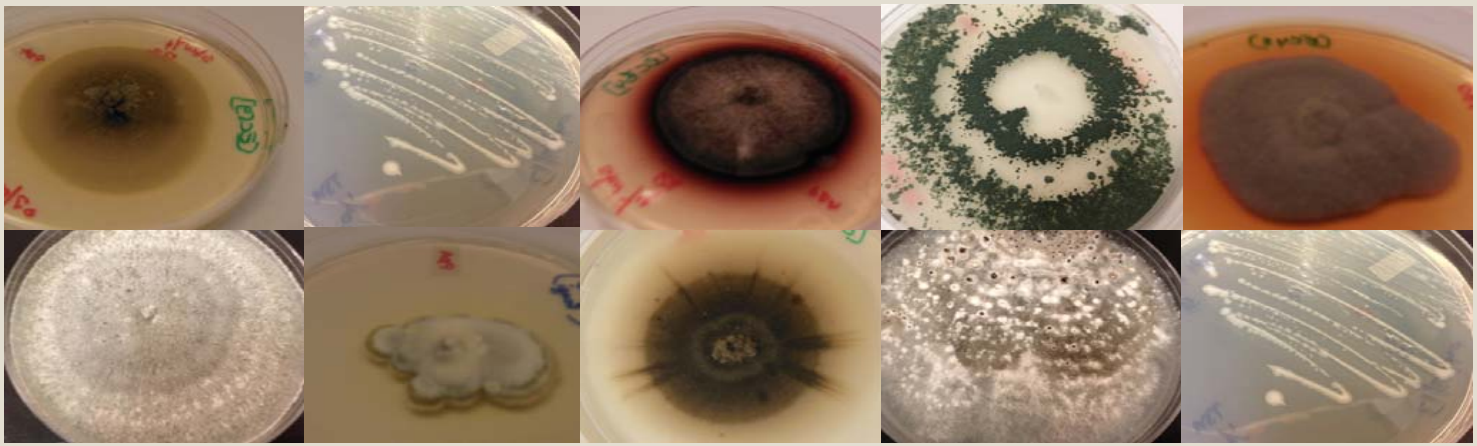
Identification et caractérisation d'endophytes avec des propriétés de bio-fertilisation et de bio-contrôle chez la canneberge

Lila N. Salhi, David Bernard-Perron, Suha Jabaji, B. Franz Lang

Les micro-organismes : amis de vos cultures?



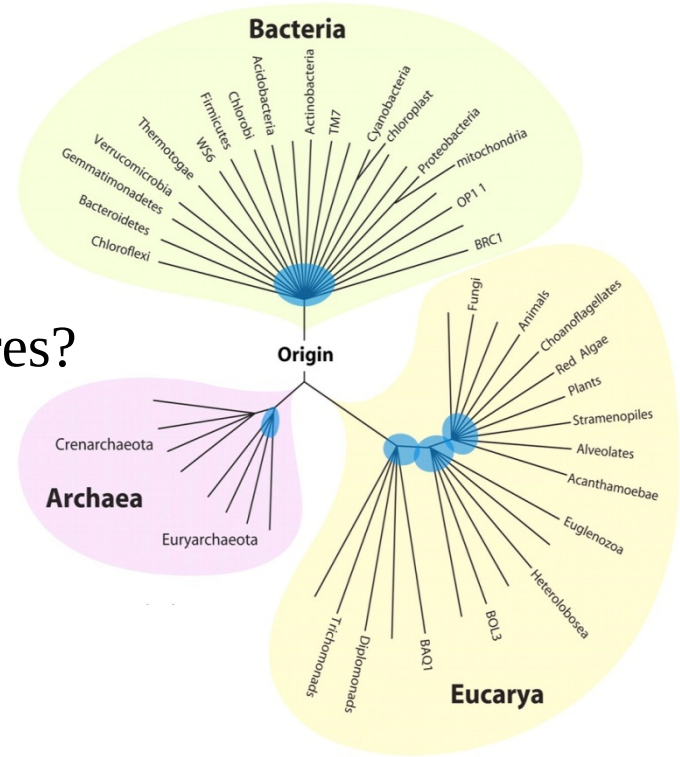
Université de Montréal

Agriculture, Pêcheries et Alimentation Québec

McGill

Plan

- Problématique: la culture de canneberge!
- Les micro-organismes: quelle solution?
- Les microbes connus en agriculture
- Quels microbes peuvent être bénéfiques?
- Les endophytes sont-ils les amis des cultures?
- Résultats: une diversité sous-estimée
- Des propriétés bénéfiques à exploiter
- Perspectives et principales conclusions



Problématique: la culture de la canneberge!

Utilisation intensive d'eau

Utilisation d'engrais, de pesticides et d'herbicides

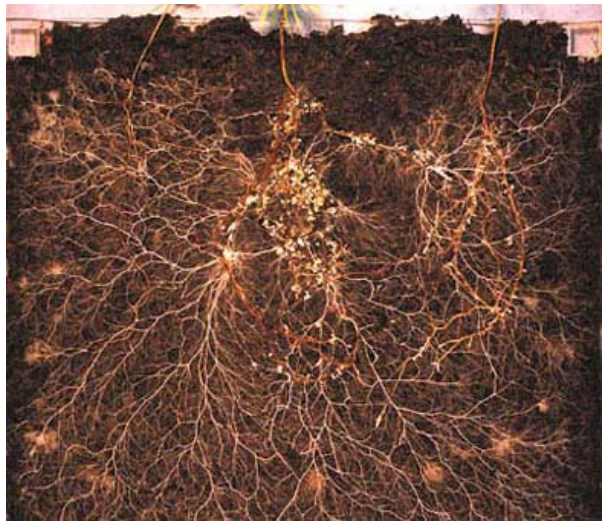
- Ruissellement potentiel des produits chimiques.
- Contraintes environnementales diverses.

