

Summary of the thesis

Lichens are symbioses between a fungus (mycobiont) and a photosynthetic partner (photobiont), which can be a green alga (chlorobiont) and/or a cyanobacterium (cyanobiont).

I studied associations among mycobionts and cyanobionts (*Nostoc*) in lichens that are classified in the families Peltigeraceae (the genus *Peltigera* sections *Polydactylon* and *Hydrothyriae*), Pannariaceae (the genera *Fuscopannaria*, *Krosbia*, *Physma*, *Parmeliella* and *Pannaria*, mostly), Lobariaceae (the genera *Lobaria* and *Sticta*) in the order Peltigerales, Lecanoromycetidae (comprising most known cyanolichens) and the family Arctomiaceae (the genus *Arctomia*) in the Arctomiales (Ostropomycetidae).

I gathered multilocus molecular data and analyzed them using various software in order to reconstruct phylogenetic relationships for each, the mycobiont and photobiont partners and to delimit species. I also examined morphology and chemistry (Thin Layer Chromatography; TLC) of ca. 200 specimens collected during various field trips and ca. 150 herbarium collections. Phylogenetic reconstructions and data on geographic distribution for studied lichens allowed me to examine patterns of specificity of mycobionts and cyanobionts as well as their impact on the evolution and diversification of lichen symbioses and morphological structure of the thallus within the studied groups. Species delimitation methods based on DNA sequences provided a base for defining species that represent meaningful evolutionary lineages and helped me to find sets of diagnostic, morphological features (including cyanobacterial identity manifested by the thallus color) circumscribing them (including many newly discovered ones) and corroborating with their geographical ranges (usually restricted to a single continent). I described several species new to science.

I used *Peltigera* section *Polydactylon* as a case study to compare DNA-based species delimitation methods in order to identify significant species units and to assess the importance of the phylogenetic and geographic data of the cyanobiont *Nostoc* in recognizing *Peltigera* species. Most species from this section reproduce sexually, but a few members produce also vegetative propagules (mostly phyllidia). This section as a whole, has a broad, almost cosmopolitan, distribution. However, the distribution range of individual species varies greatly within the group ranging from endemism in small geographical areas such as the Azores to broad distributions covering North America, Europe and Asia. It has been suspected that section *Polydactylon* contains several species complexes encompassing cryptic as well as morphologically distinct but unrecognized species. Because most species in this group have relatively uniform morphology, the implementation of a morphological species concept is likely to lead to an underestimation of the number of species. However, the recognition of geographically structured morphotypes and chemotypes within broadly distributed taxa such as for *P. neopolydactyla*, *P. scabrosa*, and *P. dolichorhiza* strongly suggest the presence of multiple undescribed species.

Distinct morphological, chemical and geographical patterns detected within the section *Polydactylon* and the occurrence of *Nostoc* as the only photobiont associated with members of this section, makes it a good model system for testing:

- 1) the patterns of symbiotic association among mycobionts and their photobionts collected from various habitats and regions based on phylogenetic relationships reconstructed for each symbiont;
- 2) if cosmopolitan lichen species represent single “evolving metapopulation lineages” or assemblages of morphologically similar but evolutionary distinct lineages.

Chapter one reports patterns of associations between the mycobiont *Peltigera* and its *Nostoc* cyanobiont within section *Polydactylon*. I sequenced five loci for the mycobionts and one locus for the cyanobionts for ca. 200 thalli representing most of the geographic and morphological variation. This is the first study attempting to determine the patterns of association among symbionts of a lichen group at a worldwide scale. I reconstructed phylogenetic relationships of both partners and determined the association profiles for mycobionts and cyanobionts within a phylogenetic framework.

