



UNIVERSITÉ DES ANTILLES ET DE LA GUYANE

Faculté des Sciences exactes et naturelles

École doctorale pluridisciplinaire :

Santé, Environnement et Sociétés dans les Amériques

THÈSE

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université des Antilles et de la Guyane

en écologie évolutive

par

Jérémie LAUTH

Conflits et stabilité évolutive dans un mutualisme tripartite plante – fourmis - champignon

sous la direction de

Jérôme ORIVEL et Alain DEJEAN

soutenue le 8 juillet 2013 à Kourou

Jury

Laurence DESPRES

Douglas W. YU

Nathalie SEJALON-DELMAS

Ivan SCOTTI

Marc GIBERNAU

Jérôme ORIVEL

Prof., U. J. Fourier, LECA

Prof., U. of East Anglia

MCF, U. P. Sabatier, EcoLab

DR2, INRA, EcoFoG

CR1, CNRS, EcoFoG

DR2, CNRS, EcoFoG

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens à remercier tout particulièrement Jérôme. Il fait partie de ces directeurs de thèse pour qui la réussite de son étudiant passe avant tout le reste (dans la mesure qu'il existe une certaine réciprocité, bien entendu). Cette réussite ne s'arrête pas au cadre de la thèse mais s'insère dans le cadre d'une future vie professionnelle en tant que chercheur. Pour moi, Jérôme a un réel talent de pédagogue. Je le remercie pour m'avoir laissé réfléchir quand il pensait que j'étais capable de trouver la solution à mon problème et de m'avoir mis sur les bonnes pistes lorsque mon bagage théorique ne me permettait pas encore de comprendre la finalité de certains résultats. Jérôme essaye de s'adapter à son étudiant alors que la règle générale voudrait que se soit le contraire. Cette adaptation nécessite un travail de longue haleine pour trouver la bonne formule et je ne le remercierai jamais assez pour avoir fait cet effort.

Mes remerciements vont bien naturellement à Alain et Céline. Moins présent que Jérôme de part ses obligations métropolitaines, chaque conseil distillé par Alain est bon à prendre. Je n'oublie pas non plus qu'une grande partie des finances qui m'ont permis de mener mon travail à bien soit due à divers projets encadrés par Alain. Céline, merci d'avoir été toujours présente et d'avoir toujours mis ton travail de côté pour répondre à mes attentes.

Je remercie d'une manière plus générale toute l'équipe « interaction ». Bien qu'une thèse soit un aboutissement personnel, cela reste avant tout un travail d'équipe. Cette thèse interdisciplinaire essaye de mettre en exergue les qualités de chacun dans divers domaines scientifiques pour donner une vision holistique du sujet. Même si certains n'ont pas activement participé à la mise en œuvre des articles de cette thèse, ils sont à l'origine de nombreuses discussions très intéressantes me permettant d'avancer dans mes réflexions. Un grand merci à PJ, Fred, Marc, Angélique, Marion, Olivier, Lucie, Mathieu ...

Je remercie bien évidemment toute l'équipe de génétique écologique à laquelle je me suis greffé pendant la majeure partie de ma thèse. Je parlerais même de phagocytose tant je me suis senti intégré à l'équipe alors qu'une telle interaction n'était pas initialement prévue. On ne fait pas d'omelette sans casser des œufs, mais je pense en avoir cassé plus que la

moyenne. Je les remercie de m'avoir apporté leur science de l'omelette aux herbes pour pouvoir réussir mon omelette aux champignons sans coquilles. Merci à Eliane, Valérie et Pierre de m'avoir tant supporté, dans les deux sens du terme. Ils sont le bloc fondateur de ma réussite je ne serais pas arrivé à ces résultats sans leur aide précieuse. Merci à Caro, Stéphanie et Ivan d'avoir pris le temps de m'expliquer certains fondements de génétique qui me paraissaient alors assez obscurs.

Je remercie également tous mes amis, une thèse ne peut bien se dérouler seulement si l'on se sent épanouie dans notre vie extra-professionnelle. J'espère ne pas à avoir à citer tous les noms de mes potes pour qu'ils sachent qu'ils tiennent une place très importante dans mon cœur. Vraiment, merci à vous tous. Mon loulou, merci pour tout, cette thèse est aussi la tienne.

Marc, merci pour ton vélo et pour tout le reste. J'y pense à chaque fois que je l'enfourche.

J'aimerais finalement remercier les participants à mon jury de thèse. La mise en place de l'oral n'a pas été évidente et je les remercie pour leur patience.

Résumé

Les mutualismes, interactions interspécifiques où chaque partenaire retire un bénéfice net de leur association, sont centraux dans l'origine et l'organisation de la biodiversité. Bien que globalement bénéfiques pour chacun des partenaires, ces interactions n'enlèvent rien à l'égoïsme inhérent de chaque espèce pour sa survie et sa reproduction, générant des conflits d'intérêts entre les espèces. Ainsi, comprendre les processus écologiques et évolutifs qui maintiennent le caractère mutualiste d'interactions entre plusieurs espèces est primordial dans la compréhension du maintien de la biodiversité. Néanmoins, le corpus scientifique s'est jusqu'à présent surtout concentré sur des paires d'espèces en interaction. Or, ces avancées scientifiques restent partielles car la plupart de ces interactions s'englobent dans un contexte communautaire. C'est dans ce cadre conceptuel que se place mon travail de thèse. Alors que la diversité structurelle des mutualismes de protection entre plantes et fourmis en ont fait un modèle d'étude clé dans la compréhension des mutualismes, j'ai concentré mes recherches sur l'intégration d'un troisième partenaire fongique pour comprendre ses conséquences sur les résultantes écologiques et évolutives de ces mutualismes tripartites.

Je me suis tout d'abord intéressé à définir la relation qui lie de façon mutualiste le champignon aux deux autres partenaires et à établir les conflits d'intérêts émanant de ces différentes interactions pour comprendre quels facteurs permettaient de les réguler. Ainsi, la relation qui lie le champignon aux fourmis peut être qualifiée d'agriculture. Les fourmis protègent, nourrissent et disséminent le champignon et celui-ci, via ses propriétés structurales, permet l'élaboration de galeries servant de piège pour capturer des proies. Ce phénomène crée cependant un conflit d'allocation de la force ouvrière des fourmis et nuit directement aux bénéfices de la plante par une diminution de l'intensité des patrouilles sur ses feuilles, diminuant consécutivement sa protection et sa fitness. Néanmoins, le rôle du champignon dans les transferts de nutriments entre les fourmis et la plante, ainsi que certaines réponses évolutives de la plante permettent de réguler ces conflits, stabilisant les bénéfices nets de chaque partenaire dans ce mutualisme tripartite.

Puis, je me suis concentré à comprendre comment certains facteurs évolutifs pouvaient moduler cette résultante écologique. La prise en compte du caractère multipartite d'un mutualisme change radicalement la vision de l'évolution des mutualismes jusqu'alors étudiée entre paires d'espèces. Alors que le corpus scientifique s'accorde à dire que la spécialisation entre espèce par coévolution renforce la stabilité et les bénéfices perçus par chaque partenaire, le contexte multipartite semble altérer ces prédictions. Au contraire la spécialisation multipartite peut être dans certains cas un moteur d'instabilité et de baisse des bénéfices.

Enfin cette thèse permet de faire le lien entre deux concepts qui s'opposent : la coévolution diffuse et la coévolution par paire. Je montre ainsi que la coévolution peut intervenir sur plus de deux espèces à la fois, mais qu'elle peut quand même entraîner une spécialisation multi-spécifique. Finalement, au contraire des prédictions de la coévolution diffuse, cette thèse montre que plusieurs pressions de sélection contrastées émanant de différentes espèces envers un seul trait d'une troisième espèce peuvent promouvoir la spécialisation multi-spécifique.

Abstract

Mutualisms, defined as interspecific interactions where each partner receives net benefits from their interactions, are central to the organization of earth biodiversity. Although globally beneficial for each partner, such interactions do not modify the inherent selfishness of species for their survival and reproduction, generating conflicts of interests between species. Thus understanding the ecological and the evolutionary processes maintaining positive outcomes in mutualisms is fundamental to understand how mutualisms shape earth biodiversity. However, scientific research on mutualisms has most of the time focused on interaction between pairs of species. Such knowledge is thus partial as mutualisms are embraced in a community context. My doctoral thesis takes place in this conceptual framework. I focused my research on the integration of a third fungal partner in protective interactions between ants and plants to evaluate its consequences on the ecological and evolutionary outcomes of such mutualisms, taken as multispecies interactions.

I first focused my researches in defining the mutualistic interaction linking the fungal partner with its two other associates and in revealing any conflict of interests and their regulation that may emerge from such tripartite interactions. The interactions between the ants and the fungi can be qualified as a case of non-food fungiculture. The ants protect, provide food and disseminate the fungus, and the latter, thanks to its structural properties, allows the elaboration of galleries used that are then used as trap to capture preys. This phenomenon creates a conflict of interest in the allocation of the worker force, altering host plant benefits through a decrease of worker patrolling activity and consequently leaves protection and thus fitness. However, the role of the fungus in the nutrient transfers between ants and plants added to evolutionary responses from the plant allows regulating this conflict, stabilizing the net benefits towards the plant.

Then I have concentrated my researches in understanding how evolutionary factors would modulate the ecological outcomes of such interactions. Taking into account the multispecific character of mutualisms changes radically the vision on the evolution of mutualisms when pair of species are considered. While it is widely accepted that specialization of mutualist species through coevolution reinforce the stability of the interaction and the net benefit of each partner, the multispecific context seems to deviate these predictions. Conversely, I show that specialization between three mutualistic partners can drive instability and decrease of benefits.

Finally, the results of this thesis join the gap between two previously opposed concepts: diffuse coevolution and pairwise coevolution. I show that coevolution can happen between more than two species simultaneously and that it can drive mutlispecific specialization. Opposed to the diffuse coevolution, I show that contrasting selective pressures on a same trait from different partner can promote specialization of species.

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE	11
CADRE THEORIQUE	13
EVOLUTION DE LA SPECIALISATION DANS LES MUTUALISMES ET MULTIPARTISMES.....	17
DYNAMIQUES DES MUTUALISMES.....	20
<i>Dynamique spatio-temporelle</i>	20
<i>Conflit dans les mutualismes</i>	21
<i>Maintien de la coopération</i>	22
OBJECTIFS PRINCIPAUX DE LA THESE	35
LES MUTUALISMES TRIPARTITES ENTRE PLANTES, FOURMIS ET CHAMPIGNONS.	37
<i>Mutualismes Plantes – Fourmis</i>	43
<i>Mutualismes Plantes – Champignons</i>	46
<i>Mutualismes Fourmis – Champignons : l’agriculture</i>	48
SYSTEME D’ETUDE	51
LES FOURMIS DU GENRE <i>ALLOMERUS</i>	53
<i>HIRTELLA PHYSOPHORA & ALLOMERUS DECEMARTICULATUS</i>	54
<i>HIRTELLA PHYSOPHORA & ALLOMERUS OCTOARTICULATUS SSP2</i>	56
<i>CORDIA NODOSA & ALLOMERUS OCTOARTICULATUS SSP1</i>	56
LES GALERIES	57
LE TROISIEME PARTENAIRE.....	58
LE SITE D’ETUDE: LA GUYANE FRANÇAISE.....	59
ORGANISATION DE LA THESE	61
CHAPITRE 1. FONGICULTURE CHEZ LES FOURMIS DU GENRE <i>ALLOMERUS</i>.....	65
ARTICULATION DES ARTICLES.....	67
ARTICLE 1. NEW FINDINGS IN INSECT FUNGICULTURE: HAVE ANTS DEVELOPED NON-FOOD, AGRICULTURAL PRODUCTS?	69
ARTICLE 2. AN EFFICIENT PROTOCOL FOR THE ISOLATION OF MELANISED CHAETOTHYRIALEAN ANAMORPHIC FUNGI ASSOCIATED WITH PLANT-ANTS.....	75
ARTICLE 3. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF POLYMORPHIC MICROSATELLITE LOCI IN THE ANT-ASSOCIATED FUNGUS <i>TRIMMATOSTROMA</i> SP. (ASCOMYCOTA: CHAETOTHYRIALES) USING PYROSEQUENCING TECHNOLOGY.....	83
ARTICLE 4. FINE SCALE CO-SPECIALIZATION AND EVIDENCE OF VERTICAL TRANSMISSION BETWEEN <i>ALLOMERUS</i> ANTS AND THEIR SYMBIONTS INDICATE NON-FOOD AGRICULTURE IN INSECTS.....	91
DISCUSSION DU CHAPITRE	106
<i>Une différenciation récente des souches H7- GC1 et GC2</i>	106
<i>Origine évolutive de l’agriculture chez les Allomerus</i>	107

<i>Histoire évolutive de l'interaction entre les souches fongiques et les trois espèces d'Allomerus: les différents niveaux de spécificité comme indice ?</i>	108
<i>Co-specialisation entre A. decemarticulatus et GC1 et niveau d'agriculture.</i>	111
<i>Variations géographiques des dynamiques coévolutives au sein des interactions entre A. octoarticulatus ssp2 et ses symbiotes fongiques.</i>	113
<i>La plante hôte comme facteur important dans les dynamiques coévolutives des pratiques agricoles chez les fourmis du genre Allomerus</i>	116
<i>Vers une démonstration directe de la transmission verticale.</i>	117
CHAPITRE 2. PROTECTION DES PLANTES PAR LES FOURMIS : EMERGENCE D'UN CONFLIT .	119
ARTICULATION DES ARTICLES.....	121
ARTICLE 5. AN ALTERNATIVE PREDATION STRATEGY ALTERS CONTRACT THEORY FEEDBACKS IN AN ANT-PLANT MUTUALISM	125
ARTICLE 6. CONVERGENT STRUCTURE AND FUNCTION OF MYCELIAL GALLERIES IN TWO NON-RELATED NEOTROPICAL PLANT-ANTS.....	141
ARTICLE 7 STRONG SELECTIVE PRESSURES AND SPECIFICITY AS MECHANISMS FOR THE MODIFICATION OF PRE-ADAPTED TRAIT OF PLANT-ANTS PATROLLING ACTIVITY.	155
DISCUSSION DU CHAPITRE	174
<i>Les galeries comme proxy de la présence du champignon</i>	174
<i>Conflit dans un mutualisme tripartite</i>	176
<i>Une régulation des conflits par un trait pré-adaptatif, renforcé par une coévolution entre partenaires ?</i>	177
CHAPITRE 3. NUTRITION PLANTE – CHAMPIGNON : UNE REGULATION ECOLOGIQUE DES CONFLITS?	179
ARTICULATION DES ARTICLES.....	181
ARTICLE 8. PREDATION SUCCESS BY A PLANT-ANT INDIRECTLY FAVOURS THE GROWTH AND FITNESS OF ITS HOST MYRMECOPHYTE.....	185
ARTICLE 9. DIFFERENTIAL MYRMECOTROPHY AFFECTS HOST PLANT PERFORMANCE IN PROTECTIVE ANT-PLANT MUTUALISMS.	199
DISCUSSION DU CHAPITRE	214
<i>Emergence d'une myrmécotrophie différentielle</i>	215
<i>Le mutualisme plante – champignon : généralisé ou spécialisé ?</i>	216
DISCUSSION GENERALE	223
RESULTANTES ECOLOGIQUES, CONFLITS ET STABILITE EVOLUTIVE DANS LES MUTUALISMES TRIPARTITES.....	226
SPECIALISATION MULTIPARTITE ET COEVOLUTION	229
COEVOLUTION, SPECIALISATION ET DEFECTION.....	230
EXTENSION DE L'ETUDE AUX RESEAUX MUTUALISTES A TROIS MODALITES.....	232
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	237

Introduction Générale

Cadre théorique

« Si dans une population, un individu acquiert la capacité d'utiliser non seulement ses propres gènes mais aussi ceux d'autres espèces pour augmenter ses chances de survie et de reproduction, alors il devrait être favorisé par la sélection naturelle ». Cette citation de Thompson (2005) résume à elle seule les avantages sélectifs d'une espèce à être intimement liée à une autre. D'un point de vue écologique, une telle utilisation se traduit par la capacité de tirer profit de traits qui ne peuvent être produits intrinsèquement. Ces traits correspondent à certaines caractéristiques du phénotype de l'espèce associée permettant de remplir certaines fonctions. Réciproquement, la seconde espèce peut acquérir elle aussi la capacité de disposer de certains traits de la première. Si cette exploitation réciproque permet aux deux espèces d'augmenter leur fitness, alors leur interaction est dite mutualiste (Herre et al. 1999). L'acquisition de nouvelles fonctions, complétée par les traits déjà présents, prédestine les interactions mutualistes à être centrales dans l'organisation de la biodiversité. En effet, elles produisent une combinaison de traits sur une échelle évolutive très courte comparée au temps qu'il faudrait pour que la sélection naturelle façonne une telle combinaison au sein d'une seule et même espèce. Ces « sauts évolutifs » permettent ainsi une diversification importante des modes de vies et consécutivement l'occupation de niches écologiques jusqu'alors vacantes (Margulis and Fester 1991). Des événements clés de l'histoire de la vie sont intimement liés à des interactions mutualistes comme la formation de la cellule eucaryote, la colonisation de la terre par les plantes ou la diversification des Angiospermes (Grimaldi 1999, Blackwell 2000, Dyall et al. 2004). Plus simplement, supprimez les lichens et les mycorhizes des écosystèmes terrestres ou les associations entre coraux et zooxanthelles formant les récifs coralliens et ces écosystèmes disparaîtraient entièrement (Thompson 2009). Comprendre les processus écologiques et évolutifs qui maintiennent le caractère mutualiste d'interactions entre plusieurs espèces est donc primordial dans la compréhension de l'organisation et du maintien de la biodiversité.

Bien que globalement bénéfiques pour chacun des partenaires, ces interactions n'enlèvent rien à l'égoïsme inhérent de chaque espèce pour sa survie et sa reproduction, conformément à la théorie de l'évolution par la sélection naturelle de Darwin. Ce fut cependant l'un des premiers à implicitement exposer l'idée de coévolution entre deux partenaires pour expliquer l'évolution des mutualismes (Darwin 1859):

« Je peux ainsi comprendre comment une fleur et une abeille peuvent lentement être, de manière simultanée où l'une après l'autre, modifiées et adaptées l'une à l'autre de manière quasi-parfaite, par la préservation continue de tous les individus qui présentent de légères modifications de structure mutuellement favorables. »

Malgré cet appel pour une recherche avancée sur les processus coévolutifs aboutissant à la formation d'interactions mutualistes, l'étude des mutualismes se limita à la découverte et la description de l'histoire naturelle de nombreuses interactions mutualistes. Ce n'est qu'un siècle plus tard, notamment par les travaux de Janzen (1966, 1967), que la coévolution acquiert un rôle fondamental dans les mutualismes entre espèces. Janzen (1980) définit la coévolution entre deux partenaires comme un changement évolutif d'un trait chez des individus d'une espèce en réponse à un trait chez des individus d'une seconde espèce, suivi par une réponse évolutive de la seconde espèce à ce changement. Bien que différentes trajectoires évolutives puissent émerger de cette sélection réciproque, une des principales hypothèses était alors la co-spécialisation entre les deux espèces. Cette pensée de l'école individualiste était alors en opposition avec l'idée que le mutualisme était un mécanisme situé à l'échelle des communautés (Boucher et al. 1982). Plusieurs scientifiques ont argumenté sur le fait que la coévolution entre deux espèces devait être un élément assez rare. En effet, le concept de coévolution diffuse assume implicitement qu'une espèce ne peut évoluer d'adaptations spécifiques sachant qu'elle est soumise à de nombreuses pressions sélectives contrastées (Strauss and Irwin 2004). Dans leur revue sur les mutualismes, Boucher et al. (1982) interpellent cependant la communauté scientifique à faire le lien entre ces deux pensées. Dans un sens, la reconnaissance de la complexité des interactions dans les systèmes naturels a permis de dévaluer l'importance de la coévolution entre deux partenaires. En effet, il est maintenant admis que les interactions multi-spécifiques devraient significativement altérer les résultantes écologiques et évolutives des interactions dans un sens qui ne peut être

prédit en étudiant les interactions par paires (Stanton 2003). Pourtant, au milieu des années 2000, l'idée que la coévolution entre espèces était diffuse prédominait encore le corpus scientifique (Strauss and Irwin 2004, Strauss et al. 2005). Ce n'est finalement que très récemment que la coévolution fut à nouveau admise comme processus central structurant le « réseau de la vie » (Thompson 2009), agissant simultanément sur un ensemble d'espèces et non pas entre plusieurs paires indépendamment :

« Aucun biologiste ne peut nier qu'une population puisse acquérir des adaptations spécifiques à une pression environnementale précise (exemple : température) et évoluer simultanément des adaptations spécifiques envers un prédateur ou un parasite. Il n'y a donc aucune raison biologique pour qu'une population ne puisse coévoluer simultanément avec plusieurs autres espèces » Ainsi, une espèce peut évoluer vers des adaptations spécifiques avec plusieurs espèces en même temps. La coévolution n'est pas binaire, mais elle n'est pas pour autant diffuse.

Il semblerait donc que la coévolution entre mutualistes puisse être un phénomène agissant sur plus de deux espèces à la fois et puisse même être à la base de l'organisation d'un écosystème. La compréhension des processus écologiques et coévolutifs agissant au sein des mutualismes dans un contexte communautaire a été grandement aidée par leur formalisation mathématique sous forme de « réseaux » (Vazquez et al. 2009). L'étude des communautés mutualistes en terme de réseaux a en effet permis d'extraire leur propriétés structurelles pour comprendre les processus écologiques et évolutifs sous-jacents.

C'est dans ce cadre conceptuel que se place mon travail de thèse. Je me suis intéressé à une micro-communauté de mutualistes comprenant trois espèces de fourmis arboricoles, leurs plantes hôtes ainsi que leurs champignons associés. Alors que la diversité structurelle des mutualismes de protection entre plantes et fourmis en ont fait un modèle d'étude clef dans la compréhension des mutualismes (Bronstein 1998), la récente découverte d'un troisième symbionte présent dans la plupart de ces interactions devrait avoir une forte influence sur les résultantes écologiques de ces mutualismes, jusqu'alors considérés comme bipartite. En concentrant mes recherches sur des relations écologiques et évolutives liant ce troisième partenaire aux deux autres, je me suis attaché à reconsidérer les résultantes écologiques et évolutives de ces mutualismes dans le but de donner une vision holistique de la coévolution multi-spécifique. Par ce travail, j'espère présenter

un cadre expérimental permettant, à partir de cas précis, de progresser dans l'établissement d'une généralisation des processus évolutifs au sein des communautés mutualistes.

Evolution de la spécialisation dans les mutualismes et multipartismes

Comprendre comment les processus écologiques et évolutifs façonnent les interactions mutualistes multi-spécifiques nécessite tout d'abord de comprendre comment évoluent les degrés relatifs de spécificité de chaque espèce avec d'autres. En effet, même si plusieurs espèces peuvent ajuster leurs interactions avec d'autres espèces sous différentes conditions écologiques, la sélection naturelle peut altérer le degré relatif pour lequel les espèces seront génétiquement et phénotypiquement spécialisées et ainsi restreindre la possibilité d'interagir avec de nombreuses espèces (Thompson 2009). En d'autres termes, la spécialisation d'une espèce avec une autre ou avec un groupe d'espèces tend à minimiser le nombre potentiel d'espèces qui peuvent s'associer avec cette espèce focale, par l'influence de contraintes phylogénétiques, génétiques, physiologiques et/ou physiques (Fontaine et al. 2011, Poisot et al. 2011).

Thompson (2005) suggère une hypothétique trajectoire évolutive par laquelle deux populations peuvent se co-spécialiser. Quelques individus, dans une population d'hôtes, acquièrent un symbiote qui, par exemple, synthétise un acide aminé dont la production est limitée chez l'hôte. Quelques génotypes de ce symbiote survivent et se reproduisent mieux associés à cet hôte, qu'associés à un hôte alternatif ou non associés. L'augmentation de la valeur sélective varie entre les partenaires, créant une distribution des résultantes écologiques en fonctions de plusieurs combinaisons de génotypes d'hôtes et de symbiotes. Dans cet environnement, le gain en fitness des individus de chaque population permet l'émergence du mutualisme et les évènements de coévolution successifs sont favorisés par les génotypes les plus aptes à extraire les plus grands bénéfices de l'interaction à un coût minimum. Pendant ce processus, la sélection naturelle favorise les hôtes qui interagissent préférentiellement avec les génotypes de symbiotes les plus bénéfiques. Dans cet exemple hypothétique, cela peut se faire par une sélection favorisant les hôtes qui transmettent le symbiote bénéficiaire directement à

leurs descendance par transmission verticale. Alors que cette interaction mutualiste continue de coévoluer, la sélection favorise les individus qui perdent la faculté d'accomplir certaines fonctions par eux mêmes, parce que les conserver constituerait un coût et ainsi une baisse de la valeur sélective. Le résultat est la fixation d'un groupe de traits complémentaires dans les espèces en interactions. Il peut alors en découler une dépendance forte entre ces deux espèces. Cet exemple montre l'importance de la présence récurrente des deux partenaires dans l'environnement, qui les transforme en une pression de sélection. De la coévolution peut résulter des structures et des fonctions nouvelles. Une espèce deviendra ainsi hyperspécialisée si elle nécessite, pour sa survie et sa reproduction, des traits qui ont été façonnés par sa coévolution avec une autre espèce.

Cependant, il faut garder à l'esprit que les mutualismes spécialisés ne sont pas forcément issus d'un processus coadaptatif, ou même adaptatif (Janzen 1980). Deux autres mécanismes qui n'impliquent pas la coévolution entre espèces peuvent permettre une spécialisation entre espèces. Premièrement, de nombreuses congruences entre les traits de plusieurs populations sont en effet possibles par des processus de préadaptations. Les traits permettant une association spécifique sont alors déjà présent chez les espèces avant leurs interactions et prennent une nouvelle fonction dans le contexte du mutualisme. Deuxièmement, une spécialisation entre plusieurs espèces a pu évoluer dans des nœuds plus profonds au sein de la phylogénie. Ainsi des traits particuliers permettant une association avec certaines espèces peuvent résulter d'un héritage phylogénétique (Janzen 1980). Il est néanmoins important de signaler que ces trois mécanismes ne sont pas mutuellement exclusifs et qu'ils peuvent agir en synergie.

Par conséquent, l'évolution de la spécificité dans un mutualisme émerge de deux mécanismes principaux : une coexistence récurrente des deux populations, ainsi qu'un gain de fitness plus important que l'association avec plusieurs espèces. L'évolution de la vie symbiotique, où les espèces interagissent de manière continue, est donc plus prompte à une spécialisation des populations par rapport aux interactions non symbiotiques où l'interaction est de courte durée. Les espèces ayant évoluées vers un mode de vie symbiotique auront ainsi tendance à être engagées avec moins de partenaires que les espèces libres.

La trajectoire évolutive citée précédemment suppose une évolution vers la transmission verticale des symbiontes par les hôtes, c'est à dire que les partenaires les plus bénéfiques sont directement transmis à la génération future. Dans ce cas précis la reproduction des deux partenaires est liée. Or dans la majorité des cas, les interactions mutualistes sont issues d'une transmission horizontale, c'est à dire que les partenaires doivent se réassocier à chaque génération. Dans ce cas, la reproduction des deux partenaires est indépendante. En gardant à l'esprit que chaque espèce est « égoïste » pour sa propre survie et sa reproduction, la sélection naturelle favorisera les espèces exploitant du mieux possible les autres. L'association avec des partenaires bénéfiques au cours des générations n'est donc pas un phénomène constant. Les mutualismes sont alors qualifiés d'interactions dynamiques.

Dynamiques des mutualismes

Dynamique spatio-temporelle

La notion d'exploitation mutuelle comme définition des mutualismes émergea au milieu des années 1990 (Bronstein 1994, Herre et al. 1999). Elle prend son essence dans le découplage des coûts et des bénéfices échangés entre les partenaires en interaction. En effet, une interaction entre espèce est qualifiée de mutualiste si chaque partenaire reçoit un bénéfice net, c'est à dire que les bénéfices perçus sont quantitativement plus importants que les coûts engendrés. La notion de « bénéfice net » se révèle être fondamentale dans la compréhension de l'origine, du maintien ou de la rupture des mutualismes. Sous le regard de la sélection naturelle, chaque partenaire devrait tendre à augmenter ses bénéfices nets par la maximisation de ses profits (surexploitation) et/ou la réduction de ses coûts (défection). Or, sachant que les coûts expérimentés par un participant sont plus ou moins corrélés aux bénéfices perçus par l'autre, un conflit d'intérêt entre chaque partenaire semble inévitable. L'effectivité de ces processus peut alors entraîner une baisse de valeur sélective chez certains des partenaires. Ces interactions se déplacent ainsi le long d'un continuum entre relations parasitaires et relations mutualistes et sont donc, par nature, dynamiques.

La théorie de la mosaïque géographique de la coévolution prédit que le résultat net d'un mutualisme peut donner lieu à des trajectoires coévolutives variées en fonction du contexte écologique dans lequel évoluent les espèces en interaction (Thompson 2005). Ainsi, les mutualismes, comme tout autre type d'interactions, intègrent également une dynamique spatio-temporelle. Par exemple, les propriétés physico-chimiques des sols pèsent sur le bilan net des coûts et des bénéfices retirés par une plante lors d'interactions mycorhiziennes (Johnson et al. 1997). Temporellement, le changement du niveau de la mer due au réchauffement climatique joue un rôle considérable dans la stabilité des associations entre communautés de coraux et

communauté de zooxanthelles (Hoegh-Guldberg et al. 2007). A hauteur de colonne d'eau constante, les zooxanthelles fournissent des dérivés photosynthétiques et des acides aminés aux coraux qui réciproquement fournissent des substances azotées et phosphorées. Une augmentation du niveau de la mer réduit alors les capacités photosynthétiques des zooxanthelles qui se retrouvent expulsés de leurs hôtes. Dans cet exemple, un mutualisme obligatoire devient neutre et facultatif pour l'hôte due à un changement dans le temps d'un facteur abiotique.

Conflit dans les mutualismes

Un partenaire qui, par surexploitation et/ou défection, génère un conflit dans une interaction mutualiste est qualifié de « tricheur » (Yu 2001). Il existe deux types de tricheurs. Chez les « tricheurs opportunistes », l'évolution de ces stratégies est conditionnée par des facteurs environnementaux où par l'identité du partenaire. Alors que chez les « tricheurs professionnels », la tricherie est constante. Dans un souci de clarté, ces derniers seront qualifiés de « parasites » d'une interaction. En effet, ils sont parasites de systèmes mutualistes déjà en place et leur persistance nécessite la présence d'une autre espèce, mutualiste. Au contraire, les espèces de tricheurs opportunistes sont généralement issues de lignées mutualistes et peuvent, en fonction de certaines conditions, être associées de manière mutualiste.

La notion de tricherie repose sur l'idée qu'un service est coûteux pour un partenaire. Or, ce n'est pas le cas pour tous les services rendus. Si les « bénéfiques par investissements » sont soumis à la tricherie, les « bénéfiques par sous-produits » ne le sont pas (Connor 1995). En effet, ces derniers émergent d'un sous produit de l'activité égoïste d'un partenaire, c'est à dire qu'ils bénéficient aux deux partenaires. Parce que non coûteux, ces bénéfiques sont supposés être plus stables que les bénéfiques qui nécessitent un investissement. Cependant, cette notion de stabilité des bénéfiques issus de sous-produits s'estompe à la mesure des avancées scientifiques (Leimar and Connor 2003, Leimar and Hammerstein 2010). En effet, parce que les bénéfiques par sous-produits ne dérivent pas d'une adaptation dans le contexte du mutualisme, on ne s'attend pas à une stabilité

évolutive complète. Ces bénéfiques peuvent être ainsi réduits ou perdus si un changement évolutif intervient au niveau des traits qui les produisent (Leimar and Connor 2003).

Maintien de la coopération

Plusieurs concepts ont été évoqués pour expliquer l'ubiquité des mutualismes malgré leur apparente instabilité : le choix du partenaire, la fidélité au partenaire, les sanctions, et le mode de transmission de l'association (et par extension la structuration génétique des populations associées). Les récentes formalisations de ces concepts ont été revues par Archetti et al (2011) qui découpent le problème de la coopération en trois composantes distinctes (Fig. 1). Premièrement, avant que l'interaction soit établie, l'hôte doit être capable de sélectionner un partenaire mutualiste parmi plusieurs symbiotes bien que leurs caractéristiques soient inconnues (Fig. 1A). Puis, une fois associé, il doit empêcher le symbiote de tricher, bien que ses actions ne puissent être observées (Fig. 1B). Enfin lorsque aucun de ces mécanismes ne rentrent en jeu, où s'ils ne suffisent pas à maintenir un comportement coopérateur, alors l'hôte devient un bien public (Fig. 1C).

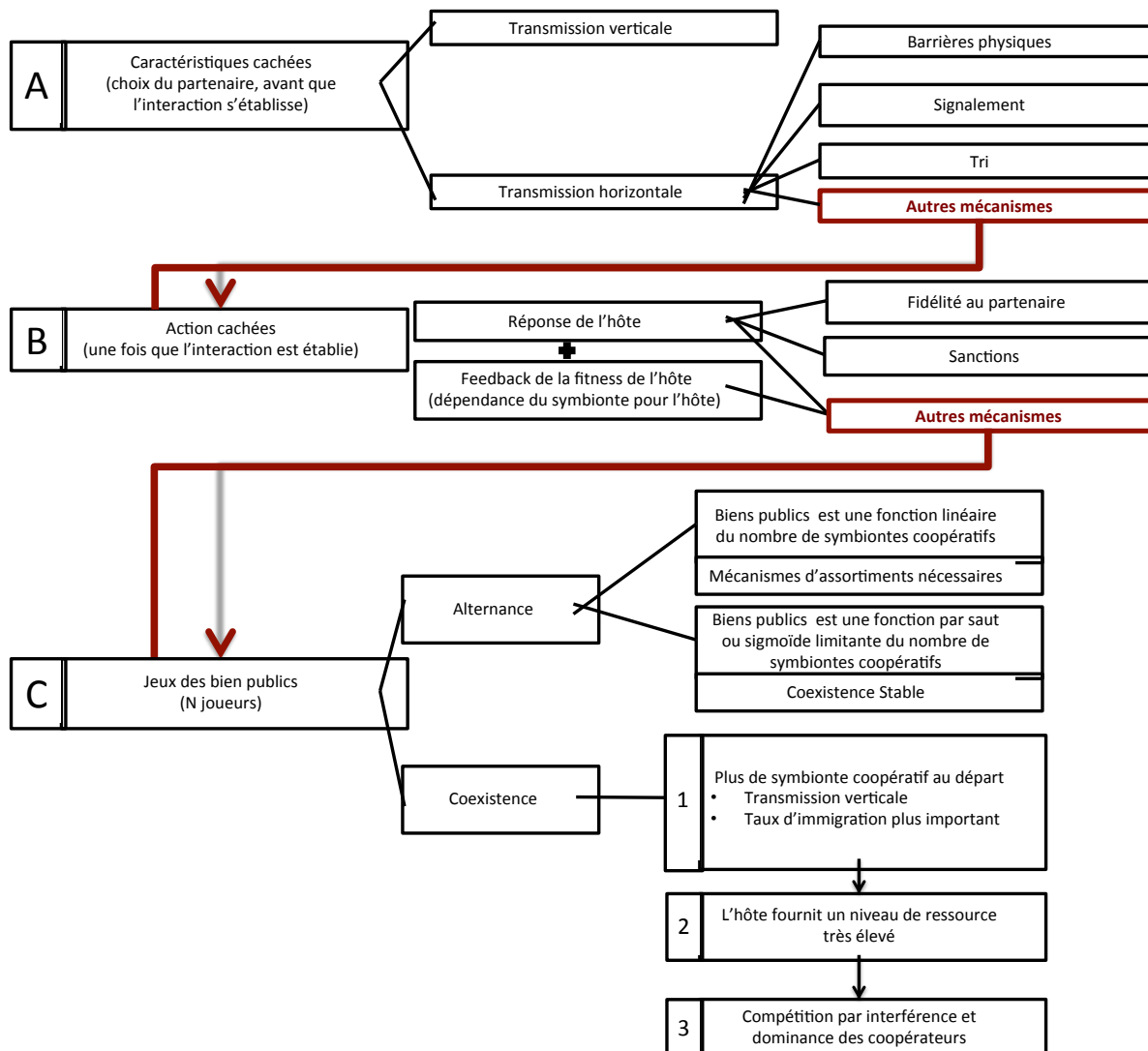


Figure 1. Schéma synthétique des mécanismes de contrôle aidant à maintenir des comportements coopératifs.

Il existe trois types de contrôles: (a) avant que l'association ne s'établisse, (b) une fois que l'association est établie, (c) lorsque ces mécanismes précédents ne rentrent pas en jeu et que les symbiontes et tricheurs coexistent dans l'environnement. (a) les filtres sélectifs, le signalement par les symbiontes ou le tri par les hôtes sont les trois mécanismes qui aident à maintenir une association avec un symbionte coopératif lorsque la transmission du symbionte est horizontale. Lorsque aucun de ces mécanismes ne rentre en jeu, l'association s'établie et alors l'hôte tente de supprimer les comportements tricheurs (b). Cela se fait, sous la théorie des contrats, par deux feedbacks : la réponse de l'hôte et le feedback de la fitness de l'hôte. La réponse de l'hôte peut être de deux formes: soit par la fidélité au partenaire, soit par les sanctions. L'efficacité du feedback de la fitness de l'hôte dépendra de la dépendance du symbionte à cet hôte particulier. Si aucun de ces mécanismes ne rentre en jeu, alors les symbiontes tricheurs et coopératifs pourront coexister et l'hôte devient alors un bien public (c). La théorie des jeux à N-joueurs s'applique lorsque les symbiontes coopératifs et tricheurs sont alternativement associés à un hôte. Si la formalisation des biens publics est une fonction linéaire du nombre de coopérateur, alors la tricherie est le seul équilibre stable si aucun mécanisme de discrimination ne rentre en jeu. Si les biens publics sont une fonction par pas ou sigmoïde du nombre de coopérateurs, alors les coopérateurs et tricheurs coexistent dans un équilibre mixte. Si les symbiontes tricheurs et coopératifs coexistent au sein d'un même hôte, alors le maintien de la coopération se fait en trois étapes: (1) le nouvel hôte commence avec une plus grande proportion de symbiontes coopérateurs; (2) l'hôte produit un niveau de ressources élevé qui (3) produit une compétition par interférence et conduit à une dominance compétitive des symbiontes coopérateurs.

Bien que le schéma indique une succession des trois classes de contrôle, chaque mécanisme n'est pas exclusif et plusieurs peuvent entrer en jeu dans les trois classes présentées.

Mécanismes pré-associations

Les problèmes des caractéristiques cachées étendent les théories du choix du partenaire lorsque le signalement de la qualité d'un symbionte est inconnu et se résolvent par la théorie du tri («screening theory»). Le signalement et le tri sont des concepts intrinsèquement destinés à l'étude des mutualismes à transmissions horizontales, c'est à dire quand l'association entre les partenaires doit être renouvelée à chaque génération. Lorsque l'interaction est transmise verticalement, c'est à dire directement héritée par les parents, les intérêts reproducteurs des partenaires sont liés. Ainsi, si la reproduction et donc la fitness d'un symbionte est directement liée à la reproduction de l'hôte, la sélection naturelle ne devrait alors sélectionner que des comportements qui ne portent pas atteinte à l'intégrité de l'hôte (Herre et al. 1999). De plus, même si non exclusif, ce mode de transmission limite fortement l'entrée d'exploiteurs externes dans le système (Wilkinson and Sherratt 2001).

Lorsque le signalement de la qualité d'un partenaire existe, le symbionte produit un signal, comme par exemple l'exposition d'un phénotype coûteux qui est profitable seulement pour les individus ayant une forte qualité, et l'hôte évalue le symbionte et peut se décider à s'engager dans la relation. Lorsque aucun signalement n'est possible, alors l'hôte peut faire un tri, de manière passive, entre les différents symbiontes en disposant de récompenses pour les symbiontes coopératifs ou de coûts pour les non coopératifs (Archetti 2011, Archetti et al. 2011b). Ainsi même si la qualité d'un symbionte ne peut être distinguée, les symbiontes tricheurs seront limités par les coûts qu'impose l'interaction avec l'hôte. La sélection naturelle peut entraîner chez certains hôtes la mise en place d'un environnement exigeant où seulement les symbiontes coopératifs peuvent se développer (Archetti et al. 2011a).

Un dernier mécanisme de choix du partenaire est présent lorsque des barrières physiques et/ou physiologiques empêchent un symbionte tricheur de s'installer dans l'interaction. La mise en place de ces barrières est généralement issue d'un processus de coévolution entre l'hôte et le symbionte coopérateur. En effet, la sélection naturelle devrait sélectionner chez l'hôte des traits qui permettent une association continue avec ces symbiontes. Un exemple de la mise en place de

ces filtres sélectifs est l'adéquation entre la taille et la forme de certaines espèces de fourmis mutualistes et la taille de l'entrée des loges de leurs hôtes spécifiques (Brouat et al. 2001).

Mécanismes post-associations

Les problèmes des actions cachées sont résolus par la théorie des contrats initialement utilisée en économie. Biologiquement, la théorie des contrats part du principe que la *fitness* d'un symbionte est soumise à trois feedbacks (Fig. 2) (Weyl et al. 2010). Le premier feedback provient de la contribution à court terme de l'action du symbionte sur sa propre *fitness*. Dans un cadre mutualiste, ces actions représentent les traits mutualistes. Que ces actions soient coûteuses ou non pour le symbionte ne changent pas les prémices de la théorie du contrat, regroupant ainsi les bénéfiques issus d'un sous-produit ou issus d'un investissement dans un seul cadre théorique. Le second feedback provient de la réponse directe de l'hôte à la résultante de l'action du symbionte. Cette réponse, qui correspond à la fidélité du partenaire (PFF), peut affecter positivement ou négativement la *fitness* du symbionte, ce qui sera fonction de la résultante de son action. Cette réponse, égoïste, n'est pas sélectionnée pour ses effets sur la *fitness* du symbionte. Archetti et al. (2011a) prennent l'exemple de certaines plantes qui, physiologiquement, perdent certains organes (fleurs, feuilles, tiges ...) qui ont été endommagés et qui n'ont donc plus aucune valeur. Ceci est un mécanisme général, et il est sélectivement avantageux pour la plante de perdre ces organes devenus inutiles plutôt que de payer le coût de leur maintenance. Dans les mutualismes de protection entre plantes et fourmis, certains de ces organes bénéficient aux fourmis en leur offrant un espace de nidification. Si les fourmis ne protègent pas ces organes, leur dégradation peut amener à leur abscission. Consécutivement, cela réduit l'espace de nidification des fourmis et donc leur *fitness* (Archetti et al. 2011a). Réciproquement, une forte protection sera convertie en une plus forte croissance végétative et donc, un plus grand espace de nidification. Alternativement, la réponse de l'hôte peut lui être coûteuse et oblige le symbionte à se comporter de manière coopérative, on parle alors de sanction de l'hôte (HS). Les mécanismes évolutifs en jeu sont différents de ceux impliqués dans la fidélité au partenaire. Dans le cas des sanctions, l'hôte répond à l'action du symbionte inférée par sa résultante. La différence est subtile mais pour faire simple, PFF est une préadaptation alors que HS est une adaptation dans le cadre du

mutualisme, car le symbionte doit être présent pour que ce mécanisme soit activé. Il semble que le PFF soit le mécanisme dominant pour maintenir les comportements coopératifs des symbiontes. Cependant cela demande des préadaptations appropriées. HS, en comparaison, semble être plus probable lorsque l'hôte a évolué certaines fonctions cognitives.

Finalement, le troisième feedback provient de la *fitness* du symbionte, qui est intrinsèquement liée à la réponse de l'hôte due à la résultante de l'action du symbionte. Plus le symbionte est dépendant de la présence de l'hôte, plus ce feedback sera important. Un pollinisateur ne devrait ainsi ne pas être affecté par ce feedback alors que la *fitness* d'un symbionte transmet verticalement est fortement corrélé à la *fitness* de l'hôte.

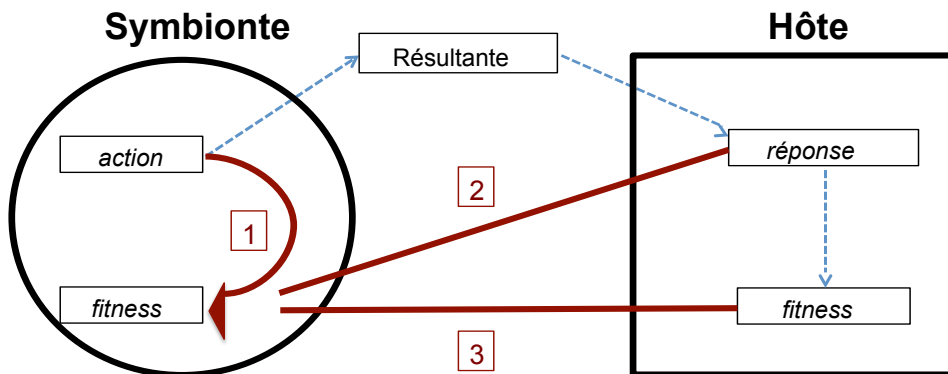


Figure 2. Représentation schématique des trois feedbacks perçus par un symbionte sous la théorie des contrats appliquée aux mutualismes. Le grand cercle noir et le grand carré noir représentent le symbionte et l'hôte, respectivement. Les flèches rouges correspondent aux trois feedbacks qui modulent la *fitness* du symbionte : (1) feedback direct qui dérive de sa propre action; (2) feedback de contrôle qui dérive de la réponse de l'hôte; (3) feedback qui dérive de la *fitness* de l'hôte. Les flèches bleues représentent les relations indirectes entre l'action du symbionte, la réponse de l'hôte et la *fitness* de l'hôte, modulées par la résultante de l'action du symbionte.

Résoudre les conflits dans les mutualismes multipartites

Bien que les mécanismes en jeu permettant de maintenir la coopération au sein des interactions mutualistes commencent à être bien compris, tant au point de vue théorique qu'empirique, la grande majorité de ces théories n'ont été testées que sur une paire d'espèce en interaction. Pourtant il devient assez clair que les interactions entre plusieurs espèces ont le potentiel pour altérer les coûts et les bénéfices écologiques. Bien que l'étude des réseaux mutualistes permette de mieux comprendre les processus coévolutifs au sein des communautés, elle ne permet pas de comprendre la résolution des conflits. Dans les interactions multipartites, il existe ainsi deux sortes de conflits : la persistance des associations mutualistes dans une communauté comprenant un ensemble de symbiotes coopératifs et tricheurs et la résolution des conflits issus de plusieurs associations mutualistes.

Conflits multipartites : tricheurs et coopérateurs

Même si, avant la mise en place de l'association ou pendant l'association, certains mécanismes limitent le nombre potentiel de symbiotes en interaction, il existe de nombreux cas où ces mécanismes ne fonctionnent pas, ouvrant la voie à une compétition entre symbiotes pour un bien commun, l'hôte (Fig. 1C). Dans ce cas, un problème d'actions collectives survient : si des symbiotes tricheurs peuvent profiter d'un bien commun grâce aux efforts des coopérateurs, comment la coopération peut elle être maintenue alors qu'il semble plus avantageux de ne pas coopérer (Archetti et al. 2011a). Un symbiote fournit un bénéfice à l'hôte qui, réciproquement, apporte un bénéfice au symbiote. Si l'hôte ne peut discriminer entre les symbiotes tricheurs et coopératifs alors les bénéfices transmis par l'hôte deviennent un bien public, perçu de manière égale chez les deux types de symbiotes (Archetti and Scheuring 2011). Lorsque l'on assume que les bénéfices venant de l'hôte s'accroissent linéairement avec le nombre de coopérateurs, alors la coopération ne peut être sélectionnée sauf s'il existe des mécanismes permettant de discriminer tricheurs et coopérateurs. En effet, dans la théorie des biens publics (dilemme du prisonnier à N joueurs), la somme de la contribution individuelle « c » (coût du symbiote coopérateur) est

multipliée par un facteur de récompense « r », qui est redistribué (par les feedbacks de l'hôte) à tous les symbiontes. Si ces récompenses sont assez importantes pour la population de symbiontes ($r > N$), alors la coopération est sélectionnée. Mais d'un point de vue empirique, le facteur de récompense est généralement modéré ($r < N$) et dans ce cas, les comportements tricheurs sont sélectionnés s'il n'y a pas de discriminations.

De récentes études théoriques ont cependant argumenté que la dynamique linéaire des biens publics n'était empiriquement pas justifiée, évoluant généralement sous forme de fonctions sigmoïdes saturantes ou bien par saut (Archetti and Scheuring 2011, 2012, 2013). Si les bénéfices sont non linéaires et augmentent de façon sigmoïde alors, la coopération peut être maintenue à un certain équilibre sans mécanismes de discriminations (Fig. 3). Dans ce cas là il existe un équilibre où la *fitness* des coopérateurs est égale à la *fitness* des tricheurs. L'existence de cet équilibre reste néanmoins dépendante de deux facteurs : la fréquence de coopérateurs pour créer le bien public et un ratio entre coûts et bénéfices qui ne doit pas dépasser une certaine valeur critique pour les coopérateurs.

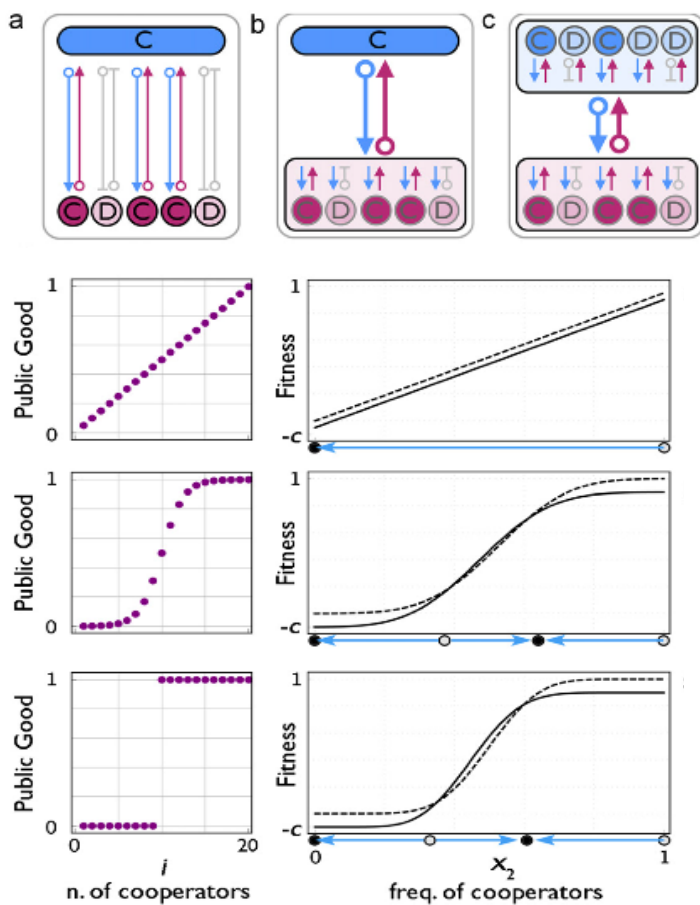


Figure 3. Mutualismes et biens publics non-linéaires. Les coopérateurs (C) contribuent au bénéfice fourni à l'hôte (flèches verticales) alors que les tricheurs (D) n'y contribuent pas (lignes tronquées). Si un hôte peut discriminer l'action de ses partenaires (a), il peut récompenser les coopérateurs et punir les tricheurs. Si par contre il peut seulement observer une action collective (b), ou si chaque espèce peut observer l'action collective des autres (c), la discrimination n'est pas possible et le bénéfice devient un bien public, qui est alors distribué entre coopérateurs et tricheurs. Le bénéfice fourni par les symbiontes aux hôtes est une fonction (points violets) du nombre de coopérateurs i parmi les symbiontes et du bénéfice reçu par l'hôte.

Si le bénéfice est linéaire, le seul équilibre stable dans des groupes de taille finie est la tricherie, sauf s'il existe des mécanismes de discrimination. Si le bénéfice est non linéaire, les tricheurs et les coopérateurs peuvent coexister dans un équilibre mixte sans système de discrimination. Les bénéfices non linéaires peuvent être approximés par une fonction par pas ou par une fonction sigmoïde. Les cercles correspondent aux équilibres stables (en noir) et instables (en gris). Les flèches horizontales dénotent les dynamiques. Les courbes noires correspondent à la fitness des coopérateurs (pleines) et aux tricheurs (pointillées) des symbiontes en fonction de la fréquence des coopérateurs. Tirée de Archetti et Scheuring (2013).

Ce système général semble fonctionner lorsque un hôte est alternativement utilisé par des symbiontes tricheurs ou des symbiontes coopérateurs. Cependant, si ces symbiontes se retrouvent à coexister dans le même espace spatio-temporel, alors la compétition entre les symbiontes devrait amener un des deux types à disparaître. Biologiquement, sachant que les symbiontes coopérateurs expérimentent un coût supplémentaire par la fourniture d'un service, les symbiontes tricheurs devraient être plus compétitifs (taux de croissance plus important) et envahir le système. Scheuring et Yu (2012) exposent ce problème dans les microbiomes formés par les bactéries symbiotiques associées aux cuticules des fourmis Attines. Pour lutter contre des pathogènes

spécialistes et généralistes de leur cultivar, les Attines ont évolué des associations strictes avec des bactéries qui produisent des antifongiques et antibiotiques contre ces pathogènes particuliers (Currie et al. 2003). Dans ce but, ces fourmis transfèrent verticalement une bactérie symbiotique (*Pseudonocardia*) mais recrutent également d'autres bactéries productrices d'antibiotiques, horizontalement à partir de l'environnement. Ce recrutement peut ainsi induire l'envahissement du microbiome par des bactéries pathogènes. Les auteurs argumentent que le maintien de ce microbiome coopératif peut se faire par les hôtes qui vont favoriser une compétition par interférence entre les symbiontes coopératifs et les symbiontes tricheurs. La compétition par interférence se définit par une espèce qui va être directement nuisible à son espèce compétitrice (Carothers and Jaksic 1984). Dans notre exemple, cela se traduit par la production d'antibiotiques par les coopérateurs, nuisibles aux bactéries tricheuses. La mise en place de cette compétition nécessite la production par les hôtes d'un environnement ayant de grandes ressources pour pouvoir combiner la croissance des bactéries coopératives et leur production d'antibiotiques. La modélisation de l'évolution du microbiome (paramètres : variation du substrat de l'hôte, de la fréquence des bactéries mutualistes, de la production d'antibiotiques et de la fréquence des bactéries pathogènes) peut atteindre deux équilibres : dominance complète des bactéries mutualistes ou des bactéries pathogènes. L'atteinte d'un équilibre plutôt que de l'autre va dépendre du type de bactérie ayant la plus forte abondance au départ. Dans le cas de ce microbiome précis, la transmission verticale d'une des bactéries permet ainsi la présence initiale de bactéries productrices d'antibiotiques, induisant donc la dominance exclusive des coopérateurs dans le microbiome.

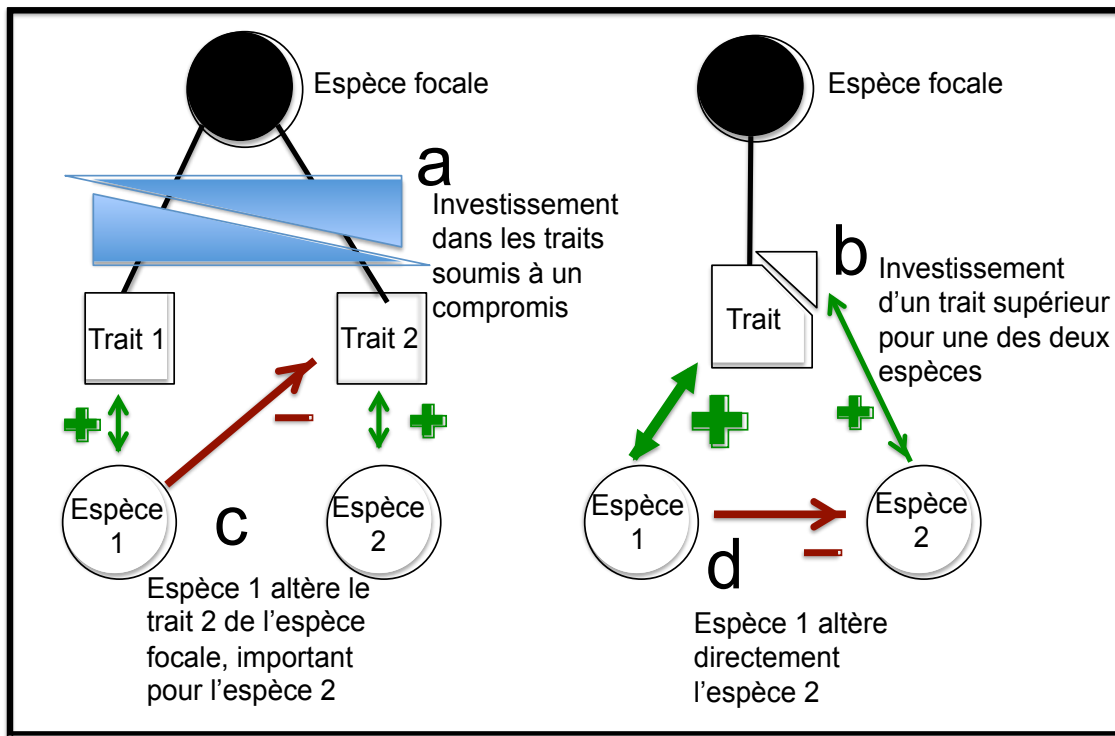
Conflits multipartites : associations avec différents coopérateurs

Historiquement, les conflits dans les mutualismes multipartites ont été initialement étudiés dans les interactions comprenant un symbionte ou une guilda additionnelle de symbiontes tricheurs. Cependant, de nombreux conflits existent également lorsque plusieurs espèces s'associent coopérativement avec une autre. Ces conflits peuvent être de deux types (Fig. 4). Dans le premier cas, ils peuvent tourner autour de la production du service qu'une espèce focale fournit à

plusieurs mutualistes. Par exemple, l'investissement dans un trait mutualiste pour une espèce peut être soumis à un compromis dans l'investissement pour un autre trait mutualiste pour une autre espèce (Fig. 4a). Dans ce cas là, ces investissements devraient néanmoins être gérés par les mécanismes de contrôle vu précédemment. Alternativement un seul et même trait peut être concerné dans le mutualisme avec plusieurs espèces. Dans cet autre cas le compromis s'établit au niveau de l'investissement de ce trait avec l'une ou l'autre espèce (Fig. 4b). Mack et Rudgers (2008) ont ainsi montré que la présence d'un champignon endophyte infectant la plante *Schedonorus phoenix* diminuait la colonisation mycorhizienne de leur autre symbionte fongique. Une de leurs hypothèses est que la plante effectue un compromis dans l'allocation des ressources en carbone entre les deux symbiontes. De plus, les champignons endophytes et mycorhiziens proposent le même type de service à la plante. Une hypothèse alternative est donc que la plante reçoit les nutriments nécessaires de la part du champignon endophyte réduisant ainsi la colonisation mycorhizienne, qui devient alors une association « non rentable ». Cet exemple illustre bien la bidirectionnalité de ces interactions et comment une espèce altère l'interaction entre les deux autres. Evolutivement, cela peut amener l'espèce focale à se spécialiser dans une seule association, sauf si les deux sont obligatoires pour sa survie et sa reproduction. De manière intéressante, ce genre de conflits ne se restreint pas aux bénéfiques par investissement. En effet, ces conflits ne se situent pas au niveau de l'investissement, mais au niveau du compromis d'allocations entre plusieurs espèces. De cette manière, les bénéfices issus d'un sous-produit d'activité égoïste entrent également en compte dans ces conflits.