Quelles solutions pour atténuer ces effets ?

- **Améliorer les pratiques culturales**
- **Utiliser des variétés résistantes**
- **Exploiter les avantages naturels que présentent certains microorganismes**

Les microorganismes chez les plantes

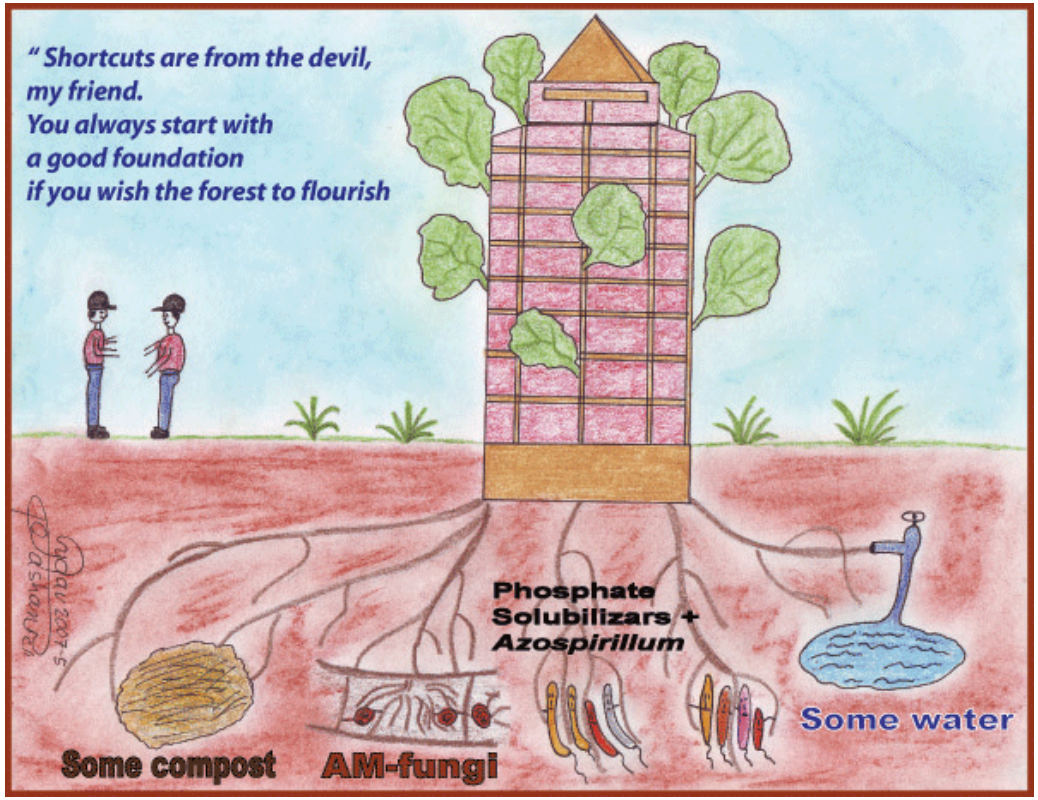
Pathogènes



Symbiotiques ou bénéfiques

- **Pathogène ou asymptomatique**
- **État stable ou transitoire**

Une fondation solide pour la nutrition des plantes



- Eau
- Matière organique
- Bactéries PGPR
- Champignons mycorhiziens
- Encore plus …

Stimulation de la croissance des plantes
Amélioration de la fertilité des sols

Bashan et al., 2007

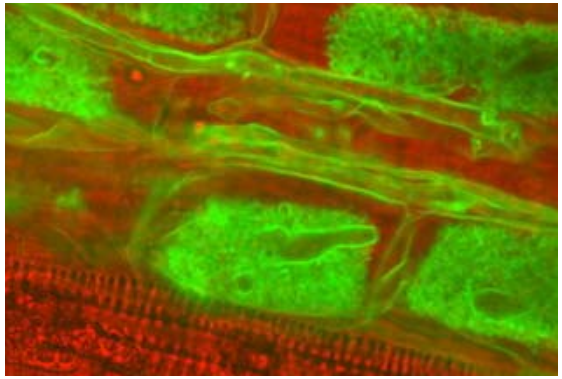
Les microorganismes endophytes stimulent la croissance végétale et protègent

- **Colonisent les tissues des plantes.**
- **Survivent et se multiplient en présence d'autres microbes.**
- **Supportent la croissance des plantes:**

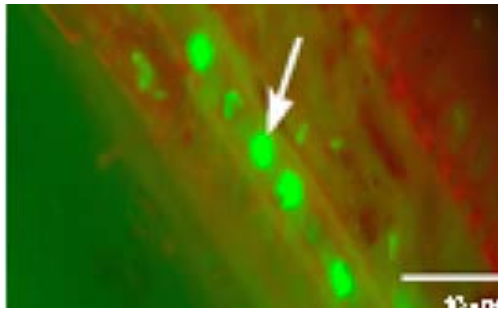
  1) **Facteurs de croissance** hormonaux
  2) **Bio-fertilisation** (solubilisation des nutriments, fixation d'azote)
  3) **Bio-contrôle** de pathogènes (production d'antibiotiques, fongicides, insecticides …)

Rothballer et al., 2003; Gamalero et al., 2004, **Persello-Cartieaux***et al., 2003*

Qu’est-ce qu’un endophyte ?



