des OTUs les plus significatifs .....	35
a. L'identification des gènes des séquences OTUs .....	35
i. OTUs gènes spécifique aux stations de l'Atlas .....	35
ii. OTUs gènes spécifique aux stations du Lentisque .....	36
iii. OTUs gène en commun entre les deux stations .....	37
b. OTUs espèces .....	37
c. OTUs stations .....	40
i. Stations du pistachier de l'Atlas .....	40
ii. Stations du pistachier Lentisque .....	41
iii. Stations du pistachier lentisque et du pistachier de l'atlas .....	42
5. Les OTUs non assignées .....	43
a. Annotation .....	43
Discussions .....	47
Conclusion .....	50
Annexe	
Références bibliographique	

## Introduction

Il existe deux définitions de la phyllosphère dans la littérature, l'une désigne l'habitat fournis par l'ensemble des parties aériennes des plantes (*Lindow&Brandl, 2003*) et l'autre désigne seulement la partie foliaire des plantes (*Jumpponen& Jones, 2009*). Ces feuilles et autres parties aériennes abritent de nombreuses espèces bactériennes et fongiques sous forme de levures, de champignons filamenteux ou encore de spores en dormance (*Lindow&Brandl, 2003*).

Dans cette étude, la phyllosphère fait référence à la partie foliaire des plantes.

Aussi vrai que la composition phyllosphériques a été déterminée chez certaines espèces, son origine reste mal connue, en premier lieu, les variations climatiques changerai considérablement la structure et l'assemblage de ces microorganismes (*comptant, 2010*). Il se pourrait aussi qu'elle soit liée à la génétique de l'espèce (*cordier et al, 2012*), en l'occurrence a tous ce qui caractérise ses traits foliaires comme les huiles essentielles et les phénols (*yadav 2008*), cas du pistachier lentisque qui présente d'importantes propriétés aromatiques.

L'objectif principal de ce travail est d'étudier les effets relatifs de l'espèce hôte et du climat sur les assemblages fongiques de la phyllosphère d'une part et d'autre part déterminer par des outils bioinformatique et statistique des 520 séquences OTUs (Unité taxonomique opérationnelle) les différences entre les communautés fongiques, leurs compositions et leurs structures.

Pour notre étude nous avons pris pour model deux espèces de pistachiers, *Pistacia lentiscus* et *Pistacia atlantica*, cette dernière est endémique a l'atlas algérien. De par sa dioécie et ses fleurs nues, *Pistacia* est un genre particulier des Anacardiées pouvant constituer une famille à part : les Pistaciacées (*Gaussen et al. 1982*).

Ces deux espèces sont différente par **le type de leurs feuillage**, les feuilles du lentisque sont persistantes tandis que celles de l'Atlas sont caduques, **la structure de l'arbre** n'est pas la même non plus, l'Atlas est un grand arbre et le lentisque se présente sous forme d'arbuste, enfin, l'Atlas préfère les milieux aride alors que le lentisque s'étend jusqu'aux milieux humides, ces différences présentent un grand intérêt pour cette étude comparative.

Les communautés bactériennes de La phyllosphère du pistachier lentisque ont été déjà étudiées, notamment par rapport à la composition des feuilles en huiles essentiels (*Yadav 2008*), mais aussi à l'interaction des facteurs chimiques avec les microorganismes (*yadav 2005*) et à leur réaction face à la variation de l'écosystème (*vouku 2012 et al.*).

## La phyllosphère

### 1.1 Définitions phyllosphère, endophytes, épiphytes

Il existe deux définitions de la phyllosphère dans la littérature, l'une désigne l'habitat fourni par l'ensemble des parties aériennes des plantes (Lindow&Brandl, 2003) et l'autre désigne seulement la partie foliaire des plantes (Jumpponen& Jones, 2009). Ces feuilles et autres parties aériennes abritent de nombreuses espèces bactériennes et fongiques sous forme de levures, de champignons filamenteux ou encore de spores en dormance (Lindow&Brandl, 2003, (Figure 1) Dans cet ouvrage, la phyllosphère fait référence à la partie foliaire des plantes. La surface foliaire totale sur le globe est estimée à  $4 \times 10^8 \text{ km}^2$  (Morris & Kinkel, 2002), soit plus que deux fois la surface couverte par les continents.

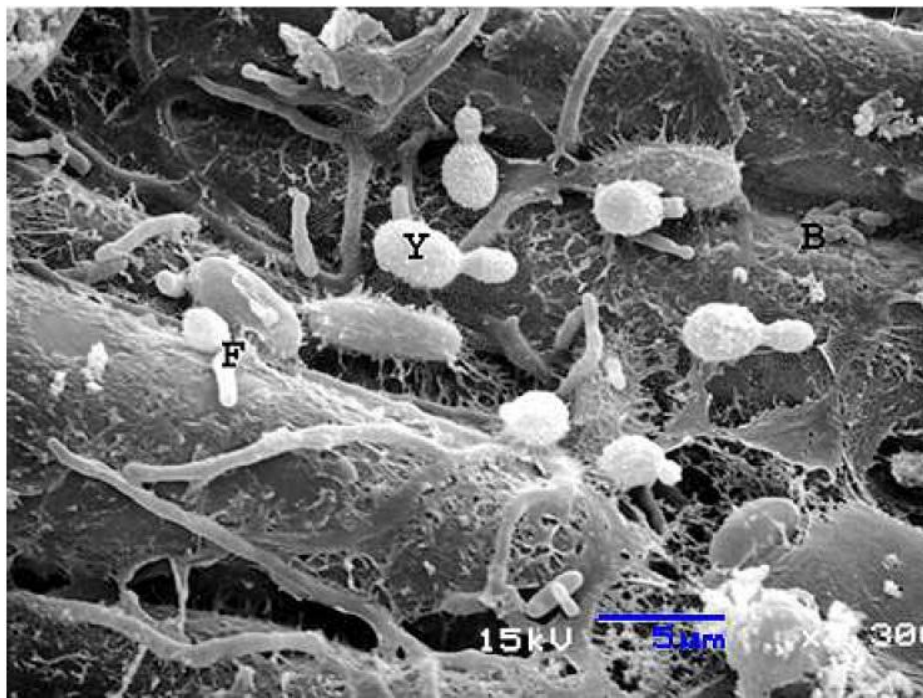


Figure 1 : Photo micrographique de la surface d'un fruit avec des bactéries (B), des levures (Y), et des champignons filamenteux (F). Issu de Buck et al. 2003.

Ces organismes peuvent être soit épiphytes en vivant sur la surface des feuilles (Inacio et al. 2002), soit endophytes vivant à l'intérieur des tissus, dans les espaces inter-cellulaires des feuilles (Arnold et al. 2000 ; Rodriguez et al. 2009). La distinction entre le statut d'endophyte et d'épiphyte n'est pas évidente. En effet, certaines espèces microbiennes peuvent

activement pénétrer les tissus de la feuille pour devenir endophytes (Viret et al. 1994 ; Wilson et al. 1999).

### **1.2 La colonisation de la phyllosphère durant la saison végétative**

Au cours d'une saison végétative, la biomasse microbienne de la phyllosphère a tendance à augmenter (Thompson et al. 1993 ; Inácio et al. 2002). On observe généralement une succession des populations microbiennes, avec une majorité de bactéries après débourrement, ensuite une majorité de levures, et enfin une majorité de champignons filamenteux en fin de saison (Kinkel, 1997). Des variations saisonnières d'abondance des 17 espèces fongiques, plus que des variations de type présence/absence, ont été montrées pour la majorité des endophytes et épiphytes dominants les assemblages, alors que quelques espèces dominantes sont constantes (Kinkel, 1997 ; Osono&Morri, 2005 ; Göre&Bucak, 2007 ; Guo et al. 2008)

Ce même patron a également été montré avec du pyroséquençage, avec plus d'un tiers des espèces dynamiques dans la saison et les deux autres tiers constants dans la saison (Jumpponen& Jones, 2010). Les sources de microorganismes colonisant la phyllosphère sont multiples.

Les épiphytes peuvent coloniser la surface foliaire via l'atmosphère (Talley et al. 2002 ; Levetin et al. 2006), les insectes (Coluccio et al. 2008, Feldman et al. 2008), les projections par la pluie (Wilson & Carroll, 1994) ou encore par les oiseaux.

L'inoculum ambiant peut varier qualitativement et quantitativement en fonction du cycle de vie des champignons, en réponse à l'environnement comme la pluie, aux températures extrêmes ou au vent (Kinkel, 1997 ; Talley et al. 2002). Il a aussi été montré que des bactéries du sol peuvent coloniser l'intérieur des racines et devenir endophytes dans les feuilles via le système vasculaire de la plante (Lamb et al. 1996 ; Wulff et al. 2003).

### **1.3 Diversité et variabilité spatiale des assemblages fongiques de la phyllosphère**

La phyllosphère des arbres forestiers abrite de très nombreuses espèces fongiques, avec presque 350 espèces différentes isolées à partir de 83 feuilles de *Heisteriacinna* ou de *Ouratealucens* (Arnold et al. 2000) ou encore jusqu'à 700 espèces moléculaires (ou MOTUs, pour Molecular Operational Taxonomic Unit) sur un seul arbre (Jumpponen& Jones, 2009). Ce compartiment microbien pourrait abriter une proportion importante de champignons inconnus (Blackwell, 2011 ; Porras&Bayman, 2011). Ces assemblages fongiques sont dominés par quelques groupes seulement, que ce soit pour les endophytes (Sahashi et al.



1999 ; Arnold et al. 2007 ; Hashizume et al. 2008), ou pour les épiphytes (Inácio et al. 2002 ; Inácio et al. 2010). Ceci est également vrai dans les études récentes utilisant des méthodes moléculaires, donc sans distinction entre épiphytes et endophytes (Jumpponen & Jones, 2009 ; Jumpponen & Jones, 2010 ; Unterseher et al. 2011).

#### **1.4 Rôle écologique des champignons de la phyllosphère**

De plus en plus d'études mettent en évidence l'influence des champignons de la phyllosphère sur la fitness des plantes hôtes. Par exemple, les pathogènes diminuent la fitness de leur hôte (Gilbert 2002 ; Newton et al. 2010) et agissent comme moteur de biodiversité (Bradley et al. 2008). Certaines espèces mutualistes améliorent la fitness de leur hôte en limitant les attaques d'insectes herbivores par la production d'alcaloïdes toxiques (Wilkinson et al. 2000), en limitant les infections par d'autres champignons pathogènes (Arnold et al. 2003), ou en augmentant la résistance aux stress environnementaux (Rodriguez & Redman, 2007). De plus, ils sont considérés comme dégradateurs précoces de la litière forestière, participant au recyclage de la matière organique (Osono, 2006). Ces organismes sont donc des acteurs majeurs structurant les communautés végétales (Clay & Holah, 1999 ; Bradley et al. 2008). Certaines associations complexes, impliquant un virus infectant un champignon mutualiste d'une plante, peuvent permettre à cette plante de survivre à des conditions extrêmes de température (65°C) durant plusieurs jours, alors que ni le champignon ni la plante ne le pourrait seul (Redman et al. 2002 ; Márquez et al. 2007).

De telles associations auraient un impact majeur dans le contexte du réchauffement climatique, en modifiant les tolérances physiologiques d'une plante au climat, et donc sa capacité à coloniser de nouveaux milieux ou à s'adapter à des nouvelles conditions environnementales.

## Les champignons

### 2.1 Les phylums fongiques

Les champignons sont un règne du vivant regroupant 99000 espèces en une dizaine de phylums et dont la classification est régulièrement revue (James et al. 2006 ; Hibbet et al. 2007 ; McLaughlin et al. 2009, Blackwell, 2011). Parmi les phylums les plus importants, on retrouve les *Chytridiomycota*, les *Zygomycota*, les *Gloméromycota*, les *Basidiomycota* et les *Ascomycota*. Ces deux derniers phylums (classés dans le sous règne des Dikarya) regroupent la grande majorité des espèces décrites à ce jour (Figure 2).

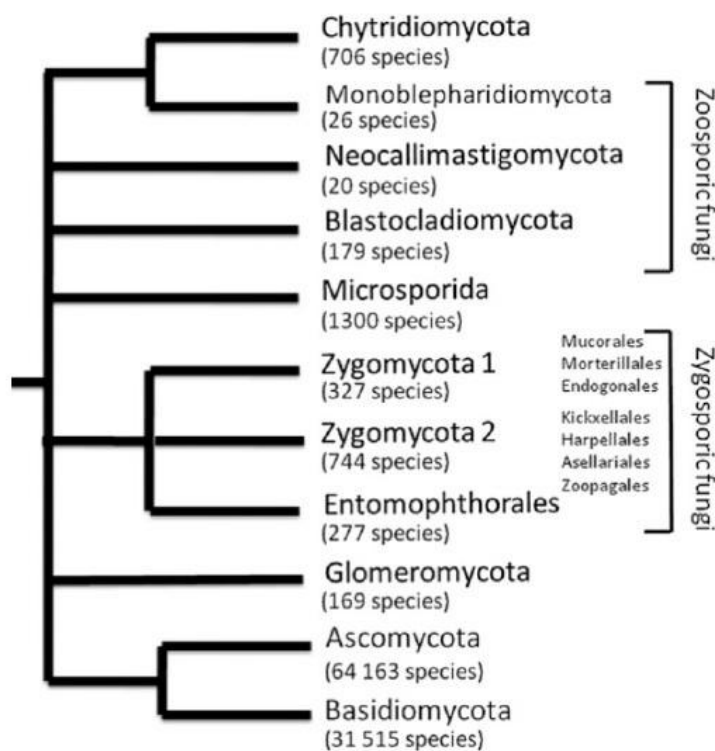


Figure 2 : Phylums fongiques et nombre d'espèces décrites (Classification extraite de Blackwell, 2011 et nombre d'espèces de, Kirk et al. 2008)

Les Chytridiomycota regroupent les espèces produisant des spores uniflagellées (zoospores), témoignant d'une vie majoritairement aquatique, et constituent la lignée évolutive la plus ancienne des champignons (James et al. 2006). Le groupe des Zygomycota est plus récent, il regroupe de nombreux saprotrophes et parasites d'insectes. Les Gloméromycota regroupent des champignons symbiotiques et biotrophes stricts de plantes, qui forment des mycorhizes à arbuscules. Les Ascomycota regroupent les champignons à lichens, de nombreux pathogènes des plantes, des levures utiles pour l'homme (*Saccharomyces cerevisiae*).

Les Basidiomycota regroupent la majorité des champignons mycorhiziens à carpophores, mais aussi des parasites des plantes et des levures. Les phylogénies moléculaires des

champignons sont régulièrement remises en question suite à la découverte de nouvelles espèces, l'intégration de séquences environnementales et les avancées dans les méthodes de reconstruction phylogénétique. Ainsi, les Cryptomycota ont récemment été ajoutés à la classification (Jones et al. 2011).

## **2.2 Le concept d'espèce chez les champignons**

L'étude d'une communauté nécessite l'identification des individus qui la compose. L'identification repose sur une classification des individus en groupes partageant des caractéristiques communes, ces critères peuvent être morphologiques, biologiques et génétiques et servent à définir l'unité d'étude dans les études d'écologie des communautés : l'espèce.

Même si l'espèce constitue l'unité la plus importante en biologie, la définition du terme est encore soumise à controverse (Hausdorf, 2011). Un seul concept ou une seule définition de l'espèce n'est pas applicable à tous les domaines du vivant.

Le concept d'espèce phénétique (ou morphologique) a été le seul moyen de classer les espèces avant l'usage des outils moléculaires. Une espèce morphologique est définie sur des critères phénotypiques et se différencie d'une autre sur la base de ces mêmes critères. Ces critères peuvent aboutir à des classifications ne reflétant pas forcément les relations évolutives (phylogénétiques), et selon les critères sélectionnés, les relations ou frontières entre espèces peuvent bouger.

De plus, la plasticité phénotypique d'un caractère, le stade de vie ou encore le sexe biologique du spécimen au moment de son observation peut conduire à une classification incorrecte. La classification des individus sur la base de critères morphologiques demande donc souvent un haut niveau d'expertise. Chez les champignons, les critères morphologiques utilisés sont la plupart du temps l'organisation et la morphologie des organes de reproduction (sexués et/ou asexués), la pigmentation du mycélium, la production de métabolites secondaires, le type de reproduction sexuée (homothallique ou hétérothallique), les vitesses et extrêmes de croissance, ou les compatibilités sexuelles et végétatives (Taylor et al. 2000).

Le concept d'espèce phylogénétique est défini chez les eucaryotes (sensu Cracraft, 1983, cité par Taylor et al. 2000) comme étant le plus petit agrégat identifiable de populations ou de lignées partageant une combinaison unique de caractères (gènes) et partageant un même ancêtre commun, c'est-à-dire un cluster monophylétique (Figure 3).

Ce concept d'espèce est aujourd'hui le plus utilisé chez les champignons, puisque il a permis de mettre à jour de nombreux complexes d'espèces cryptiques, c'est à dire morphologiquement identiques (Giraud et al. 2008 ; Mougouet al. 2008).

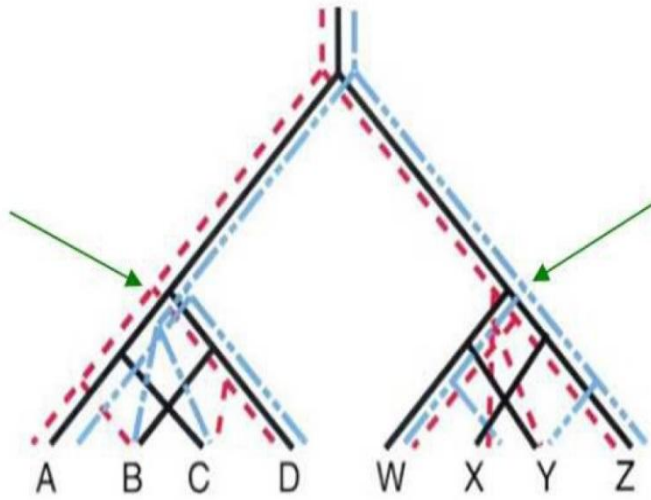


Figure 3 : Illustration du concept d'espèce phylogénétique avec une phylogénie à trois gènes (adapté de Taylor et al. 2000). La transition entre congruence parmi les branches à l'incongruence (flèche vertes) permet de diagnostiquer le « cloisonnement » des échanges de gène et donc deux espèces phylogénétiques distinctes.

### 2.3 Fonctions écologiques de certains champignons phyllosphériques

Les champignons sont une composante essentielle du fonctionnement des écosystèmes. Ils sont hétérotrophes, c'est-à-dire que leur source de composés hydrocarbonés est exogène, contrairement aux plantes et certaines bactéries photosynthétiques. En tant que saprophytes, ils permettent le recyclage, par des voies métaboliques complexes, de la matière organique végétale et animale en éléments minéraux disponibles pour les plantes (van der Heijden et al. 2008). En tant que mutualistes de végétaux, ils facilitent la nutrition hydrique et minérale et augmentent ainsi la productivité primaire (Courty et al. 2010). Enfin en tant que parasites, ils causent des mortalités et peuvent structurer ainsi directement les communautés végétales et animales (Gilbert et al. 2002 ; Newton et al. 2010) et indirectement les organismes dépendant de ces hôtes par cascade trophique (Morris & Robertson, 2005).

Jadis l'étude des champignons se faisait par culture en milieu artificiel, mais ces dernières décennies et l'avènement des méthodes moléculaires, l'étude des champignons a connu un nouvel essor (Peay et al. 2008).

