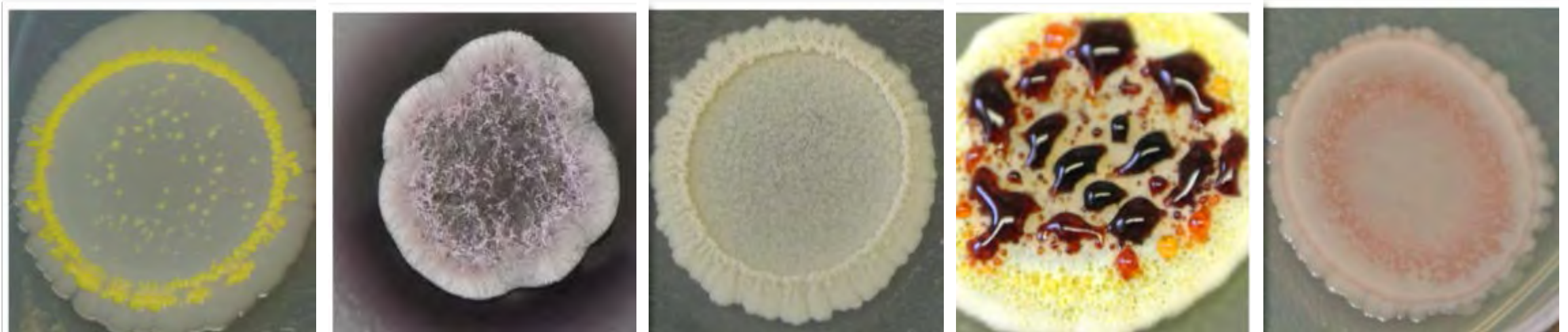


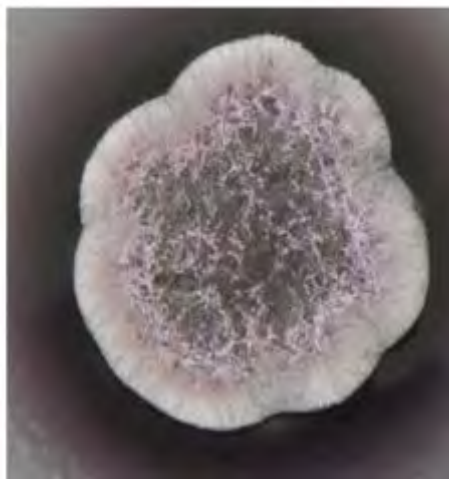
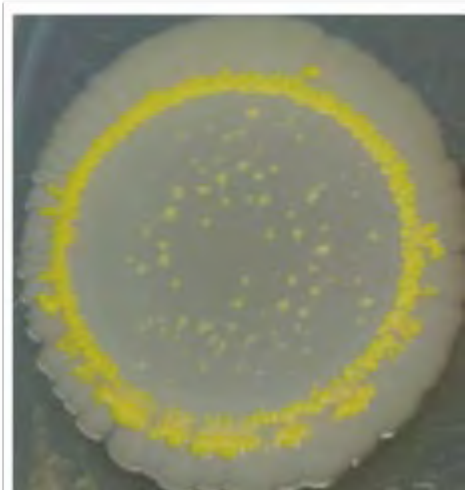
Le microbiome de la canneberge

Lila N. Salhi, Lise Forget, Gertraud Burger and B. Franz Lang

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



Comment tirer profit de la flore microbienne bénéfique associée aux différentes cultures ?



Plan de la présentation

- 1. Les microbes pathogènes et bénéfiques dans les sols**
- 2. Biofertilisation et biocontrôle**
- 3. Diversité microbienne influencée par le mode de production**
- 4. Les microbes symbiotes de la canneberge**
- 5. Les métabolites secondaires de la canneberge**
- 6. Conclusion**

La diversité des microbes dans les sols agricoles

Des **milliers d'espèces microbiennes** dans le sol

- Différences entre champs, zones climatiques, saisons, structures des sols, pH ...
- Dépendant des plantes, du régime de fertilisation, de l'irrigation etc.

Trois catégories d'espèces :

- **Minorité réputée : pathogènes**
- **Majorité : sans bénéfice direct** pour les plantes
- **Minorité mal connue: avec bénéfice direct** pour les plantes

Catégorie 1 : Pathogènes microbiens des plantes

Ex: Le Mildiou de la pomme de terre causé par *Phytophthora infestans*

Cause des infections dans :

- **Monoculture** d'une **variété susceptible**
- Sols **humides** et **mal-drainés** (- oxygène)
- **Climat** humide
- Contrôle manquant de la qualité des tubercules pour les plantations

Solutions: Pesticides ou alternatives (voir prochaine présentation de Jean-Martin)



Catégorie 2 : Majorité des microbes considérée ‘sans effet direct’

Large communauté diverse agissant de concert :

- **Décomposition de la matière organique dans le sol**
- **Fixation de l’azote atmosphérique**
- **Solubilisation du phosphate**
- **Sécrétion de composants bioactifs divers.**

Sans effet direct, mais ...

