



Laboratoire
Dynamique de la
Biodiversité

ECOFOR
ECOSYSTEMES FORESTIERS

BIODIVERSITE ET GESTION FORESTIERE

**Gestion forestière :
implications dans le fonctionnement
et la biodiversité des écosystèmes lotiques associés**

Rapport final: 20 novembre 2003

Responsable du projet : Eric Chauvet

Contributions : Sébastien Brosse, Jean-Yves Charcosset, Eric Chauvet, Lounes Chikhi, Nicolas Féau, Katia Fève, Monique Gardes, Karine Guilhem, Beryl Laitung, Antoine Lecerf, Sophie Millot et Prolet Pichmanova.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE.....	5
RESUME DU PROJET	5
ETAT DE L'ART	7
PRESENTATION DES RESULTATS	9
<i>Objectifs</i>	9
<i>Méthodologie générale</i>	12
RÉFÉRENCES	14
CHAP. 1: DIVERSITY OF RIPARIAN VEGETATION AND AQUATIC FUNGI IN WOODLAND STREAMS	16
ABSTRACT.....	16
INTRODUCTION.....	16
MATERIALS AND METHODS	17
RESULTS	20
<i>Abundance, richness and diversity of aquatic hyphomycetes</i>	20
<i>Species assemblages and site comparisons</i>	21
<i>Litter manipulation</i>	23
DISCUSSION.....	24
<i>Hierarchical diversity</i>	24
<i>Fungal assemblages and substrate preference</i>	25
ACKNOWLEDGEMENTS	27
REFERENCES	27
CHAP. 2: DIVERSITY OF RIPARIAN VEGETATION AND FUNGAL POPULATIONS IN WOODLAND STREAMS: GENETIC DIVERSITY IN <i>TETRACHAETUM ELEGANS</i>, A MITOSPORIC AQUATIC FUNGUS.....	37
ABSTRACT.....	37
INTRODUCTION.....	37
MATERIALS AND METHODS.....	39
<i>Population sampling and cultivation of fungal isolates</i>	39
<i>DNA extraction</i>	40
<i>AFLP analysis</i>	41
<i>Reproducibility tests on AFLP bands</i>	41
<i>Scoring procedures</i>	41
<i>Intrapopulation variation</i>	44
<i>Population differentiation and substructuring</i>	45
<i>Linkage disequilibrium</i>	45
RESULTS	46
<i>Characteristics of AFLP markers</i>	46
<i>Intrapopulation genetic and haplotypic diversity</i>	46
<i>Cluster analysis</i>	49
<i>Population differentiation and substructuring</i>	49
<i>Linkage disequilibrium (LD)</i>	52
DISCUSSION.....	52
<i>Genetic diversity</i>	52
<i>Gene flow and isolation between sampling sites</i>	53
<i>Substrate specificity and selection</i>	53
<i>Linkage disequilibrium and clonality</i>	54
CONCLUSION AND PERSPECTIVES.....	54
ACKNOWLEDGEMENTS	55
REFERENCES	56

CHAP. 3 : EFFET DE LA DIVERSITE FORESTIERE SUR LA DIVERSITE SPECIFIQUE ET FONCTIONNELLE DES COMMUNAUTES DE MACROINVERTEBRES BENTHIQUES	58
INTRODUCTION.....	58
MATERIEL ET METHODES	58
<i>Sites</i>	58
<i>Echantillonnage</i>	59
<i>Traitement des données</i>	59
RESULTATS	60
<i>Classification des sites</i>	60
<i>Influence de la diversité spécifique des litières végétales</i>	65
<i>Diversité fonctionnelle et groupes trophiques</i>	68
DISCUSSION.....	69
REFERENCES	72
CHAP. 4 : EFFET DE LA DIVERSITE FORESTIERE SUR LA DECOMPOSITION DES LITIERES..	74
INTRODUCTION.....	74
MATERIEL ET METHODES	74
<i>Site d'étude</i>	74
<i>Physico-chimie de l'eau</i>	75
<i>Décomposition des litières</i>	75
<i>Analyses des données</i>	76
RESULTATS	77
<i>Physico-chimie</i>	77
<i>Vitesse de décomposition</i>	77
DISCUSSION.....	79
REFERENCES	80
CONCLUSION GENERALE	82
REFERENCES	83
PRODUCTION SCIENTIFIQUE.....	84

Introduction générale

Résumé du projet ¹

Le présent projet s'adresse à la **biodiversité** et au **fonctionnement de l'écosystème forestier** dans sa **composante aquatique**. Les milieux d'eau courante, ou écosystèmes lotiques, sont fortement tributaires de leur environnement terrestre. La litière produite par les arbres riverains et interceptée par la rivière constitue en effet la source majeure de matière organique pour les cours d'eau forestiers. L'incorporation de cette matière organique dans le réseau trophique aquatique est réalisée par le processus de décomposition de la litière impliquant des bactéries, des champignons (hyphomycètes aquatiques) et des macroinvertébrés aquatiques. La forêt a donc une influence globale sur le fonctionnement biogéochimique et la productivité des rivières qui la traversent. Cependant, on ignore si la diversité des litières forestières peut influencer l'activité des décomposeurs ainsi que la structure des populations et des communautés aquatiques.

Nous testerons l'hypothèse selon laquelle la gestion forestière qui contrôle la diversité de la ripisylve affecte : (1) le processus de décomposition des litières et (2) la diversité des communautés aquatiques impliquées dans la décomposition (diversités emboîtées). Une des éventualités est que la simplification généralisée des écosystèmes forestiers entraîne un appauvrissement à grande échelle de la biodiversité des milieux aquatiques.

L'approche consistera à comparer le fonctionnement et la biodiversité de rivières sous plantation monospécifique à ceux de cours d'eau bordés par l'espèce de monoculture associée à une variété plus ou moins grande d'essences plantées ou spontanées. Les forêts étudiées seront la hêtraie et la plantation de résineux (sapin, Douglas ou épicéa), l'étude du second type de plantation étant dépendante de l'existence et la sélection de sites appropriés. Le taux de décomposition des litières, la biomasse de champignons et de macroinvertébrés associés aux litières ainsi que la densité et la biomasse de macroinvertébrés présents dans ces rivières seront mesurés au cours d'un cycle annuel. La biodiversité des rivières sera évaluée aux trois niveaux : (i) gène (diversité infraspécifique de deux espèces communes d'hyphomycètes ; techniques des RAPDs et AFLP), (ii) espèce (diversité spécifique des communautés d'hyphomycètes et de macroinvertébrés) et (iii) écosystème (diversité fonctionnelle des macroinvertébrés).

L'objectif initial du présent projet est ainsi d'évaluer l'influence de la gestion forestière sur des groupes d'organismes : (i) absents des inventaires forestiers, (ii) essentiels au fonctionnement écologique de leur milieu, les cours d'eau forestiers, et (iii) contribuant à la

¹ Rappel

biodiversité générale des milieux forestiers. A partir des résultats obtenus, le but final est d'émettre un ensemble de recommandations visant à garantir l'intégrité fonctionnelle et structurelle des rivières forestières. Les recommandations destinées aux gestionnaires des milieux forestiers seront élaborées et diffusées en partenariat avec la Section Technique Inter-Régionale Sud-Ouest de l'Office National des Forêts.

Etat de l'art ¹

Avec près de 15 millions d'hectares, la forêt française couvre aujourd'hui plus du quart du territoire métropolitain et figure à la troisième place au plan européen. Ces forêts sont en grande partie localisées sur les versants de basse ou moyenne montagne. Or ces versants forestiers coïncident largement avec la zone amont des réseaux hydrographiques, c'est-à-dire l'ensemble des cours d'eau de faible ou moyenne largeur (ordre 1 à 3 ; Strahler 1957) qui constituent la majeure partie du linéaire des rivières. Par exemple, ces petites rivières représentent 86% du linéaire du réseau hydrographique de la Garonne (Décamps, comm. pers.). En conséquence, de très nombreuses rivières françaises présentent un environnement forestier.

Sur un plan fondamental, on reconnaît aujourd'hui que le fonctionnement de l'écosystème forêt concerne non seulement le milieu terrestre lui-même, mais aussi le milieu aquatique adjacent. En fait, le lit de ces rivières n'entraîne généralement pas de rupture de la canopée et le cours d'eau peut être considéré comme un élément intégrant du système forestier. Les litières végétales qui forment un compartiment majeur dans les cycles biogéochimiques des écosystèmes forestiers sont tout aussi essentielles au fonctionnement des rivières forestières (Wagener et al. 1998). Ces litières constituent la principale source de matière et d'énergie pour le réseau trophique aquatique. En effet, on considère qu'en moyenne 80% de la matière organique arrive dans le cours d'eau sous la forme de litière (Haapala & Muotka 1998). L'apport de litière moyen est d'environ $500 \text{ g m}^{-2} \text{ an}^{-1}$, dont 70 à 80% sous la forme de feuilles mortes, le reste étant constitué de bois, écorces, fleurs, fruits et bourgeons (Webster et al. 1995). Cette valeur est généralement supérieure à celle des retombées sur le sol forestier. A l'apport vertical, s'ajoute en effet un apport latéral contrôlé par le vent et la morphologie du lit des rivières qui fonctionne comme un milieu récepteur de litière.

L'incorporation de cette matière organique dans la chaîne alimentaire est réalisée par un processus de décomposition impliquant des microorganismes et des invertébrés déchetiers (Webster & Benfield 1986, Gessner et al. 1999). La biomasse de ces décomposeurs et le produit de leur activité (matière organique transformée) constituent la source de nourriture d'autres groupes d'invertébrés et finalement celle des poissons. Ainsi, à la différence des rivières larges et ouvertes qui génèrent une abondante biomasse végétale aquatique, les cours d'eau forestiers sont considérés comme des écosystèmes hétérotrophes, c'est-à-dire tributaires des apports allochtones de matière organique (Vannote et al. 1980). Les macroinvertébrés aquatiques qui ont été classés en différents groupes fonctionnels en fonction de leur mode d'alimentation et du type de matière organique particulière assimilée (Cummins 1974) sont distribués inégalement le long du continuum fluvial. En comparaison de la zone aval des rivières, la partie amont présente une forte biomasse et une diversité élevée d'invertébrés déchetiers de litières (Cummins et al. 1989). Des expériences ont montré que ces

¹ Rappel

invertébrés consomment préférentiellement les litières “ conditionnées ” par des champignons, les hyphomycètes aquatiques (Bärlocher 1992). Les invertébrés aquatiques sont également capables de sélectionner les parties de litières colonisées par des espèces fongiques particulières (Arsuffi & Suberkropp 1985). Des bilans récents montrent en fait que, par leur activité enzymatique, les champignons contribuent pour plus de 50% à la perte de masse des litières, une part importante étant convertie en spores asexuées, ou conidies (Baldy et Gessner 1997, Gessner et al. 1997). Les hyphomycètes aquatiques ne présentent pas de spécificité vis-à-vis des espèces de feuilles mortes colonisées et les différentes espèces fongiques assurent généralement les mêmes fonctions écologiques (Bärlocher 1992, Suberkropp 1992). Certains travaux semblent pourtant indiquer que ces champignons ont une préférence pour certaines espèces foliaires (Thomas et al. 1992, Charcosset & Gardes 1999 ; Chauvet & Gessner, données non publiées). Les conséquences de ces préférences vis-à-vis de leur substrat n’ont toutefois jamais été abordées à l’échelle de l’écosystème rivière forestière.

De nombreuses études se sont attachées à comparer les apports et le devenir des litières dans les cours d’eau de différentes régions du globe, soumis à des conditions naturellement variables ou à l’impact d’activités humaines (Webster & Benfield 1986, Webster et al. 1995). La décomposition des litières a été proposée comme un indicateur de l’intégrité fonctionnelle de l’écosystème rivière (Gessner & Chauvet 2000). Plusieurs facteurs anthropiques contrôlant le processus ont été identifiés, les uns concernant la qualité de la rivière, les autres celle des litières. Les travaux traitant de l’influence de la qualité du matériel végétal sur la décomposition se limitent généralement à la comparaison d’essences très différentes comme les espèces d’eucalyptus et d’aulne (Pozo et al. 1998) ou de résineux et de feuillus (Whiles & Wallace 1997). Certaines études abordent les conséquences de la disparition des milieux forestiers, due à des coupes forestières (Stone & Wallace 1998) et des agents phytopathogènes (Smock & MacGregor 1988) ou dans le cas d’un remplacement par des cultures ou des pâturages (Abelho & Graça 1996, Townsend et al. 1997, Harding et al. 1998). Cependant la gestion forestière, par le choix des essences mais aussi le type de culture, influence directement la quantité, la qualité et la phénologie des apports. Or les études ont généralement ignoré les conséquences de cette gestion lorsque celle-ci induit seulement une diversité plus ou moins grande de litières arrivant au cours d’eau. De tels changements n’entraînent pas nécessairement de modifications radicales au niveau de l’écosystème forestier mais peuvent être déterminants dans la structure et le fonctionnement de l’écosystème rivière.

Les relations existants entre la diversité des communautés végétales et la structure des communautés animales, notamment arthropodes, qu’elles abritent et des réseaux trophiques ont donné lieu à d’importants travaux pour la gestion des agro-écosystèmes (Andow 1991). Pour ce qui est des milieux aquatiques, la prise en compte des relations entre forêt et rivière a conduit les forestiers et les ingénieurs écologues à intervenir et préconiser certains aménagements dans les milieux naturels ou anthropisés. L’entretien des berges, basé sur l’enlèvement souvent systématique des embâcles, n’est toutefois pas sans conséquence sur la

biodiversité aquatique (Laitung et al. 2000, 2002). Les scientifiques, les naturalistes et les personnels forestiers ont par ailleurs réalisé des inventaires floristiques et faunistiques ainsi que des synthèses écologiques de la richesse patrimoniale des forêts (par exemple, inventaires ZNIEFF, ZICO et ceux réalisés dans le cadre de la directive “ Habitats ”). Les forêts reconnues comme des foyers de biodiversité ont fait l’objet d’études et d’attentions particulières (Dubourdiou 1997). Les études et les mesures de protection qui en découlent sont généralement orientées par le choix d’espèces que l’on souhaite favoriser (par exemple, espèces menacées ou rares d’oiseaux ou de mammifères) ou par les caractéristiques uniques ou remarquables de certains milieux. En contraste avec cette stratégie, l’objectif du présent programme est de considérer des groupes d’organismes (microorganismes et invertébrés aquatiques) à la fois : (i) absents des inventaires forestiers, (ii) essentiels au fonctionnement écologique de leur milieu, les cours d’eau forestiers, et (iii) contribuant à la biodiversité générale des milieux forestiers.

Présentation des résultats

Objectifs

Ce rapport final intervient au terme de la convention, soit 30 mois après le début du programme et de la disponibilité des fonds (sur avance de crédit par le CNRS).

Tous les objectifs scientifiques du projet ont été atteints, conformément au calendrier de réalisation. Ceux-ci ont fait l’objet de plusieurs présentations sous la forme de communication et publication. L’ensemble de recommandations basées sur les résultats obtenus et destinées aux gestionnaires est en cours d’élaboration. Dans la mesure où ces recommandations constituent l’aboutissement appliqué des recherches conduites, il est attendu que la dissémination se prolonge sur plusieurs années (voir ci-après).

L’objet de notre étude était de comprendre comment la diversité forestière contrôle : (i) la diversité des organismes aquatiques :

Niveau de biodiversité	Champignons aquatiques	Macroinvertébrés benthiques
Infraspécifique	X	
Spécifique	X	X
Fonctionnelle		X

(ii) le processus de décomposition des litières et le métabolisme de l’écosystème rivière.

En conséquence, les résultats de cette étude sont présentés ci-après sous la forme de quatre chapitres :

- Effet de la diversité des forêts de hêtre sur la diversité infraspécifique des hyphomycètes aquatiques
- Effet de la diversité forestière sur la diversité spécifique des communautés d'hyphomycètes aquatiques :
 - Forêts de hêtres
 - Forêts de conifères
- Effet de la diversité forestière sur la diversité spécifique et la diversité fonctionnelle des communautés de macroinvertébrés benthiques
- Effet de la diversité des forêts de hêtre sur le processus de décomposition des litières.

Ces quatre parties sont développées ci-après, sous la forme de chapitres en français ou de manuscrits en anglais, soumis ou en cours de révision pour publication. L'ampleur de ces chapitres est inégale du fait de l'avancement variable du traitement des données et du processus de soumission des résultats en cours.

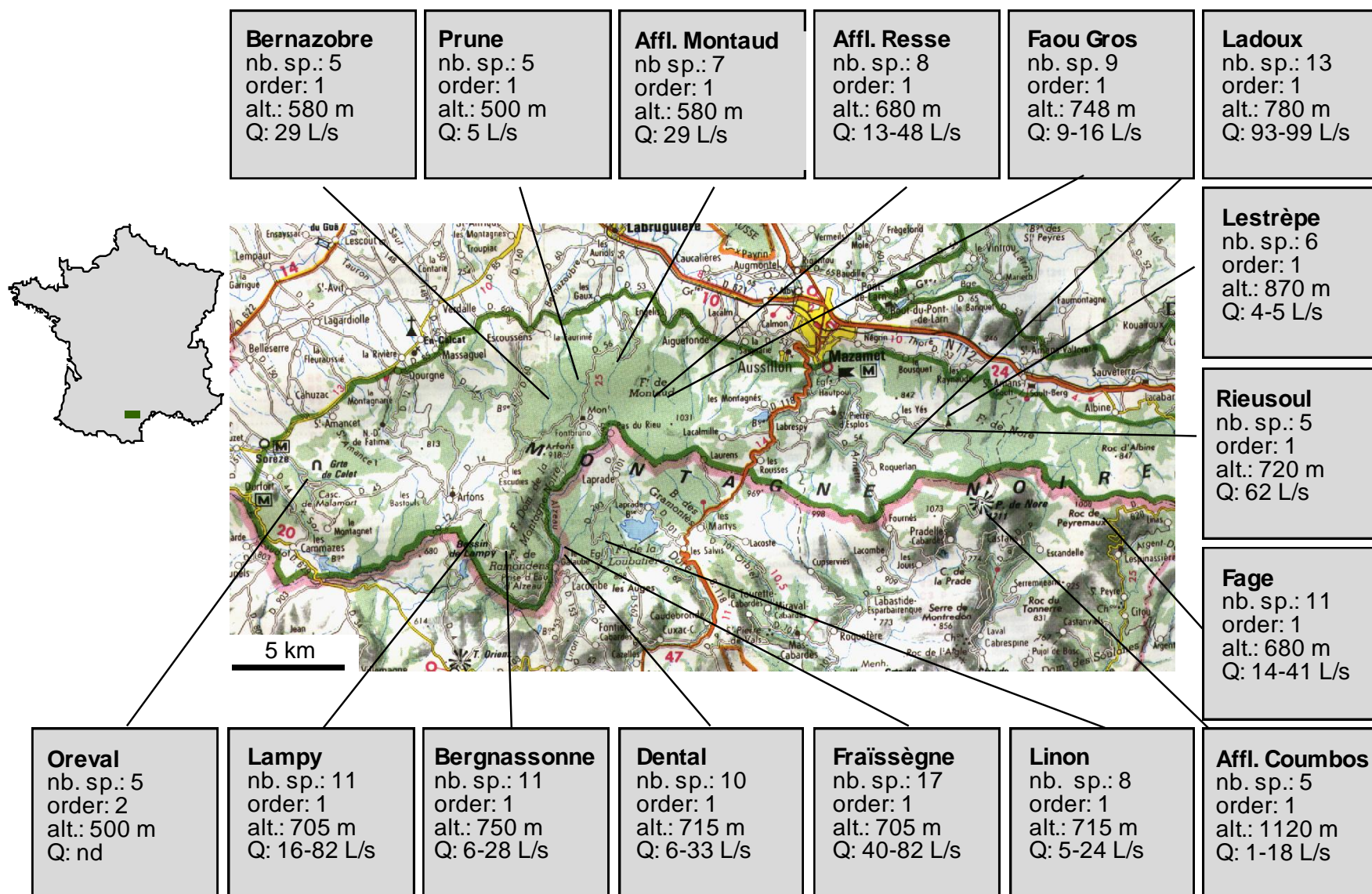


Figure 1. Localisation des seize rivières étudiées dans la Montagne Noire.

Méthodologie générale

Nous avons focalisé notre projet sur deux types de monoculture: la hêtraie et la plantation de résineux, l'étude d'un troisième type de plantation (la peupleraie) envisagée initialement ne pouvant être abordée dans le cadre de ce projet en raison de limitations matérielles et de la difficulté de trouver des sites de référence appropriés.

Au total, seize stations ont été sélectionnées dans des secteurs faiblement anthropisés de la Montagne Noire (sud-ouest du Massif Central ; cf. Figures 1 et 2). Ces stations correspondent à différentes rivières permanentes d'ordre 1 ou 2 coulant sous hêtraie (i) en monoculture pure, (ii) en association avec une autre espèce dominante ou (iii) en association avec plusieurs autres espèces. Aux dix stations sélectionnées initialement (rapport intermédiaire de juin 2001), s'ajoutent six sites sur des ruisseaux du même secteur géographique, dont deux de type 'Conifères' et faiblement influencées par des plantations de résineux. Ces deux sites sont situés au sud du village de Labruguière dans la forêt de Montaud ; ils sont donc localisés près du centre de la zone géographique d'étude. Comme cela était attendu, il n'a pas été possible de trouver de sites sous conifère majoritaire, les résineux dans le sud de la France n'occupant généralement que des surfaces limitées en crête de bassins. Nous avons donc préféré privilégier l'homogénéité de l'ensemble de nos sites, localisés dans le même massif forestier à des altitudes comparables, plutôt que l'intensité de l'impact des résineux. Des sites fortement influencés par les conifères mais localisés dans des régions françaises ou espagnoles distantes n'auraient pu, pour des raisons biogéographiques, être comparés valablement à ceux de la Montagne Noire. Le choix des sites a été grandement facilité par des contacts avec M. Sardin, responsable de la Section Technique Inter-Régionale Sud-Ouest, ainsi que des responsables locaux de l'ONF.

Figure 2. Vue de trois rivières retenues pour l'étude : la Bergnassone, le Ladoux et le Dental en automne.



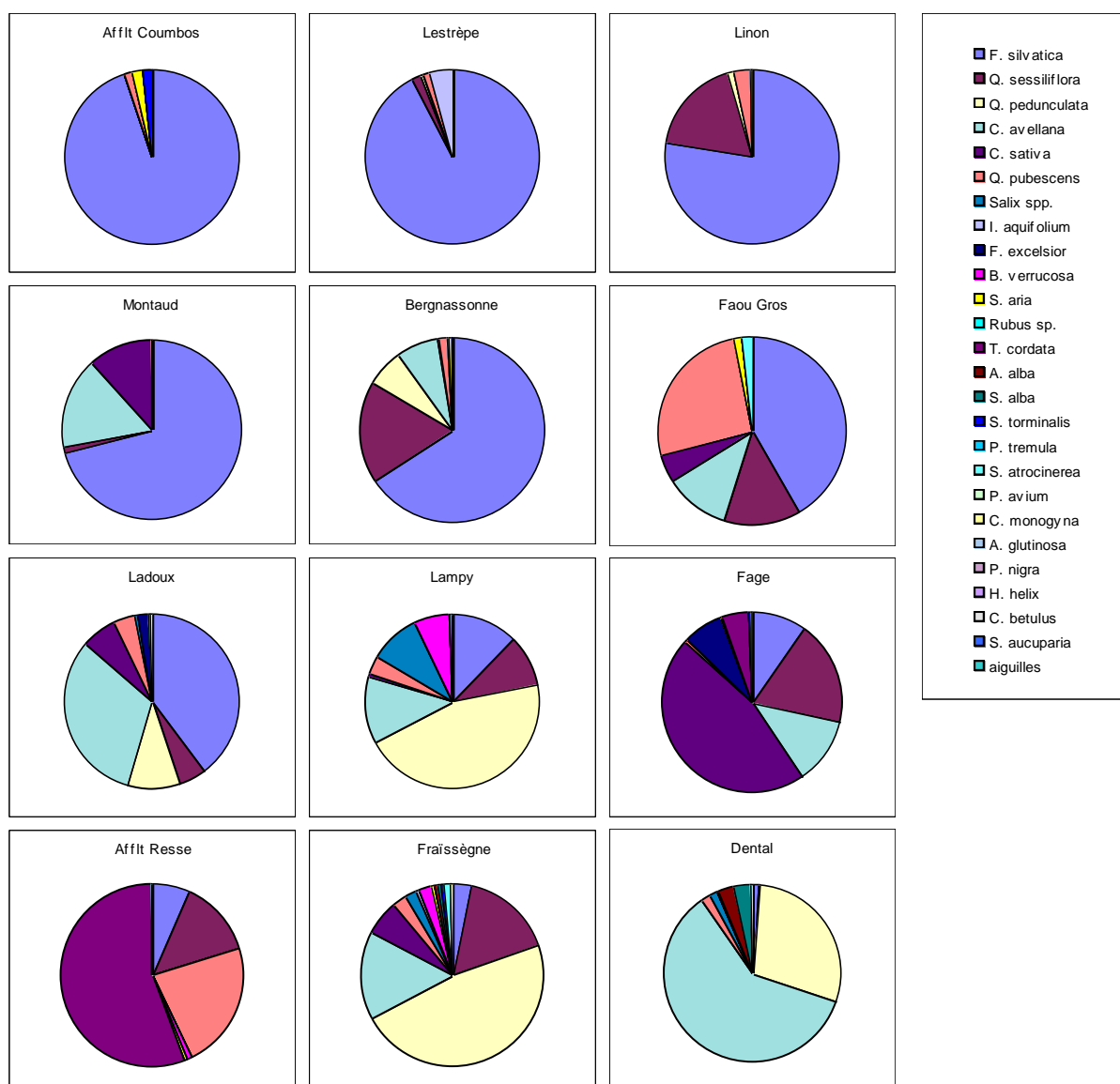


Figure 2. Abondance relative des différentes espèces forestières dans la litière accumulée dans 12 cours d'eau de la Montagne Noire (prélèvement de novembre). Les 3 rivières supplémentaires (cf. Chap. 4) ne sont pas figurées.

La contribution des espèces foliaires à la litière accumulée dans le lit des rivières constitue une base d'appréciation quantitative de la diversité forestière. Cette contribution a été mesurée régulièrement au cours d'un cycle annuel sur l'ensemble des cours d'eau. La Figure 2 représente ces abondances relatives en milieu d'automne, c'est-à-dire après le pic de chute de litière à décomposition rapide à moyenne et avant les chutes maximales de litières réfractaires (p. ex. hêtre et chênes). Les relevés réalisés à cette période donnent ainsi une image assez synthétique du type et de la diversité des litières présentes sur l'ensemble de l'année dans ces rivières.