## **2.4 Communautés fongiques dans la phyllosphère**

Les surfaces foliaires des végétaux soutiennent également une communauté diversifiée de champignons, cependant la taille de leur population est généralement inférieure à celle des bactéries. Les communautés fongiques phyllosphériques influent sur la forme physique de leurs plantes hôtes (Herre et al, 2007 ; Sunshine et al, 2009). Par rapport aux communautés bactériennes, il est relativement peu connu de la structure et de la fonction des communautés fongiques sur les surfaces des feuilles ou de la façon dont les champignons affectent la composition de la communauté bactérienne.

## **Le Pistachier**

### **3.1 Intérêt médicinal du pistachier**

Jusqu'à maintenant, cinq grandes études (the AdventistHealthStudy, The Physicians' HealthStudy, The Iowa WomenHealthStudy, the Nurses' healthStudy and the CARE study) ont examiné la relation entre la consommation de fruits oléagineux et l'incidence des maladies cardiovasculaires.

Toutes ont trouvé un effet bénéfique de la consommation des fruits oléagineux. Ceci est principalement dû à la teneur en matières grasses de ces fruits. Les acides gras mono insaturés ont un effet reconnu sur la réduction du cholestérol total et LDL. Le magnésium, le cuivre, l'acide folique, le potassium, les fibres et la vitamine E présents dans les pistaches peuvent aussi jouer un rôle dans la prévention des maladies cardiovasculaires. Certains médecins préconisent l'emploi du mastic extrait du pistachier lentisque contre les infections pulmonaires, urinaires et douleurs d'estomac. En Algérie, on utilise les racines moulues mélangées avec de l'huile contre la toux infantile, et en Iran on utilise les téguments des pistaches contre les diarrhées excessives.

### **3.2 Pistachier d'Atlas (*Pistacia atlantica*)**

Il existe principalement sur les hauteurs (800 – 1200 m) au-dessus du niveau de la mer (Figure 4). Son système racinaire très puissant lui permet de pousser sur les sols calcaires et de résister à la sécheresse, c'est pour cette raison qu'il est préconisé comme porte greffe pour le pistachier vrai qui forme après le greffage un arbre très vigoureux ce qui va influencer sur ces besoins alimentaires grandissants. Cependant, il présente un taux faible de la germination de ces graines et une croissance lente durant les premières années (MAARUF, A, 1997).

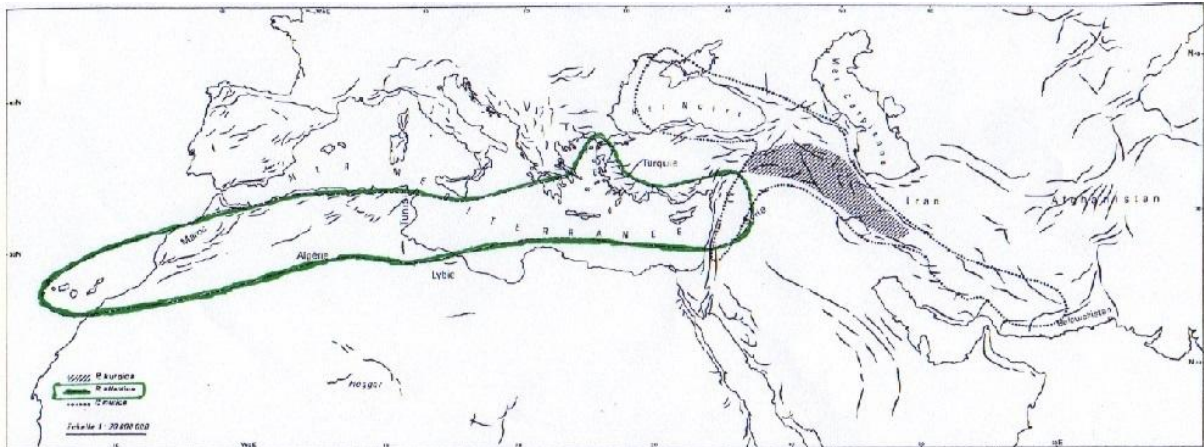


Figure 4 : Carte de distribution de Pistachier d'Atlas (*Pistacia atlantica*) dans le monde

Source : Alyafi 1979

### 3.2.1 Etymologie

Le genre botanique *Pistacia* (les pistachiers) regroupe 9 espèces d'arbustes appartenant à l'ordre des Sapindales et à la famille des Anacardiaceae. D'origine asiatique ou méditerranéenne, les pistachiers sont des arbustes dioïques (fleurs mâles et femelles poussant sur des arbustes différents). Les fleurs, plus ou moins marrons, sont groupées en racèmes. Les fruits sont des drupes.

### 3.2.2 Systématique

**Règne** : Plantae. Sous règne : tracheobionta ou Plantes vasculaires

**Embranchement** : Magnoliophyta ou Spermaphytes angiospermes

**Classe** : Magnoliopsida ou Dicotylédones.

**Sous classe** : Rosidae

**Ordre** : Sapindales

**Famille** : Anacardiaceae

**Genre** : *Pistacia*

**Espèce** : *Pistacia atlantica*

### 3.2.3 Caractère botanique et écologique

Le pistachier de l'Atlas est un arbre à feuilles caduques, pouvant atteindre 15 à 25 m de haut. Il est connu par sa longue longévité (Zohary, 1987), des sujets de 2.5 m de circonférence ont un âge voisin de 200 ans et pour les plus vieux d'entre eux, ils peuvent atteindre 300 ans (Monjauze, 1968). La frondaison est en boule dans le jeune âge puis devient hémisphérique plus tard (Nègre, 1962). Ses racines sont très pivotantes pouvant atteindre 5 m de profondeur (Monjauze, 1968). (Figure 5)



Figure 5 : Certains caractères botaniques chez *P. atlantica* : A, inflorescence mâle ; B, arbre centenaire ; C, fruits à différents stades de maturation ; D, feuille.

### 3.3 Pistachier lentisque (*Pistacia lentiscus*)

Le lentisque est en général un arbrisseau pouvant atteindre trois mètres, c'est parfois aussi un arbuste ne dépassant pas six mètres et on le trouve à des hauteurs variant entre 0 – 800 m. Il se distingue des deux autres espèces de pistachiers méditerranéens (notamment *Pistacia terebinthus* L. ou térébinthe) par ses feuilles ayant un nombre pair de folioles : son feuillage est persistant, les feuilles, composées, sont paripennées. Autrement dit, elles se terminent par une paire de folioles, tandis que celles des autres pistachiers se terminent par une seule foliole. Le rachis portant les folioles est ailé. Il est localisé généralement dans les pays du bassin méditerranéen (Figure 6). Il n'est pas utilisé comme porte greffe dans le greffage du pistachier vrai à cause d'incompatibilité entre eux (FERGUSON, 1993).



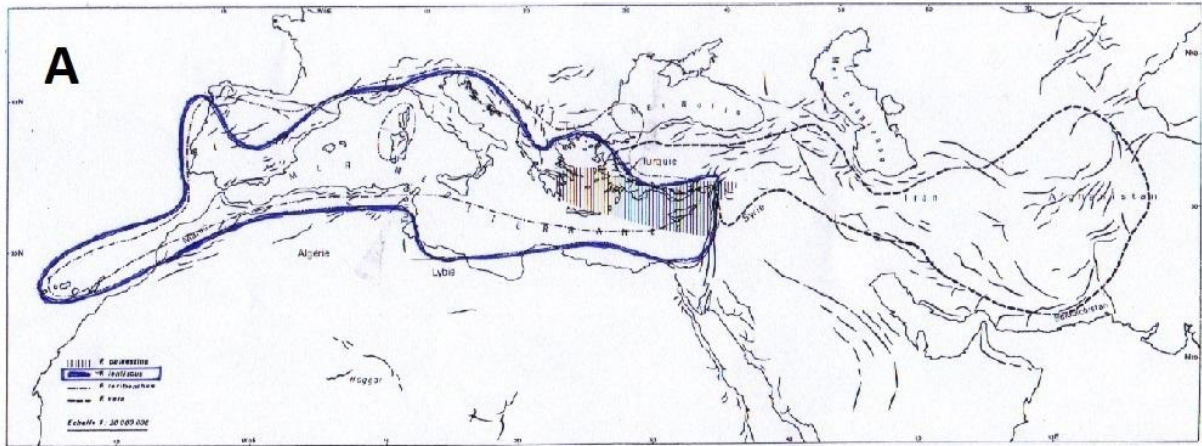


Figure 6 : Carte de distribution de lentisque (*Pistacia lentiscus*) dans le monde. Source :  
Alyafi 1979

### 3.3.1 Étymologie

L'Arbre au mastic, ou Pistachier lentisque (*Pistacia lentiscus* L.) est un arbuste poussant dans les garrigues et les maquis des climats méditerranéens. Plante de la famille des Anacardiaceae, à feuillage persistant, elle donne des fruits, d'abord rouges, puis noirs.

### 3.3.2 Systématique

**Règne** : Plantae. Sous règne : tracheobionta ou Plantes vasculaires

**Embranchement** : Magnoliophyta ou Spermaphytes angiospermes

**Classe** : Magnoliopsida ou Dicotylédones.

**Sous classe** : Rosidae

**Ordre** : Sapindales

**Famille** : Anacardiaceae

**Genre** : *Pistacia*

**Espèce** : *Pistacia lentiscus*

### 3.3.3 Caractère botanique et écologique

Le lentisque est un arbuste sclérophylle à feuilles persistantes, à odeur de résine fortement âcre et à croissance très lente. D'une hauteur de 2m, il peut cependant atteindre la taille d'un arbre lorsqu'il est dans des sites humides et protégés (Munné-Bosch et Peñuelas, 2003). Cette espèce est classée dans la section d'Eu-Lentiscus à côté de *P. weinmannifolia* Poisson, et *P. saportae* (Zohary, 1952). Les feuilles ont une durée de vie de 2 ans (Ain-Lhout et al. 2004) à rachis ailé, paripennées, composées de 2-3 paires de folioles coriaces, vert sombre



qui sont largement lancéolées, obtuses au sommet, brillantes au-dessus et de taille allant de 1.5-3cm. (Figure 7)



Figure 7 : Certains caractères botaniques chez *P. lentiscus*. A : inflorescence mâle B : arbuste en stade de fructification et C : fruits en stade de développement

## **Changement climatique & impacts écologiques sur la phyllosphère du pistachier**

### **4.1 Définition et scénarios**

Les experts du Groupe Intergouvernemental sur l'Évolution du Climat (GIEC) définissent le changement climatique comme une modification durable (de l'ordre de plusieurs décennies) des paramètres climatiques (température, précipitation) en moyenne et invariabilité, que ce soit pour des raisons naturelles ou anthropiques. Le changement climatique est une des conséquences majeures et la plus médiatisée, des changements globaux. Selon le rapport du panel intergouvernemental sur le changement climatique (IPCC 2007), le climat s'est réchauffé d'environ 0.74°C (0.56 – 0.92) au cours du 20ème siècle, avec une accélération du réchauffement au cours des 30 dernières années.

Selon l'IPCC 2007, ce rapide changement climatique actuel est probablement causé par les activités humaines, par le rapide développement démographique et ses conséquences en termes de consommation des ressources naturelles et d'utilisation des terres. Le changement climatique actuel serait ainsi la conséquence d'une augmentation de la concentration dans l'atmosphère de gaz à effets de serre (CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> et NO<sub>2</sub> surtout) et des perturbations des cycles biogéochimiques (Vitousek, 1994), dont l'explication la plus probable sont les actions humaines.

## 4.2 Réponses possibles des espèces

Des études empiriques ont montré que les réponses écologiques des espèces au changement climatique sont déjà perceptibles (McCarty 2001 ; Walther et al. 2002 ; Parmesan & Yohe 2003 ; Root et al. 2003 ; Thomas et al. 2004 ; Lenoir et al. 2008 ; Bellard et al. 2012). Ces réponses écologiques observées correspondent généralement à des changements de distribution géographique et des changements de phénologie (mais voir Bellard et al. 2012). En effet, face à un changement climatique, les espèces peuvent répondre de trois manières différentes (Figure 8).

Dans un premier cas, l'espèce arrive à migrer vers des conditions qui lui sont favorables, soit en se déplaçant si l'espèce est « mobile », soit avec des extinctions de populations dans les marges chaudes et des colonisations par de nouvelles populations aux limites froides si l'espèce est « immobile » (chez les plantes par exemple). Dans un deuxième cas, l'espèce peut s'adapter aux nouvelles conditions, soit par sélection de populations ayant la meilleure fitness dans l'environnement nouveau, soit par plasticité phénotypique.

Enfin, si la migration ou l'adaptation sont impossibles ou trop lentes par rapport aux changements, la réponse sera de type extinction. Ces types de réponses ont été montrés pour une large gamme de groupes taxonomiques, incluant les plantes (Peñuelas & Broada 2003, Lenoir et al. 2008), les oiseaux (Devictoret al. 2008), le zooplancton (Beaugrand et al. 2009). Ces trois types de changements engendrent à leur tour des changements de composition des communautés, d'interactions biotiques au sein des communautés et de fonctionnement des écosystèmes.

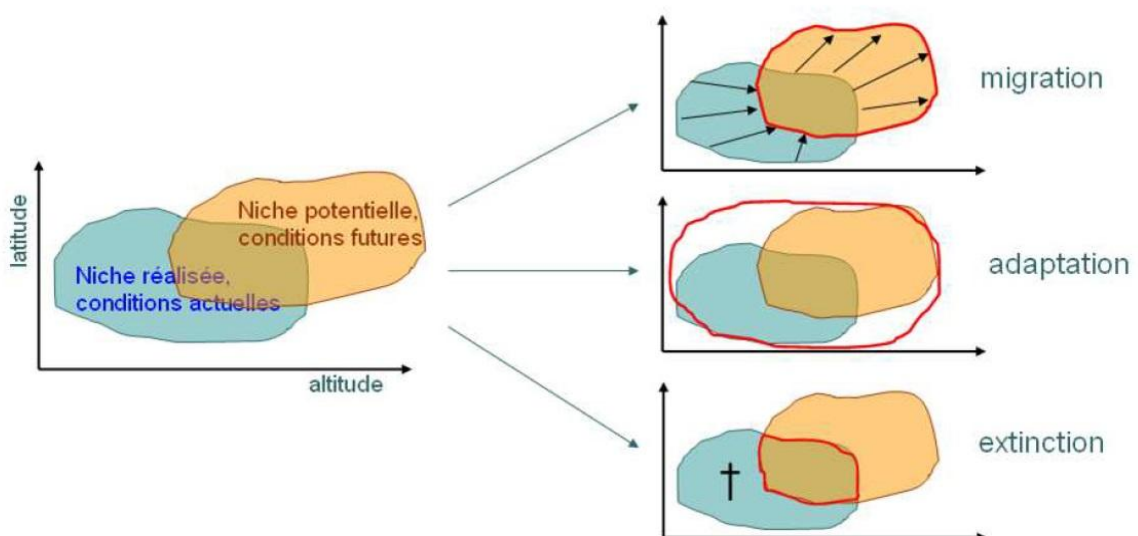


Figure 8 : Illustration des trois types de réponses possibles des espèces face au changement climatique.

### **4.3 La singularité du climat méditerranéen**

Les climats méditerranéens sont caractérisés par une période de sécheresse estivale assez prononcée marquée par des températures et insolation lumineuses élevées et dans le cas extrême par l'absence totale de précipitations (Di Castri, 1973). Cette période de sécheresse peut s'étaler sur la totalité de l'année, c'est le cas de certaines régions du Sahara Algérien. A cette contrainte hydrique s'ajoute la salinité qui caractérise essentiellement les zones semi-arides et arides (Chatzissavvidis et al, 2008) et qui touche actuellement 7% des terres mondiales (Zhu, 2002).

Certaines régions sont montagneuses notamment la Kabylie qui abrite une végétation adaptée aux conditions de vie extrêmes en altitude telles la baisse de température, augmentation de vents violents et l'exposition aux radiations lumineuses intenses essentiellement les UV-B et l'ozone (Kofidis et al, 2003).

Ces trois facteurs de stress abiotiques menacent les forêts méditerranéens réduisant par conséquent leurs superficies. Ils induisent souvent un changement dans la plupart des processus physiologiques et biochimiques des arbres affectant ainsi leur croissance et leur développement (Popova et Golldack, 2007 ; wahid et al, 2007 ; Zhou et al, 2010).

### **4.4 Les indices climatiques**

L'indice climatique, en climatologie, est à la fois une mesure de base et une combinaison à partir de ces mesures qui doit être bien différenciée pour caractériser un climat, valeur quantitative ou qualitative, parfois adimensionnelle, caractérisant l'état d'un système de façon indirecte. Ils sont utilisés en fonction du milieu.

#### **4.4.1 L'indice d'aridité d'E. de Martonne**

Cet indice (annuel ou mensuel) se calcule de la façon suivante :

- Indice Annuel :  $I = P / (T+10)$
- Indice Mensuel :  $I = 12 \times P / (T+10)$

Avec :

P : précipitation totales annuelles (mensuel si l'indice est calculé mensuellement)

T : température moyenne annuelle (ou mensuelle)

#### 4.4.2 Le quotient pluviométrique d'Emberger

L'amplitude thermique étant un facteur important de la répartition de la végétation, Emberger a proposé l'indice suivant pour les climats de la région méditerranéenne

- $Q = P / ((M+m) (M-m))$

Avec :

M : moyenne des maxima des mois les plus chaudes

m : moyenne des minima des mois les plus froids

P : précipitations totales annuelles

### 5. Pyroséquençage

Le pyroséquençage 454 permet d'obtenir environ un million de lectures de 500 paires de bases par plaque de séquençage sans passer par une étape de clonage (Shendure & Ji, 2008 ; Kircher & Kelso, 2010). Le pyroséquençage est quantitatif, c'est-à-dire qu'une copie de séquence présente en forte proportion dans le pool d'amplicons ressortira en autant de copies dans le jeu de séquences (mais voir Amend et al. 2010 ; Berry et al. 2011).

Le pyroséquençage offre une couverture bien plus complète de la communauté microbienne que la CE-SSCP et il donne la possibilité d'identifier taxonomiquement les MOTUs, même si les insuffisances et erreurs d'annotation de séquences dans les bases de données (GenBank) sont régulièrement soulevées comme limite (Bridge et al. 2003 ; Nilsson et al. 2006).

Le pyroséquençage est donc bien plus prometteur que la CE-SSCP pour les études d'écologie microbienne.

### 6. Barcoding

#### 6.1. Définition & historique

Le barcoding désigne l'usage d'un marqueur génétique standard court pour identifier un organisme au niveau spécifique. L'idée est de développer un moyen simple, rapide et utilisable par des non experts, d'identifier une espèce. Le terme « barcode ADN » a été pour la première fois employé dans une étude sur *Plasmodium falciparum* (l'agent responsable de la malaria). Il désignait l'usage d'un gène hyper-variable comme outil pour identifier les différentes lignées d'une espèce et mener ainsi des études de génétique des populations et d'épidémiologie (Arnot et al. 1993). Le terme a été repris en 2003 dans un article proposant

le gène du cytochrome oxydase 1 (COX1) comme barcode pour les animaux supérieurs (Hebert et al. 2003).

La même année, le consortium international Barcode of Life (CBOL) et le projet international Barcode of Life (iBOL) ont réuni des équipes de recherche du monde entier et d'importants moyens financiers ont été déployés pour organiser la constitution de bases de données de séquences et de spécimens de référence.

## **6.2. Les points faibles du barcoding**

L'identification d'une espèce par barcode ADN permet de s'affranchir des limites liées à la morphologie et de délimiter les espèces d'un complexe d'espèces cryptiques (Hebert et al. 2003 ; Witt et al. 2006 ; Valentini et al. 2008).