I found a broad spectrum of specificity for both partners, ranging from strict specialists to generalists. The dominant trend involved mycobionts being more specialized, i.e., associating mostly with one or few

Nostoc phylogroups (even when several other phylogroups were available in the associations with other neighboring *Peltigera* species), than cyanobionts, which were leaning more toward generalism, i.e., associating frequently with several *Peltigera* species. Geographic ranges, diversification rates and genetic diversity seem to be influenced by the specificity profile of the mycobiont species.

Chapter two includes the study of symbiotic associations between mycobionts and their *Nostoc* cyanobionts in the family Pannariaceae (Peltigerales). I reconstructed the phylogenies of the mycobionts and their respective photobionts and explored the revealed relationships in the context of the morphological aspects of the thalli formed by the sampled lichens.

Pannariaceae contains tripartite members associating with both, cyanobacteria and the green algae, as well as bipartite members associating only with cyanobacteria. Two types of thallus structures were defined within this family: pannarioid thallus, typical for most members of Pannariaceae (*Pannaria*, *Fuscopannaria* or *Parmeliella*) where the *Nostoc* cells are organized in a well-defined layer inside the thallus and collematoid thallus, typically found in members of the family Collemataceae where the *Nostoc* cells are spread across the thallus giving it a gelatinous consistency when wetted. Representatives of Pannariaceae with collematoid type of thallus were often erroneously classified within Collemataceae.

Phylogenetic reconstructions showed that collematoid morphology evolved multiple times during the evolution of Pannariaceae because members with pannarioid and collematoid thalli were intermixed across the mycobiont phylogeny and were often sister to each other.

The ancestral state reconstruction showed that in Pannariaceae most lineages of bipartite lichens (e.g., *Parmeliella mariana* and the genus *Physma*) associated with *Nostoc* only originated from the tripartite ancestors (containing both green algae and cyanobacteria) by multiple emancipation events from the cephalodia (containing *Nostoc* only) coupled with subsequent losses of green algae. This discovery was revealed by the ancestral state reconstructions and supported by the evidence that the same *Nostoc* phylogroups present in cephalodia of the tripartite thalli were also found in bipartite members of the genus *Physma*.

Chapter three contains a formal taxonomic transfer of the genus *Kroswia* to the genus *Fuscopannaria* based on a broad phylogeny (on 3 loci: mtSSU, nuLSU and *RPB1*) containing several representatives of the genus *Fuscopannaria*.

Chapter four consists of a phylogenetic study of section *Hydrothyriae* encompassing two aquatic members from the genus *Peltigera* (*P. hydrothyria* and *P. gowardii*). Based on a global multigene phylogeny of the genus, I confirmed the phylogenetic affiliation of section *Hydrothyriae* within *Peltigera*. However, its exact placement within the genus remains uncertain. The reconstructed phylogeny revealed three distinct, morphologically homogeneous, lineages corresponding to the two known species and a new species, which was formally described here as *P. aquatica*. All aquatic *Peltigera* are associated with a unique *Nostoc* strain, phylogenetically distinct from the cyanobionts found in other *Peltigera* sections, as revealed by a large-scale phylogenetic study of *Nostoc* using *rbcLX*.

Chapter five includes a formal description of a new species from the genus *Arctomia* (*Arctomia borbonica* Magain & Sérus.) collected on Reunion Island. Based on its morphology (non-stratified thallus), this cyanolichen was initially identified as a *Leptogium* species (Collemataceae) but phylogenetic reconstruction confirmed its placement within the genus *Arctomia* (Arctomiales, Ostropomycetidae). This is another example of morphological convergence of the thallus structure among phylogenetically unrelated mycobionts (parts of different orders and subclasses within Lecanoromycetes) associated with closely related cyanobacteria.