Hyphes fongiques dans les cellules foliaires



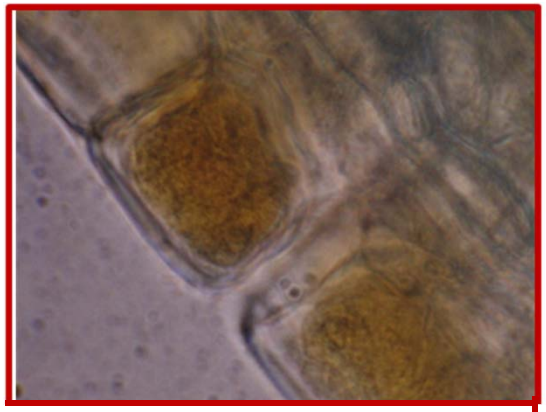
Bactéries dans les cellules du xylème

- Champignons, bactéries, levures....etc.
- Tout ou partie du cycle de vie à l'intérieur de la plante.
- Relation endosymbiotique.
- Bénéfice mutuel ou sans conséquences négatives pour la plante.

Petrini, 1991

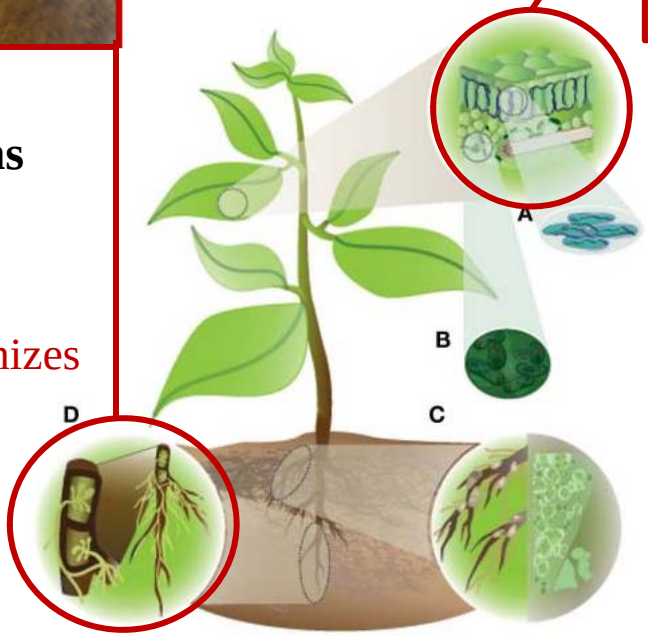
Tian et al. 2011; Ryan et al, 2008; http://organicsoiltechnology.com/

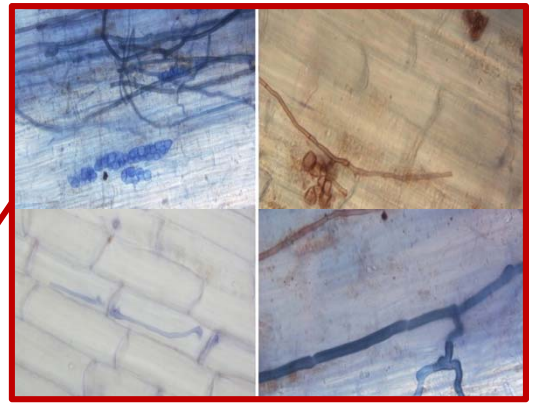
1. Les champignons endophytes



Champignons endomycorhiziens

- Formation de mycorhizes
- Nutrition minérale
- Pas d'organogenèse
- AMF et EMF





Champignons endophytes non mycorhiziens

- Mycélium entre les cellules
- Importante diversité d'espèces
- Ascomycota et basidiomycota

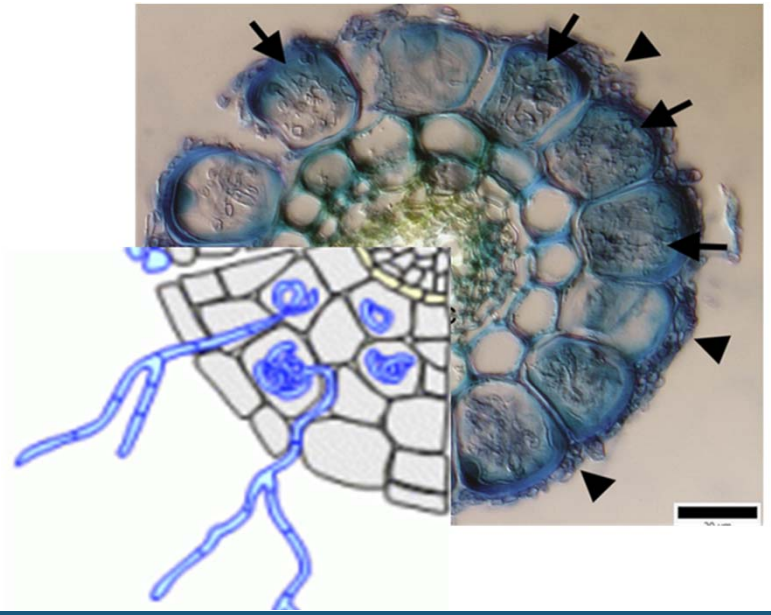
Partida-Martinez LPP, Heil M (2011), Tian W, Zhang CQ, Qiao P, Milne R (2011),