De plus, l'inventaire des espèces par ce moyen est beaucoup plus rapide et ne requiert pas de spécialisation pour l'identification des différents groupes taxonomiques. Un barcode idéal est un gène orthologue (présent chez toutes les espèces), court (moins de 1000 pb), facilement amplifiable par PCR (Polymerase Chain Reaction) et ayant surtout un niveau de variabilité interspécifique minimal supérieur au niveau maximal de variabilité intraspécifique.

L'usage strict du barcode ADN n'en reste pas moins une approche avec des limites.

D'abord, l'usage d'un seul marqueur peut conduire à des erreurs, puisqu'il est possible que des espèces différentes possèdent exactement la même séquence pour ce marqueur par des transferts interspécifiques de gènes ou par une spéciation inachevée (Valentini et al. 2008).

Ensuite, la variabilité intraspécifique du marqueur par rapport à sa variabilité interspécifique est loin d'être à un niveau fixe. Ce seuil de délimitation (ou « barcoding gap ») est en effet bien plus souvent un chevauchement qu'une vraie séparation (figure 9), ce qui pose problème pour établir un seuil de similarité de séquence comme délimitation spécifique.

L'approche par seuil peut donc générer de faux positifs et négatifs, c'est-à-dire une assignation erronée à une espèce connue ou non (Meyer & Paulay, 2005 ; Wiemers & Fiedler, 2007).

Ainsi, le débat est encore animé et plusieurs études ont souligné l'importance d'établir un diagnostic sur un faisceau d'informations plutôt que sur l'une ou l'autre approche uniquement (Will & Rubinoff, 2004 ; Will et al. 2005 ; Wiemers & Fiedler, 2007).

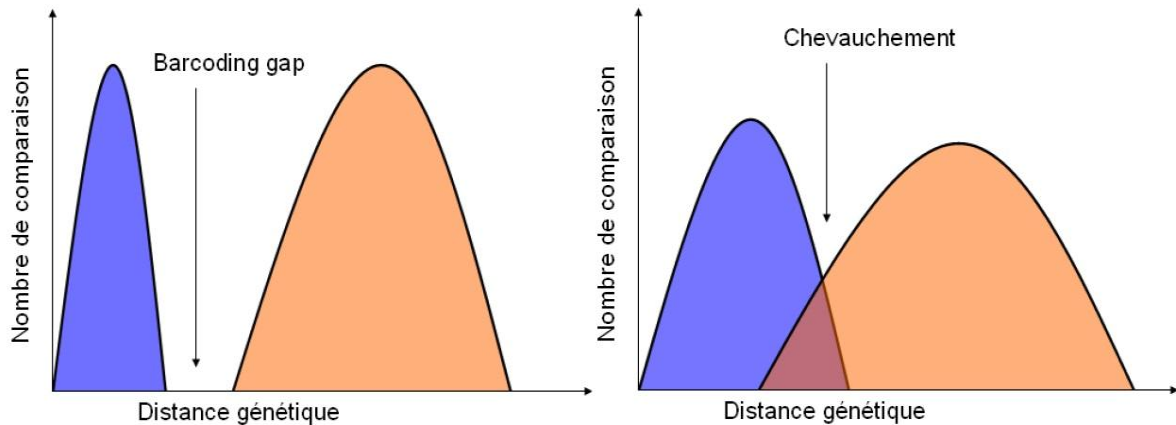


Figure 9 : Illustration du barcoding gap et du chevauchement. En bleu sont les comparaisons intraspécifique de séquences du marqueur utilisé et en orange les comparaisons interspécifiques.

En dernier, la constitution de bases de données de séquences fiables repose sur l'expertise de taxonomistes en collaboration avec des molécularistes, et sur une couverture taxonomique suffisante des espèces par clade. Les bases de données internationales comme GenBank (NCBI) ou EMBL (l'équivalent Européen) contiennent des accessions insuffisamment voire mal identifiées (Bridge et al. 2003 ; Nilsson et al. 2006).

Afin de pallier ces problèmes, une initiative comme UNITE (Kõljalg et al. 2005), qui associe taxonomistes (mycologues), molécularistes et bioinformaticiens pour construire une base de données « corrigée », semble la plus adaptée pour l'usage du barcode ADN (Begerow et al. 2010).

### 6.2.1. Barcoding chez les champignons

Le barcoding pour les champignons était déjà utilisé sans que le terme ne soit spécifiquement utilisé (Seifert et al. 2009), notamment avec les travaux sur l'ITS (internaltranscribedspacer, (Figure 10)) dans les années 1990 (White et al. 1990 ; Gardes et Bruns, 1993). Etant le marqueur historique pour ces organismes, il est le plus représenté dans les bases de données comme GenBank. Le barcode COX1, proposé par le CBOL, n'est pas suffisamment résolutif pour les champignons et est trop variable en taille pour représenter une alternative crédible (Seifert, 2009). Ainsi, l'ITS s'est rapidement imposé pour les champignons (Nilsson et al. 2006 ; 2009 ; Seifert, 2009) même si son utilisation comporte plusieurs limites. Parmi les limites, on peut citer une faible résolution pour certains taxons. Il existe certains genres (*Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*) pour lesquels l'ITS n'est pas assez variable pour

permettre une identification spécifique (Seifert, 2009), et d'autres pour lesquels il est trop variable pour séparer les espèces proches, ce qui est le cas des endomycorhizes à arbuscules, les Glomeromycètes (Stockinger et al. 2010).



Figure 10 : Schéma de l'opéron ribosomal de l'ADN nucléaire des champignons. Le 18S, le 5.8S et le 28S sont des zones très conservées, alors que l'ITS1 et l'ITS2 sont très variables d'une espèce à l'autre, ce qui en fait une cible de choix pour le barcoding.

## **Matériels & méthodes**

### **1. Objectif**

Après avoir eu les résultats bruts du pyroséquençage fait par M<sup>me</sup> AITOUAMER en France dans le cadre de sa thèse de doctorat, **520** séquences OTUs de l'ensemble des stations de deux espèces de pistachier, *Pistacia lentiscus* et *Pistacia atlantica* ont été traités.

Un traitement statistique et bioinformatique a été effectué avec pour objectif principal l'étude des effets relatifs de l'espèce hôte et du climat sur les assemblages fongiques de la phyllosphère et de déterminer grâce à la lecture bioinformatique des séquences génomiques les différences entre les communautés fongiques, leurs compositions et leurs structures ainsi que leurs affinités à l'espèce hôte et son environnement.

### **2. Les stations d'études**

Pour cette étude nous avons choisi 6 stations, 3 pour le pistachier de l'atlas et 3 pour le pistachier lentisque répartie tout au long d'un gradient d'aridité croissant entre le bioclimat subhumide de la wilaya de Médéa est l'aride de la wilaya de Djelfa.

Les stations sont situées approximativement de la route principale nord sud d'Algérie les données de chaque station sont représentées dans les tableaux 1 et 2 suivi des images satellite en 3D (figure 11, 12, 13, 14, 15, 16), Une étude climatique de chaque station s'est imposée pour déterminer l'ensemble des étages bioclimatiques.



### a. Stations du pistacher de l'Atlas

Les trois stations se dressent dans deux zones : sub humide mais d'élévation différente pour Sidi Naâmane et Berrouaghia, avec une dernière station dans la zone semi -aride de Ain Oussara, l'habitat par contre est me même pour l'ensemble de ces stations, ces espèces sont principalement entouré de *Ziziphus lotus*.

Station	Coordonnées GPS	Habitat	Pm	Altitude	Tm	Mois de sécheresse	Q2
Sidi Naâmane	36.239839, 2.675606	Ziziphus lotus	393mm	800m	32°C	3	35
Berrouaghia 1	36.150544, 2.938524	Ziziphus lotus	390mm	970m	33°C	3	35.5
Ain Oussara	35.361464, 2.950532	Ziziphus lotus	110mm	700m	37°C	6	8.5

Tableau 1 : données climatiques et positions GPS des stations du Pistachier de l'Atlas

#### i. Station Sidi Naâmane

##### Description de la station :

Notre station ce situe à 17.9 Km au sud-ouest de la ville de Médéa a environ 33min par voiture.



Figure 11 : vu satellite en 3D de la station de Sidi Naâmane

## ii. Station Berrouaghia 1

### Description de la station :

Notre station se situe à 29.8 Km au sud-est de la ville de Médéa a environ 44min par voiture.



Figure 12 : vu satellite en 3D de la station de Berrouaghia

## iii. Station Ain Oussara

### Description de la station :

Notre station se situe à 133 Km au sud de la ville de Médéa a environ 2h 11min par voiture.



Figure 13 : vu satellite en 3D de la station de Ain Oussara



## b. Stations de l'espèce du pistacher Lentisque

Les stations du pistachier lentisque se dressent aussi dans deux zones sub humides mais d'élévations différentes pour Harbil et Berrouaghia 2, avec une dernière station dans la zone semi -aride d'El Hamel, l'habitat par contre est le même pour l'ensemble de ces stations, ces espèces sont principalement entouré de Olea Europaea.

Station	Coordonnées GPS	Habitat	Pm	Altitude	Tm	Mois de sécheresse	Q2
Harbil	36.227775, 2.651917	Olea Europaea	393mm	790m	31°C	3	35
Berrouaghia 2	36.124388, 2.929124	Olea Europaea	350mm	550m	33°C	3	35.5
El Hamel	35.166639, 4.114610	Olea Europaea	320mm	762m	38.7°C	7	8

Tableau 2 : données climatiques et positions GPS des stations du Pistachier Lentisque

## i. Station de Harbil

### Description de la station :

Notre station se situe à 20.2 Km au sud-ouest de la ville de Médéa a environ 5min par voiture.



Figure 14 : vu satellite en 3D de la station de Harbil

## ii. Station Berrouaghia 2

### Description de la station :

Notre station se situe à 43.1 Km au sud-est de la ville de Médéa a environ 57min par voiture.



Figure 15 : vu satellite en 3D de la station de Berrouaghia 2

## iii. Station El Hamel

### Description de la station :

Notre station se situe à 233 Km au sud-est de la ville de Médéa a environ 3h 27min par voiture.

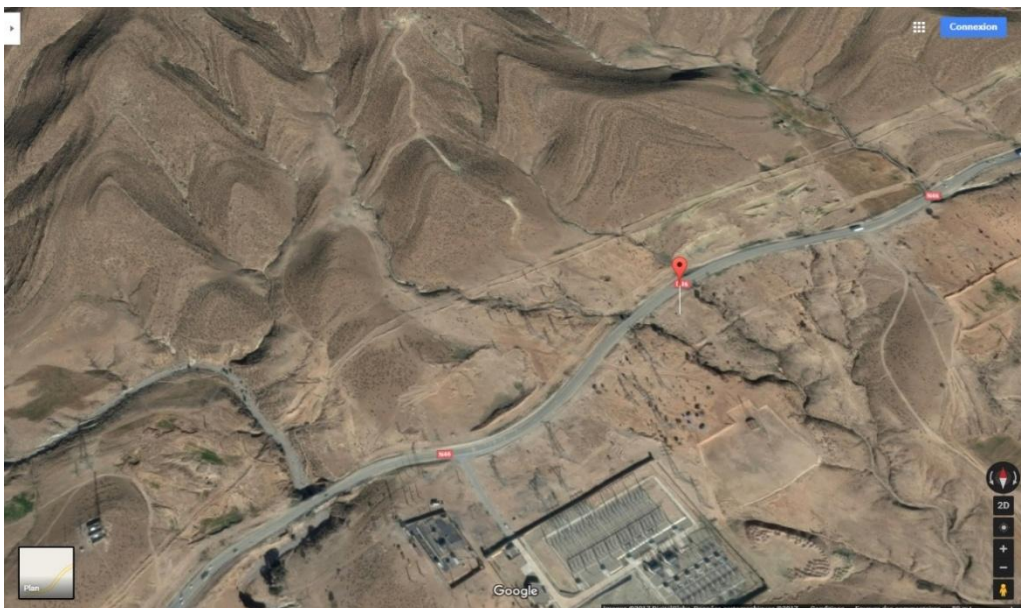


Figure 16 : vu satellite en 3D de la station de El Hamel

### c. L'échantillonnage

L'échantillonnage a été fait par Mme AIT OUAMER en octobre 2014 dans le cadre de sa thèse de Doctorat, en suivant des normes d'échantillonnage de 9 arbres par station, sur chaque arbre 9 feuilles ont été prélevées, 3 sur chaque côté de l'arbre une d'elles est une foliole apicales ce qui nous fait en total 56 arbres et 162 réplicat, l'ADN de trois réplica par station avec un témoin à cause de la disponibilité de 19 puits Pour le séquençage, Cette stratégie est présentée dans la figure 17.

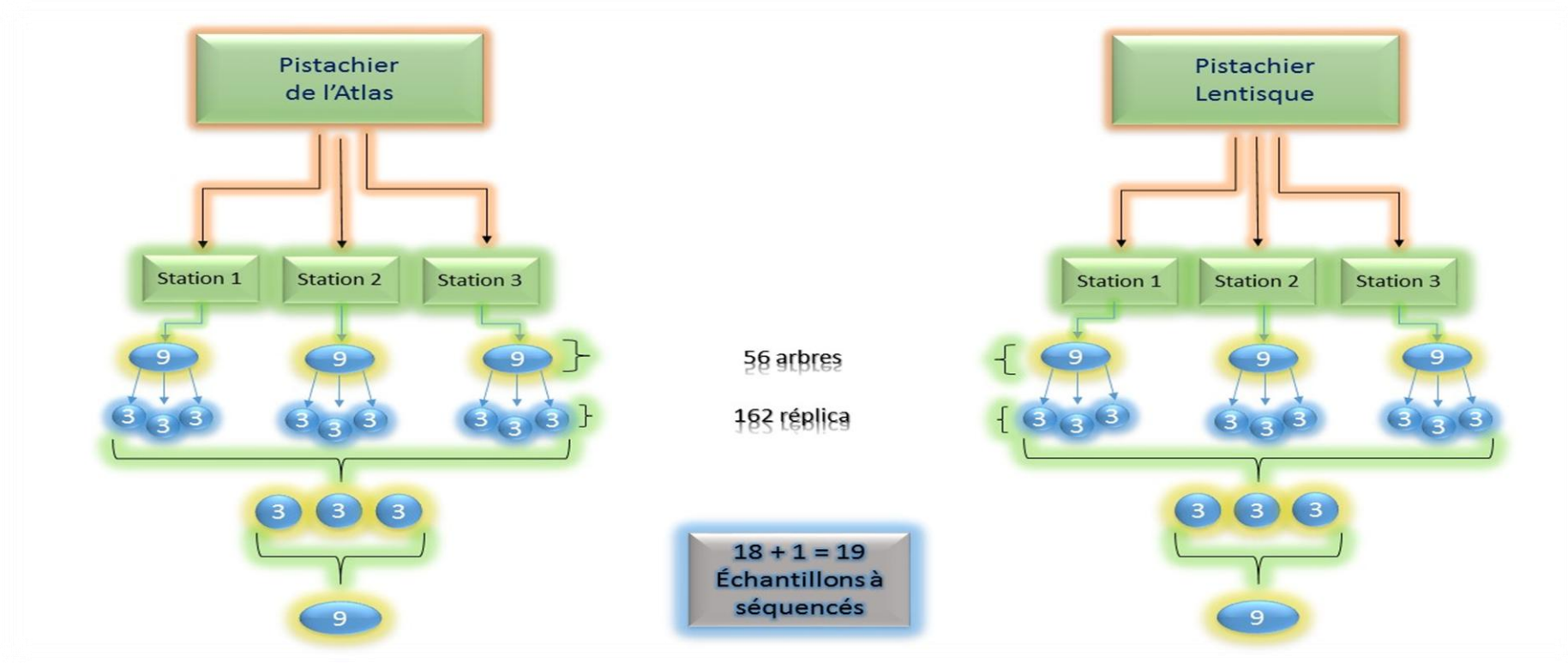


Figure 17 : Mode d'échantillonnage

### **i. Préparation des échantillons**

Les échantillons ont été envoyés en France via l'agence UPS d'Alger dans des sacs de scilicagel préalablement reçus issus du laboratoire afin d'éviter tout risque de contamination et préserver la flore microbienne de la phyllosphère.

Le séquençage a été fait en France dans la plateforme du laboratoire de biologie moléculaire de BIOGECO, université de BORDEAUX.

Pour l'analyse de communautés fongiques de la phyllosphère, un découpage des feuilles a été fait pour délimiter la même surface pour l'ensemble des feuilles et de remettre ainsi l'habitat au même stand pour l'ensemble des feuilles, pour cela nous avons utilisé un poinçon rond métallique obtenant ainsi des disques de 4mm de diamètre, ensuite ces échantillons ont été broyés grâce à un broyeur à bille métallique

Dans but d'étudier les communautés fongiques de la phyllosphère de chaque station, une extraction d'ADN a été faite, suivit d'une PCR et un pyroséquençage **L'extraction d'ADN & séquençage**

L'extraction d'ADN de chaque échantillon a été fait par le **DNeasy 96 plant kit**, cette quantité d'ADN a été séquençé dans le séquenceur de la plateforme du laboratoire produisant ainsi un nombre important de séquences en forme FASTA, 520 OTUs organisés en une matrice qui porte le nombre de réplica de champignons par chaque station.

Ces derniers ont été isolés de la totalité des séquences par la technique du barcoding à partir de laquelle une matrice qui contient uniquement les séquences fongiques de chaque station a été créée.

#### **Exemple d'une séquence OTU sous forme FASTA :**

```
. . . TGCGCCCAAGCCTTTAGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTCACGCA  
TCGTTGCCCGCCCAAGATCCTGCGATCTTGCGGCGGTGGGCGGAAAATG  
GCCTCCCGTGTGCTTGCGCCCGCGGTTGGCCCAAATCCGAGTTCTCGGTGAC  
GCTTCCCGCGACAATCGGTGGCGTTCGAAACAGAACCTAGTGATCCTGTCGT  
GCGGTTGCGTTCTCCTGTCCACGGACTCTTTGACCCTCGAGAGCAAGCGAAA  
GCGC . . .
```

Cette séquence code pour un champignon elle est extraite par technique pyroséquençage et du barcoding ainsi que 519 autres.

### Préparation de la matrice d'OTUs :

Le tableau d'OTUs contenais 19 colonnes qui porté les stations d'échantillonnages, 3 échantillons par stations comme il est illustré dans la (figure 17). 9 pour les stations du Lentisque et 9 pour les stations de l'Atlas et un témoin.

En ligne il contient les OTUs des 520 réparties sur 18 stations, dans les cellules il contient le nombre de réplcas de chaque OTU par station (Tableau 3).

### Exemple de tableau d'OTUs des deux espèces de Pistachier :

A : Atlas

L : Lentisque

**Ex :** A11 Atlas station 1 Arbre 1

Identifiant	A11	A12	A13	A21	A22	A23	A31	A32	A33	L11	L12	L13	L21	L22	L23	L31	L32	L33
<b>OTU_1</b>	1E+05	25312	23031	93170	99643	10585	60619	97983	57800	1	11	34	32	14	11	22	5	18
<b>OTU_2</b>	28	1	5	18	41	3	13	20	19	9014	28747	44449	92316	11437	29648	19903	16836	41533
<b>OTU_3</b>	5324	49984	38591	2167	1902	9095	6	12	2	7679	7210	172	426	51	66	77	325	268
<b>OTU_4</b>	9	0	1	3	4	0	4	3	3	249	533	22790	2423	14476	13534	1624	978	2389
<b>OTU_5</b>	2	3	2	10	21911	1	0	8762	5594	0	2	2	7	1	1	0	0	3
<b>OTU_6</b>	2	3	5	49	54	1063	7	0	221	138	0	5446	14	2	0	3440	1266	11776
<b>OTU_7</b>	418	736	636	698	392	7240	453	2103	792	122	69	356	22	71	8	207	287	2402
<b>OTU_8</b>	1647	814	577	24	111	3266	0	0	1	16	0	0	3	0	0	1	0	1
<b>OTU_9</b>	847	918	358	1265	132	189	18	76	83	737	792	135	248	117	92	162	440	435
<b>OTU_10</b>	3	117	4395	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tableau 3 : les réplcas des OTUs dans les stations du pistachier de l'Atlas

## RDP Classifier

Le RDP Classifier est un classificateur bayésien naïf qui peut fournir rapidement et précisément des tâches taxonomiques de domaine à genre, avec des estimations de confiance pour chaque affectation.