Références

- Abelho M. & Graça M.A.S. (1996) Effects of eucalyptus afforestation on leaf litter dynamics and macroinvertebrate community structure of streams in Central Portugal. *Hydrobiologia* 324 : 195-204.
- Andow D.A. (1991) Vegetational diversity and arthropod population response. *Annu. Rev. Entomol.* 36: 561-86.
- Arsuffi T.L. & Suberkropp K. (1985) Selective feeding by stream caddisfly (Trichoptera) detritivores on leaves with fungal-colonized patches. *Oikos* 45 : 50-58.
- Baldy V. & Gessner M.O. (1997) Towards a budget of leaf litter decomposition in a first-order woodland stream. *C. R. Acad. Sc., Ser. III*, 320 : 747-758.
- Bärlocher F. (1992) *The ecology of aquatic hyphomycetes*. Springer-Verlag, Berlin, 225 p.
- Bärlocher F., Kendrick B. & Michaelides J. (1978) Colonization and conditioning of *Pinus resinosa* needles by aquatic hyphomycetes. *Arch. Hydrobiol.* 81(4) : 462-474.
- Charcosset J.-Y. & Gardes M. (1999) Intraspecific genetic diversity and substrate preference in the aquatic hyphomycete *Tetrachaetum elegans*. *Mycol. Res.* 103 : 736-742.
- Chauvet E. (1987) Changes in the chemical composition of alder, poplar, and willow leaves during decomposition in a river. *Hydrobiologia* 148 : 35-44.
- Chauvet E. (1991) Aquatic hyphomycete distribution in South-Western France. *J. Biogeogr.* 18 : 699-706.
- Chauvet E. (1992) Dynamique saisonnière des spores d'hyphomycètes aquatiques de quatre rivières. *Nova Hedwigia* 54: 379-395.
- Chauvet E., Fabre E., Elósegui A. & Pozo J. (1997) The impact of eucalypt on the leaf-associated aquatic hyphomycetes in Spanish streams. *Can. J. Bot.* 75 : 880-887.
- Cummins K.W. (1974) Structure and function of stream ecosystems. *Bioscience* 24 : 631-641.
- Cummins K.W., Wilzbach M.A., Gates D.M., Perry J.B. & Taliaferro W.B. (1989) Shredders and riparian vegetation. *Bioscience* 39 : 24-30.
- Dubourdieu J. (1997) Dossier Sylvicultures. *Arborescences* 68 : 1-31.
- Gessner M.O. & Chauvet E. (1993) Ergosterol-to-biomass conversion factors for aquatic hyphomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 : 502-507.
- Gessner M.O. & Chauvet E. 2002. A case for using litter breakdown to assess functional stream integrity. *Ecological Applications* 12: 498-510.
- Gessner M.O. & Newell S.Y. (1997) Bulk quantitative methods for the examination of eukaryotic organoosmotrophs in plant litter. In: *Manual of environmental microbiology*. C.J. Hurst (ed). A.S.M. Press, Washington, D.C. : 295-308.
- Gessner M.O. & Schmitt A.L. (1996) Use of solid-phase extraction to determine ergosterol concentrations in plant tissue colonized by fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 415-419.
- Gessner M.O., Chauvet E. & Dobson M. (1999) A perspective on leaf litter breakdown in streams. *Oikos* 85 : 377-384.
- Gessner M.O., Suberkropp K. & Chauvet E. (1997) Decomposition of Plant Litter by Fungi in Marine and Freshwater Ecosystems. In: *The Mycota: a Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research*. Vol. IV: Environmental and Microbial Relationships. D.T. Wicklow & B. Söderström (eds). Springer-Verlag, Berlin : 303-322.
- Haapala A. & Muotka T. (1998) Seasonal dynamics of detritus and associated macroinvertebrates in a channelized boreal stream. *Arch. Hydrobiol.* 142 : 171-189.
- Harding J.S., Benfield E.F., Bolstad E.F. & Helfman P.V. (1998) Stream biodiversity: the ghost of land use past. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 : 1843-1847.
- Laitung L., Pretty J.L., Dobson M. & Chauvet E. (2000) Response of macroinvertebrate and fungal communities to manipulation of stream retention. Eight International Symposium On Regulated Streams, 17-21 Juil. 2000, Toulouse.
- Laitung, B., J. L. Pretty, Chauvet E. & Dobson M., 2002. Responses of aquatic hyphomycete communities to enhanced stream retention in areas impacted by commercial forestry. *Freshwater Biology* 47: 313-323.
- Pozo J., Basaguren A., Elósegui A., Molinero J., Fabre E. & Chauvet E. (1998) Afforestation with *Eucalyptus globulus* and leaf litter decomposition in streams of northern Spain. *Hydrobiologia* 373/374 : 101-109.
- Shearer C.A. & Webster J. (1985) Aquatic hyphomycete communities in the river Teign. III. Comparison of sampling techniques. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 84(3) : 509-518.
- Smock L.A. & MacGregor C.M. (1988) Impact of the American chestnut blight on aquatic shredding macroinvertebrates. *J. N. Am. Benthol. Soc.* 7(3) : 212-221.
- Stone M.K. & Wallace J.B. (1998) Long-term recovery of a mountain stream from clear-cut logging : the effects of forest succession on benthic invertebrate community structure. *Freshwat. Biol.* 39 : 151-169.
- Strahler A.N. (1957) Quantitative analysis of watershed geomorphology. *Trans. Am. geophys. Un.* 38 : 913-920.
- Suberkropp K. (1992) Aquatic Hyphomycete communities. In: *The Fungal community: its organization and role in the ecosystem*. 2nd Ed. G.C. Carroll & D.T. Wicklow. (eds.) Marcel Dekker, Inc., New-York : 729-747.
- Surber E.W. (1937) Rainbow trout and bottom fauna production in one mile of stream. *Trans. Am. Fish. Soc.* 66 : 193-202.
- Thomas K., Chilvers G.A. & Norris R.H. (1991) A dynamic model of fungal spora in a freshwater stream. *Mycol. Res.* 95 (2) : 184-188.

- Thomas K., Chilvers G.A. & Norris R.H. (1992) Aquatic hyphomycetes from different substrates: substrate preference and seasonal occurrence. *Aust. J. Mar. Freshwat. Res.* 43 : 491-509.
- Townsend C.R., Arbuckle C.J., Crowl T.A. & Scarsbrook M.R. (1997) The relationship between land use and physicochemistry, food resources and macroinvertebrate communities in tributaries of the Taieri River, New Zealand: A hierarchically scaled approach. *Freshwat. Biol.* 37 : 177-191.
- Vannote R.J., Minshall G.W., Cummins K.W., Sedell J.R. & Cushing C.E. (1980) The river continuum concept. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 37 : 130-137.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Fijters A., Pot J., Pelemena J., Kuiper M. & Zabeau M. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Ac. Res.* 23 : 4407-4414.
- Wagner S.M., Oswood M.W. & Schimel J.P. (1998) Rivers and soils: parallels in carbon and nutrient processing. *Bioscience* 48 : 104-108.
- Webster J.R. & Benfield E.F. (1986) Vascular plant breakdown in freshwater ecosystems. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 17 : 567-594.
- Webster J.R., Wallace J.B. & Benfield E.F. (1995) Organic processes in streams of the eastern United States. In : River and stream ecosystems. C.E.Cushing, G.W.Minshall & K.W.Cummins (eds). Elsevier, Amsterdam : 117-187.
- Welsh J. & McClelland M. (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Ac. Res.* 18 : 7213-7218.
- Whiles M.R. & Wallace J.B. (1997) Leaf litter decomposition and macroinvertebrate communities in headwater streams draining pine and hardwood catchments. *Hydrobiologia* 353 : 107-119.
- Wieder R.K. & Lang G.E. (1982) A critique of the analytical methods used in examining decomposition data obtained from litter bags. *Ecology* 63 : 1636-1642.
- Williams D.D. & Feltmate B.W. (1992) Aquatic insects. CAB International, 358 p.

Chap. 1: Diversity of riparian vegetation and aquatic fungi in woodland streams¹

Part 1 : Beech forests

Abstract

Previous studies have shown that the abiotic parameters such as elevation, water temperature and chemical composition influence the composition of aquatic hyphomycete communities in streams. The aim of the present study is to test whether the diversity of riparian vegetation affects fungal species assemblages in response to possible preferences of aquatic hyphomycetes for their leaf substratum. The study was carried out in ten woodland headwater streams (Montagne Noire, S-W of France). Streams were selected along a gradient of riparian tree diversity. The fungal species composition and the number of spores in water samples were determined microscopically on bimonthly samples of stream water taken over one year. Three submerged leaf litter patches were collected at the same time and analysed for relative abundance of leaf species. Beech was dominant in most streams. A total of 80 species of aquatic hyphomycete were found in the ten streams. Results from correspondence analyses revealed no distinct fungal assemblages associated to any particular leaf species. The addition of a bulk of hazel leaves in a stream where beech represent >90% of leaf inputs did not result in an increase in fungal richness. However, the fungal richness in the ten streams showed a significant and positive correlation with the leaf species richness, explaining 44% of the total variance among streams. These results suggest a hierarchical relationship between riparian and aquatic biodiversities and provide arguments for the conservation of diverse tree species along streams.

Introduction

The loss of biological diversity within aquatic systems, which affects all kinds of ecosystems (Vitousek et al. 1997), is a serious challenge to ecologists working at various spatial scales (Noss 1990). Stream ecosystems offer a large field of investigation (surface and subsurface waters and riparian systems) to assess the different hierarchical levels of diversity (alpha, beta and gamma diversity) and the linkages between the diversity of aquatic organisms and that of river margin organisms (Ward and Tockner 2001). Aquatic fungi are considered to be valuable indicators of changes induced by, or related to, a modification of stream diversity because of their strong involvement in keystone processes such as plant matter decomposition

¹ Cette partie fait l'objet d'un manuscrit en préparation pour la revue *Conservation Biology*, dont les auteurs sont Laitung B. et Chauvet E.

and nutrient cycling (Gessner et al. 1997). Aquatic fungi, especially aquatic hyphomycetes initiate the decomposition of leaf litter from riparian vegetation and their mycelia can account for up to 17% of detrital leaf mass (Gessner 1997). Moreover, fungal colonisation of leaves is recognised to improve the quality of the leaf detritus as a food source for stream detritivores (Suberkropp 1992) and to be at the origin of the woodland stream food web.

For these reasons, the relationships between aquatic hyphomycete communities and stream environmental factors have been studied to some extent. The importance of riparian vegetation as a main source of organic matter for woodland streams is well established and received special attention in its relation with the aquatic fungus dynamics. The pattern of abundance of aquatic hyphomycetes in temperate streams is triggered by leaf fall in deciduous forest (Gönczöl and Révay 1999). Furthermore, forest management practices such as exotic plantations (e.g., eucalyptus, Bärlocher and Graça 2002) and changes in streambed retentiveness (Laitung et al. 2002) have been shown to affect aquatic hyphomycete communities.

The response of fungal communities to changes in the diversity of riparian vegetation is, however, still poorly understood. Indeed, the understanding of aquatic hyphomycete response is complicated by the phenology of riparian vegetation and superimposed effects of other environmental factors. Although a large body of literature deals with the ecology of these fungi, the distribution of many species as well as preferences regarding the leaf substrate remain poorly known. Consequently, any stream management plan should take into account the relationships between the composition and diversity of riparian vegetation and the structure of aquatic fungus communities as a first link between the valley and the stream ecosystem (Cummins 1973).

The objective of the present study is to assess the influence of the diversity of riparian vegetation on aquatic hyphomycete communities in woodland streams. This was realised by comparing the fungal community structure of streams affected by a gradient of riparian vegetation diversity. Our hypotheses were that (i) aquatic hyphomycetes colonising leaf litter in streams exhibit preferences but not specificity for their substratum and (ii) these preferences result in a positive response of aquatic hyphomycete assemblages to changes in the diversity of riparian vegetation.

Materials and methods

Study sites

The study was carried out in ten headwater streams located in the Montagne Noire region, a 1450 km² area of mixed broadleaf forest in south-western France. All streams were selected on the basis of tree riparian vegetation diversity described by the relative amounts of leaf litter in the stream. The forest was dominated by coppice-with beech or oak standards, where

natural regenerating vegetation was preserved. Stream riparian vegetation was composed of mature beech (*Fagus sylvatica* L.) or oaks (*Quercus humilis* Miller, *Quercus petraea* Lieblein, *Quercus robur* L.) with an understorey of 14 deciduous tree species varying among sites. Three streams (Linon, Lestrèpe, Coumbos tributary) had a low riparian diversity, i.e. one leaf species predominated the litter composition over 75%; three streams (Dental, Bergnassone, Montaud tributary) had an intermediate riparian diversity, i.e. one leaf species represented 50-75% of the litter and the last four streams (Fraïssègne, Fage, Lampy, Ladoux) had a high diversity, i.e. any leaf species account for more than 50% of litter composition. Sites were selected to ensure that environmental parameters other than riparian vegetation varied little in order to minimise the importance of environmental variation in aquatic hyphomycete communities (Table 1).

Furthermore, in order to assess if major changes in litter species composition induced significant changes of the fungal community composition, an experiment was conducted where large amounts of hazel leaves were introduced at one single date in the Linon stream. The Linon was chosen because one single litter species (beech) predominated by 85% to 100% during the year prior to manipulation. In October 1999, a 30-m stretch was delineated. The 15-m upstream section within this stretch represented the reference section and the 15-m downstream section was treated. Within the treated section retention of leaves was first artificially enhanced by securing ten plastic nets at equal intervals within the stream channel perpendicularly to the stream axis. Subsequently, 30 kg of freshly fallen hazel leaves were homogeneously introduced into the treated stream channel section.

Sampling methods

Aquatic hyphomycetes were sampled bimonthly between February and December 1998 within the ten streams. This sampling period allowed to cover the seasonal dynamics of the fungal communities in relation to the riparian vegetation phenology. Fungal spores were collected by filtering stream water through Whatman cellulose nitrate membrane filters (5 µm porosity, 25 mm diameter). Five replicates of 100 mL were sampled at each stream, which was expected to provide 70 – 80% of the total species number (cf. Gönczöl et al. 2001). Filters were fixed and stained with a 60% lactic acid and 0.1% Trypan blue solution (Iqbal and Webster 1973). All filters were examined microscopically at 200X magnification and the present spores were counted and identified to species.

In order to determine litter composition and to characterise the ten sampled streams, three patches of naturally accumulated leaf litter within each of the ten streambeds were randomly collected at bimonthly intervals just downstream the stretch of stream water sampling. Leaves were identified to species, dried at 105°C during 24 hours and weighed.

In the litter manipulated stream, hyphomycete spores were collected immediately before treatment from the downstream ends of the reference and the treated sections, respectively.

Following the treatment, i.e. after artificial introduction of leaves, water samples were collected once a month during four months and the structure of aquatic hyphomycete communities determined as above.

Data analyses

Community structure for each sampling date was expressed by the following parameters: conidial density, species abundance, species richness and diversity. Conidial density was expressed by the total number of spores per litre of stream water and species abundance by the proportion of species in the total pool of spores collected in each stream. Species richness was estimated by the cumulative number of species. Species diversity was calculated using the Shannon's index (Shannon and Weaver 1949). Data were tested for normality distribution, and those not normally distributed were \log_{10} transformed. Conidial density, species richness and species diversity were compared among streams using analysis of covariance with time as a covariate. Differences between sub-groups were tested using a Bonferroni post-hoc test. Correlation between fungal species richness and leaf litter species richness was determined by Pearson correlation procedure with Bonferroni-adjusted probabilities. All these statistical analyses were performed using SYSTAT (version 5.2.1). Moreover, bootstrap estimators of true species richness (Smith and van Belle 1984) were computed using EstimateS (version 5; Colwell 1997) for each stream. In all statistical treatment, 0.05 was considered as the threshold for significance.

Community structure comparison among streams was evaluated using cluster analysis based on Sorensen's similarity coefficient (Legendre and Legendre 1979). In order to assess possible relationships between the matrix of similarities between streams based on presence-absence of fungal and leaf species, a Mantel test was performed using The R Package for Multivariate and Spatial Analysis software, version 4.0 (Casgain and Legendre 2001).

A correspondence analysis was used to produce a reduced-space ordination describing the variation in species relative abundance of fungal communities between streams. Fungal species represented by less than five spores were considered as accidental and were excluded from this analysis. Correspondence analysis was performed using STATISTICA, version 5.1 (StatSoft 1997).

To assess the association of particular fungal assemblages with riparian vegetation, a non-hierarchical clustering method was used to divide stream x date samples into groups according to the relative abundance of leaf litter species. K-means procedure was used in The R Package for Multivariate and Spatial Analysis software, version 4.0 (Casgain and Legendre 2001) for 100 random starts. Community analyses were hence redone taking into account this stream classification.

Data from the treated and reference section of the Linon were compared using independent *t*-test (SYSTAT, version 5.2.1) for conidial density and ANCOVA analyses with time as covariate for fungal species richness and diversity.

Results

Abundance, richness and diversity of aquatic hyphomycetes

The ten streams were comparable regarding environmental characteristics other than riparian vegetation. In particular, water was acidic, oligotrophic and with low mineralisation in all streams (Table 1 in annex). A total of 41 918 fungal spores and 80 species were identified from the 300 samples collected between February and December 1998. A complete list of species and their abundance are presented in Table 2 (in annex). Conidial density, species richness and diversity, all dates combined, are presented in Table 3.

Table 3. Conidial density, species richness and diversity of aquatic hyphomycetes in 10 streams from Montagne Noire region.

Stream	No. of spores/L	No. of species	Cumulative no. of species	H diversity
Bergnassonne	1437	17-24	42	3.0-3.4
Coumbos trib.	262	3-18	36	1.9-2.9
Dental	2259	18-38	47	1.6-3.7
Fage	2269	15-37	50	3.0-3.4
Fraïssègne	1334	15-32	48	2.5-3.2
Ladoux	957	8-24	41	1.4-3.4
Lampy	1375	13-30	41	2.6-3.5
Lestrèpe	610	13-25	31	2.7-3.6
Linon	958	8-23	28	1.9-3.0
Montaud trib.	2563	16-28	45	2.9-3.5

Significant variations between the ten streams are observed for species richness, diversity and for conidial density (Table 4). Sampling date as a covariate has a significant effect on species richness and conidial density but not on Shannon diversity index (Table 4). Differences among streams accounted for 52% of the variation in species richness but only three pairs of streams showed statistically significant differences: Fage/Coumbos, Fage/Linon and Dental/Coumbos. Shannon diversity index explained 33% of the variance of streams but only one pair of streams was significantly different: Fage/Linon. Differences among streams accounted for 69% of the variation in total abundance with eight pairs of streams exhibiting significant differences: Coumbos with Dental, Fraïssègne, Linon, Fage, Bergnassonne, Montaud and Lampy; and Montaud/Lestrèpe.

Table 4. Analysis of covariance of community data from 10 streams of Montagne Noire region. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

	Source	d.f.	SS	MS	F	P
Conidial density	Stream	9	31.69	3.52	5.98	**
	Date	1	32.63	32.62	55.42	**
Species richness	Stream	9	991.27	110.14	4.02	**
	Date	1	475.28	475.28	17.36	**
Diversity	Stream	9	6.12	0.68	2.73	*
	Date	1	0.01	0.01	0.03	ns

Species assemblages and site comparisons

Pearson correlation between fungal species richness and leaf litter species richness of all streams was significant and positive ($r^2 = 0.44$, $p = 0.02$; Figure 1). This relationship between fungal and leaf litter species richness was also observed with the total number of fungal species assessed by a bootstrap procedure (Figure 1). Following this linear relationship ($y = 1.96x + 25.21$), enhancing leaf litter richness by one leaf species would translate into an increase of fungal species by 2. Additionally, the correlation between fungal species richness and leaf litter species diversity was significant and positive ($r^2 = 0.11$, $P < 0.01$; data not shown).

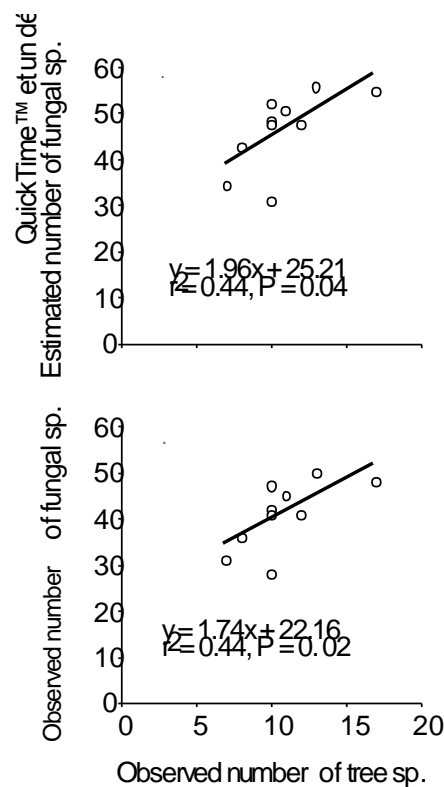


Figure 1. Correlation between aquatic fungus species richness and leaf species litter richness. a – Bootstrapped fungus richness Observed fungus richness. b – Observed fungus richness.

The K-means method allowed dividing the 60 stream x date observations into four groups according to the relative abundance of leaf litter species (Table 5). Two sets of streams were clearly distinguished: Group I (Dental and Fraïssègne) characterised by 56% of oaks and 21% of hazel on average and Group II (Linon, Lestrèpe and Coumbos tributary) dominated by 87% of beech. Differences in fungal communities between streams with diversity-contrasted litters (Group I and II) are due to the supply of 18 fungal species in streams with the most diverse pool of leaf litter. However, these fungal species are very little abundant (generally < 1-4 spores/L).

Table 5. Relative abundance of leaf litter in the four groups of streams obtained by K-mean classification.

Leaf species (%)	Group I	Group II	Group III	Group IV
<i>Fagus silvatica</i>	10	87	50	9
<i>Corylus avellana</i>	21	1	5	8
<i>Castanea sativa</i>	0	2	8	73
<i>Quercus robur</i>	43	1	6	1
<i>Quercus petraea</i>	13	4	18	6

Presence-absence comparisons of fungal species between streams were performed using cluster analysis of Sorensen's similarity coefficients calculated at each date. Similarity coefficients ranged from 0.3 to 0.9. The low value of the Spearman rank correlation coefficient ($r = 0.215$, $p > 0.05$) in the Mantel test indicated that the occurrence of fungal species was not associated with the occurrence of leaf species in any stream. No clearly differentiated clusters could be observed between sites. Similar procedure performed on the five streams of Groups I and II showed no obvious clustering.

Again, results from the correspondence analysis revealed no distinct fungal assemblages associated to any particular leaf species. However one stream, the Coumbos tributary, was characterised by the abundance of a distinct pool of fungal species (data not shown). When the data from this stream were excluded of the analysis, no distinctive cluster of streams or fungi were obtained and no aquatic hyphomycete species/leaf litter associations were observed (Figure 2). Seasonal changes were the main factor selecting distinctive fungal species abundances in the Montagne Noire region (Figure 2).

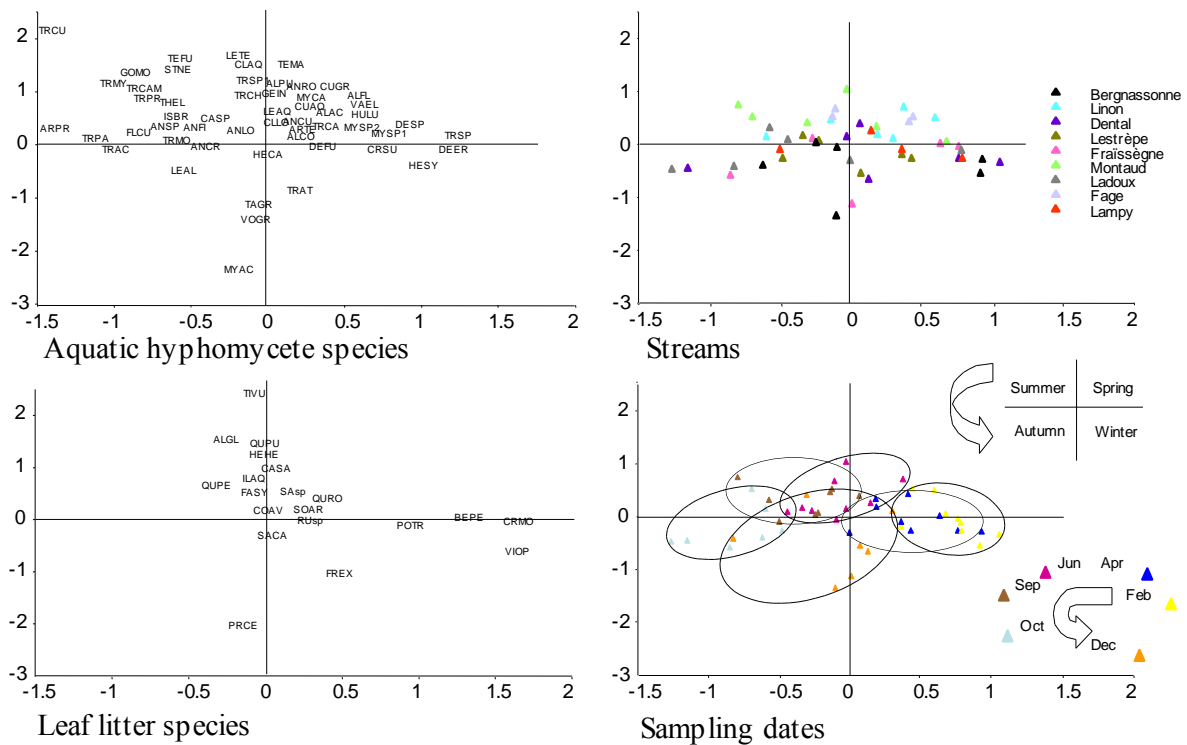


Figure 2. Correspondence analyses with relative abundance of aquatic hyphomycete species as variables, relative mass of leaf species as supplementary variables and 60 date x stream combinations as observations.

Litter manipulation

A total of 25 hyphomycetes species was recorded from Linon, and the number of species from each sampling period ranged from 16 to 20 in the reference section and from 14 to 18 in the treated section. The number of species occurring downstream of treated sections was lower than in reference sections during the sampling period but not significantly (Table 6). Seven species (*Anguillospora crassa*, *Goniopila monticola*, *Mycocentrospora spl cf angulata*, *Mycofalcella calcarea*, *Taeniospora gracilis*, *Tetracladium setigerum* and *Tricladium splendens*) were recorded in the reference sections but not in treated ones and five species (*Caesaria sphagnorum*, *Culicidospora aquatica*, *Flabelliospora acuminata*, *Heliscella stellata* and *Tricladium splendens*) in the treated sections but not in the reference ones. These differences could be indicative of an effect of the manipulation. Further there was no significant trend either in absolute abundance (Table 7) or Shannon diversity (Table 6) of fungal communities between the reference and treated sections.

Table 6. Analysis of covariance of species richness and diversity in the manipulated litter stream.

	Source	d.f.	SS	MS	F	P
Species richness	Treatment	1	8.17	8.17	4.02	ns

	Date	1	10.57	10.57	5.20	ns
Diversity	Treatment	1	0	0	0	ns
	Date	1	1.93	1.93	21.66	*

Table 7. Independent *t*-test of conidial density data between reference and treated sections of the litter manipulated stream. *t*-values refer to ‘Reference-Treated’ differences.

	Date	N	<i>t</i>	<i>P</i>
Conidial density	Oct. (reference)	5	5.46	**
	Nov.	5	1.69	<i>ns</i>
	Dec.	5	-1.27	<i>ns</i>
	Jan.	5	0.85	<i>ns</i>
	All dates	15	0.04	<i>ns</i>

Discussion

Hierarchical diversity

The results of the present study show a clear correlation between the diversity of riparian vegetation and that of aquatic fungi. Such linkages between aquatic diversity and river margin diversity, although suggested in previous studies (e.g. Fabre, 1996), have rarely been demonstrated in practice because of difficulties to select appropriate field sites with comparable physical and chemical composition but varying riparian vegetation. The choice to work at the local scale ensured that streams are potentially populated from the same fungal or vegetation species pools and that observed patterns may be attributed to variations in diversity (Tilman 1999).

In the Montagne Noire, the high diversity in riparian tree species results in high diversity of litter quality and litter types entering the aquatic stream system. According to Wardle et al. (1999), this resource heterogeneity can lead to a greater diversity of fungal decomposers. Our results confirm this assumption, but a selective association of particular species with particular litter types could not be found. This correlation between riparian vegetation diversity and aquatic fungus diversity also appears to depend on the temporal and spatial scales of the ecological factors influencing the biology of the aquatic fungi involved. Indeed, a modification of a monospecific litter by a supply of easily decaying litter did not affect fungal species richness during three months of sampling period. The observed absence of response is probably caused by the absence of a close fungal species reservoir, inside or outside the stream, able to colonise rapidly a new litter species.