Un deuxième conflit existe si plusieurs espèces engagées de façon mutualiste avec une espèce focale sont associées de manière antagoniste entre elles. L'exemple précédent montre comment il peut exister un antagonisme indirect via l'espèce focale, mais ce conflit peut également être direct. Il peut se subdiviser en deux entités : soit une espèce va altérer le trait de l'espèce focale qui conditionne le mutualisme avec une autre espèce (Fig 4c), soit une espèce va directement altérer la fitness d'une autre espèce associée à l'espèce focale (Fig. 4d). Les mutualismes de protection entre plantes et fourmis permettent d'illustrer ces deux cas. L'association mutualiste entre certains hémiptères suceurs de sève et fourmis arboricoles est un exemple frappant d'antagonisme direct entre la plante et les hémiptères. En effet, les hémiptères imposent souvent des coûts additionnels aux myrmécophytes qui supportent déjà le coût des services rendu aux

fourmis. Ils peuvent être des agents vecteurs de maladies et ajoutent un niveau trophique supérieur, augmentant les bénéfices nets des fourmis et diminuant celui des plantes (Gaume et al. 1998). Les mutualismes entre certaines plantes et des fourmis protectrices instaurent un autre conflit avec d'autres mutualistes : ses pollinisateurs. Ness (2006) illustre le cas où certaines fourmis protectrices sont capables d'attaquer directement le pollinisateur en visite en patrouillant sur les fleurs de la plante hôte. Non seulement, ce comportement nuit aux pollinisateurs, mais également à la plante hôte, par une baisse de sa pollinisation. Dans un autre cas, la castration des fleurs par les fourmis arboricoles est un trait qui peut être sélectionné chez certaines espèces, permettant une augmentation de la *fitness* des fourmis par une réallocation des ressources de la plante dans sa croissance végétative, et donc dans les espaces de nidifications. Ce comportement nuit ainsi indirectement aux pollinisateurs par la perte de ressources nectarifères (Yu and Pierce 1998, Frederickson 2009, Malé et al. 2012). Ce type de comportement, qui se classe dans le parasitisme, est généralement régulé par l'évolution de certaines stratégies chez la plante (Edwards and Yu 2008).



Enfin, s'il existe une vraie relation mutualiste entre chaque partenaire par paire, l'effet d'un hypothétique conflit à cause d'un partenaire dans la résultante de l'interaction par paire des deux autres devrait être compensé par la relation mutualiste de ce troisième partenaire avec chacun des deux autres (Fig. 5). A notre connaissance, les conflits dans ce genre de système n'ont jamais été abordés.

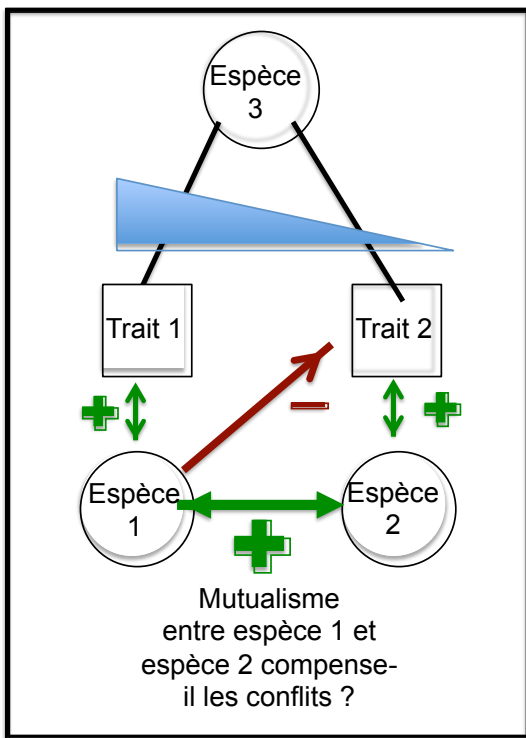


Figure 5. Représentation schématique du problème du maintien de la coopération malgré la présence de deux conflits dans des vrais mutualismes multipartites. Par un compromis dans l'allocation de ses ressources pour le trait 1, l'espèce 3 bénéficie plus à l'espèce 1 que l'espèce 2 (premier conflit). Par l'altération du trait 2 de l'espèce 3, l'espèce 1 nuit au mutualisme entre l'espèce 3 et l'espèce 2 (deuxième conflit). Cependant, l'espèce 1 est engagée de façon mutualiste avec l'espèce 2. Cette coopération est-elle suffisante pour maintenir une relation mutualiste multipartite en compensant les coûts perçus par l'espèce 2 provenant des deux conflits?

Objectifs principaux de la thèse

Nous avons vu qu'au delà des conflits émergeant au sein d'un mutualisme binaire, la présence d'une troisième espèce en interaction ajoute un niveau de complexité supérieur dans la compréhension de la stabilité d'interaction mutualistes multipartites. La régulation des conflits ne peut plus être vue d'une manière binaire et l'intégration des symbiontes additionnels doit être pris en compte pour avoir une vision holistique du maintien des mutualismes. Alors que certaines études ont abordé expérimentalement ce niveau de complexité, nous en sommes toujours à ajouter des cas particuliers dans un cadre théorique qui semble néanmoins suffisamment étoffé. Un accent doit être mis sur l'effort expérimental en combinant des études écologiques et évolutives pour intégrer dans un même système d'étude la plupart des facteurs qui vont contribuer au dynamisme des mutualismes multipartites. Une approche expérimentale idéale est ainsi d'étudier l'influence d'un troisième partenaire dans une interaction mutualisme bien connue au niveau binaire.

Dans ce but, le premier objectif de cette thèse est de cibler les traits qui vont façonner l'interaction entre ce troisième partenaire et les deux autres et de mesurer les coûts et les bénéfices qui découlent de ces interactions.

Le second objectif de la thèse est d'identifier les traits de chaque espèce seront susceptibles de générer des conflits d'investissement entre les différents partenaires. Est ce qu'un même trait d'un partenaire est important dans l'interaction avec les deux autres ? Est ce que l'investissement dans plusieurs traits d'une même espèce qui régissent son interaction avec les deux autres est soumis à un compromis d'allocation ?

Parce que ces investissements vont être conditionnés par le contexte évolutif dans lequel se place les différents partenaires, cette thèse a également pour objectif d'identifier la spécialisation et la dépendance de chaque partenaire vis à vis des autres.

Enfin, un dernier objectif est d'identifier quels facteurs écologiques et évolutifs vont intervenir dans la régulation de ces conflits pour comprendre comment un mutualisme tripartite peut être évolutivement stable.

Les mutualismes tripartites entre plantes, fourmis et champignons.

L'identification récente d'un troisième partenaire fongique dans de nombreux systèmes symbiotiques entre fourmis arboricoles et plantes myrmécophytes révèle un modèle d'étude particulièrement attractif dans l'approfondissement de notre compréhension générale des processus écologiques et évolutifs façonnant les symbioses tripartites. En effet, la forte occurrence de ces symbioses permet de pouvoir dégager leur propriété générale et surtout de mieux comprendre quels sont les facteurs responsables des variations observées entre les systèmes.

Bien que la présence de champignons au sein de quelques mutualismes entre plantes et fourmis à été observée au début du XX^{ème} siècle (Bailey 1920), ce n'est que très récemment que leur diversité ainsi que leur rôle au sein de certaines interactions ont été mis en évidence. Ces interactions existent sous deux formes : soit le champignon est présent à l'intérieur des cavités creuses des plantes à fourmis (domaties) (Defosse et al. 2009), soit il se développe au niveau de galeries construites par les fourmis sous la tige de leur plante hôte (Dejean et al. 2005, Mayer and Voglmayr 2009) (Fig. 9). Dans le premier cas, l'investigation du rôle du champignon au sein de trois mutualismes plantes-fourmis a montré que les fourmis utilisent le champignon comme source de nourriture (Blatrix et al. 2012) et qu'il prend part au transfert de nutriments entre les trois partenaires (Defosse et al. 2011). Dans le deuxième cas, le champignon a un rôle structural, solidifiant les galeries des fourmis (Dejean et al. 2005), mais aussi nutritif, servant par exemple de médiateur trophique entre l'espèce de fourmis *Allomerus decemarticulatus* et la plante hôte *Hirtella physophora* (Leroy et al. 2011). Par ailleurs, ce rôle structurel a également été observé dans les nids de fourmis non arboricoles (Schlick-Steiner et al. 2008).

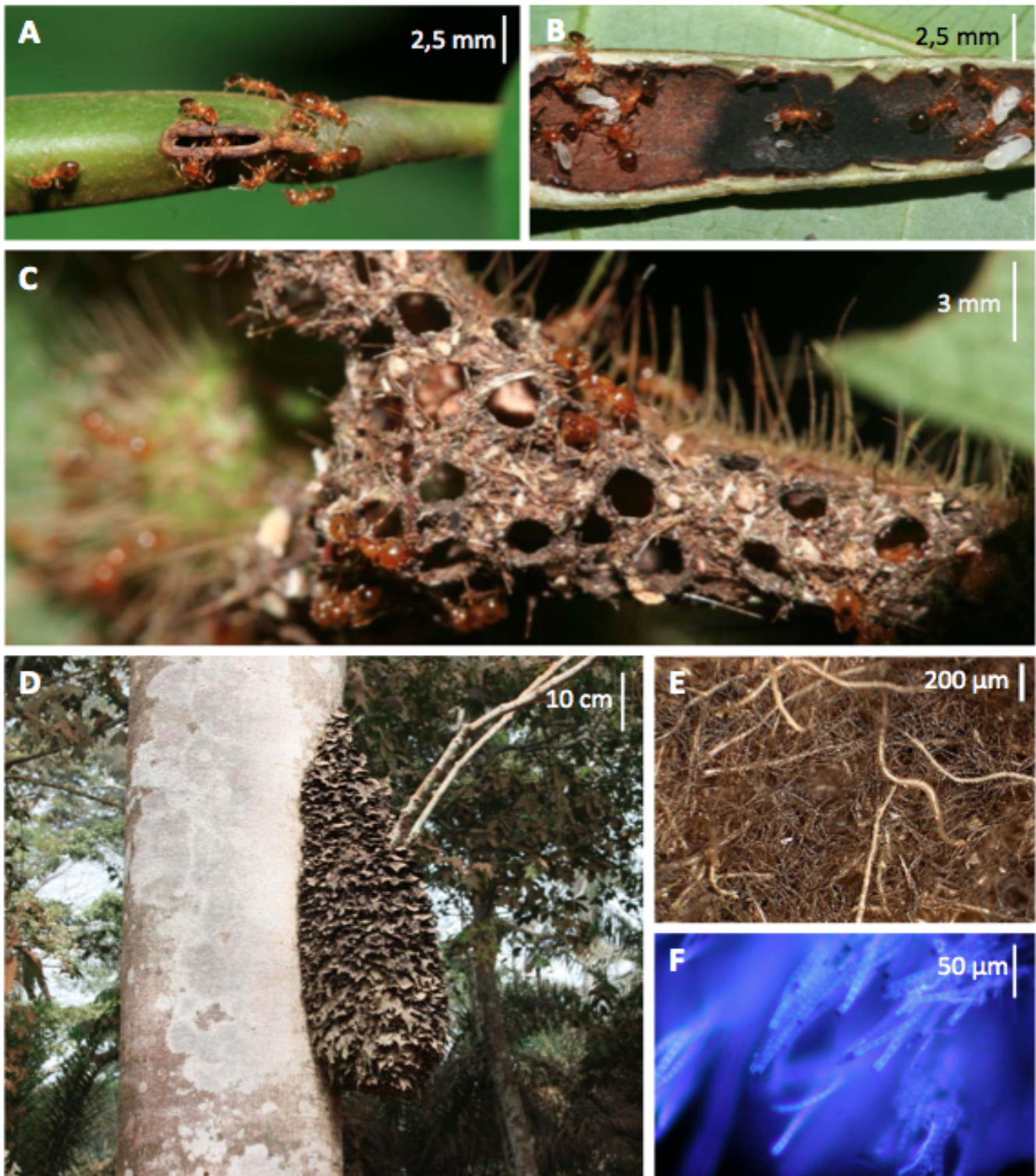


Figure 9 : Exemples d'interactions entre plantes, fourmis et champignons. Domatie (A) et coupe longitudinale de domatie (B) de *Leonardoxa africana* et fourmis symbiotiques associées *Petalomyrmex phylax*. Piège en carton (C) des fourmis *Allomerus decemarticulatus* sur la plante *Hirtella physophora*. Nid en carton (D) de *Crematogaster* sp. sur un tronc d'arbre au Cameroun. Hyphes de Chaetothyriales issus de carton (E). Hyphes de Chaetothyriales de domaties de *Barteria fistulosa* associés aux fourmis *Tetraponera aethiops* (F, coloration au calcofluor). Photographies ©R. Blatrix et H. Voglmayr (E).

Malgré cette différence importante dans l'écologie du champignon, toutes ces souches fongiques sont phylogénétiquement proches (Ascomycètes) (Fig. 10). Une grande partie de ces champignons appartiennent à l'ordre des Chaetothyriales, bien que certains font partie des Capnodiales ou des Venturiaceae, clades proches des Chaetothyriales (Voglmayr et al. 2011). L'ordre des Chaetothyriales contient des champignons ayant des modes de vie très différents. Au delà de leur association avec des fourmis, certains sont saprophytes, pathogènes d'animaux ou de plantes. D'autres vivent sur les rochers dénudés, dans les fonds marins ou encore dans les symbioses avec des bryophytes (Cannon and Kirk 2007, Crous et al. 2007, Gueidan et al. 2008, Zhao et al. 2010, Chomnunti et al. 2012). Presque tous sont des extrémophiles. Les travaux de Voglmayr et al. (2011) ont replacé 47 souches de champignons associés à ces symbioses dans une phylogénie des Chaetothyriales et ont révélé que la grande majorité de ces souches appartenaient à quatre clades monophylétiques (Fig 10). Deux clades sont spécifiques des souches présentes dans les constructions de fourmis, un clade est spécifique aux souches présentes dans les domaties et un clade présente les deux formes. Ainsi, les symbioses entre plantes et fourmis semblent fournir un environnement favorable à la croissance de ce groupe particulier de champignons, agissant comme un filtre écologique. La subdivision en différents clades monophylétiques montre également que certains groupes se spécialisent au sein des deux différentes niches écologiques.

Bien que l'occurrence et la diversité de ces champignons dans les mutualismes plantes – fourmis sont clairement établies, les facteurs évolutifs influençant ces interactions ainsi que l'identification des conflits émergeant de ces vraies symbioses tripartites n'ont pour le moment toujours pas été documentés. Néanmoins, indépendamment de ce contexte tripartite particuliers, l'influence de ces facteurs dans la stabilité évolutive des mutualismes est clairement établie dans plusieurs systèmes étudiés de façon binaire. Ainsi, la compréhension de la stabilité évolutive et de la régulation des conflits dans les mutualismes binaires est une première étape dans l'identification des facteurs écologiques et évolutifs émergeant des mutualismes tripartites.

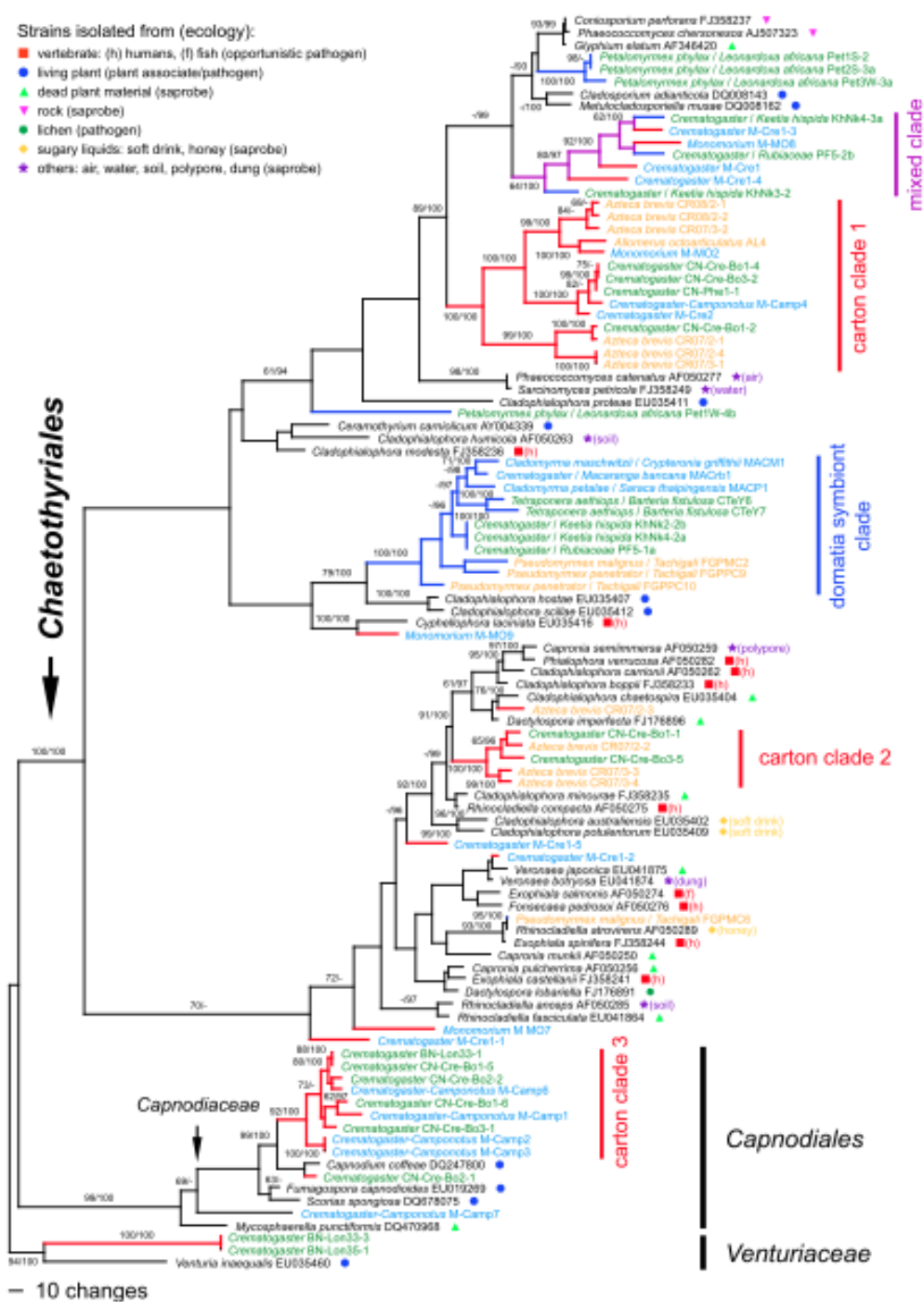


Figure 10. Phylogramme d'un des 32 arbres de maximum de parcimonie révélé par PAUP à partir d'une analyse de la matrice de Chaetothiales, Capnodiales et Venturiaceae sélectionnés du gène ITS_{LSU}. Ce phylogramme montre la position phylogénétique des champignons associés aux fourmis dans leur construction ou à l'intérieur des domaties. Les bootstraps de maximum de parcimonie au dessus de 60% et les probabilités postérieures Bayésiennes au dessus de 90% sont donnés en première et deuxième position, respectivement, au dessus et en dessous des branches. Les branches rouges correspondent aux isolats/clades issus de constructions de fourmis, les branches bleues sont les isolats issus de domaties. L'espèce de fourmis et l'espèce de plante associée sont données par le nom de l'isolat. Les isolats en vert proviennent d'Afrique (Cameroun), en jaune d'Amérique du sud et centrale (Costa Rica, Guyane française et Pérou) et en bleu d'Asie du sud-est (Malaisie, Thaïlande). Figure tirée de Voglmayr et al. (2011).

Mutualismes Plantes – Fourmis

Les interactions mutualistes entre plantes et fourmis sont extrêmement diverses, notamment dans la nature des services échangés. Les fourmis peuvent remplir quatre fonctions principales : la protection contre des insectes phytophages, la dispersion de graines, la nutrition et occasionnellement la pollinisation. Les plantes, quant à elles, fournissent de la nourriture et/ou des espaces de nidifications pour les colonies de fourmis. Avec plus de 100 genres de plantes et 40 espèces de fourmis impliqués, les mutualismes de protections entre plantes et fourmis sont ubiquistes et jouent un rôle prépondérant dans la structure des écosystèmes tropicaux (Heil and McKey 2003) Lorsque cette association est obligatoire, les plantes, dites myrmécophytes, fournissent à leurs fourmis associées des espaces de nidifications (domaties) et pour certaines de la nourriture sous forme de nectar extrafloral et/ou de corps nourriciers (Bronstein 1998). Les fourmis quant à elles, patrouillent sur le feuillage de leurs plantes hôtes et les protègent contre de nombreux insectes phytophages, certaines plantes compétitrices et peuvent également les protéger de certains champignons pathogènes (Heil and McKey 2003).

Les mutualismes obligatoires entre plantes et fourmis sont présents dans toutes les forêts tropicales humides de la planète et leurs origines découlent pour la plupart de l'association de traits pré-adaptés, remplissant un rôle supplémentaire dans l'association. Ainsi, chez les plantes, la production de nectar extrafloral et de corps nourriciers est un trait qui peut être présent chez des espèces non myrmécophytes (Fiala and Maschwitz 1992). Cette production est accessible à plusieurs espèces d'insectes, pas seulement des fourmis, qui se nourrissent de cette ressource et la protègent en s'attaquant à différents insectes, dont les insectes phytophages (Bronstein et al. 2006). La formation de certaines domaties est également issue de traits pré-adaptés. Les tiges ou les épines creuses, par exemple, sont présentes dans de nombreuses espèces non associées aux fourmis. Également appelées domaties primaires, elles peuvent être considérées comme un service non coûteux, issu d'un sous produit d'un trait présent avant l'association mutualiste. Alternativement, plusieurs études sur la formation des domaties foliaires, nommées domaties secondaires, montrent que ces dernières dérivent d'une structure modifiée dans le contexte du

mutualisme (Leroy et al. 2008, 2010). Parce que ces modifications structurales sont coûteuses pour la plante, ces domaties peuvent être considérées comme un service issu d'un investissement.

La protection des feuilles de la plante hôte par les fourmis est pour la plupart des cas également issue d'un sous-produit des activités égoïstes de prédation et de territorialité des fourmis (Dejean et al. 2007, Dejean et al. 2009). Cependant, dans certaines interactions spécialisées, les fourmis sont spécifiquement attirées à certaines parties de la plante (Janzen 1966, Agrawal 1998, Edwards et al. 2006). Dans ce cas, les patrouilles sont maximisées au niveau des feuilles les plus vulnérables et qui ont la plus grande valeur photosynthétique, suivant la théorie de la défense optimale (Rhoades 1979). L'origine évolutive de cette attraction, à savoir si elle provient de traits pré-adaptés, d'adaptations dans le contexte du mutualismes, ou d'une coadaptation entre les deux partenaires est toujours débattue mais devrait dépendre du contexte évolutif dans lequel se place l'interaction. Cette attraction peut être une préadaptation lorsque ces parties végétatives particulières représentent un lieu où l'acquisition de nourriture par les fourmis est maximisée (plus de proies potentielles et/ou une production plus forte de nectar extrafloral) (Romero and Izzo 2004). Cependant, la maximisation des bénéfices n'est pas obligatoire. Une protection optimale peut être simplement positivement sélectionnée chez les fourmis lorsque la fitness de la colonie dépend fortement de la croissance de sa plante associée (cf. p. 22-23). Dans ce cas, certains mécanismes proximaux sont nécessaires pour attirer les ouvrières vers les organes vulnérables de la plante (Brouat et al. 2000). Plusieurs études ont identifiées certains composés chimiques émis par la plante élicitant une réponse des ouvrières (Brouat et al. 2000, Edwards et al. 2007). La simple identification de ces composés ne permet néanmoins pas de conclure quant aux processus évolutifs responsable de cette attraction. L'émission de Méthyle salicylate, par exemple, est un phénomène connu chez de nombreuses non-myrmécophytes, attirant plusieurs espèces diversifiées d'insectes prédateurs, renforçant l'idée que cette production est apparue avant la mise en place du mutualisme (Edwards et al. 2007). Par contre, la surproduction de ce composé chez la plante *Leonardoxa africana* par rapport à sa plus proche relative non-myrmécophyte indique bien qu'il existe ici une adaptation dans le contexte du mutualisme (Brouat et al. 2000).

Les adaptations similaires des plantes et des fourmis à la vie en symbiose sur les différents

continents montrent que dans la grande majorité des cas, elles résultent de convergence évolutive ou d'évolution parallèle. Ces associations sont apparues de nombreuses fois indépendamment au cours de l'évolution. Il existe néanmoins quelques cas de radiation possible, où un genre contient plusieurs espèces de myrmécophytes, tels que *Macaranga* (Blattner et al. 2001), *Acacia* (Gómez-Acevedo et al. 2010) ou encore *Tachigali* (van der Werff 2008). La radiation évolutive des fourmis du genre *Crematogaster*, parallèle avec celle des *Macaranga*, montre cependant qu'il peut exister des phénomènes de coévolution et de cospéciation dans les mutualismes entre plantes et fourmis (Itino et al. 2002).

Ainsi, de manière générale, les traits responsables du mutualisme de protection entre myrmécophytes et fourmis à plante sont généralement issus de préadaptations. Ils peuvent néanmoins être modifiés dans le contexte du mutualisme en fonction des différents degrés de spécialisations des différents partenaires, qu'ils soient issus d'une coévolution ou d'une histoire phylogénétique commune. La modification de traits pré-adaptés par coévolution a déjà été documentée dans les mutualismes de protections plantes fourmis. Le mécanisme de « clé-et-serrure » entre l'espèce de plante *L. africana* et la fourmi *Petalomyrmex phylax* est un exemple modèle. Le trait de la plante est le prostoma, un petit organe non-lignifié à l'apex de la domatie que les fourmis creusent pour créer une entrée. Il existe dans ce système une correspondance exacte entre la dimension et la forme de la fourmi mutualiste et du prostoma, suggérant une coadaptation des deux partenaires (Brouat et al. 2001). Heil et al. (2005) ont également montré une coadaptation alimentaire unique entre les fourmis *Pseudomyrmex* et l'inusuel nectar extrafloral de leur plante hôte. Dans ces deux exemples, la coévolution des deux partenaires résulte de fortes pressions de sélections vers l'exclusion d'espèces de fourmis parasite du système (Kautz et al. 2009).

Il apparaît généralement que les associés sont davantage liés à leur environnement qu'à leur partenaire. En effet, la qualité de l'hôte pour la fourmi varie plus significativement avec le milieu qu'avec l'hôte lui-même. De la même façon, l'effet de la fourmi sur la *fitness* de la plante dépend plus fortement des conditions environnementales que de l'espèce de fourmi : par exemple, la qualité de la défense sera plus ou moins déterminante pour la plante en fonction de la quantité de ressources disponibles. Les changements d'hôtes, les colonisations *de novo* et les remplacements

de symbiontes expliquent les patrons d'évolution des partenaires. Certaines pressions de sélections peuvent néanmoins modifier ces patrons d'évolution, amenant la spécialisation très forte de certaines interactions.

Mutualismes Plantes – Champignons

Les interactions entre myrmécophytes et leurs champignons associés ont pour le moment été explorées dans seulement deux études (Defosse et al. 2011, Leroy et al. 2011).. Le corpus scientifique traitant de ces interactions particulières est encore faible et exploratoire mais la compréhension d'autres systèmes mutualistes entre plantes non myrmécophytes et champignons semble être un atout majeur pour étendre nos connaissances dans les mutualismes entre myrmécophytes et champignon. Deux types d'interactions plantes - champignons ont été jusqu'à présent extensivement étudiés : les mycorhizes, résultat de l'association symbiotique entre des champignons du sol et des racines d'une plante, et les associations endophytiques, entre les tissus aériens d'une plante et des champignons dits « endophytes ». Il existe néanmoins des interactions endophytiques au niveau des racines des plantes mais en règle générale, les champignons endophytes se caractérisent par leur développement au sein des feuilles de la plante (Brundrett 2002, Saikkonen et al. 2004).

Dans le premier cas, les échanges entre partenaires sont nutritifs. Le champignon permet généralement une meilleure assimilation des nutriments par la plante, surtout le phosphate et dans une moindre mesure l'azote, lorsque ceux-ci sont présents de manière insoluble ou à faible concentration. La plante, quant à elle, fournit au champignon des produits photosynthétiques sous forme de sucres simples. Les échanges au niveau des interactions entre plantes et champignons endophytes sont fonctionnellement différents. Par la sécrétion d'alcaloïdes nocifs pour de nombreux herbivores ou de mycotoxines et autres enzymes, les champignons endophytes jouent principalement un rôle de « défenses acquises » pour la plante (Saikkonen et al. 1998). En échanges, la plante hôte joue le rôle de refuge pour ces champignons, leur fournit certains

nutriments et, dans le cas des champignons endophytes transmis verticalement, devient un vecteur de dissémination (Saikkonen et al. 1998). L'infection des tissus de la plante permet également aux champignons endophytes d'avoir un accès principal à la matière organique au moment de la sénescence des feuilles.

Toutes les mycorhizes sont symbiotiques, mais elle ne sont pas toutes mutualistes (Brundrett 2004), ainsi dans les interactions entre champignons et plantes myco-hétérotrophes, l'incapacité des plantes à produire des métabolites pour son associé rend l'interaction parasitaire (Brundrett 2004). Le transport de nutriments dans les mycorhizes apparaît au niveau d'une interface spécialisée qui est le résultat du développement coordonné des deux organismes (Smith et al. 1994). L'interface cellulaire des mycorhizes est composée des membranes des deux organismes, séparées par une région apoplastique. Les structures de ces interfaces sont très variables et s'étendent d'un simple contact intercellulaire entre les deux parois dans les ectomycorhizes jusqu'à des structures très spécialisées dans les mycorhizes à arbuscules (Smith et al. 1994). Cette diversité fonctionnelle s'accompagne d'une forte diversité phylogénétique (Brundrett 2002).

L'origine évolutive des mutualismes entre plantes et champignons semble dériver d'interactions parasitaires. Il existe par ailleurs dans les mutualismes entre plantes et champignons endophytes certaines composantes parasitaires, même dans les interactions spécialisées et obligatoires. Ainsi, ces symbioses se caractérisent par un continuum entre parasitisme et mutualisme, variant en fonction des contraintes phylogénétiques et des traits d'histoire de vie, de la géographie, ainsi que de leur interaction avec les autres espèces de la communauté et des facteurs abiotiques (Saikkonen et al. 2004). Brundrett (2002) propose une séquence dans l'évolution du mutualisme entre champignons endophytes et plantes. (1) Les champignons sont attirés par les exudats de la plante et prolifèrent à sa surface. (2) Ils développent des mécanismes pour pénétrer les plantes sans leur causer de dommages. (3) L'espace à l'intérieur des plantes devient un habitat important pour ces endophytes, leur fournissant un abris contre des conditions environnementales défavorables et contre certains parasites. (4) Les champignons deviennent dépendants de l'hôte pour l'acquisition de ressources énergétiques. (5) Les hyphes augmentent leur surface d'absorption et leur perméabilité au sein de la plante. Brundrett (2002) argumente également sur le fait que les interactions mycorhiziennes sont issues d'adaptations spécifiques de certains

champignons endophytes habitant les racines de la plante dans l'absorption de nutriments et fait l'hypothèse d'une séquence évolutive entre ces deux partenaires. (1) Des adaptations des hyphes pour une absorption efficace des nutriments de la plante en résultent une perte de nutriments minéraux récupérés par les plantes. (2) Les plantes abritant des champignons obtiennent des minéraux de manières plus efficaces. (3) Les plantes évoluent certaines adaptations permettant une reconnaissance des champignons pour distinguer les champignons mycorhiziens des pathogènes. (4) Des cellules spécialisées de chaque partenaire développent une zone d'interface où les échanges apparaissent. (5) Les plantes obtiennent la capacité de digérer les vieux hyphes au sein de leurs cellules. (6) Les hyphes augmentent leur capacité d'absorption des minéraux limitant la croissance de l'hôte. (7) Les plantes deviennent dépendantes du champignon à un niveau de fertilisation des sols normal. (8) Les champignons deviennent dépendants des plantes pour leur source de nourriture. Ainsi les différentes interactions entre plantes et champignons se situent le long de cette séquence évolutive, définissant ainsi leur spécificité et leur dépendances vis à vis de leur partenaire.

Mutualismes Fourmis – Champignons : l'agriculture

Il existe dans les écosystèmes néotropicaux un exemple modèle de relation mutualiste entre champignon et fourmis. La tribu des Attini (sous famille des Myrmicinae) est un groupe monophylétique de plus de 220 espèces de fourmis qui cultivent un champignon comme source de nourriture (Mueller et al. 2001). L'agriculture se définit comme un mutualisme hyper spécialisé où un agriculteur et un cultivar échangent des services spécifiques. Le cultivateur, par son comportement, protège, améliore les conditions de croissance du cultivar et sélectionne des cultivars particuliers. Le cultivar, par ses propriétés nutritionnelles, servira de nutrition pour le cultivateur. Cet échange de services, tel qu'il a été défini par Mueller chez les insectes, ne s'applique pas seulement aux fourmis Attine, mais également aux termites Macrotermitinae et

aux coléoptères de la famille des Scolytinae et Platipodinae (Farrell et al. 2001, Aanen et al. 2002).

Différentes lignées cultivent leur champignon sur différents substrats. Le substrat utilisé par les Attines basales se compose de fleurs, de carcasses d'arthropodes, de graines, de fragments de bois alors que les Attines supérieures utilisent principalement des feuilles et des fleurs fraîches (Mueller et al. 2005). La protection du cultivar chez les Attines est assurée par deux mécanismes. Premièrement la protection du cultivar contre un pathogène spécialiste est assurée par un troisième symbiote mutualiste (Currie et al. 1999). Ce symbiote, une bactérie filamenteuse appartenant au genre *Streptomyces*, produit des antibiotiques ciblés spécifiquement contre un champignon parasite *Escovopsis* (Ascomycete). Nous avons de plus vu précédemment que le microbiome composant les cuticules des Attines se composaient de plusieurs souches, certaines acquises horizontalement (Little et al. 2006). Le second mécanisme implique la production et la sécrétion d'antibiotiques au niveau de glandes exocrines spécialisées (glandes mandibulaires et métapleurales) (Bot et al. 2001a). Ces glandes sécrètent plusieurs molécules qui, ensemble, permettent une protection généralisée contre plusieurs bactéries et champignons pathogènes (Mendonca et al. 2009).

Les champignons associés appartiennent tous à la tribu des Leucocoprinae, à l'exception près une transition vers l'agriculture d'un champignon appartenant aux Pterulaceae chez un groupe de fourmis basales. Ces mutualismes ont une origine unique qui est apparue il y a 45-65 millions d'années. Le succès écologique de ces associations a permis une importante radiation coévolutive du champignon et des fourmis, par colonisations de niches vacantes (Mueller et al. 2001). Cinq grandes transitions évolutives sont apparues au cours des temps évolutifs (Ted and Seán 2008). Il est possible de discriminer deux grands groupes en fonction de leurs propriétés générales. Le premier est représenté par les Attines pratiquant soit une agriculture dite inférieure, soit une agriculture d'un groupe de champignon particulier (Pterulaceae), ou soit une agriculture d'une forme particulière de champignon (levure) (Ted and Seán 2008). Dans ces cas, le champignon peut vivre de manière libre alors que les fourmis ne peuvent vivre sans leur association avec le champignon. La relation n'est donc pas strictement obligatoire pour les deux partenaires. Au

contraire, il n'existe pas de forme libre du champignon chez le deuxième groupe, les Attines pratiquant une agriculture dite supérieure (genres *Trachymyrmex*, *Acromyrmex* et *Atta*).

Chez les Attines, la transmission du champignon est assurée verticalement. Les reines fondatrices récupèrent un inocula de champignon de leur colonie natale, l'emporte pendant le vol nuptial et l'utilise comme culture de départ pour former une nouvelle colonie (Mueller et al. 2005). De ce processus découle une congruence phylogénétique des cultivars et des fourmis à l'échelle des cinq groupes majeurs de la tribu des Attini. Cette congruence est une conséquence directe de la cospéciation entre groupes de cultivars et groupes de fourmis. De cette coévolution entre les attines et le champignon émerge également de nouvelles structures chez le champignon (ex: gongylidia, structure nouricière). Aucun retour vers un mode de vie sans agriculture n'est apparu chez les Attines, démontrant leur forte spécialisation et le succès écologique de ces associations.

Cette congruence entre les phylogénies n'est cependant pas vérifiée au sein des différents groupes. Par exemple, les fourmis coupeuses de feuilles (*Atta* et *Acromyrmex*; 40 espèces connues) partagent toutes une même espèce de cultivar (Mikheyev et al. 2006). Il existe ainsi de nombreux transferts horizontaux à large échelle géographique entre les différents cultivars de ces espèces de fourmis par acquisition horizontale suivie par une transmission verticale ou par reproduction sexuée et recombinaisons génétiques. Ceci a été confirmé par (Mikheyev et al. 2007) en utilisant des marqueurs microsatellites. A une échelle géographique plus fine, les populations du cultivar sont peu structurées par rapport aux populations de fourmis.

Systeme d'étude

Les fourmis du genre *Allomerus*

Le genre *Allomerus* (Myrmicinae), comprend à ce jour huit espèces décrites, uniquement réparties dans les néotropiques (Fernandez 2007). Elles sont toutes arboricoles, et les deux espèces qui ont été à ce jour étudiées construisent des galeries sur les tiges de leurs plantes hôtes. *A. decemarticulatus* est obligatoirement et spécifiquement associée à *Hirtella physophora* (Chrysobalanaceae) alors que *A. octoarticulatus* interagit avec de plusieurs plantes myrmecophytes : *Cordia nodosa* (Boraginaceae), *Hirtella physophora*, et *Tococa guianensis* (Melastomataceae) (Solano et al. 2003). Cependant, des études moléculaires non publiées montrent qu'il existe au moins deux espèces d'*A. octoarticulatus* bien distinctes: une spécifiquement associée à *C.nodosa* et une généraliste; associées aux autres plantes cités ci-dessus (Fig. 11). En Guyane Française, cette espèce a toujours été décrite en association avec *H. physophora*. Nous appellerons ainsi *A. octoarticulatus* ssp1 la fourmis associée spécifiquement à *C. nodosa* et *A. octoarticulatus* ssp2 la fourmis généraliste. Nous nous intéresserons ici donc à trois couples plantes fourmis :

- *H. physophora* associée à *A. decemarticulatus*
- *H. physophora* associée à *A. octoarticulatus* ssp2
- *C. nodosa* associée à *A. octoarticulatus* ssp1

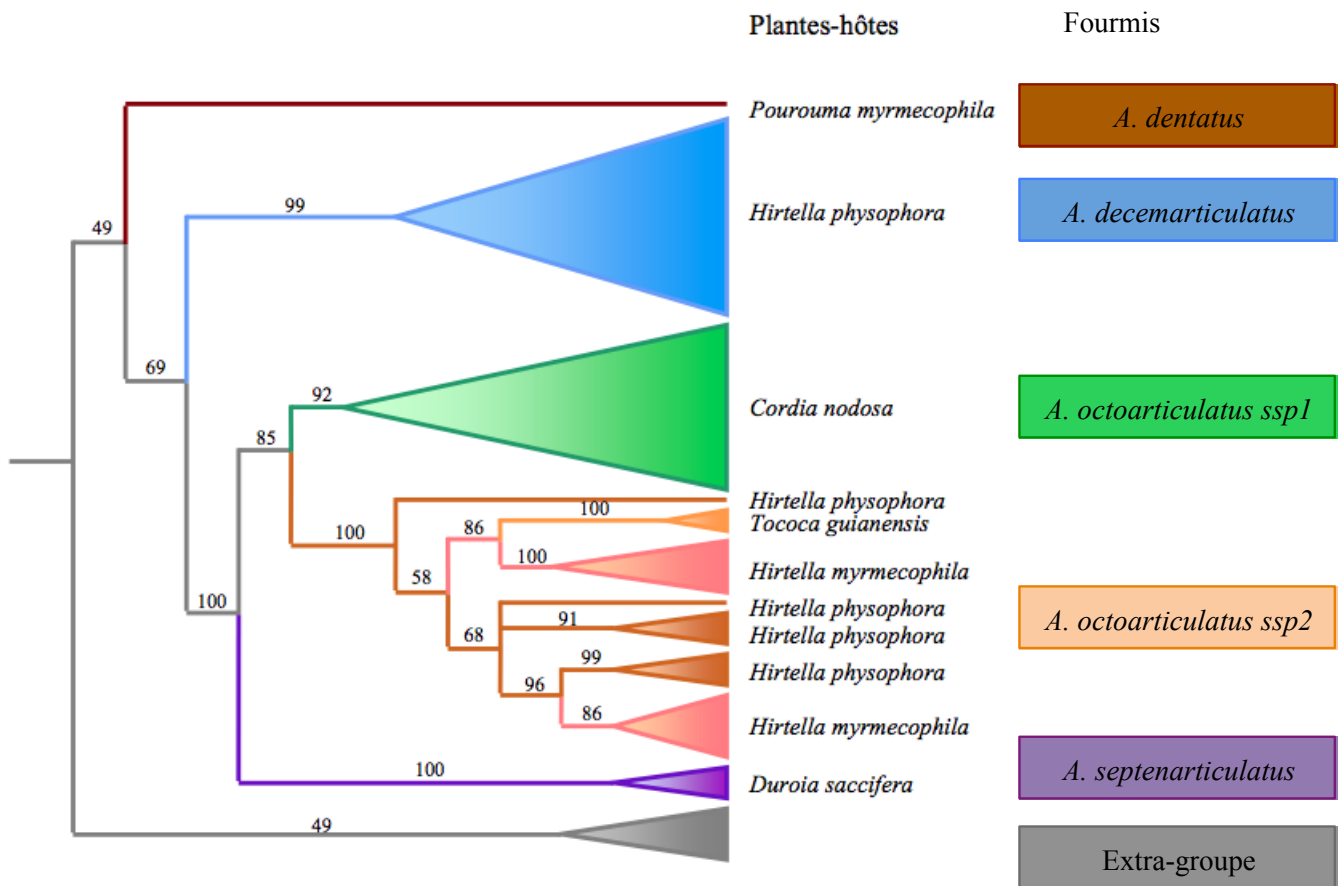


Figure 11. Phylogénie d'une partie du genre *Allomerus* construite sur la base de séquences du *cytochrome B* et de la sous-unité de la *cytochrome oxydase* (1060 paire de bases au total) à l'aide de méthodes Bayésiennes de reconstructions phylogénétiques. Les valeurs de support associées aux nœuds correspondent probabilités postérieures. Les couleurs des clades correspondent aux espèces de fourmis représentées dans les cadres (l'extra groupe est composé de quatre fourmis non arboricoles: *Monomorium subopacom*, *Diploproctum* sp., *Solenopsis saevissima* et *Wasmannia auropunctata*). Les différentes nuances d'orange correspondent aux plantes hôtes auxquelles sont associées les *A. octoarticulatus*. Tirée de Malé (2011).

Hirtella physophora & *Allomerus decemarticulatus*

Comme la majorité des mutualistes de protection plantes fourmis, *H. physophora* loge une unique colonie d' *A. decemarticulatus* dans des domaties situées à la base du limbe. De plus, la plante nourrit les fourmis via la production de nectar extrafloral (essentiellement composé de

carbohydrates) sécrétés au niveau de nectaires situés sur la face inférieure du limbe et à l'intérieur des domaties. En contrepartie, les fourmis protègent leur plantes hôtes contre divers insectes phytophages, généralement au niveau des jeunes feuilles (Dejean et al. 2001). Ce mutualisme est dit obligatoire car aucune des deux espèces ne peut vivre sans l'autre (du moins localement pour la plante). Elle est également très spécifique, résultat possible d'évènements de coévolution entre les deux partenaires (Grangier et al. 2009). Il semblerait que cette espèce soit capable de localiser spécifiquement les plantules (sans doute via la reconnaissance de composés volatils émis par la plante), expliquant une colonisation massive et très rapide des fourmis (Grangier et al. 2009). Il arrive par contre souvent que plusieurs reines fondatrices colonisent une même plantule. La croissance de la colonie connaît ainsi un passage de la polygynie vers la monogynie, mécanisme encore mal connu chez les *Allomerus*. Les ouvrières de différentes colonies ne sont pas agressives entre elles (Grangier et al. 2009), ainsi, nous ne savons pas encore si le passage vers la monogynie se traduit par la seule destruction des reines les moins compétitrices ou de la totalité de la colonie qu'ont engendré ces reines. Lorsque les jeunes reines s'installent dans une domatie d'une nouvelle plante, elles rebouchent l'entrée avec un mélange de trichomes et de matière végétale provenant de l'intérieur de la domatie (fondation claustrale). Ce bouchon est ensuite renforcé par le développement mycélien du champignon associé aux fourmis (Ruiz-González et al. 2011).

La protection des jeunes feuilles par les fourmis est issue de leur comportement de fourragement, à la recherche de proies potentielles (Grangier et al. 2008). Sachant que ce comportement est issu d'un sous produit de l'activité égoïste des fourmis, il ne peut être soumis à un comportement de tricherie. Néanmoins, les colonies de fourmis présentent un comportement de castration partielle envers les bourgeons floraux de leur plante hôte (Malé et al. 2012). La sélection de ce comportement chez les fourmis peut être expliquée par une réallocation par la plante des ressources prévues pour sa reproduction vers sa croissance végétative. Ce phénomène aurait donc comme conséquence directe une augmentation des espaces de nidification pour les fourmis. La résolution de ce conflit d'intérêt entre les deux partenaires peut être expliquée par deux mécanismes. Premièrement, il semblerait que la plante soit capable de répondre à une castration trop virulente des fourmis par une diminution du volume des domaties et des nectaires extrafloraux (Malé et al. submitted). Cette limite de virulence permettrait ainsi de pérenniser

l'association, permettant une faible mais néanmoins suffisante reproduction des *H. physophora*. De plus, Même si une transmission pseudo-verticale (alignement des intérêts reproducteurs) n'a pas été mise en évidence, les populations des deux associées sont génétiquement structurées. Cette transmission locale de l'association sélectionne également une diminution de la virulence des fourmis par la présence d'un feedback de la fitness de la plante vers la fitness des fourmis.

Hirtella physophora & *Allomerus octoarticulatus* ssp2

Ce couple plante fourmis est le moins connu des trois interactions étudiées. L'association apparait localement en Guyane française. Actuellement seulement trois populations sont connues, dans la région de Kaw, où *A. octoarticulatus* ssp2 est la seule habitante des *H. physophora*, et à la Montagne des Singes et à Saül où elle est en compétition avec *A. decemarticulatus* pour l'occupation des plantes. Les mécanismes permettant la coexistence des deux espèces de fourmis au sein de cette région ne sont toujours pas connus. Les échanges de service entre la plante et la fourmis sont les mêmes qu'entre *A. decemarticulatus* et *H. physophora*.

Cordia nodosa & *Allomerus octoarticulatus* ssp1

Les échanges entre ces deux partenaires sont un classique des mutualismes de protection entre plante et fourmis (Dejean et al. 2004). En plus des sécrétions de nectar extrafloral, *C. nodosa* synthétise des corps nourriciers au niveau de ses jeunes feuilles (Solano et al. 2005). Les fourmis protègent alors ces ressources en attaquant les insectes attirés. Comme *A. decemarticulatus*, *A. octoarticulatus* ssp1 détruit les bourgeons floraux de sa plante hôte, à la différence que celle-ci est systématique et presque totale (Frederickson 2009). Deux mécanismes sont évoqués dans le maintien de ce mutualisme. Premièrement, *A. octoarticulatus* n'est pas la seule habitante de *C. nodosa*. Elle est en compétition avec plusieurs espèces d'*Azteca* pour l'espace de nidification

offert par *Cordia*. Cette dernière est, comparée à *A. octoarticulatus*, une vrai mutualiste. En effet elle ne détruit pas les bourgeons floraux de sa plante hôte, ce qui lui permet de se reproduire et garder une taille de population stable. La coexistence des ses deux espèces de fourmis s'explique par un compromis entre une plus forte capacité de colonisation des *A. octoarticulatus* et une plus importante capacité de dispersion des *Azteca*. Ainsi quand les populations de *Cordia* sont denses, *A. octoarticulatus* acquiert un avantage sélectif face aux *Azteca*. Cela s'inverse quand les plants de *Cordia* sont plus épars, les fortes distances de colonisations des *Azteca* leur donne un avantage par rapport aux *A. octoarticulatus* (Yu et al. 2001). Un autre mécanisme impliqué dans le maintien de l'association peut s'expliquer par un phénomène de tolérance de *C. nodosa* face à la castration des *Allomerus* (Edwards and Yu 2008). En effet, lorsque habitée par *A. octoarticulatus* ssp1, les *Cordia* produisent significativement plus d'inflorescences au niveau des très jeunes branches que lorsque habitée par *Azteca*. A ce niveau là, les domaties produites ne sont toujours pas habités, faute de place. La production de fleurs à ce niveau évite une trop forte densité d'ouvrières et ont une probabilité plus importante de fleurir et de produire certains fruits.

Les galeries

Toutes les fourmis du genre *Allomerus* construisent des galeries le long des tiges de leurs plantes hôtes respectives. Malgré de nombreuses variations dans la structure et dans les matériaux utilisées, l'architecture générale de ces galeries est similaire chez les trois espèces de fourmis présentes en Guyane française. Présentes sous les tiges de la plante et au niveau du tronc, ces galeries sont percées de trous de diamètre égal à celui de la tête des ouvrières. Ces galeries sont utilisées par les *Allomerus* comme piège, leur permettant de capturer des proies jusqu'à 1600 fois leur poids (Dejean et al. 2005). Pour cela, les ouvrières se postent à l'affût au niveau des trous, mandibules ouvertes. Lorsqu'un insecte se pose sur les galeries, ses pattes et ses antennes sont immédiatement saisies par les ouvrières. Ces dernières entraînent les pattes à l'intérieur de la galerie. De ce fait, le corps de l'insecte se retrouve plaqué à la surface de la galerie. Une fois immobilisé, de nombreuses ouvrières vont alors sortir des galeries et piquer l'insecte jusqu'à ce

que mort s'en suit. A partir de là, la proie est transportée au niveau des domaties de la plante, lieu de consommation.

La séquence de construction des galeries a été étudiée en détails chez *A. decemarticulatus* (Ruiz-González et al. 2011). Au départ, les ouvrières découpent les trichomes de la plante au niveau de la partie inférieure des tiges et créent ainsi un chemin libre de trichomes. Puis elles utilisent les trichomes précédemment découpés pour construire la voute de la galerie. Cette voute est soutenue par des trichomes servant de pilier présents de part et d'autre du chemin. Les ouvrières vont ensuite mastiquer l'intérieur de la domatie pour former des pelotes de matière organique qu'elles vont coller à l'intersection de certains trichomes. Finalement, elles inoculent un bout de champignon au niveau de ces pelotes. Le champignon va ensuite se développer et former le « ciment » de la galerie. Cette dernière sera ensuite consolidée par l'ajout de carcasses de proies et autres débris végétaux par les fourmis.

Il existe néanmoins de nombreuses variations dans la construction de ces galeries en fonction de l'espèce d'*Allomerus* considérée. Même si cela n'a toujours pas été quantifié, le nombre de trichomes utilisés quand la construction semble être inférieure chez *A. octoarticulatus* ssp2 que chez *A. decemarticulatus*. Ils ne sont pratiquement pas utilisés dans la construction des galeries par *A. octoarticulatus* ssp1. De même, la quantité de mycélium varie grandement entre les trois types de galeries. Très présents en forte densité dans les galeries construites par *A. decemarticulatus* et *A. octoarticulatus* ssp1, le champignon est beaucoup plus rare dans les galeries d'*Allomerus octoarticulatus* ssp2.

Le troisième partenaire

L'étude du champignon associé aux *Allomerus* s'est majoritairement concentrée sur la relation liant *A. decemarticulatus*, *H. physophora* et le champignon des galeries. Les études moléculaires du champignon ont montré qu'il s'agissait de la même espèce dans les différentes populations étudiées (Ruiz-González et al. 2011). Cette espèce, proche de *Trimmatostroma cordae*, est un

champignon ascomycète appartenant à l'ordre des *Chaetothyriales*. La relation qui lie les fourmis et la plante au champignon est ainsi spécifique. De plus le champignon semble obligatoirement associé aux fourmis : la mort de la colonie entraîne la mort du champignon et sa présence au niveau de la plante hôte nécessite les fourmis. Les marqueurs moléculaires ITS et EF1 α ont révélé l'existence de 15 haplotypes. Parmi ces haplotype, un représente 75% des souches décrites (91 souches). Cette information et le fait qu'aucune structure sexuée n'a été encore aperçue indiquent que le champignon pourrait se reproduire clonalement.

Leroy et al (2011) ont montré en parallèle qu'il existait des transferts nutritionnels entre les différents partenaires de l'association. En effet, Le champignon joue le rôle de médiateur trophique entre les fourmis et la plante. Alors que les transferts entre les fourmis et la plante existent sans la présence du champignon, sa participation permet un apport supplémentaire d'azote pour la plante. La relation qui lie les *A. decemarticulatus* et le champignon est donc spécifique et obligatoire

Le site d'étude: la Guyane française

La Guyane française est un département d'outre mer situé sur la cote nord-ouest de l'Amérique du Sud, sur le plateau des Guyanes. Elle partage ses frontières entre le Brésil, à l'est et au sud, le Suriname, à l'ouest, et l'océan Atlantique, au nord. Situé à 4° au nord de l'équateur, le climat de la Guyane française se caractérise par un fort taux d'humidité atmosphérique (80 à 90%) et des températures annuelles constantes (26°C en moyenne). Les déplacements saisonniers de la zone intertropicale de convergence (ZIC) façonnent quatre saisons: une petite saison des pluies (novembre-janvier), une petite saison sèche février-mars), une grande saison des pluies (avril-juillet) et une grande saison sèche (août-octobre).

Le plateau des Guyanes présente une richesse spécifique très forte. Il compte par exemple plus de 13000 espèces de plantes vasculaires, dont plus de 5000 recensées en Guyane française. Les travaux présentés dans cette étude se situent dans huit localités différentes.

L'intérêt des différents sites d'études porte sur la présence ou l'absence de certaines des trois systèmes d'études utilisés. Ainsi, à la montagne des Singes et à Saül, les trois espèces de fourmis vivent en sympatrie. A Petit Saut et aux Nouragues, seules *A. decemarticulatus* et *A. octoarticulatus* spp1 sont présentes. A Patawa, *A. octoarticulatus* spp1 et *A. octoarticulatus* vivent en sympatrie. Aux Chutes voltaires et au Bronwsberg (seule population située en dehors de la Guyane française, au Suriname), seule *A. octoarticulatus* spp1 est présente. Enfin, à Fourgassier, seule *A. decemarticulatus* et *A. octoarticulatus* spp2 sont présentes.

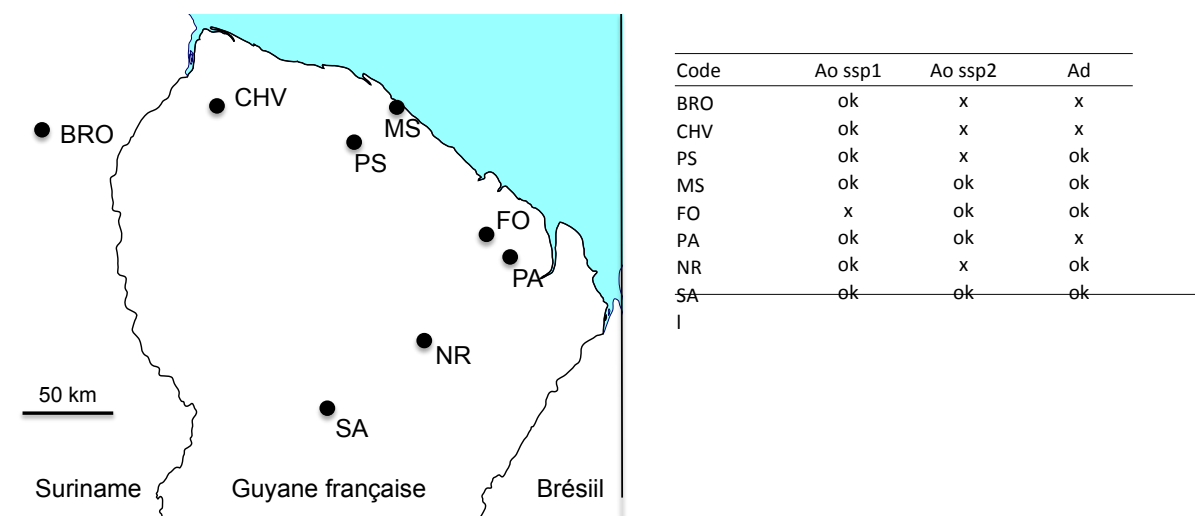


Figure 12. Carte des localités échantillonnées et tableau qui représente la présence ou l'absence des espèces de fourmis échantillonnées. Les huit populations échantillonnées : Brownsberg (BRO), les chutes Voltaires (CHV), la montagne des singes (MS), petit saut (PS), les chutes Fourgassier (FO), patawa (PA), les Nouragues (NR) et Saül (SA). « Ao spp1 » représente *A. octoarticulatus* spp1, « Ao spp2 » représente *A. octoarticulatus* spp2 et « Ad » représente *A. decemarticulatus*. Les « x » représentent l'absence de l'espèce de fourmis considérée pour les populations considérées et les « ok » représentent la présence de l'espèce de fourmis considérée.

Organisation de la thèse

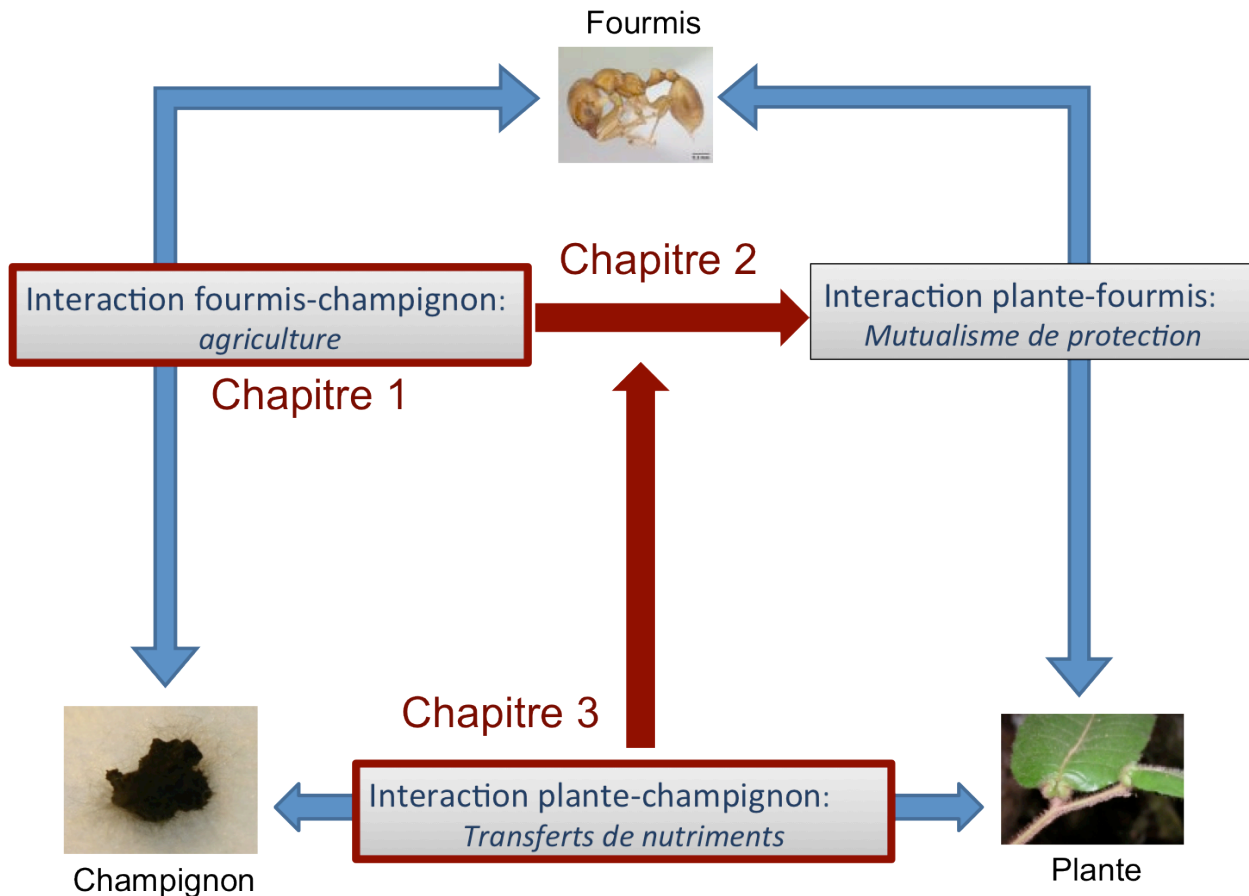


Figure 13. Schéma de l'organisation de la thèse. Le chapitre 1 explorera les composantes écologiques et évolutives qui lient mutualistiquement les fourmis et le champignon. Le chapitre 2 se concentrera les effets de l'interaction entre les fourmis et le champignon sur la modulation des résultantes écologiques entre la plante et les fourmis. Le chapitre 3 se focalisera sur l'étude des composantes écologiques de l'interaction entre le champignon et la plante.

L'objectif principal de cette étude est de comprendre les processus écologiques et évolutif façonnant des mutualismes tripartites. Le système *Allomerus* - plante myrmécophytes - champignons est particulièrement adapté à cet objectif. En effet, les relations qui lient les espèces de fourmis et leurs plantes ont été extensivement étudiées ce qui permet une prise en compte

précise du troisième partenaire fongique dans la modulation des résultantes écologiques de ce tripartisme.