Dans le quelle les séquences OTUs sont introduite en première étapes pour avoir une taxonomie générale sur chaque OTUs (Tableau 4).

Identifiant	kingdom	phylum	Class	order	Family	genus	Species		
OTU_1	Unassigned							1	1
OTU_2	Unassigned							1	1
OTU_3	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Dothideales	Dothioraceae	Aureobasidium	Aureobasidium pullulans	0,67	3
OTU_4	Unassigned							1	1
OTU_5	Unassigned							1	1
OTU_6	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Dothideales	Dothideaceae			0,67	3
OTU_7	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Incertaesedis			0,67	3
OTU_8	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Dothideales	Dothioraceae			1	2
OTU_9	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Davidiellaceae			0,67	3
OTU_10	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Mycosphaerellaceae	Pseudocercospora		1	1

Tableau 4 : Résultats de l'RDP Classifier de certain séquences OTUs



### 3. Matériels

Dans cette étude nous avons reçu une matrice des OTUs qui contient le nombre de séquences pour chaque OTU (en ligne) pour chaque station (en colonne). C'est-à-dire le nombre de réplica de chaque séquence d'OTUs dans chaque station, soit 520 OTUs différents exprimé sur 18 échantillons. Nous avons donc reçu le produit brut de séquençage qui a été fait en France sous sa forme FASTA.

Nous avons traité cette matrice pour extraire les OTUs les plus exprimés dans chaque échantillon en fixant un seuil minimum de 400 expression par OTU, ensuite l'annotation des OTUs les plus significatifs et les non assignés par le RDP classifier a été performé.

Comme matériels nous avons utilisé les logiciels d'études statistiques tel que STATISTICA et l'EXCEL 2013, et des bases de données et logiciel d'étude bioinformatique tel que le BLAST et SMS et INTERPRO PROSITE PFAM.

Notre études se divise en deux grandes partie la première est une étude bio statistique des ensembles fongiques, la deuxième quant à elle, traite l'étude bioinformatique et l'annotation génomique des OTUs.

### 4. Méthodes

#### a. Annotation génomique

##### i. Le BLAST de séquences OTUs

#### Protocole :

- Sur le site BLAST <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Cliqué sur nucléotides blast
- Copier la séquence sous sa forme fasta
- Coller la séquence dans l'espace de blastn
- Et cliqué sur BLAST en bas à gauche de la page
- Attendre quelque secondes
- Il va apparaitre un tableau avec les séquences les plus proches à la nôtre par classement décroissant classé selon le pourcentage de ressemblance et l'E-value
- Tout a fait a droit il y'a une colonne accession qui contient des détails sur la séquence la plus prête de la nôtre (Figure 18)

Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected 0

Alignments: Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<a href="#">Pistacia lentiscus isolate PLEST6 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8 ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence</a>	473	473	100%	7e-130	100%	<a href="#">KT956133.1</a>
<a href="#">Pistacia lentiscus isolate PLDZTW1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence</a>	473	473	100%	7e-130	100%	<a href="#">KT956130.1</a>
<a href="#">Pistacia lentiscus isolate PLDZEK6 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8 ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence</a>	473	473	100%	7e-130	100%	<a href="#">KT956129.1</a>
<a href="#">Pistacia lentiscus voucher Golan 1.1009 clone 1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transcribed spacer 2</a>	473	473	100%	7e-130	100%	<a href="#">EF193082.1</a>

Figure 18 : les résultats du blastn

## b. Les ORFs des séquences OTUs

### Protocole :

- Ouvrir le site SMS (Séquence Manipulation Suite) version 2  
<http://www.bioinformatics.org/sms2/index.html>
- Sur la côté gauche de la page dans Séquence Analysis choisir ORF Finder
- On clique sur Clear
- Puis on copie la séquence d'ADN sous sa forme fasta et on la colle dans l'espace réservé aux séquences
- Puis on choisit dans ORFs canbeginwith : any codon
- Et dans Recherche for ORFs in reading frame on choisit 1,2 and 3
- Et dans on the une fois on fait tout avec direct et une deuxième fois reverse
- Dans Only return ORFs that are at least on le laisse 30 codons longs
- On utilisant le code génétique standard (1)
- Et puis on clique sur Submit
- Les résultats d'ORF vont apparaitre puis on refait le travail dans l'autre sens
- On choisit la séquence protéique la plus long (Figure 19)

## ORF Finder results

### Results for 256 residue sequence "Untitled" starting "CGCCCAAGC"

```
>ORF number 1 in reading frame 1 on the direct strand extends from base 1 to base 138.
CGCCCAAGCCCTTAGGCCGAGGGCAGTCTGCCCTGGGTGTCACGCATCGTTGCCCCCT
CCCAATCCTATGATCTTGTGGCGGTGGGCGGAAAATGGCCTCCCGTGTGCTTGCGCCCG
CGTTGGCCCAATCTGA

>Translation of ORF number 1 in reading frame 1 on the direct strand.
RPKPLGRGHVCLGVTHRCPPPKSYDLVAVGGKWPVCLRPRLAQI*

>ORF number 2 in reading frame 1 on the direct strand extends from base 139 to base 255.
GTTTTGGGTGATGCTTCCCACGACAATCGGTGGTGTGAAACAGAACCTAGTGATCCTG
TCGTGCGGTTCGCTTCTCCTGTCTATGGACTCTTTGACCCTTGAGAGGAAGCGAAAG

>Translation of ORF number 2 in reading frame 1 on the direct strand.
VFGDASHDNRWCLKQNLVILSCGCVLLSMDSLTLERKRK

>ORF number 1 in reading frame 2 on the direct strand extends from base 17 to base 178.
GCCGAGGGCAGTCTGCCTGGGTGTCACGCATCGTTGCCCCCTCCCAATCCTATGATC
TTGTGGCGGTGGGCGGAAAATGGCCTCCCGTGTGCTTGCGCCCGGTTGGCCCAATCT
GAGTTTTGGGTGATGCTTCCCACGACAATCGGTGGTGTGTTGA

>Translation of ORF number 1 in reading frame 2 on the direct strand.
AEGTSAWVSRIVAPLPNPMILWRWAENGLPCACARGWPKSEFSVMLPTTIGGV*

>ORF number 1 in reading frame 3 on the direct strand extends from base 150 to base 242.
TGCTTCCCACGACAATCGGTGGTGTGAAACAGAACCTAGTGATCCTGTCGTGCGGTTG
CGTTCTCCTGTCTATGGACTCTTTGACCCTTGA

>Translation of ORF number 1 in reading frame 3 on the direct strand.
CFPRQSVVFETEPSDPVWRLRSPVYGLFDP*
```

Figure 19 : les résultats de l'ORF dans le sens direct

## c. Les domaines protéiques des séquences OTUs

### i. INTERPRO

#### Protocole :

- On ouvre le site InterPro <https://www.ebi.ac.uk/interpro/>
- On copie soit la séquence fasta soit la séquence protéique choisie de l'ORF
- Puis on clique sur Submit
- En attend environ 20 min (Figure 20)
- On aura les informations de notre séquence

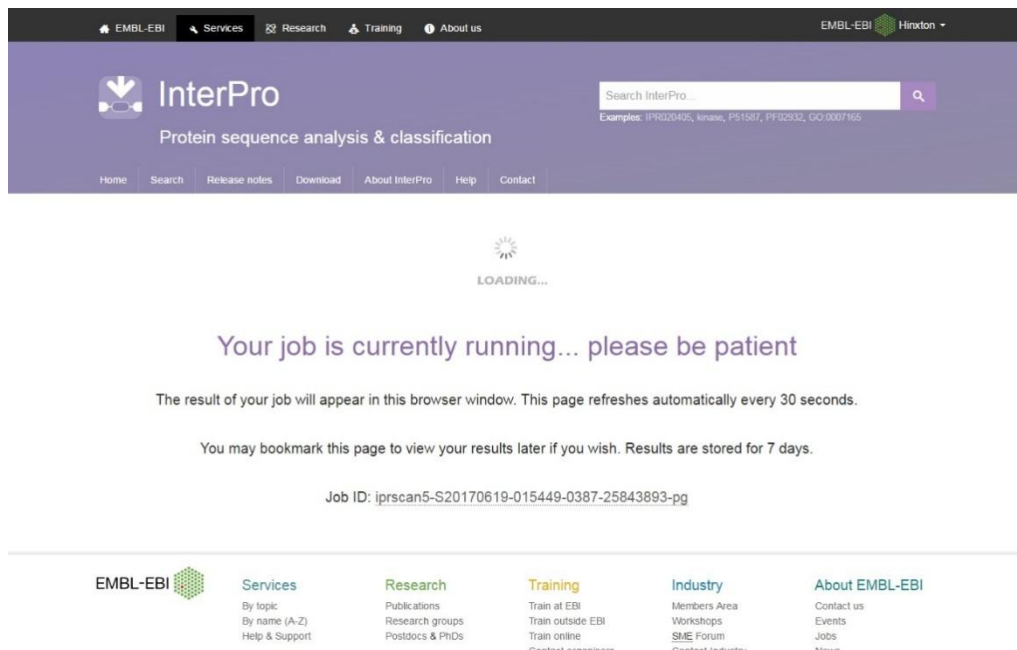


Figure 20 : INTERPRO en cour de recherche d'information sur la protéine

## ii. PROSITE

### Protocole :

- On ouvre le site <http://prosite.expasy.org/>
- On clique sur Clear
- Puis on copie notre séquence protéique et on la colle dans l'espace
- Et on clique sur Scan
- On attend la recherche d'information sur notre séquence (Figure 21)

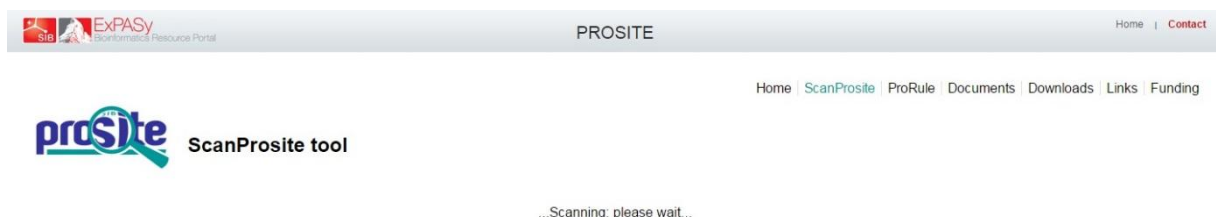


Figure 21 : PROSITE en cour de recherche d'information sur la protéine

### iii. PFAM

#### Protocole :

- On ouvre le site <http://pfam.xfam.org/>
- On va sur search en haut
- Puis sur séquence à gauche
- Enfin on copie notre séquence protéique et on la colle dans l'espace
- On choisit use E-value
- Et on clique sur Submit et on attend (Figure 22)
- Et enfin on aura les informations sur notre séquence protéique



Figure 22 : PFAM en cour de recherche d'information sur la protéine

## Résultats et discussions

### Etude d'ensembles statistiques des assemblages fongiques :

#### 1. Statistique descriptive

Afin de bien décrire nos données, nous présenteront ci-dessous un tableau récapitulatif des valeurs minimale moyennes et maximales des répliques par station (Tableau 15 en annexe) fait par analyse descriptive de la matrice d'OTU par le logiciel STATISTICA, nous obtenant ainsi une vue globale de la distribution des séquences OTUs sur toutes les stations d'étude. A partir de ce dernier, on remarque que la valeur minimale des répliques par station est toujours la même pour tous les stations ce qui indique la spécificité des séquences fongiques phyllosphérique vis-à-vis leurs stations, on ne trouve jamais 520 séquences OTUs exprimé dans une même station mais ils sont répartie sur les 6 stations,.

#### 2. ANOVA multifactoriel

Une analyse multifactorielle a été performé afin de déterminer les corrélations existantes entre le facteur du site, de l'espèce ou des deux au même temps (Tableau 5)

Source	Df	Sums of sqs	P
Especies ( <i>P. atlantica</i> x <i>P. lentiscus</i> )	1	0,9064	0,001***
Site x <i>P. atlantica</i>	2	1,1761	0,006***
Site x <i>P. lentiscus</i>	2	1,9677	0,008***

Tableau 5 : l'analyse des variances entre la composition fongique phyllosphérique et son site d'étude

#### 3. AFC Analyse Factorielle des Correspondances

Après avoir séparé les OTUs les plus significatifs en fonction de leurs nombres de répliques par station, une étude entre les assemblages fongiques et les caractéristiques du site d'échantillonnage tel que l'altitude, les précipitations annuelles moyennes et températures annuelles moyennes est devenue nécessaire afin de cibler les facteurs intervenants de ces distributions et dans leurs répartitions.

Un tableau de matrice particulier (Tableau 16 en annexe) a été créé dans lequel le nombre de répliques est répartie en classes comme suit :

- Classe 1 de 0 à 250 répliques
- Classe 2 de 250 à 500 répliques
- Classe 3 de 500 à 1000 répliques

- Classe 4 de 1000 à 2000 réplias
- Classe 5 plus de 2000 réplias

Et ce afin de savoir s'il y a un impact de l'environnement sur la distribution des assemblages fongiques de chaque station.

Les données de la matrice d'AFC furent traitées par STATISTICA et qui a donné des résultats très significatifs (Figure 23).

Sur l'axe des abscisses la pluviométrie comme facteur et sur l'axe des ordonnées l'aridité comme facteur et en diagonal l'altitude, les résultats étaient très significatifs et la distribution des stations est répartie en 5 ensembles très distincts. avec une somme de facteurs de plus de 77%.

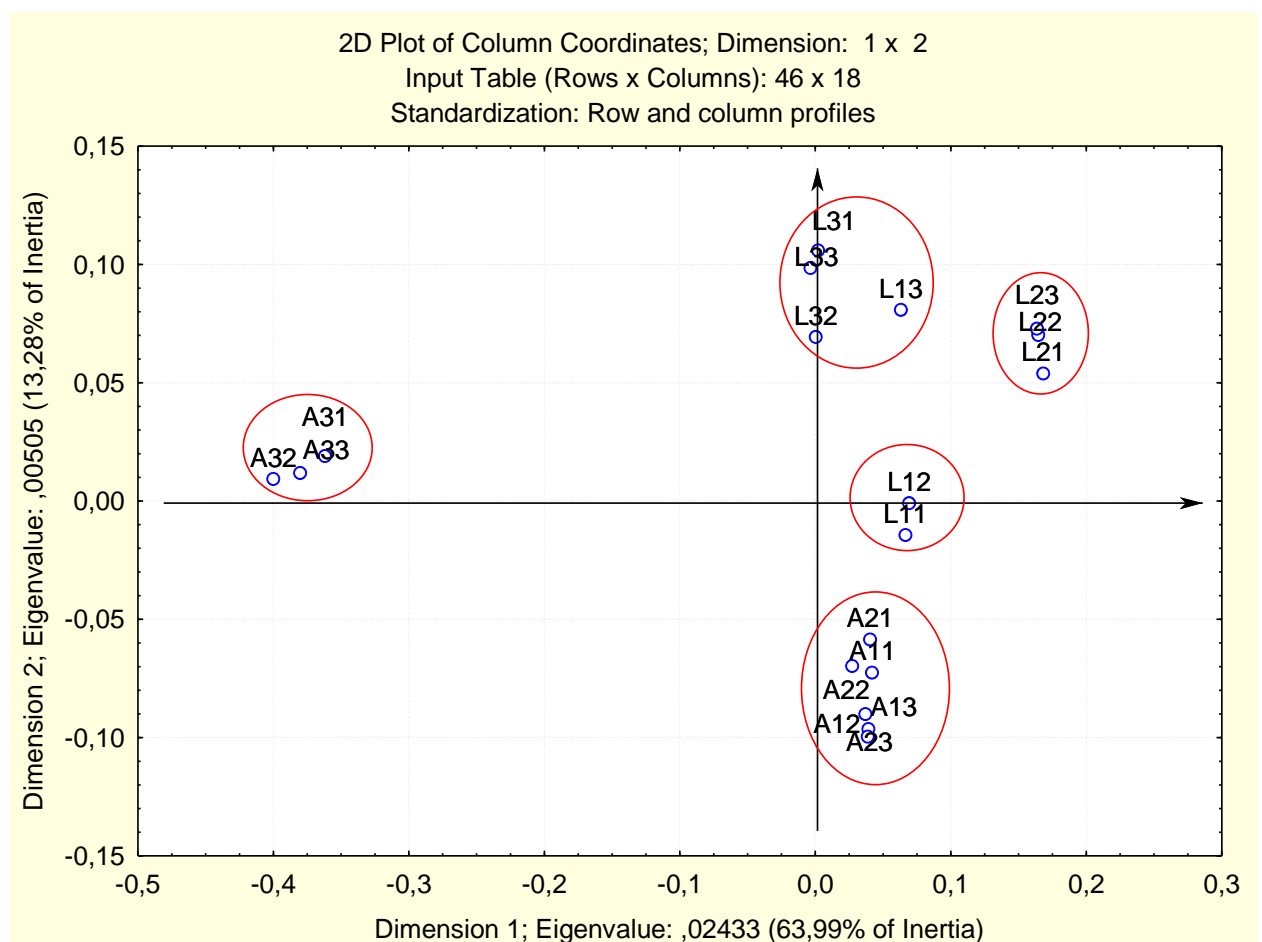


Figure 23 : les résultats de l'AFC de la distribution des stations en fonction des conditions climatiques

#### 4. Isolation des OTUs les plus significatifs

##### a. L'identification des gènes des séquences OTUs

Pour cette étape nous avons cherché sur BLASTn la présence de toutes les séquences OTUs hautement significatives sur les bases de données nucléotidiques, nous résultats sont dans les tableaux 6, 7, et 8.

Dans chaque tableau est mentionné le numéro de la séquences OTU suivi de son code sur la base de donné et l'organisme pour laquelle elle est affilié et le pourcentage d'identification ainsi que son E-value et la référence.