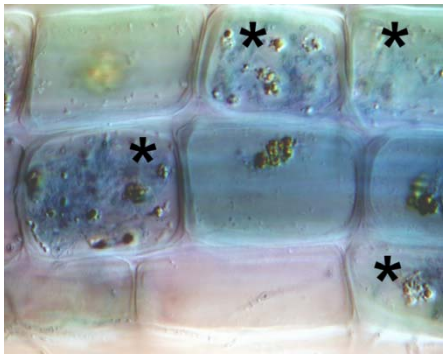
Endophytes fongiques des canneberges

Champignons mycorhiziens éricoïdes (EMF)

- Croissance à l'intérieur des cellules
- Hyphes non étendus dans le sol

Oidiodendron maius



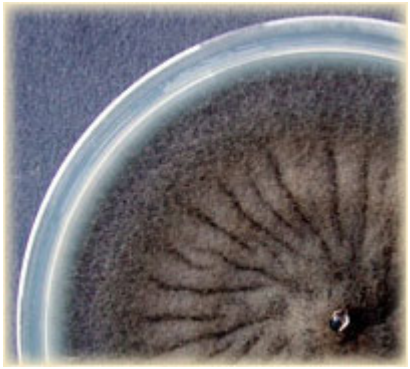


Rhizoscyphus ericae

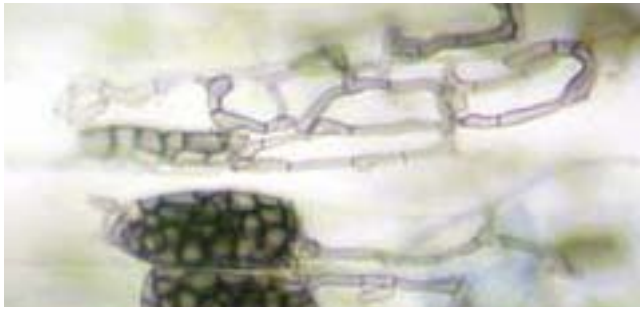
Smith and Read, 2008; Jumpponen and Trappe, 1998; http://www.scivit.de

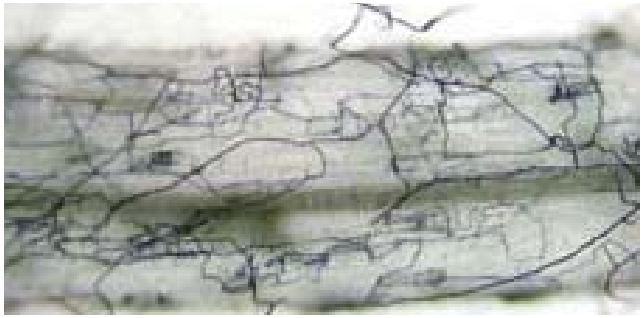
Champignons endophytes non mycorhiziens

- Groupe hétérogène sombres septés
- Hyphes à pigmentation sombre
- Production de sclérotes



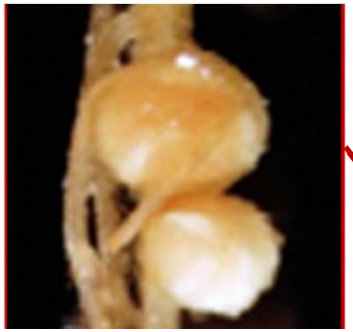
Phialocephala fortinii



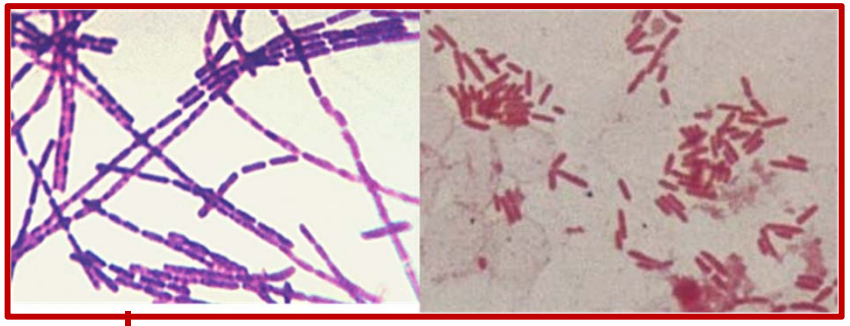


Smith and Read, 2008; Jumpponen and Trappe, 1998, http://botany.thismia.com , Martino et al, 2007

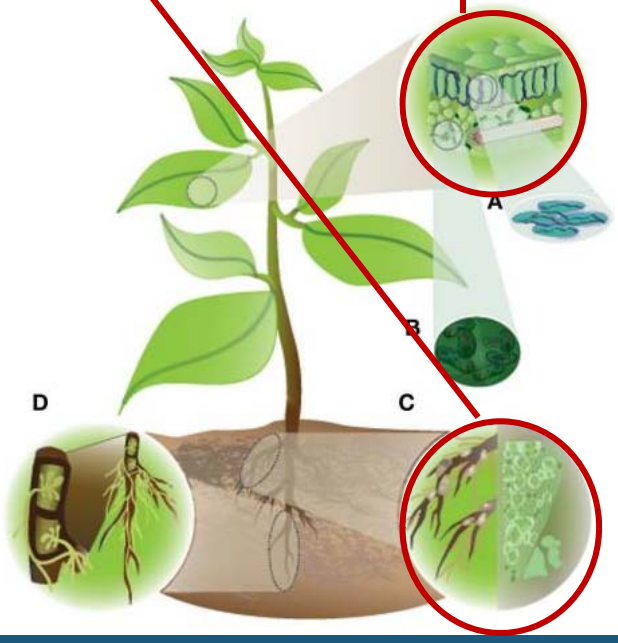
2. Les bactéries endophytes



Les bactéries endophytes de type *Rhizobium*



Les bactéries endophytes Non nodulantes



- Nutrition azotée
- Forte spécificité d'hôte
- Organogenèse (Formation de nodules)

