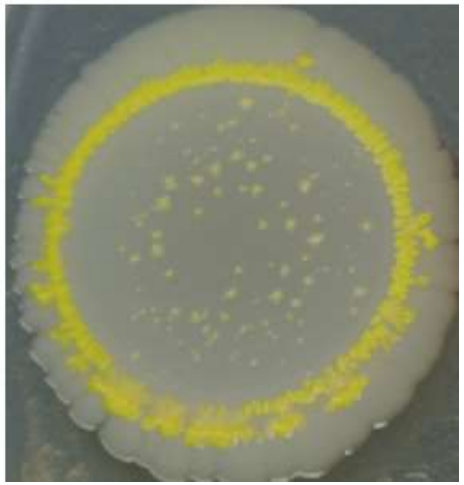
Les mycorhizes pour améliorer le régime racinaire des plants

Lila N. Salhi, Lise Forget, Peniel Bustamante, Matt Sarrasin, Gertraud Burger et B. Franz Lang

Robert Cedergren Centre for Bioinformatics and Genomics, Département de Biochimie, Université de Montréal



MycAtok

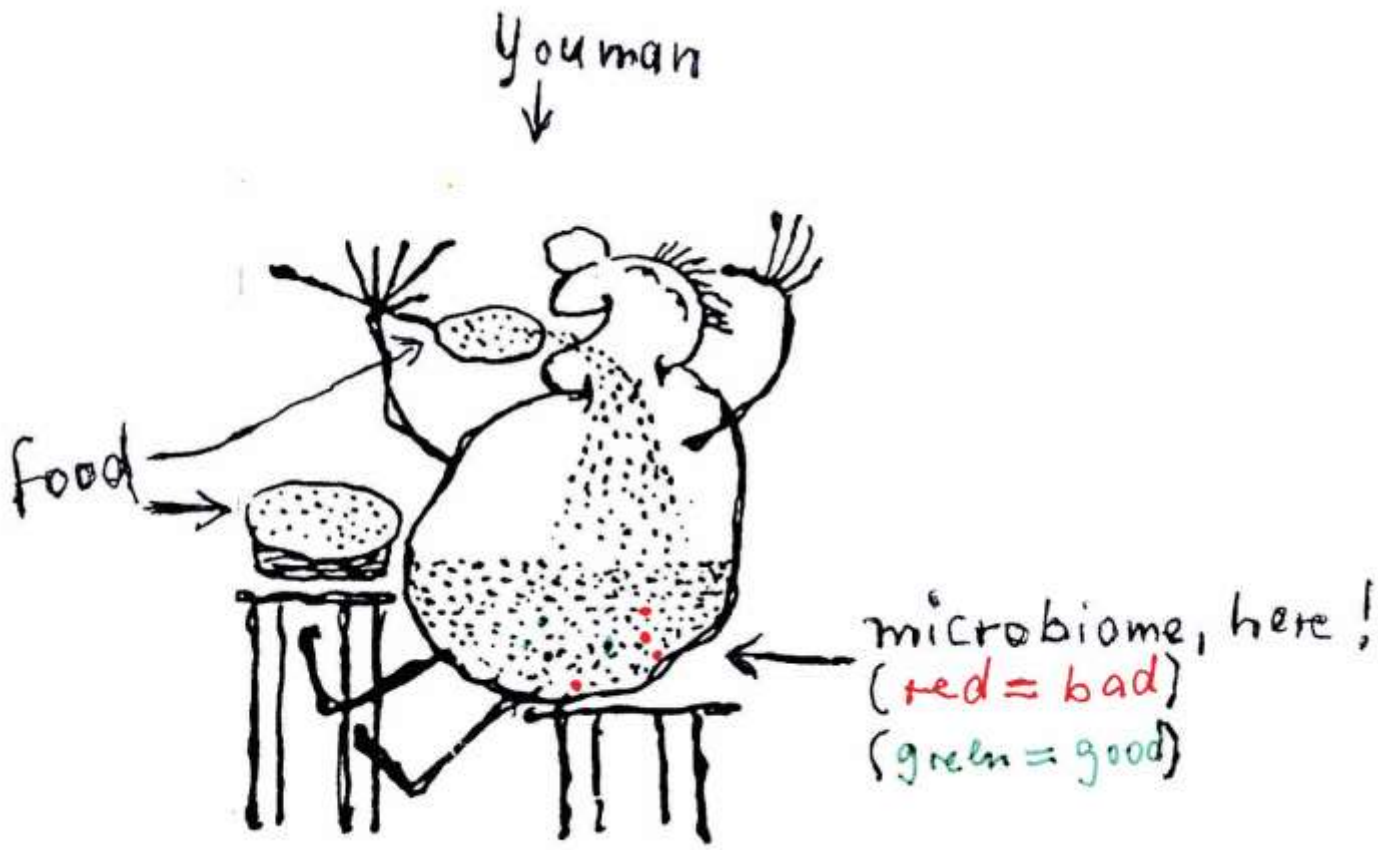
Une collaboration de quatre producteurs de canneberges (Bieler, Landreville, Godin, Lachance), avec des chercheurs de l'Université de Montréal (Lang BF, Burger G), Concordia University (Findlay B), et l'Université de Laval (Dorais M).

Financé par les producteurs, le CRSNG, et l'Université de Montréal.

Notre hypothèse de travail

L’ évolution des eucaryotes (incluant humain, animaux, plants) est marquée par les interactions symbiotiques avec des bactéries, mycètes et autres microbes.

Introduction: le microbiome humain ?



Le microbiome humain est souvent (naïvement) décrit comme une longue liste de microbes qui sont qualifié 'bon' ou 'mauvais', une définition qui manque l'essentielle:

Il s'agit plutôt de symbioses avec des interactions spécifiques et complexes.