##### i. OTUs gènes spécifique aux stations de l'Atlas

OTUs	GeneBank	Organisme	E-value	Ident	Authors
1	KJ018023.1	<i>Pistacia atlantica</i>	1,00E-142	100%	Doshmanfana, S et al. 2013
5	EF193097.1	<i>Pistacia terebinthus</i> subsp. <i>Palaestina</i>	5,00E-142	100%	Yi,T., et al, 2006
8	KU290338.1	<i>Sacrothecium rubi</i>	6,00E-59	93%	Jayasiri,S.C. et al. 2015
10	KF442649.1	<i>Pseudocercospora pistacina</i>	5,00E-69	100%	Crous,P.W.,et el.2013
11	KY173416.1	<i>Libertasomyces platani</i>	6,00E-44	89%	Crous,P.W. et al. 2016
12	HG764536.1	uncultured fungus	2,00E-78	98%	Yantian Ma,M., et al. 2013
14	KM062101.1	uncultured <i>Cladosporium</i>	4,00E-96	99%	Jroundi,F., et al. 2014
18	NR_145200.1	<i>Libertasomyces myopori</i>	3,00E-51	92%	Crous,P.W. et al. 2016
19	KP891359.1	uncultured fungus	6,00E-74	100%	Menkis,A.,et al. 2015
20	KP335607.1	fungal endophyte	7,00E-73	99%	Massimo,N.C., et al. 2014
22	KU538368.1	uncultured fungus	2,00E-63	96%	Fonseca-Garcia,C., et al. 2016
24	KX611032.1	<i>Coniothyrium</i> sp.	2,00E-74	100%	Hagh Doust,N., et al. 2016



25	KP711356.1	Neosetophoma italica	4,00E-75	100%	Hyde,K.D., et al. 2015
26	FR682355.1	uncultured Ascomycota	4,00E-76	98%	Pitkaranta,M., et al. 2010
28	KP892364.1	uncultured fungus	2,00E-54	93%	Menkis,A., et al. 2015
29	AY843134.1	fungal sp. TRN436	6,00E-79	100%	Ruibal,C., et al. 2004
30	KP162181.1	Rhytidhysterion rufulum	2,00E-43	89%	Mangaiyarkarasi,T., et al. 2014
31	KR014366.1	Rousoellaceae sp. MUT 4966	3,00E-66	97%	Gnavi,G., et al. 2015
33	LC015674.1	uncultured Pleosporales	2,00E-69	98%	Floren,A., et al. 2014
35	KX611070.1	Cytospora sp.	3,00E-77	100%	Hagh Doust,N., et al. 2016
36	KP890969.1	uncultured fungus	2,00E-95	99%	Menkis,A., et al. 2015
38	KU536271.1	uncultured fungus	9,00E-72	99%	Fonseca-Garcia,C., et al. 2016
40	JX010732.1	uncultured Phoma	4,00E-70	98%	Cheng,G. 2012
165	AY843150.1	fungal sp. TRN452	1,00E-75	100%	Ruibal,C., et al. 2004

Tableau 6 : résultats de recherche sur BLASTn des séquences OTUs spécifique aux stations du pistachier de l'Atlas

## ii. OTUs gènes spécifique aux stations du Lentisque

OTUs	GeneBank	Organisme	E-value	Ident	Authors
2	KT956133.1	Pistacia lentiscus	5,00E-142	100%	Pedrola-Monfort,J., et al 2015
4	EF193083.1	Pistacia lentiscus	3,00E-144	100%	Yi,T., et al 2006
6	KT824245.1	Endoconidioma populi	1,00E-76	99%	Ebrahimi,L. et al. 2015
15	KU314995.1	Ochrocladosporium frigidarii	2,00E-74	100%	Garzoli,L.et al. 2015
16	KF251219.1	Pseudoseptoria obscura	3,00E-77	99%	Quaedvlieg,W., et al. 2013
23	KF800339.1	uncultured fungus	5,00E-64	97%	Rittenour,W.R., et al. 2013
32	KT264548.1	Pleosporales sp.	2,00E-74	100%	Torres Cruz,T., et al. 2015
34	LC163509.1	Sydowia polyspora	2,00E-78	100%	Eo,J.K., et al. 2016

37	KY103413.1	Filobasidium chernovii	1,00E-122	100%	Vu,D., et al. 2016
47	KT956136.1	Pistacia lentiscus	5,00E-132	98%	Pedrola-Monfort,J., et al. 2015
97	KX611633.1	Alternaria sp.	1,00E-76	100%	Dong,W., et al. 2016

Tableau 7 : résultats de recherche sur BLASTn des séquences OTUs spécifique aux stations du pistachier Lentisque

### iii. OTUs gène en commun entre les deux stations

OTUs	GeneBank	Organisme	E-value	Ident	Authors
3	KX869960.1	Aureobasidium pullulans	2,00E-74	100%	Kernaghan,G., et al. 2016
7	KX611000.1	Microsphaeropsis olivacea (Coniothyrium olivaceum)	2,00E-74	100%	Hagh Doust,N., et al. 2016
9	KY945027.1	fungal sp.	3,00E-71	100%	Ma,W. 2017
13	KF617588.1	uncultured fungus	6,00E-39	87%	Taylor,D.L., et al. 2013
17	KX195022.1	uncultured fungus	2,00E-78	100%	Beck,A.M., et al. 2016
21	HQ432993.1	uncultured Ascomycota	9,00E-67	99%	Edwards,I.P. et al. 2010
27	KX611080.1	Ascomycota sp.	1,00E-76	99%	Hagh Doust,N., et al. 2016
232	KX249734.1	Aureobasidium pullulans	4,00E-75	100%	El Amrani,M. 2016

Tableau 8 : résultats de recherche sur BLASTn des séquences OTUs spécifique aux stations des deux espèces de pistachier

### b. OTUs espèces

En cherchant l'assignation de nos séquences OTUs on a trouvé 3 résultats à savoir :

- les séquences OTUs correctement assignés,
- les séquences OTUs non assignés
- les séquences OTUs non identifiés.

Nos séquences sont le produit d'un pyroséquençage des morceaux de feuilles soumise au barcoding isolant ainsi les séquences d'origine fongiques du reste de la phyllosphère phyllosphérique.

Sur les bases de données on a trouvé entre ces séquences OTUs des séquences qui sont correctement affilié (Tableau 9) et des séquences inconnus mais le plus pertinente c'est qu'on a trouvé des séquences qui sont faussement affiliées : ces séquences sont présentés dans les banques autant qu'un morceau de l'arbre et non une espèce de champignon.

<b>OTUs</b>	<b>Identification</b>	<b>Espèce-hôte</b>	<b>Assignment</b>
<b>3</b>	assigné	En commun	<i>Aureobasidium pullulans</i>
<b>6</b>	assigné	Pistachier Lentisque	<i>Endoconidioma populi</i>
<b>7</b>	assigné	En commun	<i>Microsphaeropsis olivacea</i> ( <i>Coniothyrium olivaceum</i> )
<b>8</b>	assigné	Pistachier de l'Atlas	<i>Sacothecium rubi</i>
<b>9</b>	assigné	En commun	fungus sp.
<b>10</b>	assigné	Pistachier de l'Atlas	<i>Pseudocercospora pistacina</i>
<b>11</b>	assigné	Pistachier de l'Atlas	<i>Libertasomyces platani</i>
<b>15</b>	assigné	Pistachier Lentisque	<i>Ochrocladosporium frigidarii</i>
<b>16</b>	assigné	Pistachier Lentisque	<i>Pseudoseptoria obscura</i>
<b>18</b>	assigné	Pistachier de l'Atlas	<i>Libertasomyces myopori</i>
<b>20</b>	assigné	Pistachier de l'Atlas	fungus endophyte
<b>23</b>	assigné	Pistachier Lentisque	<i>Alternaria</i> sp.
<b>24</b>	assigné	Pistachier de l'Atlas	<i>Coniothyrium</i> sp.
<b>25</b>	assigné	Pistachier de l'Atlas	<i>Neosetophoma italica</i>
<b>27</b>	assigné	En commun	Ascomycota sp.
<b>29</b>	assigné	Pistachier de l'Atlas	fungus sp. TRN436
<b>30</b>	assigné	Pistachier de l'Atlas	fungus sp. TRN452
<b>31</b>	assigné	Pistachier de l'Atlas	<i>Rhytidhysterium rufulum</i>
<b>33</b>	assigné	Pistachier de l'Atlas	Roussoellaceae sp. MUT 4966
<b>34</b>	assigné	Pistachier Lentisque	Pleosporales sp.
<b>36</b>	assigné	Pistachier de l'Atlas	<i>Cytospora</i> sp.
<b>37</b>	assigné	Pistachier Lentisque	<i>Sydowia polyspora</i>
<b>47</b>	assigné	Pistachier Lentisque	<i>Filobasidium chernovii</i>
<b>232</b>	assigné	En commun	<i>Aureobasidium pullulans</i>

Tableau 9 : Les OTUs correctement assignés sur BLAST spécifiques au pistachier

De nombreuses espèces fongiques font la richesse de la phyllosphère du pistachier tels que : *Alternaria* sp (Figure 24), *Aureobasidium pullulans* (Figure 25), Pleosporales sp (Figure 26),

Phoma (Figure 27), *Microsphaeropsis olivacea* (*Coniothyrium olivaceum*) (Figure 28), *Rhytidhysterium rufulum* (Figure 29) et beaucoup d'autres espèces fongiques.



Figure 24 : *Alternaria* sp

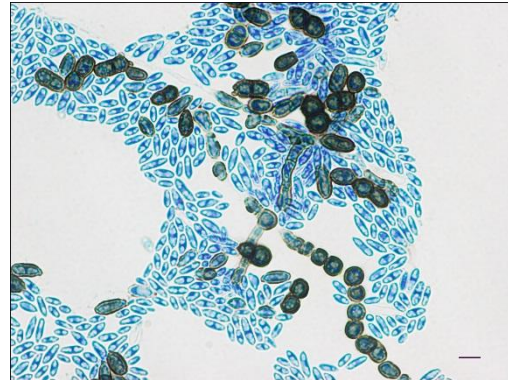


Figure 25 : *Aureobasidium pullulans*



Figure 26 : *Pleosporales* sp

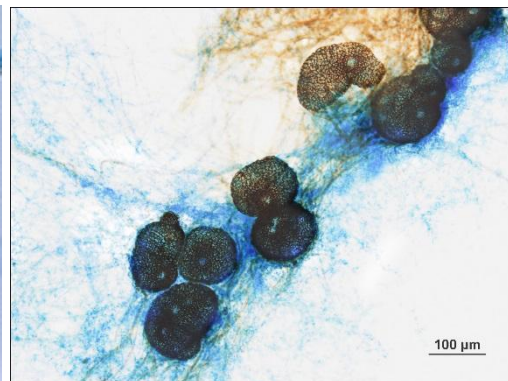


Figure 27 : *Phoma*

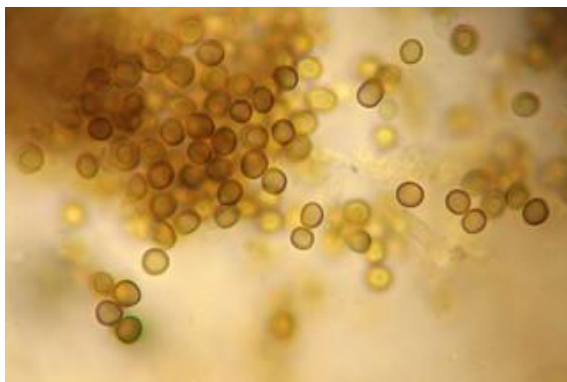


Figure 28 : *Microsphaeropsis olivacea*  
(*Coniothyrium olivaceum*)



Figure 29 : *Rhytidhysterium rufulum*

### a. OTUs stations

A partir du classement des répliques des OTUs par ordre décroissant dans chaque station et ce avec un seuil minimal de 400 répliques, nous avons pu établir que 2 tableaux sur trois (03) représentent l'expression des séquences fongiques sur chacune des espèces hôtes et un (01) tableau de séquences exprimés en commun entre les deux.

#### i. Stations du pistachier de l'Atlas

Les stations du pistachier de l'atlas (Tableau 10) telles que Sidi Naâmane, Berrouaghia et Ain Oussera sont éloignées entre elles, mais les conditions de leur environnement sont presque les mêmes pour les stations de Sidi Naâmane et Berrouaghia, par contre la station d'Ain Oussera est unique par son climat subarides.

OTU_ID	Sidi Naâmane	Berrouaghia	Ain Oussara	Somme
OTU_1	191945	203398	216402	611745
OTU_5	7	21922	14356	36285
OTU_8	3038	3401	1	6440
OTU_14	3340	1612	0	4952
OTU_10	4515	0	0	4515
OTU_11	934	2869	34	3837
OTU_12	2065	259	997	3321
OTU_19	8	2004	0	2012
OTU_20	20	1849	0	1869
OTU_18	2	2	1618	1622
OTU_26	5	1024	0	1029
OTU_22	21	841	0	862
OTU_31	0	0	167	167
OTU_24	219	263	264	746
OTU_38	424	261	0	685
OTU_25	18	646	1	665
OTU_33	0	0	665	665
OTU_165	21	628	10	659
OTU_28	0	0	591	591
OTU_29	457	65	55	591
OTU_36	11	22	415	577
OTU_35	0	0	445	448
OTU_30	3	592	0	445
OTU_40	118	296	0	414

Tableau 10 : les OTUs spécifiques aux stations du pistachier de l'Atlas

## ii. Stations du pistachier Lentisque

Les stations du pistachier lentisque (Tableau 11) telles que Harbil, Berrouaghia et El Hamel sont éloignées entre elles, mais les conditions de l'environnement sont différentes, par contre la station d'El Hamel est unique par son climat subaride comparé aux deux autres stations.

On remarque dans le tableau n°11, que les OTUs 34, 37 et 47 sont exprimés seulement dans la station d'El Hamel, de cette constatation on peut dire que c'est des champignons phyllosphériques spécifiques d'une part au climat subaride et à leur hôte d'autre part.

On remarque aussi que les OTUs 6, 15, 16, et 32 sont exprimés seulement dans les stations de Harbil et d'El Hamel on peut dire aussi que c'est des champignons phyllosphériques spécifiques d'une part à l'altitude des stations et à leur hôte d'autre part.

On note aussi que les OTUs 2, 4, 97 et 23 sont présents sur les climats variables des trois stations ce qui nous emmène à dire pour cela on peut dire qu'ils ont une spécificité à leur hôte.

OTU_ID	Harbil	Berrouaghia	El Hamel	Somme
OTU_2	82210	133401	78272	293883
OTU_4	23572	30433	4991	58996
OTU_6	5584	16	16482	22082
OTU_15	1393	0	449	1842
OTU_16	333	6	1306	1645
OTU_34	78	9	849	936
OTU_97	191	544	93	828
OTU_32	127	4	458	589
OTU_23	227	48	221	496
OTU_37	0	0	422	422
OTU_47	21	1	385	407

Tableau 11 : les OTUs spécifiques aux stations du pistachier lentisque

### iii. Stations du pistachier lentisque et du pistachier de l'atlas

Les stations du pistachier de l'atlas et du lentisque n'ont pas la même position géographique et leurs conditions de l'environnement sont différentes, malgré cela, on a noté qu'il y'a des séquences OTUs en commun entre les deux espèces hôtes qui les hébergent, bien que des affinités aux deux espèces hôte existent cela n'exclut pas l'implication des conditions de l'environnement sur leurs distributions.

On remarque dans le Tableau n° 12 que les OTUs 3, 232, et 9 ne tolèrent pas les conditions d'aridités d'Ain Oussera mais on les trouve chez les deux espèces hôtes, par contre l'OTU 27 se trouve dans une seule station de l'atlas Ain Oussera et dans deux stations du lentisque Harbil et El Hamel, cela peut être dû à leurs altitudes avoisinantes.

On constate que l'OTU 21 se trouve uniquement dans une seule station de l'atlas qui est Berrouaghia et une station du lentisque qui est Harbil, ces deux stations ont en commun leurs altitude et pluviométrie ce qui a fait d'eux un milieu favorable pour ces champignons phyllosphériques.

On constate aussi que l'OTU 13 ne tolère que les conditions d'aridité, c'est pourquoi qu'on le trouve exprimé chez les deux espèces hôtes uniquement dans les stations subarides à savoir Ain Oussera et El Hamel.

Le reste des OTUs est présent sur tous les climats variables des six stations, donc ils ont une spécificité aux deux espèces hôtes.

OTU_ID	Sidi Naâmane	Berrouaghia	Ain Oussera	Somme	Harbil	Berrouaghia	El Hamel	Somme
OTU_3	93899	13164	20	107083	15061	543	670	16274
OTU_7	1790	8330	3348	13468	547	101	2896	3544
OTU_232	2384	7020	2	9406	2923	1962	139	5024
OTU_9	2123	1586	177	3886	1664	457	1037	3158
OTU_17	72	447	329	848	309	39	1074	1422
OTU_21	0	630	0	630	435	45	1	481
OTU_27	1	1	563	565	247	0	480	727
OTU_13	32	84	403	519	159	0	1533	1692

Tableau 12 : les OTUs spécifiques aux stations du pistachier lentisque et au pistachier de l'atlas

## 2. Les OTUs non assignées

### a. Annotation

Après avoir soumis à tous les OTUs supérieurs au seuil au BLASTn, nous avons constaté trois (3) catégories de résultats comme on l'a déjà cité :

- les séquences OTUs correctement assignés,
- les séquences OTUs non assignés
- les séquences OTUs non identifiés.

Dans cette étape, nous nous sommes intéressés aux OTUs non assignés et non identifiés et afin de traiter les données relatives aux OTUs, nous les avons analysés par BLASTn.

En ce qui concerne les séquences OTUs non assignés analysées par BLASTn, les résultats des analyses du tableau n° 13, ont démontré que c'était des séquences du pistachier alors que c'est des séquences fongiques de sa phyllosphère est non pas des séquences de l'espèce hôte.

Cela peut se justifier que lors du séquençage, les séquences fongiques étaient répertoriés comme une partie de la feuille ou lors d'une étude sur la feuille du pistachier et séquençage elle fut répertorié comme telle, ce qui est une erreur et qui doit être corrigé sur les bases de données car nos séquences sont obtenues par barcode spécifique aux champignons.

<b>OTUs</b>	<b>Identification</b>	<b>Espèce-hôte</b>	<b>Fausse Assignation</b>
<b>1</b>	non assigné	Pistachier de l'Atlas	<i>Pistacia atlantica</i>
<b>2</b>	non assigné	Pistachier Lentisque	<i>Pistacia lentiscus</i>
<b>4</b>	non assigné	Pistachier Lentisque	<i>Pistacia lentiscus</i>
<b>5</b>	non assigné	Pistachier de l'Atlas	<i>Pistacia terebinthus</i> subsp. <i>Palaestina</i>
<b>97</b>	non assigné	Pistachier Lentisque	<i>Pistacia lentiscus</i>

Tableau 13 : les OTUs qui ont une fausse attribution dans les bases de données

En ce qui concerne les OTUs non identifiés Tableau n° 14, l'analyse du BLASTn n'a rien démontré, donc on a fait une annotation génomique pour ces 14 séquences OTUs, en débutant par une recherche des ORFs sur SMS (Séquence Manipulation suite) dans les trois cadres de lecture et dans les deux sens de réplication, on a choisis l'ORF le plus long entre les six ORFs obtenus



Ou nous avons fait une recherche des domaines protéiques sur BLASTp, INTERPRO, PROSITE et PFAM, les résultats ont démontré que c'était des séquences inconnues (Figure 30, 31, 32, 33).

OTUs	Identification	Espèce-hôte
12	non identifié	Pistachier de l'Atlas
13	non identifié	En commun
14	non identifié	Pistachier de l'Atlas
17	non identifié	En commun
19	non identifié	Pistachier de l'Atlas
21	non identifié	En commun
22	non identifié	Pistachier de l'Atlas
26	non identifié	Pistachier de l'Atlas
28	non identifié	Pistachier de l'Atlas
32	non identifié	Pistachier Lentisque
35	non identifié	Pistachier de l'Atlas
38	non identifié	Pistachier de l'Atlas
40	non identifié	Pistachier de l'Atlas
165	non identifié	Pistachier de l'Atlas

Tableau 14 : les OTUs qui n'ont pas d'identification sur les bases de données

The screenshot shows the NCBI BLAST search interface. At the top, it identifies the user as 'BLAST' and the search as 'blastp suite >> RID-NK8ZVEZW01R'. The job title is 'Protein Sequence (39 letters)'. The query ID is 'IclQuery\_37757' and the query length is 39 amino acids. The database used is 'nr' (non-redundant GenBank CDS translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF excluding environmental samples from WGS projects). The program used is 'BLASTP 2.6.1+'. A prominent message states: 'No significant similarity found. For reasons why, click here'. The footer includes NCBI contact information and logos for NIH, USA.gov, and the National Library of Medicine.