- Promotion de la croissance des plantes
- - Importante diversité d'espèces
- Pas d'organogenèse

Partida-Martinez LPP, Heil M (2011), Desbrosses Guilhem J, Stougaard J (2011)

Les bactéries endophytes de la canneberge

Pseudomonas syringae

- Gram négatif avec un flagelle polaire
- Généralement décrite comme pathogène, mais …
- Efficace dans le contrôle de la maladie de la pourriture sclérotique (*Monilinia oxycocci)*

Pseudomonas sp

voland *et al*, 1999

Quelles actions bénéfiques pour la plante ?

Fonction	Mycorhizes (champignons)	Fixateurs d'azote (bactéries)	Autres endophytes
Approvisionnement en éléments nutritifs	oui	oui	oui
Absorbtion d'eau	oui	non	non
Résistance aux ravageurs	maladies	?	Insectes-maladies

Mexal G.J., *2013*

Quelques exemples de propriétés utiles

Exemple de Bio-fertilisation

- Gènes bactérien de l'opéron Nod
- Organismes : *Rhizobium sp*, *Bradyrhizobium sp.*

→ Augmentation du nombre de nodules : Fixation de l'azote

Exemples de Bio-contrôle

- Formation de biofilm
- Organismes : *Bacillus subtilis*

→ Contrôle de différents agents pathogènes: *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas axonopodis*

Tian W, Zhang CQ, Qiao P, Milne R (2011). Mycologia 103: 703-709

Un endophyte est-il toujours bénéfique? Non!

Types d'interactions potentielles : stables ou transitoires

Pathogénique	**Pathogénique latente**	**Neutre**	**Mutualiste**
néfaste	asymptomatique	absence d'effet	bénéfique

- **Définition physique : à l'intérieur des tissues de la plante**
- **Fonction: Bénéfique, neutre, pathogène**

Tadych, M. and White, J. F. (2009). Endophytic Microbes, pages 431-44

Questions et hypothèses

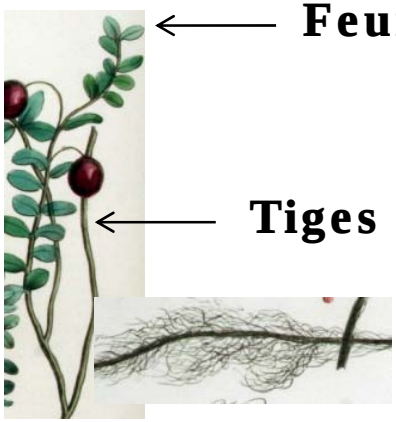
Un univers d’endophytes plus divers?

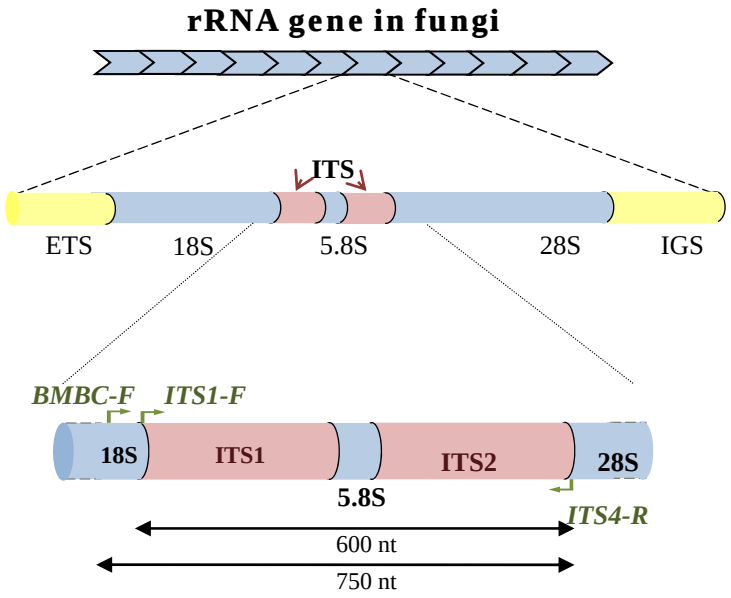
Quels isolats de la collection ont des propriétés bénéfiques?

Comment implanter les endophytes utiles durablement dans les plantes?