These results support the “first link” hypothesis of Lavelle (1986) postulating that plant diversity increasing diversity of mutualistic soil microflora, is the first link of a cascade effects resulting in increased diversity of other soil animal communities as well. Thus, we propose that riparian tree diversity can lead to an increased diversity of aquatic litter microflora (fungi and bacteria) because of the production and supply of diverse primary food resources to the stream channel. The increased diversity of aquatic litter microflora represents the first link of a cascade of effects resulting eventually in an increased diversity of communities of higher order aquatic organisms (macroinvertebrates, fishes) within the aquatic food web. Therefore, aquatic hyphomycetes can be considered as "ecological engineers" (in sensu Robinson et al. 2002) which are engaged in a major process (plant material decomposition) that influence the biodiversity (structural, functional, genetic) within stream systems (Figure 3).

Fungal assemblages and substrate preference

As commonly found in community studies, fungal communities were composed of a low number of core species and numerous low abundant species. Core species were present along the whole sampling period. The most abundant species were *Flagellospora curvula* and *Alatospora acuminata* which represent 26% and 11% of the spores identified within all sampling sites during the entire sampling period, respectively. These common and worldwide species (Webster & Descals 1981) are present within all ten streams. However, *Flagellospora curvula* was the most abundant between June and October and *Alatospora acuminata* between December and April. The other most abundant species were *Articulospora tetracladia* (7%), *Clavospora longibrachiata*, *Mycocentrospora sp1 cf. angulata*, *Taeniospora gracilis* and *Tetrachaetum elegans* (6%). These core species characterised the essential pool of species which apparently contributed to a major part of leaf decay. They account for 68% of the total conidial production from the ten streams during the study. These species seem to be able to colonise any leaf litter and possess a high capacity of spore production maintaining a strong potential of colonisation at any period.

The remaining 32% of spores were from 73 species with overall abundance ranging from 3.7 to 0.01%. These species were rare and often present only at one date during the sampling period. Among these, 26 species were represented by less than five spores in all sampled streams. Such species might be considered as accidental, present in streams because of random dispersal. Nevertheless, this large pool of species might contribute to leaf litter decay in specific environmental conditions particularly when the resource is more diversified. These numerous species largely explain the highly significant relationship between fungal species richness and leaf litter species richness. In the Linon, the addition of one leaf litter species, hazel, did not result in an increase in hyphomycete species richness. Instead, a decrease by two species on average was observed downstream the litter addition. This difference is not considered to be an effect of increased spore retention by the bulk of added litter, since no significant decrease in spore concentration was found between the reference and treated

sections. These species were always scarce ($< 0.7\%$) in the conidial pool of the reference section and they were not the same at the different sampling times, both features suggesting the absence of evidence for a strong effect. It remains that the addition of hazel, normally supporting a substantial fungal diversity, did not result in an increased in-stream diversity in contrast with the expectations based on the observed correlation above. This apparent inconsistency is explained by the time needed for a fungal community to establish in a durable way, i.e. in parallel to the establishment of the forest tree community, in other words, the evolution of the fungal inoculum. But changes in litter composition actually induce changes in the expression of the species pool of the stream but not in radical changes by increase or decrease of species number. Modification of microhabitat can explain this variation in fungal species. These particular species probably sporulate in relation to the quality or degradation state of leaves, which is, however, difficult to assert with our experimental protocol. Furthermore, the spore abundance of rare species of aquatic hyphomycetes is illustrated by varying yearly patterns (Bärlocher 1999).

The occurrence of fungal species was not specifically associated to the occurrence of a given kind of litter leaf species. Co-occurrence of fungal species indicates that they can be found in different litter assemblages and that these aquatic hyphomycete species show no substrate preference. Similar observations were made by Thomas et al. (1992). According to these authors, it was however possible to predict the type and species of substrate colonized from the knowledge of the fungal spora produced, due to distinctive patterns of occurrence of aquatic hyphomycetes among the different leaf types. The more contrasted pool of plant litter including bark, twigs and leaves of trees, macrophytes and ferns in the study by Thomas et al. (1992) may explain the discrepancy between the two studies. In line with this explanation, Gulis(2001) showed that wood and grass blades support assemblages of aquatic hyphomycetes more distinct than those borne by tree leaf litter. In the present study, the distribution of fungal species among streams was not related to the litter type. Only one stream, the Coumbos tributary, showed distinguished species assemblage in correspondence analysis but no relation could be found with the dominating leaf litter species, beech. The Coumbos tributary, although belonging to the same vegetation-based type of headwater stream, was the most contrasted of the present set of streams, especially regarding altitude and water temperature (Table 1). This suggests that abiotic factors and not only leaf substratum diversity explain the observed differences in fungal assemblages. Moreover, Fabre (1996) observed that aquatic hyphomycete and riparian vegetation richness are linked through altitude along a fluvial continuum. Therefore such factors can be considered as environmental moderators of the functioning and the biodiversity of the whole stream system (Figure 3).

The apparent contradiction between the absence of substrate specificity in aquatic hyphomycetes and the higher fungal species richness in streams with more diverse leaf litter is explained by changes in the expression of fungal species pool in relation to the nature of the litter inputs. In the ten studied streams, leaf litter was essentially composed of few dominant

species directly linked to the basic pool of fungal species of streams. But in the most diverse streams, when elementary leaf litter composition is modified by supplementary leaf species, certain fungal species “in stock” can be observed in various proportions in streams. These species might be affected by various components of these supplementary leaf species such as lignin, tannin or cellulose and step in decay processes.

In conclusion, our study has shown that aquatic hyphomycetes have no preference for leaf substrate but that resource variety and its quality provide a higher fungal species richness. Riparian vegetation diversity actually enhances fungal diversity supporting the importance of riparian vegetation in the ecological integrity of streams. The results suggest that the diversity of deciduous tree species in the riparian vegetation may substantially increase the fungal species richness in streams. Hence it plays a major role in the maintenance of biodiversity and potentially in the food web functioning of woodland stream ecosystems (Figure 3).

Acknowledgements

This work was partially supported by the French national programme ECOFOR “Ecosystèmes forestiers. Biodiversité et Gestion forestière” and by the ERMAS 2 programme funded by the European Union (European River Margins: Role of biodiversity in the functioning of riparian systems; DGXII contract ENV4-CT95-0062). We are grateful to Oscar Moya, Anne-Marie Jean-Louis and Sophie Millot for laboratory assistance.

References

- Bärlocher F. 1999. Water-borne conidia of aquatic hyphomycetes: seasonal and yearly patterns in Catamaran Brook, New Brunswick, Canada. *Canadian Journal of Botany* 78: 157-167.
- Bärlocher F. and Graça M.A.S. 2002. Exotic riparian vegetation lowers fungal diversity but not leaf decomposition in Portuguese streams. *Freshwater Biology* 47: 1123-1136.
- Casgrain P. and Legendre P. 2001. The R Package for Multivariate and Spatial Analysis, version 4.0 d5. User's manual. Département des sciences biologiques, Université de Montréal. <http://www.fas.umontreal.ca/BIOL/legendre/>.
- Colwell R.K. 1997. EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples. Version 5. User's Guide and application published at <http://viceroy.eeb.uconn.edu/estimates>.
- Cummins K.W. 1973. Trophic relations of aquatic insects. *Annual Review of Entomology* 18: 183-206.
- Fabre E. 1996. Relations between aquatic hyphomycetes communities and riparian vegetation in 3 Pyrenean streams. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris* 319: 107-111.
- Gessner M.O. 1997. Fungal biomass, production and sporulation associated with particulate organic matter in streams. *Limnetica* 13: 33-44.
- Gessner M.O., Suberkropp K. and Chauvet E. 1997. Decomposition of Plant Litter by Fungi in Marine and Freshwater Ecosystems. In: Wicklow D.T. and Söderström B. (eds), *The Mycota: a Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research*. Vol. IV: Environmental and Microbial Relationships. Springer-Verlag, Berlin, pp. 303-322.
- Gönczöl J. and Révay Á. 1999. Studies on the aquatic hyphomycetes of the Morgó stream, Hungary. II. Seasonal periodicity of conidial populations. *Archiv für Hydrobiologie* 144: 495-508.
- Gönczöl J., Révay A. and Csontos P. 2001. Effect of sample size on the detection of species and conial numbers of aquatic hyphomycetes collected by membrane filtration. *Archiv für Hydrobiologie* 150: 677-691.
- Gulis V. 2001. Are there any substrate preferences in aquatic hyphomycetes? *Mycological Research* 105: 1088-1093.
- Iqbal S.H. and Webster J. 1973. The trapping of aquatic hyphomycete spores by air bubbles. *Transactions of British Mycological Society* 60: 37-48.
- Laitung B., Pretty J.L., Chauvet E. and Dobson M. 2002. Response of aquatic hyphomycete communities to enhanced stream retention in areas impacted by commercial forestry. *Freshwater Biology* 47: 313-324.

- Lavelle P. 1986. Associations mutualistes avec la microflore du sol et richesse spécifique sous les tropiques : l'hypothèse du premier maillon. (Mutualistic associations with soil microflora and specific richness in the tropics: the first link hypothesis). *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris* 302: 11-14.
- Legendre L. and Legendre P. (eds) 1979. *Ecologie numérique*. Tome 2: *La structure des données écologiques*. Masson, Paris and les Presses de l'Université du Québec.
- Noss R.F. 1990. Indicators for monitoring biodiversity: a hierarchical approach. *Conservation Biology* 4: 355-364.
- Robinson C.T., Tockner K. and Ward J. 2002. The fauna of dynamic riverine landscapes. *Freshwater Biology* 47: 661-677.
- Shannon C.E. and Weaver W. 1949. *The mathematical theory of communication*. University of Illinois Press, Urbana, USA.
- Smith E.P. and van Belle G. 1984. Non parametric estimation of species richness. *Biometrics* 40: 119-129.
- StatSoft France 1997. *STATISTICA pour Windows*. [Manuel du Programme]: StatSoft France, 31, cours des Juilliottes, 94700 Maisons-Alfort.
- Suberkropp K. 1992. Interactions with invertebrates. In: Bärlocher F. (ed), *The ecology of aquatic hyphomycetes*. Springer Verlag, Berlin, pp. 118-134.
- SYSTAT: Statistics, version 5.2 Edition 1992. Evanston, IL: SYSTAT, Inc., pp. 724.
- Thomas K., Chilvers G.A. and Norris R.H. 1992. Aquatic Hyphomycetes from Different Substrates: Substrate Preference and Seasonal Occurrence. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 43: 491-509.
- Tilman D. 1999. The ecological consequences of changes in biodiversity: a search for general principles. *Ecology* 80: 1455-1474.
- Vitousek P.M., Mooney H.A., Lubchenco J. and Melillo, J.M. 1997. Human Domination of Earth's Ecosystems. *Science* 277: 494-499.
- Ward J. and Tockner K. 2001. Biodiversity: towards a unifying theme for river ecology. *Freshwater Biology* 46: 807-819.
- Wardle D.A., Giller K.E. and Barker G.M. 1999. The regulation and functional significance of soil biodiversity in agrosystems. In: Wood D. and Lenne J. (eds), *Agrobiodiversity*, CAB International, Wallingford, pp. 87-121.
- Webster J. and Descals E. 1981. Morphology, distribution, and ecology of conidial fungi in Freshwater habitats. In: Cole G.C. and Kendrick B. (eds), *Biology of the Conidial Fungi*, vol. 1. Academic Press, London, pp. 295-355.

Table 1. Physical and chemical characteristics of the ten sample sites within the streams from the Montagne Noire region. Latitude, longitude, altitude and distance to source of the sample sites were determined from topographical maps (1:25 000). All other characteristics were determined on site. The ranges of values stand for all the measurements at six different sample dates. The width and depth values correspond to water depths and widths during the six sample dates. The substratum and dominant riparian tree species were determined at the beginning of the study.

Montagne Noire	Dental	Fraïssègne	Montaud tributary	Fage	Linon	Lestrèpe	Bergnassonne	Ladoux	Coumbos tributary	Lampy
Latitude N	43°24'34''	43°24'44''	43°28'26''	43°25'00''	43°24'48''	43°27'31''	43°24'39''	43°26'67''	43°24'73''	43°25'10''
Longitude E	2°14'11''	2°14'01''	2°15'46''	2°32'05''	2°15'23''	2°26'57''	2°11'59''	2°24'66''	2°27'68''	2°11'22''
Altitude (m) a.s.l.	715	705	580	680	715	870	750	780	1 120	705
Distance to source (m)	0.75	0.78	1.50	1.00	1.00	0.23	1.05	3.13	0.30	1.30
Width (m)	0.8-2	0.7-1.5	1-3	0.6-3	0.6-1.5	0.5-1	0.8-2	1-3	0.4-1.2	1-3
Depth (m)	0.05-0.2	0.05-0.2	0.1-0.2	0.05-0.3	0.05-0.2	0.05-0.15	0.05-0.2	0.15-0.3	0.05-0.2	0.05-0.35
Discharge (L/s)	6-33	40-82	29	14-41	5-24	4-5	16-82	93-99	1-18	16-82
Temperature (°C)	2.2-16.9	0-20.6	3.1-18.1	3.2-16.8	5.4-12.6	2.5-16.1	3.9-16.6	3.2-16.0	1.8-13.1	4.0-14.6
pH	6.0-6.8	6.1-6.8	5.9-6.9	5.7-7.0	6.7-7.5	5.0-6.2	5.6-6.0	5.7-6.5	3.9-5.5	5.2-6.0
Conductivity (µS cm ⁻¹)	19-29	19-34	21-29	25-35	47-108	17-22	18-25	21-25	15-19	20-30
Orthophosphates P-PO ₄ (µg/L)	0-3.1	0-2.9	0-4.5	0-13.5	0-2.3	0-3.6	0-1.9	0-16.3	0-3.2	0.1-5.3
Nitrates N-NO ₃ (µg/L)	100-400	740-1100	840-990	420-550	320-620	3000-470	780-990	840-1180	530-900	1350-1610
Alcalinity (mg/L CO ₃ Ca)	4.2-8.0	5.1-7.9	3.3-5.2	3.3-7.2	34.1-66.3	1.2-2.4	1.3-3.8	1.5-9.6	0.6-1.2	3.1-5.4
Substratum	boulder, gravel, sand	boulder, gravel, sand	boulder, sand	boulder, gravel, sand	boulder, gravel, sand	boulder, gravel, sand	gravel, sand	boulder, gravel, sand	boulder	boulder, gravel, sand <i>C. avellana</i> , <i>B.</i>
Dominant riparian trees	<i>Q. robur</i> , <i>C. avellana</i> , <i>Q. petraea</i> , <i>F. silvatica</i>	<i>Q. robur</i> , <i>Q. petraea</i> , <i>F. silvatica</i> , <i>C. avellana</i>	<i>F. silvatica</i> , <i>C. avellana</i>	<i>F. excelsior</i> , <i>C. avellana</i> , <i>C. sativa</i> , <i>F. silvatica</i>	<i>F. silvatica</i>	<i>F. silvatica</i> , <i>I. aquifolium</i>	<i>F. silvatica</i> , <i>Q. petraea</i> , <i>I. aquifolium</i>	<i>F. silvatica</i> , <i>F. excelsior</i> , <i>C. avellana</i>	<i>F. silvatica</i>	<i>pubescens</i> , <i>F. silvatica</i> , <i>F. excelsior</i> , <i>Q. petraea</i>

Table 2. Relative abundance of each aquatic hyphomycete species collected in ten streams of Montagne Noire region, France, all dates combined. ? indicates an uncertain species or genus identification.

Species	Acronym	%
<i>Alatospora acuminata</i> Ingold	ALAC	11.13
<i>Alatospora constricta</i> Marvanoá & Descals	ALCO	0.07
<i>Alatospora flagellata</i> (Gönczöl) Marvanová	ALFL	0.25
<i>Alatospora pulchella</i> Marvanová	ALPU	0.18
<i>Anguillospora ?curvula</i> Iqbal	ANCU	2.34
<i>Anguillospora ?furtiva</i> Descals & Marvanová	ANFU	< 0.01
<i>Anguillospora crassa</i> Ingold	ANCR	1.16
<i>Anguillospora filiformis</i> Greathead	ANFI	0.45
<i>Anguillospora longissima</i> (Sacc. & Sid.) Ingold	ANLO	1.27
<i>Anguillospora rosea</i> Descals & Marvanová	ANRO	0.22
<i>Anguillospora</i> sp	ANSP	1.13
<i>Arborispora dolichovirga</i> Ando & Kawamoto	ARDO	< 0.01
<i>Articulospora ?proliferata</i> Jooste <i>et al.</i>	ARPR	0.40
<i>Articulospora atra</i> Descals	ARAT	< 0.01
<i>Articulospora tetracladia</i> Ingold	ARTE	6.51
<i>Casaraesia sphagnum</i> Fragoso	CASP	0.05
<i>Clavariopsis aquatica</i> de Wildeman	CLAQ	3.70
<i>Clavatospora longibrachiata</i> (Ingold) Marvanová & S. Nilsson	CLLO	5.87
<i>Crucella subtilis</i> Marvanová & Suberkropp	CRSU	0.18
<i>Culicidospora aquatica</i> R.H. Petersen	CUAQ	1.14
<i>Culicidospora gravida</i> R.H. Petersen	CUGR	0.04
<i>Dendrospora ?nana</i> Descals & Webster	DENA	0.01
<i>Dendrospora erecta</i> Ingold	DEER	0.15
<i>Dendrospora fusca</i> Descals & Webster	DEFU	0.04
<i>Dendrospora</i> sp	DESP	0.04
<i>Dendrospora tenella</i> Descals & Webster	DETE	< 0.01
<i>Dwayaangam cornuta</i> Descals	DWCO	0.01
<i>Flabellospora acuminata</i> Descals	FLAC	< 0.01
<i>Flagellospora curvula</i> Ingold	FLCU	26.31
<i>Fontanospora ?eccentrica</i> (R.H. Petersen) Dyko	FOEC	< 0.01
<i>Fontanospora alternibrachiata</i> Dyko	FOAL	< 0.01
<i>Geniculospora inflata</i> (Ingold) S. Nilsson	GEIN	0.17
<i>Goniopila monticola</i> (Dyko) Marvanová & Descals	GOMO	3.40
<i>Gyoerffyella rotula</i> (von Höhnel) Marvanová	GYRO	< 0.01
<i>Heliscella stellata</i> (Ingold & Cox) Marvanová & S. Nilsson	HEST	0.42
<i>Heliscina campanulata</i> Marvanová	HECA	0.91
<i>Heliscus lugdunensis</i> Saccardo & Théry	HELU	2.28
<i>Isthmotricladia ?britannica</i> Descals in Descals & Webster	ISBR	0.04
<i>Isthmotricladia</i> sp	ISSP	0.01
<i>Lambdasporium viridense</i> Nawawi	LAVI	< 0.01
<i>Lateriramulosa uniinflata</i> Matsushima	LAUN	< 0.01
<i>Lemonniera alabamensis</i> Sinclair & Morgan-Jones	LEAL	0.04
<i>Lemonniera aquatica</i> de Wildeman	LEAQ	0.07
<i>Lemonniera centrosphaera</i> Marvanová	LECE	0.01
<i>Lemonniera cornuta</i> Ranzoni	LECO	< 0.01

<i>Lemonnieria ?filiformis</i> R.H. Petersen	LEFI	< 0.01
<i>Lemonnieria pseudofloscula</i> Descals <i>et al.</i>	LEPS	< 0.01
<i>Lemonnieria terrestris</i> Tubaki	LETE	3.40
<i>Mycocentrospora acerina</i> (Hartig) Deighton	MYAC	0.04
<i>Mycocentrospora sp. 1 cf. angulata</i> R.H. Petersen	MYAN	5.83
<i>Mycocentrospora sp 2</i>	MYSB	0.01
<i>Mycofalcella calcarata</i> Marvanová	MYCA	1.32
<i>Stenoclaadiella neglecta</i> (Marv. & Descals) Marvanová & Descals	STNE	2.25
<i>Sympodiocladium frondosum</i> Descals & Webster	SYFR	0.01
<i>Taeniospora gracilis</i> Marvanová	TAGR	6.25
<i>Tetrachaetum elegans</i> Ingold	TEEL	6.12
<i>Tetracladium furcatum</i> Descals	TEFU	< 0.01
<i>Tetracladium marchalianum</i> de Wildeman	TEMA	0.02
<i>Tetracladium setigerum</i> (Grove) Ingold	TESE	0.01
<i>Tricellula ?aquatica</i> Webster	TRAQ	< 0.01
<i>Triscelophorus konajensis</i> Sridhar & Kaveriappa	TRKO	< 0.01
<i>Triscelophorus monosporus</i>	TRMO	0.03
<i>Tricladium attenuatum</i> Iqbal	TRAT	0.02
<i>Tricladium ?biappendiculatum</i> (Arnold) Marvanová & Descals	TRBI	< 0.01
<i>Tricladium caudatum</i> Kuzuha	TRCA	0.02
<i>Tricladium chaetocladium</i> Ingold	TRCH	2.85
<i>Tricladium curvisporum</i> Descals	TRCU	0.24
<i>Tricladium fallax</i> Marvanova ?	TRFA	< 0.01
<i>Tricladium patulum</i> Marvanová & Marvan	TRPA	0.03
<i>Tricladium splendens</i> Ingold	TRSPL	0.42
<i>Tricladium?</i> sp.	TRSP	0.02
<i>Tripaspermum camelopardus</i> Ingold, Dann & McDougall	TRCA	0.15
<i>Tripaspermum myrti</i> (Lind.) Hughes	TRMY	0.37
<i>Tripaspermum sp. 1 cf. ?prolongatum</i> Sinclair & Morgan-Jones	TRPR	0.06
<i>Tripaspermum sp 1</i>	TRSP1	< 0.01
<i>Triscelophorus monosporus</i> Ingold	TRAC	0.43
<i>Varicosporium elodeae</i> Kegel	VAEL	0.02
<i>Varicosporium giganteum</i> Crane	VAGI	< 0.01
<i>Volucrispora aurantiaca</i>	VOAU	< 0.01
<i>Ypsilina graminea</i> (Ingold. <i>et al.</i>) Marvanová & Descals	YSGR	0.02

Partie 2 : Forêts de conifères

Cette partie de l'étude concerne la comparaison des communautés d'hyphomycètes aquatiques entre les groupes de stations à « Feuillus » (hêtre dominant) et à « Feuillus+résineux ». L'échantillonnage est contemporain de l'étude des communautés d'invertébrés aquatiques et a été réalisé sur 6 des 8 stations de cette étude (voir ci-après). La méthodologie (6 campagnes de prélèvement bimestrielles) est identique à celle utilisée précédemment pour les 10 stations sous forêt de hêtre.

Les histogrammes d'abondance conidienne et de richesse spécifique fongique montrent un profil similaire entre les deux groupes de stations, avec un pic automnal bien marqué quelque soit la station (Figure 3). La présence de litière de conifères dans l'affluent de la Resse et le Faou Gros n'entraîne apparemment aucune modification importante dans la dynamique générale des hyphomycètes aquatiques, malgré la phénologie plus régulière des chutes de litière de conifères.

Le test *t* indique une absence de différence significative entre les deux groupes de sites. Entre les stations ayant un nombre total d'espèces végétal comparable (8 – 10), celles comportant des résineux présentent un nombre d'espèces fongiques très légèrement supérieur. Cette différence n'est cependant pas significative.

La liste d'espèces relevées dans les stations au cours du cycle annuel fait apparaître quelques différences entre les deux groupes de stations (Table 8) : 13 espèces sont absentes des rivières où les conifères sont présents (Groupe B) alors que ces dernières abritent 4 espèces absentes des rivières sous feuillus (Groupe A). Ces 17 espèces sont toujours présentes en très faible abondance quelque soit la station ; ainsi, l'espèce la plus abondante parmi ces 17 espèces, *Alatospora flagellata*, représente moins de 0,2 % des conidies prélevées dans les rivières sous feuillus (et moins de 0,1 % du total des conidies identifiées sur l'ensemble des stations). Les différences d'abondance les plus marquées entre les deux groupes de stations sont relevées chez *F. curvula* (5 fois moins abondant sous conifères) et *G. monticola* (6 fois plus abondant sous conifères). D'autres espèces relativement abondantes montrent également des différences de distribution sensibles entre les deux groupes de stations.

Il ressort que la dynamique des hyphomycètes aquatiques est peu altérée par la présence de conifères dans le couvert forestier. Toutefois l'abondance de certaines espèces telle *Flagellospora curvula* (de loin, l'espèce dominante sous couvert caducifolié) répond fortement à la présence de conifères. Les mécanismes impliqués dans cette sélection n'ont jamais été mis en évidence à ce jour, les hyphomycètes aquatiques étant généralement reconnus pour leur absence de spécificité vis-à-vis de leur substrat foliaire. Il reste que l'impossibilité de sélectionner des rivières sous couvert exclusivement persistant (ou avec une dominance de conifères) dans le même secteur que celui des rivières sous hêtraie a limité la portée de cette expérience. En effet, le pourcentage d'aiguilles de conifères dans le pool de

litière des deux rivières du Groupe B est inférieur à 1% en milieu d'automne ; même si l'on tient compte du temps de résidence supérieur pour ce type de litière, il est probable qu'au cours du cycle annuel ce pourcentage ne dépasse pas 20%. Dans ces conditions, une absence de réponse forte pouvait être attendue. Une sélection plus appropriée des sites pourrait lever ce problème et permettre, à l'avenir, de documenter la question de l'introduction des résineux en monoculture ou en culture mixte et de ses conséquences sur la diversité fongique.

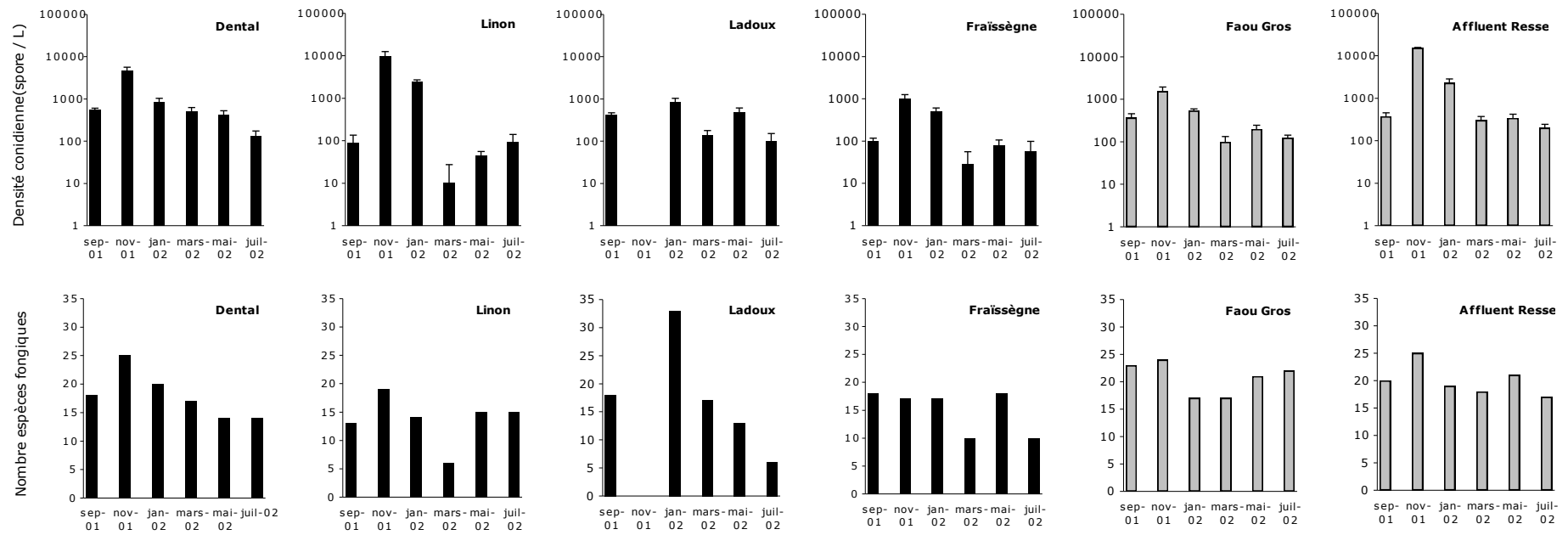


Figure 3. Densité conidienne et nombre d'espèces fongiques dans l'eau des rivières sous hêtre (noir) et sous hêtre avec conifères (gris). Six prélèvements au cours du cycle annuel 2001-2002. Moyenne \pm écart-type (n=5).