Figure 30 : Aucun résultat trouvé sur BLASTp pour notre séquence protéique

Home Search Release notes Download About InterPro Help Contact

Similar proteins  
Structures

**Submitted**  
Length 39 amino acids

**Filter view on**

**Entry type**

- Family
- Domains
- Repeats
- Site

**Status**

- Unintegrated

**Per-residue features**

- Residue annotation

**Colour by**

- domain relationship
- source database

**Protein family membership**  
None predicted.

**Domains and repeats**  
None predicted.

**GO term prediction**  
Biological Process  
None predicted.

**Molecular Function**  
None predicted.

**Cellular Component**  
None predicted.

EMBL-EBI 

**Services**  
By topic  
By name (A-Z)  
Help & Support

**Research**  
Publications  
Research groups  
Postdocs & PhDs


**Training**  
Train at EBI  
Train outside EBI  
Train online  
Contact organisers

**Industry**  
Members Area  
Workshops  
SME Forum  
Contact Industry

**About EMBL-EBI**  
Contact us  
Events  
Jobs  
News




Figure 31 : Aucun résultat trouvé sur INTERPRO pour notre séquence protéique

SIB ExpASY  Bioinformatics Resource Portal

PROSITE Home | Contact

Home | ScanProsite | ProRule | Documents | Downloads | Links | Funding

 **ScanProsite Results Viewer**

Output format: Graphical view - this view shows ScanProsite results together with ProRule-based predicted intra-domain features [help].

Hits for all PROSITE (release 2017\_06) motifs on sequence USERSEQ1 :

no hit!


SIB Swiss Institute of Bioinformatics | Disclaimer  Back to the Top

Figure 32 : Aucun résultat trouvé sur PROSITE pour notre séquence protéique

**Sequence search results**

[Show](#) the detailed description of this results page.

We did not find any Pfam-A matches to your search sequence

[Hide](#) the search options and sequence that you submitted.

You ran **one** job, a **Pfam-A** search with ID 8D05420A-5F92-11E7-9122-6A585F09777C.

These are the options that you chose:

- You set the **Pfam-A** E-value cut-off to **1.0**

This is the **sequence** that you submitted:

```
PLHNCVLTPTPLVHBPQLRSDTDPDRKDLIHL
```

You can bookmark [this URL](#) to retrieve your results later:

```
http://pfam.sanger.ac.uk/search/sequence/results/8D05420A-5F92-11E7-9122-6A585F09777C
```

[Return](#) to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

Comments or questions on the site? Send a mail to [pfam-help@ebi.ac.uk](mailto:pfam-help@ebi.ac.uk).  
European Molecular Biology Laboratory

Figure 33 : Aucun résultat trouvé sur PFAM pour notre séquence protéique

## Discutions

L'exploitation des résultats a porté sur la comparaison de la composition des colonies fongiques phyllosphériques présent sur la partie foliaire et leurs répartitions par rapport à leurs écosystèmes et a l'apparenté génétique. Pour cela nous avons échantillonné selon un gradient d'aridité croissant entre le bioclimat aride de Djelfa et le subhumide de Médéa dans plusieurs sites notamment Ain Oussera, El Hamel, Berrouaghia, Harbil, et Sidi Naâmane, sur deux espèces de pistachiers, le pistachier lentisque nommé aussi «edharou» en Algérie et le pistachier de l'atlas «el bétoum», ce dernier est endémique de l'atlas Algérien.

A ce titre, les champignons, en tant qu'organismes difficiles à observer et identifier présentent un handicap supplémentaire, ce qui explique la relative pauvreté d'études de ce type pour ces espèces par rapport à des plantes ou des animaux en Algérie, malgré leur importance primordiale et fonctionnelle dans le domaine agroalimentaire.

Nous avons pu bénéficier des données de séquençage relativement exceptionnel pour un tel groupe d'organismes, ce qui nous a permis de réaliser ce travail unique en son genre en Algérie.

Nous avons organisé ce travail en deux parties, la première a pour objectif le traitement des séquences OTUs les plus significatif de nos stations afin d'avoir leurs affinités à l'espèce hôte et son environnement, la deuxième par contre ciblai une lecture bioinformatique des séquences génomiques et des différences entre les communautés fongiques, leurs origines, leurs compositions et leurs structures par différents outils de bio-informatique, effectué préalablement sur nos stations toujours avec une différence en gradient d'aridité.

En premier lieu les observations concernent une statistique descriptive des répartitions sur toutes nos stations une observation correspond aux seuils d'expressions minimales des réplicas par station qui sont toujours les même pour toutes les stations ainsi il y'a une spécificité remarquable des séquences fongiques phyllosphérique vis-à-vis de leurs stations et leur espèces hôtes (Tableau 15 annexé).

En second lieu une ANOVA multifactoriel vient confirmer nos résultats avec une corrélation très significative de 0.01 entre la distribution des séquences fongiques et leurs espèces hôtes,

et d'un rapport de 0.06 entre l'espèce pistachier de l'Atlas et des facteurs de ces niches bioclimatiques, et un rapport de 0.08 entre l'espèce pistachier Lentisque et des facteurs de ces niches bioclimatiques les résultats de l'ANOVA sont dans le (Tableau 5).

L'AFC démontre elle aussi à son tour que l'altitude, les précipitations moyennes et les températures moyennes sont trois facteurs qui jouent un rôle primordial sur la distribution spatiale des assemblages fongiques phyllosphériques sur nos différentes stations (Figure 23) avec une somme de facteurs de plus de 77%.

Ces résultats nous ont poussés à isoler les champignons spécifiques de chaque station d'études de chaque arbre de pistachier.

L'étude de la distribution des communautés fongiques phyllosphériques à démontrer une forte corrélation entre la distribution spatiale de ces dernier et les trois facteurs l'altitude, précipitations et température, une ANOVA a été performé a fin de trouvé des affinités entre arbres hôtes et entre arbres hôtes et les différentes stations d'échantillonnage, un pourcentage très significatif fut également observé (Tableau 5).

Ensuite nous avons isolé les séquences fongiques les plus liées à chaque'une des deux arbres hôtes individuellement (Tableau 10, 11).

le *Saccothecium rubi* (Jayasiri,S.C. et al. 2015) qui occupe spécifiquement le pistachier de l'atlas comparé à *Endoconidioma populi* (Ebrahimi,L. et al. 2015) spécifique au lentisque, toutefois il existe même ceux qui sont en commun entre les deux arbres hôtes (Tableau 12), Les capacités de dispersion naturelle des *Aureobasidium pullulans* (Figure 25) (Kernaghan,G., et al. 2016) sont considérablement renforcées par une forte dispersion les deux arbres hôtes.

Nous avons effectué pour ces séquences une recherche sur les bases de données, nous avons trouvé 3 différente résultats, les séquences qui été correctement affilié (Tableau 9), parmi lesquelles on trouve une variété d'espèces de champignons spécifique à chaque'une des deux espèces de pistachier.

Les champignons spécifique au pistachier de l'Atlas qui est endémique a l'atlas algérien contient un coquetel de champignons parmi lesquelles on cite *Rhytidhysterium rufulum* (Figure 29) (Mangaiyarkarasi,T., et al. 2014).

Les séquences qui sont faussement affilié à une espèce qui doivent être sujet à l'objet de révisions taxonomiques dans les banques notamment 5 séquences qui sont généralement affilié à leurs arbres hôtes, comme le cas de l'OTU°1 il est affilié au pistachier de l'Atlas (Doshmanfana, S et al. 2013) et l'OTU°2 qui est affilié au pistachier Lentisque (Pedrola-Monfort, J., et al 2015) et 3 autres (Tableau 13), ces données doivent être corrigé sur les bases de données. Une hypothèse sous-jacente qu'on a mise qui doit être sujette d'un débat qu'elles ont dû être prises par erreur pour des monceaux de la feuille de leur hôte.

En dernier on a trouvé plusieurs séquences d'origine inconnues sur les bases de données qui sont en généralement affiliés au pistachier de l'Atlas (Tableau 14) comme le cas de l'OTU°12 inconnu (Yantian Ma, M., et al. 2013) car comme on l'a déjà dite c'est un arbre endémique à l'atlas Algérien et comme la recherche est stérile en Algérie donc elle demeure une espèce qui n'a jamais été exploré.

Un travail d'annotation génomique s'est avérer nécessaire pour répertorié ces nouvelles espèces sur les bases de données internationales (Tableau 14), alors on a fait une annotation génomique, mais on a rien pu trouver concernant leur domaine protéique et familles protéique et affiliation ça prouve que c'est des nouvelles séquences qui doivent être répertorié dans les banques de données.

Enfin, l'analyse de nos résultats montre de nombreux facteurs qui déterminent la diversité et la structure des communautés fongiques phyllosphériques des deux arbres du pistachier de l'atlas et lentisque. Les variations dans les conditions abiotiques, avec gradients d'aridité croissant, ainsi que l'élévation précipitation et température génèrent une variation spatiale dans les communautés des fongiques phyllosphériques.

## **Conclusion**

Le pistachier est un arbre d'avenir dans notre pays, il est d'un immense intérêt écologique certain pouvant croître dans des endroits très secs, ne dépassant pas 200 mm de pluie (CHEBOUTI, 2002).

Sa phyllosphère quant à elle présente de nombreuses caractéristiques qui en font d'elle un notamment un excellent habitat pour étudier l'écologie des microorganismes mais aussi une empreinte spécifique des bioclimats qui est utilisée même dans le domaine de la criminologie par certains pays avancés.

L'organisation des composants de la phyllosphère dans les feuilles de *Pistacia Lentiscus* et du Pistachier de l'Atlas, leur répartition et leur densité sont suivies des facteurs de l'environnement.

Il faut savoir que la composition des assemblages fongiques phyllosphériques du Pistachier de l'Atlas et *Lentisque*, varie considérablement en fonction de l'espèce hôte et du site, l'altitude la précipitation et la température restent des facteurs dominants de la distribution de ces assemblages.

Il faut noter aussi que grâce à la bioinformatique nous avons pu isoler de nouvelles espèces fongiques spécifiques à notre pistachier qui vont être répertoriées comme telles et en trouvant des erreurs dans les bases de données qui vont être elles aussi corrigées.

Enfin, la bioinformatique a beaucoup à offrir dans le domaine de l'écologie microbienne de la phyllosphère et promet d'explorer de nouvelles espèces endémiques qui restent de nos jours inconnues dans notre pays.

## Annexes

Descriptive Statistics (OTUs Table)					
Variable	Valid N	Mean	Minimum	Maximum	Std.Dev.
A11	520	298,2962	0,00	143602,0	6301,359
A12	520	161,2288	0,00	49984,0	2457,560
A13	520	137,8673	0,00	38591,0	1978,937
A21	520	194,5808	0,00	93170,0	4086,867
A22	520	249,2904	0,00	99643,0	4473,390
A23	520	95,3519	0,00	10585,0	765,839
A31	520	121,9135	0,00	60619,0	2658,275
A32	520	220,9269	0,00	97983,0	4314,241
A33	520	128,9846	0,00	57800,0	2546,081
L11	520	38,5788	0,00	9014,0	522,629
L12	520	76,3904	0,00	28747,0	1301,132
L13	520	150,4423	0,00	44449,0	2201,563
L21	520	189,9827	0,00	92316,0	4049,872
L22	520	52,6404	0,00	14476,0	808,394
L23	520	84,1308	0,00	29648,0	1428,124
L31	520	56,5442	0,00	19903,0	890,433
L32	520	41,7077	0,00	16836,0	741,924
L33	520	122,6231	0,00	41533,0	1898,511

Tableau 15 : tableau de statistiques descriptives des répliquas par station

	A11	A12	A13	A21	A22	A23	A31	A32	A33	L11	L12	L13	L21	L22	L23	L31	L32	L33
Altitude	800	800	800	790	790	790	700	700	700	790	790	790	550	550	550	726	726	726
Pm	393	393	393	390	390	390	110	110	110	393	393	393	350	350	350	320	320	320
Tm	32	32	32	33	33	33	37	37	37	31	31	31	33	33	33	39	39	39
OTU_1	5	5	5	5	5	5	5	5	5	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OTU_2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	5	5	5	5	5	5	5	5	5
OTU_3	5	5	5	5	4	5	1	1	1	5	5	1	2	1	1	1	2	2
OTU_4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	5	5	5	5	4	3	5
OTU_5	1	1	1	1	5	1	1	5	5	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OTU_6	1	1	1	1	1	4	1	1	1	1	1	5	1	1	1	5	4	5
OTU_7	2	3	3	3	2	5	2	5	3	1	1	2	1	1	1	1	2	5
OTU_8	4	3	3	1	1	5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OTU_9	3	3	2	4	1	1	1	1	1	3	3	1	1	1	1	1	2	2
OTU_10	1	1	5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OTU_11	1	1	3	2	5	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OTU_12	2	4	3	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OTU_13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4
OTU_14	1	5	4	1	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OTU_15	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4	1	1	1	1	1	2



OTU_16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	4	1	1
OTU_17	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	2	1	1	1	3	2	1
OTU_18	1	1	1	1	1	1	1	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OTU_19	1	1	1	1	1	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OTU_20	1	1	1	1	1	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OTU_21	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1
OTU_22	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OTU_23	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OTU_24	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OTU_25	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OTU_26	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OTU_27	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OTU_28	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OTU_29	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OTU_30	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OTU_31	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OTU_32	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1
OTU_33	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OTU_34	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
OTU_35	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OTU_36	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OTU_37	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
OTU_38	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OTU_40	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OTU_47	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1
OTU_97	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1
OTU_165	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OTU_232	3	4	3	2	2	5	1	1	1	4	4	1	4	2	1	1	1	1

Tableau 16 : matrice de l'AFC des séquences OTUs

## Matériel bioinformatique d'annotation génomique

### i. Le BLAST de séquences OTUs

BLAST trouve des régions de similarité entre les séquences biologiques (Figure 34, 35, 36). Le programme compare les séquences de nucléotides ou de protéines aux bases de données séquentielles et calcule la signification statistique.

Il contient même des sous programmes spécialisé comme :

- SmartBLAST : Trouver une protéine très similaire à votre requête
- Primer-BLAST : Amorce de conception spécifique à votre modèle de PCR

- Global Align : Comparez deux séquences sur l'ensemble de leur spam (Needleman-Wunsch)

Et plein d'autres sous programmes.

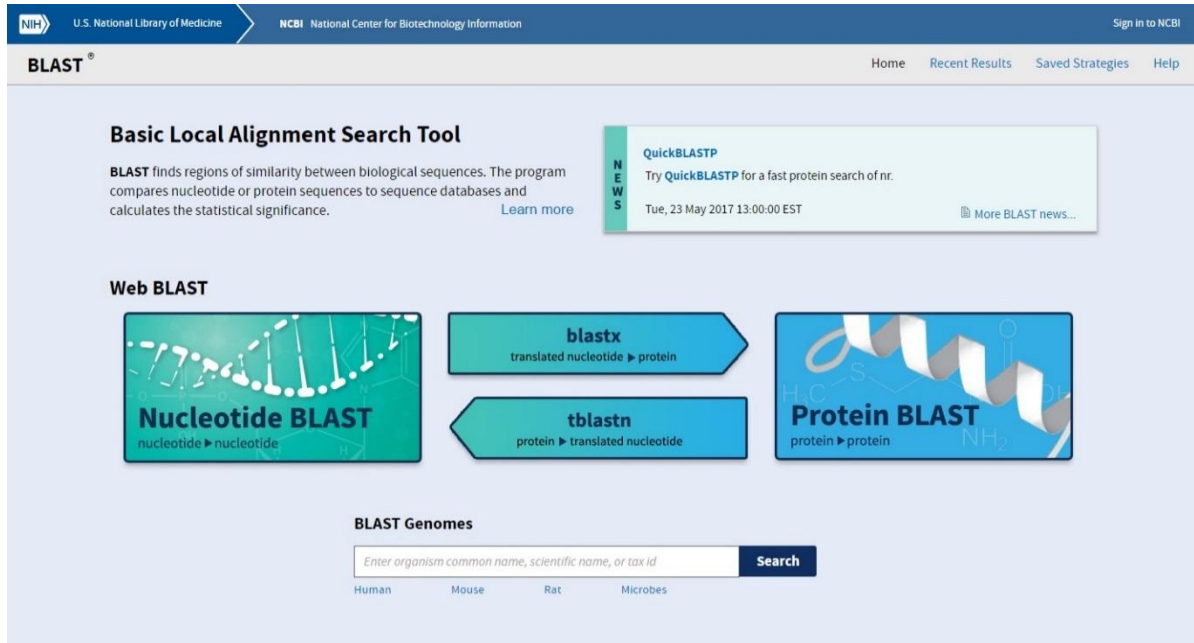


Figure 34 : BLAST Basic Local Alignment Search Tool

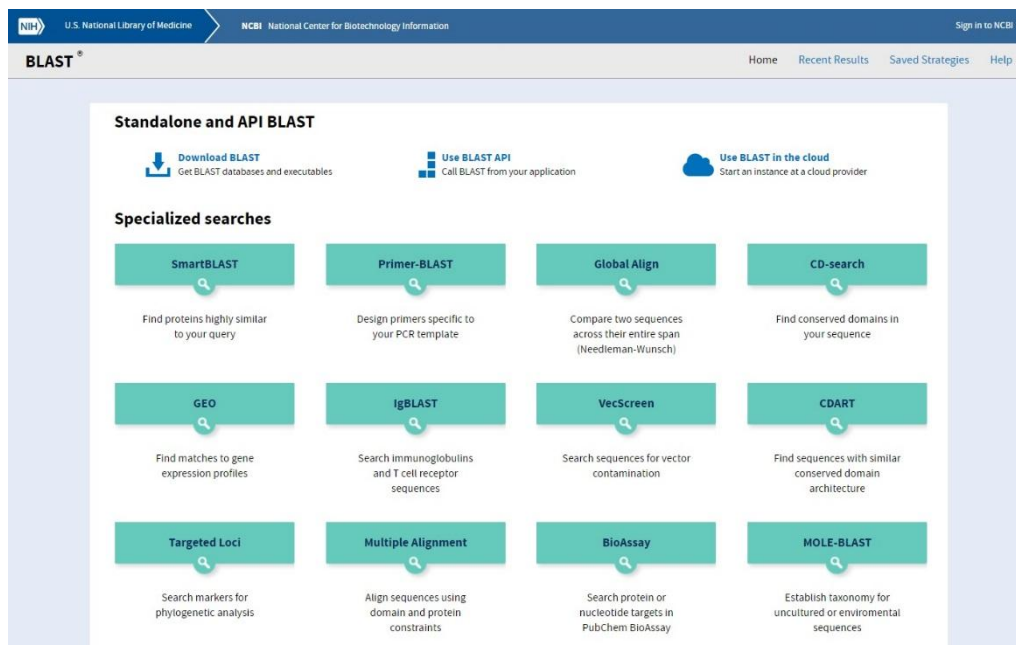


Figure 35 : Sous-programme de BLAST

Figure 36 : BLAST Nucléotides suite

En cherchant dans BLAST nucléotides les régions de similarités de mes séquences avec les séquences des bases de données et j'ai trouvé beaucoup des informations à propos de mes séquences, mais certain n'existé pas sur les bases de données.

Je m'attendais à ça car le pistachier de l'atlas est une espèce endémique et sur la quelle personne n'a déjà publié ou travaillé.

## ii. Les ORFs des séquences OTUs


Sur le logiciel SMS (Sequence Manipulation Suite) (Figure 37) se trouve un sous-programme qui se nomme ORF Finder (Open Reading Frame finder) qui est conçu pour lire les séquences protéiques et nucléiques afin de trouver des gènes susceptibles de coder pour une protéine donné

Figure 37 : SMS (Sequence Manipulation Suite) programme ORF Finder


### iii. Les domaines protéiques des séquences OTUs

La recherche des domaines protéiques de mes séquences se fait sur de grands comparateurs de banques comme INTERPRO (Figure 38), ou bien sur des banques individuelles tel que PROSITE (Figure 39) ou PFAM (Figure 40) car INTERPRO est une grande base de données protéiques qui contient les données des deux autres mais PROSITE et PFAM ont une partie non partagée avec INTERPRO et non plus entre eux, donc il va falloir chercher sur les 3 bases de données séparément.