Le premier chapitre se concentrera sur l'identification des échanges de services entre les fourmis et le champignon (Fig. 13). L'hypothèse que la relation entre les fourmis du genre *Allomerus* et leur symbiote fongique est issue d'un processus d'agriculture sera testée. Nous savons déjà que les fourmis protègent et façonnent un substrat spécifique pour la croissance du champignon. La dernière étape clé dans la démonstration complète de l'agriculture est donc de démontrer que la spécificité observée entre les fourmis et le champignon est issue d'une sélection active par les fourmis. La structure génétique du champignon dans différentes populations et associées aux différentes espèces de fourmis sera ainsi examinée.

Le deuxième chapitre se focalisera sur la compréhension de la modulation des résultantes écologiques entre la plante et les fourmis en fonction de ce troisième partenaire fongique (Fig. 13). Nous utiliserons ainsi une approche comparative entre les différents systèmes étudiés pour comprendre en quoi les variations des différentes relations entre chaque partenaire par pair vont moduler les interactions entre les trois partenaires. Nous nous focaliserons surtout sur les deux interactions comprenant la plante *H. physophora*. En effet, l'utilisation de la même plante hôte permettra de tirer des conclusions claires dans l'identification des processus écologiques sous-jacents.

Enfin, dans un troisième chapitre, nous étudierons l'importance des transferts nutritifs comme mécanismes régulateur des conflits (Fig. 13). Le champignon joue un rôle de médiateur trophique entre les espèces de fourmis et les espèces de plante, mais c'est finalement l'espèce que fourmis qui semble jouer un rôle prépondérant dans l'intégration des ressources azotées dans le système, ressource limitante dans les sols des forêts tropicales humides. Ici aussi, nous utiliserons une approche comparative des processus nutritifs se déroulant dans les deux systèmes comprenant *A. octoarticulatus* ssp2 et *A. decemarticulatus*. Enfin, la synthèse des résultats concernant notre étude sera mise en perspective dans le contexte général de la régulation des conflits et de la coévolution dans les mutualismes multipartites.

Chapitre 1. Fongiculture chez les fourmis du genre *Allomerus*

Articulation des articles

Nous avons testé l'hypothèse selon laquelle la relation mutualiste liant les trois espèces de fourmis étudiées à leur symbiote fongique était issue d'un processus d'agriculture, introduit par l'**Article 1**. La première étape clé dans l'investigation d'une telle relation était de mettre en place une méthode simple permettant la culture de souches pures du champignon associées aux trois espèces de fourmis étudiées (**Article 2**). Parce que la mise en évidence de l'agriculture dans une symbiose nécessite l'utilisation de marqueurs génétiques très variables, nous avons développé une banque de microsatellites pour le symbiote fongique (**Article 3**). Finalement l'investigation de la structure génétique du champignon symbiotique au sein de différentes espèces de fourmis dans différentes populations de la Guyane Française nous a permis de mettre en évidence un processus d'agriculture au sein du genre *Allomerus* (**Article 4**).

Abstract – Article 1

The interaction between *Allomerus* plant-ants and an ascomycete fungus growing on and strengthening their galleries is not opportunistic. We previously demonstrated that this association is highly specific as only one fungal species represented by a few haplotypes was found associated with the ants. We also discovered that the ants' behavior revealed a major investment in manipulating and enhancing the growth of their associated fungus. We have growing evidence that this specificity is consistent with selection by the ants. Here, we discuss this selection within the framework of insect agriculture, as we believe these ants fulfill all of the prerequisites to be considered as farmers. *Allomerus* ants promote their symbiont's growth, protect it from potential pathogens and select specific cultivars. Taken together, we think that the interaction between *Allomerus* ants and their cultivar might represent the first case of insect fungiculture used as a means of obtaining building material.

Keywords: *Agriculture, ant-plant-fungus interaction, selection, Allomerus decemarticulatus, Trimmatostroma sp.*

Article 1. New findings in insect fungiculture: Have ants developed non-food, agricultural products?

Published in: *Communicative and Integrative Biology*. 2011 (4:728-730)

Jérémie Lauth¹, **Mario X. Ruiz-González**^{2,3} and **Jérôme Orivel**⁴

¹Université des Antilles et de la Guyane ; UMR Ecologie des Forêts de Guyane, Campus Agronomique, F-97379 Kourou cedex, France

² CNRS; EDB (Laboratoire Evolution et Diversité Biologique), Université Toulouse III, 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse cedex 9, France

³ Present address: Abiotic Stress Department, Integrative and Systems Biology Group. Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, C.S.I.C. – U.P.V. C/ Ingeniero Fausto Elio s/n. 46022 Valencia, Spain.

⁴ CNRS, UMR Ecologie des Forêts de Guyane, Campus Agronomique, F-97379 Kourou cedex, France.

Addendum

Agriculture refers to highly specialized mutualisms in which two partners (i.e. a farmer and a cultivar) exchange specific services. To be considered a “farmer”, an organism must fulfill at least three major criteria: (i) the habitual planting of a cultivar on a favorable substrate and improving its growing conditions, (ii) protection from potential parasites and competitors, and, most importantly, (iii) the selection of specific cultivars (Mueller et al. 2005). In return, the cultivar is used by the farmer as a source of nutrients or as a trade good. These mutualisms have evolved only a few times: once for humans and at least 10 separate times for insects from four orders (i.e. ants, termites, ambrosia beetles and gall midges)(Farrell et al. 2001, Aanen et al. 2002, Mueller et al. 2005, Rohfritsch 2008). Although humans cultivate a large array of crops, using them in diversified ways (e.g. alimentation, pharmacology, construction, ornamentation), known cases of agriculture by insects are restricted to the cultivation of fungi for food. Among them, the fungiculture developed in the higher Attine (“leaf-cutter” ants) has been the best studied (Hölldobler and Wilson 1990). In this system, the interaction is obligatory for each partner and the vertical mode of fungal propagation is thought to have played a decisive role in the coevolutionary history of both partners, even leading to the emergence of new fungal structures (e.g. gongylidia) (Mueller et al. 2001, Schultz and Brady 2008). The ecological success of this fungiculture facilitated the great diversification of fungus-growing ants. The production of goods, however, remains known only for humans.

We recently described a non-food based mutualism between the plant-ant *Allomerus decemarticulatus* Mayr (Myrmicinae) and the ascomycete fungus *Trimmatostroma* sp. (Chaetothyriales) (Ruiz-González et al. 2011). In this interaction, the ants build galleried structures pierced with holes along their host plant’s stems that they then use to ambush for prey (Dejean et al. 2005). The galleries are made with the trichomes and vegetal dough of their host plant and are further reinforced by the presence of the associated fungus (Dejean et al. 2005). We demonstrated that this interaction is highly specific because only a few fungal haplotypes were found associated with the ants, with one major haplotype representing 75% of all of the fungi sampled among geographically-distant populations in French Guiana (Ruiz-González et al. 2011). Moreover, the ants’ behavior reveals a major investment in manipulating and enhancing

the growth of their associated fungus. We have growing evidence to support the idea that specific molecular and behavioral traits are both indicators of a true fungiculture in *Allomerus*. This ant-fungus interaction fulfills most, if not all, of the required conditions to be considered the first non-human case of agriculture aimed at the production of a cultivar for structural purposes.

- Choosing the right substrate and improving growing conditions

Ants select favorable substrates for the development of this fungus. The workers prepare pellets of chewed vegetable matter extracted from the inner wall of domatia (i.e. plant structures in which the ants nest) and paste them around sheaves of trichomes in the foundations of the galleries. The fungus spreads from these areas. Once the mycelia prosper on the galleries around the trichomes, the ants paste prey debris and more vegetable matter on the galleries from which the mycelium absorbs nutrients (Leroy et al. 2011). In this case, the ants apply the debris as if spreading manure to fertilize the substrate for the fungus. Direct observations of the ants' behavior demonstrate they are actively manipulating the fungal mycelia in at least two ways. First, the fungal growth is constrained to the galleries and the mycelium does not overrun the galleries, except for during a short period if the ants are experimentally removed from the plant (Dejean et al. 2005). Second, when the walls of the domatia are artificially damaged, the ants transport packets of pure mycelia from inside the domatia that they paste along the cuts (JL, personal observation). In less than 24 hours, the wound is completely filled with pieces of mycelium.

- Protection of the cultivar from potential parasites

When ants are present, only the associated fungus grows on the galleries. An examination of the infrabuccal pellets of the workers highlights the presence of many fungal spores, suggesting the existence of a weeding and/or grooming behavior by these ants. Indeed, when the ants are removed from the plant, many alien fungi, most probably from the latent spores that are present, rapidly grow and overrun the galleries (Dejean et al. 2005, Ruiz-González et al. 2011). The ants

can control the contaminants in either of two ways: first, by physically removing the fungal spores and mycelia; and, second, through potentially antibiotic secretions and/or through other symbionts secreting antifungal compounds (Kaltenpoth 2009). The latter hypothesis still needs to be demonstrated, although recent studies have shown that the antifungal producing actinobacteria present on *A. decemarticulatus* cuticles inhibit the growth of some fungi whose spores were isolated from the galleries (Seipke et al. 2012).

- Selection of specific cultivars

Our study, based on the genetic population structure of more than 114 *Allomerus* colonies with their fungal cultivars, highlighted the occurrence of a single fungal species from the order Chaetothyriales in the galleries of the two *Allomerus* species investigated (Ruiz-González et al. 2011). In total, 16 fungal haplotypes were isolated, of which one was over-represented across the area sampled. Six and seven haplotypes were strictly associated with *A. decemarticulatus* and *A. octoarticulatus* colonies, respectively. The other three haplotypes were found associated with both ant species. Although more exhaustive sampling is needed to understand the selection of the cultivars at the population level and the mode by which the association is transmitted, the interaction with a single fungal species points to the strong selection of the cultivars. Comparatively, the molecular investigation of the mycelia growing in similar carton galleries built by the ant *Azteca brevis* revealed the presence of several species, suggesting that there is a weaker level of selection than in *Allomerus* (Mayer and Voglmayr 2009). It should be noted, however, that the species found in the carton tunnels of *Az. brevis* were also phylogenetically placed within the order Chaetothyriales, close to the *Trimmatostroma* species associated with *Allomerus*. These fungi are saprophitic or grow on insect secretions (Bailey 1920). Thus, the ant galleries seem to provide both a favorable substrate and environmental conditions for the development of these specific Chaetothyriales fungi (Voglmayr et al. 2011). This ecological filter may partly account for the observed specificity between the ants and the Chaetothyriales, but does not explain why *Allomerus* ants are specifically associated with a few haplotypes from a single fungal species. Direct selection by the ants, as is the case for the Attine, would result in such specificity. Indeed, the fungus associated with *Allomerus* is always present at the very first

stage of colony development when the queen starts claustral foundation. Moreover, it is absent from plants that have not been associated with ants and does not survive long after the colonies die (Dejean et al. 2005, Ruiz-González et al. 2011). All in all, this argues in favor of fungal selection by codispersal and the vertical transmission of the cultivar across ant generations.

The association between *Allomerus* ants and the fungus that they manipulate in their galleries seems to result from an agricultural process as the ants fulfill all of the prerequisites to be considered farmers. They develop favorable substrates and promote their symbiont's growth, protect it from potential pathogens and actively manipulate it for use as construction material. Most importantly, the specificity between the ants and the symbiont is consistent with two different levels of selection by the ants. First, the specific substrate created by the ants induces a loose and indirect selection through an ecological filtering process. Second, the potential codispersal might further add to the niche specificity through the direct selection of the fungal cultivars. Current studies are focusing on the demonstration of a vertical mode of transmission to fully demonstrate this first case of insect fungiculture as a means of obtaining building material.

Acknowledgments

We are grateful to the *Laboratoire Environnement de Petit Saut* and the *Nouragues Research Station* for furnishing logistical help, to Celine Leroy for her help in the field, and to Andrea Yockey-Dejean for editing the manuscript. Financial support was provided by a research program of the French *Agence Nationale de la Recherche* (research agreement n°ANR-06-JCJC- 0109-01), by the ESF-EUROCORES/TECT/BIOCONTRACT program (06-TECT-FP-007), by a fellowship from the *Fondation pour la Recherche sur la Biodiversité* (research agreement n°AAP-IN-2009-050) and by a Nouragues research grant from the CNRS.

Abstract – Article 2

Chaetothyriales fungi associated with structures built by tropical plant-ants can be difficult to isolate with standard procedures because of their ecological specificities, slow growth and the presence of contaminants. Here, we describe an easy to perform protocol to obtain pure cultures by using cotton as a first substrate.

Keywords: *Allomerus* ants, Black fungi, Chaetothyriales, Fluorescent staining, Isolation method, Plant-ants

Article 2. An efficient protocol for the isolation of melanised chaetothyrialean anamorphic fungi associated with plant-ants.

Published in: Journal of Basic Microbiology. 2012 (53:98-100)

Mario X. Ruiz-González^{a,b,c,*}, Jérémie Lauth^d, Céline Leroy^e, Alain Jauneau^f, Hervé Gryta^{a,b}, Patricia Jargeat^{a,b}, Alain Dejean^e & Jérôme Orivel^e

^a Université de Toulouse; UPS; EDB (Laboratoire Evolution et Diversité Biologique), 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse, France

^b CNRS; EDB (Laboratoire Evolution et Diversité Biologique), F-31062 Toulouse, France

^c Present address: Abiotic Stress Department, Integrative and Systems Biology Group. Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, C.S.I.C. – U.P.V. C/ Ingeniero Fausto Elio s/n. 46022 Valencia, Spain.

^d Université des Antilles et de la Guyane; UMR Ecologie des forêts de Guyane, Campus Agronomique, 97379 Kourou cedex, France

^e CNRS; UMR Ecologie des Forêts de Guyane, Campus Agronomique, 97379 Kourou cedex, France

^f CNRS, IFR40 Pôle de Biotechnologie Végétale, Plateforme d'imagerie cellulaire de Toulouse, 24 Chemin de Borde Rouge, B.P. 42 617 Auzeville, 31326 Castanet-Tolosan, France;

Note

Black fungi are a polyphyletic group of fungi (Chaetothyriales and Dothideales) with remarkable ecological adaptations to extreme conditions (high and low temperatures, drought, osmotic stress, irradiation), substrates (rocks, plants, and animals) and modes of life (saprophytes, plant and animal mutualists, and plant pathogens) (Hughes 1976, De Hoog et al. 1999, Gueidan et al. 2008). Recently, new members of the Chaetothyriales group have been found associated with tropical arboreal ants (Defosse et al. 2009, Mayer and Voglmayr 2009, Ruiz-González et al. 2011, Voglmayr et al. 2011). Standard procedures for isolating fungi involve washing and diluting the samples and then culturing many plates at a time that must then be monitored on a daily basis. The isolation of some of these fungi by using standard procedures can, however, become a challenging task due to two main constraints. First, sometimes the symbionts do not grow despite repeated attempts to grow them (Voglmayr et al. 2011). Second, many black fungi are slow-growing organisms, and their cultures can be rapidly overwhelmed by the many contaminant fungi present as spores in the original samples (Ruiz-González et al. 2011). Here we describe a general method to easily grow and isolate various saprophytic anamorphic fungi including the melanised fungi associated with ants. We focused on the fungal symbiont, *Trimmatostroma* sp., found on the galleries built by *Allomerus* plant-ants on the stems of their host plants (Fig. 1A, B). These ants manipulate the fungal mycelium to strengthen their galleries which they later use to ambush for prey (Dejean et al. 2005).

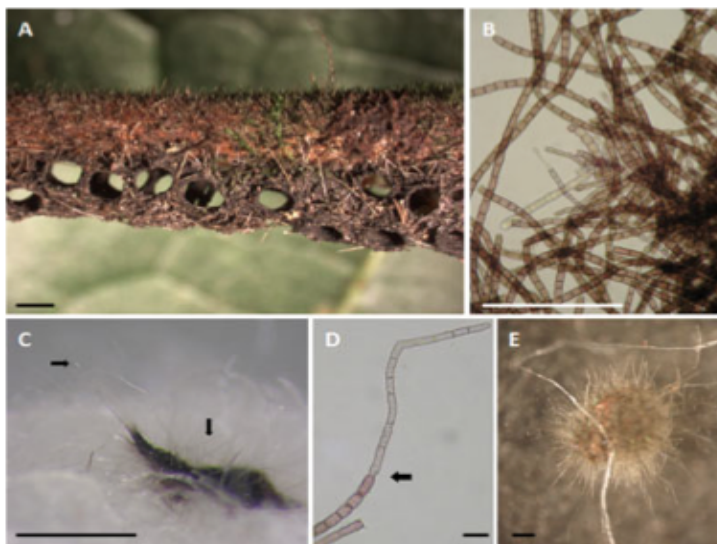


Figure 1. Fungal symbiont. (A) The anamorphic fungi growing in the ants galleries. (B) The hyphae present at the entrance of a domatium. (C) A sample of the symbiotic fungus growing in the cotton with many fresh hyphae expanding radially (arrows). (D) A detail of a hypha removed from the cotton and cultured in a YMG agar plate; the arrow points to the newly grown part of the hypha. (E) Hyphae growing from the fungal plug pasted by the ants to repair a wounded domatium. Scale bars: (A, C, E) 1 mm; (B) 100 µm; (D) 20 µm.

We first qualitatively investigated whether the hyphae present in young and old galleries could grow or if they were dead. The hyphae were placed on glass slides and the nuclei stained with two fluorescent stains, diaminophenylindole (DAPI), and bisbenzimidazole (Hoechst 33342) at 1 mg/ml. DNA stained with either DAPI or Hoechst emits a blue fluorescence (461 nm) at around 350 nm excitation. Observations were made with an inverted wide-field fluorescence microscope (Leica, Rueil-Malmaison, France) using a x40 long-distance objective lens with a numerical aperture of 0.55. We used the excitation filters 340–380 and emission filters LP425. Images were acquired with a CCD camera (Color Coolview, Photonic Science, Robertsbridge, UK). We analyzed the nuclei localized in the first 100 mm behind the hyphal tips and the density of the nuclei in the distal hyphae with Image Pro Plus software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). The staining of fresh trap samples with two fluorescent stains revealed an unbalanced distribution of nuclei across hyphae (Fig. 2). The nuclei were most likely to be present in young rather than in old hyphae, while most old cells were devoid of nuclei. Such a concentration of nuclei in young cells can explain, at least partly, the isolation failures experienced with several of these fungi.

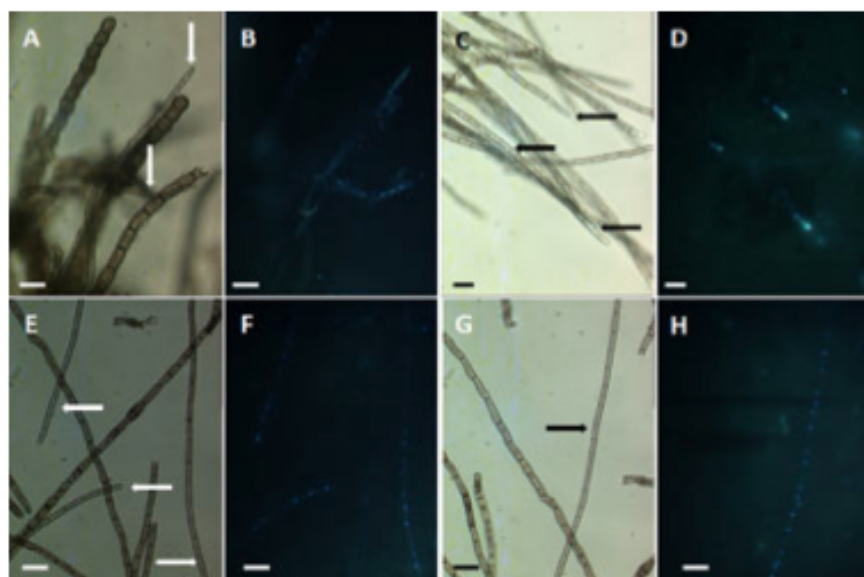


Figure 2. Hoechst fluorescent stain. (A, C, E, G) Hyphae under normal light. (B, D, F, H) The same hyphae under UV light. Not all hyphae have nuclei. (A, B, E, F) Only less melanised hyphae show nuclei. In many samples, the nuclei were found only in the young parts of pure mycelium cultured in plates. (C, D) Nuclei migrate to cells in division (the tips of the hyphae) in new parts of the trap where the mycelium is expanding. White and black arrows point to hyphae with stained nuclei. Scale bars: 20 mm.

Consequently, the galleries of *Allomerus* ants were sampled from areas under construction where the associated fungus is expected to be prospering and contaminant spores are less likely to be present. The samples were immersed in sterile, distilled water, broken into smaller pieces and washed to rid them of as many exogenous and highly prevalent spores as possible. As this fungus grows on a plant substrate, we pre-cultured small pieces of loose mycelium by placing them in wet cotton where any fast-growing contaminants were easily detected. The major contaminants that sometimes grew on the cotton associated to the fungal symbiont were identified through the sequencing of the ITS region of their nuclear rDNA as *Botryosphaeria* sp., *Hypocrea* sp., *Ophiocordyceps* sp., *Penicillium* sp., and *Trichoderma aureoviride*. All of the latter genera, except *Ophiocordyceps* sp., are known because of their cellulose-degrading activity. After 5 to 20 days under these conditions at laboratory temperature, the melanised hyphae expanded, leaving behind the old mycelia with all of the persistent contaminant spores attached to their walls but unable to sprout in the cotton (Fig. 1C, D).

The pure cultures were obtained by harvesting between 15 and 30 new hyphae with sterile forceps. These hyphae were washed in a drop of sterile, distilled water and plated on solid YMG medium (4 g yeast extract, 10g malt extract, 4g glucose, and 15 g of agar in 1l of distilled water) (Rao and Niederpruem 1969) including a cocktail of five antibiotics (100 mg/l Na-ampicillin, 120 mg/l SO₄-streptomycin, 15 mg/l tetracycline, 30 mg/l chloramphenicol, and 30 mg/l SO₄-kanamycin). The plates were kept at 25 °C for 6 to 20 days and monitored daily to assess growth. All potential contaminants were immediately removed, and, if necessary, growing hyphae were transferred to new plates. With this protocol, we have successfully isolated pure mycelia from the main symbiont present in 213 colonies of two *Allomerus* ant species from different areas in French Guiana with a success rate of 77%.

A modification to this protocol results from the ability of the ants to repair damages to the plant structures with the fungus where they nest. We artificially damaged plants in the field by cutting out a circular piece of ca. 2 mm in diameter in the wall of plant leaf-domatia with a scalpel (Fig. 3). The wound was entirely filled up by the ants with pieces of mycelium within 1 day if the domatium sheltered the queens or within four days otherwise with a mixture of plant trichomes and mycelium. We then collected these fungal plugs with sterile forceps and stored them in

sterile Eppendorf tubes. Thereafter, the isolation procedure was the same as described above. This technique is particularly useful in isolating the fungal symbiont associated with *A. octoarticulatus* because young hyphae are scarce even in galleries under construction.

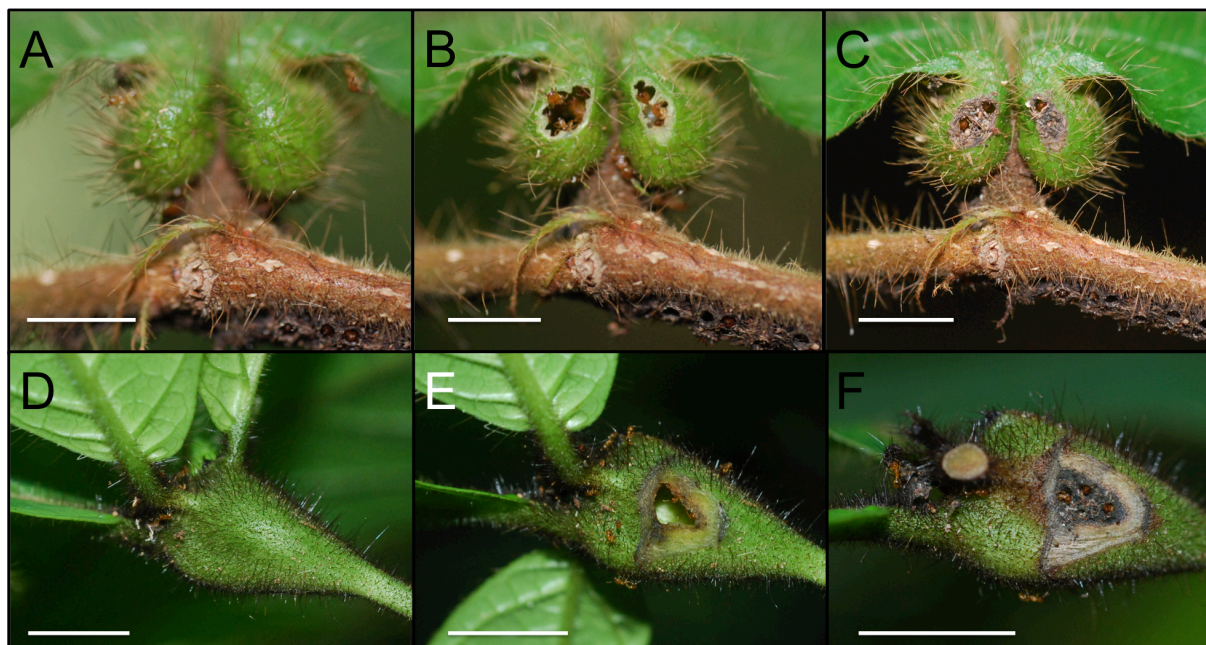


Figure 3. Filling up of artificially damaged nesting cavities by the ants with a plug of fungal mycelia. (A-C) Leaf pouches of *Hirtella physophora* inhabited by *A. decemarticulatus*. (D-F) Stem pouches of *Cordia nodosa* inhabited by *A. octoarticulatus*. (A, D) intact nesting cavities. (B, E) Artificial damage made with a sterile blade. (C, F) Wound filled up with a plug of fresh mycelia, pictures taken four days after damaging the domatia. Scale bars: (A-C) 5mm; (D-F) 1cm. (Note: this figure is not present in the published article)

The protocol described here introduces the use of wet cotton as a selective medium to stimulate the growth of the saprophytic anamorphic melanised fungi while minimizing the growth of contaminants. This protocol highly enhances the isolation success of a few hundreds of symbiotic fungi in less than 1 month.

Acknowledgements

We are grateful to Nathalie Séjalon-Delmas for insightful advice and to A. Yockey-Dejean for editing the manuscript. We would also like to thank the Laboratoire Environnement de Petit Saut and the Nouragues Research Station for furnishing logistical help. Financial support was provided by a research program of the French Agence Nationale de la Recherche (research agreement n°ANR-06-JCJC-0109-01), by the ESF-EURO- CORES/TECT/BIOCONTRACT program (06-TECT-FP-007), by a fellowship from the Fondation pour la Recherche sur la Biodiversité (research agreement n°AAP-IN-2009-050), by the Programme Interface Physique, Chimie, Biologie of the French Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and by a Nouragues research grant from the CNRS. J.L. was supported by a doctoral fellowship provided by the FSE (Fond Social Européen).

Abstract – Article 3

Eleven microsatellite markers from the ant-associated fungus *Trimmatostroma* sp. (Chaetothyriales) were isolated and characterized using 454 FLX Titanium pyrosequencing technology. Two multiplex PCR sets were optimized for genotyping. The level of haploid genetic diversity varied from 0.421 to 0.878 for fungi associated with the ants *Allomerus decemarticulatus* and *A. octoarticulatus* in two populations from French Guiana. This set of microsatellite markers will be useful in addressing questions dealing with the specificity and the mode of transmission between the fungus and its associated ants.

Key words: Chaetothyriales, “black yeasts”, *Trimmatostroma*, microsatellites, *Allomerus decemarticulatus*, *Allomerus octoarticulatus*

Article 3. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the ant-associated fungus *Trimmatostroma* sp. (Ascomycota: Chaetothyriales) using pyrosequencing technology

Published in: *Molecular Ecology Resources*. 2013 (13:546-549)

Jérémie Lauth^{1,2*}, Pierre-Jean G. Malé^{3,4}, Hermann Voglmayr⁵, Veronika E. Mayer⁶, Alain Dejean^{2,7} and Jérôme Orivel²

¹ Université des Antilles et de la Guyane, UMR EcoFoG, Campus Agronomique, BP 316, F-97379 Kourou cedex, France

² CNRS; UMR EcoFoG, Campus Agronomique, BP 316, F-97379 Kourou cedex, France

³ Université de Toulouse, ENFA, UMR Évolution & Diversité Biologique, 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse, France

⁴ CNRS, Université de Toulouse, UMR EDB, F-31062 Toulouse, France

⁵ Dept. of Systematic and Evolutionary Botany, Faculty Centre of Biodiversity, University of Vienna, Rennweg 14, A-1030 Wien, Austria.

⁶ Dept. of Structural Botany and Palynology, Faculty Centre of Biodiversity, University of Vienna, Rennweg 14, A-1030 Wien, Austria.

⁷ Université de Toulouse; UMR Ecolab, 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse cedex 9, France

Note

Fungi of the ascomycete order Chaetothyriales (also known as “black yeasts”) have an extremely wide ecological amplitude. Being primarily saprotrophic, species from this order can be also animal or plant pathogens or even extremophiles colonizing nutrient-poor or hydrocarbon-enriched environments (Cannon and Kirk 2007, Crous et al. 2007, Zhao et al. 2010). Interestingly, recent studies highlighted that several chaetothyrialean species are also involved in a number of plant-ant interactions independently acquired by several ant lineages (Poulsen and Currie 2009, Ruiz-González et al. 2011, Voglmayr et al. 2011). Among them, the Amazonian ant genus *Allomerus* comprises at least eight species that are all engaged in mutualistic associations with myrmecophytic plants (Fernandez 2007). These ants build gallery-shaped traps along their host plant stems that are further reinforced with a fungus phylogenetically close to *Trimmatrostroma cordae* (Dejean et al. 2005, Ruiz-González et al. 2011). The presence of one major single haplotype over the ITS region and the particular behavior of *Allomerus* ants in manipulating, growing and cleaning their associated fungus led us to hypothesize that these interactions could be the first case of non-food insect fungiculture (Lauth et al. 2011, Ruiz-González et al. 2011). We thus isolated and tested a set of polymorphic microsatellite loci of the associated fungus that will subsequently be used to conduct studies on the spatial genetic structures of the populations.

Pure cultures of fungi were obtained using the isolation method described in Ruiz-González *et al.* (2013). Minor modifications consisted in using 2% MEA culture media and a set of only three antibiotics (i.e. Streptomycine, Tetracycline and Kanamycine). Total genomic DNA was then extracted following a CTAB method adapted from Doyle and Doyle (1987), starting from approximately 1cm² of pure fungal culture. DNA quality was analyzed through spectrophotometry by measuring the ratios of light absorbance at 260/280nm and 260/230nm. These ratios were measured as 1.95-2.09 and 1.03-1.52, respectively, for the eight samples extracted. The production and pyrosequencing of enriched DNA libraries were carried out by Genoscreen (Lille, France) as described in Malausa *et al.* (2011). Briefly, the DNA extract was sonicated, digested by *RsaI* (Fermentas), ligated to standard adapters and purified on a Nucleofast PCR plate (Macherey-Nagel). The DNA was then hybridized to eight Biotin-labeled

oligonucleotides corresponding to eight targeted microsatellite motifs [(AG)₁₀, (AC)₁₀, (AAC)₈, (AGG)₈, (ACG)₈, (AAG)₈, (ACAT)₆ and (ATCT)₆] and amplified using primers corresponding to adapters. Finally, purified enriched libraries were pyrosequenced using the 454 FLX Titanium (Roche Applied Science) according to the GS-FLX protocol for Titanium series. We subsequently concatenated and sorted the 16,260 obtained sequences using the open access program QDD (2010). Primer pairs were designed for a total of 1,981 sequences longer than 100bp and that contained perfect microsatellite motifs displaying at least six repeats and tandem-repetition-free flanking regions.

The amplification of 92 of these sequences was tested for six fungal isolates associated with *A. decemarticulatus* or *A. octoarticulatus*. PCR amplifications were carried out for each locus in a 10µL final volume containing a mix of 2.075U of BioLabs *Taq* DNA polymerase, 1.3X *Taq* Buffer, 1.5µM of dNTPs and 40ng of genomic DNA. Fifty-six primer pairs provided a single DNA band corresponding to the predicted size of the PCR product. Eleven pairs of primers were selected based on their level of polymorphism on agarose gels, the diversity of the microsatellite motifs, the number of repeats, the expected sizes of amplification products and the annealing temperatures of the primers.

We estimated the level of polymorphism by genotyping 181 fungi either associated with *A. decemarticulatus* or *A. octoarticulatus* from two populations in French Guiana located at the *Montagne des Singes* (MDS; 05°04'20"N; 52°41'43"W) and at the *Nouragues* research station (NR; 04°05'16"N; 52°40'49"W). Using Multiplex Manager 1.1 (Holleley & Geerts 2009), we designed two sets of six and five markers, respectively, in order to both minimize differences in annealing temperatures between primers and maximize the range of amplification product sizes and to avoid complementarities of >5 bp among primers within each set (see Table 1). Loci were co-amplified with forward fluorophore-labeled primers on the 5' end. The fluorescent dyes were chosen using Multiplex Manager 1.1 (Holleley & Geerts 2009; see Table 1). PCR amplifications were carried out for each set in a 10µL final volume containing a mix of 0.6X of Quiagen PCR Multiplex Master Mix, 0.2µM of each primer and 10ng of genomic DNA. The thermal profile began with an initial denaturation at 95°C (5min), followed by 28 cycles of denaturation at 95°C

(30sec), annealing at 57°C (90sec) and extension at 72°C (60sec), and ended with a final extension at 60°C for 30min.

All of these loci were unambiguously sized using an ABI 3130 sequencer (Applied Biosystems) with the 500 LIZ™ GeneScan™ size standard and GENEMAPPER™ version 4.0 software. All of these 11 loci were polymorphic. The levels of polymorphism and haploid genetic diversity (i.e. an equivalent of the expected heterozygosity for haploid data) were estimated using GenAEx 6.41 (Peakall and Smouse 2006). Pairwise linkage disequilibrium across loci was tested using GENEPOP 4.0 (Raymond and Rousset 1995). Allelic diversity varied from 4-16 and haploid genetic diversity from 0.421 to 0.878 (Table 1). A significant deviation ($P < 0.05$) from equilibrium was observed in all of the 54 pairwise comparisons after applying a sequential Bonferroni adjustment (Holm 1979). This departure from linkage disequilibrium is not, however, uncommon in haploid ascomycetes reproducing asexually. Moreover, in strictly clonal reproduction, total departure from linkage disequilibrium is expected as the entire genome is effectively linked (i.e. there are no segregation and re-assortment of alleles) (Xu 2006). The sequences of the 11 microsatellite loci were deposited in the GenBank database (see Table 1 for their accession numbers). Altogether, these results suggest that this set of 11 polymorphic microsatellites will contribute to the investigation of the specificity as well as the transmission mode of this fungus and *Allomerus* ants.

Acknowledgements

We are grateful to Valérie Troispoux and Ivan Scotti for useful comments on the characterisation procedure, to Eliane Louisanna for providing environmental samples, to the *Laboratoire Environnement de Petit Saut* and the *Nouragues Research Station* for furnishing logistical help and to Andrea Yockey-Dejean for editing the manuscript. Financial support was provided by the ESF-EUROCORES/TECT/BIOCONTRACT program (06-TECT-FP-007), and by a fellowship from the *Fondation pour la Recherche sur la Biodiversité* (research agreement n°AAP-IN-2009-050). JL's financial support was provided by a PhD fellowship from the *Fond Social Européen* (FSE) and by a Nouragues research grant from the *Centre National de la*

Recherche Scientifique (CNRS). This study has benefited from "Investissement d'Avenir" grants managed by the *Agence Nationale de la Recherche* (CEBA, ref. ANR-10-LABX-0025 and TULIP, ref. ANR -10-LABX-0041).

Locus	Repeat motif	size range (bp)	5' dye	Multiplex markers set	<i>A. decemarticulatus</i>		<i>A. octoarticulatus</i>		Primer sequence (5'-3')	Genbank accession number				
					MDS (n=40) Na	h	NR (n=53) Na	h			MDS (n=37) Na	h	NR (n=51) Na	h
Trimm-06	(TTC)18	266-317	Atto550	1	7	0.779	11	0.823	7	0.764	10	0.840	TCACCCTCTGTACCGGTTATGC	JX515524
Trimm-10	(TGA)13	75-114	Atto565	1	8	0.835	9	0.827	4	0.473	6	0.639	TCAACGATGAAGCTCTGTTGT	JX515525
Trimm-12	(TGT)20	135-193	Yakima Yellow	1	9	0.855	9	0.845	6	0.421	6	0.514	CCGCCTAAGAAAATCGTCAT	JX515526
Trimm-16	(TCAG)27	168-290	Yakima Yellow	2	10	0.759	14	0.816	5	0.504	5	0.445	ACTACCCTACACCCTGACCG	JX515527
Trimm-24	(GTT)16	248-295	Atto550	2	9	0.826	12	0.864	4	0.427	6	0.523	CACTGTGCCATCCATCTACG	JX515528
Trimm-26	(GTT)13	113-155	6FAM	2	7	0.680	9	0.606	6	0.455	7	0.700	TATTCGTCATTCCTGCACC	JX515529
Trimm-28	(GT)24	80-132	Atto565	2	8	0.811	12	0.863	7	0.604	6	0.644	AAGCCTACTCGTCGCCCTG	JX515530
Trimm-42	(CTC)17	281-339	Yakima Yellow	1	4	0.644	7	0.775	6	0.613	10	0.839	TGGTGTATTTGAGGCAGAT	JX515531
Trimm-52	(CAT)12	104-143	Atto550	2	8	0.781	10	0.878	8	0.596	5	0.531	AAACCGAGGATTAATTCGGAT	JX515532
Trimm-54	(CAA)18	273-382	Atto565	2	11	0.834	16	0.865	6	0.598	4	0.549	TTCCGCAAAATCTTTGTCA	JX515533
Trimm-56	(CAA)19	159-211	6FAM	1	8	0.802	13	0.844	5	0.576	5	0.594	CGATTGGGAAATTTGCCATAC	JX515534

Table 1: Primer sequences and polymorphism statistics for 11 microsatellite loci in two populations of *Trimmatostroma* sp. associated with *Allomerus decemarticulatus* or *A. octoarticulatus* ants [*n*, number of individuals analyzed; *Na*, number of alleles observed; *h*, haploid genetic diversity; MDS and NR, the two geographical regions in French Guiana].

Abstract – Article 4

Agricultural symbioses between insects and fungi are mutualistic associations where a farmer protects and improves the growth condition of a crop in exchange for foods. The interaction between *Allomerus* plant-ants and an ascomycete fungus growing on and strengthening there is highly specific. Added to the protection and the growth enhancement of this fungus by the ants let us hypothesize that such interaction could be the first case of non-food agriculture in insects. Yet, the active selection of cultivars by ants still needs to be demonstrated. Here, we examined the population genetic structure of fungal symbionts associated to three phylogenetically related *Allomerus* ant species to test for the predictions of vertical transmission: monoculture of cultivars, local co-adaptation and phylogenetic congruence. Our results supports vertical transmission as the major fungal species associated to the three ant species is genetically structured in respect to their ant associates. Most importantly, the presence of an ant species is a prerequisite for the presence of a particular fungal symbiont, suggesting that it is not acquired horizontally through environmental strains. In all, the mutualistic association between *Allomerus* ants and their fungal symbionts can be considered as the first case of non-food agriculture in insects

Keywords: Agriculture, selection, vertical transmission, horizontal transmission, ant-plant-fungus interaction, *Allomerus* ants, *Chaethothyriales*, myrmecophyte, mutualisms

Article 4. Fine scale co-specialization and evidence of vertical transmission between *Allomerus* ants and their symbionts indicate non-food agriculture in insects.

In preparation

Jérémie Lauth^{1,2*}, Mario X. Ruiz-González³, Caroline Scotti-Saintagne⁴, Céline Leroy^{2,5}, Frédéric Petitclerc², Alain Dejean^{2,6} and Jérôme Orivel²

¹Université des Antilles et de la Guyane, UMR EcoFoG, Campus Agronomique, BP 316, F-97379 Kourou cedex, France

²CNRS; UMR EcoFoG, Campus Agronomique, BP 316, F-97379 Kourou cedex, France

³Abiotic Stress Department, Integrative and Systems Biology Group. Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, C.S.I.C. – U.P.V. C/ Ingeniero Fausto Elio s/n. 46022 Valencia, Spain

⁴INRA; UMR EcoFoG, Campus Agronomique, BP 316, F-97379 Kourou cedex, France

⁵IRD; UMR AMAP, Boulevard de la Lironde, TA A-51/PS2, F-34398 Montpellier Cedex 5, France (present address)

Introduction

Agriculture refers to highly specialized mutualisms in which two partners (i.e. a farmer and a cultivar) exchange specific services. To be considered a farmer, an organism must fulfill at least three criteria: (1) the habitual planting of the cultivar on favorable substrate and improving its growth conditions, (2) protection of the cultivar from potential parasites and competitors and (3) the selection of specific cultivars (Mueller et al. 2005). In exchange, the cultivar is used as a source of nutrient or as trade goods. Such interactions have evolved only a few times: in humans and at least 10 separate times for insects from four orders (i.e. attine ants, termites, ambrosia beetles and gall midges) (Farrell et al. 2001, Mueller et al. 2001, Aanen et al. 2002, Rohfritsch 2008). While humans cultivate a large array of crops, using them in diversified ways (e.g. nourishment, pharmacology, construction, ornamentation), all known cases of agriculture in other species are restricted to the cultivation of fungi exclusively for food. However, the recently described occurrence of fungi phylogenetically closed to *Trimmatostroma cordae* (Ascomycete, Chaetothyriales) in carton nests or galleries in ants might represent the first case of non-food agriculture in a species other than humans (Schlick-Steiner et al. 2008, Mayer and Voglmayr 2009, Voglmayr et al. 2011).

The selection of cultivars in agricultural symbioses results most of the time as consequence of the vertical transmission of the mycobionts (Mueller et al. 2005). Moreover, such mode of transmission creates opportunities for local co-adaptations, which may ultimately lead to the co-divergence between symbionts and fixation of co-evolved traits (Thompson 2005, Bright and Bulgheresi 2010). Therefore, in these symbioses, we can predict the evolution of monoculture of cultivars; that is, a geographic mosaic of co-selection and phylogenetic conservatism between hosts and cultivars (Thompson 2005). However, a pairwise species relationship is a simplistic view and most mutualistic symbioses involve complex interactions among several species (Mikheyev et al. 2007, Mikheyev et al. 2010, Guimaraes et al. 2011). Thus, many symbiotic interactions are characterized by host sharing; that is, symbiont switching or free-living symbiont invasions that frequently produce intricate patterns of complete or partial discord between symbiont phylogenies (Aanen et al. 2002, Mikheyev et al. 2007, Mikheyev et al. 2010). In the best studied cases of fungiculture in *Attine* ants and termites such patterns result in a phylogenetic

congruence between host and fungi at a broad scale, and a tangled up distribution of symbionts at a fine scale (Aanen et al. 2002, Mikheyev et al. 2007). Therefore, the phylogenetic analysis of both host and symbiont populations at different scales, including related ant species with similar mutualistic behaviors, are a key strategy to disentangle horizontal from vertical transmission of symbionts and, thus, to infer the strength of the relationship.

Ants of the genus *Allomerus* are specialist plant-ants inhabiting a variety of myrmecophytic hosts (Fernandez 2007). The well-known *A. octoarticulatus* and *A. decemarticulatus* workers protect their host plant from defoliators through their predatory behavior (Dejean et al. 2001, Romero and Izzo 2004, Frederickson 2005, Grangier et al. 2008). These ants build galleried structures along the stems of their host plant as traps to ambush prey where prospers a fungus (Dejean et al. 2005). Only recently has been shown that the ants provide a favorable substrate for the growth of the mycelium, that they protect it from potential competitors and pathogens, and actively manipulate it as a construction material (Lauth et al. 2011, Ruiz-González et al. 2011, Seipke et al. 2012, Ruiz-González et al. 2013). Most importantly, the genetic analysis of the fungal partner revealed the occurrence of one single species growing in the galleries built by three *Allomerus* species across distant geographic areas, thus showing a highly specific mutualism (Ruiz-González et al. 2011). Therefore, these ants fulfill most of the prerequisites to be considered farmers (Lauth et al. 2011). Yet, only the active selection of this specific fungus by the ants remains to be confirmed to demonstrate that *Allomerus* ants and their cultivars represent the first case of non-food agriculture.

Here, we study the genetic structure of the mycobionts associated to three closely related *Allomerus* plant-ant species at different scales (host plant identity, geographic origin, and local populations) to test for the predicted coevolutionary outputs that arise in a host-symbiont system with vertical transmission, as expected to happen in a true farmer-crop relationship.

Material and methods

- Ant hosts

At all the studied sites, *A. decemarticulatus* was exclusively associated to a single myrmecophyte species, *Hirtella physophora* (Grangier et al. 2009). *Allomerus octoarticulatus* is associated to either *H. physophora* or *Cordia nodosa*. *Allomerus octoarticulatus* has been hypothesized to be a species complex and its taxonomy still remains to be addressed (Fernandez 2007). Thus, we first investigated their genetic structure using microsatellite markers (Debout et al. 2006, Malé et al. 2010) in order to distinguish between potential cryptic species associated to these two host-plant species. We found that these two ants species are distinct cryptic species ($\phi_{PT} = 0.382$, $p < 0.01$; see supplementary material). Thus, for the aim of clarity, we have named *A. octoarticulatus* inhabiting *C. nodosa* as Ao/Cn and *A. octoarticulatus* inhabiting *H. physophora* as Ao/Hp. *Allomerus decemarticulatus* inhabiting *H. physophora* is hereafter denoted as Ad/Hp.

These three ant species are obligate symbionts of their host plants and their foraging areas are restricted to host plant leaves and stems. Daughter colonies develop through the successful colonization of new plants by founding queens after nuptial flights (Frederickson 2006, Grangier et al. 2009). Colonized plants can either be saplings that has never been colonized by an ant colony, plants that have been previously colonized but in which the previous colony died, or on plant flushes that already house young or mature colonies. At the first stage of founding, the queen seals the entrance of the domatium with trichomes that have been previously cut and paste over the entrance. The associated fungus quickly grows over these trichomes (Ruiz-González et al. 2011).

- Study sites and sampling

All samples of fungi were collected at eight sites: the Brownsberg Nature Park (BR, 05° 00' 20.41"N; 55° 09' 20.10"W) in Suriname; and the Chutes Voltaires (CHV, 05° 03' 13.27 "N; 54° 05'13.70"W), Montagne des Singes (MS, 05° 04' 20"N; 52° 41' 43"W), Petit Saut (PS, 05° 04' 49.43"N; 52° 59' 11.91"W), Chutes Fourgassier (FO, 04° 37' 47.67"N; 52° 18' 34.26"W), Camp

Patawa (PA, 04° 31' 47.03"N; 52° 07' 10.35"W), Nouragues research station (NR, 04° 05' 46.16"N; 52° 40' 44.5"W), and Saül (SA, 03° 36' 29.91"N; 53° 11' 23.40"W), in French Guiana (Fig. 1). Sympatry or allopatry of the different ant species in these sites and the number of fungal isolates sampled in each interaction and in total are indicated in Table 1. Samples were collected as described in Ruiz-González *et al.* (2013)

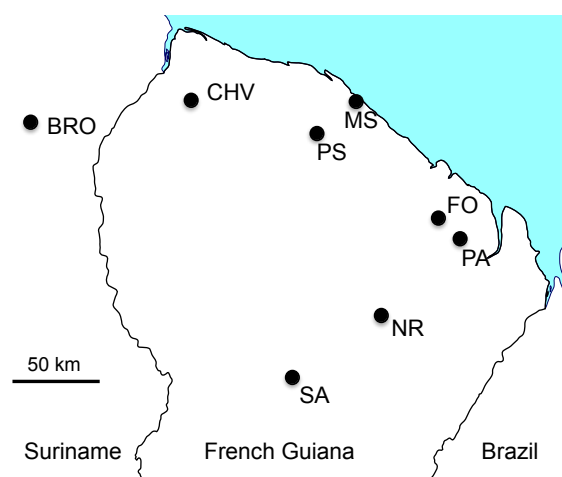


Figure 1. Sampling location of the eight populations.

10th percentile. Open circles represents outliers. **Table 1.** Sample size of fungal isolates for each subpopulation. The ‘-’ indicates the absence of an interaction in a particular region.

Code	Ao/Cn	Ao/Hp	Ad/Hp	
BRO	4	-	-	
CHV	48	-	-	
PS	12	-	20	
MS	30	29	43	
FO	-	5	21	
PA	14	36	-	
NR	44	-	45	
SA	20	30	30	
Total	172	100	159	431

- Microbiological and molecular protocols

Pure cultures of fungi in plates were obtained as described in Ruiz-González *et al.* (2013). Minor modifications consisted in using 2% Malt Extract Agar medium and a cocktail of only three antibiotics (i.e. Streptomycine, Tetracycline and Kanamycine). Total DNA was extracted following a CTAB method adapted from Doyle and Doyle (1987).

The phylogenetic analysis was conducted on the entire Internal Transcribed Spacer (ITS) region using the primers ITS1-F and ITS4 (Gardes and Bruns 1993). PCR reactions were carried out in a final volume of 20 µL. The PCR contained 0.1 × reaction buffer, 8 µL of 5% PVP (polyvinylpyrrolidone), 1.4 µL of sterile H₂O, 2.5 mM of dNTPs, 20 mM of MgCl₂, 10 µM of each primer, and 1U of *Taq* polymerase. PCR conditions involved an initial denaturing step of 94°C for 5 min, followed by 35 cycles of one minute at 92°C, at 92°C, and at 72°C; and a final elongation step of 72°C for 5 min. PCR products were sequenced by the Centre National de

Séquençage (CNS, Evry, France). Genotyping of fungal isolates were obtained using the microsatellites markers *Trimm-06*, *Trimm-10*, *Trimm-12*, *Trimm-16*, *Trimm-24*, *Trimm-26*, *Trimm-28*, *Trimm-42*, *Trimm-52*, *Trimm-54*, and *Trimm-56* (Lauth et al. 2013).

- Phylogenetic analyses

Representative sequences of the monophyletic carton clade 1 found in Voglmayr *et al.* (2011) including one fungal isolate associated to *A. octoarticulatus*, and other fungal strains associated to ants carton constructions were used to test for the monophyly of fungal isolates associated to *Allomerus* ants. The sequence of four strains found in this particular clade and of 301 fungal isolates associated with the three ant species were aligned using BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.5.2 (Hall 1999). The concatenated fungal sequences were collapsed into haplotypes using DnaSPv5 (Librado and Rozas 2009). Maximum Likelihood (ML) analyses were performed using the RAxMLBlackBox (Stamatakis et al. 2008) which produce a maximum likelihood tree and 200 bootstrap replicates. For Bayesian analyses, Mr Bayes version 3.1.2 (Ronquist and Huelsenbeck 2003) was used. According to the nucleotide substitution models suggested by Modeltest 3.6 (Posada and Crandall 1998), the K80+I model was implemented assuming equal rate of substitution among sites. Bayesian runs were started from independent random starting trees and repeated four times. Markov chain Monte Carlo runs extended for 3000000 generations, with trees sampled every 100th generation (resulting in 20000 trees for each run). Convergence of all runs was assessed when the average standard deviation of split frequency was stabilized under a value of 0.01, and using the convergence diagnostic in MrBayes. After eliminating the first 7500 trees as “burn-in,” a 50% majority-rule consensus tree was constructed, with nodal values representing the probability ("posterior probability") of those clades to be true.

- Population genetic analyses

Monoculture of fungal isolates was tested by collecting four samples of fungus per ant colony, on distant parts of the plant. Fungal collection was made on 23, 11 and 15 colonies of Ao/Cn, Ao/Hp, and Ad/Hp, respectively. Genotypes of the fungal samples collected on one colony were compared and were scored as identical if they shared the same allele for the 11 microsatellite

markers. For those isolates where some markers failed to amplify, the threshold to assess the identity was set to a minimum of eight microsatellite markers.

Bayesian clustering analyses were implemented to infer the spatial structure of the genetic data using STRUCTURE v2.3.3 (Pritchard et al. 2000). Isolates were grouped after the haplotypes found by the ITS phylogeny. Thus, we avoid the scoring of false homologous alleles in microsatellite data due to distant fungal isolates. Each round of STRUCTURE consisted in five runs for each of the K genetic groups tested, with K ranging from one to four, being the null hypothesis that the fungal isolates are subdivided into three genetic clusters, each corresponding to the association with one ant species. All the analyses were conducted with the uncorrelated allele frequencies model, and the admixture model, for 100000 iterations after a burn-in period of 10000 iterations. This burn-in period was previously proved to be sufficient for the likelihood of the runs to stabilize. The number of genetic groups was determined using the ΔK method of Evanno *et al.* (2005), which assesses the breakpoint in the slope of the distribution of $\ln P(D)$ as a function of K .

Nei's unbiased genetic distances (Nei 1978) were calculated among all pairs of subpopulations (i.e. each geographic population was further divided in accordance to ant associates, number of isolates used in the analysis is indicated in Table 1) and visualized by Principal Coordinates Analysis (PCoA) using GenAlEx 6.3 (Peakall and Smouse 2006). To statically test for genetic differences between the clusters defined from Nei's genetic distance, an analysis of molecular variance (AMOVA) was implemented using GenAlEx 6.3. The statistical significance of φ -statistics was implemented based on 999 replicates.

Results

- Phylogenetic analyses

The analysis of the ITS fungal gene revealed the presence of 15 haplotypes (Table 2). One haplotype was mainly associated to the three ant species (H7), representing more than 69% of all the isolates. Eight haplotypes were found in minority (H1, H2, H3, H5, H6, H8, H11 and H15) and six haplotypes were represented by only one fungal isolate. The major haplotype was predominant in the three different interactions (i.e. 85%, 59% and 47% of all isolates associated to Ad/Hp, Ao/Hp, and Ao/Cn, respectively), and was present in all sampled populations. The haplotype H6 was the closest in numbers to the major one and the only one that was dominantly associated to *A. decemarticulatus*, while haplotypes H1, H2, H3, H5, and H11 were mostly associated to Ao/Cn.

Table 2. Number of fungal isolates associated to each ant species corresponding to each haplotype inferred from the ITS sequence. “Ad/Hp”, “Ao/Hp” and “Ao/Cn” represent the fungal isolates associated to *A. decemarticulatus* inhabiting *H. physophora*, to *A. octoarticulatus* inhabiting *H. physophora* and to *A. octoarticulatus* inhabiting *C. nodosa*, respectively. Numbers in parentheses represents the number of population in which a haplotype was found for each specific association. The frame represents the major haplotype (H07).

Haplotypes	Ad/Hp	Ao/Hp	Ao/Cn	Total
H01	1 (1)	2 (2)	13 (4)	16
H02	1 (1)	9 (1)	12 (4)	22
H03	2 (2)	4 (2)	6 (3)	12
H04	0	1 (1)	0	1
H05	1 (1)	2 (1)	0	3
H06	10 (4)	0	1 (1)	11
H07	121 (5)	24 (4)	67 (6)	212
H08	0	5 (2)	3 (2)	8
H09	1 (1)	0	0	1
H10	0	1 (1)	0	1
H11	3 (2)	0	9 (4)	12
H12	0	1 (1)	0	1
H13	0	0	1 (1)	1
H14	0	0	1 (1)	1
H15	2 (1)	2 (2)	1 (1)	5
Total	142 (5)	51 (4)	114 (6)	307

All the fungal haplotypes in association with the three *Allomerus* species were different from the previous fungi exclusively isolated from carton structures build by ants, the latter being grouped in the monophyletic carton clade 1 found by Voglmayr et al. (2011) (Figure 2).

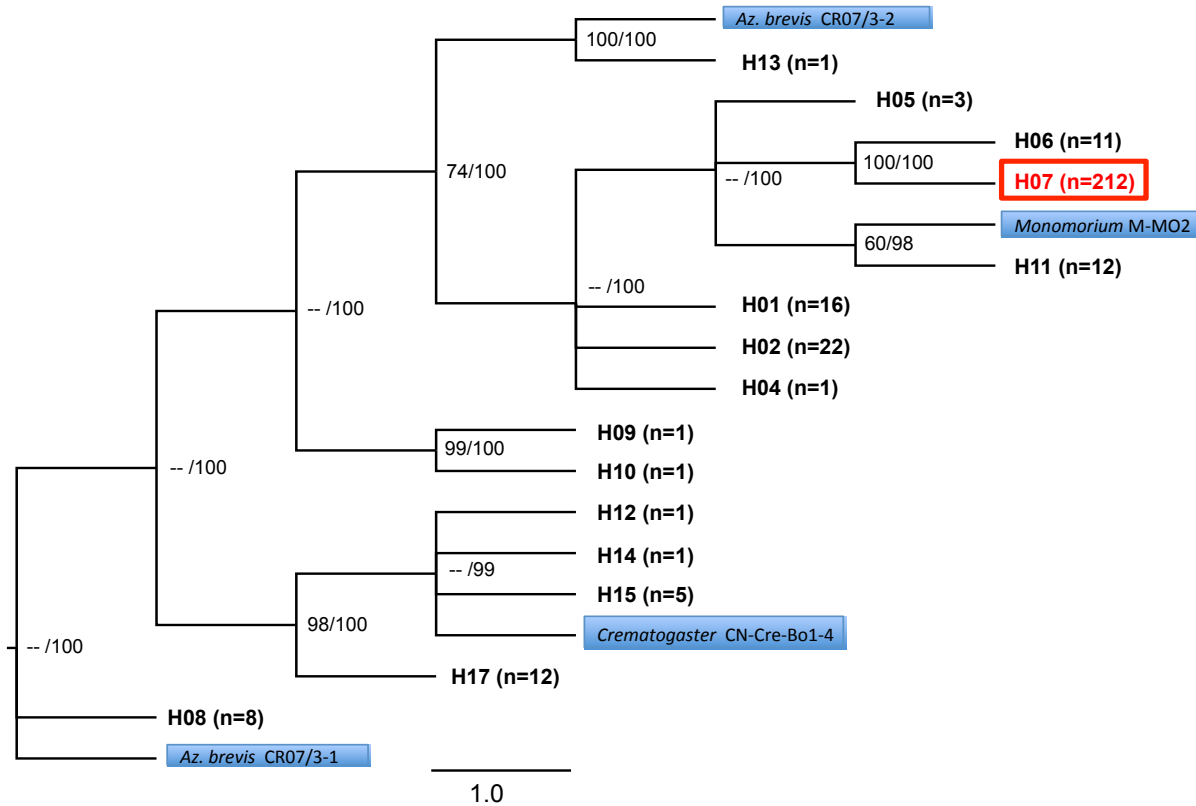


Figure 2. Phylogenetic reconstruction of haplotypes associated to three species of *Allomerus* inferred from ML and Bayesian analyses of ITS sequences. Bootstrap values above 60% and posterior probabilities for each branch are shown as BP/PP. Taxa highlighted in blue correspond to fungal strain associated to unrelated plant-ants and represent the ant species and the code of its associated fungal strain. Taxon boxed in red represent the major fungal haplotype associated to the three species of ants. "n" represents the number of fungal isolates for each haplotype.

- Population genetic structure

From the 49 colonies sampled to test for fungal monoculture, the cultivation and genotyping of four fungal samples per colony were successful in 21 (three samples for 28 colonies). The

monoculture of a unique fungal strain was present in 23 colonies (47% of all colonies). The over representation of one fungal isolates occurred in all other colonies (57%) while two colonies presented more than two fungal strains (Table 3).

Table 3. Monoculture at the intra colony level. For each colony, three or four isolates per colony were genotyped (rows). “mono” indicates that all isolates were identical, “di”, “tri” and “tetra” represent when two, three or four genetic different isolates were found by colony, respectively.

Samples	Ad/Hp				Ao/Hp				Ao/Cn			
	mono	di	tri	tetra	mono	di	tri	tetra	mono	di	tri	tetra
3	6	4	0	-	4	3	0	-	7	4	0	-
4	5	8	0	0	1	2	1	0	0	3	1	0

The genetic structure between the different fungal isolates was only tested for those grouped in haplotype 7 due to sample size restrictions. The genotyping of these isolates was successful on 195 samples out of the 212 used in the phylogeny. The most likely model in the STRUCTURE analysis subdivided the fungal isolates in two well-differentiated clusters ($\Delta K2 = 2641$, $\Delta K3 = 41$) (Fig. 3). All the fungal isolates associated to Ad/Hp were exclusively assigned to one genetic cluster (hereafter GC1) while all isolates associated to Ao/Cn were attributed to the other (hereafter GC2). Half of the fungal isolates associated to Ao/Hp were placed into the first cluster while the other half was assigned to the second one.