Table 8. Abondance relative moyenne des espèces fongiques dans les deux groupes de rivières (pourcentage de spores sur l'ensemble des relevés). A : 4 rivières avec conifères absents. B : 2 rivières avec conifères présents.

Espèce	Groupe A	Groupe B
<i>Alatospora acuminata</i>	13.9	16.1
<i>Alatospora flagellata</i>	0.2	0.0
<i>Alatospora pulchella</i>	0.0	0.0
<i>Anguillospora crassa</i>	0.2	0.7
<i>Anguillospora rosea</i>	0.8	1.6
<i>Anguillospora filiformis</i>	0.0	0.1
<i>Anguillospora longissima</i>	0.4	0.2
<i>Anguillospora sp.</i>	0.1	0.0
<i>Arbusculina irregularis</i>	0.0	0.0
<i>Articulospora tetracladia</i>	10.9	6.5
<i>Casaraesia sphagnorum</i>	0.0	0.0
<i>Clavariopsis aquatica</i>	1.9	1.5
<i>Clavatospora longibrachiata</i>	2.2	2.5
<i>Crucella subtilis</i>	0.0	0.1
<i>Culicidospora aquatica</i>	0.4	0.6
<i>Culicidospora gravida</i>	0.0	0.0
<i>Curucispora popanensis</i>	0.0	0.0
<i>Dactylaria submersa (?)</i>	0.0	0.0
<i>Dendrospora erecta</i>	0.0	0.1
<i>Dendrospora fusca?</i>	0.0	0.0
<i>Dendrospora nana</i>	0.0	0.0
<i>dwayaangam cornuta</i>	0.0	0.1
<i>Dwayaangam dichoto.?</i>	0.1	0.0
<i>Flabellospora acuminata</i>	0.0	0.0
<i>Flagellospora curvula</i>	41.8	7.6
<i>Fusarium sp.</i>	0.0	0.0
<i>Goniopila monticola</i>	2.4	13.6
<i>gyoerffyella gemellipara</i>	0.0	0.0
<i>Heliscella stellata</i>	0.1	0.0
<i>Heliscina campanulata</i>	0.3	0.5
<i>Heliscus lugdunensis</i>	0.8	0.6
<i>Isthmotricladia bitannica?</i>	0.1	0.0
<i>Lemonniera aquatica</i>	0.1	0.0
<i>Lemonniera centrosphaera</i>	0.0	0.0
<i>Lemonniera terrestris</i>	0.1	3.6
<i>Mycocentrospora acerina</i>	0.0	0.0
<i>Mycocentrospora spl</i>	3.1	4.3
<i>Mycofalcella calcarata</i>	0.3	1.0
<i>Stenoclatiella neglecta</i>	8.5	17.9
<i>Sympodiocladium frondosum</i>	0.0	0.0
<i>Taeniospora gracilis</i>	4.5	12.4
<i>Tetrachaetum elegans</i>	4.0	5.9
<i>Tetracladium furcatum</i>	0.0	0.0
<i>Tetracladium marchalianum</i>	0.0	0.0
<i>Tetracladium setigerum</i>	0.0	0.0
<i>Tricladium chaetocladium</i>	0.9	1.2
<i>Tricladium curvisporum</i>	0.0	0.0

<i>Tricladium minutum</i>	0.0	0.0
<i>Tricladium sp.</i>	0.0	0.0
<i>Tricladium splendens</i>	0.1	0.1
<i>Tripospermum camelopardus</i>	0.0	0.4
<i>Tripospermum myrti</i>	0.3	0.3
<i>Triscelophorus acuminatus</i>	0.0	0.0
<i>Tumularia aquatica</i>	0.0	0.0
<i>Varicosporium elodeae</i>	0.0	0.0
<i>Varicosporium giganteum</i>	0.0	0.0
<i>Varicosporium sp.</i>	0.0	0.0
<i>Volucrispora aurantiaca</i>	0.0	0.0
<i>Volucrispora graminea</i>	0.0	0.0
Non identifié, 2 bras	0.0	0.0
Non identifié, 3 bras	0.1	0.1
Non identifié, 5 bras	0.0	0.0
Non identifié filiforme <60 mM	0.0	0.0
Non identifié filiforme 60-120 mM	0.1	0.0
Non identifié filiforme >120 mM	0.0	0.1
Non identifié, tetracladié	1.0	0.2
sp Y	0.0	0.0

Chap. 2: Diversity of riparian vegetation and fungal populations in woodland streams: Genetic diversity in *Tetrachaetum elegans*, a mitosporic aquatic fungus¹

Abstract

Tetrachaetum elegans is a saprobic aquatic hyphomycete species for which no sexual stage has yet been described. It occurs most commonly during initial decay of tree leaves in temperate freshwater habitats and typically sporulates under water. Dispersal of the aquatic fungus takes place primarily in the water column and has a large passive component. Travel distances of conidia are poorly known, although in-stream distances may exceed hundreds of meters. Differences in substrate composition (e.g. quality of leaf litters) may also play a role in the distribution of different species or genotypes. We studied the population genetic structure of *T. elegans* using AFLP multilocus fingerprints. The populations were isolated from leaf litter from three different tree species, sampled in nine streams distributed throughout a mixed deciduous forest. Molecular markers were developed for 97 monosporic isolates using four selective primer pairs. A total of 247 fragments were scored, of which only 32 were polymorphic. Significant stream differentiation was detected for the isolates considered in this study. Analysis of molecular variance revealed that 20% of the genetic variation observed was the result of differences between streams. No correlation between genetic and geographical distances was found, but a few multilocus genotypes were observed in different locations. Altogether these results suggest that environmental barriers play a role in the population structure of this aquatic fungus. No significant effect of leaf litter composition on genetic variation was detected. Finally, tests of linkage disequilibrium between the 32 polymorphic AFLP loci (*i*) allowed us to significantly reject the independence of loci, and (*ii*) support the hypothesis that recombination events are rare or absent.

Introduction

A number of different groups of true fungi are present in freshwater and marine habitats, including parasites and decomposers (Alexopoulos *et al.* 1996). The aquatic hyphomycetes, or Ingoldian fungi, of which more than 300 species are known (Goh & Hyde 1996; Descals 1997), typically occur as saprophytes of leaf litter and wood fallen into running waters (Bärlocher 1992). *Tetrachaetum elegans* Ingold is a worldwide species commonly encountered as an early coloniser of freshly fallen leaf litter in temperate streams (Webster &

¹ Cette partie fait l'objet d'un manuscrit accepté pour publication dans la revue *Molecular Ecology*, dont les auteurs sont Laitung B., Chauvet E., Féau N., Fève K., Chikhi L. & Gardes M.

Descals 1981; Chauvet 1992; Suberkropp 1992; Gessner *et al.* 1993). Hyphomycete species are grouped in the Deuteromycota (or *Fungi Imperfecti*) because they typically reproduce by means of mitotic spores called conidia. However, the absence of known sexual stages is not evidence for lack of genetic recombination. Life cycles of many fungi are poorly characterised because of the difficulty of directly assessing the reproductive modes of such cryptic microorganisms in nature (Alexopoulos *et al.* 1996; Taylor *et al.* 1999a). Less than 10% of conidial forms (i.e. anamorphs) of aquatic hyphomycetes are currently connected to sexual forms (i.e. teleomorphs). The majority of the associated sexual forms belong to unrelated groups of true fungi, mainly Ascomycota and a few Basidiomycota (Webster 1992; Sivichai & Jones 2003).

Aquatic hyphomycetes produce considerable numbers of conidia, which can reach concentrations of 30 000 per litre (Webster & Descals 1981; Gessner *et al.* 1997). Most species develop spores underwater, but some will also continue to sporulate on leaves or twigs exposed to air (Webster, 1992). Taxonomic identification of *T. elegans* is not difficult because this species produces large conidia (span > 200 µm) with a distinctive four arm (tetra-*radiate*) shape. After contact with, and attachment to submerged plant material, the conidia germinate and the resulting mycelia rapidly penetrate the substratum and initiate the decay. Conidia are important units of dispersal. Water flow continuously carries them downstream (Bärlocher 1992). Long-distance in-stream dispersal is common among aquatic hyphomycetes (Bärlocher 1992) and is viewed as a passive phenomenon that increases the chances that individuals will reach substrate that is suitable for recruitment. Thus, for organisms such as aquatic hyphomycetes that typically inhabit streams for most of their life cycle, some geographical differentiation would be expected for populations from unconnected rivers, as has been described for macroinvertebrates (e.g. Hughes *et al.* 1996) and fishes (e.g. Wenburg *et al.* 1998). Such differentiation may be attributed to limited gene flow, random genetic drift and stream selection for particular alleles or genotypes (Monaghan *et al.* 2002). However, information on geographical differentiation, dispersal and gene flow among populations is lacking for aquatic hyphomycetes, with the exception of one study by Peláez *et al.* (1996). These authors reported on the genetic diversity of two Ingoldian species along a 1-km stream section using RAPD markers. Distant isolates shared the same RAPD patterns and genotypes appeared to be randomly distributed, which suggested the existence of a relatively uniform pool of genotypes in the stream section studied.

Mosaics of distinctive hyphomycete species colonies and genotypes are often observed on single leaves (Shearer & Lane 1983; Charcosset & Gardes 1999; McArthur *et al.* 2001). It has been suggested that at early stages of decay, a leaf receives an imprint of the stream spores (Bärlocher & Schweizer 1983). However, beyond the initial colonisation of a substrate, competitive as well as synergistic interactions between individual mycelia contribute to the patterns of diversity usually observed at various spatial scales, from a single leaf to a given stream. The fact that species of aquatic hyphomycetes differ in their growth rates, life

strategies and sporulation abilities lends support to this idea that such interactions between mycelia may play a role in determining species composition.

Preference towards a substratum is a controversial topic (Bärlocher 1992; Thomas *et al.* 1992; Gulis 2001). Ingoldian fungi are considered generalists, colonising a wide range of plant material including eucalyptus leaves and coniferous needles, which may contain high levels of tannins and other phenolics potentially exhibiting inhibitory effects (Bärlocher & Oertli 1978; Suberkropp 1998; Chauvet *et al.* 1997; Bärlocher & Graça 2002). It has also been suggested, however, that naturally coexisting assemblages of species (and genotypes) may be the result of long-term evolutionary selection of clones adapted to specific substratum characteristics, at least in some species (Gulis 2001). Charcosset & Gardes (1999) found two common RAPD phenotypes (out of 13) restricted to willow leaves in a study of genetic variation of *T. elegans* at a single site, although a similar pattern in genotype distribution was not observed on leaves from other plant species. From these observations, they suggested a possible selection of specialists for willow leaves. However, their study suffers from a limitation of the sampling procedure: all tested isolates were collected at one location during one sampling period. In addition, it is unclear whether the detected polymorphism truly reflects the genetic diversity of *T. elegans* at that site or was the result of methodological limitations associated with RAPD markers (Ellsworth *et al.* 1993; Penner *et al.* 1993).

AFLP markers are a more robust and powerful alternative to RAPD markers. This multilocus technique is reproducible and can detect similar or higher levels of polymorphism than the RAPD technique, with no requirement for prior knowledge on DNA sequences (Vos *et al.* 1995; Majer *et al.* 1996; Jones *et al.* 1997; Mueller & Wolfenbarger 1999).

In this study, we report on the genetic diversity of 97 isolates of *T. elegans* obtained from three leaf species originating from nine woodland streams located within a deciduous forest in south-western France. We investigated clonal structure and population differentiation with respect to both geographical distance and leaf litter species and assessed if the paradigm of frequent long distance gene flow by spores in an aquatic system is valid at this geographical scale.

Materials and Methods

Population sampling and cultivation of fungal isolates

T. elegans isolates originated from nine similar first-order streams located in a c. 1450 km² mixed broadleaf forest (Montagne Noire) in south-western France (Fig. 1). The streams drain independent watersheds, have low nutrient concentrations and are well oxygenated (Table 1, Annex). Streams are predominantly supplied with leaves and woody debris from oaks (*Quercus robur* L., *Q. humilis* Miller subsp. *humilis*, *Q. petraea* Liebl.), beech (*Fagus*

silvatica L.) and hazel (*Corylus avellana* L.). The distance between any two sampling sites ranged from 0.5 km (Dental and Fraïssègne) to 28 km (Fage and Lampy).

Leaves decomposing in the streams were collected in autumn 1998. Several leaves were collected from an area of a few square meters in each stream (Charcosset & Gardes 1999). Three types of leaf litter were sampled: beech, oak and hazel. In the laboratory, individual leaves from each stream and type of leaf litter were incubated in distilled water for two days at 15°C to induce sporulation (Descals 1997). At least 10 single *T. elegans* conidia per stream were isolated from different leaves under a dissecting microscope and grown on MEA medium with antibiotics (1 g/L malt extract, 20 g/L agar, 90 µg/mL ampicillin and 150 µg/mL streptomycin sulphate), then transferred to 1% MEA medium. A total of 97 cultures were produced and submitted to AFLP analysis (Table 2). Differences in the number of isolates among the three types of litter reflect the composition of the riparian vegetation along each stream (Tables 1 and 2). In order to facilitate the removal of the mycelium from the culture medium, the cultures were transferred to a growth medium containing 20 g/L malt extract, 4 g/L Gel-Gro™ gellan gum and 510 mg/L MgSO₄ · 7 H₂O (Doner & Bécard 1991).

Table 2 Number and distribution of *T. elegans* isolates used in AFLP analyses among streams and leaf litter species.

Stream	Origin of isolates			Total
	Beech	Oak	Hazel	
Montaud trib.	9	1	2	12
Dental	0	7	7	14
Linon	17	5	0	22
Lestrèpe	15	7	0	22
Fraïssègne	0	9	3	12
Fage	0	1	3	4
Bergnassonne	0	1	1	2
Lampy	0	1	2	3
Ladoux	0	1	5	6
Total no. of isolates	41	33	23	97

DNA extraction

Before DNA extraction, the culture medium was solubilised with a sodium citrate solution (Doner & Bécard 1991) and the mycelium fragments transferred with forceps to 1.5 mL tubes containing 300 µL of 2X CTAB extraction buffer (Gardes & Bruns 1996). After three successive freeze-thaw cycles (65°C), the mycelium was ground with a polypropylene micropestle and incubated at 65°C for 1 h. Three µL of a proteinase K solution (10 mg/mL) was then added and the mycelium digested for 15 min at 37°C. DNA was purified with phenol/chloroform (1:1, v/v) as described by Raeder & Broda (1985). Next, 300 µL of chloroform/isoamylalcohol (24:1, v/v) was added and the solution was emulsified and centrifuged for 15 min at 4°C. The resultant aqueous phase was incubated with 10 µL

RNaseA (20 mg/mL) at 37°C for 10 min and extracted with an equal volume of chloroform/isoamylalcohol. The DNA was precipitated overnight from the aqueous phase by the addition of an equal volume of cold isopropanol at -20°C. The pellet was washed with 70% ethanol and the DNA redissolved in 40 µL of TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0). The DNA concentration was measured by a quantitative fluorimetric assay with the fluorochrome Hoechst 33258 (Labarca & Paigen 1980) using a DNA fluorometer TKO 100 (Hoefer Scientific Instruments).

AFLP analysis

AFLP analysis was performed according to Vos *et al.* (1995), with the following modifications. Genomic DNA was restricted with *MseI* and *EcoRI* enzymes (New England Biolabs Inc.), followed by ligation of appropriate adaptors to the restriction fragments. The DNA mixture was pre-amplified using *MseI* and *EcoRI* adapted-directed primers (GIBCO™). The pre-amplification products were then selectively amplified using *MseI* and *EcoRI* primers (GIBCO™) containing one selective nucleotide at their 3'-end; the *EcoRI* primer was end-labelled with selective fluorescent markers. For this study, we first tested 57 primer pair combinations on five isolates and selected the combinations that produced at least 5 polymorphic bands. Four primer pair combinations (*EcoRI*-A/*MseI*-CA, *EcoRI*-A/*MseI*-CC, *EcoRI*-T/*MseI*-CA and *EcoRI*-T/*MseI*-CC, Promega) were selected on that criterion and used throughout the study. Selective PCRs were performed with 5 µL (5X diluted) pre-amplification product, as in the pre-selective amplification procedure.

Fluorescently-labelled amplified fragments were separated on a 6 % acrylamide gel containing 6 M urea. Electrophoresis and data collections were performed on an ABI 373 DNA Sequencer (Perkin-Elmer Applied Biosystems Inc.). Raw data were edited with GENESCAN Analysis Software, version 3.1 (Perkin-Elmer Corporation, 1998).

Reproducibility tests on AFLP bands

To test the reproducibility of the AFLP profiles, separate DNA extractions, PCR amplifications and AFLP analyses were performed as described above on a sub-sample of 20 isolates using the four primer combinations. In addition to the protocol described above, we also followed protocol 2 of Redecker *et al.* (2001) to generate AFLP fingerprints on a sub-sample of 42 isolates (included the 20 isolates previously used) using two primer combinations. No differences in the AFLP profiles were detected in the duplicates.

Scoring procedures

The data for each primer combination were analysed using GENESCAN Analysis Software, version 3.1 (Perkin-Elmer Corporation 1998). For haplotypic AFLP data, bands were

considered putative loci, with absence or presence as alleles. Presence or absence of bands was scored manually in a reproducible size range (from 60 to 500 bp) and entered as 1 or 0, respectively, in a binary data matrix. Loci that did not show clear presence/absence patterns over the populations were excluded (Fig. 2) and this allowed us to define 247 potential loci. Results were double scored and unclear bands for a few isolates were scored as missing data.

Table 1 Physical and chemical characteristics and composition of the dominant riparian vegetation of the study streams. Width and depth refer to measurements over a 50-m reach. Water temperature refers to continuous measurements over one year. Water pH was determined bimonthly over one year.

Stream	Latitude N	Longitude E	Altitude a.s.l. (m)	Width (m)	Depth (m)	Water temperature (°C)	Water pH	Riparian vegetation
Dental	43°24'34''	2°14'11''	715	0.8-2	0.05-0.2	2.2-16.9	6.0-6.8	<i>Q. robur</i> , <i>C. avellana</i> , <i>Q. petraea</i> , <i>F. silvatica</i>
Fraïssègne	43°24'44''	2°14'01''	705	0.7-1.5	0.05-0.2	0.0-20.6	6.1-6.8	<i>Q. robur</i> , <i>Q. petraea</i> , <i>F. silvatica</i> , <i>C. avellana</i>
Montaud trib.	43°28'26''	2°15'46''	580	1-3	0.1-0.2	3.1-18.1	5.9-6.9	<i>F. silvatica</i> , <i>C. avellana</i>
Fage	43°25'00''	2°32'05''	680	0.6-3	0.05-0.3	3.2-16.8	5.7-7.0	<i>F. excelsior</i> , <i>C. avellana</i> , <i>C. sativa</i> , <i>F. silvatica</i>
Linon	43°24'48''	2°15'23''	715	0.6-1.5	0.05-0.2	5.4-12.6	6.7-7.5	<i>F. silvatica</i>
Lestrèpe	43°27'31''	2°26'57''	870	0.5-1	0.05-0.1	2.5-16.1	5.0-6.2	<i>F. silvatica</i> , <i>I. aquifolium</i>
Bergnassonne	43°24'39''	2°11'59''	750	0.8-2	0.05-0.2	3.9-16.6	5.6-6.0	<i>F. silvatica</i> , <i>Q. petraea</i> , <i>I. aquifolium</i>
Ladoux	43°26'67''	2°24'66''	780	1-3	0.15-0.3	3.2-16.0	5.7-6.5	<i>F. silvatica</i> , <i>F. excelsior</i> <i>C. avellana</i>
Lampy	43°25'00''	2°32'05''	705	1-3	0.05-0.35	4.0-14.6	5.2-6.0	<i>C. avellana</i> , <i>B. pubescens</i> <i>F. silvatica</i> , <i>F. excelsior</i> , <i>Q. petraea</i>

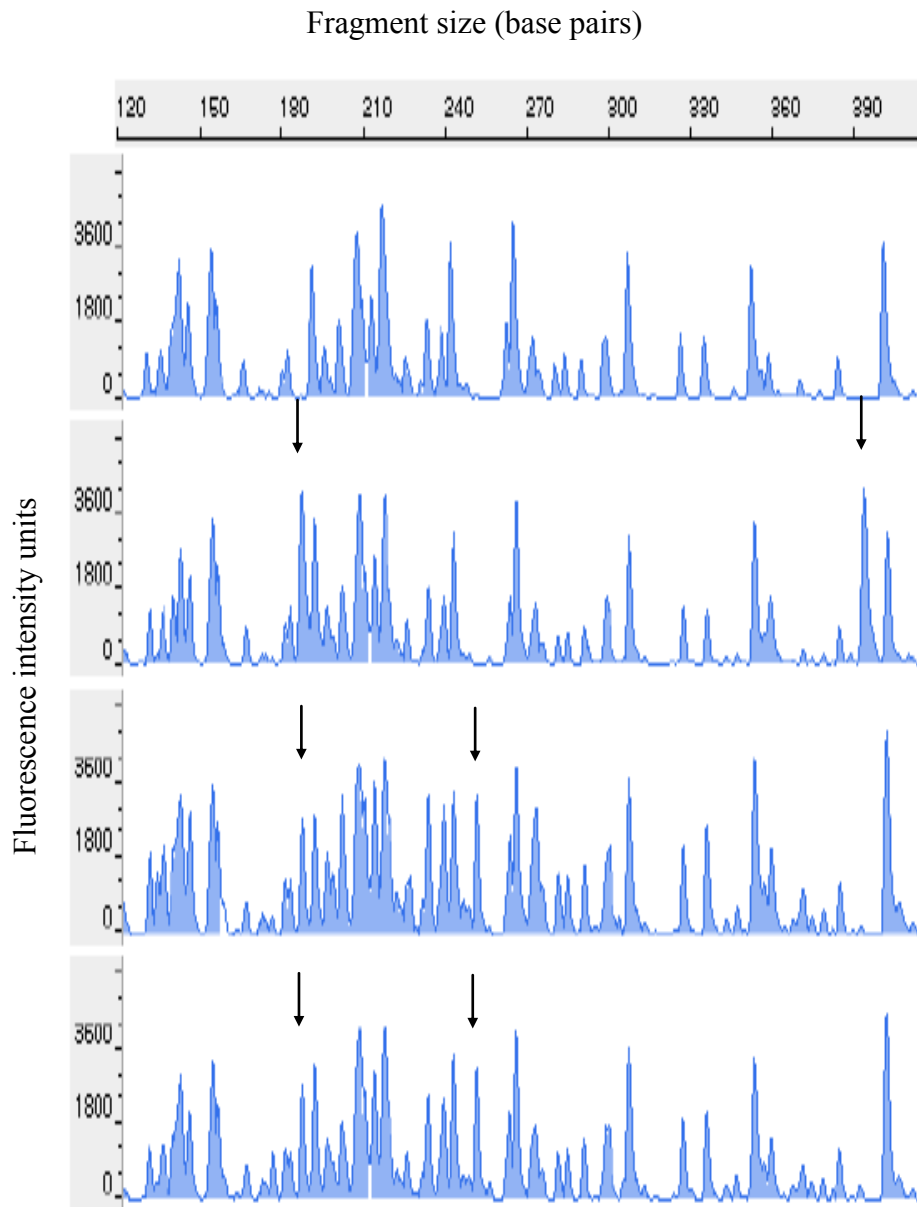


Figure 2. Electropherogram portions of AFLPs of four isolates of *Tetrachaetum elegans* obtained with the primer pair *EcoRI-A/MseI-CA*. Arrows show presence of polymorphic markers. For instance, the four individuals represented would be coded as 000, 101, 110, and 110, respectively.

Intrapopulation variation

The number of genotypes was determined for each stream population. Each multilocus genotype was regarded as representing one individual (or genet) and the number of monosporic isolates per genet was calculated as a measure of clonal diversity. The ARLEQUIN software package, version 1.1 (Schneider *et al.* 2000) was used to calculate the average gene diversity (H) estimates over loci.

A distance matrix of pairwise comparisons of individuals was constructed using the binary data matrix, using Nei & Li (1979) genetic distance. The matrices were used to construct a neighbor-joining tree with the software package TREECON 1.4 (Van de Peer & De Wachter 1994). Bootstrap values were calculated as the number of bootstrap trees comprising a cluster of the same composition out of 100 bootstrapped trees.

Population differentiation and substructuring

Nei's unbiased minimum genetic distances (1978) were estimated between streams with the largest sizes. The matrix of pairwise distances between streams was used to construct a population phenogram using the UPGMA algorithm in the software package TFPGA (Miller 1998). Confidence levels on tree topology were estimated from the percentage of 1000 bootstraps.

The ARLEQUIN software package, version 1.1 (Schneider *et al.* 2000) was used to calculate population pairwise F_{ST} distances, gene flow ($N_e m$) estimates and analyses of molecular variance (AMOVA). Pairwise F_{ST} distances (e.g. Slatkin 1995) were calculated between streams (F_{STs}) and sub-populations from leaf substrates (F_{STl}). AMOVA was applied to infer proportions of variation within and between streams. Significance of variance components and F_{ST} values among populations were tested using 1000 permutations. To examine whether genetic differences had arisen as a result of geographic isolation, we looked at the correlation between the \log_{10} of geographic distance and the \log_{10} of F_{STs} between all stream pairs. Distances among samples were measured as the shortest distances between sampling sites on a 1/25000:1 scale map. The significance of correlations was assessed using a Mantel test, with 1000 permutations, using the R PACKAGE for Multivariate and Spatial Analysis, version 4.0 d5 (Casgrain & Legendre 2001).

A population-level assignment matrix was calculated with ASSIGNMENT CALCULATOR (Paetkau *et al.* 1995), for each pair of populations, giving the number of individuals sampled in the first but assigned to the second. This calculator takes genotypes of individuals from several populations and determines from which population each individual is most likely to have come, by using an assignment index.

Linkage disequilibrium

In order to test the clonality of *T. elegans*, we decided to apply a series of tests using information on the statistical association between loci. Indeed, in a clonal species, we expect loci to be transmitted together without recombination. This is expected to generate strong linkage disequilibrium between loci. The first test uses a multilocus index based on Fisher's exact probability test on contingency tables of the observed haplotype frequencies (implemented in ARLEQUIN, version 1.1). The calculation is based on the distribution of allelic

mismatches between pairs of genotypes over all loci. A detailed description of formulas and procedures is given in the software manual (Schneider *et al.* 2000). The second test used the Index of Association, I_A , developed by Maynard Smith *et al.* (1993) to detect clonality in a number of bacteria and protozoa. I_A can be calculated as: $I_A = V_o/V_E - 1$, with V_o , the observed variance of K (where $K = \sum(1 - \sum p_{ij}^2)$) and with p_{ij} , the frequency of the i th allele at the j th locus, and V_E , the expected variance of K . As can be seen from the formula, I_A is expected to increase when there is departure from independence across loci. However, as was noted by Maynard-Smith *et al.* (1993) under a number of simplifying assumptions, I_A is also expected to increase linearly with the number of loci. So, absolute values of I_A are not directly comparable and a permutation approach can be taken to detect departures from independence. Values of I_A differing significantly from zero indicate a departure from linkage equilibrium and may indicate, in some cases, that the organism is clonal (Maynard-Smith *et al.* 1993).