Figure 38 : INTERPRO analyse des séquences protéiques et leur classification


PROSITE [Home](#) | [Contact](#)

[Home](#) | [ScanProsite](#) | [ProRule](#) | [Documents](#) | [Downloads](#) | [Links](#) | [Funding](#)


**Database of protein domains, families and functional sites**

PROSITE consists of documentation entries describing protein domains, families and functional sites as well as associated patterns and profiles to identify them [More... / References / Commercial users]  
 PROSITE is complemented by ProRule, a collection of rules based on profiles and patterns, which increases the discriminatory power of profiles and patterns by providing additional information about functionally and/or structurally critical amino acids [More...].

**Release 2017\_06 of 07-Jun-2017 contains 1787 documentation entries, 1309 patterns, 1188 profiles and 1207 ProRule.**

**Search**

**Browse**

- by documentation entry
- by ProRule description
- by taxonomic scope
- by number of positive hits

**Quick Scan mode of ScanProsite**

Quickly find matches of your protein sequences to PROSITE signatures (max. 10 sequences). [?] [Examples](#)

Enter UniProtKB accessions or identifiers or PDB identifiers or sequences in FASTA format

Exclude motifs with a high probability of occurrence from the scan

For more scanning options go to [ScanProsite](#)

**Other tools**

- **PRATT** - allows to interactively generate conserved patterns from a series of unaligned proteins
- **MyDomains - Image Creator** - allows to generate custom domain figures.






Figure 39 : La base de données des domaines protéiques et familles et sites fonctionnelles



[HOME](#) | [SEARCH](#) | [BROWSE](#) | [FTP](#) | [HELP](#) | [ABOUT](#)



**Pfam 31.0 (March 2017, 16712 entries)**

The Pfam database is a large collection of protein families, each represented by **multiple sequence alignments** and **hidden Markov models (HMMs)**. [More...](#)

**QUICK LINKS**

**SEQUENCE SEARCH**

**VIEW A PFAM ENTRY**

**VIEW A CLAN**

**VIEW A SEQUENCE**

**VIEW A STRUCTURE**

**KEYWORD SEARCH**

**JUMP TO**

**YOU CAN FIND DATA IN PFAM IN VARIOUS WAYS...**

Analyze your protein sequence for Pfam matches

View Pfam annotation and alignments

See groups of related entries

Look at the domain organisation of a protein sequence

Find the domains on a PDB structure

Query Pfam by keywords

Enter any type of accession or ID to jump to the page for a Pfam entry or clan, UniProt sequence, PDB structure, etc.

Or view the [help](#) pages for more information

**Recent Pfam [blog](#) posts** ☒ Hide this

**Pfam 31.0 is released** (posted 8 March 2017)

Pfam 31.0 contains a total of 16712 families and 604 clans. Since the last release, we have built 415 new families, killed 9 families and created 11 new clans. We have also been working on expanding our clan classification; in Pfam 31.0, over 36% of Pfam entries are placed within a clan. The new "stuff" [...]

**Pfam train online** (posted 8 December 2016)

We now have an online Quick Tour that provides a brief introduction to the Pfam protein families database. It provides a basic description of Pfam, as well as advice on how to search the database and discover protein-related information. The tour also showcases various tools that allow users to visualize data in Pfam, and explains [...]

**Pfam 30.0 is available** (posted 1 July 2016)

Pfam 30.0, our second release based on UniProt reference proteomes, is now available. The new release contains a total of 16,306 families, with 22 new families and 11 families killed since the last release. The UniProt reference proteome set has expanded and now includes 17.7 million sequences, compared with 11.9 million when we made Pfam [...]

Figure 40 : La base de données des larges collections des familles protéique

## Références bibliographique

- Ain-Lhout, F., Zunzunegui, M., Diaz Barradas, M.C., Tirado, R., Clavijo A., and Garcia Novo., 2004. Comparaison of proline accumulation in two Mediterranean shrubs subjected to natural and experimental water deficit. *Plant and Soil* 230, 175-183.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, et al. (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." *Nucleic Acids Res* 25(17): 3389-402.
- Altschul, S. F., W. Gish, et al. (1990). "Basic local alignment search tool." *J Mol Biol* 215(3): 403-10.
- Alyafi, J., 1979. Approche systématique et écologique du genre *Pistacia* L. dans la région Méditerranéenne. Thèse docteur de 3ème Cycle. Faculté des sciences et Techniques. St Jérôme, Marseille P.
- Amend AS, Seifert KA, Bruns TD, 2010. Quantifying microbial communities with 454 pyrosequencing: does read abundance count? *Molecular Ecology* 19: 5555-5565.
- Arnold AE, Henk DA, Eells RL, Lutzoni F, Vilgalys R, 2007. Diversity and phylogenetic affinities of foliar fungal endophytes in loblolly pine inferred by culturing and environmental PCR. *Mycologia* 99: 185-206.
- Arnold AE, Maynard Z, Gilbert GS, Coley PD, Kursar TA, 2000. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? *Ecology Letters* 3: 267-274.
- Arnold AE, Mejia LC, Kylo D, Rojas EI, Maynard Z, Robbins N, Herre EA, 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 15649-15654.
- Arnot DE, Roper C, Bayoumi RAL, 1993. Digital Codes from Hypervariable Tandemly Repeated DNA-Sequences in the Plasmodium falciparum Circumsporozoite Gene Can Genetically Barcode Isolates. *Molecular and Biochemical Parasitology* 61: 15-24.
- Beaugrand, G., Brander, K.M., Lindley, J.A., Souissi, S. and Reid, P.C., 2003, Plankton effect on cod recruitment in the North Sea. *Nature*, 426 : 661-664. DOI : 10.1038/nature02164
- Beck, A.M., Dawson, J.O. and Yannarell, A.C. Linkages between potential root-bound symbionts and non-symbiotic soil microbes in the alder and birch rhizosphere Submitted 03-MAY-2016 Natural Resources and Environmental Sciences, University of Illinois at Urbana-Champaign, 1102 S.
- Begerow D, Nilsson H, Unterseher M, Maier W, 2010. Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87: 99-108.
- Bellard C, Bertelsmeier C, Leadley P, Thuiller W, Courchamp F, 2012. Impacts of climate change on the future of biodiversity. *Ecology Letters*: DOI: 10.1111/j.1461-0248.2011.01736.x.
- Berry D, Ben Mahfoudh K, Wagner M, Loy A, 2011. Barcoded Primers Used in Multiplex Amplicon Pyrosequencing Bias Amplification. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 7846-7849.

- Blackwell M, 2011. The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 Million Species? *American Journal of Botany* 98: 426-438.
- Bradley DJ, Gilbert GS, Martiny JBH, 2008. Pathogens promote plant diversity through a compensatory response. *Ecology Letters* 11: 461-469.
- Buck JW, Walcott RR, Beuchat LR, 2003. Recent Trends in Microbiological Safety of Fruits and Vegetables. Online. *Plant Health Progress* doi:10.1094/PHP-2003-0121-01-RV.
- Chatzissavvidis, C, Veneti, G, Papadaskis, I. and Therios, I, 2008. Effect of and CaCl<sub>2</sub> on the antioxidant mechanism of leaves and stems of the rootstock CAB-6P (*Prunus cerasus* L) under in vitro conditions. *Plant Cell Tiss Cult.* 95,37-45.
- CHEBOUTI. Y., 2002 – Note technique sur la culture du pistachier fruitier. *Rev. La forêt*
- Cheng,G. Diversity of plant endophyte microbial community of the *Populus euphratica* in Yuli County Submitted 01-MAY-2012 College of Life Science and Technology of Xinjiang University, Life Science and Technology Institute, Shengli Road No. 14, Urumqi, Xinjiang 830046, China
- Clay K, Holah J, 1999. Fungal endophyte symbiosis and plant diversity in successional fields. *Science* 285: 1742-1744.
- Coluccio AE, Rodriguez RK, Kernan MJ, Neiman AM, 2008. The Yeast Spore Wall Enables Spores to Survive Passage through the Digestive Tract of *Drosophila*. *Plos One* 3.
- Cordier T, (2012) Structure des assemblages fongiques de la phyllosphère des arbres forestiers et effet potentiel du changement climatique.
- Cordier T, Robin C, Capdevielle X, Fabreguettes O, Desprez-Loustau ML & Vacher C (2012) The composition of phyllosphere fungal assemblages of European beech (*Fagus sylvatica*) varies significantly along an elevation gradient. *New Phytol* 196: 510–519.
- Courty PE, Buee M, Diedhiou AG, Frey-Klett P, Le Tacon F, Rineau F, Turpault MP, Uroz S, Garbaye J, 2010. The role of ectomycorrhizal communities in forest ecosystem processes: New perspectives and emerging concepts. *Soil Biology & Biochemistry* 42: 679-698.
- Crick, F. (1970). "Central dogma of molecular biology." *Nature* 227(5258): 561-3.
- Crick, F. H. (1958). "On protein synthesis." *Symp Soc Exp Biol* 12: 138-63.
- Crous,P.W. and Groenewald,J.Z.Fungal Planet description sheets: 469-557 Submitted 11-NOV-2016 Evolutionary Phytopathology, CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Uppsalalaan 8, Utrecht, UT 3584 CT, The Netherlands
- Crous,P.W., Quaedvlieg,W., Sarpkaya,K., Can,C. and Erkilic,A. Septoria-like pathogens causing leaf and fruit spot of pistachio Submitted 23-JUL-2013 Evolutionary Phytopathology, CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Uppsalalaan 8, Utrecht 3584 CT, The Netherlands
- Devictor V, Julliard, R., Couvet; D., Jiguet, F., 2008. Birds are tracking climate warming, but not fast enough. *Proc. R. Soc. B* 275: 2743-2748.

- Di Castri, F, 1973. Climatographical comparisons between Chile and the western coast of North America. In : Di Castri, F, Mooney, H.A. (ed.) : Mediterranean Type Ecosystems. Pp. 21-36 Springer –Verlag, Berlin.
- Dong,W., Yu,M., Wu,L. and Si,J. Endophytic fungi assemblages from 6 families of *Dendrobium Officinale* Submitted 27-JUL-2016 Zhejiang A&F University, College of Forest and Biotechnology, Huancheng Street No. 88, Lin'an, Hangzhou, Zhejiang 310000, China
- Doshmanfana, S., Rahiminejad,M.R. and Ghaemmaghami,L. Submitted The relationships among the wild and cultivated *Pistacia* gene-pool in Iran Submitted 30-DEC-2013 Department of Biology, University of Isfahan, Hezar-Jarib Street, Isfahan 81746-73441, Iran
- Ebrahimi,L. and Fotouhifar,K.-B. Direct Submission 22-SEP-2015 Plant Pathology, University of Tehran, Daneshkadeh Street, Karaj, Alborz 31587-77871, Iran
- Edwards,I.P. and Zak,D.R. Fungal community composition and function after long-term exposure of northern forests to elevated atmospheric CO<sub>2</sub> and tropospheric O<sub>3</sub> *Glob Chang Biol* 17 (6), 2184-2195 (2011) Submitted 22-OCT-2010 School of Natural Resources & Environment, University of Michigan, 440 Church St, Ann Arbor, MI 48109, USA
- El Amrani,M. Direct Submission 16-MAY-2016 Faculty of Pharmacy, AinShams University, Khalifa El-Maamon st, Abbasiya sq., Cairo 11566, Egypt
- Eo,J.K., Eom,A.H. and Lee,B.H. Endophytes' Diversity Isolated from *Thuja koraiensis* Nakai in Korean Peninsular Submitted 17-JUN-2016 Contact:Ju-Kyeong Eo National Institute of Ecology, Basic research; Geumgang-ro 1210, Masea-myeon, Seocheon, Chungnam 33657, Korea URL : <http://www.nie.re.kr/>
- Feldman T, O'Brien H, Arnold A, 2008. Moths that Vector a Plant Pathogen also Transport Endophytic Fungi and Mycoparasitic Antagonists. *Microbial Ecology* 56: 742-750.
- FERGUSON, 1993 - *Pistacia* – CRCh and book of flowing V- IVCRC press pp: 88-93.
- Floren,A., Kruger,D., Muller,T., Dittrich,M., Rudloff,R., Hoppe,B. and Linsenmair,K.E. Diversity and Interactions of Wood-Inhabiting Fungi and Beetles after Deadwood Enrichment Submitted 17-DEC-2014 Contact:Dirk Krueger UFZ - Helmholtz Centre for Environmental Research, Soil Ecology; Theodor-Lieser Strasse 4, Halle (Saale), SA D-06120, Germany URL : <http://www.ufz.de/index.php?en=6181>
- Fonseca-Garcia,C., Coleman-Derr,D., Garrido,E., Visel,A., Tringe,S.G. and Partida-Martinez,L.P. The Cacti Microbiome: Interplay between Habitat-Filtering and Host-Specificity *Front Microbiol* 7, 150 (2016) Submitted 13-JAN-2016 Departamento de Ingenieria Genetica, Centro de Investigacion y de Estudios Avanzados, Km. 9.6 Libramiento Norte Carr. Irapuato-Leon, Irapuato, Guanajuato 36821, Mexico
- Gardes M, Bruns TD, 1993. Its Primers with Enhanced Specificity for Basidiomycetes - Application to the Identification of Mycorrhizae and Rusts. *Molecular Ecology* 2: 113- 118.



- Garzoli,L. and Varese,G.C. Direct Submission 14-DEC-2015 Life Science and System Biology, University of Turin, Via Mattioli 25, Turin, TO 30100, Italia
- Gausсен, H., Leroy, J.F., et Ozenda, P., 1982. Précis de Botanique. Tome II. Les végétaux supérieurs, 579p
- Gilbert GS, 2002. Evolutionary ecology of plant diseases in natural ecosystems. Annual Review of Phytopathology 40: 13-43.
- Gilbert GS. 2002. Evolutionary ecology of plant diseases in natural ecosystems. Annual Review of Phytopathology 40: 13–43.
- Giraud T, Refregier G, Le Gac M, de Vienne DM, Hood ME, 2008. Speciation in fungi. Fungal Genetics and Biology 45: 791-802.
- Gnavi,G., Poli,A. and Varese,G.C. Marine fungi isolated from algae in the Mediterranean sea Submitted 23-MAR-2015 Life Science and System Biology, University of Turin, Via Mattioli 25, TURIN, TO 30100, Italia
- Göre ME, Bucak C, 2007. Geographical and seasonal influences on the distribution of fungal endophytes in *Laurus nobilis*. Forest Pathology 37: 281-288.
- Hagh Doust,N., Akbarinia,M., Safaie,N., Yousefzadeh,H. and Balint,M. The Effect of Dust Deposition on Diversity of Persian oak (*Quercus brantii* L.) Fungal Endophytes Submitted 27-JUL-2016 Forestry, Tarbiat Modares University, Jalal Al Ahmad, Tehran 67769959888, Iran
- Hashizume Y, Sahashi N., Fukuda K., 2008. The influence of altitude on endophytic mycobiota in *Quercus acuta* leaves collected in two areas 1000 km apart FOREST PATHOLOGY 38: 218-226.
- Hausdorf B, 2011. Progress toward a general species concept. Evolution 65: 923-931.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, DeWaard JR, 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences 270: 313-321.
- Herre EA, Mej\_ia LC, Kyllo DA, Rojas E, Maynard Z, Butler A & Van Bael SA (2007) Ecological implications of anti-pathogen effects of tropical fungal endophytes and mycorrhizae. Ecology 88: 550–558.
- Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, Huhndorf S, James T, Kirk PM, Lucking R, Lumbsch HT, Lutzoni F, Matheny PB, McLaughlin DJ, Powell MJ, Redhead S, Schoch CL, Spatafora JW, Stalpers JA, Vilgalys R, Aime MC, Aptroot A, Bauer R, Begerow D, Benny GL, Castlebury LA, Crous PW, Dai YC, Gams W, Geiser DM, Griffith GW, Gueidan C, Hawksworth DL, Hestmark G, Hosaka K, Humber RA, Hyde KD, Ironside JE, Koljalg U, Kurtzman CP, Larsson KH, Lichtwardt R, Longcore J, Miadlikowska J, Miller A, Moncalvo JM, Mozley-Standridge S, Oberwinkler F, Parmasto E, Reeb V, Rogers JD, Roux C, Ryvarden L, Sampaio JP, Schussler A, Sugiyama J, Thorn RG, Tibell L, Untereiner WA, Walker C, Wang Z, Weir A, Weiss M, White MM, Winka K, Yao YJ, Zhang N, 2007. A higher level phylogenetic classification of the Fungi. Mycological Research 111: 509-547.
- Hyde,K.D., Liu,J.K., Jones,E.B.G., Ariyawansa,H.A. and Bhat,D.J. Fungal Diversity Notes 1-110: Taxonomic and phylogenetic contributions to fungal species Submitted

- 26-JAN-2015 School of Sciences, Mae Fah Luang University, Institute of Excellence in Fungal Research, 333 M. 1, Thasud, Muang, Chiang Rai 57100, Thailand
- Inácio J, Pereira P, Carvalho M, Fonseca A, Amaral-Collaco MT, Spencer-Martins I. 2002. Estimation and diversity of phylloplanemycobiota on selected plants in a mediterranean-type ecosystem in Portugal. *Microbial Ecology* 44: 344–353.
  - IPCC, Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
  - James TY, Kauff F, Schoch C, Matheny B, Hofstetter V, Cox CJ, Celio G, Guiedan C, Fraker E, Miadlikowska J, Lumbsh T, Rauhut A, Reeb V, Arnold A, Amtoft A, Stajich JE, Hosaka K, Sung G, Johnson D, O'Rourke B, Crockett M, Binder M, Curtis JM, Slot JC, Wang Z, Wilson AW, Schueller A, Longcore JE, O'Donnell K, Mozley-Standridge S, Porter D, Letcher PM, Powell MJ, Taylor JW, White MM, Griffith GW, Davies DR, Humber RA, Morton JB, Sugiyama J, Rossman AY, Rogers JD, Pfister DH, Hewitt D, Hansen K, Hambleton S, Shoemaker RA, Kohlmeyer J, Volkman-Kohlmeyer B, Spotts RA, Serdani M, Crous PW, Hughes KW, Matsuura K, Langer E, Langer G, Untereiner WA, Lucking R, Budel B, Geiser DM, Aptroot DM, Diederich P, Schmitt I, Schultz M, Yahr R, Hibbett DS, Lutzoni F, McLaughlin DJ, Spatafora JW, Vilgalys R, 2006. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* 443: 818-822.
  - Jayasiri, S.C. and Hyde, K.D. Submitted 10-DEC-2015 Biological Sciences, Mae Fah Luang University, Muang, Chiang Rai, Chiang Rai 57100, Thailand
  - Jones MDM, Forn I, Gadelha C, Egan MJ, Bass D, Massana R, Richards TA, 2011. Discovery of novel intermediate forms redefines the fungal tree of life. *Nature* 474: 200-U234.
  - Jroundi, F., Gonzalez-Munoz, M.T., Sterflinger, K. and Pinar, G. Molecular Tools for Monitoring the Ecological Sustainability of a Stone Bio-Consolidation Treatment at the Royal Chapel, Granada Submitted 25-JUN-2014 Dept of Microbiology, University of Granada, Faculty of Science, Av. Fuentenueva s/n, Granada, Granada 18071, Spain
  - Jumpponen A, Jones KL, 2009. Massively parallel 454 sequencing indicates hyperdiverse fungal communities in temperate *Quercus macrocarpa* phyllosphere. *New Phytologist* 184: 438-448.
  - Jumpponen A, Jones KL, 2010. Seasonally dynamic fungal communities in the *Quercus macrocarpa* phyllosphere differ between urban and nonurban environments. *New Phytologist* 186: 496-513.
  - Kernaghan, G., Mayerhofer, M. and Griffin, A. Fungal endophytes of wild and hybrid *Vitis* leaves and their potential for vineyard biocontrol *Can. J. Microbiol.* (2017) In press Submitted 19-SEP-2016 Biology, Mount Saint Vincent University, 166 Bedford Hwy., Halifax, Nova Scotia B3M 2J6, Canada
  - Kinkel LL, 1997. Microbial population dynamics on leaves. *Annual Review of Phytopathology* 35: 327-347.