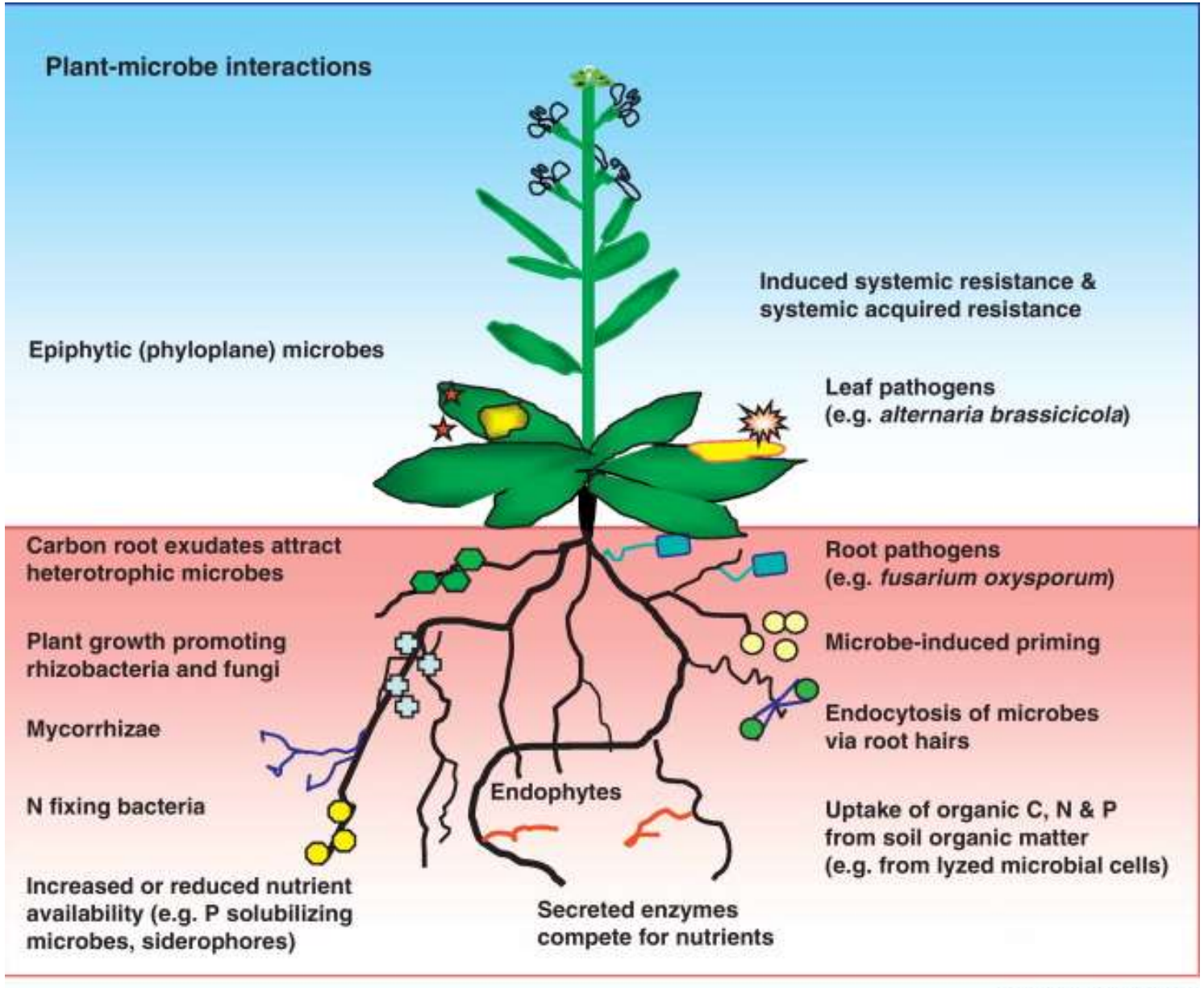
Dans un sens similaire, le microbiome des plants et souvent réduit a la *diversité* microbienne dans le sol.

Introduction: le microbiome des plants

Epiphytes microbiens

Mycorhizes (AMF) []

Rhizobacteries



Endophytes foliaires

Pathogènes fongiques

Endophytes fongiques racinaires

Nature des interactions microbe-plants

Trois types de symbiose par les endophytes:

- **Pathogène (plutôt rare)**
- **Sans bénéfices directes pour la santé des plants (majoritaire)**
- **La minorité peu connue: bénéfique pour la croissance et santé des plants et le biocontrôle de pathogènes**

(*Définition 'endophyte': microbe symbiote en intérieur des tissues de plants*)

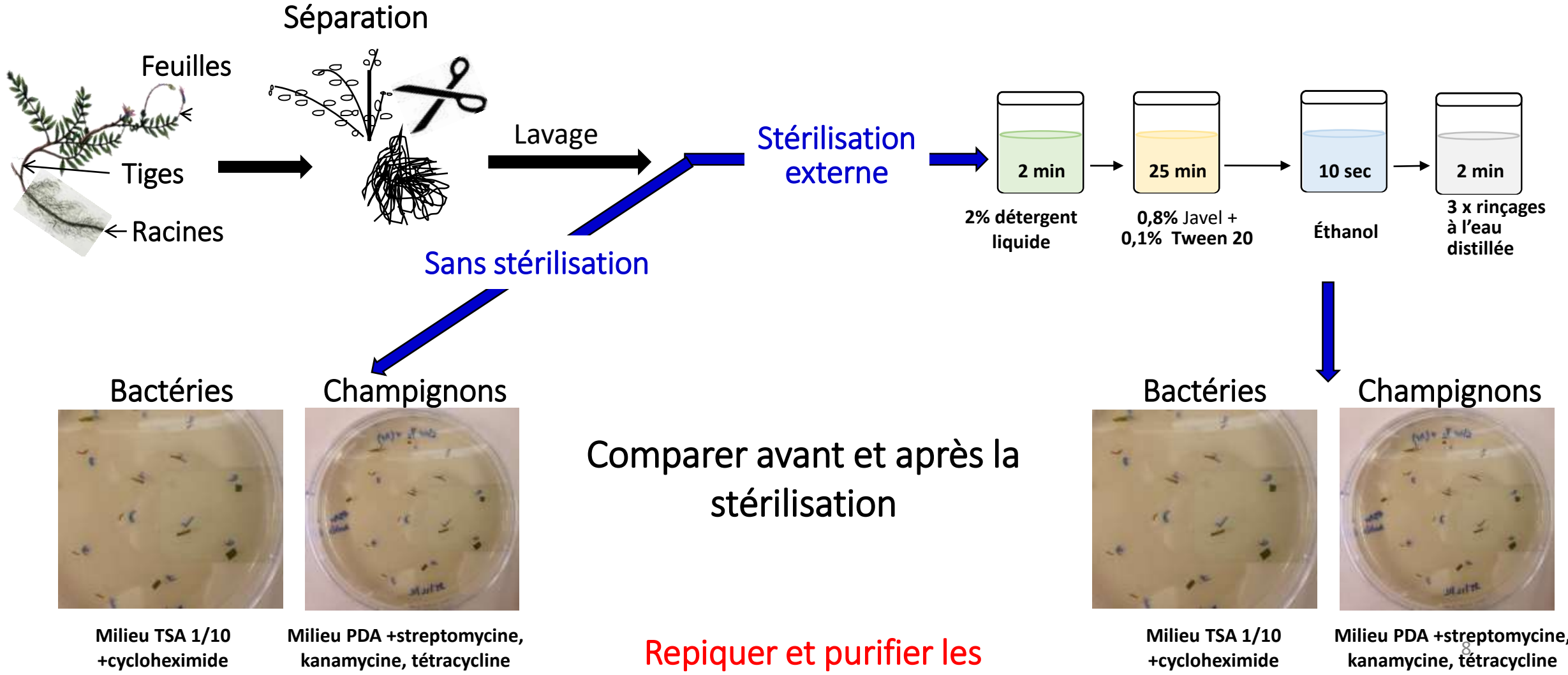
Notre intérêt: le microbiome des canneberges (endophytes)