Results

Characteristics of AFLP markers

Only four of the 57 primer pair combinations tested on twenty isolates yielded more than five polymorphic bands among isolates (data not shown) and were subsequently selected to analyse the 97 isolates. Of the four primer pairs used, the AFLP primer pair *MseI-A/EcoRI-CC* generated the greatest number of polymorphic bands (Table 3). The mean number of reliable bands detected for each primer pair varied from 52 to 72, and bands ranged in size from 60 to 500 bp (Table 3).

Table 3 Polymorphism detected with four AFLP primer pairs in 97 *T. elegans* isolates originating from three leaf species and nine streams in the Montagne Noire (France).

Primer pair	No. of bands	No. of polymorphic bands	% polymorphism
<i>MseI-A/EcoRI-CA</i>	69	8	11.6
<i>MseI-T/EcoRI-CA</i>	72	9	12.5
<i>MseI-A/EcoRI-CC</i>	54	10	18.5
<i>MseI-T/EcoRI-CC</i>	52	5	9.6
Total	247	32	12.9

Intrapopulation genetic and haplotypic diversity

Despite the use of the four most polymorphic primer combinations, the level of polymorphism was not very high. Among a total of 247 reproducible bands, only 32 (13%) were polymorphic (a locus was treated as polymorphic if the most common allele frequency was < 0.95).

Average gene diversity (H) was estimated with a mean value of 0.03 (SD 0.02; Table 4), based on the diversity of the mapped loci.

The polymorphic loci allowed the identification of 83 genotypes among the 97 isolates. Hence, nearly 86% of *T. elegans* isolates had different genotypes, indicating that almost every isolate was represented by one genotype (Table 4). This high percentage of distinct genotypes was observed in all streams (Table 4). The presence of identical genets between streams was also found. For example, isolates 1012 (from Montaud) and 849 (from Fraïssègne), collected 7.2 km apart from each other, had the same genotype (clone B, Fig. 3).

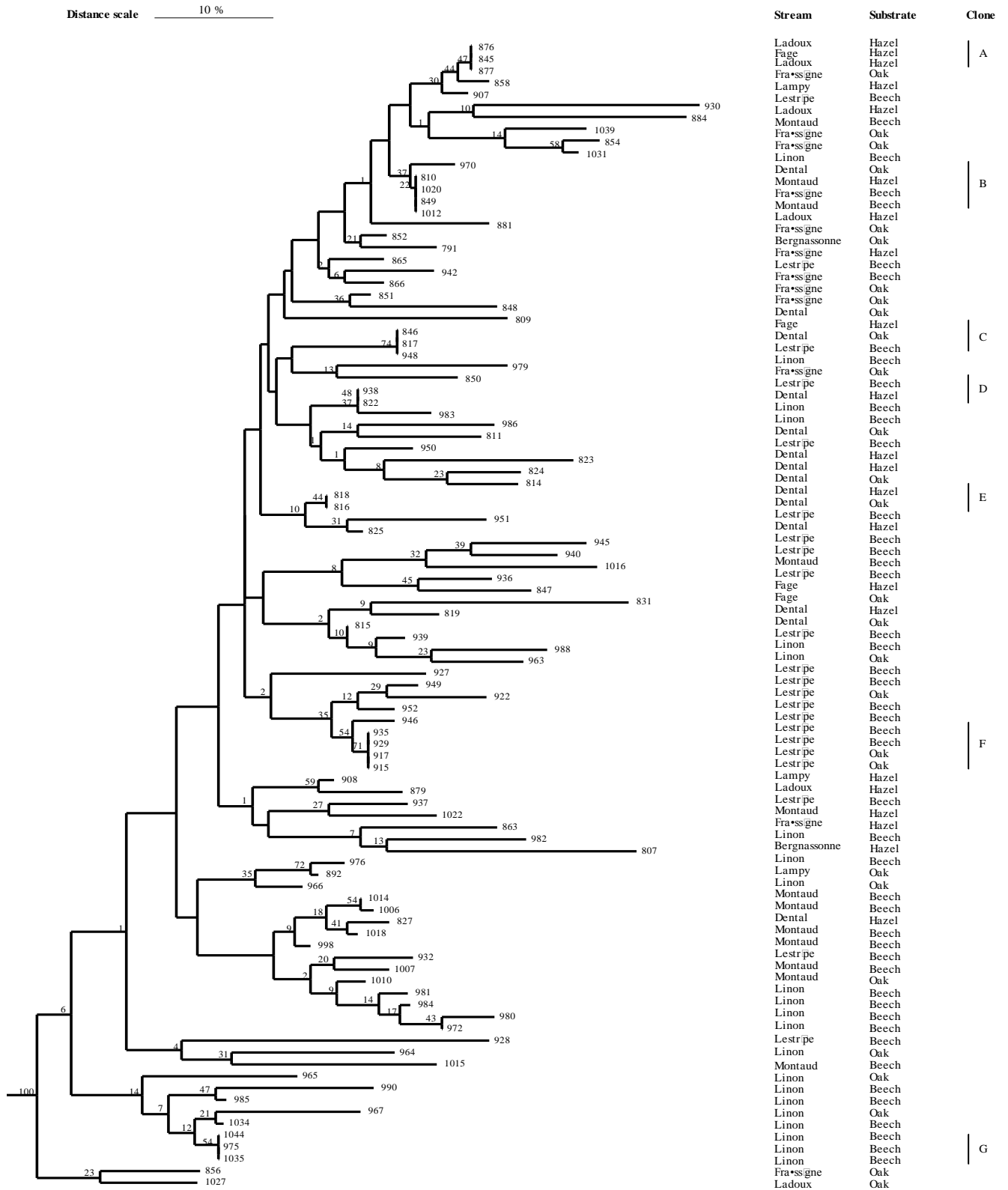


Figure 3. Tree constructed for 97 isolates of *T. elegans*, using Nei and Li coefficient and neighbor-joining method. Bootstrap values are given at the branching point. Isolates are referenced by strain number, stream and leaf type origin. Seven genets represented by more than one isolate are labeled as clones A to G.

Table 4 Population variability estimates for 97 *T. elegans* isolates originating from three leaf species and nine streams in the Montagne Noire (France)

Stream	Sample size <i>N</i>	No. of polymorphic loci	% of polymorphism	Average gene diversity over loci ($H \pm SD$)	No. of genotypes <i>G</i>	% genotype (G/N)
Montaud trib.	12	22	8.91	0.20 ± 0.12	11	91.7
Dental	14	18	7.29	0.14 ± 0.8	13	92.8
Linon	22	26	10.53	0.24 ± 0.13	20	90.9
Lestrèpe	22	27	10.93	0.23 ± 0.12	19	86.4
Fraïssègne	12	23	9.31	0.20 ± 0.11	12	100
Fage	4	16	6.48	0.28 ± 0.14	4	100
Bergnassonne	2	6	2.43	0.20 ± 0.22	2	100
Lampy	3	11	4.45	0.23 ± 0.18	3	100
Ladoux	6	19	7.69	0.24 ± 0.15	5	83.3
All isolates	97	32	12.95	0.03 ± 0.02	83	85.6

Cluster analysis

Figure 3 displays the relationships among isolates in a dendrogram generated by neighbor-joining clustering based on Nei and Li's similarity coefficients. The mean similarity between pairs of isolates was 0.64 (ranging from 0.24 to 1). The tree confirms the absence of any clear subpopulation structure among the 97 isolates of *T. elegans*. Confidence estimates on the branching pattern of the tree were generally poorly supported, with all bootstrap values below 74%. Genotypes of isolates from different streams were grouped together in various clusters. The same pattern was observed among isolates from different types of leaf litter. In addition, isolates with identical AFLP phenotypes were occasionally, but not always, found from the same litter unit collected in a given stream. Thus, out of seven genets represented by more than one isolate (clones A, B, C, D, E, F and G with 3, 4, 3, 2, 2, 4 and 4 isolates, respectively, Fig. 3), 4 were found in two and three streams, and 5 in two and three types of litter. Even for these isolates sharing the same genotype, genetic similarity was only weakly related to spatial proximity, and even less to leaf type.

Population differentiation and substructuring

Of the 32 polymorphic loci, eleven markers (34%) were found in the nine stream populations. One band was fixed exclusively in a single population (Lestrèpe). AFLP analyses performed on the five stream populations with the largest numbers of isolates ($N > 10$) revealed a low level of polymorphism in all five streams, ranging from 7% in Dental ($N = 14$) to 11% in Lestrèpe ($N = 22$) (Table 4). Using AMOVA on various subsets of the data, we determined the intrapopulation diversity component to be around 80%, while the diversity between populations was 20%. Thus, most of the genetic variance was distributed within streams (Table 5). However, the resulting significant F_{ST} value of 0.2 suggested large differences between streams.

Table 5 Analysis of molecular variance for 32 AFLP loci assayed in *T. elegans* originating from three leaf species and nine streams in the Montagne Noire (France). ** $P < 0.01$

Origin	Source	d.f.	SS	Variance	Total variance (%)	F_{st}
Stream	Among populations	8	85.1	0.75	19.8	0.20**
	Within populations	88	266.7	3.03	80.2	
Litter	Among populations	2	19.1	0.99	5.2	0.05**
	Within populations	94	332.7	3.54	94.8	

Pairwise F_{STs} (Table 6) indicated significant differences ($P < 0.05$) between the five streams with sufficiently large samples. The F_{STs} distances between streams with low numbers of individuals were mostly not significant, most likely because of small sample sizes. The F_{ST} figures indicate that the stream catchments in the Montagne Noire forest are highly differentiated and isolated from each other. This points towards the existence of a strong environmental barrier to genetic exchange and suggests that gene flow could only take place through rare events (Table 6).

Table 6 Pairwise population F_{STs} (below diagonal) and accompanying gene flow (N_{em}) (above diagonal) between streams with 1000 permutations. * $P < 0.05$

Stream	Code	MO	DE	LI	LE	FR	FA	BE	LAM	LAD
Montaud trib.	MO	—	1.44	3.37	1.73	2.01	2.28	1.52	3.32	2.31
Dental	DE	0.26*	—	1.72	8.89	2.84	4.74	1.57	3.15	1.13
Linon	LI	0.13*	0.23*	—	2.09	1.46	2.56	1.64	8.82	1.93
Lestrèpe	LE	0.22*	0.05*	0.19*	—	2.55	11.32	3.69	5.38	1.67
Fraïssègne	FR	0.20*	0.15*	0.26*	0.16*	—	6.07	—	5.66	5.39
Fage	FA	0.18*	0.10	0.16*	0.04	0.08	—	—	147.33	5.21
Bergnassonn	BE	0.25*	0.24	0.23*	0.12	-0.03	-0.02	—	4.71	3.25
Lampy	LAM	0.13	0.14	0.05	0.09	0.08	0.00	0.10	—	7.10
Ladoux	LAD	0.18*	0.31*	0.21*	0.23*	0.08	0.09	0.13	0.07	—

The general pattern of population genetic structure was also illustrated by the assignment tests (Table 7). In the five streams (where $N > 10$), a majority of individual multilocus genotypes could be reallocated to their population of origin (range from 54 to 68%). Several mis-assigned individuals were reallocated to populations from geographically distant streams, confirming that despite a large F_{ST} value, no clear geographical pattern is detectable. Similarly, the population tree had low bootstrap values (between 69 and 79) and thus did not provide a clear picture of their relationships (not shown). In addition, no correspondence emerged between population relationships and riparian vegetation diversity or physical and chemical characteristics of water. For instance, pairwise F_{STI} (Table 8) indicated no significant difference between the two or three leaf substrates within four of the five streams ($N > 10$).

Table 7 Results of the assignment analysis of 82 *T. elegans* individuals. The underlined figures represent possible migrants, i.e. the number of individuals sampled in the first stream (row) but assigned to the second (column)

	Montaud trib.	Dental	Linon	Lestrèpe	Fraïssègne
Montaud trib.	7	0	$\frac{1}{1}$	$\frac{1}{1}$	$\frac{3}{1}$
Dental	$\frac{1}{1}$	9	0	$\frac{3}{1}$	$\frac{1}{1}$
Linon	0	$\frac{6}{1}$	15	0	$\frac{1}{1}$
Lestrèpe	$\frac{1}{1}$	$\frac{6}{1}$	0	12	$\frac{3}{1}$
Fraïssègne	$\frac{2}{1}$	$\frac{2}{1}$	0	$\frac{1}{1}$	7

Table 8 Pairwise population F_{ST} between substrate sub-populations from five streams with 1000 permutations. * $P < 0.05$

Stream	Substrat	Cod	MO	MOB	MOh	DEo	DEh	Lih	Lib	LEo	LEb	FRo	FRh
Montaud trib.	oak	MO	-										
Montaud trib.	beech	MO	-0.47	-									
Montaud trib.	hazel	MOh	-0.50	0.02	-								
Dental	oak	DEo	0.42	0.26*	0.28	-							
Dental	hazel	DEh	0.09	0.17*	0.12	-0.09	-						
Linon	oak	Lih	-0.24	0.17*	0.16	0.24*	0.16*	-					
Linon	beech	Lib	-0.19	0.12*	0.19	0.27*	0.19*	0.06	-				
Lestrèpe	oak	LEo	0.71	0.44*	0.55	0.36*	0.30*	0.30*	0.38*	-			
Lestrèpe	beech	LEb	0.07	0.18*	0.14	0.02	0.00	0.13*	0.19*	0.08	-		
Fraïssègne	oak	FRo	0.21	0.20*	0.05	0.13*	0.15*	0.28*	0.30*	0.37*	0.17*	-	
Fraïssègne	hazel	FRh	0.00	0.16*	-0.04	0.05	-0.03	0.14	0.20*	0.36	0.06	-0.05	-

Finally, the relationship between $F_{STs}/1-F_{STs}$ and geographical distance for all stream population pairs was not significant (Mantel $r = -0.083$, $P = 0.301$), indicating no distinct pattern of isolation-by-distance at this geographical scale (Fig. 4).

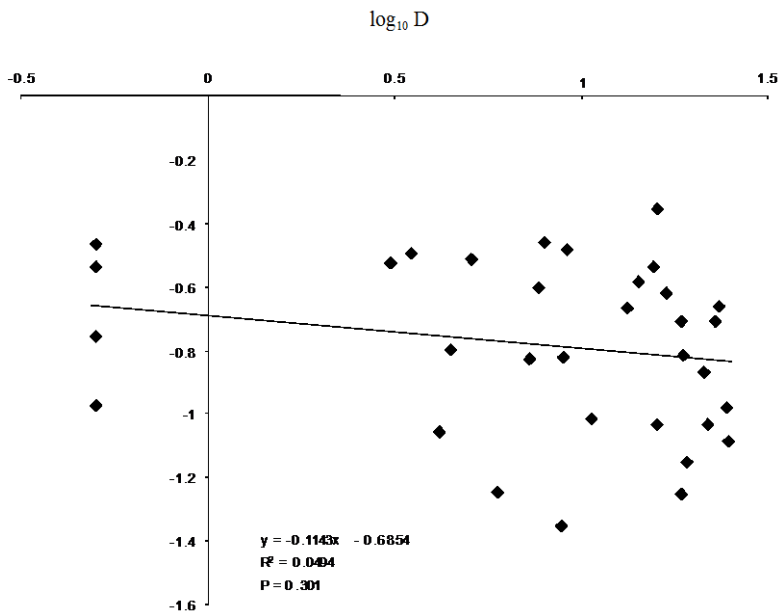


Figure 4. Relationships between $\log_{10}(F_{STs} / 1 - F_{STs})$ and \log_{10} of geographical distance (km), Pearson correlation coefficient (r^2) and significance of the correlation (P) using a Mantel test (1000 permutations) for pairwise comparisons of streams.

Linkage disequilibrium (LD)

Significant linkage ($P < 0.05$) was detected in 81 out of 465 comparisons (17.5%) over all the isolates of the five streams, which is 3.5 times more than expected by chance. Given that *LD* is typically difficult to demonstrate with small sample sizes such as ours (Lynch & Walsh 1998), this result points towards a large degree of *LD* across the markers typed. The percentage of significant pairwise *LD* was estimated in each stream to range from 3.5 to 22 (Table 9). The test of pairwise comparisons between putative AFLP loci showed significant *LD* for 15% of loci pairs, while the index of association, I_A , was significantly higher than expected under random association of alleles at different loci ($P < 0.01$). As both tests could be influenced by the existence of a substructure between samples (the equivalent of a Wahlund effect for multiple loci), I_A was calculated and compared for all isolates independently (Table 9). Overall, the results are very similar in the four cases. They allowed us to reject the null hypothesis of linkage equilibrium and suggest that the *LD* observed was indeed caused by a linkage between the loci and perhaps by a lack of recombination.

Table 9 Linkage disequilibrium tests in isolates of *T. elegans*. ** $P < 0.01$

Stream ($N > 11$)	Montaud	Dental	Linon	Lestrèpe	Fraïssègne	All	All
Number of significant linkage	15	9	51	42	6	89	75
Number of polymorphic loci	19	14	22	27	19	32	32
Total number of polymorphic loci pairs	171	91	231	351	171	496	496
% of pairwise linkage disequilibrium	8.77	9.89	22.08	11.97	3.51	17.94	15.12
Index of association I_A	—	—	1.72**	125**	—	0.81**	0.67**

Discussion

Genetic diversity

Overall, and despite the expected sensitivity of the AFLP technique, only a limited amount of polymorphism could be revealed in the mitosporic species *T. elegans*. This confirms and extends the results of Charcosset & Gardes (1999), who used RAPDs on a more limited sampling scheme of the same species (1 stream vs. 9 streams here). The AFLP analysis in the present study resulted in 13% polymorphic fragments (32 out of the 247 scored), whereas the survey of Charcosset & Gardes (1999), using isolates from the same stream site, gave a proportion of 21% (11 out of 52) polymorphic fragments. Of course, one could argue that it is difficult to compare levels of genetic diversity obtained with different markers. However, it should be noted that we initially eliminated 53 primer pairs out of 57 tested because of their low levels of polymorphism. A second piece of evidence for this low level of diversity in *T. elegans* comes from a preliminary study on the genetic diversity of another aquatic hyphomycete species, *Articulospora tetracladia* Ingold, using the same AFLP protocol and primers. In this study, five isolates of *A. tetracladia*, also collected in the Montagne Noire

streams, exhibited a total of 208 polymorphic fragments out of 286 (73%) (B. Laitung, unpublished results). The basis for the difference in polymorphism between the two species is unknown, but may be related to either different effective sizes or perhaps to the reproductive modes of the two species, given that *A. tetracladia* has a sexual stage.

Gene flow and isolation between sampling sites

We found significant evidence for population differentiation of *T. elegans* among the different streams. Moreover, the amount of stream differentiation revealed by F_{ST} values was very high, given that samples were 0.5 – 18.5 km apart. On average, the variation among sampled streams accounted for 20% of all observed variation (Table 5), but no single band was strictly indicative of any one stream population. Aquatic hyphomycetes usually produce mitotic spores underwater, and floating conidia or mycelia on leaves commonly experience downstream drift. Half-lives of conidia are estimated to carry them distances of hundreds of meters (ca. 700 m for tetracladia conidia, Thomas *et al.* 1991).

Despite the high level of differentiation observed, we found a few shared multilocus genotypes. Such genotypes could either be the result of shared polymorphism, of newly created genotypes (by recombination, but see below) or of long-distance migrants. Given that samples were located in different streams, gene flow between locations could be the result of aerial dispersal. During water turbulence, for example, the conidia are exposed to the air and are known to occur in riparian environments (Sridhar & Kaveriappa 1987). Foam containing large amounts of spores is also frequently blown onto leaves lying adjacent to the stream (Bärlocher 1992). In addition to wind dispersal, animals such as filter-feeding insects may also transport spores as well as mycelium of aquatic hyphomycetes within and between streams (Bärlocher 1981). We also found that geographical and genetic distances were not correlated among populations (at the Montagne Noire forest scale). Thus, stream populations, intimately connected via the fluid transport of various substances such as nutrients, may be open subunits within a network of habitat patches, linked perhaps by rare aerial dispersal. These various mechanisms of long-distance dispersal may explain the occurrence, for a few isolates of the same genotype in more than one stream.

Substrate specificity and selection

Distinct patterns of substrate specificity were not detected among the three types of leaf litter for the 97 isolates examined (Fig. 3), and neither significant differences between litter sub-populations (Table 6). The chemical composition of leaves from these tree species differing to some extent (Gessner & Chauvet 1994) did not segregate specific assemblages of isolates. Although only a few genotypes occurred more than once, in some of these cases the same genotypes were found on two or three tree species. Conceivably, the occurrence of aquatic hyphomycete species over a wide geographical area may promote broadly adapted genotypes

with extended ecological tolerance. Furthermore, mycelium intermingling is probably pronounced because of low intraspecific competition. For example, Shearer & Lane (1983) found numerous species of aquatic hyphomycete developing on single leaves. Charcosset & Gardes (1999) also observed some extensive co-occurrence of colonies belonging to different genotypes of *T. elegans* on single leaves. Our results are complementary to these observations. Together, they confirm that leaf litter in streams supports a high diversity of coexisting genotypes (Fig. 3) but our results do not confirm the suggestion that selection was responsible for the occurrence of some haplotypes on willow leaves (Charcosset & Gardes 1999).

Linkage disequilibrium and clonality

Aquatic hyphomycetes are believed to reproduce clonally (Webster & Descals 1981), but this has never been demonstrated. In the present paper we presented genetic data that strongly suggest that if sexual reproduction occurs, it is rare enough to be undetectable by the tests applied here. As noted above, and given our relatively limited sample sizes, the observation that on average, 15% of tests are significant at the 5% level is a strong indication that *LD* is caused by linkage between the markers. While clonality cannot be fully demonstrated, our results are in agreement with low levels of recombination. For instance, Maynard-Smith *et al.* (1993) suggested that significant I_A values could be observed if differentiated samples were analysed together. They noted that in such cases I_A values would not be significant for the subsamples. For instance, they showed that the high *LD* values found in *Rhizobium meliloti* could actually be attributed to the existence of two genetically isolated divisions. Significant I_A across all *R. meliloti* samples would become non-significant within each subdivision. Our results clearly show that I_A values are significant at all levels analysed. While I_A absolute values cannot be directly compared across studies and species (I_A 's magnitude is indeed dependent on the number of loci analysed), our results are qualitatively comparable to species such as *Salmonella*, for which clonality is likely if not demonstrated. Truly old asexual organisms have been shown to exist, for example in the bdelloid rotifers (Welch & Meselson 2000). However, our results are in contrast with other population studies on the reproductive mode of mitosporic fungi such as *Cenococcum geophilum* Fr., *Coccidioides immitis* or *Aspergillus flavus*, which all suggest at least some degree of genetic exchange in the populations examined (Burt *et al.* 1996; Geiser *et al.* 1998; LoBuglio & Taylor 2002). As in other fungi exhibiting sexual and asexual stages, we cannot preclude the existence of sexual populations of *T. elegans* elsewhere.

Conclusion and Perspectives

We have shown for the first time that within a limited geographic area, high levels of genetic differentiation can be observed in an aquatic fungus. This differentiation is most likely due to physical environmental barriers. The lack of correlation between geographic and genetic distances together with the presence of multilocus genotypes at different locations indicate

that rare gene flow events might also occur. This could be attributed to the long-distance dispersal of fungal propagules (such as spores or mycelium). Future studies should be carried out under a more extensive sampling scheme including multiple sites along different connected and isolated rivers. Another way to address directly the dispersal issue would be to develop selective spore trapping experiments and molecular genotyping methods that do not involve isolation and culturing steps. Regarding clonality, one possible way forward would be to investigate the correlation between linkage disequilibrium and physical distance between genetic markers. In the case of clonality, no correlation should be observed, whereas negative correlation would strongly suggest that recombination is actually taking place.

Acknowledgements

We would like to thank Mark O. Gessner, John W. Taylor, Wieland Meyer and Brigitte Crouau-Roy for providing helpful comments on earlier drafts of this paper. We also thank Martin Bidartondo, Dirk Redecker and Timothy Szaro for critical advice on the AFLP protocol and Hervé Gryta for help with the population genetic softwares. We are grateful to John W. Taylor and Frédérique Pitel for providing laboratory facilities. Funding was provided by the French programme Groupement d'Intérêt Public – ECOSystèmes FOREstiers to E. Chauvet, by the Programme “Dynamique de la Biodiversité et Environnement” of the Centre National de la Recherche Scientifique to M. Gardes and E. Chauvet, and by a travel grant to B. Laitung from the Université Toulouse III to visit John W. Taylor's laboratory.