- Kircher M, Kelso J, 2010. High-throughput DNA sequencing - concepts and limitations. *Bioessays* 32: 524-536.
- Kirk PM, Cannon PF, Stalpers JA, Minter DW, 2008. *Dictionary of the Fungi*, 10th edn. CAB International. Klamt M, Thompson R, Davis J, 2011. Early response of the platypus to climate warming. *Global Change Biology* 17: 3011-3018.
- Kofidis, G, Bosabalidis, A., and Moustakas, M., 2003, Contemporary seasonal and altitudinal variations of leaf structural features in *Oregano* (*Origanum vulgare* L.). *Annals of Botany* 92, 635-645.
- Kõljalg U, Larsson KH, Abarenkov K, Nilsson RH, Alexander IJ, Eberhardt U, Erland S, Hoiland K, Kjøller R, Larsson E, Pennanen T, Sen R, Taylor AFS, Tedersoo L, Vralstad T, Ursing BM, 2005. UNITE: a database providing web-based methods for the molecular identification of ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist* 166: 1063-1068.
- Lamb TG, Tonkyn DW, Kluepfel DA, 1996. Movement of *Pseudomonas aureofaciens* from the rhizosphere to aerial plant tissue. *Canadian Journal of Microbiology* 42: 1112-1120.
- Lenoir J, Gégout, J.C., Marquet, P.A., de Ruffray, P., Brisse, H., 2008. A Significant Upward Shift in Plant Species Optimum Elevation During the 20th Century. *Science* 320: 1768-1771.
- Levetin E, Dorsey K, 2006. Contribution of leaf surface fungi to the air spora. *Aerobiologia* 22: 3-12.
- Lindow SE, Brandl MT, 2003. Microbiology of the phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 1875-1883.
- Ma, W. The fungi in different Chinese tombs Direct Submission 17-APR-2017 School of Life Sciences, Lanzhou University, Tianshui South street, Lanzhou 730000, China
- MAARUF. A, 1997 – Principe de l'écologie des arbres fruitiers, revue: Ingénieur Agronome Arabe, pp: 18-44
- Mangaiyarkarasi, T., Gopal, R. and Muthu, G. Fungi isolated from subcutaneous Phaeohyphomycoses Submitted 16-NOV-2014 Department of Microbiology, Sri Manakula Vinayagar Medical College, Kalitheerthalkuppam, Madagadipet, Puducherry, Puducherry 605107, India
- Márquez LM, Redman RS, Rodriguez RJ, Roossinck MJ, 2007. A Virus in a Fungus in a Plant: Three-Way Symbiosis Required for Thermal Tolerance. *Science* 315: 513-515.
- Massimo, N.C., Nandi Devan, M.M., Arendt, K.R., Wilch, M.H., Riddle, J.M., Furr, S.H., Steen, C., U'Ren, J.M., Sandberg, D.C. and Arnold, A.E. Fungal Endophytes in Aboveground Tissues of Desert Plants: Infrequent in Culture, but Highly Diverse and Distinctive Symbionts Submitted 31-DEC-2014 Plant Sciences, University of Arizona, 1140 E South Campus Drive, Forbes 303, Tucson, AZ 85721, USA
- McCarty JP, 2001. Ecological Consequences of Recent Climate Change. *Conservation Biology* 15: 320-331.
- McLaughlin DJ, Hibbett DS, Lutzoni F, Spatafora JW, Vilgalys R, 2009. The search for the fungal tree of life. *Trends in Microbiology* 17: 488-497.

- Menkis,A., Ostbrant,I.-L., Davydenko,K., Bakys,R., Balalaikins,M. Scolytus multistriatus associated with Dutch elm disease on island of Gotland: phenology and communities of vectored fungi Submitted 02-MAR-2015 Department of Forest Mycology and Plant Pathology, Swedish University of Agricultural Sciences, Almas alle 5, Uppsala SE-75007, Sweden
- Menkis,A., Ostbrant,I.-L., Davydenko,K., Bakys,R., Balalaikins,M. and Vasaitis,R. Scolytus multistriatus associated with Dutch elm disease on island of Gotland: phenology and communities of vectored fungi Submitted 02-MAR-2015 Department of Forest Mycology and Plant Pathology, Swedish University of Agricultural Sciences, Almas alle 5, Uppsala SE-75007, Sweden
- Meyer CP, Paulay G, 2005. DNA barcoding: Error rates based on comprehensive sampling. Plos Biology 3: 2229-2238.
- Monjauze, A., 1968. Connaissance du (betoum) Pistacia atlantica Desf. Biologie et foret. Rev. For. 4, 357-363.
- Morris CE, Kinkel LL, 2002. Fifty years of phyllosphere microbiology: Significant contributions to research in related fields. In: Phyllosphere Microbiology (eds. Lindow SE, HechtPoinar EI, Elliott VJ), pp. 365-375. Amer Phytopathological Soc, St Paul.
- Morris SJ, Robertson G.P., 2005. Linking function between scales of resolution. In: The Fungal Community (ed. Dighton J, White, J.F., Oudemans, P.), pp. 13-.26. Taylor & Francis Group.
- Mougou A, Dutech C, Desprez-Loustau ML, 2008. New insights into the identity and origin of the causal agent of oak powdery mildew in Europe. Forest Pathology 38: 275-287.
- Munné-Bosch, S., and Alegre, L., 2000. Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in Rosmarinus officinalis plants 2010, 925-931.
- Munné-Bosch, S., and Peñuelas, J., 2003. Photo- and antioxidative protection during summer leaf senescence in pistacia lentiscus L. grown under mediterranean field conditions Ann. Bot. 92, 385-391.
- Nègre, R., 1962. Petite flore des régions arides du Maroc occidental Tome 2 ; Ed. C.N.R.S. 566p.
- Newton AC, Fitt BDL, Atkins SD, Walters DR, Daniell TJ, 2010. Pathogenesis, parasitism and mutualism in the trophic space of microbe-plant interactions. Trends in Microbiology 18: 365-373.
- Nilsson RH, Ryberg M, Kristiansson E, Abarenkov K, Larsson KH, Koljalg U, 2006. Taxonomic Reliability of DNA Sequences in Public Sequence Databases: A Fungal Perspective. Plos One 1.
- Osono T, 2006. Role of phyllosphere fungi of forest trees in the development of decomposer fungal communities and decomposition processes of leaf litter. Canadian Journal of Microbiology 52: 701-716.
- Osono T, Mori A, 2004. Distribution of phyllosphere fungi within the canopy of giant dogwood. Mycoscience 45: 161-168.

- Parmesan C, Yohe, G., 2003. A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. *Nature* 421.
- Peay KG, Kennedy PG, Bruns TD, 2008. Fungal Community Ecology: A Hybrid Beast with a Molecular Master. *BioScience* 58: 799-810.
- Pedrola-Monfort, J., Martinez-Nieto, I., Guara-Requena, M., Ciurana-Pallardo, M.-J., Aguilera-Palasi, A. and Mateu-Andres, I. Phylodynamic reconstruction of *Pistacia lentiscus* in the Mediterranean basin Submitted 23-OCT-2015 Departament de Botanica, Universitat de Valencia, Av. Dr. Moliner, 50, Burjassot, Valencia E-46100, Spain
- Peñuelas J, Boada, M., 2003. A global change-induced biome shift in the Montseny mountains (NE Spain). *Global Change Biology* 9: 131-140.
- Pitkaranta, M., Meklin, T., Hyvarinen, A., Nevalainen, A., Paulin, L., Auvinen, P., Lignell, U. and Rintala, H. Molecular profiling of fungal communities in settled dust of moisture damaged buildings before and after renovations Submitted 12-AUG-2010 to the INSDC. Pitkaranta M., University of Helsinki, Institute of Biotechnology, Viikinkaari 4, 00790 Helsinki, FINLAND
- Popova, O.V., and Golldack, D., 2007. In the halotolerant *lobularia maritima* (Brassicaceae) salt adaptation correlates with activation of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase and the vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *Journal of Plant Physiology* 164, 1278-1288.
- Porras-Alfaro A, Bayman P, 2011. Hidden Fungi, Emergent Properties: Endophytes and Microbiomes. In: *Annual Review of Phytopathology*, Vol 49, pp. 291-315. Annual Reviews, Palo Alto.
- Quaedvlieg, W., Verkley, G.J., Shin, H.D., Barreto, R.W., Alfenas, A.C., Swart, W.J., Groenewald, J.Z. and Crous, P.W. Sizing up *Septoria* Submitted 05-JUN-2013 CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Uppsalalaan 8, Utrecht 3584 CT, The Netherlands
- Redman RS, Sheehan KB, Stout RG, Rodriguez RJ, Henson JM, 2002. Thermotolerance Generated by Plant/Fungal Symbiosis. *Science* 298: 1581.
- Rittenour, W.R., Ciaccio, C.E., Barnes, C.S., Kashon, M.L., Lemons, A.R., Beezhold, D.H. and Green, B.J. Internal transcribed spacer rRNA gene sequencing analysis of fungal diversity in Kansas City indoor environments *Environ Sci Process Impacts* 16 (1), 33-43 Submitted 31-OCT-2013 Allergy and Clinical Immunology Branch, Health Effects Laboratory Division, National Institute for Occupational Safety and Health, Centers for Disease Control and Prevention, 1095 Willowdale Road, M.S. 4020, Morgantown, WV 26505, USA
- Rodriguez R, Redman R, 2007. More than 400 million years of evolution and plants still can't make it on their own: Plant stress tolerance and habitat expansion via fungal symbiosis. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology* 146: 20.
- Rodriguez RJ, White JF Jr, Arnold AE, Redman RS. 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist* 182: 314–330.
- Root TL, Price JT, Hall KR, Schneider SH, Rosenzweig C, Pounds JA, 2003. Fingerprints of global warming on wild animals and plants. *Nature* 421: 57-60.

- Ruibal,C., Platas,G. and Bills,G.F. High morphological convergence of melanized fungi from rock formations in the central mountain system of Spain Submitted 30-NOV-2004 Centro de Investigacion Basica (CIBE), M.S.D. de Espana, S.A., C/ Josefa Valcarcel, 38, Madrid E 28027, Spain
- Sahashi N, Kubono, T., Miyasawa, Y., Ito, S., 1999. Temporal variations in isolation frequency of endophytic fungi of Japanese beech. *Canadian Journal of Botany* 77: 197-202.
- Seifert KA, 2009. Progress towards DNA barcoding of fungi. *Molecular Ecology Resources* 9: 83-89.
- Seifert KA, 2009. Progress towards DNA barcoding of fungi. *Molecular Ecology Resources* 9: 83-89.
- Shendure J, Ji H, 2008. Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology* 26: 1135 -1145.
- Stockinger H, Kruger M, Schussler A, 2010. DNA barcoding of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 187: 461-474.
- Sunshine AVB, Valencia MC, Rojas EI, G'omez N, Windsor DM & Herre EA (2009) Effects of foliar endophytic fungi on the preference and performance of the leaf beetle *Chelymorpha alternans* in Panama. *Biotropica*, 41: 221–225.
- Talley S, Coley P, Kursar T, 2002. The effects of weather on fungal abundance and richness among 25 communities in the Intermountain West. *BMC Ecology* 2: 7.
- Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S, Kasuga T, Geiser DM, Hibbett DS, Fisher MC, 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics and Biology* 31: 21-32.
- Taylor,D.L., Hollingsworth,T.N., McFarland,J.W., Lennon,N.J., Nusbaum,C. and Ruess,R.W. A first comprehensive census of fungi in soil reveals both hyperdiversity and fine-scale niche partitioning *Ecology* (2014) In press Submitted 04-SEP-2013 Institute of Arctic Biology, University of Alaska, 311 Irving I Building, Fairbanks, AK 99775, USA
- Thomas CD, Cameron A, Green RE, Bakkenes M, Beaumont LJ, Collingham YC, Erasmus BFN, de Siqueira MF, Grainger A, Hannah L, Hughes L, Huntley B, van Jaarsveld AS, Midgley GF, Miles L, Ortega-Huerta MA, Peterson AT, Phillips OL, Williams SE, 2004. Extinction risk from climate change. *Nature* 427: 145-148.
- Thompson IP, Bailey MJ, Fenlon JS, Fermor TR, Lilley AK, Lynch JM, McCormack PJ, McQuilken MP, Purdy KJ, Rainey PB, Whipps JM, 1993. Quantitative and Qualitative Seasonal-Changes in the Microbial Community from the Phyllosphere of Sugar-Beet (*Beta-Vulgaris*). *Plant and Soil* 150: 177-191.
- Torres Cruz,T., Ford,P., Redfern,J., Young,A., Hutchinson,M., Talbot,A., Plaut,J.A., Yepez,E.A., Pockman,W., McDowell,N., Natvig,D., Dvorachek,W. and Porrás-Alfaro,A. Fungal-Tree Symbiotic Interactions: Drought-associated Tree Mortality in *Pinus edulis* in New Mexico Submitted 08-JUL-2015 Biological Sciences, Western Illinois University, 1 University Circle, Macomb, IL 61455, USA
- Unterseher M, Jumpponen A, Opik M, Tedersoo L, Moora M, Dormann CF, Schnittler M, 2011. Species abundance distributions and richness estimations in

- fungal metagenomics - lessons learned from community ecology. *Molecular Ecology* 20: 275-285.
- Valentini A, Pompanon F, Taberlet P, 2009. DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology & Evolution* 24: 110-117.
  - Van Der Heijden MGA, Bardgett RD, Van Straalen NM, 2008. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters* 11: 296-310.
  - Viret O, Scheidegger C, Petrini O, 1994. Infection of Beech Leaves (*Fagus-Sylvatica*) by the Endophyte *Discula-Umbrinella* (Teleomorph, *Apiognomonina-Errabunda*) - Low- Temperature Scanning Electron-Microscopy Studies. *Canadian Journal of Botany- Revue Canadienne De Botanique* 71: 1520-1527.
  - Vitousek PM, 1994. Beyond Global Warming: Ecology and Global Change. *Ecology* 75: 1861-1876.
  - Vokou, D., Vareli, K., Zarali, E., Karamanoli, K., Constantinidou, H. I. a, Monokrusos, N., Sainis, I. (2012). Exploring Biodiversity in the Bacterial Community of the Mediterranean Phyllosphere and its Relationship with Airborne Bacteria. *Microbial Ecology*, 64, 714-724. Doi:10.1007/s00248-012-0053-7.
  - Vorholt JA (2012) Microbial life in the phyllosphere. *Nat Rev Microbiol* 10: 828–840.
  - Vu,D., Groenewald,M., Szoke,S., Cardinali,G., Eberhardt,U., Stielow,B., de Vries,M., Verkleij,G., Crous,P., Boekhout,T. and Robert,V. Direct Submission 27-OCT-2016 Bioinformatics Group, CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Upsalalaan, Utrecht 3584CT, Netherlands
  - Wahid, A., 2007. Physiological implications of biosynthesis for net assimilation and heat-stress tolerance of sugarcane (*Saccharum officinarum*) sprouts. *J. Plants Res.* 120, 219-229.
  - Wahid, S., Gelani, M., Ashraf, M.R, 2007. and Foolad, M.R., 2007.Heat tolerance in plants : An overview. *Environmental and experimental botany* 61,199-223.
  - Walther GR, Post, E., Convey, P., Menzel, C., Beebee, T.J.C., Fromentin, J.M., Hoegh- Guldberg, O., Bairlein, F., 2002. Ecological responses to recent climate change. *Nature* 416.
  - White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (ed. Innis MA, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White), pp. 315- 322. Academic Press, Inc., New York.
  - Wiemers M, Fiedler K, 2007. Does the DNA barcoding gap exist? - a case study in blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae). *Frontiers in Zoology* 4: 8.
  - Wilkinson HH, Siegel MR, Blankenship JD, Mallory AC, Bush LP, Schardl CL, 2000. Contribution of fungal loline alkaloids to protection from aphids in a grass-endophyte mutualism. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13: 1027-1033.
  - Will KW, Mishler BD, Wheeler QD, 2005. The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. *Systematic Biology* 54: 844-851.

- Will KW, Rubinoff D, 2004. Myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace morphology for identification and classification. *Cladistics-the International Journal of the Willi Hennig Society* 20: 47-55.
- Wilson D, Carroll GC, 1994. Infection Studies of *Discula-Quercina*, an Endophyte of *Quercus-Garryana*. *Mycologia* 86: 635-647.
- Wilson M, Hirano SS, Lindow SE, 1999. Location and survival of leaf-associated bacteria in relation to pathogenicity and potential for growth within the leaf. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1435-1443.
- Witt JDS, Threlloff DL, Hebert PDN, 2006. DNA barcoding reveals extraordinary cryptic diversity in an amphipod genus: implications for desert spring conservation. *Molecular Ecology* 15: 3073-3082.
- Wootton, J. C. and S. Federhen (1996). "Analysis of compositionally biased regions in sequence databases." *Methods Enzymol* 266: 554-71.
- Wulff EG, van Vuurde JW, Hockenhull J, 2003. The ability of the biological control agent *Bacillus subtilis*, strain BB, to colonise vegetable brassicas endophytically following seed inoculation. *Plant and Soil* 255: 463-474.
- Yadav, R. K. P., Karamanoli, K., & Vokou, D. (2005). Bacterial colonization of the phyllosphere of mediterranean perennial species as influenced by leaf structural and chemical features. *Microbial Ecology*, 50, 185–196. doi:10.1007/s00248-004-0171-y
- Yadav, R. K. P., Papatheodorou, E. M., Karamanoli, K., Constantinidou, H. I. a, & Vokou, D. (2008). Abundance and diversity of the phyllosphere bacterial communities of Mediterranean perennial plants that differ in leaf chemistry. *Chemoecology*, 18, 217–226. doi:10.1007/s00049-008-0408-1
- Yantian Ma, M., Fasi Wu, W., He Zhang, Z. and Ye Du, D. The contribution of air microbe to wall painting corrosion in Maogao Grottoes, China Submitted 21-OCT-2013 Life science school, Lanzhou University, South Tianshui RD #222, Lanzhou, Gansu, 730000, P., 730000, CHINA
- Yi, T., Wen, J., Golan-Goldhirsh, A. and Parfitt, D.E. Phylogenetics and reticulate evolution in *Pistacia* (Anacardiaceae) Submitted 18-DEC-2006 Southwestern China Wild Species Bank, Kunming Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Kunming, Yunnan 650204, P.R. China
- Zhou, G.A., Chang, R.Z., and Qiu, L.J., 2010. Overexpression of soybean ubiquitin-conjugating enzyme gene *GmUBC2* confers enhanced drought and salt tolerance through modulating abiotic stress-responsive gene expression in *Arabidopsis*. *Plants Mol Biol.* 72, 357-367.
- Zhu, J.K., 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 247-273.
- ZOHARY M., 1952 - A monographical study of the genus *Pistacia*. *Palestine Journal Bot. J. Séries*, 5 pp:187-228.