OBJECTIVES

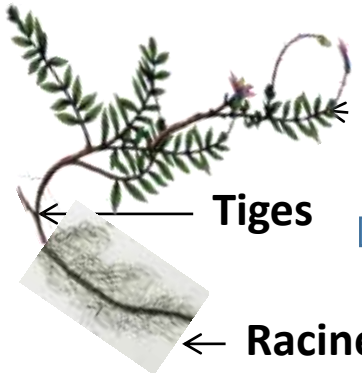
1. **Exploration de la diversité des endophytes dans les canneberges**
2. **Identification d'isolats qui stimulent la croissance des plants et le rendement de fruits**
3. **Identifier les gènes impliqués (génomique, transcriptomique)**
4. **Focus sur les isolats avec potentiel biocontrôle et biofertilisation**
5. **Traitements des champs, et développement de formulations microbiens.**

***Vaccinium macrocarpon* Ait**

Procédures pour l' isolation des endophytes

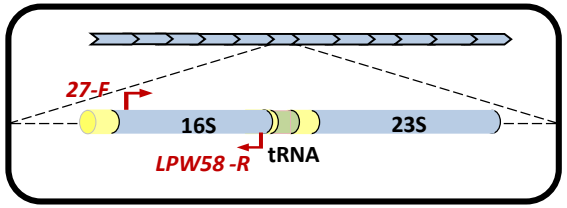


Identification taxonomique des endophytes - ribotypage

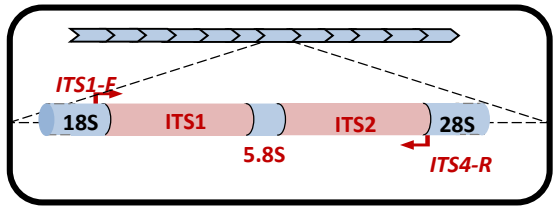


Isolement et culture

Extraction d'ADN et amplification par PCR des gènes de l'ARNr



chez les bactéries



chez les champignons

Séquençage

Blast (NCBI)

Espèces proches téléchargées de NCBI

Séquences bactériennes

Séquences fongiques

304 séquences bactériennes

314 séquences fongiques

Sélection

145 séquences bactériennes

102 séquences fongiques

Alignements multiples et curation manuelle

Alignements multiples et curation manuelle

Construction des arbres phylogénétiques (Mr. Bayes)

Muyzer et al., 1993. . Appl. Environ. Microbiol. 59: 695-700 ; White et al. 1990. In: PCR Protocols: a guide to methods and applications. USA: 315–322

Diversité inattendue des endophytes de canneberge

~ 25 % : dans le parties ariennes

Stevens	Mullica Queen
Bactéries ***Rhodococcus sp.*** **Mycètes** *Godronia cassandrae* ***Nemania serpens*** *Diaporthe sp.*	**Bactéries** ***Bacillus velezensis*** **Mycètes** *Diaporthe sp.*
Bactéries ***Pseudomonas sp.*** ***Burkholderia sp*** **Mycètes** *Phomopsis vaccinii* ***Meliniomyces variabilis*** ***Uncultured Helotiales*** *Cytospora chrysosperma* *Colletotrichum sp* ***Rhizoscyphus sp***	**Bactéries** ***Bacillus thuringiensis*** **Mycètes** *Godronia cassandrae* *Pythium sp.* ***Lachnum sp.*** ***Phialocephala sp.***

~ 75 % : dans les racines

Expériences représentatives de dépistages d'endophytes

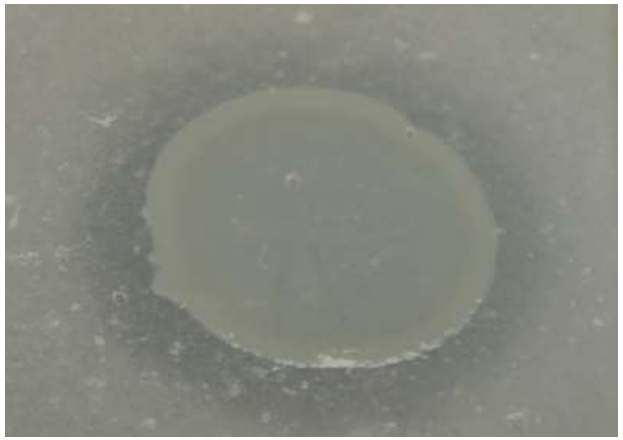
Noir:
Bénéfique ou neutre

Rouge:
Pathogène potentiel

Note: les mycorhizes de type AMF n'existent pas pour les canneberges. Notre recherche démontre quels mycètes prennent leur place.

Biofertilisation: solubilisation de phosphate et stimulation de croissance

Phosphate



Bacillus velezensis; hydroxyapatite

Bacillus velezensis; phytate

Croissance

(1) (2) (3) (4)

Control (C13)

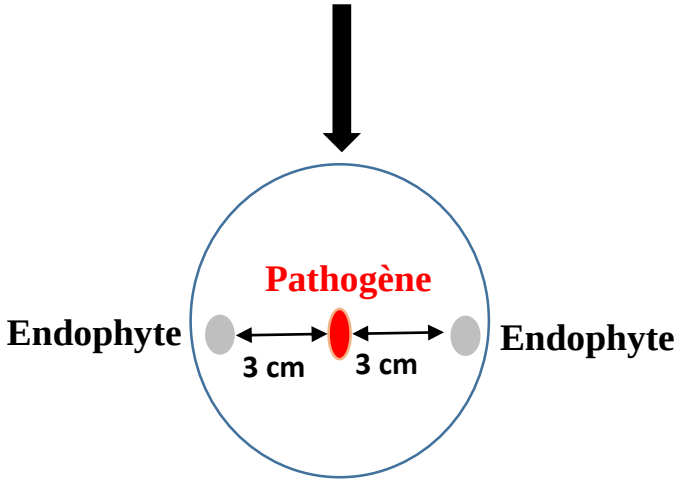
Treatment	Fertilisation	Dry weight	
		Stems+leaves	Roots
Control	(1) Without fertilization	0,064	0,007
Control	(2) Complete organic fertilization (NPK)	0,125	0,017
Control	(3) Fertilization limited to PK (no N)	0,216	0,027
Control	(4) Fertilization with insoluble P + NK	0,046	0,002