References

- Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M (1996) *Introductory Mycology*. John Wiley and Sons, New York.
- Bärlocher F (1981) Fungi on the food and in the faeces of *Gammarus pulex*. *Transactions of the British Mycological Society*, **76**, 160-165.
- Bärlocher F (1992) Recent Developments in Stream ecology and their Relevance to Aquatic Mycology. In: *The ecology of aquatic hyphomycetes* (ed. Bärlocher F), pp. 16-32. Springer-Verlag, Berlin.
- Bärlocher F, Graça MA (2002) Exotic riparian vegetation lowers fungal diversity but not leaf decomposition in Portuguese streams. *Freshwater Biology*, **47**, 1123-1136.
- Bärlocher F, Oertli JJ (1978) Colonization of conifer needles by aquatic hyphomycetes. *Canadian Journal of Botany*, **56**, 57-62.
- Bärlocher F, Schweizer M (1983) Effect of leaf size and decay rate on colonization by aquatic hyphomycetes. *Oikos*, **41**, 205-210.
- Bonello P, Bruns TD, Gardes M (1998) Genetic structure of a natural population of the ectomycorrhizal fungus *Suillus pungens*. *New Phytologist*, **138**, 533-542.
- Burt A, Carter DA, Carter GL, White TJ, Taylor JW (1996) Molecular markers reveal cryptic sex in the human pathogen *Coccidioides immitis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **93**, 770-773.
- Casgrain P, Legendre P (2001) *The R Package for Multivariate and Spatial Analysis, version 4.0 d5*. User's manual. Département des sciences biologiques, Université de Montréal. <http://www.fas.umontreal.ca/BIOL/legendre/>.
- Charcoset J-Y, Gardes M (1999) Intraspecific genetic diversity and substrate preference in the aquatic hyphomycete *Tetrachaetum elegans*. *Mycological Research*, **100**, 736-742.
- Chauvet E (1992) Dynamique saisonnière des spores d'hyphomycètes aquatiques de quatre rivières. *Nova Hedwigia*, **54**, 379-395.
- Chauvet E, Fabre E, Elósegui A, Pozo J (1997) The impact of eucalyptus on the leaf-associated aquatic hyphomycetes in Spanish streams. *Canadian Journal of Botany*, **75**, 880-887.
- Descals E (1997) Ingoldian Fungi: some field and laboratory techniques. *Bolleti de la Societat d'Historia Natural de les Balears*, **40**, 169-221.
- Doner LW, Bécard G (1991) Solubilization of gellan gels by chelation of cations. *Biotechnology Techniques*, **5**, 25-28.
- Ellsworth DL, Rittenhouse KD, Honeycutt RL (1993) Artfactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. *BioTechniques*, **14**, 214-216.
- Fiore-Donno A-M, Martin F (2001) Population genetic structure and spatial distribution of genets from *Laccaria amethystina*, *Xerocomus chrysenteron* and *Xerocomus pruinatus* in an old mixed forest. *New Phytologist*, **152**, 533-542.
- Gardes M, Bruns TD (1996) ITS-RFLP matching for the identification of fungi. In: *Methods In Molecular Biology* (ed. Clapp JP), pp. 177-186. Humana Press Inc., Towota, NJ.
- Geiser DM, Pitt JI, Taylor JW 1998. Cryptic speciation and recombination in the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus flavus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **95**, 388-393.
- Gessner MO, Chauvet E (1994) Importance of stream microfungi in controlling breakdown rates of leaf litter. *Ecology*, **75**, 1807-1817.
- Gessner MO, Suberkropp K & Chauvet E (1997) Decomposition of Plant Litter by Fungi in Marine and Freshwater Ecosystems. In: *The Mycota: a Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research. Vol. IV: Environmental and Microbial Relationships* (eds Wicklow DT & Söderström B), pp. 303-322. Springer-Verlag, Berlin.
- Gessner MO, Thomas M, Jean-Louis A-M, Chauvet E (1993) Stable successional patterns of aquatic hyphomycetes on leaves decaying in a summer cool stream. *Mycological Research*, **97**, 163-172.
- Goh TK, Hyde KD (1996) Biodiversity of freshwater fungi. *Journal of Industrial Microbiology*, **17**, 328-345.
- Gryta H, Debaud J-C, Effosse A, Gay G, Marmeisse R (1997) Finescale structure of populations of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* in coastal sand dune forest ecosystems. *Molecular Ecology*, **6**, 353-364.
- Gulis V (2001) Are there any substrate preferences in aquatic hyphomycetes? *Mycological Research*, **105**, 1088-1093.
- Hughes JM, Bunn SE, Hurwood DA, Choy S, Pearson RG (1996) Genetic differentiation among populations of *Caridina zebra* (Decapoda: Atyidae) in tropical rainforest streams, northern Australia. *Freshwater Biology*, **36**, 289-296.
- Jones N, Ougham H, Thomas H (1997) Markers and mapping: We are all geneticists now. *New Phytologist*, **137**, 165-177.
- Labarca C, Paigen K, (1980) A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Analytical Biochemistry*, **102**, 344-352.
- LoBuglio KF, Taylor JW (2002) Recombination and genetic differentiation in the mycorrhizal fungus *Cenococcum geophilum* Fr. *Mycologia*, **94**, 772-780.
- Lynch M, Walsh B (1998) *Genetics and analysis of quantitative traits*. Sinauer Associates, 990 pp.
- McArthur FA, Bärlocher MO, MacLean NAB, Hiltz MD, Bärlocher F (2001) Methods in Litter Breakdown Asking Probing Questions: Can Fluorescent in situ Hybridization Identify and Localise Aquatic Hyphomycetes on Leaf Litter? *International Review of Hydrobiology*, **86**, 429-438.
- Majer D, Mithen R, Lewis BG, Vos P, Oliver RP (1996) The use of AFLP fingerprinting for the detection of genetic variation in fungi. *Mycological Research*, **100**, 1107-1111.
- Maynard Smith JN, Smith NH, O'Rourke M, Spratt BG (1993) How clonal are bacteria? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **90**, 4384-4388.

- Miller MP (1998) *Tools for Population Genetic Analysis*. Northern Arizona State University, Flagstaff, AZ.
- Monaghan MT, Spaak P, Robinson CT, Ward J V (2002) Population genetic structure of 3 alpine stream insects: influences of gene flow, demographics, and habitat fragmentation. *Journal of the North American Benthological Society*, **21**, 114–131.
- Mueller UG, Wolfenbarger LL (1999) AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends in Ecology and Evolution*, **14**, 389-394.
- Nei M, Li WH (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **76**, 5269-5273.
- Paetkau D, Calvert W, Sterling I, Strobeck C (1995) Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology*, **4**, 347-354.
- Peláez F, Platas G, Collado J, Díez MT (1996) Intraspecific variation in two species of aquatic hyphomycetes assessed by RAPD analysis. *Mycological Research*, **100**, 831-837.
- Penner GA, Bush A, Wise R *et al.* (1993) Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. *PCR Methods and Applications*, **2**, 341-345.
- Raeder U, Broda P (1985) Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*, **1**, 17-20.
- Redecker D, Szaro TM, Bowman RJ, Bruns TD (2001) Small genets of *Lactarius xanthogalactus*, *Russula cremoricolor* and *Amanita francheti* in late-stage ectomycorrhizal successions. *Molecular Ecology*, **10**, 1025-1034.
- Shearer CA, Lane L (1983) Comparison of three techniques for the study of aquatic hyphomycete communities. *Mycologia*, **75**, 498-508.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L (2000) *Arlequin ver. 2.000: A software for population genetics data analysis*. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland. <http://lgb.unige.ch/arlequin/>.
- Sivichai S, Jones EGB (2003) Teleomorphic-anamorphic connections of freshwater fungi. In: *Freshwater mycology* (eds Tsui CKM, Hyde KD), pp 259-274. Fungal Diversity Press, Hong Kong.
- Slatkin M (1995) A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, **139**, 457-462.
- Smith ML, Bruhn JN, Anderson JB (1992) The fungus *Armillaria bulbosa* is among the largest and oldest living organisms. *Nature*, **356**, 428-431.
- Sridhar KR, Kaveriappa KM (1987) Occurrence and survival of aquatic hyphomycetes under terrestrial conditions. *Transactions of the British Mycological Society*, **89**, 606-609.
- Suberkropp K (1992) Aquatic Hyphomycete Communities. In: *The fungal Community* (eds Carroll GC, Wicklow DT), 2nd edn, pp. 729-747. Marcel Dekker Inc., New-York.
- Suberkropp K (1998) Microorganisms and organic matter decomposition. In: *River ecology and management: Lessons from the Pacific Coastal Ecoregion* (eds Naiman RJ, Bilby RE), 1st edn, pp. 120-143. Springer-Verlag, New-York.
- Taylor JW, Jacobson DJ, Fisher MC (1999a) The evolution of asexual fungi: reproduction, speciation and classification. *Annual Review of Phytopathology*, **37**, 197-246.
- Taylor JW, Geiser DM, Burt A, Koufopanou V (1999b) The evolutionary biology and population genetics underlying fungal strain typing. *Clinical Microbiology Reviews*, **12**, 126-146.
- Thomas K, Chilvers GA, Norris RH (1992) Aquatic hyphomycetes from different substrates: substrate preference and seasonal occurrence. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*, **43**, 491-509.
- Van de Peer Y, De Wachter R (1984) TREECON for Windows: a software package for construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Computer Applications in the Biosciences*, **10**, 569-570.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M *et al.* (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, **23**, 4407-4414.
- Webster J (1959) Experiments with spores of aquatic hyphomycetes. I. Sedimentation and impaction on smooth surfaces. *Annals of Botany*, **23**, 595-610.
- Webster J (1992) Anamorph-Teleomorph Relationships. In: *The ecology of aquatic hyphomycetes* (ed. Bärlocher F), pp. 99-115. Springer-Verlag, Berlin.
- Webster J, Descals E (1981) Morphology, distribution, and ecology of conidial fungi in Freshwater habitats. In: *Biology of the Conidial Fungi*, Vol. 1 (eds. Cole GC, Kendrick B), pp. 295-355. Academic Press, London.
- Welch DM, Meselson M (2000) Evidence for the evolution of bdelloid rotifers without sexual reproduction or genetic exchange. *Science*, **228**, 1211-1215.
- Wenburg JK, Bentzen P, Foote CJ (1998) Microsatellite analysis of genetic population structure in an endangered salmonid: the coastal cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki clarki*). *Molecular Ecology*, **7**, 733-749.

Chap. 3 : Effet de la diversité forestière sur la diversité spécifique et fonctionnelle des communautés de macroinvertébrés benthiques

Introduction

Cette partie de l'étude traite de la réponse des communautés d'invertébrés aquatiques à une variation de la diversité forestière. A la différence des hyphomycètes aquatiques, les macroinvertébrés benthiques peuvent être classés en différents groupes trophiques, en fonction de leur mode et type d'alimentation. Comme pour les champignons aquatiques, l'hypothèse est que certains groupes d'invertébrés (par exemple les broyeurs de litière) sont sensibles à une diversité de leur ressource trophique. Une diversité plus élevée de litière peut se traduire par une plus grande disponibilité de ressources pour les consommateurs de litière au cours de l'année. On constate en effet une disparition quasi-totale des litières à potentiel de décomposition élevé (p. ex. aulne, frêne) en quelques semaines alors que les feuilles mortes plus réfractaires (p.ex. hêtre, chênes) peuvent persister tout au long de l'année dans les lit des rivières. En conséquence, nous testerons l'hypothèse selon laquelle la diversité spécifique et fonctionnelle des communautés d'invertébrés est plus grande dans les rivières à litière diversifiée. Nous tenterons également de mettre en évidence l'influence d'apports de litières de conifères en incluant deux rivières soumis à ce type d'apports à l'ensemble des sites d'étude.

Matériel et méthodes

Sites

Sur les 12 sites préalablement sélectionnés pour cette étude, 8 sites d'étude ont été choisis pour l'étude des macroinvertébrés benthiques. Une importance toute particulière a été accordée au choix des stations, dont l'ensemble des caractéristiques peut conditionner les résultats de l'étude. Les stations sélectionnées sont Fraissègne (FRA), Linon (LIN), Dental (DEN), Affluent Resse (ARE), Faou Gros (FAO), Montaud (MON), Fage (FAG) et Ladoux (LAD). Les six premiers sites se situent dans la même zone géographique avec un éloignement entre les sites inférieur à 10 Km tandis que les deux dernières stations sont situées environ 20 Km à l'est des autres sites. L'Affluent Resse et Faou Gros sont les deux rivières soumises à un apport d'aiguilles de résineux.

Echantillonnage

Les invertébrés ont été prélevés au moyen d'un filet de type "Surber", de 250 µm de vide de maille (Surber, 1937). Cette méthode permet d'échantillonner de manière exhaustive une surface déterminée du fond de la rivière. Les invertébrés benthiques ont été échantillonnés selon un rythme bimestriel durant une année. Trois répliques ont été récoltées pour chaque station à chaque campagne de prélèvement. Dès leur récolte les invertébrés ont été fixés grâce à une solution de formol (formaldéhyde, 4%), puis conservés au laboratoire. Le tri et la détermination de tous les individus capturés ont été réalisés à l'aide de la clé de Tachet et al. (2000). De plus, pour chaque réplique, plusieurs paramètres de l'environnement ont été évalués : granulométrie (classification de Cailleux, 1954) vitesse de courant, largeur et profondeur du cours d'eau. A chaque campagne de prélèvement et pour chaque cours d'eau le pH, la température et la conductivité ont été mesurés au moyen de sondes et un prélèvement d'eau a été effectué afin de déterminer l'alcalinité et les teneurs en nitrates et orthophosphates des différents cours d'eau.

Traitement des données

Nous avons d'abord classé les stations en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques et de la composition faunistique des macroinvertébrés à l'aide d'Analyses Factorielles des Correspondances (AFC), afin de tester si les sites sont comparables entre eux, et différent uniquement par la nature de leur couvert forestier.

Le traitement des données concernant les macroinvertébrés a ensuite consisté en l'utilisation de statistiques descriptives classiques pour visualiser l'abondance et la richesse spécifique de l'ensemble de la faune benthique, mais également des différents groupes trophiques en fonction de la diversité spécifique des litières végétales. L'utilisation de tests statistiques a été limitée par le manque de répliques qui n'autorise pas une analyse plus poussée. En effet, le tri, la détermination et le dénombrement des invertébrés nécessitent un temps considérable et il n'a été possible de trier que trois échantillons par site et par campagne, soit au total 144 échantillons. L'analyse des résultats obtenus doit néanmoins permettre de visualiser l'influence d'un gradient de diversité végétale sur les communautés benthiques, que ce soit en terme d'abondance, de richesse spécifique, ou de diversité fonctionnelle des communautés.

Enfin, nous avons utilisé des méthodes multivariées d'ordination, les cartes auto-organisées de Kohonen ou Self-Organizing Maps (SOM) (Kohonen 1995), pour comparer la structure des communautés benthiques des différentes stations. Dans ce type de modèle, l'algorithme multivarié a pour fonction de classer les données introduites dans le modèle. Conventionnellement, en écologie, la réduction de données multivariées est réalisée par utilisation de l'analyse en composantes principales (ACP) ou bien par une classification hiérarchique (Jongman et al. 1995). Les SOM réalisent la même opération, mais contrairement aux analyses classiques basées sur des relations linéaires, les SOM sont capables de

fonctionner aussi bien dans le domaine linéaire que dans le domaine non linéaire. Ainsi, cette méthode permet de classer de manière fiable l'organisation de communautés animales complexes, en intégrant à la fois les espèces rares et les espèces abondantes (Brosse et al. 2001). Les résultats obtenus sont visualisés sous forme d'une grille en 2 dimensions, formant une carte constituée de cellules en "nid d'abeilles", dont l'interprétation s'effectue de manière similaire à celle d'un plan d'ACP. Les similarités ou dissimilarités entre cellules sont ensuite mises en évidence par un algorithme appelé 'U-matrix' (voir Lek & Guegan 2000 pour plus de détails). De manière simplifiée, cette analyse est réalisée grâce à un algorithme qui consiste à intercaler des cellules entre les cellules existantes de manière à détecter les similarités ou dissimilarités entre cellules. Une représentation complémentaire sous forme de dendrogramme (classification hiérarchique par la méthode de Ward) permet d'identifier des clusters, c'est-à-dire les groupes de cellules qui présentent une similarité entre elles et une dissimilarité par rapport aux cellules des autres clusters. Cette méthode a été utilisée pour mettre en évidence l'existence de différences éventuelles entre les structures des communautés de macroinvertébrés des différentes stations (correspondant à des natures et des diversités spécifiques de litières différentes). D'un point de vue pratique, les données introduites dans le modèle sont les compositions taxonomiques de chaque site d'étude. Nous avons d'abord classifié les sites en considérant l'ensemble des invertébrés, sans distinction de groupes trophiques. Puis, dans un second temps, nous nous sommes uniquement intéressés aux invertébrés broyeur qui constituent les principaux consommateurs de litières végétales.

Résultats

Classification des sites

Les résultats de l'AFC réalisée sur les caractéristiques physico-chimiques des différents sites (Figure 1) montre que les stations ne sont pas similaires du point de vue physico chimique. On distingue deux groupes de stations : le premier formé par les stations ARE, FAO, MON, DEN et caractérisé par une faible vitesse maximale de courant ; le second formé par les stations FAG , LAD , LIN, caractérise des sites à conductivité et vitesse minimale de courant élevées. Cette analyse oppose donc des sites où l'eau est minéralisée et à régime hydraulique plutôt torrentiel à des sites à courant moins variable présentant une conductivité moindre.

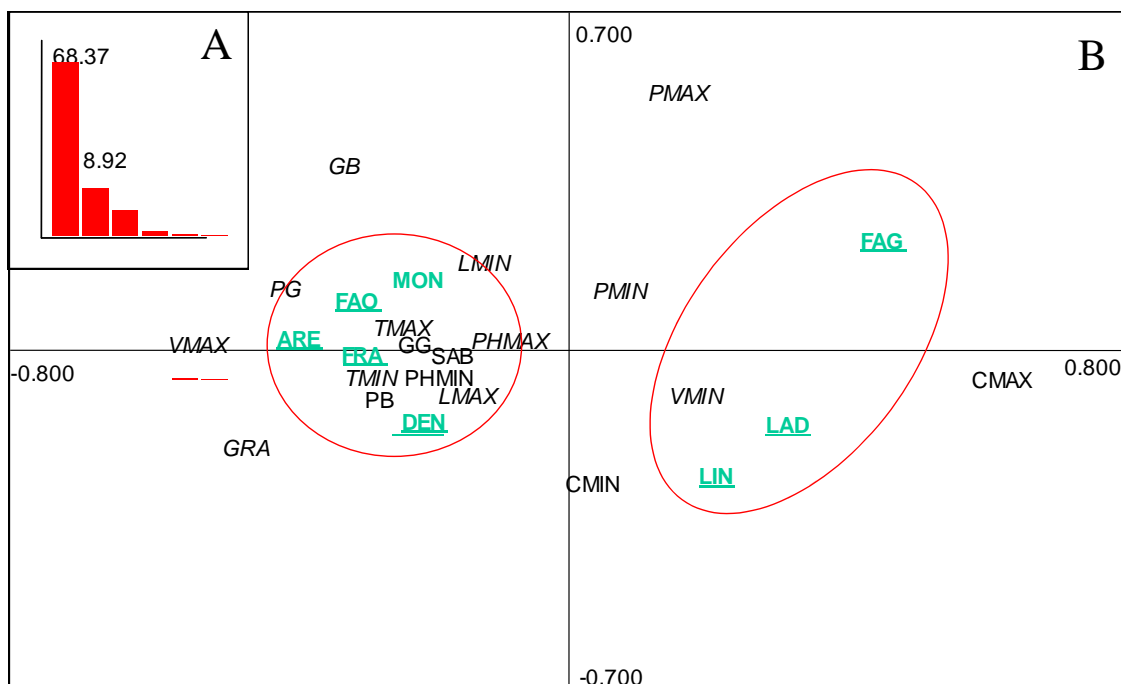


Figure 1. Analyse factorielle des correspondances effectuée sur les variables environnementales. (A) Inertie des axes, (B) Plan F1x2 de l'AFC. PMAX et PMIN : Profondeur maximale et minimale ; CMAX et CMIN : conductivité maximale et minimale ; VMAX et VMIN : vitesse maximale et minimale du courant ; TMAX et TMIN température maximale et minimale de l'eau ; LMAX et LMIN : largeur maximale et minimale du cours d'eau ; PHMIN et PHMAX: pH maximum et minimum ; GB, PB, GG, PG, GRA, SAB : pourcentage de gros blocs, petits blocs, gros galets, petits galets, graviers et sable.

L'inventaire faunistique (Tableau 1) montre que les huit sites présentent une faune benthique diversifiée. La classification des sites par une AFC montre que deux sites, LAD et FAG présentent un peuplement benthique distinct des 6 autres sites (Fig. 2). La comparaison de ces résultats avec ceux obtenus sur les caractéristiques abiotiques des sites montre que les différences faunistiques observées sont imputables aux caractéristiques environnementales des sites.

Tableau 1. Inventaire faunistique.

	Code	FAG	FAO	LAD	ARE	DEN	FRA	LIN	MON
PLATHELMINTHES									
Planariidae									
<i>Polycelis sp.</i>	Pol	x	x	x	x	x	x	x	x
Dendrocoelidae									
<i>Dendrocoelum sp.</i>	Den				x	x	x		x
NEMATHELMINTHES									
	Nea	x	x		x	x	x	x	x
ANNELIDES									
<u>Oligochètes</u>									
Haplotaxidae	Hap	x		x	x		x	x	
Tubificidae	Tub	x	x	x	x	x	x		x
Lumbriculidae	Lum	x	x	x	x	x	x	x	x
Naididae	Nai	x	x	x	x	x	x	x	x
Enchytraeidae	Enc	x	x	x	x	x	x	x	x
Lumbricidae	Lub	x	x		x	x	x	x	x
<u>Achètes</u>									
Erpobdellidae	Erp	x		x	x	x	x	x	x
<i>Erpobdella sp.</i>									
Glossiphoniidae									
<i>Haementeria costata</i>	Hae	x					x		
MOLLUSQUES									
<u>Gastéropodes</u>									
Hydrobiidae	Byt		x		x		x	x	x
<i>Bythinella sp.</i>									
Ancylidae	Anc					x	x	x	
<i>Ancylus fluviatilis</i>									
Planorbidae	Pla		x		x				
<u>Lamellibranches</u>									
Sphaeriidae	Pis		x				x		
<i>Pisidium sp.</i>									
CRUSTACES									
<u>Amphipodes</u>									
Gammaridae	Gam	x	x	x	x	x	x	x	x
<u>Isopodes</u>									
Asellidae	Pra			x	x	x			
<i>Proasellus sp.</i>									
Copépodes	Cop	x	x		x	x	x	x	x
HYDRACARIENS									
	Hya	x	x		x	x	x	x	x
INSECTES									
<u>Éphéméroptères</u>									
Leptophlebiidae	Hab	x			x	x	x	x	x
<i>Habroleptoides sp.</i>									
<i>Habrophlebia sp.</i>	Har	x					x		
Ephemerellidae									
<i>Ephemerella</i>	Eph	x			x		x		
Baetidae									
<i>Baetis sp.</i>	Bae	x	x	x	x	x	x	x	x
Heptageniidae									
<i>Heptagenia sp.</i>	Hep	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Ecdyonurus sp.</i>	Ecd	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Epeorus sp.</i>	Epe	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Rhithrogena sp.</i>	Rhi	x	x	x	x	x	x	x	x
<u>Plécoptères</u>									
Nemouridae	Prn	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Protonemura</i>									
<i>Amphinemura sp.</i>	Amp	x		x		x	x	x	
<i>Nemoura sp.</i>	Nem	x	x	x	x	x	x	x	x
Leuctridae									

<i>Leuctra sp.</i>	Leu	x	x	x	x	x	x	x	x
Capniidae									
<i>Capnionaura sp.</i>	Cap					x	x	x	
Chloperlidae									
<i>Chloroperla sp.</i>	Chl	x		x					
<i>Siphonoperla sp.</i>	Sip	x	x	x	x	x	x	x	x
Perlodidae									
<i>Perlodes sp.</i>	Per	x		x					x
<i>Isoperla sp.</i>	Iso	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Arcynopteryx compacta</i>	Arc	x			x		x		
Perlidae									
<i>Perla sp.</i>	Pel				x		x	x	x
<i>Dinocras sp.</i>	Din				x		x		x
Odonates									
Aeshnidae									
<i>Boyerla irene</i>	Boy	x	x	x					
Cordulegasteridae									
<i>Cordulegaster sp.</i>	Cor	x	x		x	x	x	x	x
Calopterygidae									
<i>Calopteryx sp.</i>	Cal					x	x		
Mégaloptères									
Scialidae									
<i>Sialis sp.</i>	Sia					x			
Coléoptères									
Dytiscidae									
<i>Hydraena sp.</i>	Hyd					x			
Elmidae									
<i>Oulimnius sp.</i>	Oul	x							
<i>Limnius sp.</i>	Lim	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Esolus sp.</i>	Eso	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Elmis sp.</i>	Elm	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Dupophilus sp.</i>	Dup						x		
Scirtidae									
<i>Elodes sp.</i>	Elo	x	x		x	x	x	x	x
<i>Cyphon sp.</i>	Cyp					x	x		x
<i>Microcara sp.</i>	Mic						x		
<i>Hydrocyphon sp.</i>	Hyc						x		
Trichoptères									
Philopotamidae									
<i>Philopotamus sp.</i>	Phi		x	x	x	x	x	x	x
Hydropsychidae									
<i>Diplectrona felix</i>	Dip	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Hydropsyche sp.</i>	Hyp	x		x	x	x	x	x	x
Polycentropodidae									
<i>Plectrocnemia sp.</i>	Ple	x	x		x	x	x	x	x
<i>Neureclipsis sp.</i>	Neu	x		x	x			x	x
Lepidostomatidae									
<i>Lepidostoma hirtum</i>	Lep			x					
<i>Crunoecia sp.</i>	Cru		x		x			x	
Psychomyiidae									
<i>Tinodes sp.</i>	Tin		x		x				x
Rhyacophilidae									
<i>Rhyacophila sp.</i>	Rhy	x	x	x	x	x	x		
Glossosomatidae									
<i>Glossosoma sp.</i>	Glo	x	x	x	x	x	x	x	x
sF. Agapetinae	Aga		x		x	x	x	x	x
Hydroptilidae									
<i>Ptilocolepus granulatus</i>	Pti				x	x	x		
Limnephilidae									
<i>Stenophylacini</i>	Ste	x	x	x	x	x	x	x	x

<i>Drusus sp.</i>	Dru		x		x	x	x	x	x
Goeridae									
<i>Silo sp., Lithax sp.</i>	Sil	x	x				x		
Brachycentridae									
<i>Micrasema sp.</i>	Mia	x			x		x		
Leptoceridae									
<i>Adicella sp.</i>	Adi						x		
<i>Oecetis sp.</i>	Oec		x						
Odontoceridae									
<i>Odontocerum albicorne</i>	Odo	x	x	x	x	x	x	x	x
Sericostomatidae									
<i>Sericostoma sp.</i>	Ser	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Notidobia sp.</i>	Not	x					x		
Diptères									
Dolichopodidae	Dol							x	
Stratimyidae	Str	x			x				
Psychodidae	Psy					x			x
Blephariceridae									
<i>Liponeura sp.</i>	Lip	x		x					
<i>Blepharicera sp.</i>	Bl				x		x		x
Dixidae									
<i>Dixa sp.</i>	Dix	x	x		x	x	x	x	
Simuliidae									
Tr. Simuliini	Sim	x	x	x	x	x	x	x	x
Tr. Prosimuliini	Pro	x		x	x	x	x	x	x
Thaumaleidae	Tha								x
Ceratopogonidae									
sF. Ceratopogoninae	Cer	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Atrichopogon sp.</i>	Atr	x	x				x		x
Chironomidae									
sF. Tanypodinae	Tan	x	x	x	x	x	x	x	x
Tr. Tanytarsini	Tay	x	x	x	x	x	x	x	x
Tr. Chironomini	Chi	x	x	x	x	x	x	x	x
sF. Orthocladiinae	Ort	x	x	x	x	x	x	x	x
Tipulidae	Tip	x		x		x	x	x	x
Limoniidae									
Tr. Limoniini	Lio			x				x	
Tr. Hexatomini	Hex	x	x		x	x	x	x	x
Tr. Eriopterini	Eri		x	x		x			x
Tr. Pedicini	Ped	x	x	x	x	x	x	x	x
Empididae									
sF. Clinocerinae	Cli	x	x	x	x	x	x	x	x
sF. Hemerodrominae	Hem	x			x	x	x	x	x
Rhagionidae									
<i>Chrysopilus sp.</i>	Chr			x		x	x	x	x
Athericidae									
<i>Atherix sp.</i>	Ath		x	x	x	x	x	x	
Tabanidae	Tab			x		x			

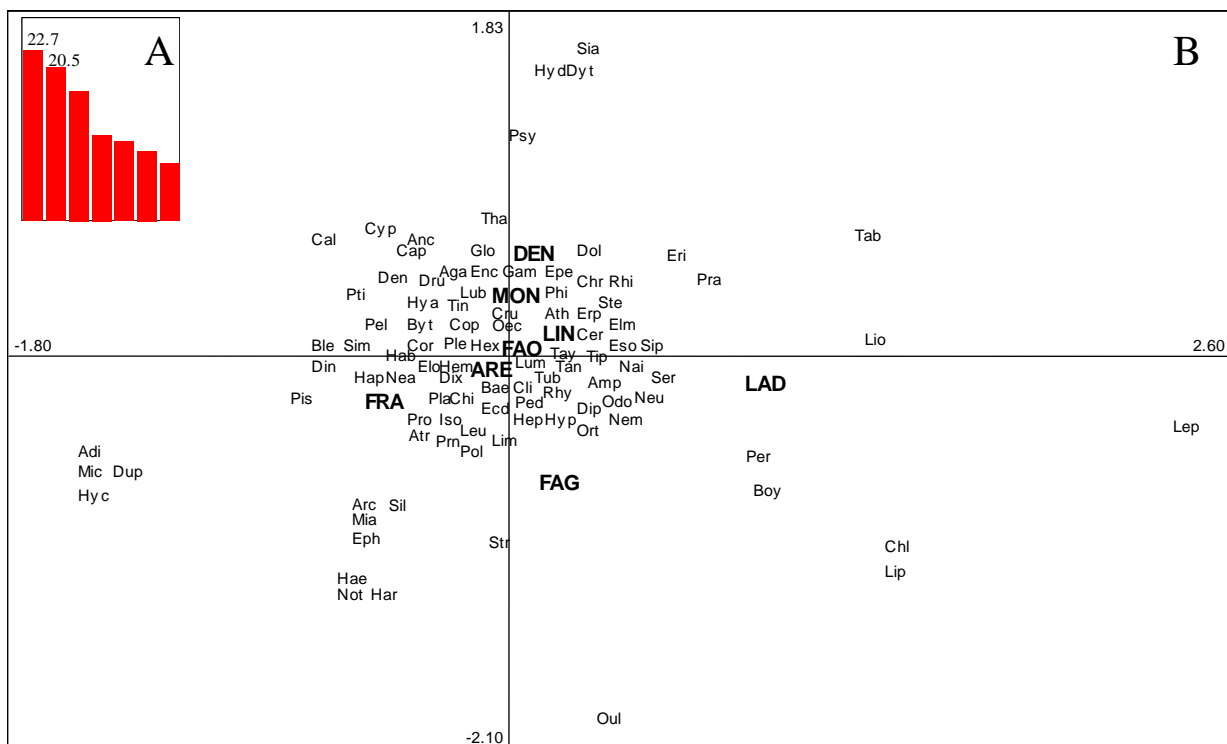


Figure 2. Analyse factorielle des correspondances effectuée sur la matrice présence/absence des espèces. (A) Inertie des axes, (B) Plan F1x2 de l'AFC. Le code utilisé pour chaque taxon est expliqué dans le Tableau 1.