The PCoA spatially grouped all subpopulations associated to Ao/Cn and all subpopulations associated to Ad/Hp that were differentiated by the first PCoA axis (explaining 73.33% of the variation, Figure 4b). The subpopulation associated to Ao/Hp did not form a unique cluster and was spatially split along the first axis. The PA subpopulation was placed next to the Ao/Cn cluster while MS and FO subpopulations were close to the Ad/Hp cluster. SA subpopulation was placed at the center of the PCoA, between these two clusters. The second axis (explaining 9.65% of the variance) separated the different subpopulation within the Ad/Hp cluster. The AMOVA

supports the genetic distribution of the PCoA. The PA and SA subpopulations associated to Ao/Hp were genetically closer to the Ao/Cn cluster and the MS and FO subpopulations were genetically closer to the Ad/Hp clusters (Table 4).

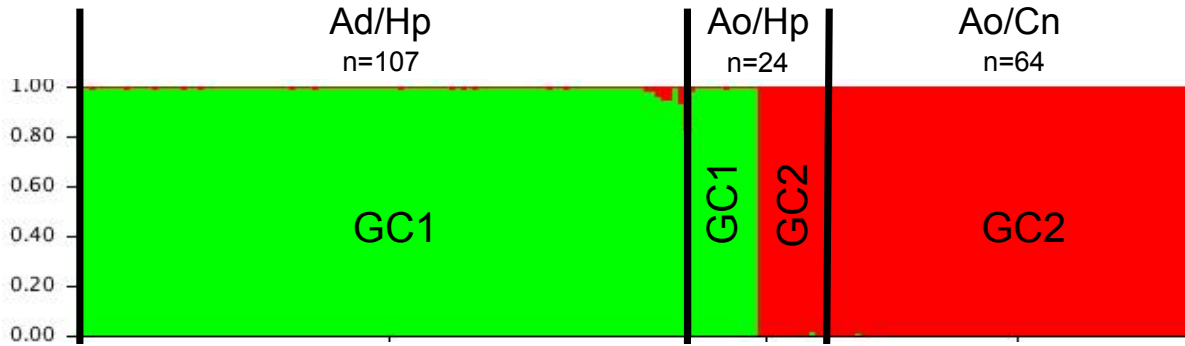


Figure 3. Population structure of the fungal isolates corresponding to the major haplotype (H7) revealed by the ITS phylogeny, based on 11 microsatellites. Each horizontal bar represents the assignment of each fungal isolates (based on membership coefficient) to each of the two optimal clusters identified with Bayesian inference software STRUCTURE. Black lines separate isolates belonging to the three different ant plant interactions. For each association n represents the number of fungal isolates corresponding to the major haplotype that were genotyped with the 11 microsatellites.

Table 4. Pairwise ϕ_{ST} distances and statistical significance between cultivar subpopulations associated Ao/Hp to and cultivar associated to Ad/Hp or Ao/Cn.

		Ad/Hp		Ao/Cn	
		ϕ_{PT}	p-values	ϕ_{PT}	p-values
Ao/Hp	FO	0.028	0.050	0.205	0.001
	MS	0.021	0.002	0.180	0.001
	SA	0.185	0.001	0.061	0.001
	PA	0.130	0.001	0.078	0.001

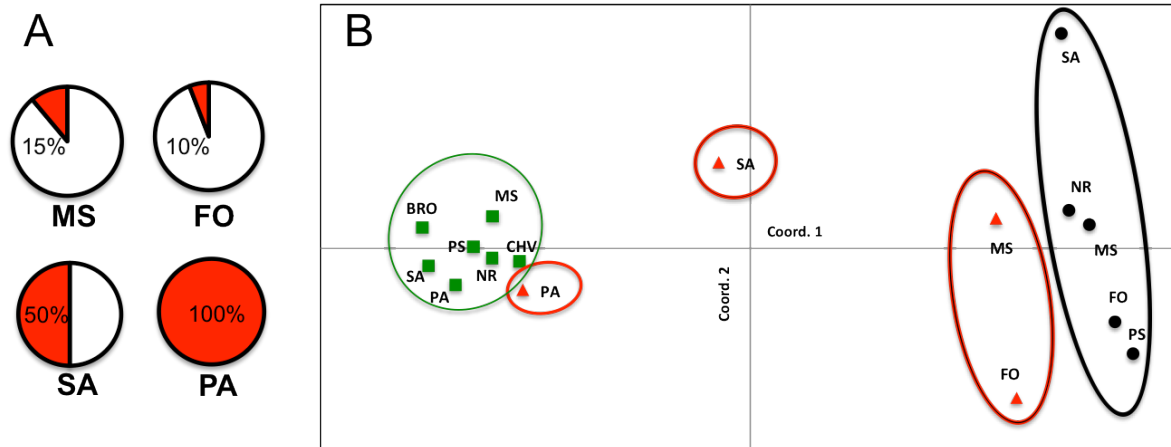


Figure 4. (A) Graphical representation and percentage of Ao/Hp (in red) in the four sampling locations where *A. octoarticulatus* inhabit *H. physophora*. (B) Principal Coordinates Analysis among the 16 sub-populations based on Nei's unbiased genetic distance using GenAlEx. The first and the second accounted for 73.33% and 9.65% of the variance respectively. The green squares, the red triangles and the black dots represent the subpopulation of fungal isolates associated to *A. octoarticulatus* inhabiting *C. nodosa*, *A. octoarticulatus* and *A. decemarticulatus* inhabiting *H. physophora*, respectively, for each indicated sampling location. The large circles represent spatially grouped clusters of isolates subpopulations.

Discussion

Co-specialization and symbiont vertical transmission.

Our results are consistent with those of earlier genetic studies of fungal symbionts associated to *Allomerus* ants, which found the presence of one major haplotype, H7, eight with a lower occurrence, and seven found only once (Ruiz-González et al. 2011). All the haplotypes are Chaetothyriales fungi. The placement of all these haplotypes in the Chaetothylerean fungi phylogeny confirmed their monophyly with fungal species associated to ant constructions and thus their specificity over the specialized niche provided by ant carton or galleries (Voglmayr et al. 2011). However, their paraphyly within this clade infirmed their unique origin, providing insights on their differential specialization toward *Allomerus* ants. The large overrepresentation of one haplotype constitutes a great evidence of further co-specialization of a particular symbiont species within this clade and the three species of *Allomerus*. Moreover, the structuration of this

major haplotype in two distinct genetic groups demonstrates a further specialization within the *Allomerus* lineage. Such fine-scale specialization in sympatric population by two closely related ant species strongly supports the vertical transmission of fungal strain by *Allomerus* ants, at least for the H7 associate (Clark et al. 2000, Thompson 2005, Moran et al. 2008). Although such patterns have been observed in some horizontal transmitted interactions, it requires extremely sophisticated molecular machineries and recognition mechanisms to select and differentiate between two highly related genetic symbionts (Bright and Bulgheresi 2010), mechanisms that might be lacking in our system study. Moreover, the observation that Ao/Hp was not associated to GC1 in the only location where *A. decemarticulatus* was absent is a strong evidence supporting vertical transmission. Indeed, it suggests that the presence of *A. decemarticulatus* is a prerequisite for the presence of GC1 symbionts, thus, demonstrating that these symbionts are not acquired horizontally from other colonies or from free-living states by environmental contamination.

Whether minor and rare haplotypes are vertically transmitted or horizontally acquired cannot be inferred. In the *A. decemarticulatus* association, the very low occurrence of minor haplotypes suggests rare events of horizontally acquired symbionts and mechanisms that restrict symbiotic diversity (Bot et al. 2001b). Yet, the higher occurrence of minor haplotypes associated to the *A. octoarticulatus* lineage evokes either vertical selection or reliable association that are not under pressure of restrictive mechanisms.

Symbiont horizontal switch through host plant sharing

The co-existence of the haplotype H7 and other underrepresented haplotypes in most of the sampled populations was not translated into a similar diversity of co-occurring haplotypes at the intra-colony level for each one of the three ant species. Nonetheless, while fungal gardens of Attine ants are monocultures (Mueller et al. 2010), only 47% of the analyzed *Allomerus* colonies consisted of a single haplotype. This, however, is compatible with the biology of the ants, because the host-plants are colonized by different ant colonies along their lifespan (few hundreds of years) and the new colonies might get in contact with old galleries, acquiring a new haplotype

by horizontal transmission (Orivel et al. 2011). The later can be the explanation for the presence at the geographic level of the Ao/Hp fungal haplotypes due to lateral transfer of GC1 strains from Ad/Hp to Ao/Hp through host plant sharing. Indeed, both the occurrence and the proportion of *A. decemarticulatus* inhabited plants seems to guide the level of association between GC1 strain and Ao/Hp. GC2 strains might thus be a phylogenetic signal of ancestrally acquired symbionts, thus arguing for specific association of GC2 with *A. octoarticulatus* lineage.

Allomerus fungiculture

Following the transmission-first route model suggested in agriculture (Mueller et al. 2001), the *Allomerus* lineage may have began firstly loose associations with fungi specialized to ant galleries niche and secondly specialized to a specific fungal species through its vertical transmission. Subsequently, the speciation between *A. decemarticulatus* and *A. octoarticulatus* lineage may have led to the co-speciation of the major fungal haplotype into GC1 and CG2 lineages. Finally a new episode of speciation in *A. octoarticulatus* lineage led to the formation of Ao/Cn and Ao/Hp. Posterior host plant switch from Ao/Hp might have allowed the de-novo acquisition of the fungal strains that was specifically associated to *A. decemarticulatus*.

Alternatively, host switch speciation of the major haplotype from *A. decemarticulatus* to *A. octoarticulatus* lineage through an event of horizontal transmission may have led to a rapid differentiation of the two fungal genetic structures (Fauci et al. 2007). Following this hypothesize, minor haplotypes could represent the phylogenetic signal of the ancestral cultivars associated to *A. octoarticulatus* lineage and thus explain their relatively higher occurrence of association (Mikheyev et al. 2010).

Conclusion

All our results strongly suggest the selection of specific cultivars selected and cultivated by *Allomerus* ants through vertical transmission. The later finding and both the protection of the cultivar and the supply of a favorable substrate by the ants, represent all three criteria that are needed to define a true farmer. Therefore, we should start to consider the *Allomerus* – fungi mutualism as the first non-food agriculture system described in species other than humans. The association between each *Allomerus* ant and their cultivars reveals a high specialization detected at different scales.

Supplementary materials

For 40 colonies of each ant species situated in the area studied, the total DNA was extracted from one ant worker per colony. Each ant worker was incubated overnight at 55°C in 10 µL of Proteinase K solution (Qiagen) and 150 µL of 10% Chelex solution (BioRad, Marnes-la-Coquette, France). We used 2 µL of the obtained solution to amplify six microsatellite markers in two different PCR sets and using forward primers fluorophore-labeled on the 5' end, as described in Malé *et al.* (2010). These markers were Adec-A23, Waur8Ω, Waur813, Ad040, Ad127 and Ad166 (Fournier *et al.* 2005, Debout *et al.* 2006, Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium *et al.* 2009, Malé *et al.* 2010). All loci were measured using an ABI 3730 sequencer (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) coupled with the 500 LIZ™ GeneScan™ size standard and GENEMAPPER™ 4.0 software.

An analysis of molecular variance (AMOVA) examining genetic differentiation between ant species was carried out in GenAlEx (Peakall and Smouse 2006) using 999 replicates to generate the null distribution. Genetic variation between ant species accounted for 38% of the total genetic variation ($\phi_{PT} = 0.382, p < 0.01$).

Discussion du chapitre

La relation qui lie les trois espèces de fourmis étudiées du genre *Allomerus* aux champignons se développant dans leurs galeries est bien issue d'un processus d'agriculture. Deux preuves indirectes démontrent qu'il existe bien une sélection active des souches de champignons par leur transmission verticale au fil des générations par les fourmis : (1) l'existence de deux groupes génétiques distincts du champignon associés à *A. octoarticulatus* ssp1 et à *A. decemarticulatus* lorsqu'elles coexistent en sympatrie et (2) l'absence du groupe génétique GC1 en association avec *A. octoarticulatus* ssp2 dans la seule population où *A. decemarticulatus* est absente. Nous avons ainsi démontré que les fourmis du genre *Allomerus* ont développé une agriculture non pas à but alimentaire, mais à but structurel, phénomène jusqu'alors connu seulement chez les Hommes.

Une différenciation récente des souches H7- GC1 et GC2.

Les marqueurs génétiques utilisés pour différencier les différents haplotypes de champignon (une partie des séquences ITS et les microsatellites) sont des marqueurs neutres. Ils correspondent à des parties du génome qui ne codent pas pour des protéines et ne sont donc pas soumis aux pressions de la sélection naturelle. Les différences observées au sein de ces régions génétiques résultent de mutations aléatoires et de la dérive génétique des allèles nouvellement formés et retracent donc indirectement le temps écoulé entre la séparation des différentes souches jusqu'au présent. L'utilisation de deux types de marqueurs, ayant des taux de mutations différents nous permet ainsi d'inférer le temps relatif écoulé entre la séparation de ces souches et aujourd'hui, s'il n'existe pas de réarrangements génétiques (reproduction sexuée, hybridation, méiose) L'accumulation de mutations au niveau des marqueurs microsatellites (taux de mutation importante) ne s'observe pas au niveau de leurs séquences ITS (taux de mutation relativement plus faible). Parce que nous n'observons pas de phénomène d'hybridation entre ces deux souches, nous pouvons conclure que l'absence de différenciation au niveau du marqueur ITS

démontre une séparation très récente de ces souches. En définissant une espèce dans son concept phylogénétique, les différenciations du marqueur ITS chez les champignons permettent de définir des espèces différentes (Giraud et al. 2008). Ainsi, dans notre système, une seule est unique espèce de champignon interagit principalement avec les trois espèces de fourmis. La différenciation claire au niveau des marqueurs microsatellites pourrait cependant traduire un processus de spéciation en cours des souches GC1 et GC2 par une séparation physique et ainsi une évolution récente et indépendante des différents couples fourmis-champignons. Cependant, ce n'est pas parce que deux entités génétiques sont phylogénétiquement proches au niveau de marqueurs neutres qu'elles le seront écologiquement. S'il existe de fortes pressions de sélection différentielles entre les espèces de fourmis, alors des traits différents peuvent être sélectionnés dans chacune des deux souches.

Origine évolutive de l'agriculture chez les *Allomerus*

Deux modèles principaux ont été suggérés pour expliquer l'origine des pratiques agricoles chez les insectes (Mueller et al. 2005) : le modèle de primo-consommation et le modèle de primo-transmission. Dans le premier cas, les agriculteurs incorporent le champignon comme source de nourriture dans un régime alimentaire varié. Ils se spécialisent ensuite dans la consommation de champignon et développent des adaptations permettant la culture de ce champignon. Dans le deuxième cas, les insectes commencent leur association en servant de vecteurs de dissémination pour le champignon. Ils évoluent ensuite vers la consommation de ce champignon et deviennent finalement cultivateurs. Le premier modèle ne s'applique pas au cas des *Allomerus*. En effet, même si nous ne savons toujours pas si une partie de l'alimentation des fourmis provient du champignon, son utilisation est principalement structurelle. La probable consommation de ce champignon serait alors une adaptation secondaire. Sachant que d'autres espèces de fourmis phylogénétiquement éloignées utilisent également des champignons de l'ordre des Chaetothyriales comme base dans la structuration de galeries ou de nids, le deuxième modèle semble également peu probable dans le sens où c'est l'adaptation des Chaetothyriales aux

conditions environnementales produites par les fourmis qui semble être à la base de ces associations. Surtout, la diversité d'espèces de champignons présents dans certaines de ces constructions (Schlick-Steiner et al. 2008, Mayer and Voglmayr 2009) ne suggère pas une spécialisation induite par une transmission verticale comme première étape de l'agriculture. Nous proposons ainsi un troisième modèle expliquant l'origine de l'agriculture chez les *Allomerus* : la primo-colonisation. Une diversité de champignons s'installe dans la niche particulière générée par les constructions des fourmis. La présence des champignons devient une composante principale de ces structures et les fourmis développent des adaptations permettant la culture de certains de ces champignons par transmission verticale.

Histoire évolutive de l'interaction entre les souches fongiques et les trois espèces d'*Allomerus*: les différents niveaux de spécificité comme indice ?

Nous suggérons dans l'article 4 deux histoires évolutives possibles entre les espèces de fourmis et leur symbiotes : la cospéciation des fourmis et des souches GC1 et GC2 ou une spéciation par changement d'hôtes entre GC1 ou GC2. Les différents niveaux de spécificité entre les champignons et les fourmis rendent la deuxième hypothèse comme la plus probable.

Notre étude indique que le niveau de spécificité d'association de chaque espèce de fourmis avec une ou plusieurs souches de champignons est assez variable. Il semble exister trois niveaux de spécificité : l'association avec l'haplotype majoritaire, l'association avec les deux sous-groupes génétiques de cet haplotype, et l'interaction avec les haplotypes minoritaires. Bien que l'haplotype H7 soit la souche associée majoritairement aux trois espèces de fourmis, la proportion d'association reste néanmoins assez variable dans chacune d'entre elles. Ainsi, elle représente 85% des associations avec *A. decemarticulatus* (92% si l'haplotype H6 est inclus, haplotype le plus proche de H7), 59% et 47% pour *A. octoarticulatus* ssp1 et *A. octoarticulatus* ssp2, respectivement. Réciproquement, l'association avec les haplotypes minoritaires représente 8% des associations chez *A. decemarticulatus*, 41 % et 53% des associations chez *A. octoarticulatus* ssp1 et *A. octoarticulatus* ssp2, respectivement.

Le choix d'une des deux hypothèses concernant l'histoire évolutive de ces associations repose sur l'identification de la transmission de ces haplotypes minoritaires. Est ce que les haplotypes minoritaires correspondent à des souches environnementales acquises horizontalement, ou bien sont elles transmises verticalement et donc sélectionnées par les fourmis ? Parce qu'aucune structure de reproduction asexuée et/ou sexuée n'a put être mise en évidence lors de nos différentes cultures ou lors de nos observations des galeries, l'acquisition verticale semble être favorisée.

Dans ce cas, la présence relativement importante de ces haplotypes minoritaires chez *A. octoarticulatus* ssp1 et *A. octoarticulatus* ssp2 peut représenter une trace d'association ancienne dans la lignée *A. octoarticulatus*. La topologie congruente entre les lignées de cultivar des Attines et les Attines était un argument en faveur d'une stricte transmission verticale, de coévolution et de cospéciation (Chapela et al. 1994). Or, bien qu'il existe une congruence topologique, une étude calibrant les temps de divergence entre les phylogénies d'Attines et de leur cultivars a montré que ces dernières étaient temporellement non congruentes (Mikheyev et al. 2010), suggérant une acquisition horizontale d'un nouveau groupe de symbionte par des Attines basales. Dans le cas spécifique des Attines basales, l'acquisition de ce nouveau groupe a remplacé totalement l'ancienne lignée de symbionte, expliquant la congruence topologique des arbres. Chez les *Allomerus*, l'histoire évolutive de l'interaction fongique semble être assez récente. On peut donc émettre l'hypothèse que le remplacement de l'ancienne lignée (haplotype minoritaire) par des symbiontes plus performant (H7) est en cours. La récente différenciation génétique des deux souches de H7 comparée à la différenciation génétique des fourmis corrobore avec une spéciation par changement d'hôte. En effet sous l'hypothèse d'une co-spéciation entre fourmis et cultivars, nous devrions observer une différenciation du champignon plus marquée. Ainsi, les différences génétiques entre GC1 et GC2 semblent indiquer un processus de spéciation bien plus tardif, après la spéciation entre *A. decemarticulatus* et la lignée *A. octoarticulatus*.

Bien sur, cela reste une hypothèse. Il se peut que la sporulation de ces souches nécessite des conditions environnementales et des conditions de culture particulières, et donc elle ne peut pas être exclue totalement. La justification d'une des deux hypothèses ne pourra qu'être vérifiée en calibrant temporellement les arbres phylogénétiques des cultivars avec celui des fourmis (de Vienne 2013).

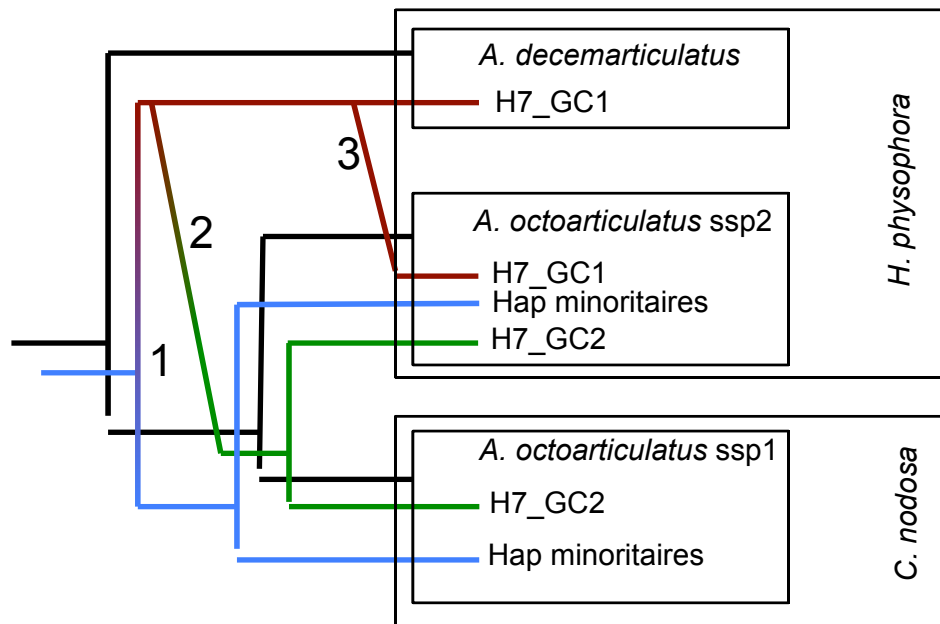


Figure 14. Représentation schématique et simplifiée de l'histoire évolutive la plus probable entre les fourmis du genre *Allomerus* et leurs symbiotes fongiques. Le phylogramme noir représente la phylogénie des *Allomerus*. Le phylogramme coloré correspond à celui des champignons. Les dégradés de couleurs dans le phylogramme correspondent à une différenciation génétique des symbiotes et les tracés en biais représentent des transferts horizontaux par changement d'hôtes. **(1)** spécialisation d' *A. decemarticulatus* envers H7 à partir d'un pool de symbiotes. **(2)** Evènement de transfert horizontal du symbiote H7 de *A. decemarticulatus* vers l'ancêtre commun des *A. octoarticulatus* concomitant avec une différenciation génétique de H7 en deux entités GC1 et GC2. **(3)** Transfert horizontal de GC1 vers *A. octoarticulatus* ssp2 par le partage d'une même plante hôte entre cette dernière et *A. decemarticulatus*

La figure 14 représente l'hypothétique histoire évolutive de l'interaction sous l'hypothèse de la spéciation par changement d'hôte. En premier lieu, l'ancêtre commun de ces trois espèces

d'*Allomerus* cultive une seule espèce de champignon, génétiquement diversifiée, et acquiert la capacité de la transmettre verticalement. Lors de la spéciation entre *Allomerus decemarticulatus* et la lignée des *A. octoarticulatus*, la première se spécialise avec l'haplotype majoritaire H7 (Fig. 14 (1)). Par un événement de transfert d'hôte horizontal, la lignée des *A. octoarticulatus* acquiert l'haplotype H7. Cette souche se retrouve séparée physiquement, et par des phénomènes de mutations, dérive ou/et pressions de sélections différentes, se subdivise en deux entités, GC1 et GC2 (Fig. 14 (2)). La surreprésentation de GC2 chez les *A. octoarticulatus* traduit alors un phénomène de spécialisation entre ces partenaires. Soit cette souche est positivement sélectionnée par les fourmis, leur donnant un avantage sélectif par rapport aux haplotypes minoritaires, soit elle dispose d'une meilleure capacité compétitrice, limitant la croissance des haplotypes minoritaires et facilitant sa transmission verticale par les fourmis. Enfin, un événement de spéciation dans la lignée *A. octoarticulatus* donne naissance à *A. octoarticulatus* ssp1 et ssp2. *Allomerus octoarticulatus* ssp2 s'associe à *H. physophora*, ce qui entraîne l'acquisition de GC1 par ces dernières, par un deuxième événement de transfert horizontal de souches (Fig. 14 (3)).

Sous cette hypothèse, la non différenciation des souches GC2 en fonction des deux espèces d'*A. octoarticulatus* pourrait traduire une spéciation très récente par changement de plante hôtes.

Co-spécialisation entre *A. decemarticulatus* et GC1 et niveau d'agriculture.

Alors que nos résultats indiquent clairement l'acquisition des souches GC1 par *A. octoarticulatus* ssp2 par des événements de transmission horizontale, ils démontrent également que la réciproque n'est pas vérifiée, c'est à dire que *A. decemarticulatus* n'a pas acquis horizontalement les souches GC2.

Encore une fois, de nombreuses hypothèses peuvent expliquer ce phénomène. Si nous suivons notre hypothétique histoire coévolutive, l'association entre les souches GC1 et *A. decemarticulatus* serait la plus ancienne. Par des processus de co-adaptations entre ces deux partenaires au cours des temps évolutifs, *A. decemarticulatus* a pu se spécialiser vis à vis de GC1 et n'est donc plus en mesure d'interagir avec GC2. Dans la même mesure, la souche GC1 a pu se

spécialiser aux conditions environnementales fournit par sa fourmi hôte, se retrouvant alors avantagée compétitivement et arrivant à exclure GC2 de l'environnement. Est ce que cela revient à dire que *A. octoarticulatus* ssp2 n'est pas spécialisée à GC2, ce qui lui permet d'interagir sans trop de contraintes évolutives avec GC1 ? La vérification de ces hypothèses nécessite la mise en évidence de différents traits soumis à une sélection réciproque entre les deux partenaires de chaque couple. Chez les Attines qui pratiquent une agriculture dite supérieure, le substrat fourni au champignon se compose de matériel végétal frais. Ce substrat est une évolution par rapport au substrat fournit par les fourmis pratiquant une agriculture dite « inférieure », qui se compose essentiellement de matière végétale morte. Le champignon associé aux fourmis « supérieures », quant à lui, produit des structures nutritives particulières (gongylidia) qui n'existent pas chez les souches de champignons associées aux fourmis pratiquant une agriculture inférieure (Mueller et al. 2005). Ces modifications coévolutives ont entraîné une très forte co-spécialisation et co-dépendance entre agriculteurs et cultivars particuliers. Ainsi une espèce de fourmis coupeuses de feuilles ne peut pas vivre en association avec un champignon issue d'une agriculture inférieure et vice versa (Mueller et al. 2005). Dans notre système, les traits soumis à sélection réciproque chez la fourmis sont du même types que chez les Attines : la fourniture d'un substrat favorable et la protection des cultivars. Chez le champignon par contre, le service fourni est essentiellement structural, les traits soumis à une sélection réciproque ne sont ainsi pas facile à mettre en évidence. Il doit s'agir probablement des propriétés structurales du mycélium, de son mode de croissance et sa propension à être modelé par les fourmis. Enfin la plante hôte peut également jouer un rôle important dans la sélection de certaines souches, ce que nous discuterons dans le chapitre trois. Les différentes souches de champignon sont, en culture pure, morphologiquement très semblables. La mise en évidence de structures particulières risque d'être une tâche compliquée à mettre en place. Une alternative serait de se concentrer sur le « modelage » du champignon par les fourmis. L'utilisation de signaux chimiques et la production de molécules antifongiques sont des caractéristiques majeures chez les fourmis (Hölldobler and Wilson 1990). Ainsi, une réponse, par exemple une modification de croissance, d'un champignon spécifique (par exemple GC1) à des stimuli émis par des extraits de son espèce de fourmis associée (*A. decemarticulatus*), couplée à une réponse négative d'une souche étrangère (GC2) et vice versa, serait une démonstration d'une coévolution entre champignon et fourmis. Des tests

préliminaires ont été effectués mais aucune réponse n'a été observée. Lors de ces tests, les souches n'étaient cependant pas génétiquement identifiées. Il est donc possible que nous n'ayons pas travaillé sur les couples champignons-fourmis préférentiellement associés, mais sur des associations minoritaires.

En définitive, il semble que les différents niveaux de spécificité montrent bien un niveau différent de sélection, du moins entre *A. decemarticulatus* et *A. octoarticulatus* ssp2, qu'ils soient direct, par compétition par interférence (Archetti et al. 2011b), ou indirect, par contraintes évolutives (Futuyma 2010). Savoir si ces différences de spécificité entraînent une différence dans les niveaux des pratiques agricoles entre les différences espèces de fourmis n'est pas une tâche aisée. Cependant si l'on considère que ces processus agricoles ont comme but premier la construction de galeries pour capturer des proies, la qualité et l'efficacité de ces galeries en fonction des espèces de fourmis peuvent être utilisées comme proxy pour comprendre si la spécificité d'association entraîne une différence des pratiques agricoles (Cf. Chapitre 2).

Variations géographiques des dynamiques coévolutives au sein des interactions entre *A. octoarticulatus* ssp2 et ses symbiotes fongiques.

L'association entre *A. octoarticulatus* ssp2 et la souche GC1 est corrélée au taux d'occupation des plantes hôtes par *A. decemarticulatus* dans les différentes populations étudiées. Ainsi il semblerait que l'association entre *A. decemarticulatus* et GC1 soit le facteur déterminant l'association entre *A. octoarticulatus* ssp2 et GC1. (Tableau 1, article 4).

Tableau 1. Différentiation de l'haplotype majoritaire en GC1 et GC2 associée aux 24 colonies d'*Allomerus octoarticulatus* ssp2 pour chaque population. (MS), (FO), (PA) et (SA) représentent les sous-populations de la Montagne des Singes, des chutes Fourgassier, de Patawa et de Saül, respectivement.

souches	MS	FO	PA	SA
H7_GC1	6	3	0	3
H7_GC2	1	0	8	3

Cela à une conséquence directe sur les processus adaptatifs entre *A. octoarticulatus* ssp2 et GC1. En effet, les changements d'hôtes limitent la capacité du champignon à s'adapter à son nouvel hôte (Mikheyev et al. 2007). Sachant que les pressions de sélections imposées par les deux espèces de fourmis devraient être différentes, l'adaptation de GC1 envers *A. decemarticulatus* par une histoire coévolutive commune devrait être sélectivement moins avantageuse lorsque GC1 interagit avec *A. octoarticulatus* ssp2. Puisque dans la plupart des populations, *A. decemarticulatus* est le symbionte majoritaire de *H. physophora*, l'adaptation de GC1 à des éventuelles pressions de sélection imposées par *A. octoarticulatus* devrait être limitée, voire nulle. Ainsi dans la plupart des populations, les pressions de sélections de GC1 envers *A. octoarticulatus* ssp2 lui impose une certaine adaptation, mais la réciproque ne devrait pas être vrai. Consécutivement, les populations où *A. decemarticulatus* est présente peuvent être déterminées comme un « coldspot coévolitif » dans l'interaction entre *A. octoarticulatus* et les symbiontes fongiques (Thompson 2005).

A Patawa, au contraire, *A. decemarticulatus* n'est pas présente, et consécutivement le symbionte GC1 non plus. La présence de certains génotypes de champignons associés à *A. octoarticulatus* ssp2 sera seulement due aux pressions de sélection de cette dernière et aux pressions environnementales. Il semblerait donc que dans cette population, les processus co-adaptatifs puissent se mettre en place, agissant comme un hotspot coévolitif dans cette interaction (Thompson 2005). Outre la présence de la souche GC2, une autre souche se retrouve majoritaire à Patawa, H2 (Tableau 2). Il se peut donc que certaines pressions de sélections induites par

A. octoarticulatus entraîne la présence d'un symbionte qui ne se retrouve pas associé à *A. octoarticulatus* ssp2 dans d'autres populations. Alternativement la co-dominance de H2 pourrait être due à certains processus stochastiques, comme une primo colonisation d'une reine fondatrice avec ce symbionte particulier. Est ce que les traits de ces deux partenaires varient par rapport aux autres populations? Cela n'a pas été expérimentalement testé, mais une expérience comparative de reconnaissance chimique comme nous l'avons expliqué précédemment et une mesure des pratiques agricoles d'*A. octoarticulatus* ssp2 (qualité/quantité du piège) entre les différentes populations permettraient de se faire une idée de la variation géographique des dynamiques coévolutives entre *A. octoarticulatus* ssp2 et ses symbiontes fongiques.

Tableau 2. Occurrence des différents haplotypes de champignon en association avec *A. octoarticulatus* ssp2 dans la population de Patawa

souches	occurrence
H1	1
H2	9
H4	1
H5	2
H7_GC2	9
H8	2
H10	1
Total	25

La plante hôte comme facteur important dans les dynamiques coévolutives des pratiques agricoles chez les fourmis du genre *Allomerus*

Au delà de la capacité des fourmis à sélectionner des symbiontes particuliers, leur interaction mutualiste avec une plante hôte semble être un facteur déterminant dans la capacité d'adaptation des champignons à leur fourmis associées.

De l'asexualité et de la reproduction clonale émergent deux principes fondamentaux dans les capacités d'adaptation et de coévolution. D'un coté, ils permettent aux partenaires symbiotiques une coévolution avec des clones adaptés de façon optimale en évitant les recombinaisons génétiques qui dissocient les combinaisons de gènes bien adaptées. D'un autre coté, les lignées purement asexuées devraient être soumis à l'accumulation d'allèles délétères et devraient être limitées dans leur capacité d'adaptation à des environnements hétérogènes (Roe et al. 2011). La restriction des colonies de fourmis sur leurs plantes hôtes limite les recombinaisons entre des symbiontes trop différenciés. Ainsi chaque couple fourmis-champignon a pu librement se coadapter, même dans un milieu où les deux espèces de fourmis vivent en sympatrie. Cependant, la plus grande longévité des plantes hôtes par rapport aux colonies de fourmis entraîne une succession de plusieurs colonies de fourmis d'une même espèce et par conséquent, une succession de symbiontes fongiques. Si l'on considère que chaque espèce de fourmis s'est associée avec un symbionte préférentiel, les recombinaisons d'allèles se feront entre souches qui auront préalablement été sélectionnées par l'adaptation à une même pression de sélection, une seule et même espèce de fourmis. Cette diversité générée permet alors un taux d'adaptation plus important, facilitant les réponses évolutives au changement de milieu. Ces mécanismes fonctionnent lorsqu'une plante est spécialisée à une espèce de fourmis.

Lorsque plusieurs espèces de fourmis sont en compétition pour une plante hôte alors les mécanismes vus précédemment entre *A. octoarticulatus* ssp2 et *A. decemarticulatus* entrent en jeu. Les capacités d'adaptations dépendront de la fréquence de chaque hôte et de la façon dont certains génotypes vont affecter les interactions par paires.

Vers une démonstration directe de la transmission verticale

Bien qu'il existe très peu de doute quand à la verticalité de la transmission entre fourmis et champignons, l'hypothèse d'une transmission horizontale exclusive de l'haplotype majoritaire ne peut être totalement rejetée. Pour exclure cette possibilité de la transmission horizontale comme mécanisme exclusif, une démonstration directe de cette transmission verticale est donc nécessaire. Bien sur, cela n'enlève rien à la démonstration du phénomène agricole, même si la transmission du champignon est horizontale, nos résultats démontrent quand même une sélection active par les fourmis. Cependant toutes les hypothèses sur l'histoire évolutive et coévolutive citées précédemment assument la verticalité de la transmission des souches fongiques comme processus majoritaire.

Nous avons essayé de démontrer directement cette verticalité. Cependant les résultats n'ont pas été concluants. Le principe était de réassigner les cultivars associés à certaines colonies mères à leurs probables colonies filles. Pour cela nous avons échantillonné et génotypé plus de 60 reines fondatrices d'*A. decemarticulatus* ainsi que leurs cultivars associés. Puis nous avons génotypé les colonies mères avoisinantes ayant la plus forte probabilité de produire des reines fondatrices (c'est à dire des colonies vivant sur des plantes ayant plus de 20 domaties). Nous avons alors réassigné des reines fondatrices à leurs colonies mères et génotypé le champignon associé à ces dernières. Au final seulement cinq couples champignons colonies-mères et champignons-reines fondatrices ont pu être assignés. Ce faible rendement tient en plusieurs points : (1) tous les cultivars des reines fondatrices n'ont pu être génotypé, lié à l'impossibilité d'obtenir une culture pure et (2) seules quelques reines fondatrices ont pu être assignées sans ambiguïté à une colonie mère. Finalement dans aucun des cinq cas nous avons retrouvé le même cultivar entre colonie mère et reines fondatrices. Plusieurs explications, liées à la biologie du système, peuvent être mise en avant pour expliquer ce résultat : (1) Il existe une assez faible diversité génétique des fourmis au sein d'une même population, ainsi les assignations des reines fondatrices à leurs vrais colonies filles peuvent être facilement biaisées. (2) Nous avons génotypé un seul cultivar par colonies mères alors que plusieurs cultivars génétiquement distincts peuvent coexister au sein

d'une même colonie. (3) Finalement, nous ne connaissons pas les différents processus de transferts horizontaux de souches au moment de la colonisation d'une nouvelle plante. Est ce que certaines reines fondatrices peuvent perdre leurs cultivars pendant le vol nuptial ? Si c'est le cas, sont elles capables de cultiver un champignon préexistant sur la plante hôte? Nous avons par exemple observé deux cas où les champignons associés à deux reines fondatrices s'installant sur la même plante étaient génétiquement identiques. Il doit donc exister certains mécanismes comme des vols de cultivars qui doivent perturber le signal d'une transmission verticale. Une étude qui sera prochainement mise en place aura pour but de démontrer cette transmission verticale dans un environnement contrôlé, en serre. Pour cela, plusieurs plantes colonisées, mais provenant de différentes populations (pour augmenter la diversité entre colonies filles et ainsi faciliter la réassignation des reines fondatrices) seront mises en présence de plantes non-colonisées, vierges de symbiontes fongiques. Les souches de champignon associées aux colonies mères seront préalablement génotypées et la monoculture d'une souche sera une condition préalable à l'intégration de cette colonie dans le système expérimental.

Chapitre 2. Protection des plantes par les fourmis : émergence d'un conflit

Articulation des articles

Nous avons vu dans le premier chapitre que la relation entre le champignon et les fourmis correspond à un tout nouveau cas d'agriculture à but structurel chez des insectes. La culture de ce champignon par les fourmis leur permet ainsi de construire des galeries sous les tiges de leurs plantes hôtes. Ces galeries jouent un rôle de piège, permettant aux fourmis de capturer des insectes jusqu'à 1800 fois le poids d'une ouvrière (Dejean et al. 2005). Néanmoins, la construction et l'utilisation de ce piège par les fourmis devraient créer un conflit dans l'interaction entre fourmis et plante. En effet, la protection de la plante hôte par les fourmis du genre *Allomerus* est issue d'un sous produit de l'activité prédatrice des fourmis sur les feuilles de la plante (Dejean et al. 2001). Or, non seulement la construction du piège devrait nécessiter une force ouvrière qui ne sera pas allouée aux patrouilles sur les feuilles, mais surtout l'utilisation du piège comme moyen de capture d'insectes devrait théoriquement décharger les ouvrières de patrouilles conséquentes sur les feuilles, à la recherche de proies potentielles. Il se met alors en place un compromis dans l'allocation de la force ouvrière entre l'ensemble - culture du champignon, construction et utilisation du piège - et protection de la plante. Nous avons étudié ce possible conflit d'intérêt en comparant les comportements de prédation entre *A. octoarticulatus* ssp2 et *A. decemarticulatus* et leurs conséquences sur la fitness de leur plante hôte *H. physophora*. Cette approche comparative nous a permis d'appliquer la théorie des contrats pour comprendre comment de tels traits peuvent être sélectionnés malgré leurs potentielles nuisances dans la relation mutualiste entre la plante et les fourmis (**Article 5**). Nous avons ainsi montré que le compromis entre la chasse dans le piège et les patrouilles sur les feuilles affecte bien la croissance végétative de la plante. Il semble également avoir un effet sur la production de fleurs et donc potentiellement de fruits, affectant consécutivement la fitness de l'hôte. Cependant, parce que la fitness des fourmis est non seulement liée à leur action mais également à la croissance végétative et la fitness de son hôte, un « service minimum » de patrouilles sur les feuilles se met en place permettant une protection garantissant une résultante écologique positive pour la plante et les fourmis

On peut alors légitimement se demander quels sont les mécanismes qui rentrent en jeu dans l'attraction des ouvrières sur les feuilles d'*H.physophora*. En effet, l'efficacité du piège (**Article 6**) devrait contre sélectionner les activités de patrouilles sur les feuilles à la recherche de proies. Dejean et al. (2001) ont étudié le recrutement des ouvrières d'*A. decemarticulatus* lors de la reconnaissance d'une proie sur les feuilles en utilisant des termites. Ils concluent leur étude en suggérant que l'utilisation de termites comme proies a permis d'enregistrer la séquence complète de recrutement mais que les proies naturelles avaient dans la majeure partie le temps de s'échapper à cause d'un temps de recrutement assez long. En définitive, les *A. decemarticulatus* ne chassent pas sur les feuilles. Deux autres mécanismes peuvent alors être à l'origine des patrouilles. Soit les ouvrières sont attirées par d'autres sortes de récompenses, soit il existe un signal visuel ou chimique émis par les plantes. Nous avons ainsi étudié quels mécanismes étaient responsables des patrouilles des ouvrières d'*A. octoarticulatus* ssp2 et *A. decemarticulatus* sur les feuilles de leur plante hôte (**Article 7**).

Abstract - Article 5

Mutualisms rely on the preservation of the mutualistic traits of the associated species over evolutionary time. Yet, natural selection should promote alternative traits if they increase the fitness of one of the species, which may weaken the outcomes of the interaction and thus its persistence. When applied to mutualisms, the contract theory offers an interesting framework for studying such modifications as it infers that a symbiont's fitness is tied to feedbacks deriving from its actions and the host's responses. We empirically tested this theory in a two-to-one ant-plant mutualism by correlating the fitness of the ant species to their mutualistic actions. Both ant species protect their host by patrolling leaves, but have also developed an alternative predation strategy consisting of constructing gallery-shaped traps to ambush prey. We show that differences in the trade-off between ambushing and patrolling leaves induce a variation in the intensity of the biotic defense, affecting the host's vegetative growth and, consequently, the production of domatia. Overall, the contract theory allows us to demonstrate that changes in the mutualistic traits behind the interaction can be selected if the benefits conferred to the symbiont from its action feedbacks are not too negatively affected by the host's feedbacks.

Key words: host response, trait selection, mutualism, *Allomerus*, *Hirtella physophora*.

Article 5. An alternative predation strategy alters contract theory feedbacks in an ant-plant mutualism

In preparation

Jérémie Lauth^{1,2§*}, Pierre-Jean G. Malé^{3,4§}, Mathieu Duvignau², Céline Leroy⁵, Olivier Roux^{2,6}, Alain Dejean^{2,7} and Jérôme Orivel²

¹Université des Antilles et de la Guyane, UMR EcoFoG (Ecologie des Forêts de Guyane), Campus Agronomique, BP 316, F-97379 Kourou cedex, France

²CNRS; UMR EcoFoG, Campus Agronomique, BP 316, F-97379 Kourou cedex, France

³Université de Toulouse; UMR EDB (Evolution et Diversité Biologique), 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse cedex 9, France

⁴CNRS; UMR EDB, 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse, France

⁵IRD ; UMR AMAP (botAnique et bioinforMatique de l'Architecture des Plantes; UMR-IRD 123), Boulevard de la Lironde, TA A-51/PS2, F-34398 Montpellier Cedex 5, France

⁶IRD; UMR MIVEGEC (Maladies Infectieuses et Vecteurs Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle), BP 171, Bobo Dioulasso 01, Burkina Faso

⁷Université de Toulouse; UMR ECOLAB (Laboratoire d'Ecologie Fonctionnelle), 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse cedex 9, France

[§]These two authors contributed equally to this study

*Corresponding author: Jérémie Lauth, UMR Ecologie des Forêts de Guyane, Campus Agronomique, BP 316, F-97379 Kourou cedex, France. Fax: +33 (0)5 94 32 43 02; E-mail: jeremie.lauth@ecofog.gf

Introduction

Understanding the mechanisms behind the persistence of cooperative behaviors between unrelated organisms is one of the central issues driving the study of mutualisms (Yu 2001, Ferriere et al. 2002). Historically, mutualisms were firstly defined as interactions resulting from costly investments in which the return benefits exceed the imposed costs (Trivers 1971, Axelrod and Hamilton 1981). However, in such a situation, natural selection should promote the emergence of cheaters that benefit from the mutualism without reciprocating. A number of concepts and factors have been put forward to explain the maintenance of mutualistic interactions in face of cheating, such as partner-fidelity feedback, host sanctions or spatial structure (Bull and Rice 1991, Sachs et al. 2004, Szilagyí et al. 2009). Alternatively, most mutualisms can be interpreted as cost-free interactions, where benefits arise from the by-product of the selfish behavior of one partner that generates an indirect and positive outcome for the other (Connor 1995, Leimar and Hammerstein 2010). If such an interpretation has been one of the most suitable in explaining the ubiquity of mutualisms, the recent advent of a formalized theory integrating and expanding the above-mentioned conceptualizations has greatly improved our understanding of mutualisms (Foster and Wenseleers 2006, Weyl et al. 2010, Archetti et al. 2011a)

A host engaged in a mutualistic association with a symbiont faces two challenges. First, before the interaction is established, the host must be able to select from a variety of mutualistic partners whose characteristics are unknown. Then, it must prevent the symbiont from cheating, although it cannot observe the symbiont's actions. This is known as the "hidden actions" problem and it can best be explained by the contract theory originally used in economics (Archetti et al. 2011a). In biology, the economic contract theory assumes that the fitness of a symbiont corresponds to the net sum of three different feedbacks (Fig. 1). The first feedback comes from the short-term contribution of the symbiont's actions to its own fitness. In a mutualistic framework, these actions are linked to the mutualistic traits of the symbiont. Whether they are costly or not for the symbiont does not alter the premises of the contract theory, thus grouping together invested and by-product benefits. The second feedback comes from the host's direct response to the outcome of the symbiont's action. This response, called policy feedback, can be either negative or positive depending on the outcome of the symbiont's action (Weyl et al. 2010).

The third feedback comes from the host's fitness, which is linked to the host's response to the outcome of the symbiont's action. The degree to which this feedback affects the symbionts depends upon factors intrinsic to mutualisms; for example, generalist symbionts tend to be less affected than specialists by host fitness (Archetti et al. 2011a). This framework is thus very useful in understanding the selection of traits underlying the mutualistic behavior of symbionts and any possible change in these traits. Indeed, any modifications to such traits should be followed by the modification of the action feedback, its outcomes and thus the associated policy and fitness feedbacks. The potential for the selection of such a trait should thus depend on the net sum of

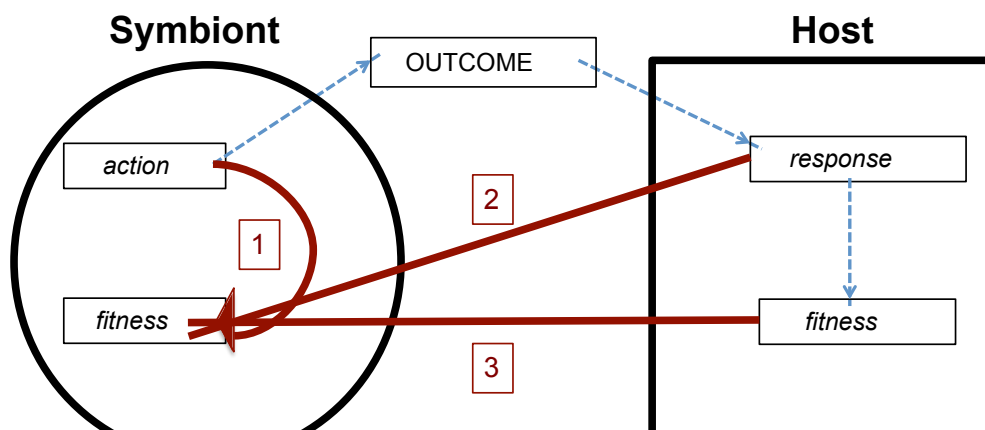


Figure 1. Schematic representation the three feedbacks experienced by a symbiont by applying the contract theory to mutualisms. The large, empty black circle and the large, empty black square represent the symbiont and the host, respectively. The thick red arrows represent the three feedbacks modulating the symbiont's fitness: 1- direct feedback deriving from the symbiont's action which benefits itself; 2- policy feedback deriving from the host's response, and 3- feedback deriving from the host's fitness. The thin and dotted blue arrows represent the indirect relationship between the symbiont's action, the host's response and the fitness feedback, which is modulated by the outcome of the symbiont's action.

these three feedbacks.

Protective ant-plant mutualisms are interesting model systems for the empirical demonstration of this variability in feedbacks. In these systems, the protection of plants by ants is most often the indirect result of foraging and territorial activities on host leaves, which are by-products of the "selfish" activities of the colonies. In return, myrmecophytes ensure constant ant presence through the production of domatia (e.g., hollow branches, thorns or leaf pouches) and often food (i.e., extra-floral nectar and/or food bodies) (Heil and McKey 2003, Rico-Gray and

Oliveira 2007, Dejean et al. 2009). Such by-product mutualisms are theoretically viewed as stable because there is no incentive to cheat (Sachs et al. 2004). Nevertheless, this does not mean that there is no potential for the selection of alternative traits. Any change in the original trait (i.e., patrolling activities) that affects the outcome for the host could in turn affect the stability of the mutualism. Here, we explore this issue in a two-to-one ant-plant mutualism between two closely-related ant species, *Allomerus decemarticulatus* and *A. octoarticulatus*, competing for the same host plant species, *Hirtella physophora*. The close phylogenetic relatedness of the two ant species inhabiting the same species of host plant in the same environment enable factors other than the importance of a symbiont's actions and the subsequent outcomes to be excluded. To meet their need for nitrogen in the restricted foraging environment provided by their host plants, some predatory plant-ants have developed alternative hunting techniques other than solely patrolling on their host-plant leaves. This is the case for *A. decemarticulatus* and *A. octoarticulatus* which build gallery-shaped traps on the stems of their host plants to ambush prey, while also foraging on their leaves (Dejean et al. 2001, 2005, Ruiz-González et al. 2011). If such a predatory strategy enables the capture of prey larger than what can be captured on the foliage, it generates, nonetheless, the spatial segregation of the workers, which could ultimately lessen plant protection. We thus studied the trade-off between the two predation strategies of these ant species, and subsequently analyzed to what extent this can affect ant fitness as well as the protection and performance of the host plant. We discuss different hypotheses, in the context of the “hidden actions” problem, on how and in which conditions a symbiont trait that lessens host benefits may be selected in by-product mutualisms.

Materials & Methods

- *Study site and model system*

This study was conducted between November 2008 and May 2011 at *La Montagne des Singes*, Kourou (05° 04' 20"N; 52° 41' 43"W), in French Guiana. At this site, *Hirtella physophora* is inhabited by either *A. octoarticulatus* or *A. decemarticulatus*, with a single colony per plant.

Hirtella physophora is an understory treelet that occurs strictly in pristine Amazonian rainforest. It has long-lived leaves that bear a pair of domatia at the base of each lamina and

extra-floral nectaries located on the abaxial surface of the lamina and inside the domatia (Leroy et al. 2008). The domatia appear early in the plant's ontogeny and result from the curling under of the leaf margin. The profound morpho-anatomical modifications of the tissues compared to the lamina show that the formation of domatia is costly for the plant (Leroy et al. 2008, 2010).

All *Allomerus* species are specialist plant-ants inhabiting a variety of myrmecophytic hosts (Fernandez 2007). In *A. octoarticulatus* and *A. decemarticulatus*, the species studied thus far, workers protect their host plant from defoliators through their predatory behavior (Dejean et al. 2001, Romero and Izzo 2004, Frederickson 2005, Grangier et al. 2008). Moreover, these species build galleries pierced with holes under the stems of their host plants that they then use as traps to ambush prey. Workers hide in the galleries with their heads just under the holes, waiting for prey. The vault of the galleries is a composite material made of cut plant trichomes reinforced by the mycelium of an Ascomycete fungus specifically cultivated by these ants (Lauth et al. 2011, Ruiz-González et al. 2011). Note that this fungus is also a trophic mediator, improving nutrient uptake by the host plant (Leroy et al. 2011). On the other hand, these two ant species are also known to impose costs on their host plants through their castration behavior (Yu and Pierce 1998, Izzo and Vasconcelos 2002, Edwards and Yu 2008, Malé et al. 2012). Castration favors the vegetative growth of the plant and thus the production of more nesting space (Frederickson 2009).

It has been hypothesized that *A. octoarticulatus* is a species complex and its taxonomy remains a subject of debate (Fernandez 2007). At the study site, *A. octoarticulatus* lives in association with both *H. physophora* and another ant plant, *Cordia nodosa*. In order to distinguish between potential cryptic species associated with these two host-plant species, we investigated their genetic structure using microsatellite markers (Debout et al. 2006, Malé et al. 2010). This demonstrated that these two ants species are distinct cryptic species ($\phi_{PT} = 0.382$, $p < 0.01$; see supplementary material) and it is thus important to note that, in the area studied, *A. octoarticulatus* inhabiting *H. physophora* is a specialist toward its host plant.

- *Ant behavior*

Patrolling activity on leaves

As phytophagy mostly affects young leaves (though not those at their first developmental stage; see (Grangier et al. 2008)), we conducted the following experiments on mature, but still tender leaves, which were between 1 and 2 months-old.

We first compared the patrolling effort of the two ant species by counting the number of ant workers patrolling on both sides of two leaves on two different branches for 13 *H. physophora* per associated ant species between 1:00 and 3:00 p.m. during the species' main period of activity (Dejean et al. 2001). Statistical comparisons were conducted using Generalized Linear Mixed Modelling (GLMM) with plant ID as a random effect.

The time needed to locate alien arthropods on the leaves was assessed using soldiers of the termite, *Cavitermes tuberosus*. One individual was gently deposited in the middle of one leaf per plant halfway between the central vein and the leaf margin, and the time it took for it to be discovered by a worker was recorded. Putative differences in data dispersion between the two ant species were assessed using the Ansari-Bradley test, a non-parametric alternative to the F-test.

Construction of and ambushing from the galleries

The construction of galleries by the two ant species was assessed by measuring the proportion of host-plant stems covered by galleries on 12 *H. physophora* per associated ant species. Both groups of plants were similar in size. The percentage of stems covered by galleries was compared using Generalized Linear Modelling (GLM).

We estimated the use of the galleries by determining the percentage of ant-occupied holes for 15 *H. physophora* per associated ant species. To do so, between 1:00 and 3:00 p.m., we took pictures of the part of the gallery located at the first basal branch and then counted the number of empty and ant-occupied holes for each picture (mean number of holes \pm SE = 54.5 \pm 20.4). The percentages of ant-occupied holes were compared between ant species using GLM, with the presence of ants considered as the 'successes' and their absence as the 'failures' in a binomial distribution.

Ant colony growth and reproduction

The total number of sexuals and workers in *A. decemarticulatus* colonies as a function of host plant size was taken from (2011) and compared to similar data for *A. octoarticulatus* colonies. The size of *A. octoarticulatus* colonies was calculated from 30 different colonies collected in the study area. All of the leaves and stems on each plant individual were cut off and placed into a plastic bag, and then preserved in 70% ethanol. Each domatium was then dissected and the number of workers, brood and sexuals was recorded. The relationship between the total number of workers or sexuals and the number of domatia was assessed using linear regressions. For the total number of workers, linear models were forced to the origin in order to fit the biological assumption (i.e., when the plants bear no domatium, the number of workers is thought to be null). Interspecific differences in the number of workers and sexuals per colony were determined by ANCOVA, using the number of domatium as the covariate.

- *Host plant*

Phytophagy and vegetative growth

The consequence of the differences in ant behavior in terms of phytophagy was determined by recording the presence/absence of damage on newly-produced leaves each month during 9 months for 13 *H. physophora* per associated ant species. The level of phytophagy was compared using GLMM, with the presence of damage considered as the "successes" and the absence of damage as the "failures" in a binomial distribution. Plant ID was used as a random effect. The number of new leaves produced was also compared between plants inhabited by either *A. decemarticulatus* or *A. octoarticulatus* using the Mann & Whitney rank test for unpaired data.

Reproduction and castration

During one period of reproduction (January to June 2009), the number of inflorescences, buds, flowers in bloom and fruits per plant were counted each week for 13 *H. physophora* per associated ant species. We then compared plant reproduction according to the associated ant

species using the Mann & Whitney rank test for unpaired data. Plant reproduction was also assessed by comparing the floral bud-to-leaf ratios using GLM.

Because both ant species are known to negatively affect the reproduction of their host plants through the destruction of floral buds, we quantified the intensity of this castration by comparing the flower-to-bud ratios for the two groups of plants. The impact of ant activity on fruit production was also compared between the two ant species by determining the fruit-to-flower ratios. These comparisons were made using Generalized Linear Modelling (GLM), with the number of flowers/fruits per inflorescence considered as the ‘successes’ and the initial number of buds/flowers minus the number of flowers/fruits as the ‘failures’ in a binomial distribution.

- *Statistical analyses*

All statistical analyses were conducted using R (R Development Core Team 2009). Generalized Linear Mixed Modelling was conducted with the `lmer` function in the *lme4* package (Bates and Maechler 2009). When needed, Shapiro-Wilk, Breusch-Pagan and Durbin-Watson tests were conducted to test for the normality of the residuals, homoscedasticity and non-autocorrelation, respectively, using functions in the *lmtest* package (Zeileis and Hothorn 2002).

Results

- *Ant behavior*

The number of workers patrolling on leaves was higher for *A. octoarticulatus*- than for *A. decemarticulatus*-inhabited plants (Fig. 2A; GLMM, ant species [*A. octoarticulatus*]: Estimate = 1.0744, SE = 0.3475, z-value = 3.092, $p = 0.002$). As a consequence, the time needed by *A. octoarticulatus* workers to find an alien arthropod on *H. physophora* foliage was shorter and less variable than for *A. decemarticulatus* (Fig. 2B; Ansari-Bradley test, $p = 0.0418$).

The proportion of host plant stem covered by galleries was lower for *A. octoarticulatus*- than for *A. decemarticulatus*-inhabited plants (Fig. 2C; GLM, ant species [*A. octoarticulatus*]: Estimate = -0.4258, SE = 0.0732, t-value = -5.821, $p < 0.001$). Moreover, the proportion of holes occupied in these galleries was also lower for *A. octoarticulatus* than for *A. decemarticulatus* (Fig. 2D; GLM, ant species [*A. octoarticulatus*]: Estimate = -1.5445, SE = 0.1825, z-value = -

8.461, $p < 0.001$).

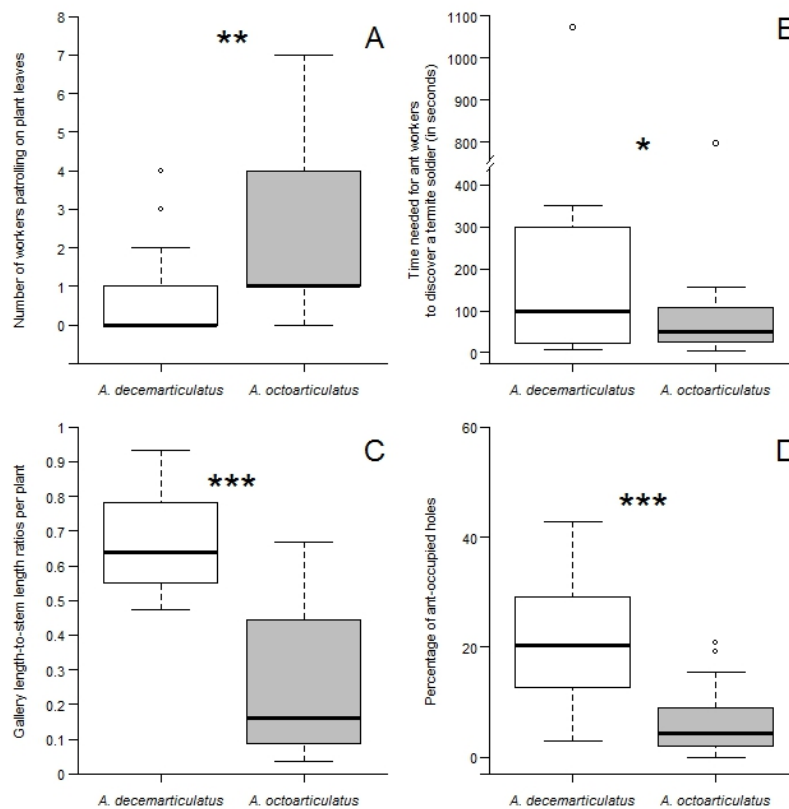


Figure 2. (A) Ant patrolling activity on *Hirtella physophora* leaves expressed as the number of workers per leaf. Asterisks indicate a significant difference between ant species (GLMM, $p < 0.01$). (B) Ant efficiency in discovering alien arthropods on *H. physophora* leaves expressed as the time needed for workers to find a termite. Asterisks indicate a significant difference in data dispersion between ant species (Ansari-Bradley test, $p = 0.0418$). (C) The building of a gallery-shaped trap expressed as gallery length-to-stem length ratios. Asterisks indicate a significant difference between ant species (GLM, $p < 0.001$). (D) Prey ambushing expressed as the percentage of ant-occupied holes in galleries. Asterisks indicate a significant difference between ant species (GLM, $p < 0.001$). Box and whisker plots represent, top to bottom, the 90th percentile, 75th percentile, median, 25th percentile and 10th percentile.