Conséquences pour les plantes :

- Enrichissement de nutriments disponibles pour les plantes, (**biofertilisation**)
- Fixation d'azote atmosphérique (**biofertilisation**)
- Solubilisation de phosphate insoluble (**biofertilisation**)
- Suppression de pathogènes, biopesticides (**biocontrôle**)
- Composants sécrétés stimulant la croissance (**biofertilisation**)

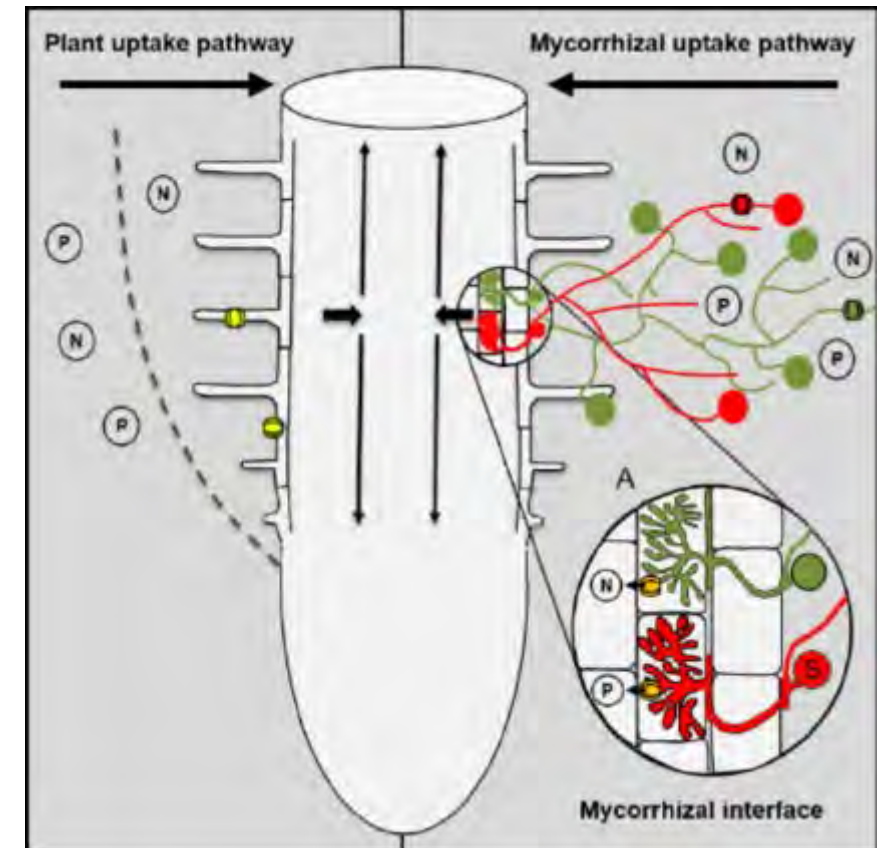
Une **large diversité microbienne** est **positive pour les plantes**, dont profite **l'agriculture biologique**.

Catégorie 3 : Microbes bénéfiques pour les plantes

- La plupart interagissent directement avec les plantes (**symbiotes**)
 - dans la zone racinaire (*‘rhizosphère’*)
 - à l'**intérieur** des tissus (mycorhizes et/ou *‘endophytes’*)
 - **certains sont visiblement bénéfique**, dans un sens agronomique

Les **champignons** mycorhiziens sont dans les racines

Les **bactéries** endophytes dans toutes les parties des plantes.



Les champignons mycorhiziens AMF solubilisent le phosphate et transportent les nutriments.
(Bücking, Plant Science, 2012)

Catégorie 3 - Ex: AMF mycorhiziens



Notre système d'étude : La canneberge

- **Vivace, famille des Ericacées**
- **Native d'Amérique du Nord**
- **Contient des flavonoïdes etc. appliquées en médecine (infections urinaires, etc.)**



Vaccinium macrocarpon Ait

- **Peu d'information sur des mycorhizes et endophytes des Ericaceae**
- **Carrément rien sur les cultivars populaires de la canneberge**