Chapter six includes a report of a newly discovered photosymbiodemes from Reunion Island. I examined photosymbiodemes occurring in the genus *Sticta* and *Lobaria* in the family Lobariaceae. A single mycobiont was found to form a joint thallus composed of the lobes containing the green algae (chloromorph) and the cyanobacteria (cyanomorph) only, or both morphs were detached from each other forming independent thalli. In *Sticta dichotoma*, morphologically alike, chloro- and cyanomorphs formed a single thallus, but sometimes the chloromorphs were growing separately. In *Lobaria discolor* I observed *Dendriscoaulon*-like fruticose cyanomorph and the foliose chloromorph growing separately. Similarly to the origin of bipartite

thalli in Pannariaceae, it is very likely that cyanomorphs in Lobariaceae originated from emancipation of the typically tripartite thalli. These switches of photobionts, from green alga to cyanobacteria substantially influence the morphology of the thallus.

Chapter seven is focusing on species delimitation within section *Polydactylon* of the genus *Peltigera*. I reconstructed the phylogeny of the mycobiont based on molecular data from eight loci, including three newly designed intergenic *Peltigera*-specific markers (IGS1, IGS3 and IGS16) and applied five species delimitation methods. I focused on two major clades of the section: the Scabrosoid clade, where the lineages representing putative species are well delimited and most phylogenetic relationships among them are highly supported by bootstrap values; and the Dolichorhizoid clade, where substantially lower levels of resolution and bootstrap support was obtained and, species delimitation was more challenging.

I applied five species delimitation methods, to assess species boundaries and their overlap among methods. The methods I used rely on very different models from inferring population structure based on allele distributions to methods relying on coalescence.

All methods resulted in mostly congruent species delimitations within the Scabrosoid clade. A total number of 12 species including 9 previously unrecognized species was detected. In the Dolichorhizoid clade, methods relying on different models and assumptions provided different species delimitations, highlighting the necessity to use various criteria before formal species assignments are made. The species delimitations I proposed were based on a consensus among these various methods. I concluded that the Dolichorhizoid clade comprises 29 species, for which only 7 have already been described and named. The consensus approach revealed that most “evolutionary significant” species have relatively well-defined distribution ranges (usually panboreal or restricted to a single biogeographic region).

This study on the symbiotic associations in *Peltigera* section *Polydactylon* and related cyanolichens from the order Peltigerales shows that cyanobiont identity (e.g., within a phylogenetic context) shapes the ecology, evolution and speciation of mycobionts (lichen species). Photobiont switches play an important role as a mechanism impacting various aspects of lichen macroevolution, species diversification, morphological appearance and the range expansion to new regions or new ecological niches.

Résumé de la thèse

Les lichens sont composés d’une symbiose entre un champignon (mycobionte) et un partenaire photosynthétique (photobionte) qui est une algue verte (chlorobionte) et/ou une cyanobactérie (cyanobionte).

J’ai étudié les associations entre les mycobiontes et les cyanobiontes (*Nostoc*) de lichens classés dans les familles Peltigeraceae (le genre *Peltigera*, sections *Polydactylon* et *Hydrothyriae*), Pannariaceae (les genres *Fuscopannaria*, *Kroswia*, *Physma*, *Parmeliella* et *Pannaria*, principalement), Lobariaceae (les genres *Lobaria* et *Sticta*) dans l’ordre des Peltigerales, Lecanoromycetidae (qui contient la majorité des cyanolichens) et la famille Arctomiaceae (le genre *Arctomia*) dans les Arctomiales (Ostropomycetidae).

J’ai rassemblé des données moléculaires multiloci, et les ai analysées en utilisant une variété de logiciels pour reconstruire les relations phylogénétiques de chacun des partenaires (le mycobionte et le cyanobionte), et pour délimiter les espèces au sein de ces groupes. J’ai aussi examiné la morphologie et la chimie (Chromatographie à couche fine, TLC) d’environ 200 spécimens collectés lors de plusieurs missions de terrains et d’environ 150 collections d’herbaria.

Les reconstructions phylogénétiques et les données de distributions géographiques pour les lichens étudiés nous ont permis d’examiner les profils de spécificité des mycobiontes et des cyanobiontes ainsi que leur impact sur l’évolution et la diversification des symbioses lichéniques et la structure morphologique du thalle au sein des groupes étudiés.