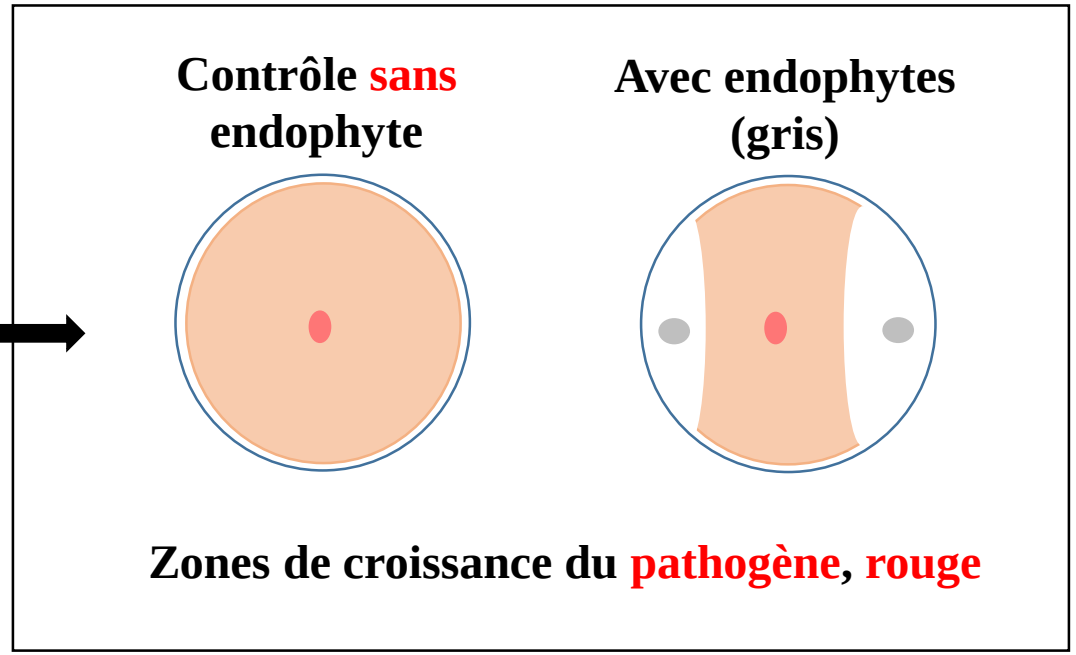
EC5-EB37 (C10)

Treatment	Fertilisation	Dry weight	
		Stems+leaves	Roots
EC5+EB37	(1) Without fertilization	0,145***	0,037***
EC5+EB37	(2) Complete organic fertilization (NPK)	0,144	0,035***
EC5+EB37	(3) Fertilization limited to PK (no N)	0,229***	0,032***
EC5+EB37	(4) Fertilization with insoluble P + NK	0,253***	0,048***