For each ant species, the total number of workers and sexuals per colony significantly increased with plant size (Workers: *A. octoarticulatus*: $y = 12.82x$, $R^2 = 0.95$, $F = 510$, $p < 0.0001$; *A. decemarticulatus*: $y = 25.66x$, $R^2 = 0.94$, $F = 497.3$, $p < 0.0001$, Fig. 3A; Sexuals: *A. octoarticulatus*: $y = 0.14x - 3.67$, $R^2 = 0.48$, $F = 25.94$, $p < 0.0001$; *A. decemarticulatus*: $y = 0.46x - 4.35$, $R^2 = 0.80$, $F = 130.7$, $p < 0.0001$, Fig. 3B). The estimated regression slopes significantly differed for workers and sexuals (Workers: ANCOVA, plant size/ant species $F = 43.20$, $p < 0.0001$; Sexuals: ANCOVA, plant size/ant species $F = 134.70$, $p < 0.0001$). These results indicate that, for a given plant size, the total number of workers per colony is two times greater and the total number of sexuals three times greater for *A. decemarticulatus* than for *A. octoarticulatus*.

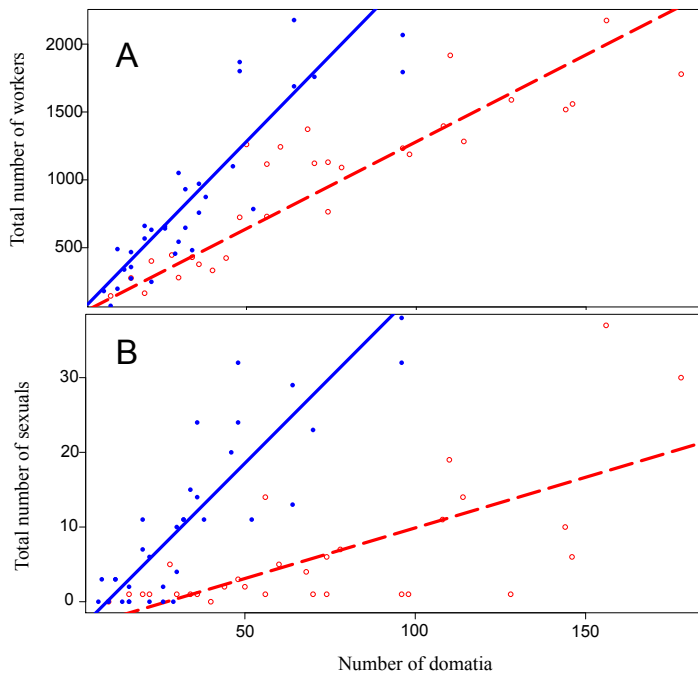


Figure 3. (A) Linear regression of the number of domatia on *H. physophora* by the total number of workers in *A. decemarticulatus* and *A. octoarticulatus* colonies. Domatia number was positively related to the total number of workers in the *A. decemarticulatus* and *A. octoarticulatus* colonies size (*A. octoarticulatus*: $y=12.82x$, $R^2=0.95$, $F=510$, $p<0.0001$; *A. decemarticulatus*: $y=25.66x$, $R^2=0.94$, $F=497.3$, $p<0.0001$). For *A. octoarticulatus*, the linear regression is represented by a dotted red line and, for *A. decemarticulatus*, the linear regression is represented by a continuous blue line (B) Linear regression of the number of domatia on *H. physophora* by the total number of sexuals in *A. decemarticulatus* and *A. octoarticulatus* colonies. Domatia number was positively related to the total number of sexuals in the *A. decemarticulatus* and *A. octoarticulatus* colonies (*A. octoarticulatus*: $y = 0.14x-3.67$, $R^2=0.48$, $F=25.94$, $p<0.0001$;

- *Host plant*

The plants inhabited by *A. octoarticulatus* were less prone to phytophagy than those inhabited by *A. decemarticulatus* (Fig. 4A; GLMM, ant species [*A. octoarticulatus*]: Estimate = -1.4146, SE = 0.4450, z-value = -3.179, $p = 0.0015$). Moreover, those plants associated with *A. octoarticulatus* produced significantly more leaves than those associated with *A. decemarticulatus* (Fig. 4B; GLM, ant species [*A. octoarticulatus*]: Estimate = 3.0769, SE = 1.2860, t-value = 2.393, $p = 0.0249$).

Both the flowering and fruiting successes of the plants were less than 100% but did not differ according to the inhabiting ant species, highlighting the similar negative effect of the ants on the host's reproduction (Fig. 4C; GLM, flowering success, ant species [*A. octoarticulatus*]: Estimate = 0.0851, SE = 0.2099, z-value = 0.406, $p = 0.6850$; fruiting success, ant species [*A. octoarticulatus*]: Estimate = -0.9683, SE = 0.5225, z-value = -1.853, $p = 0.0639$). The plants associated with *A. octoarticulatus*, however, had a higher bud-to-leaf ratio (Fig. 4D; GLM, ant species [*A. octoarticulatus*]: Estimate = 0.5326, SE = 0.2350, t-value = 2.266, $p = 0.0327$), which demonstrated the higher reproductive investment of the plants when inhabited by *A. octoarticulatus* than by *A. decemarticulatus*.

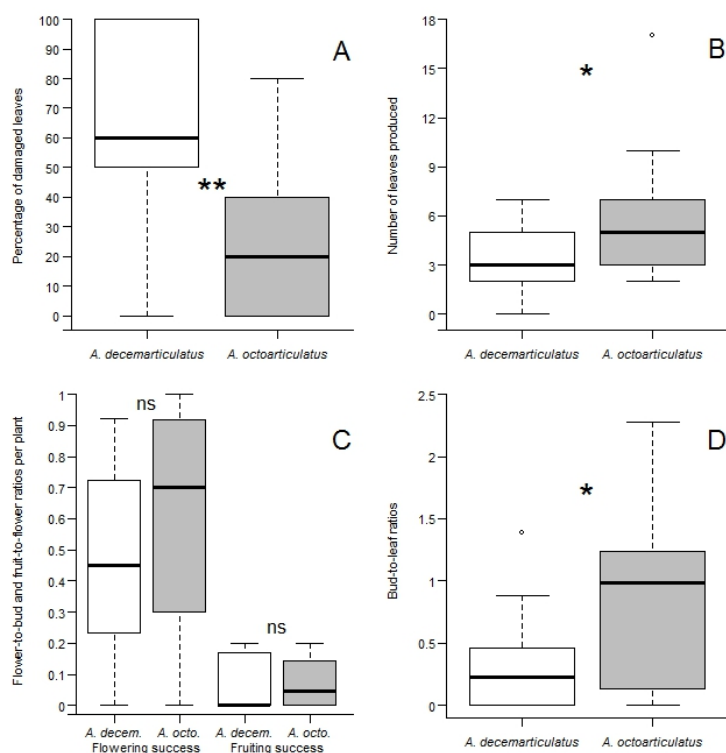


Figure 4. (A) Ant efficiency in protecting *Hirtella physophora* leaves expressed as the percentage of damage on leaves. Asterisks indicate a significant difference between ant species (GLMM, $p = 0.0015$). (B) *H. physophora* leaf production during 9 months depending on the associated ant species. Asterisks indicate a significant difference between ant species (GLMM, $p = 0.0249$). (C) Impact of ant activity on the flowering and fruiting success of *H. physophora* expressed as flower-to-bud and fruit-to-flower ratios. 'ns' indicates the absence of a significant difference between ant species (GLM, Flowering success, $p = 0.0639$; Fruiting success, $p = 0.0249$). (D) Plant reproduction expressed as bud-to-leaf ratios. Asterisks indicate a significant difference between ant species (GLMM, $p = 0.0327$). Box and whisker plots represent, top to bottom, the 90th percentile, 75th percentile, median, 25th percentile and 10th percentile.

Discussion

Both *Allomerus* species have developed an alternative to the classic foraging behavior observed in most ant species thanks to the construction of galleries that they then use as traps to ambush prey. However, differences in the construction and use of their galleries translated into contrasting ant actions, which induced variations in the outcomes experienced by the host plant. As a consequence, the policy feedback from the host's response also varied, which should theoretically more negatively affect *A. decemarticulatus*, which patrols less. Nevertheless, the higher fitness experienced by this species compared to *A. octoarticulatus* empirically demonstrates that the net effect of a symbiont's action to its fitness results from the sum of the feedbacks as defined by the contract theory. Consequently, such a theory suggests that by-product benefits can be lessened by the selection of alternative traits increasing a symbiont's fitness.

Differential selection in predation strategies

Both predation strategies are subject to a trade-off which derives from the limited worker force in the colonies. The investment of *A. decemarticulatus* in the construction of the galleries and in the worker force involved in ambushing prey enables the capture of larger prey than does foraging on the leaves (Dejean et al. 2005). *Allomerus octoarticulatus* workers, on the contrary, forage more intensively on leaves. Such a difference highlights a differential selection in predation strategies in these two closely-related plant-ants, which entails variations in both the action feedback to the ants' fitness and the host's response.

The higher number of patrolling *A. octoarticulatus* workers significantly reduces the time needed to discover alien arthropods. Its direct consequence is the better defense and less herbivory experienced by the host plant compared to plants associated with *A. decemarticulatus*. Hence, these two contrasting actions produce different outcomes. Nonetheless, it should be noted that although its presence is less beneficial for the plant, *A. decemarticulatus* remains a mutualist as the net outcome experienced by *H. physophora* is positive. These ants also protect the foliage

by patrolling on leaves, so that host plants have a better level of fitness when associated with *A. decemarticulatus* than when devoid of ants (Grangier et al. 2008, Orivel et al. 2011).

Host response and policy feedback

The differences in vegetative growth according to the associated ant species attest to the existence of a policy feedback in these mutualisms. The lower vegetative growth experienced by the host plant when inhabited by *A. decemarticulatus* is directly linked to the higher rate of herbivory, showing that the outcomes from *A. decemarticulatus*' actions affect the policy feedback. The fitness of both ant species should be qualitatively affected in a similar way by this feedback as their colony growth is highly correlated to plant size. However, because the limitation to colony growth and reproduction does not vary similarly between the ant species, one can expect that the quantitative effect of policy feedback on their fitness is not similar.

Such a difference in vegetative growth could also result from variations in the intensity of the plant castration (Yu and Pierce 1998, Vasconcelos and Davidson 2000, Frederickson and Gordon 2009, Szilagyi et al. 2009, Malé et al. 2012). The flowering and fruiting success were, however, similar regardless of the associated ant species. Yet, because plant individuals invest more in reproduction when associated with *A. octoarticulatus*, over the long term such an association may result in a higher level of fruit production.

Ant species fitness and net outcomes of the feedbacks

For a given plant size, the number of workers and sexuals in *A. decemarticulatus* colonies are twice and three times greater, respectively, than for *A. octoarticulatus*. According to the contract theory, the observed higher production of *A. decemarticulatus* offspring should thus depend on the variation in the net effect of the action, policy and fitness feedbacks experienced by the ants through the “hidden actions” problem. The ants studied are predators and use the extrafloral nectar produced by the plant to fuel their predatory activities but they do not tend Hemiptera, so that this difference in higher offspring production does not result from their diet. It seems reasonable to affirm that the higher offspring production experienced by *A. decemarticulatus* is

thus a direct consequence of the construction and use of a more highly effective trap compared to *A. octoarticulatus*. If such a strategy negatively affects the outcomes for the host plant (i.e., a reduction in vegetative growth) and thus the policy feedback, the gain in fitness for *A. decemarticulatus* from the action feedback allows it to compensate that reduction. This might explain why such a trait can be selected even if it lessens the beneficial outcomes for the host plant.

Overall, by examining our results in light of the contract theory, this study demonstrates that by-product mutualisms are not as stable as previously thought. The selection of modifying traits inherent to by-product benefits in symbionts ultimately decreases host fitness and thus acts as an equivalent to the evolution of “cheating” behavior, although it does not result from selective pressures to reduce costs. Changes in the mutualistic traits underlying the by-product benefits can be selected if the benefits conferred to the symbiont are not too negatively affected by the policy and fitness feedbacks.

The effect of the fitness feedback on ant fitness depends on the plants’ population structure because the association is transmitted horizontally. In the case of a strong population structure, daughter queens should end up with more (or fewer) daughter plants to colonize if the ants patrol more (or less). The present data do not enable us to completely understand the fitness feedback for the two ants studied. Yet, future studies on the genetic structure of both ant species and the host plants from different populations should shed some light on the ways in which the fitness feedback impacts the two ant species.

Acknowledgments

We are grateful to the *Laboratoire Environnement de Petit Saut* for furnishing logistical support, to Isabelle Henry for her help in the field and to Andrea Yockey-Dejean for editing the manuscript. Financial support was provided by the ESF-EUROCORES/TECT/BIOCONTRACT program (06-TECT-FP-007) through a fellowship from the *Fondation pour la Recherche sur la Biodiversité* (research agreement n°AAP-IN-2009-050) and by the *Programme Amazonie II* of the *Centre National de la Recherche Scientifique*. JL’s financial support was provided through a

PhD fellowship from the FSE (*Fond Social Européen*) and by a Nouragues research grant from the CNRS. This work has benefited from "Investissement d'Avenir" grants managed by the *Agence Nationale de la Recherche* (CEBA, ref. ANR-10-LABX-0025 and TULIP, ref. ANR -10-LABX-0041).

Abstract – Article 6

The construction process and the use of galleries of *Azteca brevis* (Myrmicinae: Dolichoderinae) inhabiting *Tetrathylacium macrophyllum* (Salicaceae) are compared with *Allomerus decemarticulatus* (Myrmicinae: Solenopsidini) galleries on *Hirtella physophora* (Chrysobalanaceae). Though the two ant species are phylogenetically distinct, the construction mode, the use of Chaetothyriales fungi to strengthen the galleries, and the structure are surprisingly similar. For the first time it was experimentally shown that *Azteca brevis*-built galleries are used for prey capture and host plant defense. Although differences exist in the material used for construction, the fungal association and the behavioural sequence of prey capture, our results show that the galleries have a convergent function in both ant species. However, in experiments with *Atta* workers introduced as potential prey and thread, *Al. decemarticulatus* was quicker and more efficient in capturing than *Az. brevis*. This may be due to a higher need for protein in *Al. decemarticulatus* compared to coccid raising *Az. brevis*.

Key words: ant-plant interaction, ambush behaviour, *Allomerus decemarticulatus*, *Azteca brevis*, Chaetothyriales, *Hirtella physophora*, leaf domatia, mycelial cultures, *Tetrathylacium macrophyllum*.

Article 6. Convergent structure and function of mycelial galleries in two non-related Neotropical plant-ants

Submitted in Myrmecological news

Veronika E. Mayer¹, Jérémie Lauth^{2,3}, Hermann Voglmayr⁴ & Jérôme Orivel³

¹ Dept. of Structural and Functional Botany, Faculty Centre of Biodiversity, University of Vienna, Rennweg 14, A-1030 Wien, Austria.

² Université des Antilles et de la Guyane, UMR Ecologie des Forêts de Guyane, Campus Agronomique, BP316, 97379 Kourou cedex, France.

³ CNRS, UMR Ecologie des Forêts de Guyane, Campus Agronomique, BP316, 97379 Kourou cedex, France.

⁴ Dept. of Systematic and Evolutionary Botany, Faculty Centre of Biodiversity, University of Vienna, Rennweg 14, A-1030 Wien, Austria.

Author for correspondence: Veronika Mayer, Tel: +43 1 4277-54081, Fax: +43 1 4277-9541,
Email: veronika.mayer@univie.ac.at

Introduction

The elaboration of independent nests, galleries, resource shelters or walls for the division of cavities is a common feature in ants, particularly in arboreal species. Most species use carton made from plant fibers and debris or soil particles as building material. In the Neotropics, extensive carton runways are known, among others, from the *Hirtella/Allomerus* association (Jolivet 1996, Dejean et al. 2005), *Cordia/Allomerus* (Bailey 1920, Longino 1996, Dejean et al. 2004), and the *Tetrathylacium/Azteca* association (Tennant 1989, Schmidt 2001). Previous investigation of the galleries built by *Azteca brevis* living on *Tetrathylacium macrophyllum* showed the occurrence of numerous small pores (Mayer and Voglmayr 2009). Such pores are also found in carton galleries from *Allomerus* spp. living on *Hirtella physophora* which use them as a trap for prey capture with ant workers waiting inside the galleries and ambushing prey when the latter walk over the gallery (Dejean et al. 2005). It is, however, not known whether the *Az. brevis*-built galleries have an analogous function to that of the *Allomerus* galleries. The apparent and remarkable convergence of the galleries built by *Az. brevis* inhabiting *T. macrophyllum* and *Al. decemarticulatus* on *H. physophora* led us to investigate in detail their similarities and differences in terms of (i) construction process and structure of the galleries, and (ii) to experimentally test whether the pores of *Az. brevis* galleries have a prey capture function analogous to the *Al. decemarticulatus* galleries.

Material and methods

- Species and study sites

The *Azteca brevis/Tetrathylacium macrophyllum* association was studied in the Parque Nacional Piedras Blancas (Costa Rica) near the Biological Research Station La Gamba (08°42'46''N, 83°12'90''W, 70 m asl) in a lowland primary rainforest characterised by high annual rainfall (> 5000 mm). *Azteca brevis* (Forel 1899) (Dolichoderinae) is a red-brown ant, *c.*

4 mm long and known only from the Pacific side of Costa Rica, mostly from wet forests of the southern Pacific lowlands (Longino 2007). The colonies are polydomous, with caulinar nests in live stems of trees. All the nesting chambers inside the stems are connected externally by an extensive system of galleries, made of a characteristic black, very crusty carton with small, circular holes. *Azteca brevis* maintains large populations of coccoid Hemiptera of the genus *Cryptostigma* (P. Gullan, pers. com.) inside the stems and in the runway tunnels. Colonies have been found on *T. macrophyllum* (Salicaceae), a small tree with an average height of about eight metres (but reaching a maximum height of 15–20 metres) that grows on the Pacific slopes of Central and South America from southern Costa Rica to Ecuador with its centre of distribution in the Colombian Chocó. It is found preferentially on steep slopes near rivers and streams in primary forest (Janzen 1983). The domatia are located on the stems and develop from the partial pith degeneration. In the study area the plant can be colonised by various ant species (Tennant 1989), but, *Az. brevis* is the only one which enlarges the domatia actively through excavation of remaining pith (Schmidt 2001).

The *Allomerus decemarticulatus*/*Hirtella physophora* association was studied in the area of *Petit Saut*, Sinnamary, French Guiana (05°03'30" N, 52°58'34"W) in a lowland primary rainforest. *Allomerus decemarticulatus* (Mayr 1878) (Myrmicinae) are minute tawny-coloured ants (1.5–1.8 mm), all restricted to ant plants. In the study area, *Al. decemarticulatus* is the main obligatory inhabitant of *H. physophora* with a single mature colony per plant and this ant species has never been found associated with other myrmecophytic species (Grangier et al. 2009). The *Al. decemarticulatus* workers protect their host plants through their predatory behaviour (Grangier et al. 2008), including by building galleries along the stems to ambush for prey (Dejean et al. 2005). *Hirtella physophora* is a long-lived understory treelet that has leaves with a pair of domatia at the base of each lamina (Leroy et al. 2008, Orivel et al. 2011). The species occurs mostly in patches on the upper slopes of hillsides (Solano et al. 2003).

- Investigation of galleries' structure and material

Freshly collected carton galleries of *Az. brevis* were examined and documented with a Reichert and Wild M400 photomicroscope equipped with a Nikon digital camera in the laboratory of the Estación Tropical La Gamba. At the University of Vienna dried carton samples were investigated with a Nikon SZH10 stereomicroscope. In both ant species, wall thickness, hole diameter and distribution in the galleries were investigated from measurements performed along 2 cm of the carton gallery with a calliper rule from ten different ant colonies.

- Field observation on the construction of the carton galleries

The construction process of the carton galleries was studied in 15 different *Az. brevis* colonies during the dry and the rainy season in 2009 and 2010. We removed 10 cm from already existing carton galleries and observed and documented twice a day for one week the reconstruction. If young, recently grown branches of the host tree *T. macrophyllum* were easily accessible, we also monitored and documented the elongation of the galleries onto this part.

Similar observations were performed on 10 *Al. decemarticulatus* colonies during the wet season in 2010. The *Al. decemarticulatus* galleries were removed from the plant and the reconstruction process was followed each week during 14 weeks. For documentation we made photos of the construction of each colony every day during the observation period.

- Testing the function of the galleries of *Az. Brevis* and *Al. decemarticulatus*.

To test the role of the *Az. brevis* galleries and to compare it with *Al. decemarticulatus*, leaf cutter ants of nearby nests (*Atta colombica* or *At. cephalotes*) were used to simulate the ants' behaviour towards potential invaders or prey. One *Atta* worker or soldier was carefully placed on the upper side of three different branches (ie. on parts devoid of galleries) of four different *Azteca*-occupied *T. macrophyllum* and ten different *Allomerus*-occupied *H. physophora* plants. Because suitable and easily accessible branches with *Azteca* galleries are rather rare, we repeated the experiment

with the same branches three times with an interval of two days between the experiments. The *Atta* ants were monitored for 30 min. The fate of the *Atta* ants was classified into one of three different behavioural categories: (1) still free, (2) getting captured by the inhabiting ants, and (3) escaping from the tree. For control, the carton galleries of three branches on the same trees as before were destroyed after the experiment and the behaviour of *Az. brevis* towards the leaf cutter ants monitored. As the ants did not attack the insects apart from their carton tunnels and no capture happened, the data were not further analysed.

The data obtained from the 30 min observation were not normally distributed and therefore statistically analysed with a Generalized Linear Model (GLM) with repeated measures. Whether the difference of the response between *Allomerus* and *Azteca* to the introduced *Atta* ants was significant or not was tested using a Mann-Whitney U test for independent groups with non-parametric data. For all statistics Statistica 7.1 (StatSoft Inc.) was used.

Results

- Galleries structure, construction material and construction process

In both species the galleries are of similar shape, i.e. an arched tunnel, with an outer diameter of 3–4 mm and 2 mm high. In *Azteca*- as well as in *Allomerus*-built galleries, the entire wall is 0.2 mm thick, perforated with \pm evenly distributed circular holes 0.9 (\pm 0.2) mm wide, and separated by an average distance of 2-4.5 mm (Fig. 1D, H). The diameter of the holes is slightly larger than the workers' heads, allowing them to enter and exit. In *Az. brevis*, the holes are lined with a bulky ring (Fig. 1D, 2A, B). The galleries cover the underside of the stems, including the entrances of the domatia.

They differ, however, in the building materials used by the ants. To construct the galleries, *Az. brevis* workers scratch off bark particles or epiphylls from the lower surface of their host plant's stems and branches (Fig. 1A). As construction material they then use pellets from pith tissue they

get from the excavation of the branches, leaflets of epiphylls, or bark fibers. Workers first build two parallel rows of lateral pillars about every millimetre along the prepared path (Fig. 1B). Then each pair of adjacent pillars is filled with a lateral wall and finally the rows are connected with an arch forming the galleries vault (Fig. 1C). Circular areas enforced with a bulky rim are left open (Fig. 1D, 2A, B). The construction progress is not constant over the year. It is reduced on days with only little or no rainfall during the dry season and *Azteca* workers while during the rainy season, however, up to 4 cm of galleries can be built within a day. Even newly produced galleries are strong, resisting heavy rains which fell during the observation period in the rainy season.

In *Al. decemarticulatus*, the workers begin by cutting the trichomes along the sections of plant stems interconnecting the leaf pouches, clearing a path (Fig. 1E). These cut trichomes are assembled together to form the vault of the gallery and are supported by adjacent, uncut trichomes that serve as pillars (Fig. 1F) (Dejean et al. 2005, Ruiz-González et al. 2011). The workers also scratch off the inner walls of the domatia to make pellets that are then pasted along the trichomes in the gallery (Fig. 1G) (Ruiz-González et al. 2011). The pores are not secondarily pierced, but they are formed during the construction of the galleries (Fig. 1H). They are left open and further shaped by the workers.

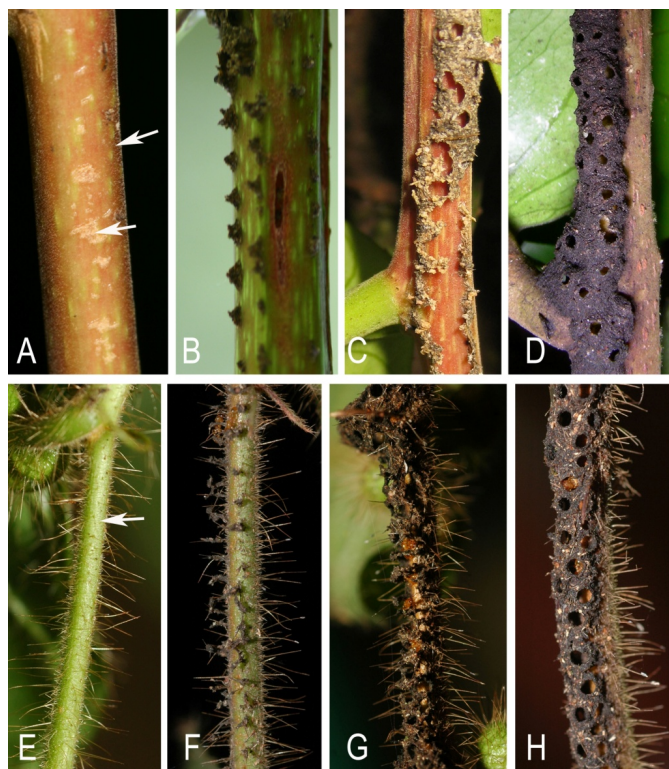


Figure 1. Construction of the carton galleries in *Azteca brevis* (A–D) and *Allomerus decemarticulatus* (E–H). Both ant species start with clearing a path (A, E). *Azteca brevis* uses chewed plant tissue to build rows of parallel pillars (B) and fill the space inbetween (C). Pores are left open during the construction process (D). *Allomerus decemarticulatus* is clearing a path by cutting the trichomes (E), which are then used to form the vaults of the gallery (F–G). Like in *Az. brevis* the pores are not secondarily pierced but left open (H). The construction process was observed in the field in Costa Rica (*Az. brevis*) and French Guiana (*Al. decemarticulatus*).

The reconstruction of the galleries by *Allomerus* ants always started from the base of a leaf petiole between the pair of domatia. The construction then progressed toward other leaves until two galleries under construction could be connected. The first part of the gallery that could be assigned as functional occurred generally two weeks after the galleries removal and was situated beneath the domatium sheltering the queen. The next stage of the reconstruction process was defined by the formation of galleries beneath domatia of leaves situated in the middle of healthy branches. The construction on the branches then started from these specific points. The speed of the reconstruction was quite variable between colonies and after 14 weeks the average percentage of reconstructed galleries (i.e. compared to the length of the previous construction) was $46 \pm 18\%$.

New galleries are built almost exclusively with plant material and only few fungal hyphae are present. The colonization of the galleries by the fungus is driven by the ants which paste pellets of hyphae on the plant material. SEM investigation of the galleries of both ant species show that fibre particles are woven into a dense net of fungal hyphae (see Fig. 1c in Mayer and Voglmayr 2009 for *Az. brevis* and supplementary information in Dejan et al. for *Al. decemarticulatus*) which have been identified as members of the Chaetothyriales (Mayer and Voglmayr 2009, Ruiz-González et al. 2011). At least one of these *Azteca*-associated species shows greenish iridescent hyphae.

- Function of the galleries

When the branches with carton galleries were disturbed, workers of the respective *Az. brevis* colony immediately adopted positions behind the holes with their mandibles wide open grasping immediately all approaching items (Fig. 2A, B). After the first 5 minutes of the experiment, 80.6% (± 5.6) of the *At. colombica* individuals were still free, 16.6% (± 6.4) were immediately captured, and 2.8% (± 5.6) escaped by simply dropping off the tree (Fig. 3). Five minutes later, 41.7% (± 10.6) of the *Atta* workers were captured, 47.2% (± 10.6) were still free. After 30 minutes, 69.4% (± 10.4) of the *Atta* workers were captured and immobilised (Fig. 2C), while 25.0% (± 5.6) escaped the capture immediately and dropped off the tree and 5.6% (± 6.4) were still

free (Fig. 3). If the carton galleries were removed, *Az. brevis* workers were only sporadically seen at this branch part and they never attacked the *Atta* workers.

From the 30 *At. cephalotes* workers that were placed on branches of *Al. decemarticulatus* occupied-trees, 90.1% (± 15.9) were already captured within the first five minutes (Fig. 2A–C). The remaining *Atta* workers first went to the closest leaf instead of moving towards the galleries and they all dropped off once they reached the end of the leaf (Fig. 3). *Al. decemarticulatus* captured significantly quicker than *Az. brevis* workers (after 5 min $P = 0.0023$, U test), and even after 30 min the cumulated capture rate was significantly lower in *Az. brevis* than in *Al. decemarticulatus* ($P = 0.033$, U test).

The behaviour which leads to captures in both *Az. brevis* and *Al. decemarticulatus* was similar. If *Atta* ants passing over the carton inserted one of their legs into one of the gallery's holes, the open mandibles of the individual beneath the hole immediately grasped that leg (Fig. 2). Other workers rapidly approached and grasped the other legs and the antennae of the prey. Once immobilized, the insect was stung. *Azteca* workers either discarded the dead insects or cut them into pieces and transported them into the domatia. Instead, *Allomerus* workers always transported the prey to the nearest domatium.

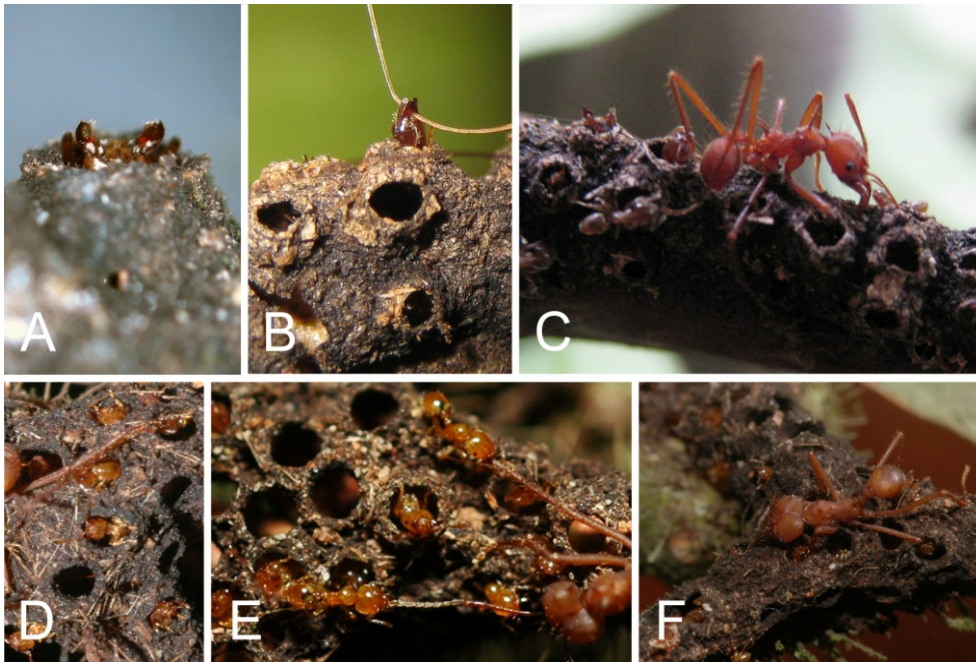


Figure 2. The function of *Azteca brevis* and *Allomerus decemarticulatus* galleries was experimentally tested. If the *Az. brevis* colony is disturbed, workers adopt position behind the pores with widely opened mandibles (A), and grasp any item they get (B). In case of the latter photo it is the first authors hair, but usually they grasp legs or antennae of other arthropods (C). The prey is immobilised and stung to death. *Allomerus decemarticulatus* workers guard the pores day and night (D), and appendices of the prey walking over the galleries are immediately caught and the prey immobilised (E, F).

However, *Al. decemarticulatus* were more efficient, they captured all insects that walked on galleries, whereas 25.0% (± 5.6) of the *Atta* workers could escape the capture of *Azteca*. Another important difference between the two ant species could be observed at the beginning of the predation sequence. Whereas *Azteca* workers did not seem to wait for prey and appeared below the holes only after branch disturbances or alarm, *Allomerus* workers were always alert and waiting with their mandibles open for passing insects.

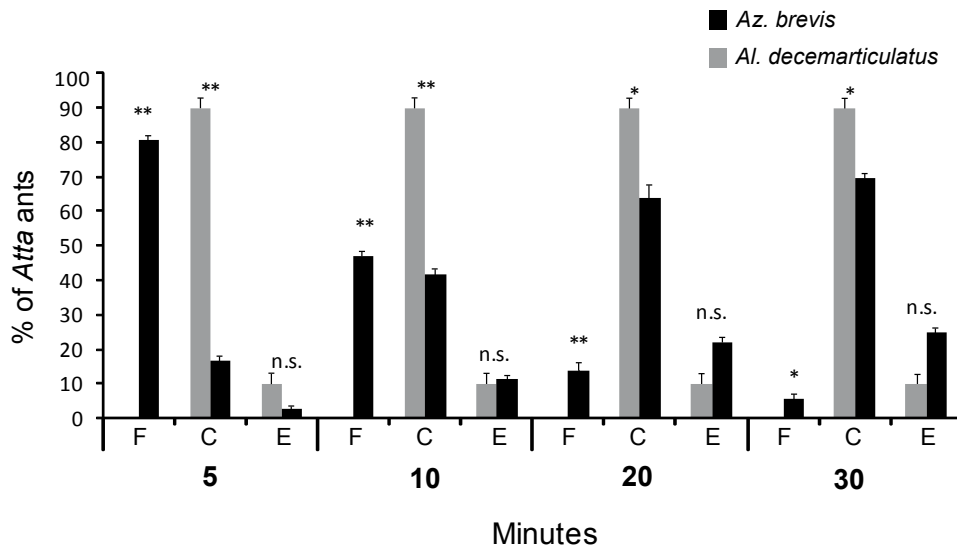


Figure 3. Experiment to test the function of the galleries as traps in *Azteca brevis* and *Allomerus decemarticulatus* colonies. *Atta* workers were put on inhabited branches of the respective host tree. The *Atta* ants were then monitored for 30 minutes and classified into three categories: free – F, getting captured – C and escaping – E. Significances between *Az. brevis* and *Al. decemarticulatus* were analysed with a non-parametric Mann-Whitney U-test. Further details are in the text. ** $P \leq 0.005$, * $P \leq 0.05$, n.s. not significant.

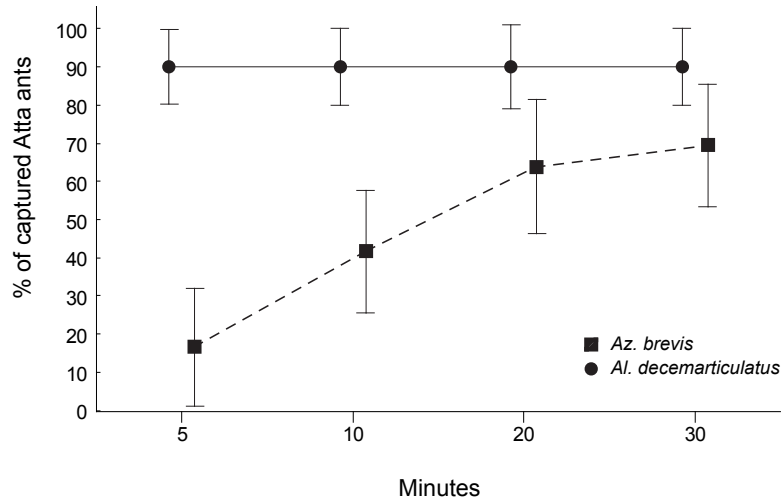


Figure 4. *Azteca brevis* and *Allomerus decemarticulatus* colonies show considerable differences in the promptness of capture ($P = 0.00001$, $F_{3,36} = 187,94$). The data were analysed with a GLM with repeated measures.

Discussion

The galleries built by the two ant species have a very similar appearance, are highly stable, and can be used by both ants to capture arthropods. These convergences are, however, punctuated by differences linked to the building material, the specialization in the relationship with the fungi living on the carton, and behavioural aspects of the involved ants.

- Structure and construction material

The most striking convergence is the structure of the galleries. They are made of carton perforated by numerous small circular holes resulting from a similar construction process in the two ant species. The workers first start clearing a path on the lower surface of their host plant's stem or branches and then edify the pillars that will sustain the future vault of the gallery. The

final products differ in minor traits like colour, inner and outer diameter, wall thickness and pore width, which may be correlated with the size of the workers.

The main difference between the two structures occurs in the material used. While *Al. decemarticulatus* uses plant trichomes as primary building material and tissue particles to paste the trichomes together and to favour the growth of the associated fungus (Dejean et al. 2005, Ruiz-González et al. 2011), *Az. brevis* uses exclusively plant tissues like excavated pith, bark parts or leaflets of epiphylls. The use of plant trichomes by *Al. decemarticulatus* can be attributed to its high specificity to its host plant, *H. physophora*, a densely hirsute plant (Grangier et al. 2009), while on the contrary, *Az. brevis* is more a generalist and can be found apart from *T. macrophyllum* also on *Licania* sp. (Chrysobalanaceae), *Grias* sp. (Lecythidaceae), *Myriocarpa* sp. (Urticaceae), and *Ocotea nicaraguensis* (Lauraceae) (Longino 2008), none of those hosts bearing trichomes like *Hirtella*. Such a difference in the construction material could partly explain the weaker stability of the *Az. brevis* galleries, which were often damaged by bigger insects, whereas those of *Al. decemarticulatus* remained always intact.

- Fungal association

Another striking convergence in the galleries of the two ant species is the development of fungal mycelia on the substrate used for construction, probably strengthening the whole structure. All the fungi found on the galleries of *Az. brevis* and *Al. decemarticulatus* belong to the order Chaetothyriales, a group of Ascomycetes which are frequently found in associations between ants and plants (Voglmayr et al. 2011), indicating that the substrate and the environmental conditions may be especially favorable for their development. In *Al. decemarticulatus*, only one fungal species, close to *Trimmatostroma cordae*, has been noted and isolated from the galleries, while in *Az. brevis*, the mycelium consists of at least six species of Chaetothyriales (Mayer and Voglmayr 2009, Ruiz-González et al. 2011). This difference could result from the cultivation process of the respective ants, which involves among others the selection of the fungal strains, their propagation and protection against competitors and parasites (Lauth et al. 2011; see Article 1). In both ant

species, the galleries deteriorate quickly when abandoned indicating that the fungi need the care of the associated ants for constant growth.

- Functional convergence

An important function of the extensive runway galleries may be to protect the workers of the colony themselves on their way between the domatia chambers. Further, the structural convergence of the galleries is accompanied by a convergence in their function, both being used as trap. Workers of *Az. brevis* and *Al. decemarticulatus* hide behind the holes to catch appendices like antennae or legs of insects on the gallery surface, immobilize them in a group action and sting them to death. Due to this ambush trap technique, both ant species are able to capture arthropods which are much bigger like the *Atta* workers in our experiment. Some behavioural divergences, however, may indicate a different level of specialization in hunting strategies between the two ant species. The first difference is that in *Az. brevis* colonies the openings were only occupied on alarm, while in *Al. decemarticulatus* they are permanently guarded. This may explain why in the experiment with *Atta* workers *Al. decemarticulatus* caught the *Atta* workers much quicker and more often than *Az. brevis*. The captured insects were not always consumed by *Az. brevis*, which is in contrast to *Al. decemarticulatus*. *Al. decemarticulatus* does not attend coccids whereas *Az. brevis* is herding coccids of the genus *Cryptostigma* which supply the ants not only with carbohydrate rich exudates, but may also been eaten for protein and lipids (Gullan 1997). This difference in the diet of the two ant species might explain the observed variation in prey capture. *Az. brevis* have been observed to be aggressive towards other ants like in the experiment, but also against spiders, treehoppers, bugs without always capturing them for food. This indicates, that the ambush traps are not only used for prey capture, but also for defence against intruders.

The striking evolutionary convergence observed in the construction behaviour, the fungal association and the similar behaviour during use of the traps in these two phylogenetically distant

ant species argue for the existence of strong selection pressures. Such selection most probably emerged from the defensive and/or predatory behaviour of the colonies.

Acknowledgements

We are grateful to J. Longino for identifying *Az. brevis*, to M. Schmidt for carrying out part of the experiments with *Atta* and *Az. brevis*, to Céline Leroy for her help in the field, to Andrea Yockey-Dejean for editing the manuscript and to the Laboratoire Environnement de Petit Saut and the Nouragues Research Station in French Guiana for furnishing logistical help. Financial support was provided by a fellowship from the Fondation pour la Recherche sur la Biodiversité (research agreement n°AAP-IN-2009-050). JL's financial support was provided by a PhD fellowship from the *Fond Social Européen* (FSE) and by a Nouragues research grant from the *Centre National de la Recherche Scientifique* (CNRS). This study has benefited from an "Investissement d'Avenir" grant managed by the Agence Nationale de la Recherche (CEBA, ref. ANR-10- LABX-0025).

Abstract – Article 7

In ant plant protective mutualisms, the plant provides foods and nesting cavities in exchange for ant protection through their patrolling activity on host plant leaves. While such activity can arise from the pre-adapted predatory and/or the territorially behavior of plants-ants, it can also be driven by specific chemical cues produced by the plant. Here, we demonstrate that ant attraction to emission of plant chemicals compounds can be the result of co-modifications of pre-adapted traits, although it has to be driven by strong selective pressures altering of the pre-adaptive activity of workers. *Allomerus decemarticulatus* and *A. octoarticulatus* protect their host plant *Hirtella physophora* from defoliating insects. We demonstrate that that the patrolling activity of the specialist *A. decemarticulatus* on young leaves is driven by the recognition of plant chemical compounds, while it is not the case in the generalist *A. octoarticulatus*. We further show that the constant higher patrolling activity of *A. octoarticulatus* on older leaves can be seen as the results of their pre-adaptive predatory behavior. We discuss the idea that recognition mechanisms between *H. physophora* and *A. decemarticulatus* is the result of reciprocal adaptation, emerging from the evolution toward an alternative predatory strategy used by the latter, allowing workers to offload patrolling activity on host plant leaves in the search for preys.

Keywords: Pre-adaptation; chemical attraction, ant plant mutualism, coadaptation, specificity

Article 7 Strong selective pressures and specificity as mechanisms for the modification of pre-adapted trait of plant-ants patrolling activity.

In preparation

Olivier Roux^{1,2}, Jérémie Lauth^{1,3}, Pierre-Jean G. Malé^{4,5}, Alain Dejean^{1,6}, Jérôme Orivel¹
and

¹ CNRS; UMR EcoFoG (Ecologie des Forêts de Guyane), Campus Agronomique, BP 316, F-97379 Kourou cedex, France

² IRD; UMR MIVEGEC (Maladies Infectieuses et Vecteurs Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle), BP 171, Bobo Dioulasso 01, Burkina Faso

³ Université des Antilles et de la Guyane; UMR EcoFoG (Ecologie des Forêts de Guyane), Campus Agronomique, BP 316, F-97379 Kourou cedex, France

⁴ Université de Toulouse; UMR EDB (Evolution et Diversité Biologique), 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse cedex 9, France

⁵ CNRS; UMR EDB, 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse, France

⁶ Université de Toulouse; UPS, UMR Ecolab, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse, France.

Introduction

Mutualisms are mutually beneficial interactions between species and are ubiquitous, often ecologically dominant and fundamentally important at all levels of biological organization (Boucher et al. 1982, Herre et al. 1999, Hoeksema and Bruna 2000). Several studies have shown that the traits involved in maintaining a mutualistic interaction are generally modifications of pre-existing traits, rather than evolutionary novelties (Ward 1991, Pellmyr et al. 1996, Anstett et al. 1997). However, the ecological and evolutionary factors that are responsible for such modifications have challenged biologists for decades.

In obligate mutualistic interactions between ants and plants, ant-plants, also named myrmecophytes, provide plant-ants with nesting cavities (domatia) and most of the time food in the form of extrafloral nectar and/or food bodies. In exchange, plant-ants protect their host-plant foliage against herbivores (Heil and McKey 2003, Rico-Gray and Oliveira 2007). Leaf protection by ants is one of the clearest examples of this array of evolutionary modifications. In most cases, ant species protect their host plant through the by-product of their predatory and/or territorially behavior (Dejean et al. 2009). Such traits have not been modified by the interaction with the plants, but took an additional function because of it. They could thus refer to ancestral traits in the framework of ant-plant protective mutualisms. Yet, in some specialized interactions, ants are specifically attracted to particular plant parts, either through a greater production of food reward by the plant, either through the production of attractive chemical compounds (Janzen 1966, Agrawal 1998, Edwards et al. 2006). Here, ants attraction is maximized on the most valuable and the most vulnerable plant leaf, following the optimal defense theory (Rhoades 1979). Whether this attraction to specific plant parts arises from pre-adapted traits, adaptations driven by the mutualistic interaction or coadaptation between ants and plants is still a subject of debate and may depend on the evolutionary context in which the interaction takes place.

Modification of pre-existing trait through coevolution has already been documented in ant plant protective mutualisms. The ‘lock-and-key’ mechanism in *Leonardoxa* species (Fabaceae) is a model example. The plant character is the prostoma, a small, unligified organ at the apex of the domatia in which myrmecophytic ants excavate an entrance hole. Brouat et al. (2001) provide evidence for a close correspondence between the dimensions and the shape of the myrmecophytic

ants and the prostoma of the *Leonardoxa* species they inhabit, suggesting a history of pairwise reciprocal adaptation. Heil et al. (2005) have also documented unique dietary adaptations in *Pseudomyrmex* ants that correspond to the unusual extrafloral nectar chemistry of their *Acacia* mutualists. Interestingly, in these two examples, the coevolution between partners has resulted from strong selective pressures, arising from the presence of parasitic ants in the system (Kautz et al. 2009)

Here, we aim to demonstrate that ant attraction to emission of plant chemicals compounds can be the result of co-adaptation, although it has to be driven by strong selective pressures. We focus on a mutualism between a plant-ant, *Hirtella physophora*, and two closely-related ant species, *Allomerus decemarticulatus* and *A. octoarticulatus*, that differ in their degree of specificity with the host plant and in their net fitness outcomes, which provides an interesting framework for such demonstration. While *A. decemarticulatus* has been recorded only in association with *H. physophora*, *A. octoarticulatus* ssp2 can inhabit a variety of myrmecophytes within its distribution range, although it is solely associated with *H. physophora* in French Guiana. These two ant species protect their host plant through their predatory behavior and young leaves are more intensively patrolled than mature ones. They also build galleries under their host plant stem that they use as a trap to ambush prey (Dejean et al. 2005). Such a predatory strategy generates a spatial segregation of workers, which affects in turn the biotic protection provided to the plant leaves (Lauth et al. in preparation). Moreover, because the investment of the specialist species, *A. decemarticulatus*, in ambushing is much more important than *A. octoarticulatus* ssp2, we hypothesized that it could act as a selective pressure in the host plant to maintain an adequate level of ant attraction on leaves allowing a sufficient plant protection.

Materials and methods

- *Study sites and model system*

We conducted this study between 2009 and 2012 in two areas of pristine forest around the field station at *Petit Saut*, Sinnamary, French Guiana (5°03'39"N-53°02'36"W) and in the *Montagne des singes*, Kourou (5°04'19.6"N-52°41'42.5"W). *Hirtella physophora* is an understory myrmecophytic shrub that bears leaf pouches situated at the base of the leaf blade, on both sides of the petiole. The leaf blades bear extra-floral nectaries on their abaxial surface (Leroy et al. 2008). In French Guiana, *H. physophora* is mainly associated with *A. decemarticulatus* and *A. octoarticulatus*. The workers of the both species build a gallery-shaped trap along the stems and the petioles to capture prey, and also patrol the plant's surface, providing a biotic protection to their host plant, (Dejean et al. 2005, Grangier et al. 2008).

- *Phylogenetic Analyses*

Ant workers were sampled from 16 *A. decemarticulatus* colonies inhabiting *H. physophora*, nine *A. octoarticulatus* ssp2 and 10 *A. octoarticulatus* ssp1. Other *Allomerus* samples were obtained through collaborations: two *A. octoarticulatus* var. *demerarae* from Peru, two *A. octoarticulatus* inhabiting *Tococa guianensis* from Brazil, nine *A. octoarticulatus* inhabiting *Hirtella myrmecophila* from Brazil and three *A. septemarticulatus* inhabiting *Duroia saccifera* from Brazil. Since *A. septemarticulatus* is morphologically closer to the *A. octoarticulatus* complex than *A. decemarticulatus* (Fernandez 2007), we included it in the phylogenetic analyses to accurately root this clade. In addition, individuals from four Solenopsidini species were used as outgroups *Monomorium subopacum* collected in Spain, *Diplorhoptrum* sp., *Solenopsis saevissima* and *Wasmannia auropunctata* collected in French Guiana.

The total DNA was extracted from one ant worker per colony. Each ant worker was incubated overnight at 55°C in 10 µL of Proteinase K solution (Qiagen, France) and 150 µL of 10% Chelex solution (BioRad, Marnes-la-Coquette, France). We used 2 µL of the solution obtained to amplify almost 1.6kb of the mitochondrial genes cytochrome oxidase subunit I gene (COI) and cytochrome *b* (*cyt b*) following the protocol described by Ruiz-González et al. (2011). PCR products were sequenced by Millegen (Labège, France). Sequences were edited using Geneious 6.0.5 and aligned using MAFFT (Katoh et al. 2002) as provided through Geneious v6.0.5.

Maximum likelihood (ML) analyses were conducted in RAxML hosted by the CIPRES Science Gateway Portal with 450 bootstrap replicates under the GTR + I + G substitution model (Stamatakis 2006, Miller et al. 2010). Bayesian analyses were run in MrBayes v3.2.1 (Ronquist and Huelsenbeck 2003) under the GTR + I + G substitution model for one million generations, sampling a tree every 200 generations. Two runs with four chains were executed simultaneously. Consensus trees were generated with the "sumt" command in MrBayes after discarding the first 25% as burn-in. The percent nucleotide difference between and within *A. decemarticulatus*, *A. octoarticulatus* and *A. octoarticulatus* var. *demerarae* clades were calculated using MEGA v5.05 (Tamura et al. 2011) .

- *Ant patrolling behavior*

In January 2010, the activity rhythms of the two ant species were assessed on five *H. physophora* per species, both on leaves and in the ant-constructed galleries. Because it rained several time each day, greatly reducing or stopping ant activity on the leaves, this survey lasted for three weeks in order to get at least one measure per hour over a 24 hours period. Each hour, we counted workers on the adaxial and abaxial sides of two stage 1, two stage 3 expanded leaves and two stage 4 leaves per plant. We compared activity rhythms of ants on leaves, depending on ant species, leaf age and leaf side using a generalized linear mixed model (GLMM). The individuals and the time were considered as random effects.

- *Chemical analyses and bioassays*

Ants and leaves collection – Both ants and leaves were collected immediately before the experiments. Ants were collected with a mouth aspirator on leaves of their host tree avoiding collection of nursing ants near or in the domatia. Indeed, it has been shown that these ants may behave differently than patrolling workers when confronted to leaf extracts (Arauco et al. 2006, Edwards et al. 2007). Both *A. decemarticulatus* and *A. octoarticulatus* were collected on *H. physophora* and *A. octoarticulatus* var. *demerarae* were collected on *C. nodosa*. In the laboratory, ants were provided with water and honey and kept in small tubes (h=70mm; Ø=30mm) until their use in the afternoon.

Leaves of *H. physophora* were collected on different trees than the ants. Four types of leaves were collected according to stages described in Grangier et al. (2008). Juvenile leaves (young leaves thereafter) were entirely collected whereas well-developed leaves (stage 2-4) were cut off just before the domatia to avoid collecting ants with the leaf. Leaves were individually placed in a plastic bag for transport to the laboratory. Once in the laboratory, patrolling ants were carefully removed from leaves before extraction.

Leaf tissue extracts - Extraction of the leaf compounds were performed less than 1 hour after collection in the field by soaking the leaves in hexane for 30min. Such extraction allows obtaining surface and primary volatile compounds (Bergström et al. 1980, Brouat et al. 2000). Because we were interested in isolating the compounds potentially involved in constitutive and induced patrolling behavior of ants, extracts were performed either on intact or damaged leaves. Intact young leaves were soaked in 4mL of hexane with only the petiole remaining out of the solvent. Older leaves (stage 2-4) were also soaked in 4ml of hexane, but with only the same leaf area as young leaves immersed in the solvent. For each extract, three leaves collected on different trees were consecutively soaked in the same bath of hexane. After each leaf extract, the hexane volume was completed to 4mL to account for partial evaporation or adsorption on the previous leaf due to the surface tension with trichomes. To simulate herbivory, leaves were damaged by making a linear wound of 6cm in length with scissors and then soaked in hexane as described above. Extracts of damaged leaf were performed only on young and old leaves (stage 1 and 4). Extracts were kept at -20°C until their use.

Fractionation of young leaf tissue extracts – Different fractionations were performed in order to isolate the active compounds involved in the induction of the patrolling behavior. First, volatile compounds were eliminated by evaporating the whole solvent under nitrogen. The dried extracts were re-dissolved in 4mL of hexane for bioassays. Second, crude extracts were fractionated on a silica gel column (2 cm, 70-230 mesh, 60Å). The elution was performed successively with 4 mL of hexane, 1 mL of dichloromethane and 4 mL of methanol. The fractions were dried under nitrogen and re-dissolved in 4mL of hexane for bioassays.

Identification of compounds extracted from leaves - Chemical analysis of leaf tissue extracts and fractions and the identification of compounds were performed by Gas Chromatography-Mass

Spectrometry (GC-MS) with a Varian 450-GC coupled to a MS240 ion-trap mass spectrometer. The entire system was operated by using the Varian MS workstation data system, version 6.9.2. MS spectra were recorded over a mass range of 50-650 mass units with two scans per second. An aliquot of 1 μ L was injected in splitless mode with an injector temperature of 250°C, a detector temperature of 300°C and manifold temperature of 300°C. An apolar Varian factorFourVF-5MS capillary column (30m, 0.25mm i.d., 0.25 μ m film thickness, 5% diphenyl and 95% dimethylpolysiloxane) was used. Elution was carried out with helium at 1 mL/min. The oven temperature was programmed as followed: 60°C for 2 min, 60 to 280°C at 15°C/min, 280 to 320°C at 10°C/min and left at 320°C for 10min. Identifications were processed with spectral databases and with a series of standard linear alkanes. Standards of compounds of interest were injected for control.

Behavioral assays – The biological activity of the different *H. physophora* leaf extracts and their fractions were tested on the three plant-ant species. Behavioural tests were performed in a neutral arena (Petri dish; 90mm in diameter) whose walls were coated with Fluon® to prevent the ants from climbing out. Thirty ants from the same colony were placed in the arena 10 min before the bioassay for acclimation. Then, two pieces of filter papers (square of 2cm in side) on which 300 μ L of extract (treatment) or 300 μ L of hexane (control) were previously deposited. Each minute for 20 min we counted the number of ants in contact with each filter paper as described in Edwards et al. (2007). Ants and filter papers were used only once and arenas were cleaned with ethanol after each experiment.

As bioassays on the different fractions identified tocopherol as putative attractive compounds (see Results section), similar bioassays were performed with synthetic α -tocopherol and β -tocopherol. Different combinations were tested: " α - and β -tocopherol", " α - and β -tocopherol+OLE" (OLE = old leaf extract), " α -tocopherol+OLE", and " β -tocopherol+OLE". The α - and β -tocopherol were mixed in similar proportions to the ones inferred from the GC profiles of young leaves.

- *Statistics*

The effect of each treatment on the number of ants attracted were analysed using a repeated-measures ANOVA comparing treatments and their respective control using SPSS 16 software. Time (n=20) was considered as the factor of repetition. The number of ants was $\sqrt{(x+0.5)}$ transformed. To account for violations of the sphericity assumption of variances, the Greenhouse–Geisser correction was applied to the degrees of freedom. For clarity of presentation, all of the graphs were generated using non-transformed data.

Results

- *Phylogenetic Analyses*

We successfully sequenced COI for all but three samples and *cyt b* for almost three quarters of the samples. The tree obtained with the ML analysis had exactly the same topology as the one obtained with the Bayesian analysis. Both analyses highlighted four well-supported *Allomerus* clades, corresponding to the four species: *A. decemarticulatus*, *A. septemarticulatus*, *A. octoarticulatus* ssp2 and *A. octoarticulatus* ssp1 (Fig. 1). All *A. octoarticulatus* var. *demerarae* were grouped in the same clade, whatever their geographical and host-plant origin. All but one *A. octoarticulatus* were grouped in the same clade whatever their host plant and their geographical origin. These two clades were well differentiated since the percent nucleotide difference was higher between clades than within clades (Table 1)

Table 1. Percent nucleotide difference within (along the diagonal) and between (below the diagonal) *A. decemarticulatus*, *A. octoarticulatus* and *A. octoarticulatus* var. *demerarae* clades calculated with MEGA v5.05 (Tamura *et al.*, 2007).

	Ant species		
	<i>A. decemarticulatus</i>	<i>A. octoarticulatus</i> ssp2	<i>A. octoarticulatus</i> ssp1
<i>A. decemarticulatus</i>	4.2 ± 0.5%		
<i>A. octoarticulatus</i> ssp2	31.9 ± 4.6%	2.9 ± 0.4%	
<i>A. octoarticulatus</i> ssp1	29.2 ± 4.1%	8.8 ± 1.2%	2.8 ± 0.5%

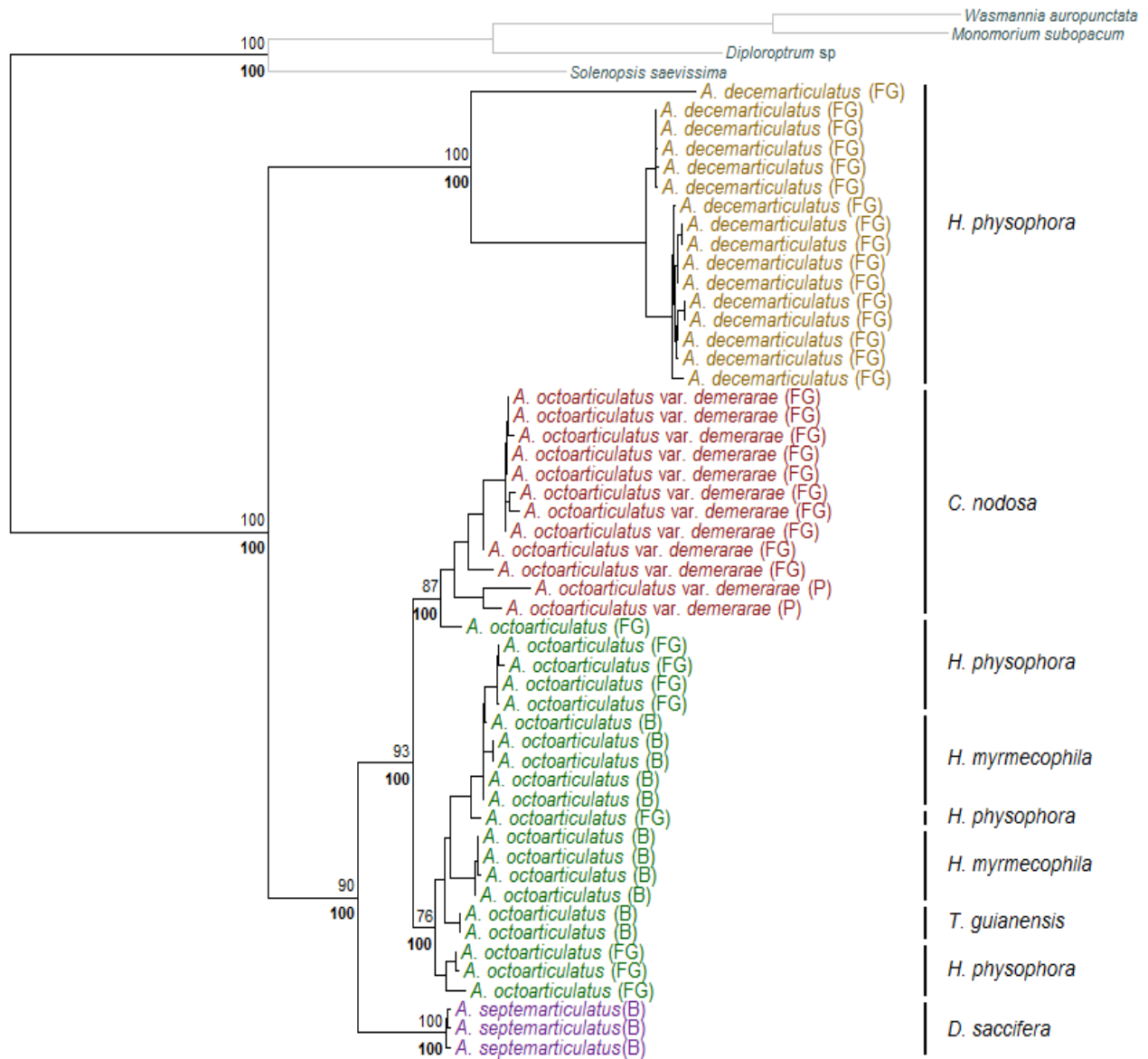


Figure 1. Phylogenetic tree of *Allomerus* obtained with COI and Cyt. b inferred from a Maximum Likelihood phylogeny reconstruction method (RAxML) and a Bayesian method (MrBayes). Support values are indicated for the major clades (likelihood values are indicated above, posterior probabilities are indicated below nodes). Colour of tip labels account for the ant species, sampling locations are indicated in brackets (FG: French Guiana; P: Peru; B: Brazil). Host plant species are indicated in black, on the right of the tip labels. *A. octoarticulatus* corresponds to *A. octoarticulatus* ssp2 and *A. octoarticulatus* var. *demerarae* corresponds to *A. octoarticulatus* ssp1

- *Ant patrolling behavior*

The overall activity of *A. octoarticulatus* workers on leaves was higher than that of *A. decemarticulatus* (Table 2.a). Whatever the ant species, patrolling workers were less numerous when leaves get older (Table 2.b).