Les méthodes de délimitation d’espèces basées sur les séquences d’ADN ont fourni une base pour définir des espèces qui représentent des lignées évolutives significatives, et aidé à trouver des caractères mor-

phologiques diagnostiques (incluant l'identité des cyanobactéries, qui influence la couleur du thalle) pour les décrire (y compris beaucoup de nouvelles espèces) et corroborées par leurs aires géographiques (souvent restreintes à un seul continent). J'ai décrit plusieurs nouvelles espèces.

J'ai utilisé *Peltigera* section *Polydactylon* comme une étude de cas pour comparer les méthodes de délimitation d'espèces basées sur l'ADN, pour identifier des unités évolutives significatives, et pour évaluer l'importance des données phylogénétiques et géographiques du *cyanobionte* *Nostoc* pour reconnaître les espèces de *Peltigera*. La plupart des espèces dans cette section se reproduisent de façon sexuée, mais certains membres produisent aussi des propagules végétatives (principalement des phyllidies). La section dans son ensemble a une distribution large, presque cosmopolite. Cependant, l'aire de répartition des espèces individuellement varie beaucoup à l'intérieur du groupe, d'endémiques dans de petites zones géographiques comme les Açores à de larges aires couvrant l'Amérique du Nord, l'Europe et l'Asie. On suspecte ce groupe de contenir plusieurs complexes d'espèces comprenant des espèces cryptiques, et des espèces morphologiquement distinctes mais non-diagnostiquées. Parce que la plupart des espèces dans ce groupe ont une morphologie relativement uniforme, l'implémentation d'un concept d'espèce morphologique risque de mener à une sous-estimation du nombre d'espèces. Cependant, la reconnaissance de morphotypes et chémotypes géographiquement structurés au sein de taxa largement distribués comme *P. neopolydactyla*, *P. scabrosa* et *P. dolichorhiza* suggère fortement la présence de nombreuses espèces non-reconnues.

Les différences morphologiques, chimiques et géographiques détectées au sein de la section *Polydactylon*, et la présence de *Nostoc* comme unique photobionte associé avec les membres de cette section en font un bon modèle pour tester:

- 1) les profils d'association symbiotique au sein des mycobiontes et de leurs photobiontes, collectés dans différents habitats et régions, basés sur les relations phylogénétiques de chaque symbionte;
- 2) si les espèces cosmopolites de lichens représentent chacune une seule lignée évolutive distincte ou des assemblages de lignées morphologiquement similaires mais évolutivement distinctes.

Le **chapitre un** rapporte les profils d'association entre le mycobionte *Peltigera* et son cyanobionte *Nostoc* au sein de la section *Polydactylon*. J'ai séquencé cinq loci pour le mycobionte et un locus pour le cyanobionte d'environ 200 thalles représentant la majeure part de la variation morphologique et géographique du groupe. Ceci est la première étude essayant de déterminer les stratégies d'associations des symbiontes d'un groupe de lichens à l'échelle mondiale. J'ai reconstruit les relations phylogénétiques des deux partenaires et déterminé les profils d'associations du mycobionte et du cyanobionte dans un contexte phylogénétique.

J'ai trouvé un large gradient de spécificité pour les deux partenaires, allant de stricts spécialistes à des généralistes. La tendance dominante est constituée de mycobiontes plus spécialisés, i.e. s'associant principalement avec un ou peu de phylogroupes de *Nostoc* (même lorsque plusieurs autres phylogroupes sont disponibles dans des associations avec d'autres espèces de *Peltigera* voisines) que les cyanobiontes, qui tendent plutôt vers le généralisme, i.e. s'associant fréquemment avec plusieurs espèces de *Peltigera*. Les aires de répartition, les taux de diversification et la diversité génétique semblent être influencés par le profil de spécificité des espèces de mycobionte.