Biocontrôle : Évaluation du grandeur de zones d'inhibition

Milieu PDA



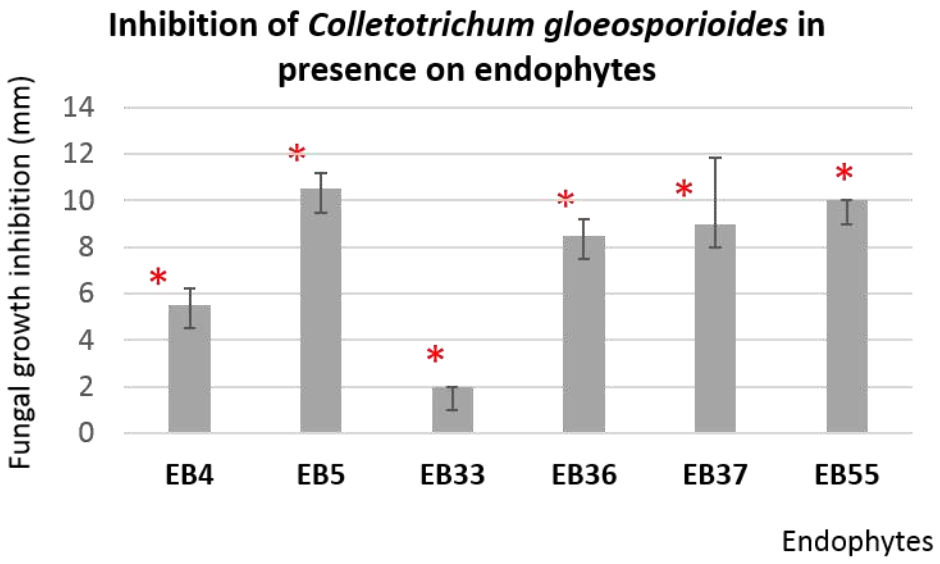


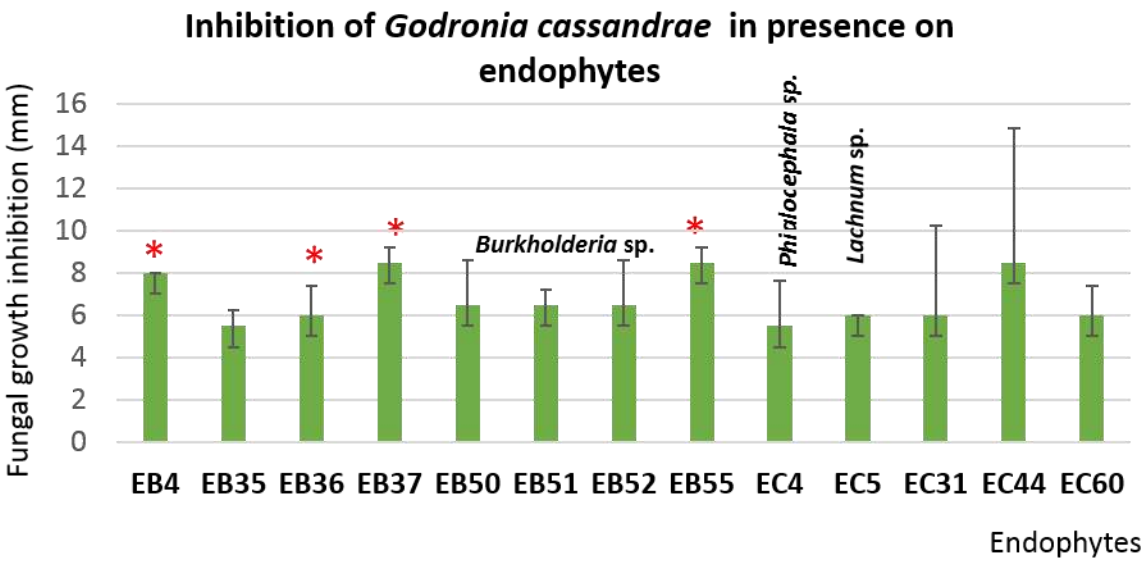
Zone d'inhibition

Pathogènes fongiques utilisés:

- *Colletotrichum gloeosporioides*
- *Phomopsis vaccinii*
- *Cytospora chrysosperma*
- *Godronia cassandrae*
- *Etc.*

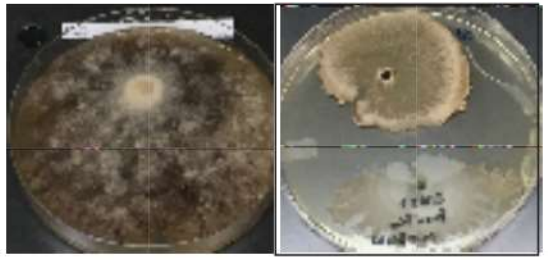
Bacillus velezensis EB37: biocontrôle



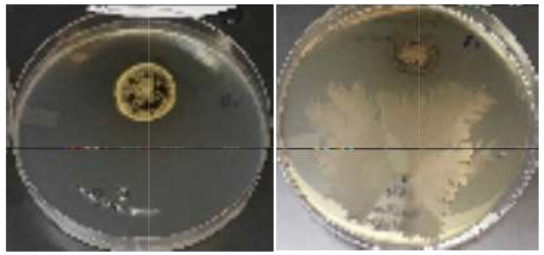


Colletotrichum gloeosporioides

Phomopsis vaccinii



Cytospora chrysosperma



Godronia cassandrae

Analyse génomique d'endophytes :
– abondance de gènes impliqués dans le biocontrôle

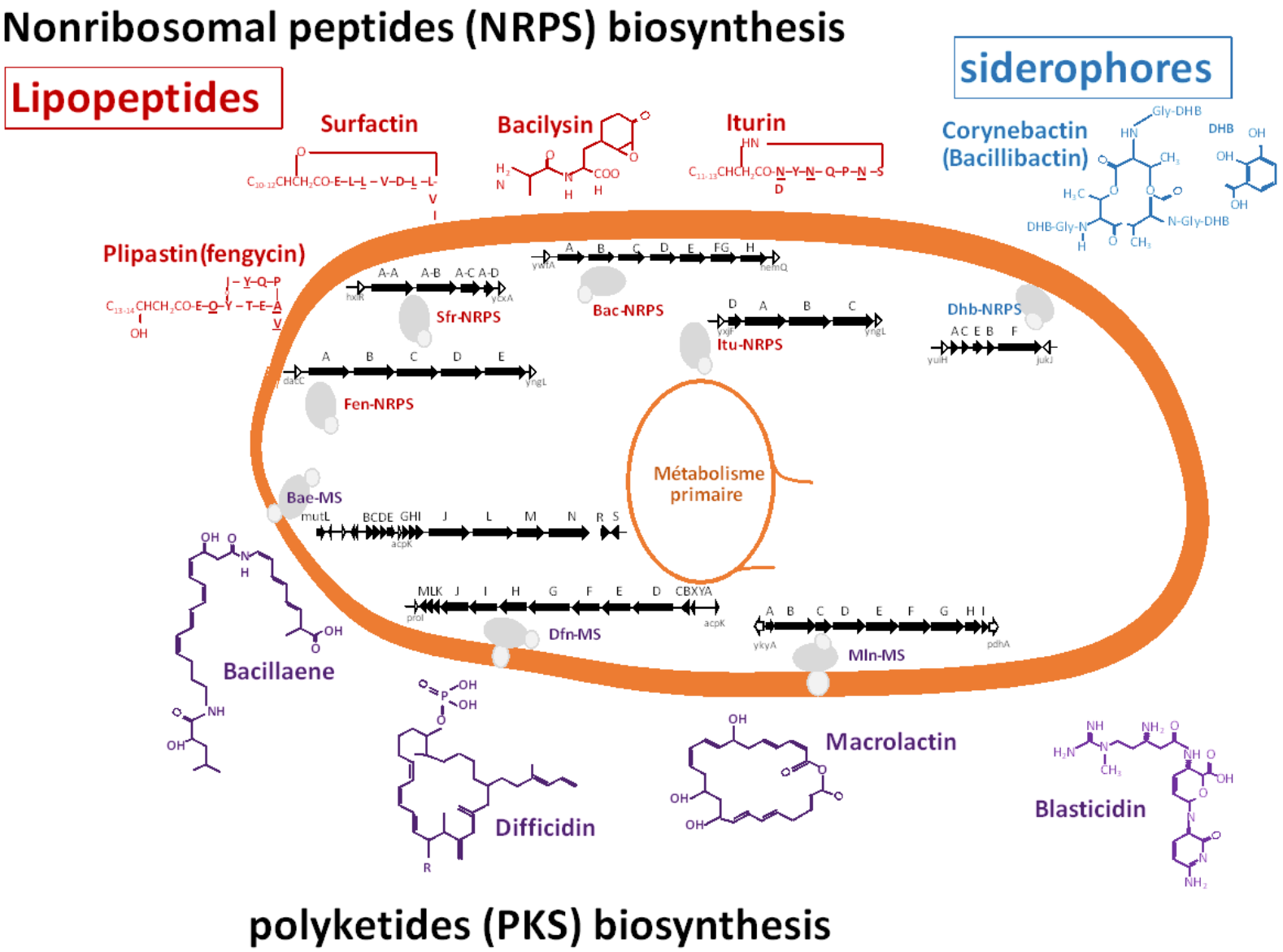
Fungal genes encoding non-ribosomal peptide (nrps), polyketide (pks) and mixed nrps/pks compounds