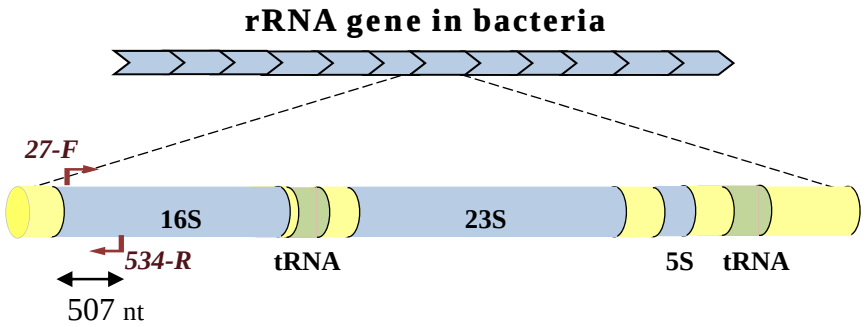
Identification moléculaire des endophytes

1. Isolement à partir de tissus frais

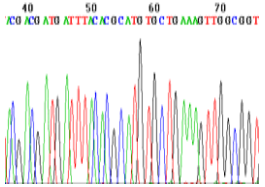




2. Extraction d'ADN et PCR



3. Séquençage et Blast (NCBI)



BLAST

NCBI

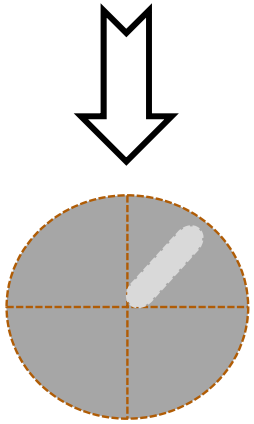
Muyzer et al. (1993) ; White et al. 1990; blast.ncbi.nlm.nih.gov

②

Détermination des propriétés utiles

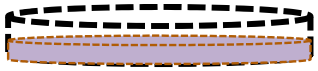
Solubilisation du phosphate

Milieu NBRIP
Phosphate insoluble

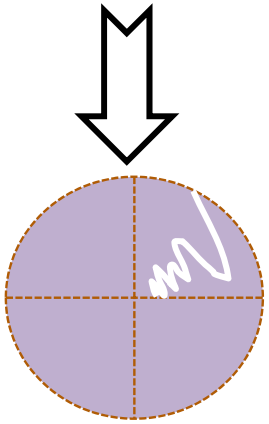


Halo représentant la solubilisation minérale

Fixation de l'azote



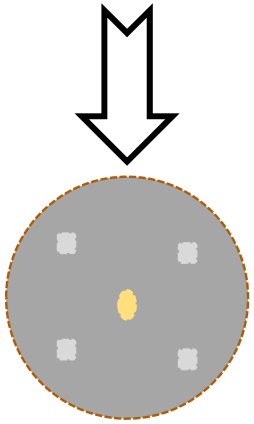
Milieu sans azote



Croissance

Bio-contrôle

Milieu PDA



Inhibition de la croissance fongique

Résultats

1 – Diversité microbienne

2 – Propriétés bénéfiques

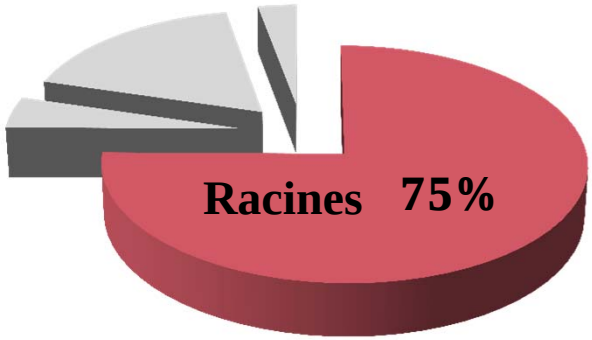
①

Une diversité inattendue: le côté visible de l'iceberg?

137 micro-organismes isolés

Racines: 65 champignons, 36 bactéries

Champignons: 23 genres/espèces

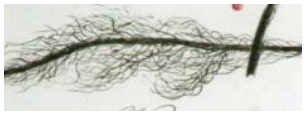


o **Deux espèces de DES**

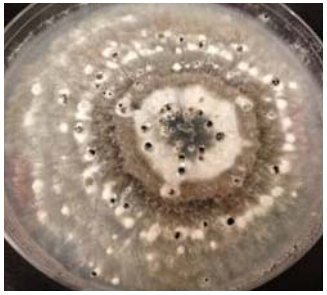
Phialocephala sp

Acephala sp

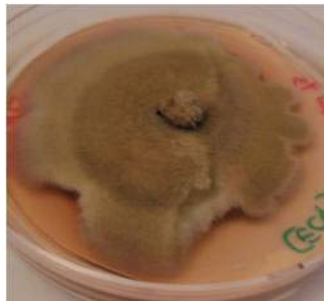
o **Absence des champignons endomycorhiziens éricoïdes** ***Oidiodendron maius et de Rhizoscyphus ericae***



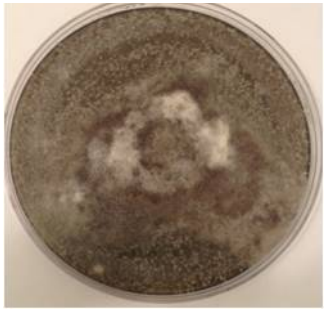
o Trois espèces pathogènes de la canneberge