Le **chapitre deux** étudie les associations symbiotiques entre les mycobiontes et leur cyanobiontes *Nostoc* dans la famille Pannariaceae (Peltigerales). J'ai reconstruit les phylogénies des mycobiontes et de leurs photobiontes respectifs et exploré les relations observées dans le contexte des aspects morphologiques des thalles formés par les lichens échantillonnés.

Les Pannariaceae contiennent des membres tripartites s'associant avec à la fois des cyanobactéries et des algues vertes; et des membres bipartites s'associant uniquement avec des cyanobactéries. Deux types de structures de thalles ont été définies au sein de cette famille: thalle pannarioïde, typique de la plupart des membres des Pannariaceae (*Pannaria*, *Fuscopannaria* ou *Parmeliella*) où les cellules de *Nostoc* sont organisées dans une couche bien définie à l'intérieur du thalle; et thalle collematoïde où les cellules de *Nostoc* sont dispersées à travers le thalle, lui donnant une consistance gélatineuse quand il est humide. Des représentants des Pannariaceae avec des thalles collematoïdes étaient souvent classés à tort comme faisant partie des Collemataceae.

Les reconstructions phylogénétiques ont montré que la morphologie collematoïde est apparue à de nombreuses reprises durant l'évolution des Pannariaceae, parce que des membres avec des thalles pannarioïdes et collematoïdes sont entremêlés à travers la phylogénie du mycobionte, et souvent étroitement liés.

Les reconstructions d'états ancestraux ont montré que chez les Pannariaceae, la plupart des lignées de thalles bipartites (par exemple *Parmeliella mariana* et le genre *Physma*) associées uniquement avec *Nostoc* proviennent d'ancêtres tripartites (contenant à la fois des algues vertes et des cyanobactéries) par de multiples émancipations de céphalodies (structures contenant uniquement *Nostoc*) couplées avec des pertes d'algues vertes. Cette découverte a été révélée par la reconstruction d'état ancestral et supportée par le fait que le même phylogroupe de *Nostoc* est présent dans les céphalodies d'un thalle tripartite et dans les thalles bipartites du genre proche *Physma*.

Le **chapitre trois** contient le transfert taxonomique formel du genre *Kroswia* vers le genre *Fuscopannaria* basé sur une phylogénie (sur trois loci: mtSSU, nuLSU et RPB1) contenant toutes les données disponibles de représentants du genre *Fuscopannaria*.

Le **chapitre quatre** consiste en l'étude phylogénétique de la section *Hydrothyriae*, englobant deux membres aquatiques du genre *Peltigera* (*P. hydrothyria* et *P. gowardii*). En se basant sur une phylogénie multi-gène du genre, j'ai confirmé l'affiliation phylogénétique de la section *Hydrothyriae* au sein de *Peltigera*. Cependant, son placement exact au sein du genre demeure incertain. La phylogénie reconstruite révèle trois lignées distinctes, morphologiquement homogènes, correspondant aux deux espèces connues et à une nouvelle espèce, qui a été formellement décrite comme *P. aquatica*. Tous les *Peltigera* aquatiques sont associés avec une souche unique de *Nostoc*, phylogénétiquement distincte des cyanobiontes rencontrés dans d'autres sections de *Peltigera*, comme révélé par une phylogénie à grande échelle du genre *Nostoc*, basée sur le locus *rbcLX*.

Le **chapitre cinq** inclut une description formelle d'une nouvelle espèce du genre *Arctomia* (*Arctomia borbonica* Magain & Sérus.) récoltée sur l'île de la Réunion. En se basant sur sa morphologie (thalle non-stratifié), ce cyanolichen avait été initialement identifié comme une espèce de *Leptogium* (Collemataceae) mais la reconstruction phylogénétique a confirmé son placement au sein du genre *Arctomia* (Arctomiales, Ostropomycetidae). Ceci est un autre exemple de convergence morphologique de la structure du thalle au sein de mycobiontes phylogénétiquement sans rapport (faisant partie de différents ordres et sous-classes au sein des Lecanoromycetes) associés avec des cyanobactéries phylogénétiquement proches.