Species	Genome size (Mbp)	Number of contigs	Number of nrps	Number of pks	Number of nrps/pks hybrids
Rhizophagus irreg. (AMF)	149,8	210	1	0	0
Phialocephala scopiformis	48,9	71	**19**	**78**	5
Rhizoscyphus ericae	57,4	267	13	27	0
Phialocephala sp. EC4	61,6	1109	**17**	54	2
Lachnum sp. EC5	55,9	256	12	**59**	3
Lachnum sp. EC90	57,5	1220	**21**	**80**	2

Bacterial genes encoding non-ribosomal peptide (nrps), polyketide (pks), mixed nrps/pks and other compounds

Species	Genome size (Mbp)	Number of contigs	Number of nrps	Number of pks	Number of nrps/pks hybrids	Other compounds
Bacillus velezensis EB37	4,203	27	6	5	3	25
Bacillus velezensis EB33	4,153	26	3	5	3	22
Bacillus velez. EB100	4,203	26	5	6	3	4
Pantoea sp. EB38	4,506	16	0	0	0	17
Pseudomonas sp. EB42	6,934	71	3	0	0	53

Bacillus velezensis EB37: biocontrôle très puissante

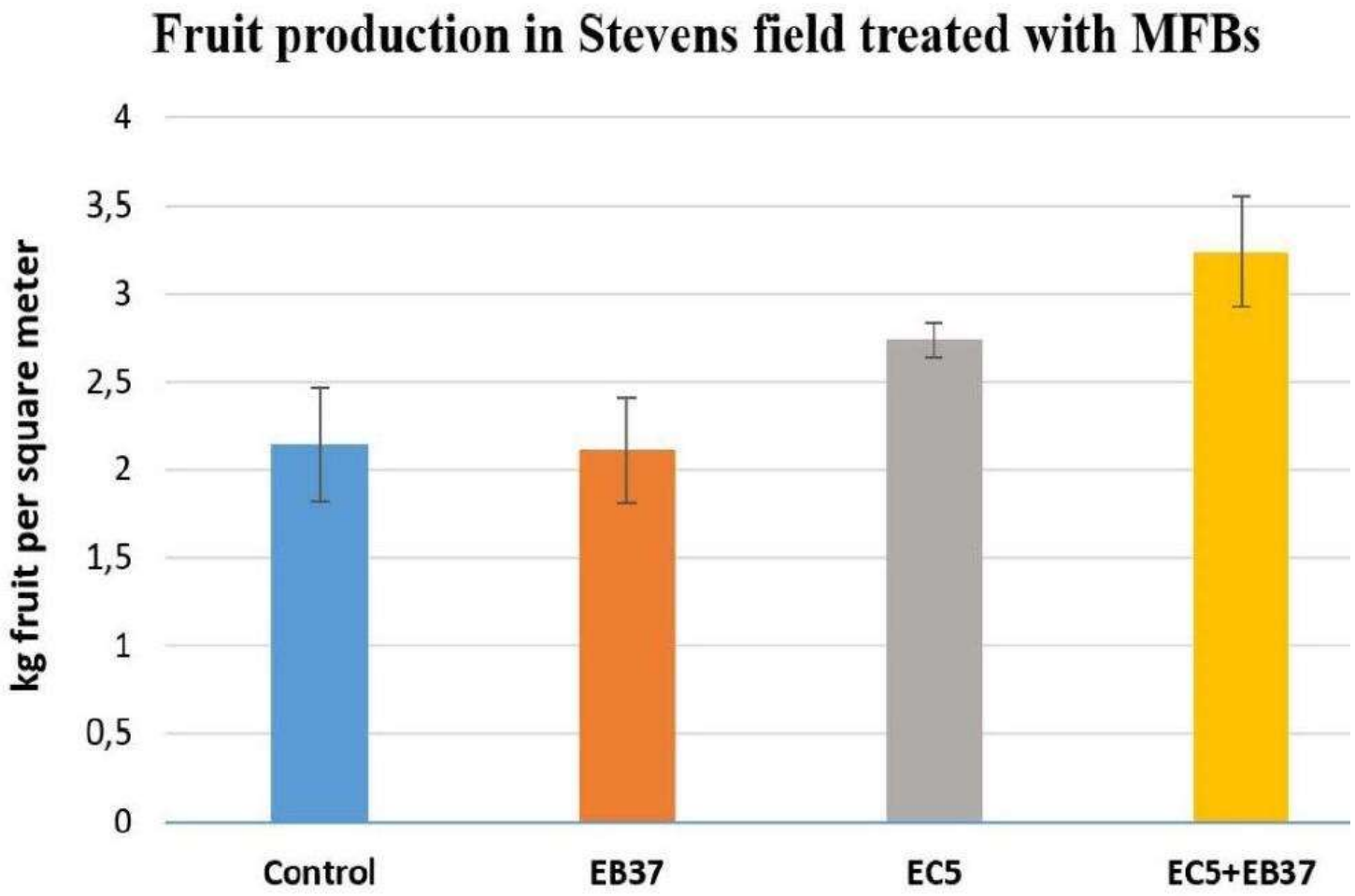


Résistances aux antibiotiques

- Multidrug (transporteurs)
- Tetracycline
- Tetracenomycin
- Tunicamycin
- Lincomycin

Par contre, dans une confrontation de *Bacillus velezensis* EB37 avec notre endophyte fongique favori, *Lachnum* EC5, les deux ne se chicanent pas, mais ils font belle équipe - et en stimulation de croissance des canneberges et en production de fruits !

Expériences aux champs: plus de fruits



2017

En 2018, résultats similaires dans le même champs, et dans un autre champs.

Conclusions

- **Les mycètes *Lachnum* sp. et *Phialocephala* sp. stimulent la croissance, et la formation de racines.**
- **La bactérie *Bacillus velezensis* contrôle les pathogènes fongiques.**
- ***Lachnum* EC5 and *Bacillus* EB37 sont compatibles, ils font belle équipe !**
- **Combiné, ils stimulent la productions de fruits (15-50%) dans les champs.**
- **L'analyse génomique confirme que ces endophytes sont de véritables machines de guerre (production de biopesticides). De plus, ils libèrent le phosphate insoluble dans le sol.**

Perspectives

- **Identifier plus d'endophytes qui fonctionnent en équipe**
- **Optimiser les traitements de champs, incluant production organique**
- **Inclure plus de cultivars de canneberges (Mullica Queen, Scarlet Knight)**
- **identifier des producteurs/distributeurs de formulations microbiennes (Lallemand? COOP Fédérée).**

MycAtok

Merci pour le support !