Table 2 (a) Effect of ant species and leaf development stage on the number of workers patrolling leaves, and **(b)** comparison matrix of the effect of leaf development stage according to the different stages. The lower half of the matrix shows estimates of the regression slopes and their standard error (SE) and the upper half of the matrix shows t-values and significance.

a) Significance of the variables

	DF	χ^2	<i>p</i> -value	
Ant species	1	15.23	0.00009	***
Leaf development stage	2	301.96	<0.0001	***
Ant species * Leaf development stage	2	1.87	0.39	ns

b) Coefficients estimated by the model

Estimate (SE) \ z-value	Stage 1	Stage 3	Stage 4
Stage 1		-8.032 ***	-7.545 ***
Stage 3	-2.628 (0.327)		-2.878 **
Stage 4	-4.238 (0.562)	-1.609 (0.559)	

- *Chemical analyses and recognition assays*

Biological activity of leaf tissue extracts on the three plant-ants species - Only *A. decemarticulatus* workers were attracted to leaf extracts of *H. physophora* (Fig. 2), while the two other ant species did not show any reaction. Moreover, only young leaf extracts (stage 1) were attractive to (Fig. 2). The extracts of damaged leaf did not trigger more attraction than intact leaves and only *A. decemarticulatus* workers were attracted by the extracts of damaged young leaves (Fig. 3). There was also a significant time effect related to worker recruitment in the four first minutes in *A. decemarticulatus*.

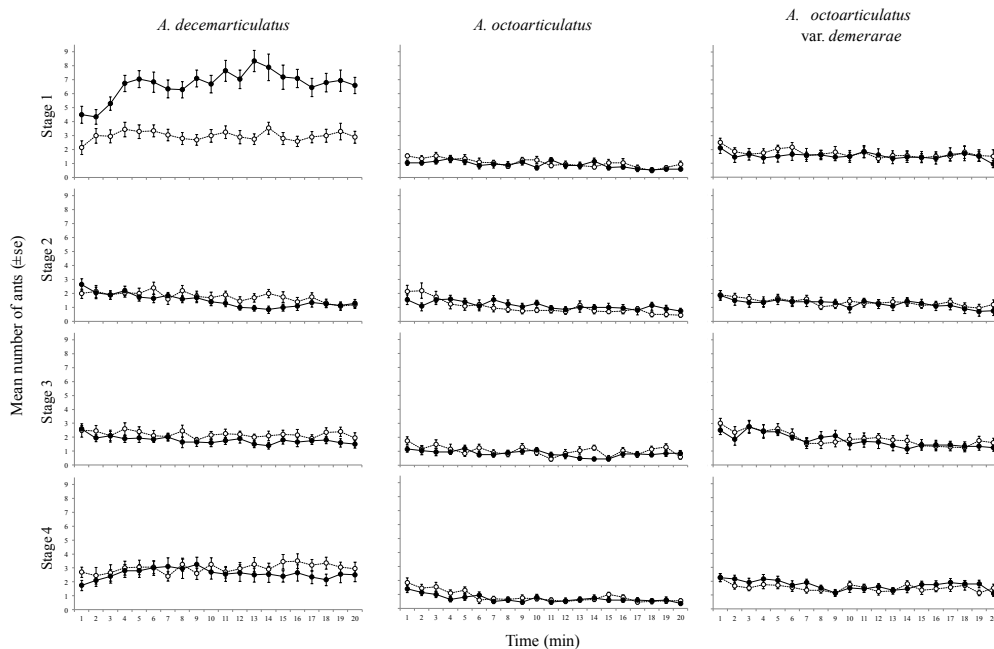


Fig. 2. Mean (\pm se) number of worker ants attracted to filter papers containing leaf tissue extracts from stage 1 to 4 of *H. physophora* leaves on a 20 min time period for the three species of *Allomerus*. Filled circles: leaf tissue extracts and open circle: pure hexane.

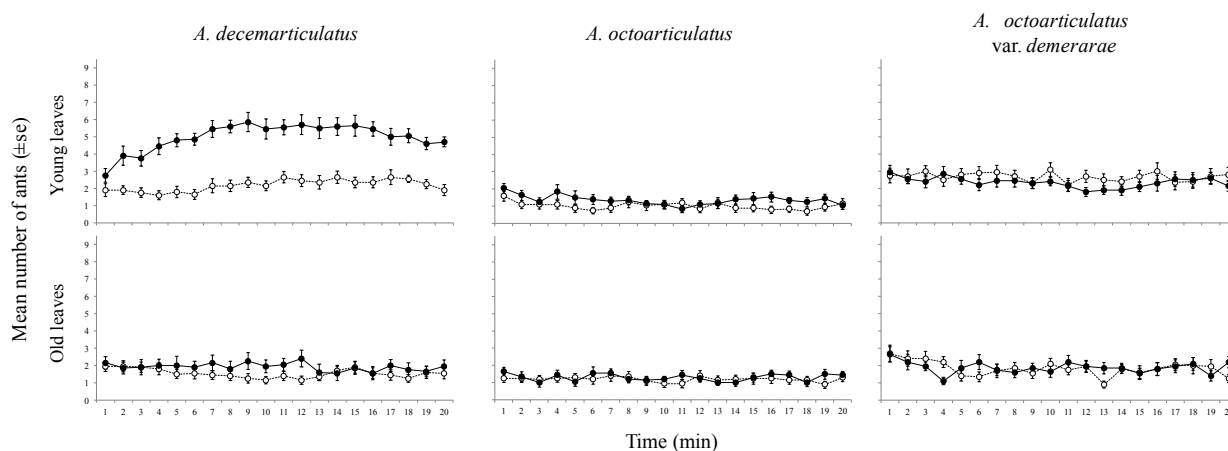


Fig. 3. Mean (\pm se) number of worker ants attracted to filter papers containing damaged leaf tissue extracts from young leaves (stage 1) and old leaves (stage 4) of *H. physophora* on a 20 min time period for the three species of *Allomerus*. Filled circles: leaf tissue extracts and open circle: pure hexane.

Compounds identifications and biological activity of fractions – The compounds identified in the leaf extracts were mainly linear hydrocarbons (69.9% and 98.7% in young and old leaves, respectively) (Table 3). Young leaves presented a more diversified profile than old leaves with some triterpene (α -amyrin, β -amyrin and α -amyrone), tocopherols (α - and β -tocopherol), and an unidentified alcohol. Among the volatile compounds, only methyl salicylate was found in both young and old leaves.

Table 3. Repeated-measures ANOVAs examining the effect of fractions of young leaf extracts of *H. physophora* on attraction of *A. decemarticulatus*. Probabilities corrected for sphericity are provided using the Greenhouse–Geisser correction (G-G). In bold: significant results.

	<i>df</i>	F	<i>p</i> -value	G-G
Evaporated vs. hexane				
Treatment	1	63.85	<0.001	
Error	38			
Time	19	0.55	0.941	0.869
Time x Treatment	19	0.77	0.744	0.669
Error	722			
Hexane fraction vs. hexane				
Treatment	1	0.22	0.623	
Error	38			
Time	19	1.56	0.061	0.113
Time x Treatment	19	0.95	0.513	0.485
Error	722			
Dichloromethane fraction vs. hexane				
Treatment	1	154.32	<0.001	
Error	38			
Time	19	0.79	0.725	0.659
Time x Treatment	19	0.70	0.819	0.744
Error	722			
Methanol fraction vs. hexane				
Treatment	1	0.96	0.334	
Error	38			
Time	19	1.33	0.153	0.209
Time x Treatment	19	0.58	0.923	0.834
Error	722			

As only young leaf extracts induced an attraction of *A. decemarticulatus* workers, fractionations were performed only on this developmental stage. Complete evaporation did not trigger any recruitment suggesting that the attractive effect was related to non-volatile compounds (Table 4). After fractionation, only the dichloromethane fraction triggered an attraction of *A. decemarticulatus* workers. The GC-MS analysis of compounds in the different fractions highlighted that α -tocopherol was the only compound present in all active fractions (evaporated,

dichloromethane, and young leaves) and absent of all inactive fractions (old leaves, hexane and methanol fractions) (Table 4). β -tocopherol was also present in all the fractions but in higher proportion in the active dichloromethane fraction than in the others. As its structure is close to α -tocopherol, behavioral tests were performed with both compounds.

Biological activity of tocopherol - The " α - and β -tocopherol" mix did not induce any attraction of *A. decemarticulatus* workers. However, when they were added to an old leaf extract, the attractiveness to workers was highly significant (Fig. 4). The " α -tocopherol+OLE" mix induced a significant attractiveness, while the " β -tocopherol+OLE" mix was not significantly different from the hexane control; however, the related hexane control shown a positive time effect that can affect the statistic outcome (Fig. 4). Furthermore, " β -tocopherol+OLE" mix was not significantly different from both " α - and β -tocopherol+OLE" and " α -tocopherol+OLE" mixes (Tukey HSD: $p=0.81$ and 0.12 respectively)

Table 4. Compounds found in *H. physophora* leaf extracts and fractions of young leaves. Proportions are indicated in relation to the total composition of each extract and fraction. tr: traces (<0.1%), Unk: unknown, - : absent. Fractions that trigger an attraction of *A. decemarticulatus* are in bold.

Peak	Retention index	Identification	Leaves		Fractions (young leaves)			
			Young	Old	Evaporated	Hexane	Dichloromethane	Methanol
1	1207	Methyl salicylate	0.2	0.2	tr	tr	-	-
2	2300	n-Tricosane (<i>n</i> -	0.2	tr	0.1	0.3	0.1	0.3
3	2500	n-Pentacosane (<i>n</i> -	4.1	0.1	2.4	0.6	0.1	0.2
4	2600	n-Hexacosane (<i>n</i> -	0.5	tr	0.4	0.8	tr	-
5	2641	Unk.	0.3	tr	0.2	0.2	0.5	-
6	2700	n-Heptacosane	4.1	0.1	3.4	6.3	-	-
7	2704	Unk. polar	1.5	-	1.1	-	5.9	8.4
8	2800	n-Octacosane (<i>n</i> -	1.4	-	0.9	1.2	-	-
9	2805	Unk. polar	0.7	-	0.5	-	2.2	2.7
10	2845	Unk.	0.6	0.1	0.2	0.1	1.7	-
11	2900	n-Nonacosane (<i>n</i> -	19.1	10.0	20.1	19.5	-	-
12	2910	Heptacosan-2-ol	18.2	-	14.4	-	57.1	65.1
13	3000	n-Triacontane (<i>n</i> -	2.8	1.5	4.1	5.0	-	-
14	3077	β -tocopherol	4.7	0.2	2.0	0.2	19.5	1.6
15	3100	n-Entriacontane	30.2	56.5	37.7	52.4	-	-
16	3155	α -tocopherol	0.8	-	0.7	-	4.3	tr
17	3200	n-	1.5	4.1	1.9	2.7	tr	-
18	3300	n-	5.7	26.4	7.7	10.7	-	-
19	3438	β -amyryn	1.4	-	1.1	-	3.3	11
20	3455	α -amyryne	0.4	0.7	-	-	2.1	
21	3484	α -amyryn	0.8	-	0.7	-	1.7	5.6
22	3572	Unk. polar	0.7	-	0.3	-	1.4	5.1

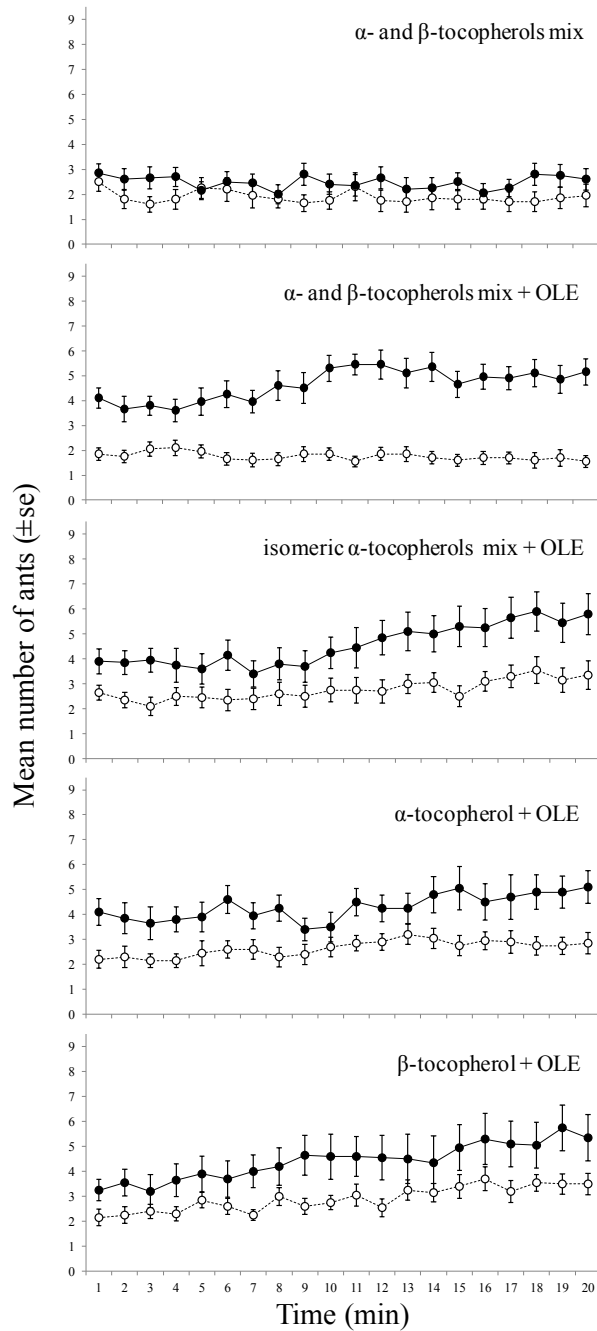


Fig. 4. Mean (\pm se) number of *Allomerus decemarticulatus* workers attracted to filter papers containing different mix of compounds made of α -tocopherol, β -tocopherol and old leaf extract (OLE) of *H. physophora* on a 20 min time period. Filled circles: mix and open circle: pure hexane.

Discussion

Both *Allomerus* species inhabiting *H. physophora* patrol preferentially on the young leaves of their host plant, following the optimal defense theory. Such patrols are triggered in *A. decemarticulatus* by a chemical attraction, while *A. octoarticulatus* did not show any behavioral reactions to the leaf extracts. These two different mechanisms, associated with the specialist *versus* generalist trait of the species towards their host plant and their predation strategies, shed light on potential reciprocal adaptation and coevolution between the plant and the ants.

The presence of attractive compounds on young leaves is the proximal factor that explains the protection behavior of *A. decemarticulatus* towards its host plant. α -tocopherol was the only compound exclusively found in young leaves and in all active fractions of leaf tissue extracts. This compound alone did not show, however, any attractiveness and needed to be associated with one or several unidentified chemicals of old leaf extract. In insects, the α -tocopherol, also known as vitamin E, have been shown to be essential to reproduction abilities (Meikle and McFarlane 1965, House 1966), to increase weight intake and survival in the house cricket (McFarlane 1972), biased the sex ratio in favor of females in the parasitoid *Pimpla turionellae* (Coşkun et al. 2005), and an antioxidant activity was also reported (Felton and Summers 1995). Whether or not this compound has such effect in ants is currently unknown. Nevertheless, the absence of response from *A. octoarticulatus* suggests that host plant protection is not driven by the same cues and that it might be related to other traits in the ants.

Both *Allomerus* are omnivorous predators and they developed an alternative predation strategy than only patrolling on leaves by building galleries on their host plant stems they as a trap to ambush prey (Dejean et al. 2005). Yet, there are some important differences between the species in the investment in the construction of the galleries and in the worker force involved in ambushing prey. Indeed, while *A. decemarticulatus* uses mostly the galleries, *Allomerus octoarticulatus*, on the contrary, forages more intensively on leaves. It has been demonstrated that the higher fitness experienced by *A. decemarticulatus* compared to *A. octoarticulatus* is, at least to some proportions, the result of the development of this efficient

predatory behavior (Lauth et al. in preparation). Because of the trade-off between patrolling and ambushing, *A. decemarticulatus* strategy creates a conflict of interest for the host protection. The chemical attractiveness of young leaves can thus be considered selectively as advantageous as it allows maximizing host plant protection on the most vulnerable organs (Grangier et al. 2008). As a consequence, the attraction of *A. octoarticulatus* workers towards young leaves is a preadaptation (i.e., the by-product of its predatory behavior), while it is an adaptation to the host plant in *A. decemarticulatus*.

Because the chemical attraction to young leaves is absent in the two *A. octoarticulatus* species, it can be considered as an adaptation in the context of the mutualism in *A. decemarticulatus*. Such adaptation reflects the complementarity of traits between *A. decemarticulatus* and *H. physophora*. It cannot be inferred, however, from our results that the production of tocopherol by *H. physophora* is an adaptation or a preadaptation. Such demonstration would require the investigation of tocopherol in other *Hirtella* species and their subsequent attractiveness of *A. decemarticulatus* workers.

Discussion du chapitre

L'investissement important dans la construction et l'utilisation des galeries comme piège par *A. decemarticulatus* en comparaison à l'investissement de *A. octoarticulatus* ssp2 réduit la protection de sa plante hôte et consécutivement ses performances. Il s'instaure bien un conflit entre l'interaction fourmis – champignon et l'interaction fourmis - plante. Savoir si ce conflit s'apparente à la présence du troisième partenaire fongique nécessite cependant d'évaluer l'importance du champignon dans l'efficacité du piège, pour comprendre si ce dernier peut être utilisé comme un proxy de la présence du champignon. Ce conflit est toutefois régulé par certains mécanismes évolutifs entraînant une patrouille et une protection suffisante par *A. decemarticulatus*, ce qui semble permettre une résultante écologique globalement positive pour *H. physophora*. D'un côté, cette régulation provient de mécanismes pré-adaptatifs de la plante, s'identifiant à la fidélité du partenaire sous la théorie des contrats. De l'autre il semble que ce mécanisme soit renforcé par une adaptation dans le contexte du mutualisme par les deux protagonistes. Cela reste néanmoins de l'ordre de l'hypothèse et doit encore être expérimentalement vérifiée.

Les galeries comme proxy de la présence du champignon

Alors qu'il s'instaure bien un conflit entre la protection de la plante et l'utilisation des galeries comme stratégie alternative de prédation chez *A. decemarticulatus*, cela n'implique pas inéluctablement que ce conflit émerge de la présence du troisième partenaire fongique. Sachant que ce conflit est lié à ce système de prédation alternatif, il paraît important de le découpler en plusieurs entités distinctes et de comprendre l'apport du champignon dans l'efficacité du piège dans son ensemble. Une première dichotomie peut être instaurée entre les propriétés mécaniques du piège et le comportement des fourmis. Comme nous l'avons vu, le nombre d'ouvrières qui se poste à l'affût au niveau des trous des galeries est plus important chez *A. decemarticulatus* que

chez *A. octoarticulatus* ssp2. La capacité de saisir un des membres d'une proie potentielle est indéniablement augmentée par ce comportement qui se retrouve être un élément primordial dans la capacité de prédation de l'espèce de fourmis. La plus grande proportion de piège construite sur les tiges de la plante hôte est un autre élément important dans la multiplication des proies rencontrées et donc potentiellement saisies. Ainsi même si le champignon joue un rôle important dans les propriétés mécaniques du piège, c'est bien le comportement particulier des ouvrières qui finalise la capture de proies. Notons tout de même que sans un piège résistant, ce comportement aurait une efficacité limitée. Les galeries construites par les fourmis du genre *Allomerus* se composent de plusieurs matériaux. Les trichomes de la plante hôte, ainsi que le mycélium du champignon sont les deux matériaux principalement utilisés par *A. decemarticulatus* (Dejean et al. 2005). Le premier joue le rôle d'ultrastructure et le deuxième le rôle de ciment. La particularité d'*A. decemarticulatus* par rapport aux deux autres espèces étudiées est d'utiliser extensivement des trichomes non coupés longeant le chemin fait par les fourmis et servant de pilier à l'ensemble de la construction. La voûte des galeries, construite à partir de trichomes coupés vient se poser sur ces piliers et la croissance du mycélium va assembler tous ces trichomes ensemble. Ainsi, sans trichomes, pas de galeries mais sans champignon pas de galeries non plus. L'efficacité du piège, à l'origine du conflit, est donc composé de trois éléments indissociables : le comportement particulier des fourmis, les trichomes de la plante et le mycélium du champignon. Faisons maintenant l'hypothèse que ce champignon soit alors remplacé par un autre matériau jouant le rôle de ciment comme par exemple des cellules de la plante hôte préalablement grattées par les fourmis. Le piège aurait t-il les mêmes fonctions mécaniques ? Des études préliminaires ont été menées visant à comprendre l'importance du champignon dans les propriétés élastiques ainsi que dans la résistance du piège. La difficulté dans la mise en place de ces études fait que nous n'avons toujours pas de réponse précise quand à l'importance du champignon. Néanmoins, les observations de la croissance du champignon montre que le mycélium comporte très peu de ramifications et qu'il est capable de pousser sur plus de 5cm sans se ramifier. Lorsque plusieurs mycéliums se rencontrent, ils s'entremêlent pour former une tresse. Ainsi les propriétés de résistance de ce mycélium s'apparentent à celle d'un câble formé par de nombreuses fibres fines entremêlées. La résistance du câble ne tient pas à son diamètre mais bien au tressage de fibres beaucoup plus fines. Il semble bien que toutes ces

propriétés participent à l'élasticité et à la résistance des galeries au niveau des zones de tension créées par les membres d'un insecte qui se pose sur les galeries et les ouvrières qui prennent appuis sur les galeries pour tirer les membres de la proie à l'intérieur des galeries.

L'importance du champignon dans cette stratégie de prédation peut également être vue dans un contexte évolutif. Nous pouvons en effet émettre l'hypothèse que les propriétés physiques du champignon étaient un prérequis à la sélection d'un tel comportement chez *A. decemarticulatus*. En effet, on peut penser que les avantages sélectifs issus d'un tel comportement ont pu être effectifs à partir du moment où la résistance du piège, induite par la présence du champignon, permettait une capture efficace des proies.

Ainsi, pour résumer, même si plusieurs éléments participent de manière synergique à l'efficacité du piège, il semble bien que le champignon soit un élément essentiel de cette stratégie, et donc peut être légitimement considéré comme un élément important dans la mise en place de ce conflit d'intérêt dans la protection et les bénéfices perçus par la plante hôte.

Conflit dans un mutualisme tripartite

Nous avons identifié en introduction plusieurs conflits qui peuvent émerger lorsque plusieurs espèces s'associent de manière coopérative. Dans notre système, ce conflit émerge autour d'un compromis dans l'allocation d'un même service (la force ouvrière) par une espèce focale (les fourmis) vers deux partenaires différents (plante et champignon). L'investissement de la force ouvrière vers l'une ou l'autre espèce dépendra alors du gain de fitness que retire l'espèce de fourmis dans son investissement. L'utilisation de la théorie des contrats dans l'article 5 montre que l'investissement de la force ouvrière dans l'utilisation du piège permet un gain de fitness important chez *A. decemarticulatus* par rapport à *A. octoarticulatus* ssp2, ce qui explique un investissement important dans cette stratégie et donc vers le champignon. En effet, en plus de la force ouvrière nécessaire pour la construction et l'utilisation du piège, une certaine proportion de cette force sera utilisée pour la protection et la fourniture constante d'un substrat bénéfique pour la croissance du champignon. Notre système diffère cependant de celui étudié par Mack and

Rudgers (2008) dans le sens où le champignon et la plante fournissent à l'espèce de fourmis des services totalement différents. Alors que la plante *Schedonorus phoenix* peut sélectivement réduire son association mycorhizienne car elle reçoit le même type de bénéfice à un moindre coût par son associé endophyte, un abandon de la plante au profit du champignon serait immédiatement contre sélectionné chez *A. decemarticulatus* par sa dépendance pour les espaces de nidification fournis par la plante hôte. Cette dernière est primordiale pour la survie et la reproduction de la fourmi, ce qui entraîne une régulation du conflit permettant à *H. physophora* une résultante écologique positive de son association avec *A. decemarticulatus*.

Une régulation des conflits par un trait pré-adaptatif, renforcé par une coévolution entre partenaires ?

L'utilisation de la théorie des contrats dans notre système d'étude démontre en effet que ce conflit est régulé au moins par le feedback de la fidélité au partenaire de la part *H. physophora* envers *A. decemarticulatus*. Sa moindre croissance constatée lorsqu'associée à cette dernière entraîne une baisse de la production de domaties. Sachant que la croissance de la colonie de fourmis est intimement liée à celle de la plante, cette baisse de croissance, mécanisme pré-adaptatif, entraîne la sélection d'une protection minimale de la plante par les patrouilles sur les feuilles chez *A. decemarticulatus*. Nos études montrent cependant que les mécanismes par lesquels les fourmis patrouillent et protègent la plante pourraient émerger de processus adaptatifs dans le contexte du mutualisme, des fourmis, ou des deux partenaires. Ces deux mécanismes semblent contradictoires, en effet, à partir du moment où la fitness d'*A. decemarticulatus* est dépendante de celle de sa plante hôte, n'importe quel comportement des fourmis qui ne permet pas une protection minimale de la plante devrait être automatiquement contre sélectionné. Il n'y a donc pas de raison biologique et évolutive pour la plante de produire un composé attractif, sans doute coûteux, si par la seule action de la fidélité au partenaire, elle force les fourmis à une patrouille minimale sur les feuilles de la plante. Du point de vue de l'espèce de fourmis, la sélection de l'attraction à un composé permettant de reconnaître les jeunes feuilles de son hôte est facilement compréhensible. D'un côté, le tocophérol peut être considéré comme une récompense

pour les fourmis et la collection de ce composé peut être positivement sélectionnée. D'un autre, même si les fourmis ne reçoivent pas de bénéfices par ces patrouilles, cette attraction permet une protection de la plante optimale. C'est à dire qu'avec une allocation minimum d'une partie de la force ouvrière, l'espèce de fourmis permet une protection suffisante de son hôte et induit ainsi la production de domaties. Est ce que la plante tire un avantage sélectif favorisant une attraction des la force ouvrière vers ses jeunes feuilles? Cela pourrait être le cas si elle tire un avantage indirect dans l'efficacité de prédation de son associée. Elle serait alors soumise au même compromis que les fourmis entre les bénéfices provenant de la chasse efficace de proies et sa propre protection, ce qui pourrait justifier un phénomène adaptatif permettant une protection optimale nécessitant une force ouvrière minimum.

La myrmécotrophie, c'est à dire la nutrition de la plante par les fourmis, est un autre trait mutualiste important dans les résultantes écologiques des mutualismes obligatoires entre plantes et fourmis. Ces transferts devraient être indirectement liés à la capacité des fourmis à obtenir de la nourriture. Ainsi si la plante bénéficie par myrmécotrophie du succès de prédation d'*A. decemarticulatus*, alors une adaptation vers l'attraction des fourmis peut être positivement sélectionnée. Nous explorerons ce volet dans le chapitre suivant.

Chapitre 3. Nutrition plante – champignon : une régulation écologique des conflits?

Articulation des articles

Alors que l'efficacité du piège, et donc indirectement le troisième partenaire fongique, peut augmenter la valeur sélective des fourmis au détriment de celle de la plante, Leroy et al (2011) ont démontré que la présence du champignon était néanmoins bénéfique à la plante par la médiation des transferts azotés entre les restes de proies et autres déchets des fourmis vers la plante. Ainsi, il semblerait que les conflits émergents de l'utilisation du piège puissent être non seulement évolutivement régulés mais également écologiquement contrebalancés par ces transferts nutritifs. De plus si ces transferts sont indirectement liés au nombre de proies capturées, alors l'efficacité de capture via le piège devrait être d'autant plus bénéfique à la plante. Nous avons ainsi testé si une augmentation du taux de capture chez *A. decemarticulatus* permet non seulement une augmentation de la fitness des fourmis, mais aussi une augmentation de la fitness d'*H. physophora*. Pour cela nous avons expérimentalement nourri les fourmis avec des proies et nous avons par la suite calculé le taux de production de femelles reproductrices chez les fourmis et le taux de fructification chez la plante (**Article 8**). Nous avons ainsi montré que le succès de prédation d'*A. decemarticulatus* entraînait une augmentation de la fitness chez la plante par transfert nutritif. Même si cette étude souligne l'importance potentielle des transferts nutritifs dans la régulation des conflits dans ce mutualisme tripartite, elle ne permet pas de comprendre dans quelle mesure ces bénéfices seront effectifs dans un milieu naturel, non-expérimentalement enrichi en azote par l'ajout de proie. En effet, cette étude montre que l'apport expérimental d'azote dans le système permet un plus grand taux de fructification de la plante. Or dans un système naturel, l'azote est un facteur limitant dans la production de sexués chez les fourmis (Davidson 2005). Ainsi, la propension des fourmis à d'abord utiliser l'azote pour sa propre reproduction avant d'en déposer le surplus devrait être un facteur important conditionnant l'apport d'azote à la plante et ainsi sa fitness. Nous avons testé cette hypothèse en comparant l'apport d'azote d'*A. decemarticulatus* et *A. octoarticulatus* ssp 2 vers *H. physophora* (**Article 9**). Nous montrons d'abord, en fournissant de l'azote enrichie en ^{15}N aux fourmis, que le système mutualiste composé par *A. octoarticulatus* ssp2, *H. physophora* et le champignon se comporte comme le système impliquant *A. decemarticulatus*, c'est à dire que le champignon joue le rôle de

médiateur trophique dans les transferts entre les fourmis et la plante. Enfin nous montrons que même si le champignon joue un rôle important dans ces transferts azotés, le dépôt d'azote par les fourmis est le facteur qui déterminera les bénéfices reçus par la plante par myrmécotrophie.

Abstract - Article 8

Mutualisms, or interactions between species that lead to net fitness benefits for each species involved, are stable and ubiquitous in nature mostly due to “byproduct benefits” stemming from the intrinsic traits of one partner that generate an indirect and positive outcome for the other. Here we verify if myrmecotrophy (where plants obtain nutrients from the refuse of their associated ants) can explain the stability of the tripartite association between the myrmecophyte *Hirtella physophora*, the ant *Allomerus decemarticulatus* and an Ascomycota fungus. The plant shelters and provides the ants with extrafloral nectar. The ants protect the plant from herbivores and integrate the fungus into the construction of a trap that they use to capture prey; they also provide the fungus and their host plant with nutrients. During a 9-month field study, we over-provisioned experimental ant colonies with insects, enhancing colony fitness (i.e., more winged females were produced). The rate of partial castration of the host plant, previously demonstrated, was not influenced by the experiment. Experimental plants showed higher $\delta^{15}\text{N}$ values (confirming myrmecotrophy), plus enhanced vegetative growth (e.g., more leaves produced increased the possibility of lodging ants in leaf pouches) and fitness (i.e., more fruits produced and more flowers that matured into fruit). This study highlights the importance of myrmecotrophy on host plant fitness and the stability of ant-myrmecophyte mutualisms.

Key words: ant-plant-fungus interactions, enhanced growth and fitness, *Hirtella physophora*, myrmecophyte, nutrient provisioning

Article 8. Predation success by a plant-ant indirectly favours the growth and fitness of its host myrmecophyte

Published in PLoS One . 2013 (8: e59405)

Alain Dejean^{1,2*}, Jérôme Orivel², Vivien Rossi³, Olivier Roux⁴, Jérémie Lauth², Pierre-Jean G. Malé⁵, Régis Céréghino^{1,6}, Céline Leroy⁷

1 Université de Toulouse; UPS, Ecolab, Toulouse, France, **2** CNRS; Écologie des Forêts de Guyane (UMR-CNRS 8172), Kourou, France, **3** CIRAD; Ecofog (UMR-CIRAD 93), Kourou, France, **4** IRD; Maladies Infectieuses et Vecteurs, Écologie, Génétique, Evolution et Contrôle (UMR- IRD 224), Bobo-Dioulasso, Burkina Faso, **5** CNRS; EDB (UMR-CNRS 5174), Toulouse, France, **6** CNRS; Laboratoire d'Ecologie Fonctionnelle (UMR-CNRS 5245), Toulouse, France, **7** IRD, AMAP (botAnique et bioinforMatique de l'Architecture des Plantes; UMR-IRD 123), Montpellier Cedex 5, France

Corresponding author: Alain Dejean; Écologie des Forêts de Guyane, Campus Agronomique, BP 316, 97379 KOUROU cedex, France

Tel.: (33) 594 594 32 93 00; Fax: (33) 594 594 32 43 02. E-mail: alain.dejean@wanadoo.fr

Introduction

Mutualisms, defined as cooperative interactions between species where each partner derives a fitness benefit, are based on “invested benefits” corresponding to an adaptation by each species to obtain benefits from its partner with the return exceeding the costs of the investment (Trivers 1971, Axelrod and Hamilton 1981, Herre et al. 1999, Holland et al. 2005). Such context-dependent outcomes vary according to the interacting partners over space and time, thus influencing the evolutionary fate of a mutualistic relationship and providing information on how and when mutualisms arise, persist, and vanish (Sachs and Simms 2006).

When hosts transmit symbionts by “vertical transmission” to their offspring the mutualisms are evolutionarily stable; yet, most mutualistic interactions are transmitted “horizontally” as the partners disperse separately. In the latter case, the reproduction of each partner might be subject to a trade-off if the resources invested by one partner in its own reproduction are lost for the other partner. Such a trade-off is a major source of instability as the symbionts may evolve traits promoting a reduction in cost, engendering the emergence of “cheaters” obtaining benefits at minimal cost (Leimar and Hammerstein 2010). Over time, they end up by completely sterilizing their hosts (Wilkinson and Sherratt 2001, O’Keefe and Antonovics 2002).

The subsequent instability would turn every mutualist into a parasite if not counterbalanced by specific conditions such as partner selection and fidelity, spatial structure (i.e., limited dispersal), and, above all, retaliation against exploiters (Herre et al. 1999, Wilkinson and Sherratt 2001, West et al. 2002, Bronstein et al. 2003, Kiers et al. 2003, Sachs and Simms 2006, Szilagyi et al. 2009). Because mutualisms are stable and ubiquitous in nature, the intrinsic traits of one partner can generate an indirect and positive outcome for the other, resulting in “byproduct benefits”. The resulting absence of cost (or very low cost) permits an equilibrium between the costs and benefits to be easily established between the partners (Connor 1995, Leimar and Connor 2003, Sachs et al. 2004).

Ant relationships with myrmecophytes, or plants housing a limited number of so-called ‘plant-ants’ in domatia (i.e., hollow branches or thorns and leaf pouches), are interesting models for studying conflicts and breakdown within mutualisms. Also, myrmecophytes usually provide their

guest ants with food, particularly extrafloral nectar (EFN) and/or food bodies (FBs), while, in return, plant-ants protect them from herbivores, competitors and pathogens through their intrinsic predatory, territorial and cleaning behaviours (Rico-Gray and Oliveira 2007). So, these protections correspond to byproduct benefits for the host myrmecophytes (see Thornham et al. 2012). The same is true when ants provide their host plants with nutrients (e.g. prey remains and faeces) that accumulate in the domatia. These nutrients are absorbed through the rhizomes, roots, protuberances, or the walls of the domatia. This phenomenon, called myrmecotrophy, has been noted for epiphytes and for some phanerophytes adapted to the nutrient-poor, lateritic soils of tropical rainforests (Rico-Gray and Oliveira 2007, Leroy et al. 2011).

The size of plant-ant colonies can be limited by the availability of space and food. As the host myrmecophyte grows, the guest colonies have more nesting space thanks to a greater number of domatia and so can grow in turn, while the production of EFNs and FBs increases. Yet, certain plant-ant species are somewhat less dependent on their host myrmecophyte to provision them because they tend hemipterans to obtain honeydew and/or are predators (Rico-Gray and Oliveira 2007). Mutualisms between myrmecophytes and plant-ants are transmitted horizontally, so that the energy invested by the myrmecophytes in producing flowers and fruits is not allocated to producing greater nesting space for the ant colonies. Reciprocally, winged ant sexuals are not involved in protecting the host plant foliage. This gives rise to a conflict of interest between the partners. By destroying flowers, the ants “sterilize” the plant and trigger the reallocation of host-plant resources from reproduction to vegetative growth. The sterilization is partial; otherwise, the ant species are considered parasites of the mutualism (Young et al. 1996, Yu and Pierce 1998, Rico-Gray and Oliveira 2007, Frederickson 2009, Szilagyi et al. 2009, Malé et al. 2012).

We focused this study on *Hirtella physophora* (Chrysobalanaceae) that houses colonies of *Allomerus decemarticulatus* (Myrmicinae) in pouches situated at the base of the leaf lamina (Fig. 1) and provides them with extrafloral nectar. Workers build galleries under the stems of their host-plants that serve as traps to capture insects of up to 1800 times the weight of a worker (Fig. 1; Dejean et al. 2005). To build these galleries, the workers first cut plant trichomes along the stems, clearing a path; then, using uncut trichomes as pillars, they build the vault of the galleries by binding together the cut trichomes with the mycelium of a fungus that they manipulate

(Dejean et al. 2005). This third partner, an Ascomycota from the order Chaetothyriales, therefore serves a structural purpose. *Allomerus decemarticulatus* also supply their host tree with nutrients via the walls of the domatia and the fungus with wastes, whilst the fungus, in turn, also provides the host plant with nutrients (Leroy et al. 2011, Ruiz-González et al. 2011). Finally, the workers partially castrate their host plant by cutting and chewing both the sterile and fertile parts of the flower buds (Orivel et al. 2011, Malé et al. 2012).

We hypothesized that when particularly successful in catching prey, mutualistic ant colonies increase their own fitness by producing more sexuals while also providing benefits to their host plant. Indeed, the more prey they capture, the more they provide the host plant with nutrients that then has greater growth (more leaves equals more housing available for guest ants) and fitness (more flowers and fruits produced in spite of the partial castration).

Materials and Methods

- *Ethics Statement*

This study was conducted according to relevant national and international guidelines. Sample collections necessary to scientific research were authorized by the French *Office National des Forêts (ONF)* provided that their impact upon the environment is considered negligible (details of the permit in [28]).

- *Study site and model*

This study was conducted between November 2007 and July 2008 on the top of a hill (05° 03.697' N; 52° 58.620' W - 05° 03.638' N; 52° 58.612' W) situated in the pristine forest near the field research station at Petit Saut, Sinnamary, French Guiana. *Hirtella physophora*, an understory plant found in pristine Amazonian forests and strictly associated with *A. decemarticulatus* in the study area, has long-lived leaves that bear a pair of leaf domatia at the base of each lamina; the flowers are segregated on racemous inflorescences and produce dark-

purple drupes (Fig. 1). These trees have a much longer lifespan (up to ca. 350 years) than their associated ant colonies (ca. 20 years) [27].

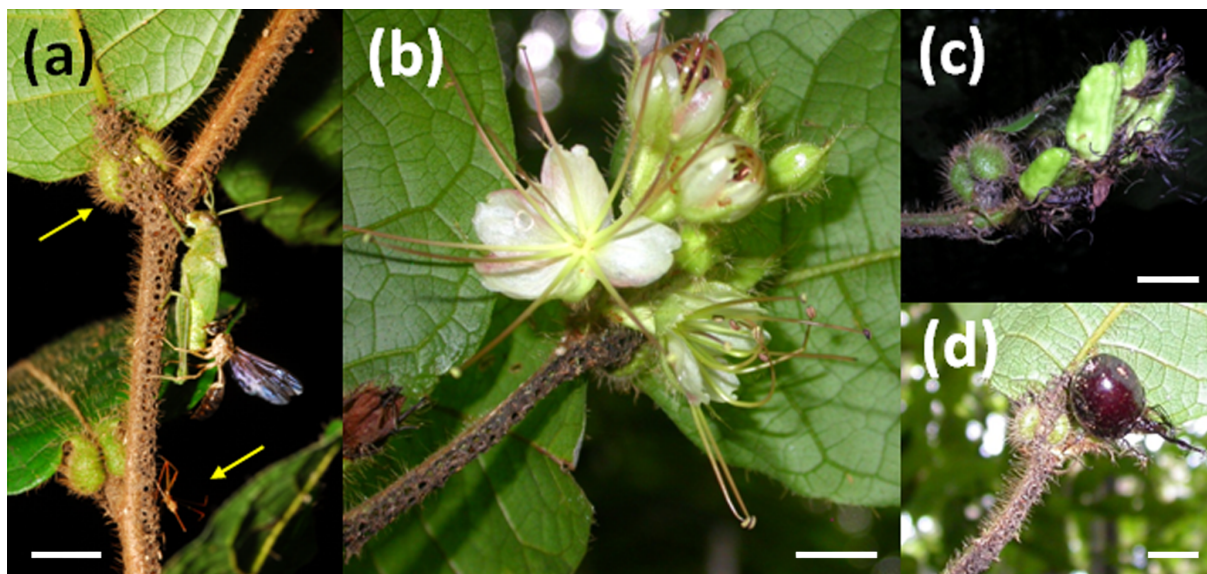


Figure 1. *Hirtella physophora* leaves, flowers and fruits. (a) Leaves bear leaf pouches (left arrow) at the base of their laminas. *Allomerus decemarticulatus* workers capture a green locust thanks to their trap: a gallery made using severed host plant trichomes and the mycelium of an Ascomycota fungus that the ants manipulate to create a composite material pierced by numerous holes (from under which the workers ambush prey). A wasp is seen robbing a piece of the locust abdomen; the wasp was also captured in turn as was the red Reduviid (right arrow). (b) At the distal position of the branch, flowers are segregated on racemous inflorescences at different stages of maturation from flower buds to fully open flowers. (c) Development of young, green (i.e. unripe) drupes. (d) A dark purple (i.e. ripe) drupe. Scale bars represent 1 cm.

- *Over-provisioning the ants*

We investigated the role of the ants in the nitrogen provisioning of their host plant by providing the colonies of experimental *H. physophora* with surplus prey twice a week for 9 months (colonies normally capture one to two prey items per week (Dejean et al. 2005). Captured at a light trap situated in Petit Saut, the prey - large moths and grasshoppers - were cut into pieces and the thoraxes plus legs (ca. 1g) were then provided to the ants by holding them close to the galleries where the workers immediately seized and dismantled them (Dejean et al. 2005). The 41 control and 31 experimental *H. physophora* trees selected for the main experiment were of similar height, trunk diameter at their base and number of leaves at the beginning of the

experiment; height: 1.4 ± 0.09 m vs. 1.35 ± 0.08 m ($t = 0.80$; $df = 70$; $p = 0.42$), trunk diameter at the base of the trees: 1.58 ± 0.13 cm vs. 1.72 ± 0.15 cm ($t = 0.62$; $p = 0.50$), and number of leaves: 22.7 ± 1.3 vs. 23.8 ± 1.9 ($t = 0.50$; $p = 0.61$). Because *Hirtella* trees are patchily distributed (several individuals within a 3-5 m radius), we randomly allocated trees within each patch with respect to the treatment (giving us the final ratio of 41 control and 31 experimental trees). This keeps the majority of either experimental or control trees from being selected in the same zone since differences in the amount of ^{15}N in the soil between zones can occur with repercussions for the $\delta^{15}\text{N}$ of the plants.

Twenty-four trees (height: 1-1.8 m) that had lost their associated ant colonies before we began the experiment were taken into consideration for certain comparisons. Over the 9-month study, only some queens began to found colonies on 11 trees, but no workers patrolled the foliage. Other trees from this hill were not selected because they were either too small to produce flowers (< 0.9 m), too tall (over 1.9 m) to be easily paired, or were in the process of regenerating after being broken by a branch that fell from the canopy.

Each month we counted the number of leaves, flower buds, flowers and fruits on both control and experimental trees. We were therefore able to deduce the number of new leaves produced by each tree as well as its level of flower and fruit production.

- *Isotopic analysis*

Nitrogen exists in two stable (non-radioactive) forms, ^{14}N and ^{15}N , and the isotopic nitrogen composition of animal tissue reflects the isotopic ratio of food eaten with a ^{15}N enrichment of 3-5‰ at each trophic level (Deniro and Epstein 1981). Also, the $\delta^{15}\text{N}$ in plant tissue reflects the $\delta^{15}\text{N}$ value of the nitrogen source. Therefore, if ants supply their host myrmecophyte with nutrients, we reasoned that plants whose associated ants were experimentally provided with surplus prey must be richer in ^{15}N than those in the control treatment.

At the end of the experiment, a 4-cm² piece of a “young, well-developed leaf” (see “stage 3” leaf in (Grangier et al. 2008 and in Fig. 2) was harvested from each host tree, freeze-dried and

then ground into a homogeneous powder using a mixer mill. Stable isotope analyses on these plant samples were conducted at the Scottish Crop Research Institute, Invergowrie, Dundee, DD2 5DA, Scotland, UK, using a Thermo-Finnigan Delta^{plus} Advantage gas isotope-ratio mass spectrometer interfaced with a Costech Analytical ECS4010 elemental analyzer. The natural abundances of ¹⁵N were calculated as follows:

$$\delta X (\text{‰}) = (R_{\text{sample}} - R_{\text{standard}}) (R_{\text{standard}})^{-1} \times 1000\text{‰}$$

where X is the element of interest and R_{sample} and R_{standard} the molar ratios (i.e., ¹⁵N/¹⁴N) of the sample and the standard, respectively (Deniro and Epstein 1981).

We conducted this study because we needed to be sure that the $\delta^{15}\text{N}$ of the experimental trees had truly increased compared to the control trees.

- *Biotic protection of trees*

Foliar growth is slow in *H. physophora*, and leaves can live for several years. While juvenile leaves benefit from the intense biotic protection provided by mutualistic ants, old leaves have their own efficacious mechanical and chemical defences (Grangier et al. 2008). So, we compared the defoliation rates of the two other kinds of leaves (“stage 2” and “stage 3”, respectively, according to Grangier *et al.* (2008); see Fig. 2) that were likely produced during the survey period: “expanding leaves” (“stage 2”) had fully developed domatia and an immature blade 8-to-15-cm-long (to be distinguished from “juvenile leaves” whose domatia were not fully developed), and “young, well-developed leaves” (“stage 3”).

At the end of the survey 28 control trees, 25 experimental trees (among the 41 and 31, respectively, from the beginning) and the 24 trees that had naturally lost their ants before the survey period bore such leaves, enabling us to compare the levels of defoliation using the following scale: (1) intact leaves or less than 5% of the leaf surface destroyed; (2) between 5% and 25% of the leaf surface destroyed; (3) between 25% and 50% of the leaf surface destroyed; (4) between 50% and 75% of the leaf surface destroyed; and (5) more than 75% of the leaf

surface destroyed. We assigned the values 0, 1, 2, 3 and 4 for these levels of defoliation and we averaged these numbers ($\sum \text{defoliation values} \times \text{number of leaves}^{-1}$) to obtain a rate of herbivory per tree.

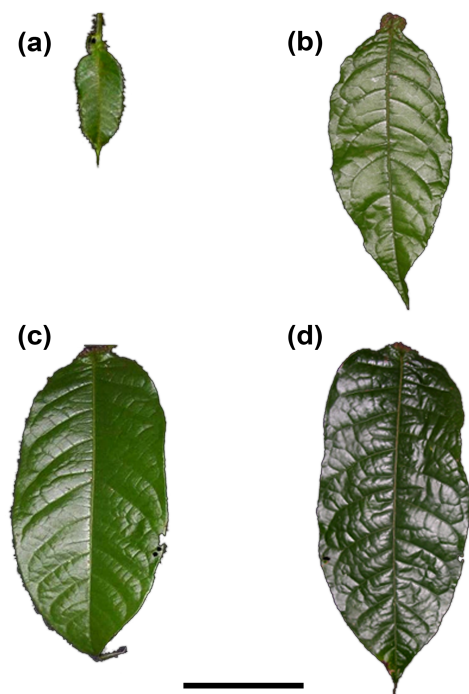


Figure 2. Four developmental stages of *Hirtella physophora* leaves. (a) Juvenile leaves: less than 5 cm long, positioned vertically; the domatia are not fully developed. (b) Expanding leaves: have fully developed domatia, but the blade is still immature. (c) Young leaves: from 15 to 25 cm long; positioned horizontally, mature but still relatively tender, and

- *Ant castes produced in control and experimental colonies*

To preserve some *H. physophora* plants in the area at the end of the survey, we gathered colonies from only 23 control and 23 experimental trees so that some intact trees and colonies remained to re-colonize the area. Indeed, to gather the ant colonies, we were obliged to cut off most of the host tree branches to collect both the leaf pouches (so the entire leaf) and the galleries where numerous workers were hiding and quickly placed them into plastic bags containing 0.5 L of 96% ethanol. We placed a label identifying the tree inside each bag, closed the bag, and then tagged the outside of the bag with the same code. The bags were then transported to the laboratory to quantify the size of the ant colony on each *H. physophora* tree.

All of the colonies had a queen. In the laboratory, we counted the number of males, male pupae, winged females, female pupae and larvae. For the production of workers, we could not consider the adult individuals as some of them likely emerged before the experimental period, so that we estimated the number of workers produced only from the number of pupae and larvae. We evaluated the number of worker larvae using the following formula:

$$\text{Number of worker larvae} = (\text{Total Number of larvae}) \times (\text{Number of worker pupae}) \times (\text{Total Number of pupae})^{-1}$$

where $\text{Total Number of pupae} = \text{male pupae} + \text{female pupae} + \text{worker pupae}$

- *Statistical comparisons*

The Student's t-test was used each time a comparison of two sets of data was necessary. The levels of defoliation between treatments were compared using the Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's *post-hoc* test. The link between the treatment and the numbers of leaves, buds or fruits on each plant was modelled using a generalized linear model (GLM) with a log-Poisson link [31]. The significance of the effect of the treatment was assessed through Likelihood ratio tests. Using the same statistics, the link between the treatment and the number of buds that developed into flowers was modelled for each plant to obtain the transition rates from bud to flower; the same was done for the number of flowers that developed into fruits (R v. 2.14.2 software).

Results

The numbers of workers and males produced by the experimental and control colonies during the survey period were not significantly different (means \pm s.e.; workers: 167.60 ± 13.24 vs. 174.40 ± 19.36 , $t = 0.289$, $df = 44$, $p = 0.77$; males: 5.09 ± 1.17 vs. 4.61 ± 1.12 , $t = 0.294$, $df = 44$, $p =$

0.77). However, over-provisioned colonies produced significantly more winged females than control colonies (3.17 ± 0.97 vs. 1.00 ± 0.34 , $t = 2.24$, $df = 44$, $p = 0.03$).

The very similar rates of defoliation for experimental (median, 25% and 75% percentiles: 1.00, 0.50, 1.33) and control trees (1.00, 0.62, 1.00) were much lower than for trees having lost their guest ant colony (3.33; 3.00; 3.41, Kruskal-Wallis test: $H_{2,77} = 47.22$, $p < 0.0001$; Dunn's *post-hoc* test: rates of defoliation for experimental vs. control trees, not significant; experimental and control trees vs. trees having lost their guest ants, $p < 0.001$). Among the 24 trees that had naturally lost their ants before the survey, six produced inflorescences and a total of 26 flower buds. Defoliating insects destroyed 21 of these buds as well as the five flowers produced.

Both plant growth and reproductive investment were enhanced by over-provisioning the ant colonies as the experimental trees produced significantly more leaves (3.58 ± 0.40 vs. 2.17 ± 0.31 , $p < 0.001$), more flower buds (5.81 ± 1.45 vs. 3.27 ± 0.64 , $p < 0.0001$), more flowers (3.61 ± 0.83 vs. 1.78 ± 0.39 , $p < 0.0001$) and more fruits (1.90 ± 0.50 vs. 0.49 ± 0.19 , $p < 0.0001$) than control trees (Likelihood ratio test on the GLM-Poisson model; R statistics). The percentage at which flower buds matured into flowers was not significantly different between experimental and control trees (64.3 ± 5.5 % vs. 49.9 ± 7.3 %, $p = 0.48$ for the Likelihood ratio test on the GLM-Binomial model). So, it is likely that the workers castrated their host trees regardless of whether the trees belonged to the experimental or the control group. Finally, the percentage of flowers that matured into fruit was significantly higher for experimental than for control trees (49.7 ± 5.4 % vs. 23.3 ± 6.0 %, $p = 0.02$ for the Likelihood ratio test on the GLM-Binomial model).

At the end of the survey, while the percentage of nitrogen contained in the leaves of both experimental and control trees was not significantly different (mean \pm SE: 1.46 ± 0.03 % vs. 1.42 ± 0.02 %; $t = 0.95$; $df = 70$; $p = 0.35$), the experimental trees had significantly higher $\delta^{15}\text{N}$ values than control trees (2.45 ± 0.18 ‰ vs. 1.59 ± 0.11 ‰; Welch-corrected $t = 4.08$, $df = 51$, $p < 0.001$; see Fig. 3).

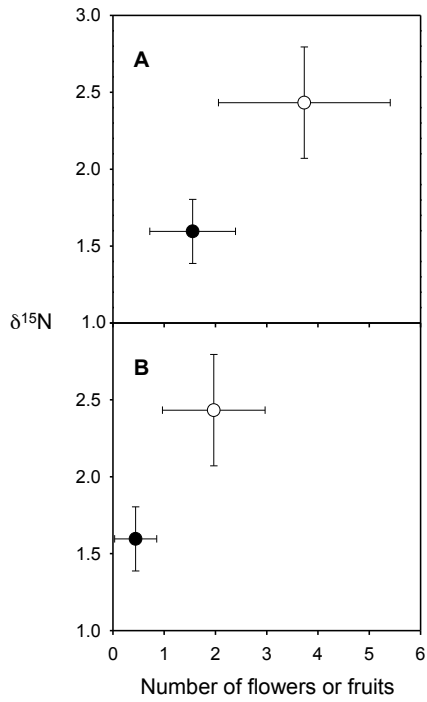


Figure 3. Production of flowers (A) and fruits (B) versus $\delta^{15}\text{N}$ values (‰) for the leaves of *Hirtella physophora*. The resident *Allomerus decemarticulatus* colonies were over-provisioned (experimental trees; open circles; N = 31) or not (control trees; filled circles; N = 41) (means \pm se).

Discussion

Here we show that colony fitness was enhanced through over-provisioning with prey as more winged females were produced by experimental colonies. Supplemental protein increased the production of males and gynes, but not of workers, in the Argentine ant *Linepithema humile* (Aron et al. 2001), while the increased production of winged females was due to supplementary carbohydrates rather than proteins in *Myrmica brevispinosa* (Bono and Herbers 2003).

The experiment did not modify the worker patrolling activity because we noted non-significant differences in the: (1) number of workers produced per colony sheltered, (2) biotic protection (similar defoliation rate; having very low constitutive defences, the leaves at the chosen stages of development depend on ant protection (Grangier et al. 2008)) and (3) castration rate between control and experimental trees.

On the plant side, experimental individuals had more ^{15}N than did control plants, confirming findings by Leroy *et al.* (2011) of myrmecotrophy in this mutualism. The novelty of this study is that “surplus” nutrients likely permitted the experimental trees to increase their investment in both growth and reproduction as they produced significantly more leaves, flower buds, flowers and fruits than control trees. Furthermore, the experimental trees had a higher rate of flowers that matured into fruits compared to the control trees, showing that fruiting is likely limited by the quantity of available nitrogen.

Our results support the initial hypothesis that the more insects the ants capture, the more nutrients are available to the host plant for growth. This provides the ants with more housing, in turn providing accommodation for the additional winged females produced and enabling the ants to build longer gallery-traps to capture more prey. In addition to this self-sustaining process, the prey carcasses incorporated into the trap to feed the fungus attract necrophagous insects that are then frequently captured (Dejean et al. 2005), while the trapped prey attract cleptobionts that are also captured (Fig. 1a; Dejean et al. 2012).

Cases of plant-ants sterilizing their host myrmecophyte have frequently been noted (Young et al. 1996, Yu and Pierce 1998, Frederickson 2009, Orivel et al. 2011). This behaviour corresponds

to the “over-exploitation” of the partner, increasing that partner’s cost, as opposed to “cheating by defection”, or reducing the partner’s benefit (Douglas 2008, 2010). In response, myrmecophytes can keep their guest ants from destroying flowers by changing the distribution of the inflorescences and through repellent floral volatiles (Raine et al. 2002, Willmer et al. 2009) or through retaliation where they destroy certain domatia or reduce their size and survival rate (Izzo and Vasconcelos 2002, Edwards et al. 2006). For *H. physophora*, a trade off occurs between the partial castration carried out by the *A. decemarticulatus* workers (Orivel et al. 2011, Malé et al. 2012) and myrmecotrophy that indirectly favours both plant growth and fitness (this study). Although entirely dependent only on the ants’ behaviour, these mechanisms seem to increase the stability of the relationship.

In conclusion, myrmecotrophy, a byproduct benefit for myrmecophytes, may intervene in the stability of myrmecophyte-ant mutualisms because the plant receives a benefit at no cost (or extremely reduced cost) for the ant. Further studies are needed to verify whether myrmecotrophy is more widely found than previously thought, particularly when the plant-ants are predatory and have a tendency to partially castrate their host plant.

Abstract - Article 9

In ant plant protective mutualisms, the plants provide ants with nesting space and in certain cases food resources in exchange for indirect benefits such as foliage protection. Ants may provide also nutrients to their host plant, a phenomenon called myrmecotrophy. Despite its wide recognition, the variation of nutritive outcomes arising from different symbionts over a single host plant host should have never been explored but should greatly influence host performance. Here, we empirically test if myrmecotrophy arising from two sympatric ant symbionts, *Allomerus decemarticulatus* and *A. octoarticulatus*, may trigger differences in performance of the host plant *Hirtella physophora* for which they compete. We demonstrated through the use of ^{15}N enrichments, that these two model systems have similar nitrogen acquisition through the mediation of a third fungal partner. However, *A. octoarticulatus*- associated *H. physophora* had a higher natural abundance of leaf ^{15}N and received higher amount of leaf N compared to *A. decemarticulatus*- associated *H. physophora*. We showed also that such different N supply has a direct positive effect on the leaf area and the specific leaf area but not on the volume of the domatia of the host plant. Overall, we showed, for the first time, that myrmecotrophy is driven differently depending on the identity of the ant species that thus provide differential outcomes to the host plants influencing their performance. This study adds further evidence that myrmecotrophy has to be better considered to understand the stability of ant plant mutualisms.

Key words: nutrient provisioning, stable isotopes, ant-plant-fungus interaction, *Allomerus* ants, *Hirtella physophora*, myrmecophyte, mutualism

Article 9. Differential myrmecotrophy affects host plant performance in protective ant-plant mutualisms.