Influence de la diversité spécifique des litières végétales

La figure 3 n'indique à première vue aucune relation entre l'abondance et la richesse des invertébrés benthiques et la richesse des litières végétales. Concernant la richesse des invertébrés, la richesse des litières et la présence de résineux n'affecte pas la richesse taxonomique des invertébrés (Fig. 3b), puisque aucune différence significative entre les stations n'a pu être détectée (test de Mann Whitney, $p = 0.818$). Concernant l'abondance des invertébrés, les résultats sont relativement hétérogènes en fonction des sites. Bien qu'aucune relation évidente ne soit observable entre diversité des litières et abondance des invertébrés, nous pouvons remarquer que les deux sites à résineux présentent une richesse invertébrée faible, et comparable au site MON où les litières végétales sont très peu diversifiées. De plus, si l'on fait abstraction des trois sites préalablement classifiés comme différents des autres d'un point de vue physico-chimique (LIN, FAG, LAD), nous pouvons observer une augmentation très nette, bien que non significative (test de Mann Whitney, $p > 0.05$), de l'abondance des invertébrés en fonction de la richesse végétale dans les sites présentant des litières uniquement composées de feuillus.

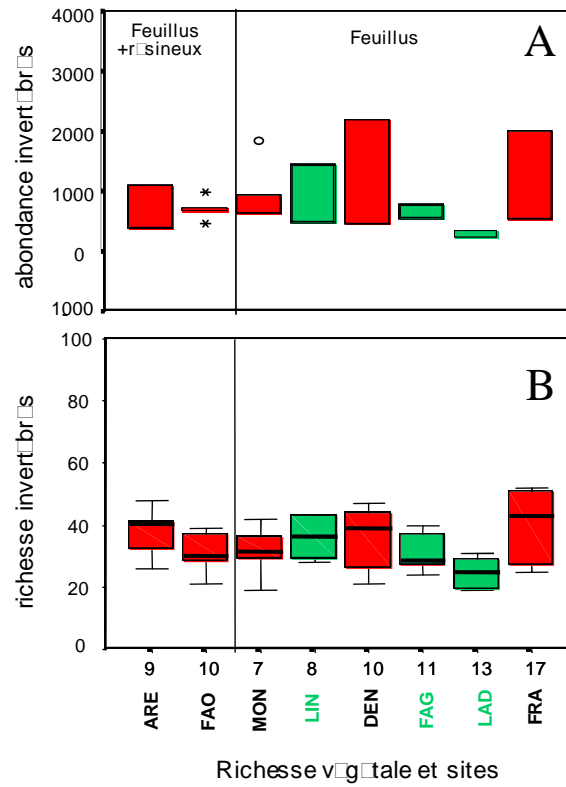


Figure 3. Box-plots représentant l'abondance et la richesse taxonomique des invertébrés benthiques en fonction de la richesse spécifique des litières végétales. Les sites comprenant des litières de résineux ont été séparés des sites dans lesquels les litières sont uniquement composées de feuillus. Les trois sites présentant des caractéristiques physico-chimiques distinctes des autres sites sont indiqués en vert. (A) Abondance, (B) Richesse taxonomique. Afin de comparer les différents assemblages taxonomiques en fonction de la diversité spécifique des litières végétales, nous avons procédé à la réalisation d'une carte SOM (Fig. 4a) et du dendrogramme correspondant (Fig. 4b) qui permet l'identification de clusters. Pour chaque station, les résultats faunistiques de toutes les campagnes ont été groupés afin d'obtenir un inventaire le plus complet possible du peuplement invertébré.

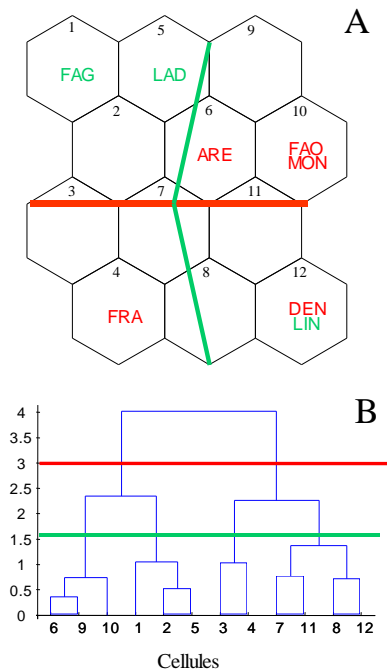


Figure 4. Distribution des sites sur une carte auto-organisée de Kohonen (A). Cette classification est obtenue par analyse de la composition faunistique des sites. (B) Classification hiérarchique (algorithme de Ward) des cellules de la carte permettant d'identifier des clusters sur cette représentation graphique. La frontière rouge correspond à une distance de Ward de 3 alors que la frontière verte correspond à une distance de 1,5. Les stations représentées en vert ou en rouge correspondent aux groupes de stations identifiées à partir des caractéristiques abiotiques des sites (cf. Fig. 1).

Le dendrogramme permet d'identifier 4 clusters sur la carte SOM. Les 4 clusters sont composés de la manière suivante :

- Groupe 1 : Absence de résineux, diversité spécifique moyenne des litières (11 à 13 espèces), (FAG, LAD)
- Groupe 2 : Présence de résineux et diversité spécifique des litières faible (8 à 10 espèces) + Absence de résineux et diversité spécifique des litières très faible (moins de 8 espèces), (ARE, FAO, MON)
- Groupe 3 : Absence de résineux, diversité spécifique des litières faible (8 à 10 espèces), (LIN, DEN).
- Groupe 4 : Absence de résineux, diversité spécifique des litières forte (> 15 espèces), (FRA).

Les stations à résineux et la station à feuillus MON qui présente la plus faible diversité végétale se situent dans un même cluster qui est proche du groupe FAG et LAD, stations à feuillus de richesse spécifique de 11 et 13 respectivement. Les deux derniers clusters sont formés par les stations LIN, DEN et FRA qui ont des richesses spécifiques des litières moyennes à fortes (respectivement 8, 10 et 17 espèces). La carte n'indique donc pas une

démarcation nette entre les stations à résineux et les stations à feuillus à forte diversité végétale. Cependant si l'on tient pas compte des stations FAG et LAD, ces deux stations semblent se différencier des autres stations à feuillus riches en litières par leurs caractéristiques physico-chimiques (Fig.1), et par conséquent également par leur composition faunistique (Fig. 2).

Diversité fonctionnelle et groupes trophiques

Les traits écologiques des genres rencontrés ont été sélectionnés selon la clé de Tachet et al. 2000 (version corrigée). La diversité fonctionnelle des macroinvertébrés benthiques est similaire pour tous les sites, nous constatons une dominance des broyeur et des collecteurs de sédiments fins qui représentent de 40 à 60% de la faune présente. Les racleurs de substrat sont également bien représentés (25 à 45 % de la faune) alors que les filtreurs sont peu représentés, tout comme les prédateurs qui représentent moins de 20% de la faune. Les filtreurs, en particulier, sont peu représentés et constituent toujours moins de 10% du peuplement (Fig. 5).

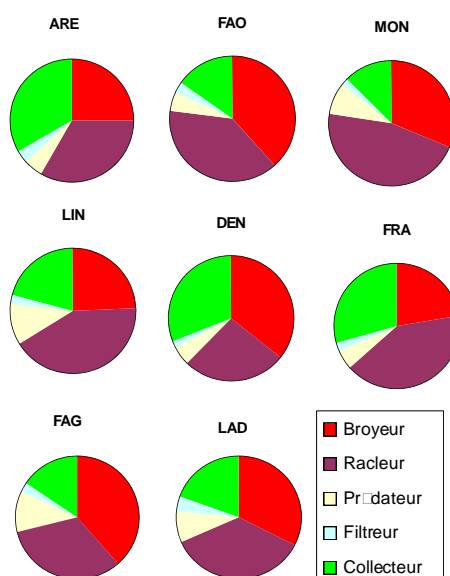


Figure 5. Diagramme en secteurs représentant la composition trophique des communautés invertébrés dans chaque site.

Afin d'affiner cette étude, nous nous sommes ensuite intéressés à la composition taxonomique des broyeurs et des collecteurs, qui consomment directement les litières végétales. Les résultats obtenus lors de la classification des sites par SOM (Fig. 6) révèlent une structuration des sites similaire à celle obtenue préalablement en considérant l'ensemble de la faune (Fig. 4). En effet, pour une distance de Ward de 2, les deux clusters identifiés sont identiques à ceux obtenus concernant l'analyse globale de la faune. Pour une distance inférieure (distance de 1), 4 clusters apparaissent. Cette structure diffère de celle obtenus pour la faune totale par l'inversion de seulement deux sites (ARE et LAD). Il n'existe donc pas de différence notable entre la structure obtenue en utilisant la faune totale, et cette analyse ne prenant en compte que les broyeurs et les collecteurs de particules fines. En termes de composition faunistique, les

stations à résineux et les stations à feuillus présentant une faible diversité de litières végétales (FAG, LAD et MON) sont semblables et s'opposent aux stations à diversité végétale plus forte.

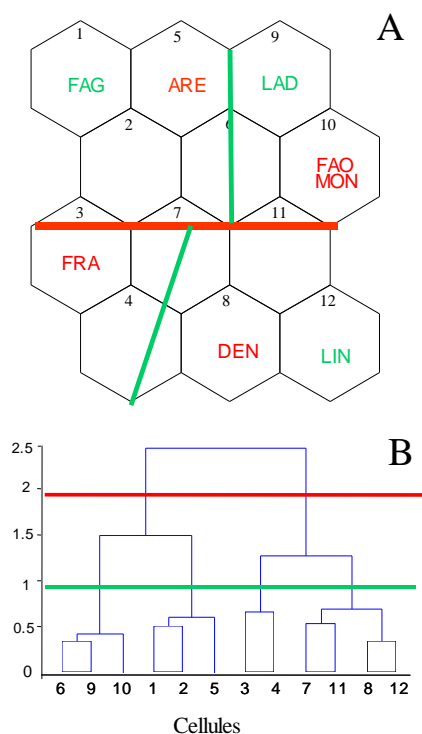


Figure 6. Distribution des sites sur une auto-organisée de Kohonen. Cette classification est obtenue par analyse de la composition faunistique des sites en broyeurs et collecteurs de particules fines (A). (B) Classification hiérarchique (algorithme de Ward) des cellules de la carte permettant d'identifier des clusters sur cette représentation graphique. La frontière rouge correspond à une distance de Ward de 2 alors que la frontière verte correspond à une distance de 1. Les stations représentées en vert ou en rouge correspondent aux groupes de stations identifiées à partir des caractéristiques abiotiques des sites (cf. Fig. 1).

Discussion

Comme le soulignent Wallace et Webster (1996), les macroinvertébrés peuvent avoir une influence déterminante sur le cycle des nutriments, la productivité primaire, la décomposition et le transport des matériaux. Ils sont reconnus pour être d'excellents témoins de la qualité des habitats, d'où leur utilisation de plus en plus fréquente dans différents types d'indices biotiques (Tachet et al., 2000). Leur rôle au sein de l'écosystème aquatique, ainsi que leur sensibilité aux conditions du milieu en font donc un intégrateur fiable du fonctionnement des milieux aquatiques. Cependant, la distribution des invertébrés dans les cours d'eau est largement dépendante de la biogéographie et des caractéristiques spécifiques de l'habitat (Hawkins & Anderson 1982, Malmqvist & Hoffsten 2000, Wiggins & Mackay, 1978, Danks, 1979). Ainsi, comme le montre la Figure 1, les cours d'eau sélectionnés, bien que globalement comparables en termes d'altitude ou de numéro d'ordre, présentent des différences notables concernant la conductivité de l'eau ou la vitesse du courant. Cette dernière variable joue un rôle particulièrement important dans la structuration des communautés invertébrés benthiques

(Fig. 2), puisque elle conditionnera les habitats disponibles pour ces organismes et sélectionnera des espèces adaptées (Allan 1996). La prise en compte de deux groupes de sites distincts d'un point de vue environnemental permet donc de déterminer si la nature des litières exerce une influence prépondérante sur la biodiversité de la faune benthique, ou si cette influence est négligeable face à l'hétérogénéité naturelle de l'habitat.

En effet, l'influence de la diversité des litières sur les communautés de macroinvertébrés benthiques ont jusqu'à présent été abordées par l'étude de situations extrêmes ou très contrastées (par exemple les monocultures ou le remplacement total d'essences d'arbres existantes par une essence très différente). Il s'agit par exemple de l'influence de plantations de conifères, induisant une décroissance de l'abondance des peuplements invertébrés comparée aux zones où la végétation riveraine est composée de feuillus (Weatherley et al. 1992). De même, Whiles & Wallace (1997) indiquent que la conversion d'une forêt de feuillus en monoculture de pins influence la composition taxonomique des invertébrés benthiques. Ces différences sont probablement imputables à la qualité des litières disponibles qui constituent la nourriture de nombreuses espèces de macroinvertébrés (broyeurs et collecteurs en particulier) (Irons et al. 1988 ; Richardson, 1992 ; Parkyn & Winterbourn 1997). Au contraire, les travaux présentés ici concernent l'influence d'une modification, parfois minime, de la diversité de la végétation riveraine liée à la présence d'arbres d'essences indigènes ou exotiques aux côtés de l'espèce dominante. Ces situations se rencontrent fréquemment dans la nature mais n'ont pas fait l'objet d'études spécifiques. Dans ce cadre, il est donc particulièrement important de déterminer l'influence des caractéristiques abiotiques du cours d'eau face à la richesse des litières végétales.

Concernant l'abondance des macroinvertébrés benthiques, la prise en compte des 6 stations présentant des caractéristiques environnementales similaires (ARE, FAO, MON, DEN, FRA) tend à montrer que la présence de résineux affecte négativement l'abondance des peuplements d'invertébrés benthiques (Fig. 3) comme l'ont déjà souligné Whiles & Wallace (1997), Weatherley et al. (1993) et Harding & Winterbourn (1995). En effet, l'abondance des macroinvertébrés benthiques en présence de résineux est comparable à celle observée dans des sites exclusivement composés de feuillus mais avec une richesse taxonomique faible de litières (MON par exemple). Au contraire, sous une forêt de feuillus plus diversifiée, l'abondance des macroinvertébrés tend à s'accroître (DEN, FRA). Cependant, ces conclusions doivent être tempérées par la prise en compte du second groupe de sites (LIN, FAG, LAD), montrant que les caractéristiques environnementales abiotiques exercent un effet prépondérant sur l'abondance des invertébrés benthiques. En effet, les sites FAG et LAD, bien que présentant une diversité végétale forte sous couvert de feuillus, présentent une abondance faible de macroinvertébrés, comparable à celle observée en présence de conifères. Il faut néanmoins préciser que les sites considérés présentent tous des formations végétales plurispécifiques avec une forte composante naturelle. Ces résultats ne sont donc naturellement pas extrapolables à des plantations monospécifiques.

Concernant la richesse taxonomique, aucune opposition nette entre feuillus et résineux n'a été observée, ni de relation entre diversité des litières et diversité des macroinvertébrés. Bien que de nombreux auteurs aient observé une relation importante entre richesse végétale et richesse faunistique dans le cas de modifications drastiques de la végétation riveraine (Molles, 1982 ; Winterbourn & Rouinick, 1985 ; Weatherley et al. 1993 ; Harding & Winterbourn 1995 ; Whiles & Wallace, 1997), ceci ne s'applique pas dans le cas présent, probablement à cause de la relative similarité des sites en termes de litières végétales.

La prise en compte de la composition taxonomique des invertébrés des sites similaires d'un point de vue abiotique (ARE, FAO, MON, FRA, DEN) montre que la présence de résineux ou d'un couvert de feuillus faiblement diversifié conduisent à une composition faunistique comparable, qui s'oppose nettement à celle des zones à feuillus plus diversifiées (Fig. 4). Cependant ces résultats doivent encore une fois être tempérés par la prise en compte des stations FAG, LAD et LIN, qui diffèrent d'un point de vue abiotique. Dans ce cas, la structure préalablement obtenue n'est plus valable, puisque les deux stations diversifiées (en termes de litières) s'associent aux stations peu diversifiées ou avec résineux. Ainsi, comme pour l'abondance, nous pouvons penser que la structure physique de l'habitat exerce un effet prépondérant à la richesse des litières sur la composition taxonomique des sites.

La prise en compte de la diversité fonctionnelle des invertébrés révèle la présence de différents groupes trophiques. Les 5 groupes principaux, broyeurs, racleurs, prédateurs, filtreurs et collecteurs sont représentés dans tous les sites et la proportion de chaque groupe trophique est comparable entre les sites ; il n'existe donc pas de différence notable de diversité fonctionnelle entre les différents sites. Cependant, la diversité fonctionnelle observée n'est pas en accord avec le concept de continuum fluvial (Vannote et al., 1980), qui prédit une dominance des broyeurs dans les cours d'eau de tête de bassin. Nos résultats vont plutôt dans le sens de ceux obtenus par Stockley et al. (1998), qui soutient que les broyeurs ont un rôle limité dans ce type de cours d'eau, face aux racleurs qui consomment le biofilm se développant sur les litières. Ainsi, les processus de décomposition des litières seraient essentiellement dépendants de l'activité du biofilm bactérien et fongique plutôt que de l'activité des invertébrés broyeurs, et un changement au point de vue des apports de litières ne serait pas forcément source de modification de la richesse ou de l'abondance des communautés de broyeurs (Casas et al. 2000). Ceci expliquerait la faiblesse des relations observées entre faune benthique et richesse des litières, puisque les invertébrés seraient plus dépendants du biofilm que de la nature des litières végétales.

De manière à tester cette hypothèse, nous avons classifié les sites à l'aide des broyeurs et des collecteurs. La carte SOM obtenue est similaire à celle obtenue pour l'ensemble de la faune (Fig. 6), ce qui confirme bien l'influence prépondérante des conditions abiotiques face à la richesse des litières végétales. Il semble donc que la faune benthique, y compris les invertébrés directement dépendants des litières végétales soit peu influencés par la richesse des litières.

Ainsi, l'hypothèse qu'une plus grande diversité de la ripisylve accroît la biodiversité des peuplements d'invertébrés aquatiques ne peut être validée car l'impact des paramètres physico-chimiques semble prépondérant face à l'influence de la richesse des litières. En accord avec Laitung et al. (2002), il semble que comparés aux hyphomycètes aquatiques, les macroinvertébrés benthiques soient nettement moins sensibles à la nature des litières. Ces différences entre hyphomycètes et invertébrés benthiques peuvent s'expliquer par une plus grande dépendance des invertébrés vis-à-vis de l'habitat physique, puisque ces derniers sont des animaux mobiles réalisant un choix actif de leur habitat. Il apparaît donc logique, qu'au même titre que les ressources alimentaires (qui peuvent, pour certains être représentées par les litières), l'habitat physique joue un rôle important dans la distribution spatiale des invertébrés. Ce phénomène rend donc particulièrement délicate l'analyse, en milieu naturel, de l'influence des litières forestières sur la biodiversité des invertébrés benthiques. Ceci démonte que la faune benthique est peu affectée par des modifications mineures de la structure végétale et ne s'avère donc pas un indicateur fiable de ce type de changements.

Références

- Allan, J.D. 1995. Stream ecology : structure and function of running waters. London, Chapman & Hall. 338p.
- Brosse, S., Giraudel, J.L., Lek, S., 2001. Utilisation of non-supervised neural networks and principal component analysis to study fish assemblages. *Ecol. Model.* **146**, 159-166.
- Cailleux, A, 1954. Limites dimensionnelles des noms des fractions granulométriques. *Bulletin de la Société géologique Française*. **4**: 643-646.
- Casas, J. J., Zamora-Munoz C., Archilla F. & Alba-Tercedor J., 2000. The effect of a headwater dam on the use of leaf bags by invertebrate communities. *Regul. Rivers: research and management* **16**: 577- 591.
- Danks, H., 1979. Canada and its insect fauna. *Memoirs of the Entomological Society of Canada* **108**.
- Harding, J. S. & Winterbourn M., 1995. Effects of contrasting land use on physico-chemical conditions and benthic assemblages of streams in a Canterbury (South Island, New Zealand) river system. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* **29**: 479-492.
- Hawkins, C. P. M. & Anderson, N.H., 1982. Effects of canopy, substrate composition, and gradient on the structure of macroinvertebrate communities in Cascade Range streams of Oregon. *Ecology* **63**: 1840-1856.
- Irons, J.G., Oswood, M.W. & Bryant, J.P., 1988. Consumption of leaf detritus by a stream shredder: influence of tree species and nutrient status. *Hydrobiologia* **160**: 53-61.
- Jongman R.H.G., Ter Braak C.J.F. & Van Tongeren O.F.R., 1995. Data analysis in community and landscape ecology. Cambridge University Press, England.
- Kohonen, T., 1995. Self-organizing maps. Springer-Verlag.
- Laitung, B., J. L. Pretty, Chauvet E. & Dobson M., 2002. Responses of aquatic hyphomycete communities to enhanced stream retention in areas impacted by commercial forestry. *Freshwater Biology* **47**: 313-323.
- Lek, S. & Guegan, J. F. (eds.) 2000. Artificial neuronal networks: Application to ecology and evolution. Springer, Berlin.
- Malmqvist, B. & Hoffsten P., 2000. Macroinvertebrate taxonomic richness, community structure and nestedness in Swedish streams. *Arch. Hydrobiol.* **150**: 29-54.
- Molles, M.C., 1982. Tricopteran communities of streams associated with aspen and conifer forest: long-term structural change. *Ecology*, **63**: 1-6.
- Parkyn, S.M. & Winterbourn, M.J., 1997. Leaf breakdown and colonisation by invertebrates in a headwater stream: comparisons of native and introduced tree species. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, **31**: 301-312.
- Richardson, J.S., 1992. Food, microhabitat, or both? Macroinvertebrate use of leaf accumulations in a montane stream. *Freshwater Biology*. **27**: 169-176.
- Stockley, R.A., Oxford, T.S. & Ormond, R.F.G., 1998. Do invertebrates matter? Detrital processing in the River Swale-Ouse. *Science of the Total Environment*, **210/211**: 427-435.
- Surber, E.W., 1937. Rainbow trout and bottom fauna production in one mile of stream. *Trans. Am. Fish. Soc.* **66** : 193-202.
- Tachet, H., Richoux, P., Bournaud, M. & Usseglio-Polatera, P., 2000. Invertébrés d'eau douce – Systématique, Biologie, écologie. CNRS Editions, 588 pages.
- Vannote, R.L., Minshall, G.W., Cummins, K.W., Sedell, J.R. & Cushing, C.E., 1980. The river continuum concept. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **37**: 130-137.

- Wallace, J.B. & Webster, J.R., 1996. The role of macroinvertebrates in stream ecosystem function. *Ann. Rev. Entomol.*, **41**: 115-39.
- Weatherley, N.S., Lloyd, E.C., Rundle, S.D. & Ormerod, S.J., 1993. Management of conifer plantations for the conservation of stream macroinvertebrates. *Biol. Conserv.* **63**, 171-176.
- Whiles, M.R. & Wallace, J.B., 1997. Leaf litter decomposition and macroinvertebrate communities in headwater streams draining pine and hardwood catchments. *Hydrobiologia* **353**: 107-119.
- Wiggins, G. B. & Mackay, R.E., 1978. Some relationships between systematics and trophic ecology in nearctic aquatic insects, with special reference to Trichoptera. *Ecology* **59**: 1211-1220.
- Winterbourn, M.J. & Rounick, J.S., 1985. Benthic faunas and food resources of insects in small New Zealand streams subjected to different forestry practices. *Verh. Int Ver. Limnol*, **22**, 2148-2152.

Chap. 4 : Effet de la diversité forestière sur la décomposition des litières

Introduction

La relation entre les écosystèmes terrestres et les écosystèmes aquatiques a été démontrée et discutée à de multiples reprises (*e.g.* Wallace *et al.*, 1997). La végétation riveraine, notamment en tant que source de matières et d'énergie, joue un rôle clé dans le fonctionnement trophique des cours d'eau forestiers (Gregory *et al.*, 1991). Ainsi, la structure et la dynamique des communautés d'hyphomycètes aquatiques (Fabre, 1996) et des assemblages et des populations de macroinvertébrés décheteteurs (Cummins *et al.*, 1989 ; Stevens et Cummins, 1999) sont déterminées par la qualité, la quantité et la disponibilité des particules allochtones. Or ces organismes contribuent fortement aux processus de décomposition des litières (Hieber et Gessner, 2002).

Plusieurs études ont déjà abordées l'influence du type de végétation traversée sur l'efficacité du recyclage de la matière organique allochtone (*e.g.* Webster et Waide, 1982 ; Pozo *et al.*, 1998), sans pour autant considérer séparément le facteur diversité des litières. Dans tous les cas, il s'agit de modifications drastiques des communautés végétales engendrées par la déforestation ou la plantation d'espèces exotiques. Puisque les bassins versant comparés ne supportent pas le même type de végétation, l'effet potentiel de la diversité est confondu dans l'effet de l'identité spécifique des litières.

Au contraire notre étude se distingue en cherchant à isoler l'effet de la diversité. Les bassins versant sélectionnés sont couverts d'une végétation native dominée par le hêtre et ne diffèrent que par la présence d'espèces natives complémentaires sur nos stations de référence. Nous posons donc l'hypothèse selon laquelle la diversité de la végétation implantée au bord des cours d'eau agit sur le recyclage des litières qu'elle produit.

Matériel et méthodes

Site d'étude

Nous avons sélectionné 10 cours d'eau de tête de bassin, d'ordre 1 à 2 (Strähler, 1949), qui drainent les massifs forestiers de la Montagne Noire. Les bassins versant sont quasi-exclusivement boisés et sont morphologiquement similaires. Ils ne diffèrent entre eux que par la diversité des litières qui alimentent les cours d'eau. Cinq d'entre eux ont été choisis pour les forêts riches en essence qui les couvrent. Les cinq autres sont caractérisés par une forte dominance de hêtre, issue d'une gestion forestière intensive. Les vallées du Linon, de la

Prune, du Lestrèpe et du Rieusoul sont entièrement couvertes de hêtraies pures. En revanche, le bassin du Bernazobre est composé dans sa partie supérieure de forêts mixtes, malgré la forte contribution des hêtraies pures à l'apport de litière au cours d'eau dans le secteur étudié.