Consultants:

Jacques Painchaud (MAPAQ)
Jean-Pierre Deland (Oceanspray)
Richard Bélanger (pathogènes)

Producteurs de canneberges:

Bieler
Landreville
Godin
Lachance
Fortier
Montreuil

Nos amies les canneberges en symbiose avec *Lachnum* et *Bacillus*

NSERC CRSNG

Université de Montréal

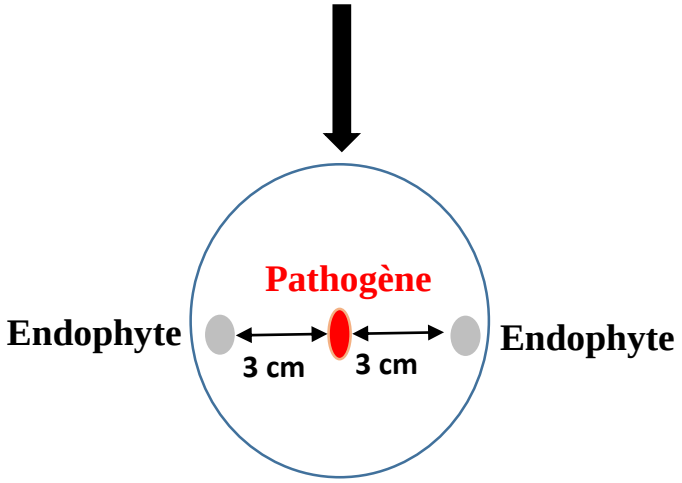
Agriculture, Pêcheries et Alimentation Québec

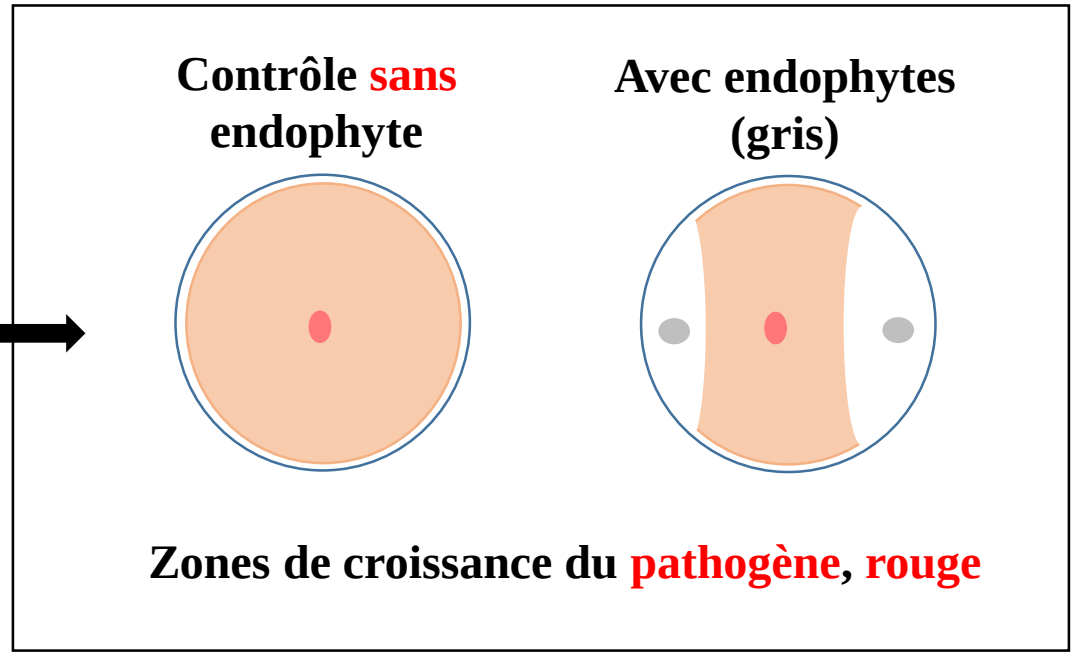
Ex.: Fungal endophytes that stimulate root formation

Increase of the number of roots, and of secondary roots, change of coloration (white to brownish) in the presence of these fungi.