In preparation

Jérémie Lauth^{1,2*}, Jérôme Orivel², Jérémie Mener³, Frédéric Petitclerc², Alain Dejean^{2,4} and Céline Leroy⁵

¹Université des Antilles et de la Guyane, UMR EcoFoG, Campus Agronomique, BP 316, F-97379 Kourou cedex, France

²CNRS; UMR EcoFoG, Campus Agronomique, BP 316, F-97379 Kourou cedex, France

³ Conservatoire du littoral, îles Bretagne Sud, 8 quai Gabriel Péri, Port du Légué, BP 474, F-22174 Plérin cedex, France

⁴Université de Toulouse; UMR Ecolab, 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse cedex 9, France

⁵IRD; UMR AMAP, Boulevard de la Lironde, TA A-51/PS2, F-34398 Montpellier Cedex 5, France

*Corresponding author: Jérémie Lauth, UMR Ecologie des Forêts de Guyane, Campus Agronomique, BP 316, F-97379 Kourou cedex, France. Fax: +33 (0)5 94 32 43 02; E-mail: jeremie.lauth@ecofog.gf

Introduction

Understanding the persistence of mutualisms amounts to quantifying the net outcomes arising from the mutualistic traits under selection and experienced by each partner (Bronstein 1994). Yet, while some mutualistic traits can easily be identifiable, additional ones, not always obvious, may play an important role. Their obliteration may lead to a misinterpretation of the outcomes, giving rise to an incorrect view of mutualisms persistence. This is particularly true when several symbionts compete for a single host. One symbiont might be more beneficial for a considered mutualistic trait, but more detrimental for another, which could have noticeable consequences for host benefits.

In obligate ant plant protective mutualisms, ant-plants, also called myrmecophytes, provides the ants with nesting cavities (domatia) and most of the time food through the production of extrafloral nectar and/or food bodies. In exchange, the ants protect the plant against herbivores, competitors and pathogens through their predatory and territorial behaviors (Heil and McKey 2003, Rico-Gray and Oliveira 2007). Ants can also provide their host plants with nutrients from prey remains and faeces (i.e. myrmecotrophy). These nutrients are absorbed through the domatia walls or protuberances that develop inside the domatia. This phenomenon is widespread in epiphytic and geophytic myrmecophytes adapted to the nutrient-poor, lateritic soils of tropical rainforests (Beattie 1989, Treseder et al. 1995, Rico-Gray and Oliveira 2007, Leroy et al. 2011).

Yet, despite its wide recognition, its widespread presence and its importance in plant nutrition (e.g. Sagers et al. 2000), myrmecotrophy has been underestimated in the shade of ant protection. Indeed, while numerous studies have focused on the direct benefits arising from ant protection, and their context dependency (Chamberlain and Holland 2009), studies on myrmecotrophy has been limited to its occurrence and quantification. The direct benefits resulting from myrmecotrophy have most of the time only been assumed (but see Dejean et al. 2013) and their variations among different symbionts have never been studied.

In some regions of French Guiana, *Allomerus decemarticulatus* and *A. octoarticulatus*, compete for the same host-plant species, *Hirtella physophora*. Besides their protective role, a previous study demonstrated that *A. decemarticulatus* provides nitrogen to its host plant through the mediation of a third fungal partner (Leroy et al. 2011). Because the fungus is strictly

associated with the presence of ants (Ruiz-Gonzalez et al. 2010), the nutritional benefit provided by the fungus to the host plant could thus positively affect the evolutionary persistence of the ant–plant interaction (Leroy et al. 2011). The plant fitness was also influenced according to the quantity of prey capture by the interacting ant partners (Dejean et al. 2013). Yet, the two ant partner shows considerable variations in their strategy and thus their ability to catch potential preys (Lauth et al. in preparation). We thus hypothesize that according to the ant symbiont identity, the amount and the “quality” of waste and faeces might display important variations, which may alter the benefits received by the host plant. In this context, we firstly investigated whether the association between *A. octoarticulatus*, its associated fungus and the host plant exhibits the same functional nitrogen transfer as the *A. decemarticulatus* association and empirically tested if nitrogen supply from two sympatric plant-ant species through myrmecotrophy showed variations which could trigger differences in the host plant performance. At last, we draw conclusions on the behavior of the system by integrating the outcomes arising from myrmecotrophy to the previous known outcomes arising from protective mutualisms.

Materials and methods

- *Study site and model*

This study was conducted from November to December of 2011 at *La montagne des singes*, Kourou (05° 04' 20"N; 52° 41' 43"W), in French Guiana. At this site, *Allomerus octoarticulatus* and *A. decemarticulatus* are found in sympatry (at a ratio 1:7) and compete for the same host plant, *Hirtella physophora* with a single ant colony per plant.

Hirtella physophora is an understory treelet that occurs strictly in pristine Amazonian rainforest. It has long-lived leaves that bear a pair of domatia at the base of each lamina and extra-floral nectaries located on the abaxial surface of the lamina and inside the domatia (Leroy et al. 2008). The domatia appear early in the plant’s ontogeny and result from the curling under of the leaf margin. The profound morpho-anatomical modifications of the tissues compared to the lamina indicate that the formation of domatia is costly for the plant (Leroy et al. 2008, 2010).

All *Allomerus* species are specialist plant-ants inhabiting a variety of myrmecophytic hosts

(Fernandez 2007). In *A. octoarticulatus* and *A. decemarticulatus*, the species studied thus far, workers protect their host plant from defoliators through their predatory behavior (Dejean et al. 2001, Romero and Izzo 2004, Frederickson 2005, Grangier et al. 2008). Moreover, these species build galleries pierced with holes under the stems of their host plants, that serve as traps to ambush prey. Workers hide in the galleries with their heads just under the holes, waiting for prey. The vault of the galleries is a composite material made of cut plant trichomes strengthened by the mycelium of an Ascomycete fungus specifically cultivated by these ants (Lauth et al. 2011, Ruiz-González et al. 2011). The proportion of plant trichomes, fungus and other vegetative or insect debris in the galleries are, however, different according to the ant species (J. Lauth, pers. obs.).

- ¹⁵N provisioning

We investigated the role of the two mutualistic ant species in myrmecotrophy by providing a total of 14 colonies (i.e., seven *A. octoarticulatus* and seven *A. decemarticulatus* colonies) with food artificially enriched with ¹⁵N. Isotopic labeling with ¹⁵N was provided to the ants through agar discs (ca. 5mm diameter; mean weight ± SE = 111 ± 17 mg) containing 2% of enriched glycine (99 atom% ¹⁵NH₂OOH), 3% of non-enriched peptone, 15% of non-enriched fructose and 4% of agar. Agar discs were placed in plastic cups wired to the base of the plant, just besides the first basal branching. No direct contact occurred between the ¹⁵N enriched food and the plant or the galleries. Plastic cups were sealed with tapped caps to keep out food-robbing insects and a small hole facing the host plant stem was made to enable access to the ants. The plastic cups were placed ten days prior to the beginning of experiment for the ants to adapt to the setup. The ants were fed with ¹⁵N enriched food each day for nine consecutive days. Before re-supplying each colony with a new predefined quantity of agar discs we removed any remaining food and weight it in order to determine the total food consumption by the ant colonies.

- *Sample collection*

Ant, plant and fungal samples were collected one month after the end of the experiment. The youngest leaf was harvested from each plant and a 4-cm² piece of the lamina was dissected avoiding the main nerve. The ants sheltered in the domatia were also collected. Fungal samples were not collected directly from the galleries to avoid any bias as the latter are not constituted of pure fungus and also because the two ant species do not build similar galleries in terms of composition and structure. Pure fungal samples were collected as described in Ruiz-González *et al.* (2013). Briefly, it consists in making a cut of ca. 5mm² in domatia walls of the last six produced leaves and wait for ants to fill it with pure fungus. Cuts were made two days after the end of the enrichment procedure.

Negative control of ants and plants were collected in the same manner and on the same experimental plants before the beginning of the ¹⁵N enrichment procedure. However, because it was not possible to get negative control of pure fungal samples on the experimental plants we decided to collect these samples on seven other untreated plants associated with each ant species. The cuts and the sampling of the pure fungus were made at the same time as in experimental plants.

- *Isotopic analysis*

To quantify %N, δ¹⁵N and δ¹³C contents of all of the three partners, all of the samples collected were vacuum-dried and around 5 mg of each were analyzed for their δ¹⁵N and δ¹³C contents. Stable isotope analyses were conducted at the Colorado Plateau Stable Isotope Laboratory (Northern Arizona University, USA) using a Thermo-Finnigan Delta^{Plus} Advantage gas isotope-ratio mass spectrophotometer (ThermoFisher Scientific) interfaced with a Costech Analytical ECS4010 elemental analyzer. The natural abundances of ¹⁵N and ¹³C were calculated as follows:

$$\delta X = (R_{sample}/R_{standard} - 1) \times 1.000$$

where X is the element of interest, and R_{sample} and $R_{standard}$ are the molecular ratios (i.e. $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ or $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) of the sample and the standard, respectively (Deniro and Epstein 1978).

Moreover, nitrogen concentration (%N) was quantified in the negative control for ants, pure fungus and plants by calculating the ratio between the mass of nitrogen atoms and the total mass of the dried sample.

- *Leaf traits of host plants*

Three important traits of the plants, either related to nitrogen or myrmecophytism were measured: specific leaf area (SLA), leaf area (LA) and domatia volume. SLA is associated to a large array of leaf properties affecting the physiology and ecology of plant species (Shipley 1995), while LA is correlated with nitrogen leaf content (Niinemets et al. 2002). SLA was calculated as the ratio between leaf area and leaf dry mass ($\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$) using the leaves collected to the negative control plants. LA (cm^2) was calculated using leaf length (L) and width (W) of the three latest mature leaves of 192 *A. decemarticulatus* and 68 *A. octoarticulatus* inhabited plants using the formula: $LA = L * W - (4W^2 - \pi W^2)$. Domatia were excluded in the determination of both SLA and LA. Domatia volume (mm^3) was estimated based on the volume of an ellipsoid for which the three elliptic radii were equal to the length, width and height of the domatium. These measurements were performed on the same leaves used for the estimation of LA.

- *Statistical analyses*

Because the variables were not normally distributed, even after transformation, non-parametric Mann-Whitney U tests (MW) were used to compare leaf %N, $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{13}\text{C}$, SLA and domatia volume according to the inhabiting ant species. Finally, a Linear Model (LM) was conducted on the LA with ant species and trunk diameter as explanatory factors. Indeed, in ant plants, nitrogen acquisition can be the results of both myrmecotrophy and root intake (Sagers et al. 2000, Fischer et al. 2003). We thus used the trunk diameter of the plant as a proxy of the development of the root system. Indeed, many studies found that plant size could be use as a

proxy for nutrient availability (Aker 1982, Herrera 1991). Yet, *H. physophora*, as an understory treelet, experiences physical damage caused by debris falling from the canopy (Orivel et al. 2011). Thus, trunk diameter seems to be a better estimate for nutrient availability. All statistical analyses were conducted using R (R Development Core Team 2009)

Results

- Natural abundances of ^{15}N and ^{13}C

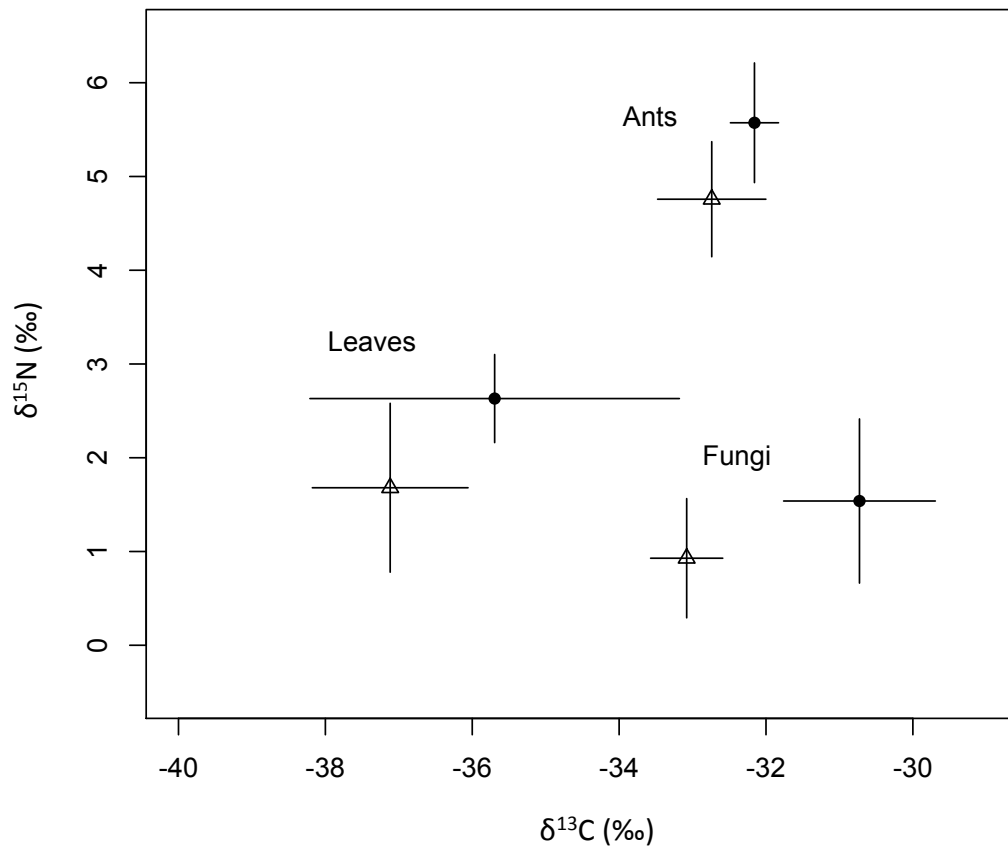


Figure 1. Natural abundance (mean \pm SE) of $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ of each of the three partners involved in the interaction. Full circles represent the values for *Allomerus octoarticulatus* and its associated fungus and plant, and open triangles represent the values for *A. decemarticulatus* and its associated fungus and plant.

In both systems, the natural abundances of ^{15}N and ^{13}C allow distinguishing the three partners (Fig. 1). *Allomerus octoarticulatus* had significantly higher $\delta^{15}\text{N}$ compared to *A. decemarticulatus* (mean \pm SE + 5.57 \pm 0.64‰ vs. + 4.76 \pm 0.61 ‰ respectively; MW, $U = 8$, $P < 0.05$). When associated with *A. octoarticulatus*, the host plant had significantly higher $\delta^{15}\text{N}$ compared to those associated with *A. decemarticulatus* (+ 2.63 \pm 0.47‰ vs. + 1.68 \pm 0.9 ‰ respectively; MW, $U = 11$, $P < 0.05$). On the contrary, no difference was observed in the fungus when associated with either *A. octoarticulatus* or *A. decemarticulatus* (+ 1.54 \pm 0.88‰ vs. + 0.93 \pm 0.64 ‰ respectively; MW, $U = 21$, $P = 0.7104$). Finally, the ants had significantly higher $\delta^{15}\text{N}$ values than the host plant and the fungus. The difference between the $\delta^{15}\text{N}$ values of the plant and the fungus was also significant when associated to *A. octoarticulatus*, but non-significant when interacting with *A. decemarticulatus* (*A. octoarticulatus*: ants vs. plant, MW, $U = 56$, $P < 0.001$; ants vs. fungus, $U = 49$, $P < 0.001$ and plant vs. fungus, $U = 5$, $P < 0.01$; *A. decemarticulatus*: ants vs. plant, $U = 64$, $P < 0.001$; ants vs. fungus, $U = 48$, $P < 0.001$ and plant vs. fungus, $U = 12$, $P = 0.1419$) This non-significant difference may however be due to a small sample size, as Leroy *et al.* (2011) found, with a much larger sample size, that the plant exhibited a significantly higher $\delta^{15}\text{N}$ value .

Conversely, the $\delta^{13}\text{C}$ values showed a different pattern with, in both model systems, the fungus exhibiting significantly higher values than the ants and the plants – the difference between the last two being also significant (*A. octoarticulatus*: ants vs. plant, -32.16 \pm 0.32 vs. - 35.7 \pm 2.5 ‰, MW, $U = 49$, $P < 0.01$; ants vs. fungus, -32.16 \pm 0.32 vs. -30.72 \pm 1.03 ‰, $U = 6$, $P < 0.05$ and plant vs. fungus, - 35.7 \pm 2.5 vs. -30.72 \pm 1.03 ‰, $U = 50$, $P < 0.01$; *A. decemarticulatus*: ants vs. plant, -32.74 \pm 0.74 vs. - 37.12 \pm 1.1 ‰, $U = 64$, $P < 0.001$; ants vs. fungus, -32.74 \pm 0.74 vs. -33.08 \pm 0.49 ‰, $U = 40$, $P < 0.05$ and plant vs. fungus, - 37.12 \pm 1.1 vs. -33.08 \pm 0.49 ‰, $U = 48$, $P < 0.001$). The fungus also displayed a significantly higher $\delta^{13}\text{C}$ values when associated with *A. octoarticulatus* compared to *A. decemarticulatus* (MW, $U = 0$, $P < 0.001$), while both the ants and the host plants showed similar values (*A. decemarticulatus* vs. *A. octoarticulatus*: MW, $U = 9$, $P = 0.053$; *A. decemarticulatus*- vs. *A. octoarticulatus*-associated plants: MW, $U = 21$, $P = 0.2786$).

Measurements of the percentage of total nitrogen highlighted that, while nitrogen concentration remained constant between the two ant species (MW, $U = 35$, $P = 0.4634$), both the fungus and the host plant were richer in nitrogen when associated with *A. octoarticulatus* (fungus: MW, $U = 0.5$, $P < 0.01$; host plant: MW, $U = 8$, $P < 0.05$, Fig.2).

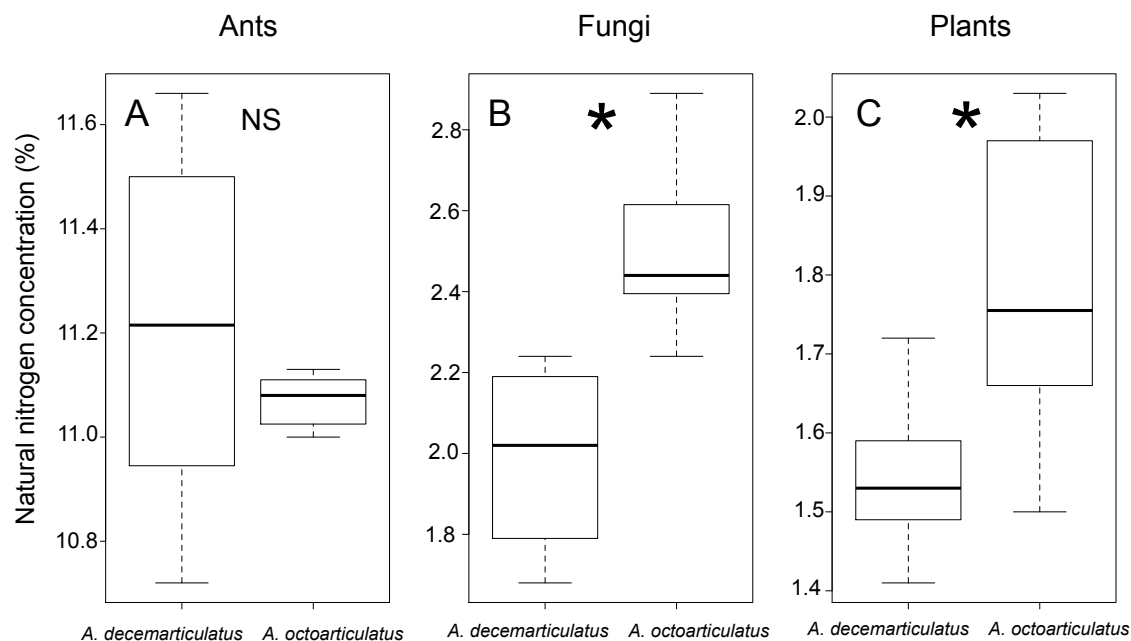


Figure 2. (A) Nitrogen concentration (%) of *Allomerus decemarticulatus* and *A. octoarticulatus* workers. ‘NS’ indicates the absence of a significant difference between ant species (MW, $U = 35$, $p = 0.4634$). (B) Nitrogen concentration (%) of the fungus either associated with *A. decemarticulatus* or *A. octoarticulatus*. Asterisks indicate a significant difference between ant species (MW, $U = 0.5$, $p < 0.01$). (C) Nitrogen concentration (%) of in *Hirtella physophora* leaves either associated with *A. decemarticulatus* or *A. octoarticulatus*. Asterisks indicate a significant difference between ant species (MW, $U = 8$, $p = 0.05$). Box and whisker plots represent, top to bottom, the 90th percentile, 75th percentile, median, 25th percentile and 10th percentile.

- ¹⁵N enrichments of the associated partners

The total consumption of ¹⁵N-enriched food by the two *Allomerus* species was not significantly different (mean per colony \pm SE = 0.336 ± 0.101 g vs. 0.424 ± 0.144 g for *A. decemarticulatus* and *A. octoarticulatus*, respectively, MW: $U = 16$, $P = 0.1893$), indicating a similar ¹⁵N enrichment in both species. The provisioning of the ants with ¹⁵N-enriched food

resulted in a significant increase in $\delta^{15}\text{N}$ in all of the three associated partners compared with the negative controls (Fig. 3).

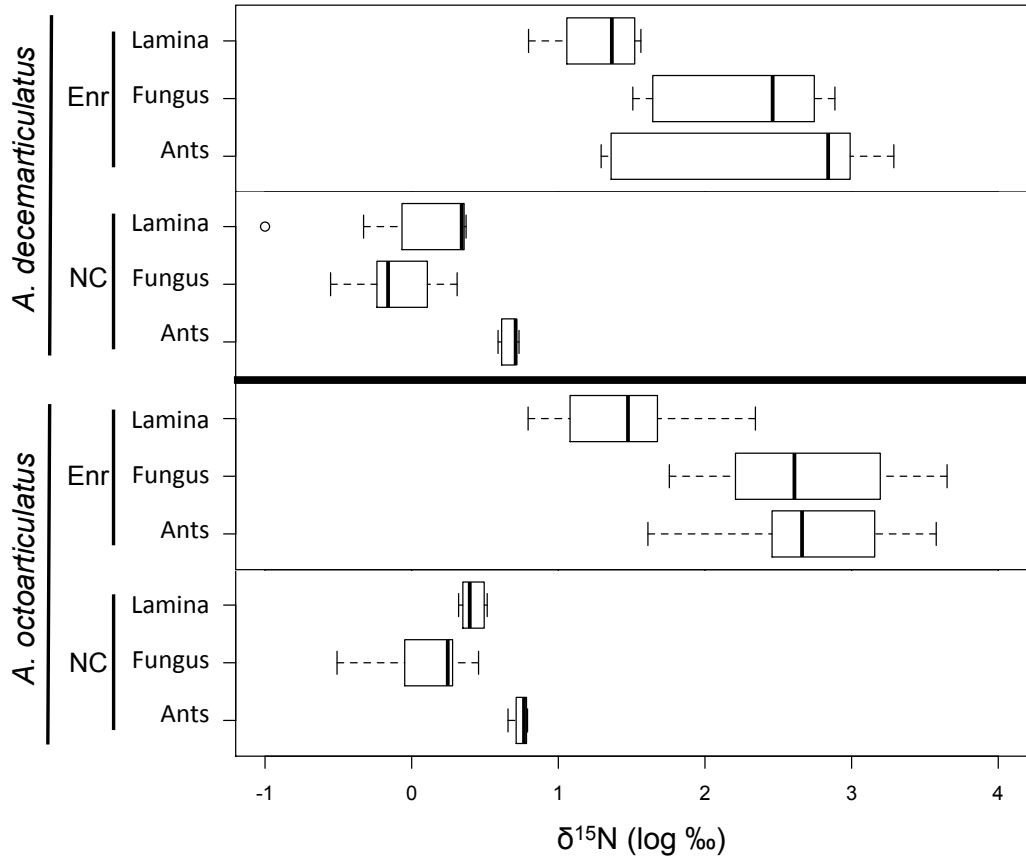


Figure 3. Effect of experimental ^{15}N provisioning to the ants on the three partners of the two model systems. $\delta^{15}\text{N}$ (log ‰) values of the tree partners are shown for the two treatments: Negative control (NC) and ant ^{15}N -enriched food (Enr). The two ants species, *Allomerus decemarticulatus* and *A. octoarticulatus* were provisioned during nine consecutive days with agar discs containing 2% of 99 atom% ^{15}N -glycine. Pairwise statistical comparisons between negative controls and enriched samples were all significant at $p < 10^{-3}$ (Mann-Whitney U test). Error bars below and above the boxes indicate the 10th and the 90th percentiles, and the ends of the boxes indicate the 25th and the 75th percentiles and open circles indicate outliers.

For each model system, the ^{15}N enrichments of the ants and the fungi were of the same magnitude (*A. decemarticulatus* vs. fungus: MW, $U = 37$, $P = 0.6454$; *A. octoarticulatus* vs. fungus: MW, $U = 26$, $P = 0.9015$). On the contrary, the ^{15}N enrichments of the plants were significantly lower compared with both the ants and the fungus (*A. decemarticulatus*: ant vs. plant: MW, $U = 52$, $P < 0.05$, fungus vs. plant: MW, $U = 61$, $P < 0.01$; *A. octoarticulatus*: ants vs. plant: MW, $U = 46$, $P < 0.05$, fungus vs. plant: $U = 46$, $P < 0.05$). The comparison of the two model systems highlighted also no significant differences in ^{15}N translocation between the ants, the fungus and the plants (*A. decemarticulatus* vs. *A. octoarticulatus*: MW, $U = 23$, $P = 0.6126$; *A. decemarticulatus*- vs. *A. octoarticulatus*-associated fungus: MW, $U = 16$, $P = 0.1893$; *A. decemarticulatus*- vs. *A. octoarticulatus*-associated plants: MW, $U = 24$, $P = 0.6943$).

- *Leaf traits of host plants*

Plants associated with *A. octoarticulatus* showed higher SLA than to those associated with *A. decemarticulatus* (MW, $U = 2$, $P < 0.01$, Fig. 4A). The leaf area of *A. octoarticulatus*-associated plants was also significantly more important. Both ant identity and trunk diameter had a significant effect on leaf area but the former had, by far, the strongest effect (Fig. 4B, Table 1). On the contrary, the identity of the associated ant species did not have any affect on domatia volume (MW, $U = 5793$, $P = 0.1886$, Fig. 4C)

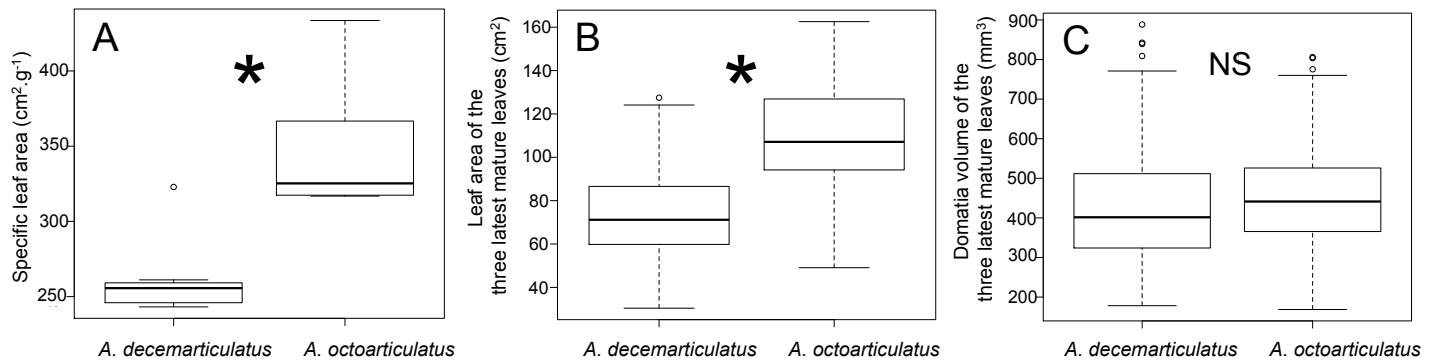


Figure 4. (A) Specific leaf area (SLA, $\text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) of *Hirtella physophora* leaves. Asterisks indicate a significant difference between ant species (MW, $U = 2$, $p < 0.01$). (B) Leaf area (LA, cm^2) of the three latest mature leaves. Asterisks indicate a significant difference between ant species (LM, Estimates \pm SE = 27.80 ± 7 , $p < 0.0001$). (C) Domatia volume (mm^3) of the three latest mature leaves. ‘NS’ indicates the absence of a significant difference between ant species (MW, $U = 5793$, $p = 0.1886$). Box and whisker plots represent, top to bottom, the 90th percentile, 75th percentile, median, 25th percentile and

Table 1. Linear model assessing the influence of ant species and trunk diameter on the mean leaf surface. SE, standard error.

	Estimates \pm SE	t-value	p-value
Intercept	63.46 \pm 3.12	20.319	< 0.0001
Ant species:			
<i>A. octoarticulatus</i>	27.80 \pm 7	3.96	< 0.0001
Trunk diameter	7.43 \pm 1.99	3.71	< 0.001
Interaction	0.85 \pm 3.44	0.246	0.805

Discussion

Nutrient provisioning by ants to their host plants is widespread (see Rico-Gray and Oliveira 2007) and such myrmecotrophy can result from the direct absorption of ant wastes and/or indirectly from the trophic mediation by a third fungal partner (Defosse et al. 2011, Leroy et al. 2011). Here we show that myrmecotrophy is driven by the identity of the ant species and provides differential outcomes to the host plant.

The experimental provisioning of the two ant species with ^{15}N -enriched food led to a significant increase of $\delta^{15}\text{N}$ for all partners of the mutualism. Moreover, the enrichment was of the same magnitude for each partner when compared between model systems. This corroborates the results of Leroy et al. (2011) and demonstrates that in both systems, the fungus act as a trophic mediator, transferring nutrients from ant wastes to the plant. This is further supported in *A. octoarticulatus* by the presence of hyphae running along the inner epidermis of old domatia and the penetration of hyphae into previously scarified epidermis of domatia by the ants (JL, pers. obs.). Under natural conditions, however, comparisons of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ signatures of the three interacting organisms highlight variations in the trophic fluxes between each compartment. The two ant species have $\delta^{15}\text{N}$ values of 4-6‰ that reflect their omnivorous diet (Davidson et al. 2003). Although they differ significantly in their $\delta^{15}\text{N}$ signatures, the observed difference of c. 0.8‰ cannot be categorically attributed to a feeding at a different trophic level and thus to variation in their diet. Both ants capture most encountered arthropods and exploit extrafloral nectar produced by their host plant.

The functioning of the system is, however, different according to the ant species. Indeed, both the fungus and the plant showed a significantly higher nitrogen concentration when associated to *A. octoarticulatus*. Because both ants occur in sympatry and are randomly distributed within the plant population, the observed differences could only be attributed to the ants. Thus, *A. octoarticulatus* transfer more nitrogen to its associated fungus and because the latter retains very little nitrogen and transfer most to the plant (Leroy et al. 2011), the plant also benefit from the higher supply in nitrogen arising from the ants. Moreover, part of the nitrogen is thought to be cycling from exchanges between the partners, which could explain the higher $\delta^{15}\text{N}$

values in *A. octoarticulatus* and its associated plants, as well as their higher nitrogen concentrations than in the *A. decemarticulatus* system. Such a difference in functioning is of importance as the higher leaf nitrogen concentration of *A. octoarticulatus*-associated plants translated into phenotypic differences, with higher SLA and LA compared to *A. decemarticulatus*-associated plants. Because SLA and LA are correlated with nutrient availability (Cunningham et al. 1999, Fonseca et al. 2000, Ackerly et al. 2002), these traits, among others, outline the performance of the plants (see Wright et al. 2004, Poorter and Bongers 2006). As a consequence, the two ant species influence differently the vegetative growth of their host plant and, everything else being equal, probably its fitness as myrmecotrophy acts on host plant fitness (Dejean et al. 2013). It should be noted, however, that no variation in the volume of domatia was noticed between *A. octoarticulatus*- and *A. decemarticulatus*-inhabited plants. This highlights potential differences in developmental pathways between lamina and domatia (see Leroy et al. 2008, 2010) and/or the influence of other factors than nutritional resources (see Malé 2011).

Myrmecotrophy has been characterized to date in a number of ant plant interactions and can have major impact on plant nutrition (Treseder et al. 1995, Sagers et al. 2000, Watkins et al. 2008). But this is, to the best of our knowledge, the first study placing myrmecotrophy in a comparative approach. The observed differences and their consequences have to be replaced in the theoretical context of mutualisms. The economic contract theory applied to mutualisms led to the development of a useful framework in understanding the selection and potential changes of traits underlying the mutualistic behavior of symbionts (Weyl et al. 2010, Archetti et al. 2011a). Lauth et al. (submitted) demonstrated that variations in the protection benefits provided by the two ant species studied here induced variations in the outcomes experienced by the host plant, and thus in the associated feedbacks. Adding myrmecotrophy in the protective aspect of the interaction provides new insights into this framework. The association with *A. octoarticulatus* generates a better leaf protection of the host plant (Lauth et al. in preparation). Thus *A. octoarticulatus* is nutritionally and protectively a better mutualist than *A. decemarticulatus*. The higher vegetative growth of *A. octoarticulatus*-inhabited plants is not only the result of the biotic protection, but also results from the more important myrmecotrophy. Yet, one question remains: why *H. physophora* benefits more from nitrogen when associated with

A. octoarticulatus than *A. decemarticulatus*? Nitrogen is one of the main limiting factor in arboreal ants (Davidson 2005) and the more important myrmecotrophy most probably indicates a physiological limitation in nitrogen use in *A. octoarticulatus*. Further studies are needed to demonstrate this hypothesis, but the less important space limitation in growth and reproduction in *A. octoarticulatus* compared to *A. decemarticulatus* supports this potential physiological limitation (Lauth et al. in preparation).

Acknowledgments

We are grateful to Andrea Yockey-Dejean for editing the manuscript. Financial support was provided by a fellowship from the *Fondation pour la Recherche sur la Biodiversité* (research agreement n°AAP-IN-2009-050) and by the *Programme Amazonie II* of the *Centre National de la Recherche Scientifique*. JL's financial support was provided by a PhD fellowship from the FSE (*Fond Social Européen*). This work has benefited from "Investissement d'Avenir" grants managed by the *Agence Nationale de la Recherche* (CEBA, ref. ANR-10-LABX-0025 and TULIP, ref. ANR -10-LABX-0041).

Discussion du chapitre

Nos résultats supportent l'importance de la myrmécotrophie dans les mutualismes de protection entre les fourmis à plantes et les myrmécophytes. Alors que son importance à été mise en évidence dans plusieurs systèmes, nos études démontrent deux points jusqu'alors jamais abordés. Le taux de myrmécotrophie affecte durablement la fitness de la plante hôte et les bénéfices reçus peuvent varier en fonction de l'identité du symbionte. Alors que le corpus scientifique a dressé l'effet protecteur des fourmis comme le trait mutualiste majeur dont bénéficie les myrmécophytes, il se pourrait que l'apport d'azote à la plante ait tout autant, si ce n'est plus d'importance dans la globalité des bénéfices reçus par la plante.

De plus, nos études apportent du crédit quant à l'implication de la myrmécotrophie dans la régulation des conflits mutualistes multipartites. Alors que la protection de la plante est compromise par l'investissement de ce dernier par les fourmis, l'article 8 met en exergue l'importance du taux de prédation dans le taux de myrmécotrophie et consécutivement la fitness de la plante hôte. L'investissement plus important dans la construction et l'utilisation du piège par *A. decemarticulatus* (cf. Chapitre 2) devrait alors se traduire par un transfert d'azote entre les fourmis, le champignon puis la plante plus important. Pourtant, ces résultats sont contradictoires avec l'article 9. En effet, nous démontrons que *A. octoarticulatus* ssp2 est nutritionnellement une meilleure mutualiste, par un transfert plus important d'azote vers ses deux autres partenaires. La compréhension de cette contradiction permettrait de généraliser les conditions par lesquelles les myrmécophytes bénéficient de ces apports nutritifs.

Emergence d'une myrmécotrophie différentielle

Les bénéfices acquis par la plante par myrmécotrophie sont un sous produit de l'activité des fourmis. En effet, ces transferts sont passifs car ils découlent des déchets des fourmis, notamment leurs excréments et leurs restes de proies. Cependant, nos études montrent que les fourmis jouent indirectement un rôle dans ces transferts. En effet, l'azote fait partie des facteurs limitant la production des sexués chez les fourmis. Ainsi, l'acquisition d'azote, par la capture de proies, devrait être d'abord intégrée par les fourmis et son dépôt dans les galeries devrait seulement refléter l'azote inutilisée. Nous avons vu dans le chapitre 2 que *A. decemarticulatus* produit trois fois plus de sexués que *A. octoarticulatus* ssp2. Dès lors, l'utilisation d'azote pour sa propre reproduction doit être comparativement plus importante, ce qui pourrait expliquer le moindre transfert d'azote vers les galeries et consécutivement vers la plante. Bien qu'hypothétique, cette explication semble raisonnable. En effet lorsque *A. decemarticulatus* est surnourrie, cette dernière produit plus de sexuées. A partir du moment où une certaine limitation quant à la production de sexués est atteinte, alors la plante bénéficie d'un surplus d'azote déposés dans les galeries par la colonie.

En suivant cette hypothèse, la production de sexués par *A. octoarticulatus* ne devrait ainsi pas être limitée par un manque d'azote. Le chapitre 2 montre également que la production de sexués ne devrait pas non plus être limitée par l'espace de nidification disponible ou l'apport de carbohydrates. Il est donc tentant de spéculer sur le fait que cette différence de production de sexués puisse être le résultat de la différence de spécialisation entre les deux espèces de fourmis envers leur plante hôte. Les mécanismes par lesquels cette différence de spécialisation entraîne une limitation de la reproduction chez *A. octoarticulatus* ssp2 ne sont pas connus, mais une limitation de la capacité ou du taux de ponte des reines à suivre la croissance de la plante peut être un facteur explicatif. Il serait dès lors intéressant d'explorer cette hypothèse, en définissant par exemple l'augmentation de l'espace de nidification chez les autres myrmécophytes habitées par *A. octoarticulatus* ssp2 et de différencier la capacité de ponte entre *A. decemarticulatus* et *A. octoarticulatus* ssp2.

Plus largement, ces résultats suivent les recommandations de Palmer et al (2010) sur l'importance de bien définir les effets d'un parasite sur une plante hôte pour comprendre la stabilité des mutualismes en général. En effet, ils montrent que certaines espèces de fourmis, jusqu'alors considérées comme « parasites », pouvaient être finalement bénéfiques à la plante lorsque ces interactions étaient considérées dans un contexte plus large, comme les différentes successions de symbiotes pendant l'ontogénie de la plante. Dans notre contexte, nous faisons appel à une reconsidération de symbiotes tricheurs, qui, même s'ils ne protègent pas leur plante hôte, peuvent être globalement bénéfiques à la plante par un apport nutritif par myrmécotrophie.

Le mutualisme plante – champignon : généralisé ou spécialisé ?

Nous avons vu dans les chapitres précédents que les deux mutualismes tripartites étudiés comportaient une différence de spécialisation importante. Alors que l'interaction entre *A. decemarticulatus* et son symbiote fongique GC1 ainsi qu'avec *H. physophora* sont très spécialisées, *A. octoarticulatus* ssp2 peut s'associer avec plusieurs souches de champignons et avec plusieurs plantes au niveau de son aire de répartition amazonienne. Il est cependant important de rappeler qu'elle est exclusivement associée à *H. physophora* en Guyane française. Parce que la présence du champignon sur la plante hôte est conditionnée par la présence des fourmis, on peut émettre l'hypothèse que les différences de spécialisation peuvent également conditionner la spécialisation entre la plante et le champignon. En effet les chapitres précédents suggèrent que la spécialisation d'*A. decemarticulatus* envers ses deux autres partenaires est une conséquence de leur plus longue histoire évolutive. Dans ce contexte, la plus longue association entre *H. physophora* et le symbiote GC1 a pu également entraîner une spécialisation de ces deux espèces. Un tel scénario évolutif pourrait alors expliquer l'association entre le symbiote GC1 et *A. octoarticulatus* ssp2. En effet, sous la condition que l'interaction prolongée entre *H. physophora* et le symbiote GC1 ait entraîné une maximisation des bénéfices pour la plante, alors celle-ci a pu évoluer des adaptations permettant l'exclusion de tout autre symbiote, moins bénéfique. La succession des différentes colonies de fourmis au long de l'ontogénie de la plante, dans les populations où *A. decemarticulatus* est majoritaire, risque fort probablement de mettre

en contact la plante avec le symbiote particulier. Dans ce cas, la spécialisation de la plante envers GC1 entrainerait l'exclusion d'un autre symbiote transféré par *A. octoarticulatus* ssp2, qui se retrouverait finalement dans l'obligation d'interagir avec GC1. En extrapolant cette hypothèse, nous pouvons même imaginer que cette sélection par la plante, et non la fourmi, ait pu induire les différences observées dans le niveau d'agriculture entre les deux espèces de fourmis. Dans ce sens, il existerait alors une forte pression de sélection vers la plante pour une telle spécialisation sachant que le « niveau » d'agriculture va directement induire le niveau de ses bénéfiques reçus. Si cette possible spécialisation peut entrainer l'exclusion de certains symbiotes fongiques, alors il devrait exister des mécanismes de reconnaissance au niveau des zones de transferts nutritifs entre le champignon et la fourmi.

Leroy et al. (2011) ont identifié les vieilles domaties comme zone privilégiée du transfert d'azote entre le champignon et la plante dans le système comprenant *A. decemarticulatus*. L'épiderme de ces cellules est recouvert d'hyphes du champignon qui pénètrent au niveau de cellules endommagées, précédemment scarifiées par les fourmis. De récentes observations en microscopie à transmission ont révélé que les hyphes du champignon sont présents dans les méats du mésophylle des domaties et présentent même des fusions avec la paroi végétale (Fig. 15 A, B). Par une approche d'immunologie permettant de mettre en évidence les parois cellulaires végétales, nous avons pu mettre en évidence que la matrice entourant le champignon est d'origine végétale alors que la partie interne, non marquée, est d'origine fongique (Fig. 15C). Sachant que les parois cellulaires sont des systèmes poreux avec une interface solide, des échanges entre plante et champignon se font sans trop de doute possible directement au niveau de cette interface.

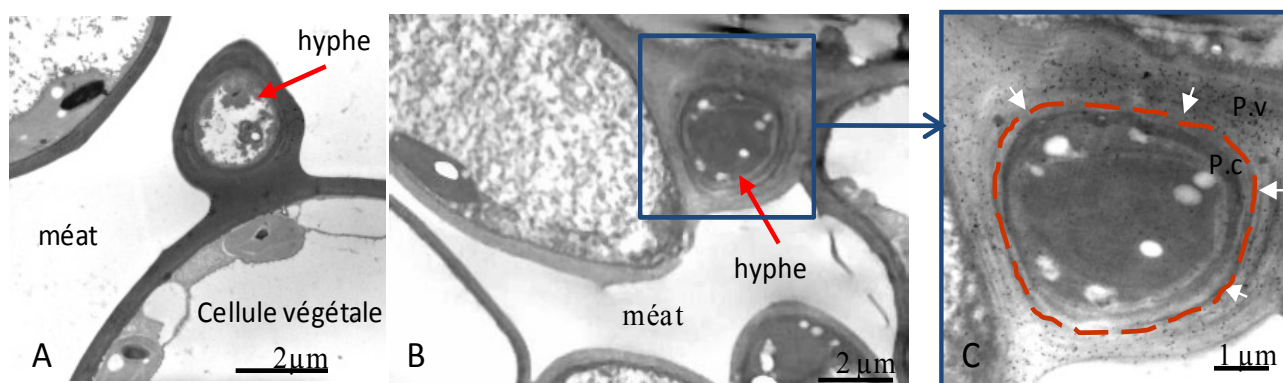


Figure 15. Observations en microscopie électronique à transmission de coupe ultra fines réalisées dans les vieilles domaties. La distinction entre les parois végétales (P.v) et les parois du champignon (P.c) a été réalisée grâce à l'anticorps JIM7.

De ces résultats découlent deux questions fondamentales : (1) est ce que ces structures particulières sont issues d'une coadaptation entre la plante et le champignon ? (2) est ce que ce phénomène observé entre GC1 (parce que associé à *A. decemarticulatus*) et la plante est également présent avec d'autres symbiontes fongiques génétiquement différenciés ?

Nous avons très peu d'éléments, si ce n'est aucun, qui nous permettent de répondre directement à la première question. Ces observations sont préliminaires et aucune investigation des structures de transferts de nutriments n'a été explorée dans les autres modèles d'études ; là où un transfert a été mis en évidence. On peut néanmoins entreprendre une démarche inverse, c'est à dire faire certaines hypothèses quant à l'absence de coadaptation chez ces deux espèces. En effet, il est important de considérer qu'il existe déjà une forte spécialisation écologique et évolutive des Chaetothyriales à la vie symbiotique au sein des myrmécophytes (Voglmayr et al. 2011). Dans notre système, le champignon a un rôle structurel et un rôle de médiateur trophique. Sous l'hypothèse d'une coadaptation entre la plante et le champignon, on peut émettre l'hypothèse que le rôle de transfert soit un trait acquis secondairement, une fois que le champignon a évolué vers une association durable avec les fourmis. Or, dans d'autres systèmes, le champignon n'est présent qu'à l'intérieur des domaties, ce qui laisse entendre que le rôle de transfert de nutriment est un trait basal dans ce mutualisme tripartite (Defosse et al. 2011). De plus, le champignon associé à ce système est phylogénétiquement plus basal que le champignon associé aux différentes *Allomerus*, suggérant que ces structures observées puissent être un héritage phylogénétique plutôt qu'une coévolution entre *H. physophora* et GC1 (Voglmayr et al. 2011). Dans ce sens, ces structures spécialisées devraient ainsi être également présentes lorsque la plante est associée à d'autres champignons génétiquement variables. Cette hypothèse peut être confirmée par l'observation de l'intérieur des domaties quand *H. physophora* est associée à *A. octoarticulatus* ssp2 ou au niveau de l'interaction entre *C. nodosa* et *A. octoarticulatus* spp1 (Fig. 16). Dans ces systèmes, de nombreux hyphes longent également la paroi interne des domaties et s'insèrent dans l'épiderme au niveau des cellules précédemment scarifiées par les fourmis. Il se peut donc que les structures observées soient généralisées au sein de l'interaction spécifique entre Chaetothyriales et myrmécophytes. Alternativement, la coadaptation de certaines souches peut se faire non pas au niveau de la structure du transfert mais au niveau de la reconnaissance chimique entre hyphes et cellules végétales, comme dans certains types de symbioses ectomycorhiziennes (Lagrange et al.

2001). Mais encore une fois ces hypothèses restent en suspend. En conclusion, il est donc extrêmement difficile de savoir s'il existe un niveau de spécificité supérieur à celui des Chaetothyriales et des plantes myrmécophytes. Toutefois cela ne peut pas être exclu et nécessite de plus grandes investigations tant une cosélection de la plante et de GC1 pourrait avoir une importance primordiale dans l'interaction entre les champignons et *A. octoarticulatus* ssp2.

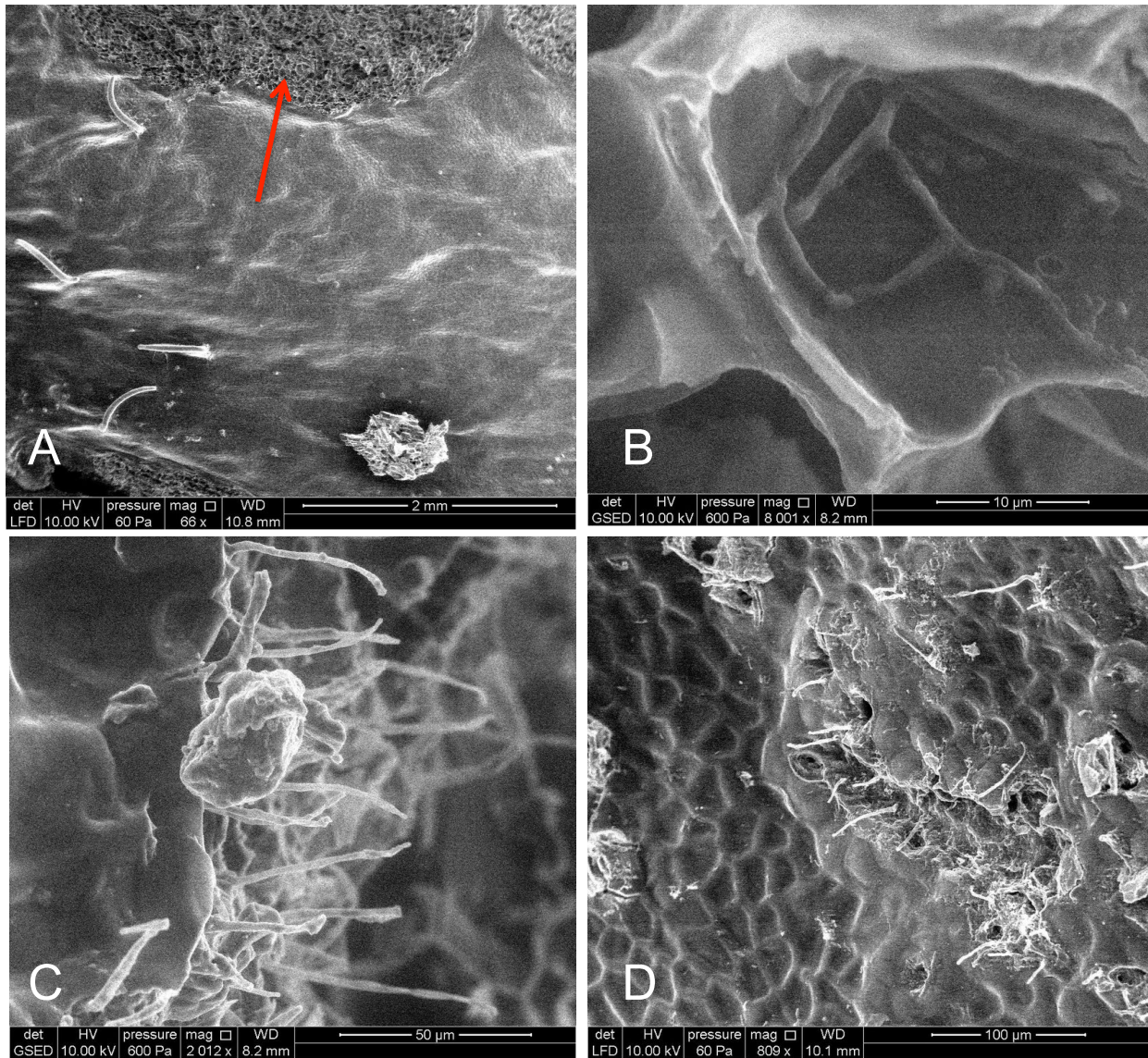


Figure 16. Observations en microscopie électronique à balayage de l'intérieur d'une domatie de *C. nodosa* associée à *A. octoarticulatus* ssp1 (A, B, C) et *H. physophora* associée à *A. octoarticulatus* ssp2 (D). (A) Scarification de l'épiderme de l'intérieur de la domatie (représenté par la flèche rouge). (B) Hyphes longeant la paroi interne de la domatie. (C) Pénétration de mycélium dans les cellules scarifiées. (D) Pénétration des hyphes dans les cellules préalablement scarifiées par les ouvrières.

Discussion Générale

L'ensemble des résultats de cette thèse démontre clairement qu'il n'est pas possible d'étudier les interactions mutualistes par paire d'espèces sans prendre en compte la présence de partenaires additionnels pour comprendre les processus écologiques et évolutifs qui maintiennent la coopération dans les mutualismes. Dans les mutualismes tripartites, chaque espèce va directement ou indirectement influencer la résultante écologique de l'interaction des deux autres, par divers conflits dans l'allocation de certaines ressources qui vont être contrebalancés par certaines réponses qui ne peuvent être comprises que dans un contexte multipartite.

Notre approche comparative nous a également permis de mettre en avant l'importance du contexte évolutif dans lequel se place une interaction sur la modulation des bénéfices net de chaque partenaire. Notre étude démontre que la spécialisation d'une espèce envers une autre n'est pas forcément synonyme d'une réduction du nombre de partenaires. En effet, chaque espèce d'un mutualisme tripartite peut devenir hyperspécialisée aux deux autres. Elle suggère par ailleurs que cette spécialisation multipartite entre chaque paire n'est pas indépendante : la spécialisation d'une interaction entre deux espèces entraîne la spécialisation d'une autre paire et ainsi de suite. Enfin, la prise en compte du caractère multipartite d'un mutualisme change radicalement la vision de l'évolution des mutualismes jusqu'alors étudiée entre paires d'espèces. Alors que le corpus scientifique s'accorde à dire que la spécialisation entre espèce par coévolution renforce la stabilité et les bénéfices perçus par chaque partenaire, le contexte multipartite semble altérer ces prédictions. Au contraire la spécialisation multipartite semble être un moteur d'instabilité et de baisse des bénéfices.

Résultantes écologiques, conflits et stabilité évolutive dans les mutualismes tripartites

L'association entre *H. physophora*, les deux fourmis du genre *Allomerus* et leur champignon repose sur des échanges de services. Chacun des trois partenaires bénéficie de la présence des deux autres mais cette relation engendre également des coûts. La balance de ces coûts et bénéfices détermine le caractère mutualiste d'une espèce focale vis-à-vis de ses associés. Notre étude a montré qu'il est fondamental de bien évaluer l'ensemble des interactions entre tous les partenaires et l'ensemble des traits mutualistes que chaque espèce afin d'appréhender correctement la résultante écologique de l'association. En effet chaque trait de la part de l'un d'entre eux engendre un la création d'un service chez les autres, soit par des effets directs ou indirects (Fig. 17).

Nous avons vu que la construction et l'utilisation élaborée des galeries chez *A. decemarticulatus* grâce à la culture d'un champignon spécifique entraîne un conflit d'intérêt dans la protection de sa plante hôte. Ce conflit génère une plus grande phytophagie et consécutivement une diminution de sa croissance végétative et très probablement une baisse de la production de fruits. Ce conflit est au centre des interrogations quant au maintien à long terme de l'association. Il tend à faire du champignon un compétiteur de la plante hôte agissant indirectement de manière antagoniste. Or, lorsque l'on considère ce tripartisme dans son ensemble, la présence du champignon semble réguler ce conflit par sa médiation trophique entre les transferts nutritifs de la plante et des fourmis. Bien que les fourmis soient l'élément médiateur du taux de transfert vers la plante, la probable dégradation par le champignon de molécules complexes en molécules simples directement assimilables par la plante doit jouer en faveur de la régulation de ce conflit d'intérêt. Si l'on ne considère plus seulement le champignon mais la sélection d'un comportement alternatif de prédation par *A. decemarticulatus* comme le trait imposant ce conflit d'intérêt, alors de nouveaux éléments se distinguent dans la compréhension de la régulation du conflit. Premièrement, par un phénomène pré-adaptatif, la plante est capable de contrôler le comportement des fourmis vers l'assurance d'un service minimum de protection. En effet, indirectement, une baisse trop importante de la croissance végétative de la plante aurait un tel

effet néfaste sur la fitness de *A. decemarticulatus* qu'elle permet de contrôler l'antagonisme lié à cette stratégie de prédation. L'absence totale de patrouille sur les feuilles d'*H. physophora* est donc directement contre sélectionnée chez *A. decemarticulatus* par un mécanisme de fidélité au partenaire. Nous exposons par ailleurs comment ce processus de patrouille peut se mettre en place d'une manière plus fine. En effet même si la fidélité au partenaire « force » *A. decemarticulatus* à protéger sa plante hôte, cette action est en conflit avec l'utilisation du piège. L'intérêt évolutif des fourmis tient donc à protéger au maximum la plante en utilisant un nombre minimum d'ouvrières dans les patrouilles sur les feuilles. L'attraction chimique des feuilles les plus vulnérables envers *A. decemarticulatus* permet cela et l'on peut bien comprendre pourquoi ce mécanisme a été positivement sélectionné chez les fourmis. Alors que l'utilisation du piège entraîne une baisse des bénéfices envers la plante, la capture de proies qui en émane entraîne également un apport nutritif non négligeable. Il semble donc que la plante ait également un avantage à conserver une telle stratégie de prédation. Ainsi on peut également comprendre pourquoi la production de molécules attractives puisse être sélectionnée chez *H. physophora* même si certains mécanismes pré-adaptatifs contrôlent les patrouilles de *A. decemarticulatus* en amont.

Au delà de la mise en évidence des mécanismes régulant les conflits émergent d'une association multipartite permettant une résultante écologique positive pour chacun des partenaires, nos résultats soulignent l'importance du contexte évolutif dans lequel se place ses interactions dans la modulation de cette résultante.

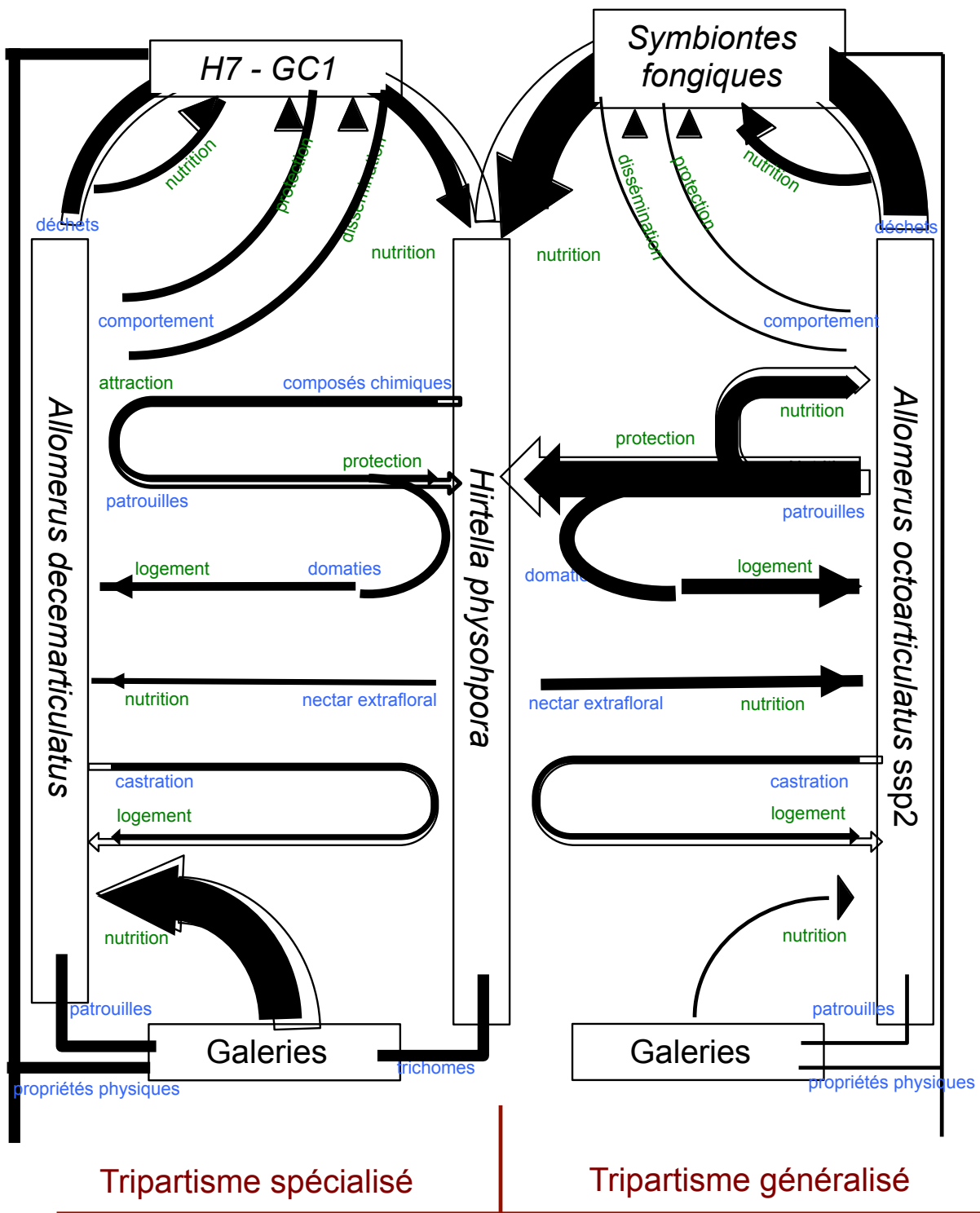


Figure 17. Résultante écologique combinée des deux mutualismes tripartites étudiés. Les différents mécanismes de régulation des conflits et de l'intensité des bénéfices résultent d'une différence de spécialisation entre les différents systèmes. Les noms en bleu représentent les traits des différentes espèces, les noms en vert représentent les services rendus par ces traits. La largeur des flèches représente l'intensité relative d'un service rendu. La différence de largeurs des flèches correspondant aux services rendus par les deux espèces de fourmis vers leur symbiontes fongiques relatent leurs différents niveaux d'agriculture.