Phomopsis vaccinii

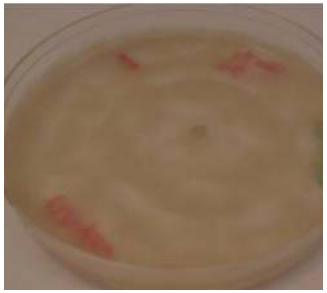


Godronia cassandrae



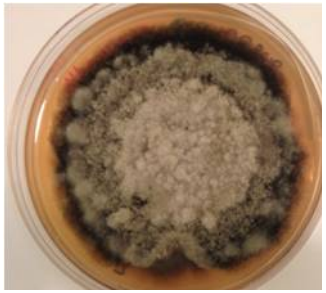
Colletotrichum sp

oSix espèces pathogènes d'autres cultures

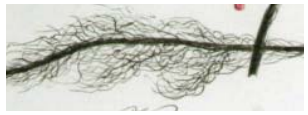


Nemania serpens

Articulospora atra



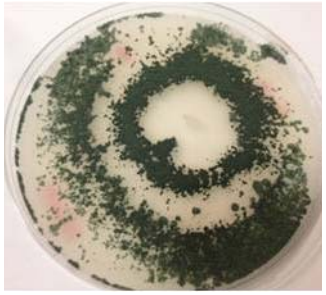
Alternaria alternata



Une diversité inattendue: le côté visible de l'iceberg? ①

- **Deux espèces ayant une activité de bio-contrôle**

Penicillium sp

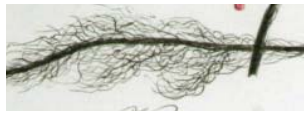


Trichoderma hamatum

- **Dix espèces dont la fonction est inconnue**

Mollisia sp

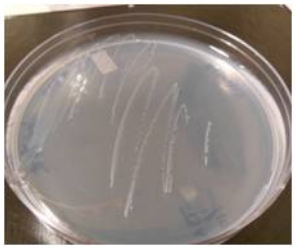
Sebacinaceae sp



Une diversité inattendue: le côté visible de l'iceberg? ①

Bactéries: 12 genres/espèces

- **Une espèce de *Pseudomonas sp***



Pseudomonas sp

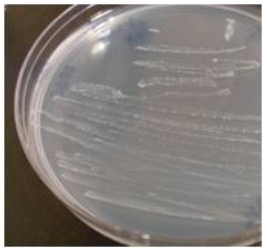
- **Deux espèces pathogènes de la canneberge**

Enterobacter sp

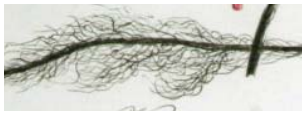
Panteoa sp

- **Deux espèces ayant une activité de bio-contrôle**

Bacillus thuringiensis



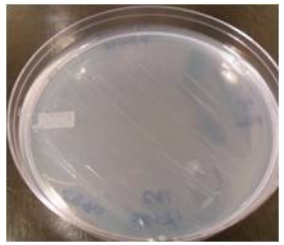
Rahnella aquatilis



Une diversité inattendue: le côté visible de l'iceberg? ①

- **Trois espèces ayant une activité de bio-fertilisation:**

Bacillus aryabhattai/
Bacillus megaterium



Burkholderia sp

Pseudomonas putida

- **Quatre espèces de bactéries endophytes non identifiées**

Conclusion

Une diversité microbienne importante dans les racines

Deux des espèces endophytes décrites ont été isolées

Les champignons mycorhiziens n'ont pas retrouvés

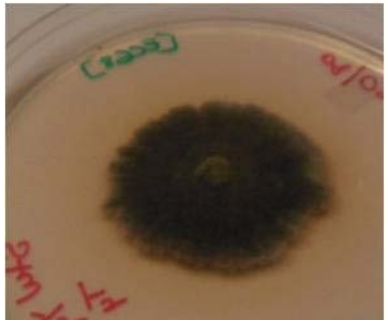
Une composition microbienne équilibrée

Tiges: 16 champignons, 8 bactéries

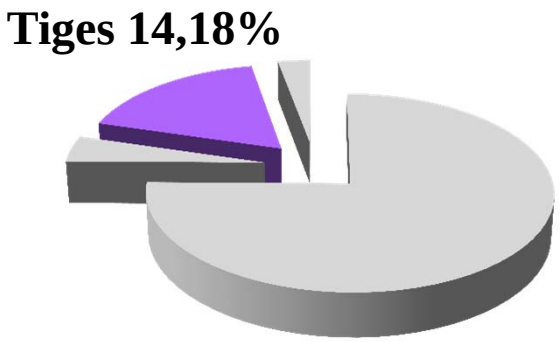
Champignons: 7 genres/espèces

- **Deux espèces pathogènes de la canneberge**

Diaporthe sp



Godronia cassandrae



- **Quatre espèces pathogènes d'autres cultures**

Alternaria alternata *Nemania serpens* *Pythium sp* *Setomelanomma holmii*

- **Une espèce ayant une activité de bio-contrôle** *Penicillium janthinellum*

Bactéries : 4 genres/espèces

- **Trois espèces dont les fonctions ne sont pas clairement décrites**

Cohnella ginsengisoli *Lysinibacillus sp* *Paenibacillus agarexedens*

- **Une espèce ayant une possible activité de bio-fertilisation** *Paenibacillus sp*

Conclusion

Diversité microbienne moins importante que dans les racines.