Biocontrôle : Évaluation du grandeur de zones d'inhibition

Milieu PDA



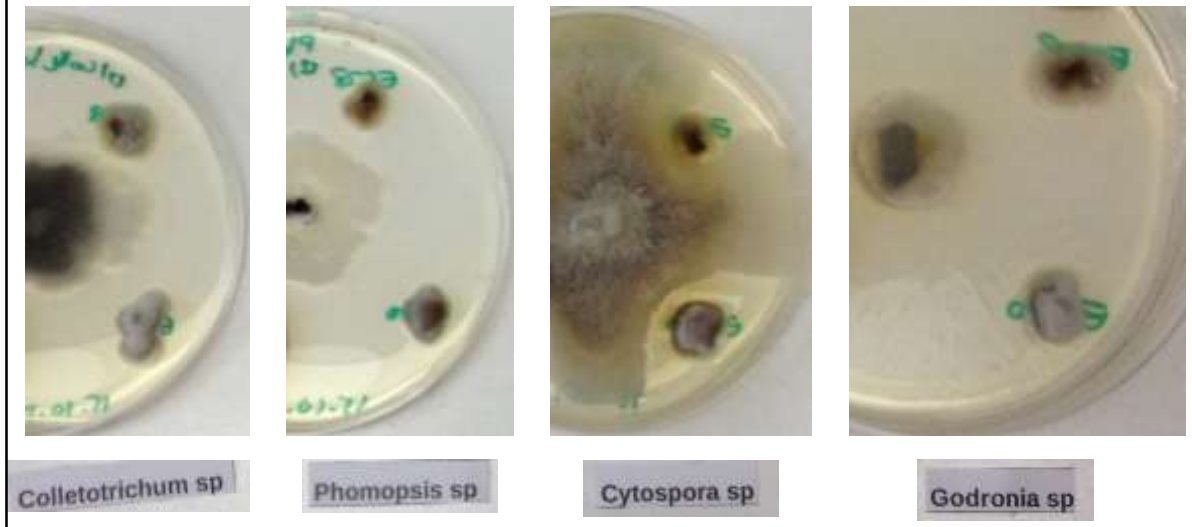


Zone d'inhibition

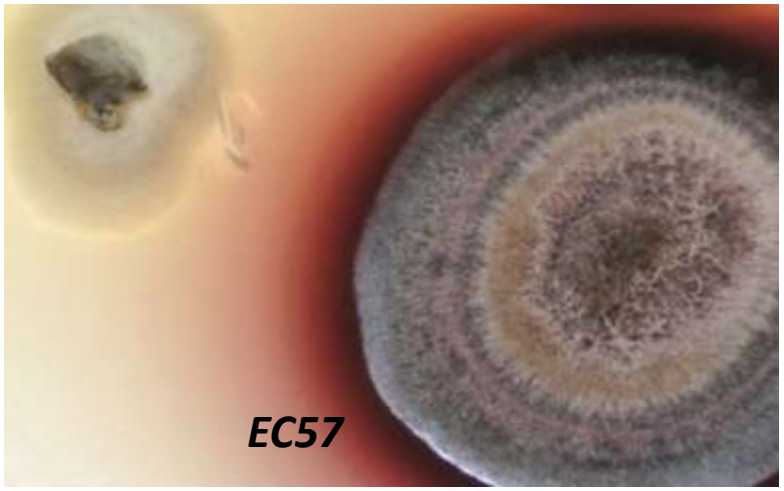
Pathogènes fongiques utilisés:

- *Colletotrichum gloeosporioides*
- *Phomopsis vaccinii*
- *Cytospora chrysosperma*
- *Godronia cassandrae*

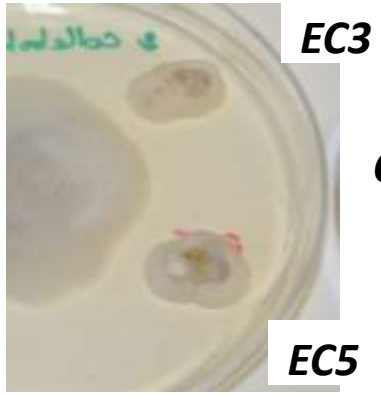
Biocontrôle avec les isolats de champignons endophytes



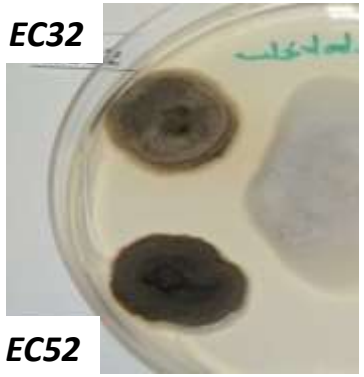
Inhibition de la croissance des 4 champignons pathogènes par *Phialocephala* sp au 6ème jour de la confrontation



Inhibition de la croissance de *Phomopsis vaccinii* par *Neonectria discophorma* au 6ème jour de la confrontation



Inhibition de la croissance de *Colletotrichum gloeosporioides* par *Lachnum* sp. au 6ème jour de la confrontation

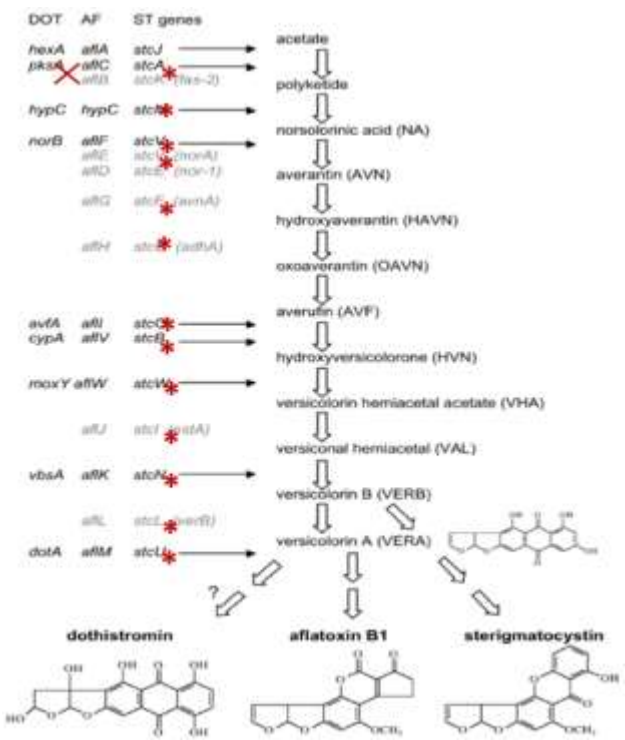


Inhibition de la croissance de *Colletotrichum gloeosporioides* par *Ascomycota* sp. au 6ème jour de la confrontation

Lachnum EC5: 59 genes of polyketide biosynthesis
12 genes of NRPS biosynthesis

I. Type I polyketides

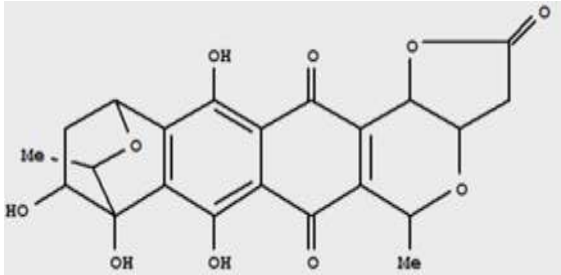
Sterigmatocystin biosynthesis genes



Lovastatin biosynthesis genes (medical interest)

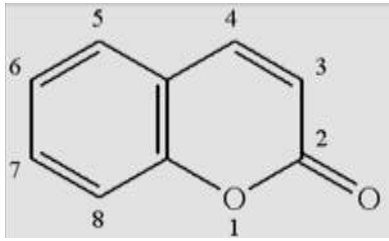
II. Type II polyketides

Granaticin biosynthesis genes



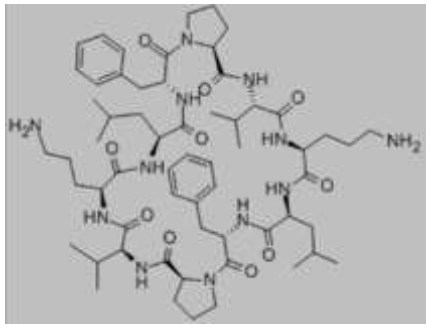
III. Type III polyketides

Alpha-pyrone biosynthesis genes



NRPS biosynthesis genes

Gramicidin biosynthesis genes



Chalcone biosynthesis genes

Other genes

- **Tetracenomycin biosynthesis genes**
- **Rebeccamycin biosynthesis genes**
- **Resistance genes to** Tetracycline, Quinidine, Leptomycin Oligomycin, Puromycin et Streptogramin