Spécialisation multipartite et coévolution

Cette thèse a particulièrement exploré deux systèmes mutualistes tripartites. Un système spécialisée, comprenant *A. decemarticulatus*, le symbionte fongique H7_GC1 et la plante *H. physophora*; et un système généraliste, comprenant *A. octoarticulatus* ssp2, ses différents symbiontes fongiques associés, et *H. physophora*. Bien que spécifiquement associée à *H. physophora* en Guyane française, *A. octoarticulatus* ssp2 interagit avec plusieurs espèces myrmécophytes le long de son aire de répartition amazonienne. L'étude comparative de ces deux systèmes permet de montrer que la spécialisation d'*A. decemarticulatus* envers chacun de ses deux partenaires est interconnecté. En effet, il semble que la spécialisation de *A. decemarticulatus* envers sa plante hôte soit une réponse adaptative à l'élaboration d'un piège efficace. La construction et l'utilisation de ce piège peuvent être considérées comme un « niveau » supérieur d'agriculture comparée à *A. octoarticulatus* ssp2, qui semble découler de la spécialisation des fourmis avec un champignon particulier. Ainsi, la spécialisation de *A. decemarticulatus* avec le champignon a entraîné sa spécialisation avec la plante hôte. D'un autre côté, la mise en place de ce piège a sans doute été permise par la spécialisation des fourmis envers leur plante hôte via l'utilisation élaborée des trichomes. Le niveau d'agriculture des fourmis est ainsi également conditionné par sa spécialisation avec la plante, entraînant la spécialisation avec le champignon. Est ce que cette spécialisation multipartite découle de phénomène de coévolution ? Nous ne pouvons pas en être certain car il n'a pas été possible d'identifier clairement les traits soumis à une adaptation réciproque entre chaque espèce. Néanmoins, la démonstration de l'agriculture chez les fourmis du genre *Allomerus* montre qu'il existe bien des adaptations particulières du comportement de ces dernières envers la culture du champignon. La réciproque, à savoir si certains traits du champignon se soient adaptés au comportement des fourmis n'a pu être démontrée, mais l'investissement de *A. decemarticulatus* dans la construction du piège, utilisé comme proxy d'un niveau supérieur d'agriculture, permet de suggérer une adaptation des propriétés physiques du mycélium en réponse au comportement des fourmis. Dans le même sens, l'attraction des ouvrières aux composés chimiques émis par les jeunes feuilles d'*H. physophora* démontre une adaptation d'*A. decemarticulatus* envers sa plante hôte. Nous ne savons pas si les composés émis par la plante sont issus d'un phénomène adaptatif

vis à vis du comportement d'*A. decemarticulatus*. Mais, parce qu'une telle production n'est pas sélectivement avantageuse pour la plante lorsque associée à *A. octoarticulatus* ssp2, on peut émettre l'hypothèse qu'il s'agit bien d'une réponse adaptative au comportement d'*A. decemarticulatus*. Finalement, l'association étroite de ces trois partenaires sur une plus longue échelle évolutive prédit ces phénomènes de coadaptation et de coévolution.

Le concept de la coévolution diffuse assume implicitement qu'une espèce ne peut évoluer d'adaptations spécifiques à une autre sachant qu'elle est soumise à de nombreuses pressions sélectives contrastées. De manière opposée, la coévolution par paire assume qu'une espèce va préférentiellement interagir avec une autre, amenant irrémédiablement une cospécialisation des deux espèces par une course à l'armement. Cette thèse fait le lien entre ces deux théories. D'un côté, la coévolution peut intervenir sur plus de deux espèces à la fois, et d'un autre, elle peut quand même entraîner une spécialisation multi-spécifique. Finalement, au contraire des prédictions de la coévolution diffuse, assumant qu'une espèce ne peut développer d'adaptations spécifiques à cause de nombreuses pressions de sélections divergentes, nous montrons que les contrastes de pressions de sélections envers un même trait peuvent promouvoir la spécialisation multi-spécifique.

Coévolution, spécialisation et défection.

Une idée qui prédomine le corpus scientifique est que la spécialisation entre partenaires mutualistes renforce la stabilité de cette interaction et les bénéfices reçus par chaque partenaire. De nombreux exemples cités dans cette thèse valide ce concept. La cospécialisation entre symbiontes et hôtes permet par exemple de limiter l'exploitation de symbiontes parasites (Brouat et al. 2001, Heil et al. 2005). De manière générale, lorsque plusieurs partenaires partagent un intérêt commun, une prédiction simple est que la coévolution devrait favoriser les combinaisons de traits qui sont les plus bénéfiques pour chaque partenaire (Thompson 2005). Si ce mutualisme perdure, alors on s'attend à ce que les bénéfices issus de cette interaction soient supérieurs lorsqu'ils ont coévolué depuis longtemps par rapport à une interaction récente (Chapuis et al.

2009). En effet, au cours de ce temps évolutif, les partenaires les moins bénéfiques seront toujours exclus, entraînant une spécialisation des partenaires les plus bénéfiques. Cependant cela reste une question ouverte qui nécessite une plus grande investigation expérimentale (Poisot et al. 2011). En effet, alors que cette prédiction semble s'appliquer pour les mutualismes à transmission verticale, là où l'intérêt reproducteur des différents partenaires est lié, elle semble moins évidente pour les mutualismes à transmission horizontale, où la surexploitation et/ou la défection reste un phénomène sous-jacent. Contrairement au concept cité ci-dessus, on peut penser que si une spécialisation entraîne une dépendance d'une ou des espèces en interaction, alors il sera toujours plus avantageux pour l'espèce dépendante de s'associer avec un partenaire ayant développé certaines adaptations néfastes plutôt que de ne pas s'associer du tout. Notre étude en est un exemple frappant.

Allomerus octoarticulatus ssp2, l'espèce généraliste, est bien plus bénéfique à *H. physophora* que l'espèce spécialiste *A. decemarticulatus*, que ce soit au niveau de la protection ou de la nutrition de la plante. Nous avons vu que la différence de protection émerge d'une différence entre les deux espèces de fourmis dans l'investissement vers la stratégie de prédation émanant de l'utilisation des galeries. Comme nous l'avons vu précédemment, la sélection d'une telle stratégie a sans doute été possible par une spécialisation plus forte d'*A. decemarticulatus* vers le champignon et la plante. Quant à la différence de nutrition, elle provient uniquement de la spécialisation d'*A. decemarticulatus* envers sa plante hôte où, comparativement à *A. octoarticulatus* ssp2, la production de sexués s'est adaptée à la croissance des espaces de nidifications, mobilisant plus d'azote pour sa propre reproduction. Protection et nutrition ne sont par pour autant des traits mutualistes indépendants, du moins chez *A. decemarticulatus*, où l'on peut penser que la capture efficace de proies « alimente » la production de sexués par un apport important d'azote.

Donc finalement ce n'est pas seulement la spécialisation d'*A. decemarticulatus* envers sa plante hôte qui génère cette baisse de bénéfice mais bien l'ensemble spécialisé plante-fourmis-champignon. Si l'on compare toujours ce système à celui impliquant *A. octoarticulatus* ssp2, cette « exploitation » de la plante se fait par défection plutôt que par surexploitation. Ainsi même si la plante s'est adaptée à cette exploitation par plusieurs réponses évolutives, l'asymétrie entre

le turnover générationnel et le taux d'évolution entre le couple fourmis-champignon et la plante semble être le moteur évolutif d'une telle exploitation (Orivel et al. 2011).

Extension de l'étude aux réseaux mutualistes à trois modalités

Ce travail ouvre différentes perspectives permettant de mieux intégrer l'influence de partenaires additionnels dans les processus écologiques et évolutifs caractérisant les mutualismes. Nous avons ainsi abordé dans les différents chapitres les études complémentaires nécessaires pour valider les hypothèses émises dans le cadre de notre système d'étude et elles ne seront donc pas revues dans cette partie. Cette thèse pose les premières bases dans l'étude des mutualismes multipartites pour comprendre leur modulation dans un niveau d'intégration supérieur, au sein d'une communauté de fourmis – champignon et plantes myrmécophytes.

La modélisation des communautés de mutualistes sous forme de réseaux est une approche fondamentale dans la compréhension des mécanismes évolutifs et coévolutifs générant la structure des mutualismes multipartites. Néanmoins, ces études se sont toujours intéressées qu'à des réseaux bimodaux, c'est à dire entre deux groupes d'espèces (ex : d'un côté les plantes à fleurs et de l'autre les pollinisateurs). Notre modèle d'étude fourmis à plantes – myrmécophytes – Chaetothyriales et nos résultats suggèrent cependant que l'étude de ces réseaux à l'échelle communautaire devrait se concentrer vers l'intégration d'une troisième modalité. Bien sur, notre étude et l'étude des réseaux mutualistes ne se situent pas sur la même échelle d'intégration, mais la mise en place d'un nouveau type de modélisation nécessite de tout d'abord de comprendre les processus sous-jacent au niveau des interactions entre espèces. Dans le même sens, Fontaine et al. (2011) incitent la communauté scientifique à joindre les réseaux mutualistes et antagonistes qui ne sont finalement que des sous-représentation des interactions d'une même communauté. Dans cette optique, ils énoncent trois futures directions de recherches à aborder pour approfondir notre compréhension des processus écologiques et évolutifs structurant une communauté. De manière intéressante, ces directions s'appliquent également à la compréhension des réseaux mutualistes à trois modalités. Cette compréhension passe par la caractérisation des liens entre la troisième

modalité les deux autres précédemment étudiées, l'étude des processus écologiques pour comprendre les patterns observés et l'étude des processus évolutifs pour comprendre comment cette troisième modalité va affecter la fitness des deux autres.

Les mesures communes dans l'étude des réseaux incluent le nombre d'espèces présentes (les nœuds) et le nombre de liens entre ces espèces. Une des caractéristiques des réseaux mutualistes symbiotiques, comme par exemple les interactions entre myrmécophytes et fourmis arboricoles, est d'être compartimentée. C'est à dire que certains groupes de symbiontes vont tendre à interagir avec un groupe particulier d'hôtes. Ainsi, au niveau de la communauté, les réseaux symbiotiques sont généralement caractérisés par plusieurs groupes d'espèces totalement isolés montrant des patterns d'interactions symétriques, c'est à dire que les espèces spécialistes d'un type de nœud interagissent avec des espèces spécialistes de l'autre nœud, et les espèces généralistes interagissent entre elles (Fonseca and Ganade 1996). L'existence de ces sous-réseaux isolés a des conséquences profondes quant aux processus coévolutifs façonnant les réseaux symbiotiques. En effet, sachant qu'il n'y a pas de lien entre les différents groupes, un changement évolutif dans une espèce d'un groupe a de très faibles chances de se propager dans une espèce d'un autre groupe, ce qui contraint de grandes cascades coévolutives au sein du réseau (Guimaraes et al. 2007). Cela implique également que chaque sous-réseau devrait montrer des dynamiques coévolutives distinctes et indépendantes. Fonseca et Ganade (1996) insistent sur ces propriétés particulières en proposant que l'étude des processus coévolutifs dans les réseaux entre plantes et fourmis puisse se faire au niveau d'un compartiment et non pas nécessairement au niveau de la communauté entière. De plus les simulations de Guimaraes et al. (2007) suggèrent que cette structure facilite les réponses évolutives d'espèces aux changements de partenaire mutualiste au sein d'un même sous groupe, facilitant les changements évolutifs réciproques. Une hypothèse émise est que la coévolution dans les mutualismes symbiotiques est caractérisée par de fréquents changements réciproques entre peu de partenaires.

Notre système d'étude ne compose qu'un compartiment des réseaux de la communauté et donc bien sur il est nécessaire d'étudier la présence de champignons (et dans ce cas leurs caractérisations) dans les autres modèles de plantes à fourmis. Nos résultats permettent néanmoins d'amorcer les futures recherches sur les processus écologiques et évolutifs

caractérisant ce réseaux. Cette thèse montre par exemple que deux compartiments bien distincts lorsqu'on que nous considérons seulement un réseau comme bimodal, se retrouvent connectés par la troisième modalité. En effet le compartiment *H. physophora* – *A. decemarticulatus* – *A. octoarticulatus* ssp2 est dans un contexte bimodal séparé du compartiment formé par *C. nodosa* et *A. octoarticulatus* ssp1. Or ces deux compartiments se retrouvent connectés par le partage des souches fongiques minoritaires et la souche H7_GC2. Il est prédit que chaque compartiment d'un réseau mutualiste symbiotique devrait montrer des dynamiques coévolutives distinctes et indépendantes (Guimaraes et al. 2007). La connexion de ces réseaux par la troisième modalité pourrait altérer ces prédictions, en connectant ces compartiments par cascades évolutives, ne les rendant plus indépendants. Néanmoins dans notre dans notre cas particulier, cette connexion semble être un artefact de la récente séparation des deux compartiments et la transmission verticale de la troisième modalité ne devrait pas modifier ses prédictions. Cependant, est ce que les associations champignon – fourmis des autres compartiments de la communauté sont issues d'un processus agricole, avec comme point central la transmission verticale ? Rien n'est moins sur, d'où l'intérêt d'étudier en profondeur les autres associations tripartites qui composent notre communauté. Nous avons vu qu'*Azteca brevis*, fourmis phylogénétiquement éloignée des *Allomerus*, avait un comportement assez similaire à ces dernières. Par extension, nous pouvons émettre l'hypothèse que cette convergence des traits est due au partage d'un champignon phylogénétiquement proche. Une autre hypothèse émise est que la coévolution dans les mutualismes symbiotiques est caractérisée par de fréquents changements réciproques entre peu de partenaires au sein d'un compartiment. La encore, nos résultats montre que l'ajout d'une troisième modalité change ces prédictions. Dans le cas du couple *H. physophora* et *A. decemarticulatus*, la prise en compte du troisième partenaire montre que le système se retrouve plus spécialisé que lorsqu'il est pris d'un point de vue bimodal. Il parait donc improbable que *A. decemarticulatus* puisse changer d'hôtes myrmécophytes ou de symbionte fongique. Ainsi la prise en compte d'une troisième modalité montre ici qu'un compartiment peut être composé de sous-compartiments indépendants si on prend on compte la trimodalité des réseaux mutualistes.

Notre compréhension des processus et des patterns caractérisant les communautés mutualistes a été grandement améliorée par l'étude de ces dernières sous forme de réseau. Ajouter une

troisième modalité dans un cadre théorique commun est le nouveau challenge qui s'offre à la communauté scientifique dans l'espoir d'une compréhension plus fine des processus écologiques et évolutifs structurant ces réseaux.

Références Bibliographiques

- Aanen, D. K., P. Eggleton, C. Rouland-Lefevre, T. Guldberg-Froslev, S. Rosendahl, and J. J. Boomsma. 2002. The evolution of fungus-growing termites and their mutualistic fungal symbionts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**:14887-14892.
- Ackerly, D. D., C. A. Knight, S. B. Weiss, K. Barton, and K. P. Starmer. 2002. Leaf size, specific leaf area and microhabitat distribution of chaparral woody plants: contrasting patterns in species level and community level analyses. *Oecologia* **130**:449-457.
- Agrawal, A. A. 1998. Leaf damage and associated cues induce aggressive ant recruitment in a neotropical ant-plant. *Ecology* **79**:2100-2112.
- Aker, C. L. 1982. Regulation of flower, fruit and seed production by a monocarpic perennial, *Yucca whipplei*. *Journal of Ecology* **70**:357-372.
- Anstett, M. C., M. Hossaert-McKey, and F. Kjellberg. 1997. Figs and fig pollinators: evolutionary conflicts in a coevolved mutualism. *Trends in Ecology & Evolution* **12**:94-99.
- Arauco, R., I. O. Jose, A. J. Edwards, and D. W. Yu. 2006. Chemical mediation between *Allomerus demerarae* wheeler, 1935 (Hymenoptera : Formicidae) and *Cordia nodosa* Lam. (Boraginaceae). *Revista Colombiana De Entomologia* **32**:85-92.
- Archetti, M. 2011. Contract theory for the evolution of cooperation: the right incentives attract the right partners. *Journal of Theoretical Biology* **269**:201-207.
- Archetti, M. and I. Scheuring. 2012. Review: game theory of public goods in one-shot social dilemmas without assortment. *Journal of Theoretical Biology* **299**:9-20.
- Archetti, M. and I. Scheuring. 2013. Trading public goods stabilizes interspecific mutualism. *Journal of Theoretical Biology* **318**:58-67.
- Archetti, M., I. Scheuring, M. Hoffman, M. E. Frederickson, N. E. Pierce, and D. W. Yu. 2011a. Economic game theory for mutualism and cooperation. *Ecology Letters* **14**:1300-1312.
- Archetti, M. and I. n. Scheuring. 2011. Coexistence of cooperation and defection in public goods games. *Evolution* **65**:1140-1148.
- Archetti, M., F. Ubeda, D. Fudenberg, J. Green, N. E. Pierce, and W. Y. Douglas. 2011b. Let the right one in: a microeconomic approach to partner choice in mutualisms. *The American Naturalist* **177**:75-85.
- Aron, S., L. Keller, and L. Passera. 2001. Role of resource availability on sex, caste and reproductive allocation ratios in the Argentine ant *Linepithema humile*. *Journal of Animal Ecology* **70**:831-839.
- Axelrod, R. and W. D. Hamilton. 1981. The evolution of cooperation. *Science* **211**:1390-1396.
- Bailey, I. W. 1920. Some Relations between Ants and Fungi. *Ecology* **1**:174-189.
- Bates, D. and M. Maechler. 2009. lme4: linear mixed-effects models using S4 classes. R package version 0.999375-26. <http://lme4.r-forge.r-project.org/>.
- Beattie, A. 1989. Myrmecotrophy - plant fed by ants. *Trends in Ecology & Evolution* **4**:172-176.
- Bergström, G., M. Appelgren, A. Borg-Karlson, I. Groth, S. Strömberg, and S. Strömberg. 1980. Studies on natural odoriferous compounds. XXII. Techniques for the isolation/enrichment of plant volatiles in the analyses of *Ophrys orchids* (Orchidaceae). *Chemical Scripta* **16**:173-180.
- Blackwell, M. 2000. Evolution - Terrestrial life - Fungal from the start? *Science* **289**:1884-1885.
- Blatrix, R., C. Djieto-Lordon, L. Mondolot, P. La Fisca, H. Voglmayr, and D. McKey. 2012. Plant-ants use symbiotic fungi as a food source: new insight into the nutritional ecology of

- ant-plant interactions. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **279**:3940-3947.
- Blattner, F. R., K. Weising, G. Bänfer, U. Maschwitz, and B. Fiala. 2001. Molecular analysis of phylogenetic relationships among myrmecophytic *Macaranga* species (Euphorbiaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **19**:331-344.
- Bono, J. and J. Herbers. 2003. Proximate and ultimate control of sex ratios in *Myrmica brevispinosa* colonies. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **270**:811-817.
- Bot, A. N. M., M. L. Obermayer, B. Holldobler, and J. J. Boomsma. 2001a. Functional morphology of the metapleural gland in the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus*. *Insectes Sociaux* **48**:63-66.
- Bot, A. N. M., S. A. Rehner, and J. J. Boomsma. 2001b. Partial incompatibility between ants and symbiotic fungi in two sympatric species of *Acromyrmex* leaf-cutting ants. *Evolution* **55**:1980-1991.
- Boucher, D. H., S. James, and K. H. Keeler. 1982. The ecology of mutualism. *Annual Review of Ecology and Systematics* **13**:315-347.
- Bright, M. and S. Bulgheresi. 2010. A complex journey: transmission of microbial symbionts. *Nature Reviews Microbiology* **8**:218-230.
- Bronstein, J. L. 1994. Our current understanding of mutualism. *Quarterly Review of Biology* **69**:31-51.
- Bronstein, J. L. 1998. The contribution of ant-plant protection studies to our understanding of mutualism. *Biotropica* **30**:150-161.
- Bronstein, J. L., R. Alarcon, and M. Geber. 2006. The evolution of plant-insect mutualisms. *New Phytologist* **172**:412-428.
- Bronstein, J. L., W. G. Wilson, and W. F. Morris. 2003. Ecological dynamics of mutualist/antagonist communities. *The American Naturalist* **162**:S24-S39.
- Brouat, C., N. Garcia, C. Andary, and D. McKey. 2001. Plant lock and ant key: pairwise coevolution of an exclusion filter in an ant-plant mutualism. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **268**:2131-2141.
- Brouat, C., D. McKey, J. M. Bessiere, L. Pascal, and M. Hossaert-McKey. 2000. Leaf volatile compounds and the distribution of ant patrolling in an ant-plant protection mutualism: Preliminary results on *Leonardoxa* (Fabaceae : Caesalpinioideae) and *Petalomyrmex* (Formicidae : Formicinae). *Acta Oecologica-International Journal of Ecology* **21**:349-357.
- Brundrett, M. 2004. Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biological Reviews* **79**:473-495.
- Brundrett, M. C. 2002. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist* **154**:275-304.
- Bull, J. J. and W. R. Rice. 1991. Distinguishing mechanisms for the evolution of cooperation. *Journal of Theoretical Biology* **149**:63-74.
- Cannon, P. F. and P. M. Kirk. 2007. *Fungal Families of the World*, Wallingford, UK.
- Carothers, J. H. and F. M. Jaksic. 1984. Time as a niche difference: the role of interference competition. *Oikos* **42**:403-406.
- Chamberlain, S. A. and J. N. Holland. 2009. Quantitative synthesis of context dependency in ant-plant protection mutualisms. *Ecology* **90**:2384-2392.

- Chapela, I. H., S. A. Rehner, T. R. Schultz, and U. G. Mueller. 1994. Evolutionary history of the symbiosis between fungus-growing ants and their fungi. *Science* **266**:1691-1694.
- Chapuis, E., V. Emelianoff, V. Paulmier, N. Le Brun, M. Sicard, and J. Ä. Ferdy. 2009. Manifold aspects of specificity in a nematode-bacterium mutualism. *Journal of Evolutionary Biology* **22**:2104-2117.
- Chomnunti, P., D. J. Bhat, E. B. G. Jones, E. Chukeatirote, A. H. Bahkali, and K. D. Hyde. 2012. Trichomeriaceae, a new sooty mould family of Chaetothyriales. *Fungal Diversity* **56**:63-76.
- Clark, M. A., N. A. Moran, P. Baumann, and J. J. Wernegreen. 2000. Cospeciation between bacterial endosymbionts (*Buchnera*) and a recent radiation of aphids (*Uroleucon*) and pitfalls of testing for phylogenetic congruence. *Evolution* **54**:517-525.
- Connor, R. C. 1995. The benefits of mutualism - a conceptual framework. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* **70**:427-457.
- Coşkun, M., P. Özalp, and İ. Emre. 2005. Effects of vitamin E concentrations on sex ratio of *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae) adults. *Annals of the Entomological Society of America* **98**:336-339.
- Crous, P. W., K. Schubert, U. Braun, G. S. de Hoog, A. D. Hocking, H. D. Shin, and J. Z. Groenewald. 2007. Opportunistic, human-pathogenic species in the Herpotrichiellaceae are phenotypically similar to saprobic or phytopathogenic species in the Venturiaceae. *Studies in Mycology* **58**:185-234.
- Cunningham, S. A., B. Summerhayes, and M. Westoby. 1999. Evolutionary divergences in leaf structure and chemistry, comparing rainfall and soil nutrient gradients. *Ecological Monographs* **69**:569-588.
- Currie, C. R., A. N. M. Bot, and J. J. Boomsma. 2003. Experimental evidence of a tripartite mutualism: bacteria protect ant fungus gardens from specialized parasites. *Oikos* **101**:91-102.
- Currie, C. R., J. A. Scott, R. C. Summerbell, and D. Malloch. 1999. Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. *Nature* **398**:701-704.
- Darwin, C. 1859. *The Origin of Species*. New York: Gramercy Books.
- Davidson, D. W. 2005. Ecological stoichiometry of ants in a New World rain forest. *Oecologia* **142**:221-231.
- Davidson, D. W., S. C. Cook, R. R. Snelling, and T. H. Chua. 2003. Explaining the abundance of ants in lowland tropical rainforest canopies. *Science* **300**:969-972.
- De Hoog, G., P. Zalar, C. Urzi, F. De Leo, N. Yurlova, and K. Sterflinger. 1999. Relationships of dothideaceous black yeasts and meristematic fungi based on 5.8 S and ITS2 rDNA sequence comparison. *Studies in Mycology*:31-37.
- de Vienne, D. 2013. Cospeciation vs host-shift speciation: methods for testing, evidence from natural associations and relation to coevolution. *New Phytologist*:1.
- Debout, G. D. G., R. Pereyra, B. C. Emerson, and D. W. Yu. 2006. Characterization of polymorphic microsatellites in the castration parasite plant-ant *Allomerus octoarticulatus* cf. *demerarae* (Formicidae : Myrmicinae). *Molecular Ecology Notes* **6**:182-184.
- Defosse, E., C. Djieto-Lordon, D. McKey, M. A. Selosse, and R. Blatrix. 2011. Plant-ants feed their host plant, but above all a fungal symbiont to recycle nitrogen. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **278**:1419-1426.
- Defosse, E., M. A. Selosse, M. P. Dubois, L. Mondolot, A. Faccio, C. Djieto-Lordon, D. McKey, and R. Blatrix. 2009. Ant-plants and fungi: a new threeway symbiosis. *New Phytologist* **182**:942-949.

- Dejean, A., J. M. Carpenter, B. Corbara, P. Wright, O. Roux, and L. M. LaPierre. 2012. The hunter becomes the hunted: when cleptobiotic insects are captured by their target ants. *Naturwissenschaften* **99**:265-273.
- Dejean, A., B. Corbara, J. Orivel, and M. Leponce. 2007. Rainforest canopy ants: the implications of territoriality and predatory behavior. *Functional ecosystems and communities* **1**:105-120.
- Dejean, A., J. Grangier, C. Leroy, and J. Orivel. 2009. Predation and aggressiveness in host plant protection: a generalization using ants from the genus *Azteca*. *Naturwissenschaften* **96**:57-63.
- Dejean, A., J. Orivel, V. Rossi, O. Roux, J. Lauth, P.-J. G. Malé, R. Céréghino, and C. Leroy. 2013. Predation success by a plant-ant indirectly favours the growth and fitness of its host myrmecophyte. *Plos One* **8**:e59405.
- Dejean, A., A. Quilichini, J. H. C. Delabie, J. Orivel, B. Corbara, and M. Gibernau. 2004. Influence of its associated ant species on the life history of the myrmecophyte *Cordia nodosa* in French Guiana. *Journal of Tropical Ecology* **20**:701-704.
- Dejean, A., P. J. Solano, J. Ayroles, B. Corbara, and J. Orivel. 2005. Arboreal ants build traps to capture prey. *Nature* **434**:973.
- Dejean, A., P. J. Solano, M. Belin-Depoux, P. Cerdan, and B. Corbara. 2001. Predatory behavior of patrolling *Allomerus decemarticulatus* workers (Formicidae; Myrmicinae) on their host plant. *Sociobiology* **37**:571-578.
- Deniro, M. J. and S. Epstein. 1978. Carbon isotopic evidence for different feeding patterns in two *Hyrax* species occupying same habitat. *Science* **201**:906-908.
- Deniro, M. J. and S. Epstein. 1981. Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* **45**:341-351.
- Douglas, A., E. 2010. *The symbiotic habit*. Princeton and Oxford: Princeton University Press. 214p.
- Douglas, A. E. 2008. Conflict, cheats and the persistence of symbioses. *New Phytologist* **177**:849-858.
- Doyle, J. and J. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues. *Phytochemistry Bulletin* **9**:11-15.
- Dyall, S. D., M. T. Brown, and P. J. Johnson. 2004. Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. *Science* **304**:253-257.
- Edwards, D. P., R. Arauco, M. Hassall, W. J. Sutherland, K. Chamberlain, L. J. Wadhams, and D. W. Yu. 2007. Protection in an ant-plant mutualism: an adaptation or a sensory trap? *Animal Behaviour* **74**:377-385.
- Edwards, D. P., M. Hassall, W. J. Sutherland, and D. W. Yu. 2006. Selection for protection in an ant-plant mutualism: host sanctions, host modularity and the principal-agent game. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **273**:595-602.
- Edwards, D. P. and D. W. Yu. 2008. Tolerating castration by hiding flowers in plain sight. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **63**:95-102.
- Evanno, G., S. Regnaut, and J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular ecology* **14**:2611-2620.
- Farrell, B. D., A. S. Sequeira, B. C. O'Meara, B. B. Normark, J. H. Chung, and B. H. Jordal. 2001. The evolution of agriculture in beetles (Curculionidae: Scolytinae and Platypodinae). *Evolution* **55**:2011-2027.

- Fauci, A., R. J. Toonen, and M. G. Hadfield. 2007. Host shift and speciation in a coral-feeding nudibranch. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **274**:111-119.
- Felton, G. W. and C. B. Summers. 1995. Antioxidant systems in insects. *Archives of insect biochemistry and physiology* **29**:187-197.
- Fernandez, F. 2007. The Myrmicine ant genus *Allomerus* Mayr (Hymenoptera:Formicidae). *Caldasia* **29**:159-167.
- Ferriere, R., J. L. Bronstein, S. Rinaldi, R. Law, and M. Gauduchon. 2002. Cheating and the evolutionary stability of mutualisms. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **269**:773-780.
- Fiala, B. and U. Maschwitz. 1992. Food bodies and their significance for obligate ant-association in the tree genus *Macaranga* (Euphorbiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **110**:61-75.
- Fischer, R. C., W. Wanek, A. Richter, and V. Mayer. 2003. Do ants feed plants? A N-15 labelling study of nitrogen fluxes from ants to plants in the mutualism of *Pheidole* and *Piper*. *Journal of Ecology* **91**:126-134.
- Fonseca, C. R. and G. Ganade. 1996. Asymmetries, compartments and null interactions in an Amazonian ant-plant community. *Journal of Animal Ecology* **65**:339-347.
- Fonseca, C. R., J. M. Overton, B. Collins, and M. Westoby. 2000. Shifts in trait-combinations along rainfall and phosphorus gradients. *Journal of Ecology* **88**:964-977.
- Fontaine, C., P. R. Guimaraes, S. Kefi, N. Loeuille, J. Memmott, W. H. van der Putten, F. J. F. van Veen, and E. Thebault. 2011. The ecological and evolutionary implications of merging different types of networks. *Ecology Letters* **14**:1170-1181.
- Foster, K. R. and T. Wenseleers. 2006. A general model for the evolution of mutualisms. *Journal of Evolutionary Biology* **19**:1283-1293.
- Fournier, D., J. Foucaud, A. Loiseau, S. Cros-Arteil, H. Jourdan, J. Orivel, J. Le Breton, J. Chazeau, A. Dejean, L. Keller, and A. Estoup. 2005. Characterization and PCR multiplexing of polymorphic microsatellite loci for the invasive ant *Wasmannia auropunctata*. *Molecular Ecology Notes* **5**:239-242.
- Frederickson, M. E. 2005. Ant species confer different partner benefits on two neotropical myrmecophytes. *Oecologia* **143**:387-395.
- Frederickson, M. E. 2006. The reproductive phenology of an Amazonian ant species reflects the seasonal availability of its nest sites. *Oecologia* **149**:418-427.
- Frederickson, M. E. 2009. Conflict over reproduction in an ant-plant symbiosis: why *Allomerus octoarticulatus* ants sterilize *Cordia nodosa* trees. *American Naturalist* **173**:675-681.
- Frederickson, M. E. and D. M. Gordon. 2009. The intertwined population biology of two Amazonian myrmecophytes and their symbiotic ants. *Ecology* **90**:1595-1607.
- Futuyma, D. J. 2010. Evolutionary constraint and ecological consequences. *Evolution* **64**:1865-1884.
- Gardes, M. and T. D. Bruns. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular ecology* **2**:113-118.
- Gaume, L., D. McKey, and S. Terrin. 1998. Ant-plant-homopteran mutualism: how the third partner affects the interaction between a plant-specialist ant and its myrmecophyte host. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **265**:569-575.
- Giraud, T., G. Refregier, M. Le Gac, D. M. de Vienne, and M. E. Hood. 2008. Speciation in fungi. *Fungal Genetics and Biology* **45**:791-802.

- Gómez-Acevedo, S., L. Rico-Arce, A. Delgado-Salinas, S. Magallón, and L. E. Eguiarte. 2010. Neotropical mutualism between *Acacia* and *Pseudomyrmex*: phylogeny and divergence times. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **56**:393-408.
- Grangier, J., A. Dejean, P. J. G. Male, and J. Orivel. 2008. Indirect defense in a highly specific ant-plant mutualism. *Naturwissenschaften* **95**:909-916.
- Grangier, J., A. Dejean, P. J. G. Male, P. J. Solano, and J. Orival. 2009. Mechanisms driving the specificity of a myrmecophyte-ant association. *Biological Journal of the Linnean Society* **97**:90-97.
- Grimaldi, D. 1999. The co-radiations of pollinating insects and angiosperms in the Cretaceous. *Annals of the Missouri Botanical Garden*:373-406.
- Gueidan, C., C. Villase, G. De Hoog, A. Gorbushina, W. Untereiner, and F. Lutzoni. 2008. A rock-inhabiting ancestor for mutualistic and pathogen-rich fungal lineages. *Studies in Mycology* **61**:111-119.
- Guimaraes, P. R., P. Jordano, and J. N. Thompson. 2011. Evolution and coevolution in mutualistic networks. *Ecology Letters* **14**:877-885.
- Guimaraes, P. R., V. Rico-Gray, P. S. Oliveira, T. J. Izzo, S. F. dos Reis, and J. N. Thompson. 2007. Interaction intimacy affects structure and coevolutionary dynamics in mutualistic networks. *Current Biology* **17**:1797-1803.
- Gullan, P. 1997. Relationships with ants. Pages 351-373 in H. C. Ben-Dov Y, editor. *Soft scale insects - Their biology, natural enemies and control*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Pages 95-98 in *Nucleic acids symposium series*.
- Heil, M. and D. McKey. 2003. Protective ant-plant interactions as model systems in ecological and evolutionary research. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* **34**:425-453.
- Heil, M., J. Rattke, and W. Boland. 2005. Postsecretory hydrolysis of nectar sucrose and specialization in ant/plant mutualism. *Science* **308**:560-563.
- Herre, E. A., N. Knowlton, U. G. Mueller, and S. A. Rehner. 1999. The evolution of mutualisms: exploring the paths between conflict and cooperation. *Trends in Ecology & Evolution* **14**:49-53.
- Herrera, C. M. 1991. Dissecting factors responsible for individual variation in plant fecundity. *Ecology* **72**:1436-1448.
- Hoegh-Guldberg, O., P. Mumby, A. Hooten, R. Steneck, P. Greenfield, E. Gomez, C. Harvell, P. Sale, A. Edwards, and K. Caldeira. 2007. Coral reefs under rapid climate change and ocean acidification. *Science* **318**:1737-1742.
- Hoeksema, J. D. and E. M. Bruna. 2000. Pursuing the big questions about interspecific mutualism: a review of theoretical approaches. *Oecologia* **125**:321-330.
- Holland, J. N., J. H. Ness, A. Boyle, and J. L. Bronstein. 2005. Mutualisms as consumer - resource interactions. *Ecology of predator-prey interactions*:17-33.
- Hölldobler, B. and E. O. Wilson. 1990. *The ants* (Springer, Berlin).
- Holleley, C. E. and P. Geerts. 2009. Multiplex Manager 1.0: a cross-platform computer program that plans and optimizes multiplex PCR. *Biotechniques* **46**:511-517.
- Holm, S. 1979. A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scandinavian Journal of Statistics* **6**:65-70.

- House, H. 1966. Effects of vitamins E and A on growth and development, and the necessity of vitamin E for reproduction in the parasitoid *Agria affinis* (Fallén) (Diptera, Sarcophagidae). *Journal of Insect Physiology* **12**:409-417.
- Hughes, S. J. 1976. Sooty moulds. *Mycologia* **68**:693-820.
- Itino, T., S. J. Davies, H. Tada, Y. Hieda, M. Inoguchi, T. Itioka, S. Yamane, and T. Inoue. 2002. Cospeciation of ants and plants. *Ecological Research* **16**:787-793.
- Izzo, T. J. and H. L. Vasconcelos. 2002. Cheating the cheater: domatia loss minimizes the effects of ant castration in an Amazonian ant-plant. *Oecologia* **133**:200-205.
- Janzen, D. H. 1966. Coevolution of mutualism between ants and acacias in Central America. *Evolution*:249-275.
- Janzen, D. H. 1967. Interaction of the bull's-horn acacia (*Acacia cornigera* L.) with an ant inhabitant (*Pseudomyrmex ferruginea* F. Smith) in eastern Mexico. *Univ. Kansas Sci. Bull* **47**:315-558.
- Janzen, D. H. 1980. When is it coevolution? *Evolution* **34**:611-612.
- Janzen, D. H. 1983. *Costa Rican natural history*. Univ. of Chicago Press. , Chicago.
- Johnson, N., C. J. Graham, A. and F. Smith, A. 1997. Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytologist* **135**:575-585.
- Jolivet, P. 1996. *Ants and plants - an example of coevolution*. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands.
- Kaltenpoth, M. 2009. Actinobacteria as mutualists: general healthcare for insects? *Trends in Microbiology* **17**:529-535.
- Katoh, K., K. Misawa, K. A. Kuma, and T. Miyata. 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic acids research* **30**:3059-3066.
- Kautz, S., H. T. Lumbsch, P. S. Ward, and M. Heil. 2009. How to prevent cheating: a digestive specialization ties mutualistic plant-ant to their ant-plant partners. *Evolution* **63**:839-853.
- Kiers, E. T., R. A. Rousseau, S. A. West, and R. F. Denison. 2003. Host sanctions and the legume-rhizobium mutualism. *Nature* **425**:78-81.
- Lagrange, H., C. Jay-Allmand, and F. Lapeyrie. 2001. Rutin, the phenolglycoside from *Eucalyptus* root exudates, stimulates *Pisolithus hyphal* growth at picomolar concentrations. *New Phytologist* **149**:349-355.
- Lauth, J., P. Malé, C. Leroy, O. Roux, A. Dejean, and J. Orivel. in preparation. An alternative predation strategy alters contract theory feedbacks in an ant-plant mutualism.
- Lauth, J., P. J. G. Malé, H. Voglmayr, V. Mayer, A. Dejean, and J. Orivel. 2013. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the ant-associated fungus *Trimmatostroma* sp. (Ascomycota: Chaetothyriales) using pyrosequencing technology. *Molecular Ecology Resources* DOI: 10.1111/1755-0998.12095.
- Lauth, J., M. X. Ruiz-González, and J. Orivel. 2011. New findings in insect fungiculture: have ants developed non-food, agricultural products? *Communicative and integrative biology* **4**:728-730.
- Leimar, O. and R. C. Connor. 2003. By-product benefits, reciprocity, and pseudoreciprocity in mutualism. Pages 203-222 in P. Hammerstein, editor. *Genetic and Cultural Evolution of Cooperation*. The MIT Press, Cambridge.
- Leimar, O. and P. Hammerstein. 2010. Cooperation for direct fitness benefits. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* **365**:2619-2626.

- Leroy, C., A. Jauneau, A. Quilichini, A. Dejean, and J. Orivel. 2008. Comparison between the anatomical and morphological structure of leaf blades and foliar domatia in the ant-plant *Hirtella physophora* (Chrysobalanaceae). *Annals of Botany* **101**:501-507.
- Leroy, C., A. Jauneau, A. Quilichini, A. Dejean, and J. Orivel. 2010. Comparative structure and ontogeny of the foliar domatia in three neotropical myrmecophytes. *American Journal of Botany* **97**:557-565.
- Leroy, C., N. Séjalon-Delmas, A. Jauneau, M. X. Ruiz-Gonzalez, H. Gryta, P. Jargeat, B. Corbara, A. Dejean, and J. Orivel. 2011. Trophic mediation by a fungus in an ant-plant mutualism. *Journal of Ecology* **99**:583-590.
- Librado, P. and J. Rozas. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* **25**:1451-1452.
- Little, A. E. F., T. Murakami, U. G. Mueller, and C. R. Currie. 2006. Defending against parasites: fungus-growing ants combine specialized behaviours and microbial symbionts to protect their fungus gardens. *Biology Letters* **2**:12-16.
- Longino, J. T. 1996. Taxonomic characterization of some live-stem inhabiting *Azteca* (Hymenoptera: Formicidae) in Costa Rica, with special reference to the ants of *Cordia* (Boraginaceae) and *Triplaris* (Polygonaceae). *Journal of hymopteran research* **5**:131-156.
- Longino, J. T. 2007. A taxonomic review of the genus *Azteca* (Hymenoptera : Formicidae) in Costa Rica and a global revision of the aurita group. *Zootaxa*:1-63.
- Longino, J. T. 2008. The ants of Costa Rica. <http://academic.evergreen.edu/projects/ants/AntsofCostaRica.html>.
- Mack, K. M. and J. A. Rudgers. 2008. Balancing multiple mutualists: asymmetric interactions among plants, arbuscular mycorrhizal fungi, and fungal endophytes. *Oikos* **117**:310-320.
- Malausa, T., A. Gilles, E. Meglecz, H. Blanquart, S. Duthoy, C. Costedoat, V. Dubut, N. Pech, P. Castagnone-Sereno, C. Delye, N. Feau, P. Frey, P. Gauthier, T. Guillemaud, L. Hazard, V. Le Corre, B. Lung-Escarmant, P. J. G. Malé, S. Ferreira, and J. F. Martin. 2011. High-throughput microsatellite isolation through 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing of enriched DNA libraries. *Molecular Ecology Resources* **11**:638-644.
- Malé, P., J. Ferdy, C. Leroy, O. Roux, J. Lauth, A. Avilez, A. Dejean, A. Quilichini, and J. Orivel. submitted. Sanctions in response to castration promote a low level of virulence in an ant-plant mutualism.
- Malé, P. J. G. 2011. Stabilité évolutive des mutualismes et mécanismes de contrôle : le cas d'une relation plante-fourmis. PhD thesis, Toulouse, France.
- Malé, P. J. G., C. Leroy, A. Dejean, A. Quilichini, and J. Orivel. 2012. An ant symbiont directly and indirectly limits its host plant's reproductive success. *Evolutionary Ecology* **26**:55-63.
- Malé, P. J. G., A. Loiseau, A. Estoup, A. Quilichini, and J. Orivel. 2010. Characterization of polymorphic microsatellite loci in the neotropical plant-ant *Allomerus decemarticulatus* (Formicidae: Myrmicinae) and multiplexing with other microsatellites from the ant subfamily Myrmicinae. *European Journal of Entomology* **107**:673-675.
- Margulis, L. and R. Fester. 1991. Symbiosis as a source of evolutionary innovation: speciation and morphogenesis. MIT Press.
- Mayer, V. E. and H. Voglmayr. 2009. Mycelial carton galleries of *Azteca brevis* (Formicidae) as a multi-species network. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **276**:3265-3273.

- McFarlane, J. 1972. Vitamin E, tocopherol quinone and selenium in the diet of the house cricket, *Acheta domesticus* (L.). *Israel Journal of Entomology* **7**:7-14.
- Megléc , E., C. Costedoat, V. Dubut, A. Gilles, T. Malausa, N. Pech, and J.-F. Martin. 2010. QDD: a user-friendly program to select microsatellite markers and design primers from large sequencing projects. *Bioinformatics* **26**:403-404.
- Meikle, J. and J. McFarlane. 1965. The role of lipid in the nutrition of the house cricket, *Acheta domesticus* L.(Orthoptera: Gryllidae). *Canadian Journal of Zoology* **43**:87-98.
- Mendonca, A. D., C. E. da Silva, F. L. T. de Mesquita, R. D. Campos, R. R. Do Nascimento, E. Ximenes, and A. E. G. Sant'Ana. 2009. Antimicrobial activities of components of the glandular secretions of leaf cutting ants of the genus *Atta*. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* **95**:295-303.
- Mikheyev, A. S., U. G. Mueller, and P. Abbot. 2006. Cryptic sex and many-to-one coevolution in the fungus-growing ant symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**:10702-10706.
- Mikheyev, A. S., U. G. Mueller, and P. Abbot. 2010. Comparative dating of Attine ant and lepiotaceous cultivar phylogenies reveals coevolutionary synchrony and discord. *American Naturalist* **175**:E126-E133.
- Mikheyev, A. S., U. G. Mueller, and J. J. Boomsma. 2007. Population genetic signatures of diffuse co-evolution between leaf-cutting ants and their cultivar fungi. *Molecular ecology* **16**:209-216.
- Miller, M. A., W. Pfeiffer, and T. Schwartz. 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. Pages 1-8 in *Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, New Orleans, LA.
- Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium and G. R. Almány and M. P. De Arruda and W. Arthofer and Z. K. Atallah and S. R. Beissinger and M. L. Berumen and S. M. Bogdanowicz and S. D. Brown and M. W. Bruford and C. Burdine and J. W. Busch and N. R. Campbell and D. Carey and B. C. Carstens and K. H. Chu and M. A. Cubeta and J. P. Cuda and Z. X. Cui and L. E. Datnoff and J. A. Davila and E. S. Davis and R. M. Davis and O. E. Diekmann and E. Eizirik and J. A. Fargallo and F. Fernandes and H. Fukuda and L. R. Gale and E. Gallagher and Y. Q. Gao and P. Girard and A. Godhe and E. C. Goncalves and L. Gouveia and A. M. Grajczyk and M. J. Grose and Z. F. Gu and C. Hallden and K. Harnstrom and A. H. Hemmingsen and G. Holmes and C. H. Huang and C. C. Huang and S. P. Hudman and G. P. Jones and L. Kanetis and I. Karunasagar and I. Karunasagar and N. Keyghobadi and S. J. Klosterman and P. E. Klug and J. Koch and M. M. Koopman and K. Koppler and E. Koshimizu and S. Krumbock and T. Kubisiak and J. B. Landis and M. L. Lasta and C. Y. Lee and Q. Q. Li and S. H. Li and R. C. Lin and M. Liu and N. Liu and W. C. Liu and Y. Liu and A. Loiseau and W. S. Luan and K. K. Maruthachalam and H. M. McCormick and R. Mellick and P. J. Monahan and E. Morielle-Versute and T. E. Murray and S. R. Narum and K. Neufeld and P. J. G. de Nova and P. S. Ojiambo and N. Okamoto and A. S. Othman and W. A. Overholt and R. Pardini and I. G. Paterson and O. A. Patty and R. J. Paxton and S. Planes and C. Porter and M. S. Pratchett and T. Puttker and G. Rasic and B. Rasool and O. Rey and M. Riegler and C. Riehl and J. M. K. Roberts and P. D. Roberts and E. Rochel and K. J. Roe and M. Rossetto and D. E. Ruzzante and T. Sakamoto and V. Saravanan and C. R. Sarturi and A. Schmidt and M. P. C. Schneider and H. Schuler and J. M. Serb and E. T. A. Serrao and Y. H. Shi and A. Silva and Y. W. Sin and S. Sommer and C. Stauffer and C. A. Strussmann and

- K. V. Subbarao and C. Syms and F. Tan and E. D. Tejedor and S. R. Thorrold and R. N. Trigiano and M. I. Trucco and M. T. N. Tsuchiya-Jerep and P. Vergara and M. S. van de Vliet and P. A. Wadl and A. M. Wang and H. X. Wang and R. X. Wang and X. W. Wang and Y. Wang and A. R. Weeks and F. W. Wei and W. J. Werner and E. O. Wiley and D. A. Williams and R. J. Wilkins and S. M. Wisely and K. A. With and D. H. Wu and C. T. Yao and C. Yau and B. K. Yeap and B. P. Zhai and X. J. Zhan and G. Y. Zhang and S. Y. Zhang and R. Zhao and L. F. Zhu. 2009. Permanent Genetic Resources added to Molecular Ecology Resources Database 1 May 2009–31 July 2009. *Molecular Ecology Resources* **9**:1460-1466.
- Moran, N. A., J. P. McCutcheon, and A. Nakabachi. 2008. Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. *Annual review of genetics* **42**:165-190.
- Mueller, U. G., N. M. Gerardo, D. K. Aanen, D. L. Six, and T. R. Schultz. 2005. The evolution of agriculture in insects. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* **36**:563-595.
- Mueller, U. G., T. R. Schultz, C. R. Currie, R. M. M. Adams, and D. Malloch. 2001. The origin of the attine ant-fungus mutualism. *Quarterly Review of Biology* **76**:169-197.
- Mueller, U. G., J. J. Scott, H. D. Ishak, M. Cooper, and A. Rodrigues. 2010. Monoculture of leafcutter ant gardens. *Plos One* **5**.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* **89**:583-590.
- Ness, J. H. 2006. A mutualism's indirect costs: the most aggressive plant bodyguards also deter pollinators. *Oikos* **113**:506-514.
- Niinemets, U., A. Portsmouth, and L. Truus. 2002. Leaf structural and photosynthetic characteristics, and biomass allocation to foliage in relation to foliar nitrogen content and tree size in three *Betula* species. *Annals of Botany* **89**:191-204.
- O'Keefe, K. J. and J. Antonovics. 2002. Playing by different rules: the evolution of virulence in sterilizing pathogens. *American Naturalist* **159**:597-605.
- Orivel, J., L. Lambs, P. J. G. Malé, C. Leroy, J. Grangier, T. Otto, A. Quilichini, and A. Dejean. 2011. Dynamics of the association between a long-lived understory myrmecophyte and its specific associated ants. *Oecologia* **165**:369-376.
- Palmer, T. M., D. F. Doak, M. L. Stanton, J. L. Bronstein, E. T. Kiers, T. P. Young, J. R. Goheen, and R. M. Pringle. 2010. Synergy of multiple partners, including freeloaders, increases host fitness in a multispecies mutualism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**:17234-17239.
- Peakall, R. and P. E. Smouse. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* **6**:288-295.
- Pellmyr, O., J. N. Thompson, J. M. Brown, and R. G. Harrison. 1996. Evolution of pollination and mutualism in the yucca moth lineage. *American Naturalist*:827-847.
- Poisot, T., J. D. Bever, A. Nemri, P. H. Thrall, and M. E. Hochberg. 2011. A conceptual framework for the evolution of ecological specialisation. *Ecology Letters* **14**:841-851.
- Poorter, L. and F. Bongers. 2006. Leaf traits are good predictors of plant performance across 53 rain forest species. *Ecology* **87**:1733-1743.
- Posada, D. and K. A. Crandall. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* **14**:817-818.
- Poulsen, M. and C. R. Currie. 2009. On ants, plants and fungi. *New Phytologist* **182**:785-788.
- Pritchard, J. K., M. Stephens, and P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**:945-959.

- R Development Core Team. 2009. R: a language and environment for statistical computing. <http://r-project.org/>.
- Raine, N. E., P. Willmer, and G. N. Stone. 2002. Spatial structuring and floral avoidance behavior prevent ant-pollinator conflict in a Mexican ant-acacia. *Ecology* **83**:3086-3096.
- Rao, P. and D. Niederpruem. 1969. Carbohydrate metabolism during morphogenesis of *Coprinus lagopus* (sensu Buller). *Journal of Bacteriology* **100**:1222-1228.
- Raymond , M. and F. Rousset. 1995. GENEPOP (Version 1.2): population genetics software for exact test and ecumencism. *Journal of Heredity* **86**:248-249.
- Rhoades, D. F. 1979. Evolution of plant chemical defense against herbivores. *Herbivores: their interaction with secondary plant metabolites*. Academic Press, New York:3-54.
- Rico-Gray, V. and P. S. Oliveira. 2007. *The ecology and evolution of ant-plant interactions*. Chicago, IL: The University of Chicago Press:331p.
- Roe, A. D., P. M. A. James, A. V. Rice, J. E. K. Cooke, and F. A. H. Sperling. 2011. Spatial Community Structure of Mountain Pine Beetle Fungal Symbionts Across a Latitudinal Gradient. *Microbial Ecology* **62**:347-360.
- Rohfritsch, O. 2008. Plants, galls midges, and fungi: a three-component system. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* **129**:116.
- Romero, G. Q. and T. J. Izzo. 2004. Leaf damage induces ant recruitment in the Amazonian ant-plant *Hirtella myrmecophila*. *Journal of Tropical Ecology* **20**:675-682.
- Ronquist, F. and J. P. Huelsenbeck. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**:1572-1574.
- Ruiz-González, M. X., J. Lauth, C. Leroy, A. Jauneau, H. Gryta, P. Jargeat, A. Dejean, and J. Orivel. 2013. An efficient protocol for isolating melanised chaetothyrlean anamorphic fungi associated with plant-ants. *Journal of Basic Microbiology* **53**:98-100.
- Ruiz-González, M. X., P. J. G. Malé, C. Leroy, A. Dejean, H. Gryta, P. Jargeat, A. Quilichini, and J. Orivel. 2011. Specific, non-nutritional association between an ascomycete fungus and *Allomerus* plant-ants. *Biology Letters* **7**:475-479.
- Sachs, J. L., U. G. Mueller, T. P. Wilcox, and J. J. Bull. 2004. The evolution of cooperation. *Quarterly Review of Biology* **79**:135-160.
- Sachs, J. L. and E. L. Simms. 2006. Pathways to mutualism breakdown. *Trends in Ecology & Evolution* **21**:585-592.
- Sagers, C., S. Ginger, and R. Evans. 2000. Carbon and nitrogen isotopes trace nutrient exchange in an ant-plant mutualism. *Oecologia* **123**:582-586.
- Saikkonen, K., S. H. Faeth, M. Helander, and T. J. Sullivan. 1998. Fungal endophytes: A continuum of interactions with host plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **29**:319-343.
- Saikkonen, K., P. Wäli, M. Helander, and S. H. Faeth. 2004. Evolution of endophyte-plant symbioses. *Trends in plant science* **9**:275-280.
- Scheuring, I. and D. W. Yu. 2012. How to assemble a beneficial microbiome in three easy steps. *Ecology Letters* **15**:1300-1307.
- Schlick-Steiner, B. C., F. M. Steiner, H. Konrad, B. Seifert, E. Christian, K. Moder, C. Stauffer, and R. H. Crozier. 2008. Specificity and transmission mosaic of ant nest-wall fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**:940-943.

- Schmidt, M. R. 2001. Interactions between *Tetrathylacium macrophyllum* (Flacourtiaceae) and its live-stem inhabiting ants. MSc thesis. University of Vienna, Austria.
- Schultz, T. R. and S. G. Brady. 2008. Major evolutionary transitions in ant agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**:5435-5440.
- Seipke, R. F., J. Barke, M. X. Ruiz-González, J. Orivel, D. W. Yu, and M. I. Hutchings. 2012. Fungus-growing *Allomerus* ants are associated with antibiotic-producing actinobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek Journal of Microbiology* **101**:443-447.
- Smith, S., V. Gianinazzi-Pearson, R. Koide, and J. W. Cairney. 1994. Nutrient transport in mycorrhizas: structure, physiology and consequences for efficiency of the symbiosis. *Plant and Soil* **159**:103-113.
- Solano, P. J., M. Belin-Depoux, and A. Dejean. 2005. Formation and structure of food bodies in *Cordia nodosa* (Boraginaceae). *Comptes Rendus Biologies* **328**:642-647.
- Solano, P. J., S. Durou, B. Corbara, A. Quilichini, P. Cerdan, M. Belin-Depoux, J. H. C. Delabie, and A. Dejean. 2003. Myrmecophytes of the understory of French Guianian rainforests: their distribution and their associated ants. *Sociobiology* **41**:605-614.
- Stamatakis, A. 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* **22**:2688-2690.
- Stamatakis, A., P. Hoover, and J. Rougemont. 2008. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML Web servers. *Systematic biology* **57**:758-771.
- Stanton, M. L. 2003. Interacting guilds: moving beyond the pairwise perspective on mutualisms. *American Naturalist* **162**:S10-S23.
- Strauss, S. Y. and R. E. Irwin. 2004. Ecological and evolutionary consequences of multispecies plant-animal interactions. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* **35**:435-466.
- Strauss, S. Y., H. Sahli, and J. K. Conner. 2005. Toward a more trait-centered approach to diffuse (co)evolution. *New Phytologist* **165**:81-89.
- Szilagy, A., I. Scheuring, D. P. Edwards, J. Orivel, and D. W. Yu. 2009. The evolution of intermediate castration virulence and ant coexistence in a spatially structured environment. *Ecology Letters* **12**:1306-1316.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, and S. Kumar. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution* **28**:2731-2739.
- Ted, R. S. and G. B. Seán. 2008. Major evolutionary transitions in ant agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**:5435-5440.
- Tennant, L. E. 1989. A new ant-plant, *Tetrathylacium costaricense*. *Symp Ants Plants Oxford*.
- Thompson, J. N. 2005. *The geographic mosaic of coevolution*. Chicago, IL: The University of Chicago Press.
- Thompson, J. N. 2009. The coevolving web of life. *American Naturalist* **173**:125-140.
- Thornham, D. G., J. M. Smith, T. U. Grafe, and W. Federle. 2012. Setting the trap: cleaning behaviour of *Camponotus schmitzi* ants increases long-term capture efficiency of their pitcher plant host, *Nepenthes bicalcarata*. *Functional Ecology* **26**:11-19.
- Treseder, K. K., D. W. Davidson, and J. R. Ehleringer. 1995. Absorption of ant-provided carbon-dioxide and nitrogen by a tropical epiphyte. *Nature* **375**:137-139.
- Trivers, R. L. 1971. Evolution of reciprocal altruism. *Quarterly Review of Biology* **46**:35-57.

- van der Werff, H. 2008. A synopsis of the genus *Tachigali* (Leguminosae: Caesalpinioideae) in northern south America I. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **95**:618-661.
- Vasconcelos, H. L. and D. W. Davidson. 2000. Relationship between plant size and ant associates in two Amazonian ant-plants. *Biotropica* **32**:100-111.
- Vazquez, D. P., N. Bluthgen, L. Cagnolo, and N. P. Chacoff. 2009. Uniting pattern and process in plant-animal mutualistic networks: a review. *Annals of Botany* **103**:1445-1457.
- Voglmayr, H., V. Mayer, U. Maschwitz, J. Moog, C. Djiéto-Lordon, and R. Blatrix. 2011. The diversity of ant-associated black yeasts: insights into a newly discovered world of symbiotic interactions. *Fungal Biology* **115**:1077-1091.
- Ward, P. S. 1991. Phylogenetic analysis of pseudomyrmecine ants associated with domatia-bearing plants. *Ant-plant interactions*:335-352.
- Watkins, J. E., C. L. Cardelus, and M. C. Mack. 2008. Ants mediate nitrogen relations of an epiphytic fern. *New Phytologist* **180**:5-8.
- West, S. A., E. T. Kiers, E. L. Simms, and R. F. Denison. 2002. Sanctions and mutualism stability: why do rhizobia fix nitrogen? *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **269**:685-694.
- Weyl, E. G., M. E. Frederickson, D. W. Yu, and N. E. Pierce. 2010. Economic contract theory tests models of mutualism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**:15712-15716.
- Wilkinson, D. M. and T. N. Sherratt. 2001. Horizontally acquired mutualisms, an unsolved problem in ecology? *Oikos* **92**:377-384.
- Willmer, P. G., C. V. Nuttman, N. E. Raine, G. N. Stone, J. G. Pattrick, K. Henson, P. Stillman, L. McIlroy, S. G. Potts, and J. T. Knudsen. 2009. Floral volatiles controlling ant behaviour. *Functional Ecology* **23**:888-900.
- Wright, I. J., P. B. Reich, M. Westoby, D. D. Ackerly, Z. Baruch, F. Bongers, J. Cavender-Bares, T. Chapin, J. H. C. Cornelissen, M. Diemer, J. Flexas, E. Garnier, P. K. Groom, J. Gulias, K. Hikosaka, B. B. Lamont, T. Lee, W. Lee, C. Lusk, J. J. Midgley, M. L. Navas, U. Niinemets, J. Oleksyn, N. Osada, H. Poorter, P. Poot, L. Prior, V. I. Pyankov, C. Roumet, S. C. Thomas, M. G. Tjoelker, E. J. Veneklaas, and R. Villar. 2004. The worldwide leaf economics spectrum. *Nature* **428**:821-827.
- Xu, J. 2006. Fundamentals of fungal molecular population genetic analyses. *Current Issues in Molecular Biology* **8**:75-89.
- Young, T. P., C. H. Stubblefield, and L. A. Isbell. 1996. Ants on swollen-thorn acacias: species coexistence in a simple system. *Oecologia* **109**:98-107.
- Yu, D. W. 2001. Parasites of mutualisms. *Biological Journal of the Linnean Society* **72**:529-546.
- Yu, D. W. and N. E. Pierce. 1998. A castration parasite of an ant-plant mutualism. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **265**:375-382.
- Yu, D. W., H. B. Wilson, and N. E. Pierce. 2001. An empirical model of species coexistence in a spatially structured environment. *Ecology* **82**:1761-1771.
- Zeileis, A. and T. Hothorn. 2002. Diagnostic checking in regression relationships. *R News* **2**:7-10.
- Zhao, J. J., J. S. Zeng, G. S. de Hoog, D. Attili-Angelis, and F. X. Prenafeta-Boldu. 2010. Isolation and identification of black yeasts by enrichment on atmospheres of monoaromatic hydrocarbons. *Microbial Ecology* **60**:149-156.