Le **chapitre six** rapporte des photosymbiodemes nouvellement découverts de l'île de la Réunion. J'ai examiné des photosymbiodemes des genres *Sticta* et *Lobaria* dans la famille Lobariaceae. Un seul mycobionte forme un thalle composé de lobes contenant l'algue verte (chloromorphe) et de lobes contenant la cyanobactérie (cyanomorphe), ou les deux morphes sont détachés l'un de l'autre, formant des thalles indépendants. Chez *Sticta dichotoma*, les chloro- et cyanomorphes, morphologiquement similaires, se développaient au sein d'un même thalle, et le chloromorphe se développait parfois séparément. Chez *Lobaria discolor*, j'ai observé un cyanomorphe fruticuleux Dendriscoaulonoïde et un chloromorphe foliacé se développant séparément. De la même manière que l'origine des thalles bipartites chez les Pannariaceae, il est vraisemblable que les cyanomorphes chez les Lobariaceae trouvent leur origine dans l'émancipation depuis des thalles tripartites. Ces changements de photobiontes, d'algue verte vers cyanobactérie influe fortement la morphologie du thalle.

Le **chapitre sept** se concentre sur la délimitation d'espèces au sein de la section *Polydactylon* du genre *Peltigera*. J'ai reconstruit la phylogénie du mycobionte basée sur des données moléculaires de huit loci, incluant trois marqueurs inter-géniques nouvellement créés et spécifiques à *Peltigera* (IGS1, IGS3 et IGS16) et appliqué cinq méthodes de délimitation d'espèces. Je me suis concentré sur deux des clades majeurs de la section: le clade Scabrosoïde, où les lignées représentant des espèces potentielles sont bien délimitées et la plupart des relations phylogénétiques entre elles sont bien supportées par les valeurs de bootstrap; et le clade Dolichorhizoïde, où des niveaux de résolution et de bootstrap plus bas ont été obtenus, et où la délimitation d'espèces est plus difficile.

J'ai utilisé cinq méthodes de délimitation d'espèces pour tester les frontières entre les espèces, et la

congruence des méthodes. Les méthodes que j'ai utilisées se basent sur des modèles très différents, de la détermination de structures de populations basée sur les distributions d'allèles à des méthodes se basant sur la coalescence.

Toutes les méthodes ont donné des résultats majoritairement congruents au sein du clade Scabrosoide. Un nombre total de douze espèces, incluant neuf espèces précédemment non-reconnues a été détecté. Dans le clade Dolichorhizoide, les méthodes se basant sur différents modèles ont donné des délimitations d'espèces différentes, mettant en évidence la nécessité d'utiliser différents critères avant de formellement définir les espèces. Les délimitations d'espèces que je propose sont basées sur un consensus parmi ces différentes méthodes. J'ai conclu que le clade Dolichorhizoide comprend vingt-neuf espèces, alors que seulement sept étaient précédemment reconnues et décrites. L'approche de consensus a révélé que la plupart des espèces "significatives évolutivement" avaient des aires de répartitions relativement bien définies (souvent panboréales, ou restreintes à une seule région biogéographique).

L'étude des associations symbiotiques au sein de *Peltigera* section *Polydactylon* et de cyanolichens de l'ordre des Peltigerales montre que l'identité du cyanobionte (par exemple dans un contexte phylogénétique) influence l'écologie, l'évolution et la spéciation des mycobiontes (espèces de lichens). Les changements de photobiontes jouent un rôle important comme mécanisme impactant différents aspects de la macroévolution des lichens, la diversification des espèces, l'apparence morphologique et l'expansion vers de nouvelles régions ou de nouvelles niches écologiques.