Présence de nombreuse espèces pathogène de canneberge ou d'autres culture

La majorité des bactéries ne possèdent pas de fonctions clairement décrites

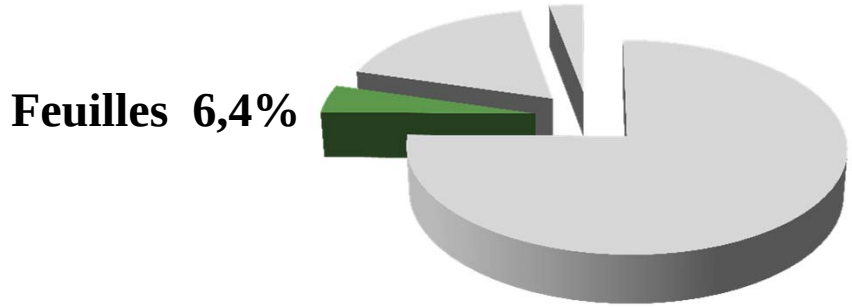
Une diversité inattendue: le côté visible de l'iceberg? ①

<u>Feuilles</u>: 8 bactéries

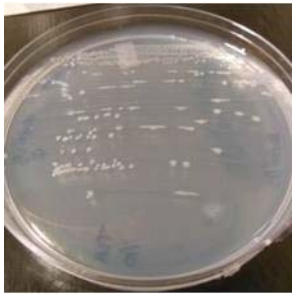
Bactéries: **2 genres**

- **Une espèce ayant une activité de bio-contrôle**

Bacillus subtilis



- **Une espèce ayant une possible activité de bio-fertilisation**



Rhodococcus sp

Conclusion

Diversité microbienne très faible

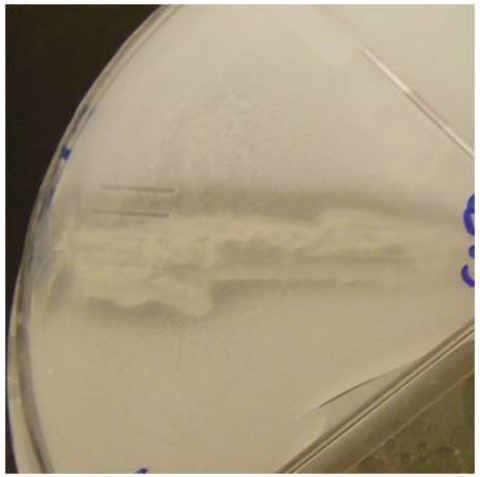
Absence de champignons

②

Quel endophyte est potentiellement bénéfique ?

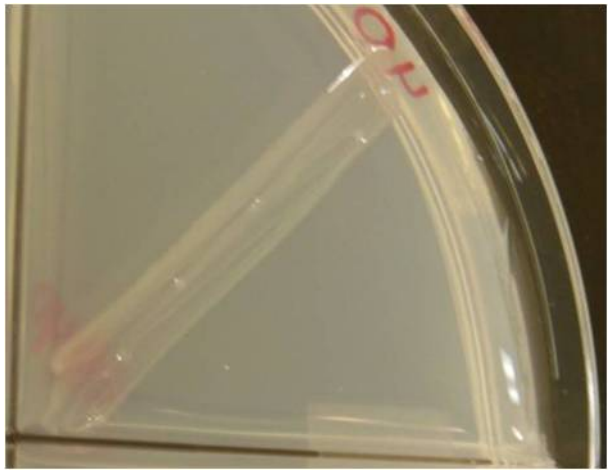
Solubilisation du phosphate

Bacillus subtilis
Burkholderia sp.
Rahnella aquatilis



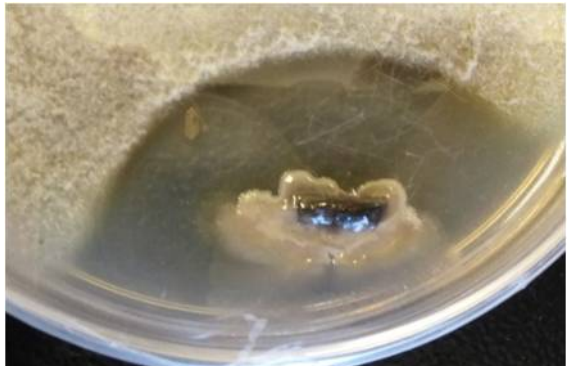
Fixation de l'azote

Rhodococcus qingshengii
Burkholderia sp.
Rahnella aquatilis
Panteoa sp.
Cohnella ginsengisoli



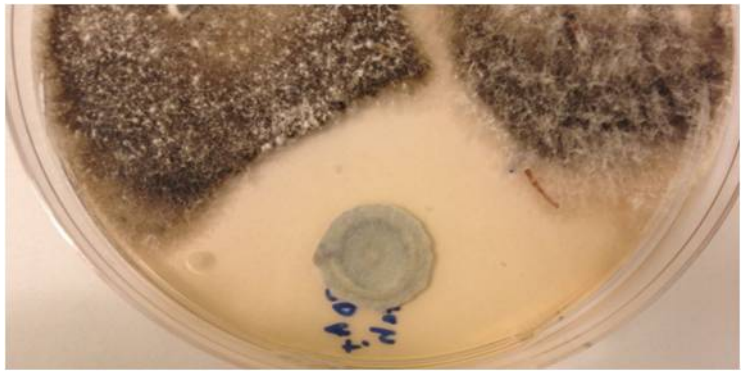
Bio-contrôle

Pseudomonas sp.



Interaction bactérie - champignon

Penicillium janthinellum



Interaction champignon - champignon

Conclusions

- Une large diversité d'endophytes dans les tissus de canneberges.
- Différents types de microbes dans les racines et les parties aériennes.
- Certains endophytes présentent des propriétés de bio-fertilisation et d'autres des propriétés anti-fongiques

la suite ?

Remerciements pour le financement

Le ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec

Université de Montréal

Agriculture, Pêcheries et Alimentation Québec

McGill