Table 1. Caractéristiques physiques des cours d'eau étudiés.

Cours d'eau	Type de forêt	Altitude de la station (m)	Distance à la source (km)	Pente moyenne (m/m)	Surface BV (km ²)	Ordre
Montaud	Mixte	720	0,7	0,11	0,4	1
Bergnassonne	Mixte	750	1,0	0,05	0,7	1
Fraissègne	Mixte	800	1,1	0,05	1,4	2
Ladoux	Mixte	680	1,0	0,20	0,5	1
Oréval	Mixte	500	2,3	0,25	2,3	2
Bernazobre	Hêtraie (+Mixte)	580	1,1	0,13	1,2	2
Lestrèpe	Hêtraie	800	0,9	0,08	1,1	2
Linon	Hêtraie	710	1,2	0,05	0,7	2
Prune	Hêtraie	500	0,8	0,19	0,6	1
Rieusoul	Hêtraie	720	1,1	0,13	0,9	2

Physico-chimie de l'eau

Des échantillons d'eau sont régulièrement prélevés durant la période d'exposition afin de caractériser les eaux. La température est mesurée automatiquement toutes les deux heures grâce à un enregistreur préalablement introduit dans chaque cours d'eau. Les paramètres pH et conductivité sont mesurés sur le terrain à l'aide d'appareil portatif. L'alcalinité, les teneurs en nitrate, nitrite, ammoniac et orthophosphate sont déterminées au laboratoire sur de l'eau filtrée sur filtre en fibre de verre Whatman GF/F *in situ* selon les techniques standards d'analyse (Rodier, 1996).

Décomposition des litières

L'intégrité fonctionnelle des cours d'eau est évaluée au travers de la vitesse de décomposition des litières. Des feuilles d'aulne (*Alnus glutinosa*) et de chêne pédonculé (*Quercus robur*), collectées juste après l'abscission et séchées à l'air ambiante, sont introduites dans des filets fermés à grosses mailles (10mm) et à fines mailles (0,5 mm) par lots de 5 grammes ($\pm 0,05$ grammes : la masse exacte est notée). Ces espèces contrastées diffèrent fortement par leur vitesse de décomposition : la première se décompose rapidement et la seconde très lentement. Selon le type de mailles, on mesure soit la vitesse de décomposition réelle résultante de l'ensemble des processus physiques et biologiques (grosse maille), soit la vitesse de décomposition liée à l'activité microbienne (fine maille).

Les dix cours d'eau reçoivent chacun 6 filets de chaque type de maille et de chaque espèce (2 espèces * 2 mailles * 6 réplicats = 24 filets). Une seule date de prélèvement est programmée

par espèce. Les filets ont été immergés dans les cours d'eau le 11 décembre 2002, maintenus en place grâce à des barres métalliques ancrées dans le substrat. Les filets d'aulne ont été relevés le 16 et 17 janvier 2003 (soit 36 et 37 jours après l'immersion) et les filets de chêne le 26 et 27 février 2003 (soit 77 et 78 jours après l'immersion).

Des filets supplémentaires ont été ajoutés à un cours d'eau représentatif de chacun des types de végétation riveraine. Il s'agit de Fraissègne (forêt mixte) et de Linon (hêtraie pure). L'objectif est d'affiner la description de la cinétique de décomposition à partir de 4 dates de prélèvement. La première date a été fixée à 7 jours pour l'aulne et 14 jours pour le chêne. Les suivantes ont été déterminées *a posteriori* afin d'obtenir une bonne répartition des points sur la courbe de décomposition. Pour chaque espèce, 4 filets grosses mailles et 4 filets fines mailles sont prélevés par cours d'eau.

Au laboratoire, les litières sont délicatement lavées à l'eau du robinet, mises à sécher à 105°C durant 48h et pesées à 0,01 gramme près. On détermine la teneur en cendre d'un aliquote de chaque échantillon, préalablement broyé (microbroyeur Culatti), après un passage au four à moufle à 550°C pendant 4 heures.

Analyses des données

La vitesse de décomposition déterminée à partir d'une seule date est calculée de la manière suivante pour chaque filet :

$$k_{ij} = - \ln(\% \text{restant}) / t$$

k_{ij} = vitesse de décomposition dans le filet j du cours d'eau i en jours⁻¹ ou degré.jour⁻¹

%restant = masse de litière non décomposé rapportée à la masse initiale

t = durée de l'expérience en jours ou en degré.jours

La vitesse moyenne de décomposition k_i pour une espèce dans un type de filet dans un cours d'eau est calculée comme la moyenne des 6 répliques. Une ANOVA à un facteur permet de comparer les cours d'eau et le test de Mann-Whitney sur les moyennes permet de tester l'influence du type de forêt traversée d'eau sur le recyclage de la matière organique.

La vitesse de décomposition pour les cours d'eau Fraissègne et Linon qui ont été échantillonnés sur plusieurs dates est également déterminée par régression non linéaire (Chauvet, 1987). On utilise une ANCOVA après transformation logarithmique des masses restante pour comparer les vitesses entre les cours d'eau.

Résultats

Physico-chimie

Les résultats des analyses physico-chimiques témoignent de la très bonne qualité générale des eaux (Tableau 2). Les teneurs en nitrate restent néanmoins anormalement élevées et varient considérablement entre les cours d'eau. Les eaux, naturellement acide à neutre, sont faiblement tamponnées à l'exception de deux cours d'eau (Linon et Prune).

Tableau 2. Paramètres physico-chimiques mesurés pendant l'étude de décomposition (moyenne \pm écart-type pour n=3)

Cours d'eau	°C.jours		Température °C	pH	Conductivité $\mu\text{S}/\text{cm}$	Alcalinité $\text{mg CaCO}_3/\text{L}$	P-PO ₄ $(\mu\text{g}/\text{L})$	N-NH ₄ $(\mu\text{g}/\text{L})$	N-NO ₃ $(\mu\text{g}/\text{L})$	N-NO ₂ $(\mu\text{g}/\text{L})$
	Aulne	Chêne								
Bergnassonne	293.9	576.5	7.4	6.5	33.3	4.9	1.9	9.4	1064	0.4
(\pm ET)	-	-	1.6	0.6	0.6	4.8	1.0	8.1	78	0.3
Fraissègne	268.0	496.5	6.5	6.5	41.0	7.3	3.1	16.9	1160	0.9
(\pm ET)	-	-	1.4	0.6	1.7	0.8	3.1	4.0	140	1.0
Ladoux	300.9	607.4	7.8	6.3	37.8	2.5	2.9	12.9	1803	0.5
(\pm ET)	-	-	1.8	0.6	1.0	3.2	3.2	13.2	25	0.4
Montaud	281.0	539.9	7.1	6.3	41.7	3.5	2.0	12.1	1151	0.5
(\pm ET)	-	-	1.5	0.6	16.8	2.3	2.1	16.5	29	0.4
Oréval	264.1	497.2	6.5	6.4	61.7	7.0	2.5	11.3	1737	0.8
(\pm ET)	-	-	2.1	0.6	0.6	0.4	1.8	13.9	76	0.7
Bernazobre	300.6	594.9	7.8	6.8	66.0	22.1	4.9	7.8	1034	3.5
(\pm ET)	-	-	1.2	0.8	6.2	5.6	4.7	3.9	6	5.9
Lestrèpe	326.7	650.6	8.3	5.8	27.0	1.0	1.6	18.8	467	0.3
(\pm ET)	-	-	1.1	0.3	1.7	0.4	1.5	8.1	57	0.2
Linon	313.6	597.0	7.8	6.7	75.3	28.8	4.0	10.6	395	0.3
(\pm ET)	-	-	1.2	0.6	6.1	1.4	0.9	3.9	25	0.2
Prune	327.6	655.9	8.6	7.3	210.0	68.9	3.9	9.7	2239	0.8
(\pm ET)	-	-	1.0	1.1	10.0	2.3	3.2	5.1	15	0.5
Rieusoul	326.7	650.6	8.3	5.7	29.8	0.9	1.7	10.4	631	0.3
(\pm ET)	-	-	1.1	0.4	0.8	0.7	2.6	4.8	38	0.3

Vitesse de décomposition

Les taux de décomposition moyens de l'aulne calculés sur une date varient entre 0,0309 et 0,1611 jours⁻¹ dans les filets grosse maille et 0,0109 et 0,0173 jours⁻¹ dans les filets fines mailles. Ceux du chêne sont compris entre 0,0032 et 0,0627 jours⁻¹ dans les filets grosse maille et 0,0022 et 0,0062 dans les filets à fine maille. Des valeurs sensiblement différentes sont obtenues pour les cours d'eau Linon et Fraissègne lorsque le calcul de k utilise plusieurs dates. Ceci est vraisemblablement dû à des modes de calcul différents. Toutefois, les résultats des comparaisons restent similaires.

L'effet de la diversité des forêts riveraines n'est significatif que si l'on considère le chêne dans les filets grosses mailles, et à condition de ne pas tenir compte du cours d'eau Bernazobre (test U : p = 0,031746 (jours⁻¹) et p = 0,015873 (°C.jours⁻¹)) ou bien de le considérer comme un site

de référence (test U : $p = 0,019048$ (jours⁻¹) et $p = 0,009524$ (°C.jours⁻¹)). Dans tous les autres cas, aucune différence significative n'est observée.

L'effet cours d'eau est quant à lui toujours présent quel que soit l'espèce ou la maille considérée (ANOVA : $p < 0,05$). Les facteurs abiotiques contribuent à expliquer pour une part importante ces variations (Tableau 4). Toutefois, la hiérarchie entre les sites change considérablement selon l'espèce considérée dans les filets à grosses mailles (e.g. : k Bernazobre < k Prune pour l'aulne ; k Bernazobre > k Prune pour le chêne).

Tableau 3. Vitesse de décomposition par cours d'eau déterminé sur 4 dates par régression non-linéaire (IC = intervalle de confiance ; * groupe homogène déterminée par ANCOVA). Maille grosse (C) et fine (F). A : aulne ; B : chêne.

Cours d'eau	Maille	Espèces	unité	k	$k + IC95\%$	$k - IC95\%$	r^2	*
Linon	C	A	Jours ⁻¹	0,04765	0,05299	0,04231	0,9826	a
Fraissègne	C	A	Jours ⁻¹	0,04489	0,05085	0,03893	0,9751	a
Linon	F	A	Jours ⁻¹	0,01400	0,01636	0,01165	0,7954	b
Fraissègne	F	A	Jours ⁻¹	0,01392	0,01652	0,01131	0,8101	b
Linon	C	O	Jours ⁻¹	0,01534	0,01793	0,01275	0,8863	a
Fraissègne	C	O	Jours ⁻¹	0,01315	0,01671	0,00959	0,7606	a
Linon	F	O	Jours ⁻¹	0,00461	0,00505	0,00418	0,9087	b
Fraissègne	F	O	Jours ⁻¹	0,00410	0,00459	0,00361	0,8725	b
Linon	C	A	degree.jours ⁻¹	0,00555	0,00623	0,00487	0,9782	A
Fraissègne	C	A	degree.jours ⁻¹	0,00611	0,00699	0,00523	0,9685	A
Linon	F	A	degree.jours ⁻¹	0,00171	0,00198	0,00145	0,8189	B
Fraissègne	F	A	degree.jours ⁻¹	0,00200	0,00235	0,00164	0,8249	B
Linon	C	O	degree.jours ⁻¹	0,00189	0,00223	0,00155	0,8687	A
Fraissègne	C	O	degree.jours ⁻¹	0,00191	0,00246	0,00137	0,7309	A
Linon	F	O	degree.jours ⁻¹	0,00058	0,00063	0,00053	0,9245	B
Fraissègne	F	O	degree.jours ⁻¹	0,00061	0,00068	0,00053	0,8593	B

Table 4. Corrélation de Spearman entre les vitesses de décomposition (k) et les paramètres abiotiques. Seules les corrélations significatives au seuil de 5% sont conservées.

k	Aulne GM	Aulne FM	Chêne GM	Chêne FM	Aulne GM	Aulne FM	Chêne GM	Chêne FM
unité	jours ⁻¹	jours ⁻¹	jours ⁻¹	jours ⁻¹	°C.jours ⁻¹	°C.jours ⁻¹	°C.jours ⁻¹	°C.jours ⁻¹
Température	0,6687				0,6687			
pH		0,7939		0,903 0		0,7333		0,8667
Conductivité		0,9273				0,7818		
Alcalinité		0,8424		0,806 1		0,7697		0,8061
Orthophosphate		0,8303		0,745 5		0,7091		0,7091
Ammoniac								
Nitrate								
Nitrite								
Altitude		- 0,7340						
Distance à la source	- 0,6339				-0,6339			
Pente								
Surface bassin	- 0,7295				-0,7295			

Discussion

A la lumière de nos résultats, il apparaît que les réseaux trophiques détritiques sont contrôlés par la richesse des essences riveraines comme le suggère Zimmer (2002) dont les observations portent sur le milieu terrestre forestier. Ici, la décomposition du chêne est ralentie au sein des cours d'eau traversant intégralement des hêtraies pures. Le cas du ruisseau Bernazobre, qui ne reçoit que ponctuellement des litières de hêtre, souligne la difficulté de l'étude des milieux lotiques. En effet, il semble que le transport de l'énergie en provenance du cours amont, où les forêts sont riches en essences, suffit à compenser l'effet localisé des hêtraies pures. D'après nous, il est indispensable de considérer l'effet végétation à l'échelle du bassin versant et non du tronçon dans le cadre d'étude du fonctionnement trophique des cours d'eau. C'est la raison pour laquelle le choix de station localisées sur des cours d'eau d'ordre 1 s'avérait judicieux, même si un contrôle absolu des apports de litière depuis la source se révèle impossible.

Si l'on se réfère à l'étude de Cuffney *et al.* (1990), il est vraisemblable que l'activité des invertébrés déchetiers contribue fortement à ce résultat puisque ce phénomène n'est observé que dans des filets à grosse maille. Les feuilles de hêtre étant d'une qualité nutritionnelle médiocre (Gessner et Chauvet, 1994), la productivité secondaire des cours d'eau ne recevant que cette ressource est supposée inférieure aux autres ; les résultats du chapitre précédent montrent que ce principe doit toutefois être modulé. Cette hypothèse rejoint les observations de Griffith et Perry (1991) qui montrent que la décomposition de l'érable sucrier

(*Acer saccharum*) est plus rapide dans un cours d'eau alimenté par des litières rapidement décomposables (donc de plus grande qualité) que dans une rivière de référence dont la végétation produit des litières de moindre qualité. D'ailleurs, ces auteurs associent ce résultat à la densité d'invertébrés déchetisseurs qui est plus importante dans le premier cours d'eau. De la même manière, nous pourrions tenter d'expliquer pourquoi les filets garnis d'aulne ne présentent pas une tendance similaire. En effet, ces litières constituent une ressource nutritive de grande qualité que les broyeurs sélectionneront de préférence, d'où une compensation de leur plus faible densité dans les cours d'eau de hêtraie.

Si l'effet diversité de la ripisylve peut être mis en relation avec la qualité des litières qu'elle produit, des effets indirects potentiels sont susceptibles de s'ajouter. En effet, nous montrons que d'autres facteurs biotiques et abiotiques contrôlent la vitesse de décomposition (Tableau 4). En premier lieu, le pH, ses facteurs covariants (alcalinité, conductivité), et les orthophosphates modulent l'activité microbienne (Thompson et Baërlocher, 1989 ; Grattan et Suberkropp, 2001). Certains couverts forestiers sont connus pour favoriser l'acidification des sols et des eaux. Toutefois, il semble que ce ne soit pas le cas des hêtraies pures. La prise en compte de l'ensemble des agents responsables de la perte de masse dans nos filets à grosse maille révèle une moindre sensibilité de la vitesse de décomposition aux facteurs abiotiques mesurés ici. La surface du bassin versant, qui semble covarier avec la distance à la source et la température, a un impact négatif sur la vitesse de décomposition de l'aulne. D'autres paramètres importants comme la rétention (Rounick et Winterbourn, 1983) pourrait expliquer l'absence de différences significatives entre les cours d'eau Fraissègne et Linon dans la mesure où la densité des déchetisseurs y est liée (Dobson et Hildrew, 1992).

En conclusion, si cette partie de l'étude met en évidence un effet positif de la diversité de la ripisylve sur la vitesse de décomposition d'une litière, il n'en reste pas moins que ce processus est contrôlé par d'autres facteurs biotiques et abiotiques.

Références

- Cuffney T.F., Wallace J.B., Lughart G.J., 1990. Experimental evidence quantifying the role of benthic invertebrate in organic matter dynamics of headwater streams. *Freshwater Biology*, 23, 281-299.
- Cummins K.W., Wilzbach M.A., Gates D.M., Perry J.B. et Taliaferro W.B., 1989. Shredders and riparian vegetation. *Bioscience*, 39(1), 24-30.
- Dobson M. et Hildrew A.G., 1992. A test of resource limitation among shredding detritivores in low order streams in southern England. *Journal of Animal Ecology*, 61, 69-78.
- Fabre E., 1996. Relationships between aquatic hyphomycètes communities and riparian vegetation in 3 Pyrenean streams. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, III, 319, 107-111.
- Gessner M.O. & Chauvet E., 1994. Importance of stream microfungi in controlling breakdown rates of leaf litter. *Ecology* 75: 1807-1817.
- Grattan R.M. et Suberkropp K., 2001. Effects of nutrient enrichment on yellow poplar leaf decomposition and fungal activity in streams. *J.N. Am. Benthol. Soc.*, 20(1), 33-43.
- Gregory S.V., Swanson F.J., McKee W.A., Cummins K.W., 1991. An ecosystem perspective of riparian zones. *Bioscience*, 41(8), 540-551.
- Griffith M.B. et Perry S.A., 1991. Leaf pack processing in two Appalachian mountain streams draining catchments with different management histories. *Hydrobiologia*, 220, 247-254.
- Hieber M. et Gessner M.O., 2002. Contribution of stream detritivore, fungi and bacteria to leaf breakdown based on biomass estimates. *Ecology*, 83(4), 1026-1038.

- Pozo J., Basaguren A., Elosegui A., Molinero J., Fabre E. et Chauvet E., 1998. Afforestation with *Eucalyptus globulus* and leaf litter decomposition in streams of northern Spain. *Hydrobiologia* 373/374: 101-109.
- Rounick J.S. et Winterbourn M.J., 1983. Leaf processing in two contrasting beech forest streams: effects of physical and biotic factors on litter breakdown. *Arch. Hydrobiol.*, 96(4), 448-474.
- Stevens M.H.H., Cummins K.W., 1999. Effects of long-term disturbance on riparian vegetation and in-stream characteristics. *Journal of Freshwater Ecology*. 14(1), 1-17.
- Wallace J.B., Eggert S.L., Meyer J.L., Webster J.R., 1997. Multiple trophic levels of a forest stream linked to terrestrial inputs. *Science*, 277(5322), 102-104.
- Zimmer M., 2002. Is decomposition of woodland leaf litter influenced by its species richness ? *Soil Biology and Biochemistry*, 34, 277-284.

Conclusion générale

Les résultats de cette étude sont nuancés, selon que l'on examine les dimensions fonctionnelle ou strictement biologique de l'influence de la diversité forestière sur les processus aquatiques. La décomposition des litières est fortement affectée par la richesse des ripisylves puisque le taux de décomposition du chêne est diminué très sensiblement dans les cours d'eau traversant des hêtraies pures. Cette diminution est apparemment due à une activité moindre des décomposeurs invertébrés. Cependant, des facteurs du milieu autres que la diversité forestière, tels le pH et la concentration en orthophosphates de l'eau, sont nettement plus déterminants.

L'absence d'influence de la diversité et la composition de la strate arborée sur la richesse des communautés d'invertébrés benthiques est à rapprocher du régime alimentaire relativement opportuniste d'un nombre important d'espèces et surtout du caractère non spécifique des relations avec leur ressource trophique. Bien que des expériences de laboratoire aient mis en évidence des préférences de plusieurs taxons d'invertébrés broyeurs pour certaines espèces de feuille, la qualité des litières en terme de conditionnement microbien reste le facteur prépondérant d'une discrimination par les invertébrés. La mobilité des invertébrés, d'une part, et la disponibilité généralement non limitante des litières, d'autre part, assurent aux communautés d'invertébrés une ressource sous la forme de polymères végétaux et de biomasse fongique tout au long de l'année. Si la qualité des litières facilement décomposables comme l'aulne ou le frêne est supérieure, leur présence exclusive dans les pools de litière ne peut probablement pas assurer un développement optimal des organismes puisque ces litières disparaissent dès la fin de l'hiver. Ce n'est pas le cas des litières réfractaires, comme celle du hêtre, qui abritent une mycoflore relativement diversifiée (quoique moins abondante) mais persistent la majeure partie de l'année. Le cas des litières de conifères, colonisées par des assemblages d'hyphomycètes aquatiques à la fois moins diversifiés et moins développés, n'a pu être traité ici de façon satisfaisante, étant donné le peu d'ampleur des boisements résineux dans le secteur étudié.

La réponse des communautés fongiques à une diversité des litières est un résultat nouveau, qui va à l'encontre des thèses communément admises sur la non spécificité des hyphomycètes aquatiques vis-à-vis de leur substrat végétal. Si l'on n'observe pas de spécificité (la plupart des espèces de champignon aquatique peuvent se développer sur la plupart des espèces végétales caducifoliées), des préférences dans les relations hôtes – substrat permettent le développement d'un plus grand nombre d'espèces fongiques sur une litière diversifiée. En moyenne, deux espèces fongiques supplémentaires sont observées pour chaque espèce végétale ajoutée au pool de litière. Les essences résineuses n'interfèrent apparemment pas dans cette relation ; la faible présence des conifères dans les cours d'eau testés ne permet toutefois pas d'exclure un effet plus marqué dans certaines situations, comme les plantations de conifères. A cet égard, les communautés fongiques de rivières anglaises bordées, parfois

exclusivement, par des résineux se révèlent plus pauvres que celles de secteurs forestiers caducifoliés (Laitung et al. 2002). Les résultats obtenus sur les communautés fongiques ne sont apparemment pas transposables aux populations, comme celle de *Tetrachaetum elegans*, pour lesquelles aucune différenciation en fonction de la composition (ou de la diversité) des litières ou de la distance géographique entre stations n'a pu être mise en évidence.

En terme de gestion forestière, les recommandations qui avaient été esquissées lors d'une étude récente sur la rétention naturelle ou manipulée des cours d'eau (Laitung *et al.* 2002) peuvent être reconduites et amplifiées. La conservation d'un rideau d'arbres en bordure de cours d'eau garantit l'approvisionnement en litière, ressource trophique essentielle aux rivières forestières. L'incorporation (ou le maintien) d'une variété d'espèces caducifoliées favorise le développement d'une plus grande diversité fongique. Par ailleurs, l'utilisation des processus écologiques fondamentaux comme la décomposition des litières constitue aujourd'hui une base incontournable de l'évaluation de la qualité des rivières forestières. Le projet européen RIVFUNCTION en cours et la présente étude, qui en représente l'un des volets majeurs, mais aussi plusieurs publications récentes (Gessner & Chauvet 2002 ; Dangles *et al.* 2003) fournissent une illustration de la nécessité d'intégrer une composante fonctionnelle dans la quantification de l'intégrité écologique des milieux naturels.

Références

- Dangles O., Gessner M.O., Guérol F. & Chauvet E. 2003. Use of plant litter breakdown to assess the impact of acidification on stream ecosystem functioning. *Journal of Applied Ecology* (sous presse).
- Gessner M.O. & Chauvet E. 2002. A case for using litter breakdown to assess functional stream integrity. *Ecological Applications* 12: 498-510.
- Laitung B., Pretty J.L., Chauvet E. and Dobson M. 2002. Response of aquatic hyphomycete communities to enhanced stream retention in areas impacted by commercial forestry. *Freshwater Biology* 47: 313-324.

Production scientifique

Publications dans des revues à comité de lecture

1. Laitung B., Chauvet E., Féau N., Fève K., Chikhi L. & Gardes M. Genetic diversity in *Tetrachaetum elegans*, a mitosporic aquatic fungus. *Molecular Ecology* (accepté).
2. Laitung B. & Chauvet E. Diversity of riparian vegetation and aquatic fungi in woodland streams. Soumission à *Biological Conservation* (soumission en cours).
3. Un article, en préparation, traite de la réponse comparée des communautés aquatiques de champignons et d'invertébrés déchetiqueurs à un gradient de diversité forestière.
4. Un manuscrit, en préparation, concerne l'effet d'un gradient de diversité des forêts de hêtre sur le processus de décomposition des litières dans les cours d'eau.

Communications orales ou écrites à congrès

1. Brosse S., Charcosset J.-Y., Chauvet E., Guilhem K., Laitung B. & Millot S. Gestion forestière : implications dans le fonctionnement et la biodiversité des écosystèmes lotiques associés. Séminaire ECOFOR « Biodiversité et gestion forestière », Paris, 12-13 février 2002, Poster.
2. Laitung B., Chauvet E. & Gardes M. Diversité spatiale et préférence du substrat chez l'hyphomycète aquatique *Tetrachaetum elegans* Ingold. 4^e Journées d'Ecologie Fonctionnelle, Gourdon, 5-8 mars 2002, Communication orale.
3. Laitung B. & Chauvet E. Relationships between fungal communities and riparian vegetation in woodland streams. 3rd International meeting on Plant Litter Processing in Freshwaters, Szentendre (Hongrie), 7-12 Septembre 2002, Communication orale.
4. Guilhem K., Brosse S. & Chauvet E. Influence de la diversité des litières forestières sur la richesse et l'abondance des macroinvertébrés benthiques. 5^e Congrès international de Limnologie-Océanographie. Impact des perturbations locales ou planétaires (naturelles ou anthropiques) sur les réseaux trophiques aquatiques, Paris, 9-12 septembre 2002, Communication orale.
5. Lecerf A., Lambrigot D., Millot S. & Chauvet E. La diversité végétale des ripisylves gouverne-t-elle le fonctionnement trophique des ruisseaux forestiers ? 46^e Congrès de l'Association Française de Limnologie, Metz, 15-18 décembre 2003, Communication orale.

6. Laitung B., Millot S. & Chauvet E. Genetic diversity and spatial distribution of aquatic hyphomycete species *Articulospora tetracladia* populations from different streams. Plant Canada 2003, Annual meeting of the Canadian Botanical Association, Antigonish, NS (Canada), 25-29 juin 2003, Poster.
7. Lecerf A., Chauvet E., Charcosset J.-Y. Comment évaluer la « santé » des cours d'eau en utilisant un indicateur de l'intégrité fonctionnelle de l'écosystème. 5^e Journées d'Ecologie Fonctionnelle (JEF), Nancy, 12-14 mars 2003. Communication orale.
8. Laitung B., Chauvet E. & Gardes M. 2nd Symposium on European Freshwater Sciences, Toulouse, 8-12 juillet 2001. Spatial diversity and substrate preference in the aquatic hyphomycete *Tetrachaetum elegans*. Poster.

Mémoires

- Guilhem K. Biodiversité et gestion forestière : influence de la diversité des litières sur les communautés de macroinvertébrés benthiques. D.E.S.U., Toulouse, Univ. Paul Sabatier, Sept. 2002.
- Laitung B. Diversité des communautés et populations d'hyphomycètes aquatiques de cours d'eau forestiers. Influence de la végétation riveraine. Thèse de doctorat en écologie, Univ. Paul Sabatier, 16 décembre 2002.
- Pichmanova P. Richesse des communautés d'invertébrés benthiques de huit cours d'eau de la montagne Noire : la nature de litière forestière structure-t-elle les communautés benthiques ? D.E.S.U., Toulouse, Univ. Paul Sabatier, Sept. 2003.