Nos Objectifs

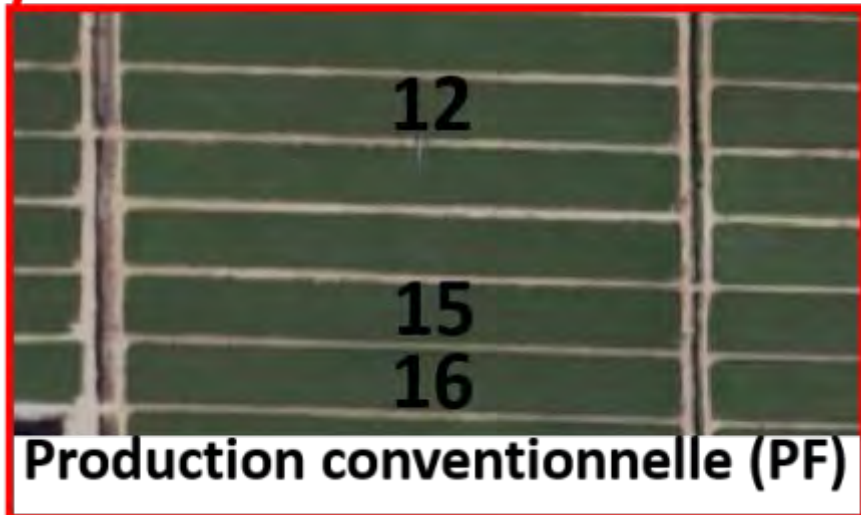
1. Identification des mycorhizes/endophytes de la canneberge
2. Identification des isolats qui stimulent la croissance des plantes
3. Études de spécificité sur les cultivars de canneberge
4. Identification des gènes impliqués, et analyse de leur expression
5. Développement de méthodes pour les applications agronomiques :
traitement de nouvelles plantations, et de champs existants
6. Focus sur des isolats microbiens qui sont **faciles à propager**, en masse
7. Focus sur des isolats qui **suppriment les pathogènes** de la canneberge et qui stimulent la croissance et **production de fruits**

Lieux d'échantillonnage

Notre-Dame-de-Lourde



Saint-Louis-de-Blandford



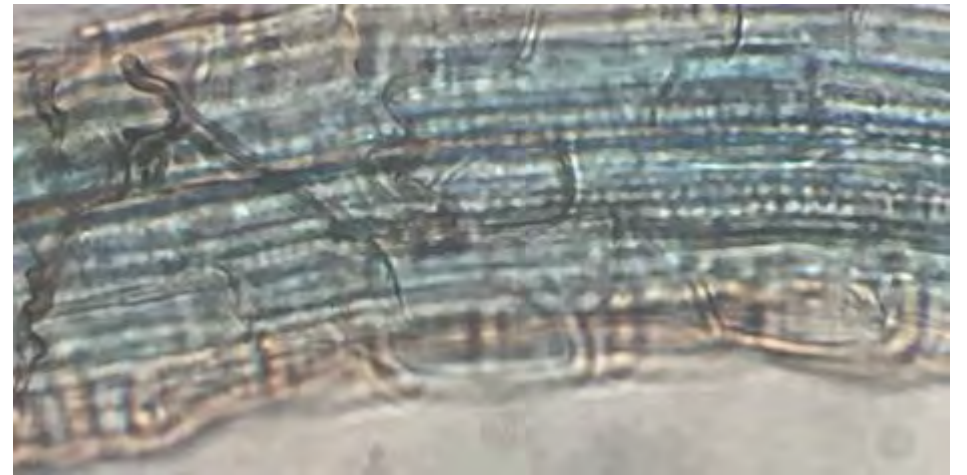
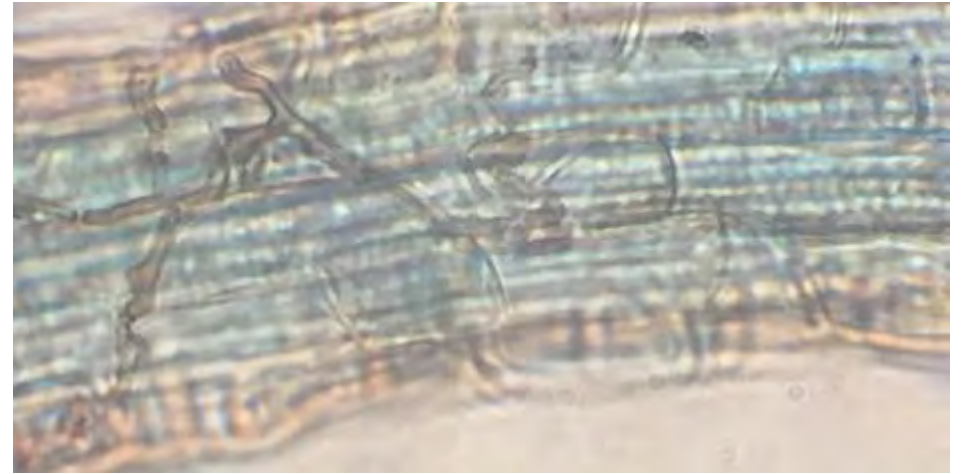
Production conventionnelle (PF)



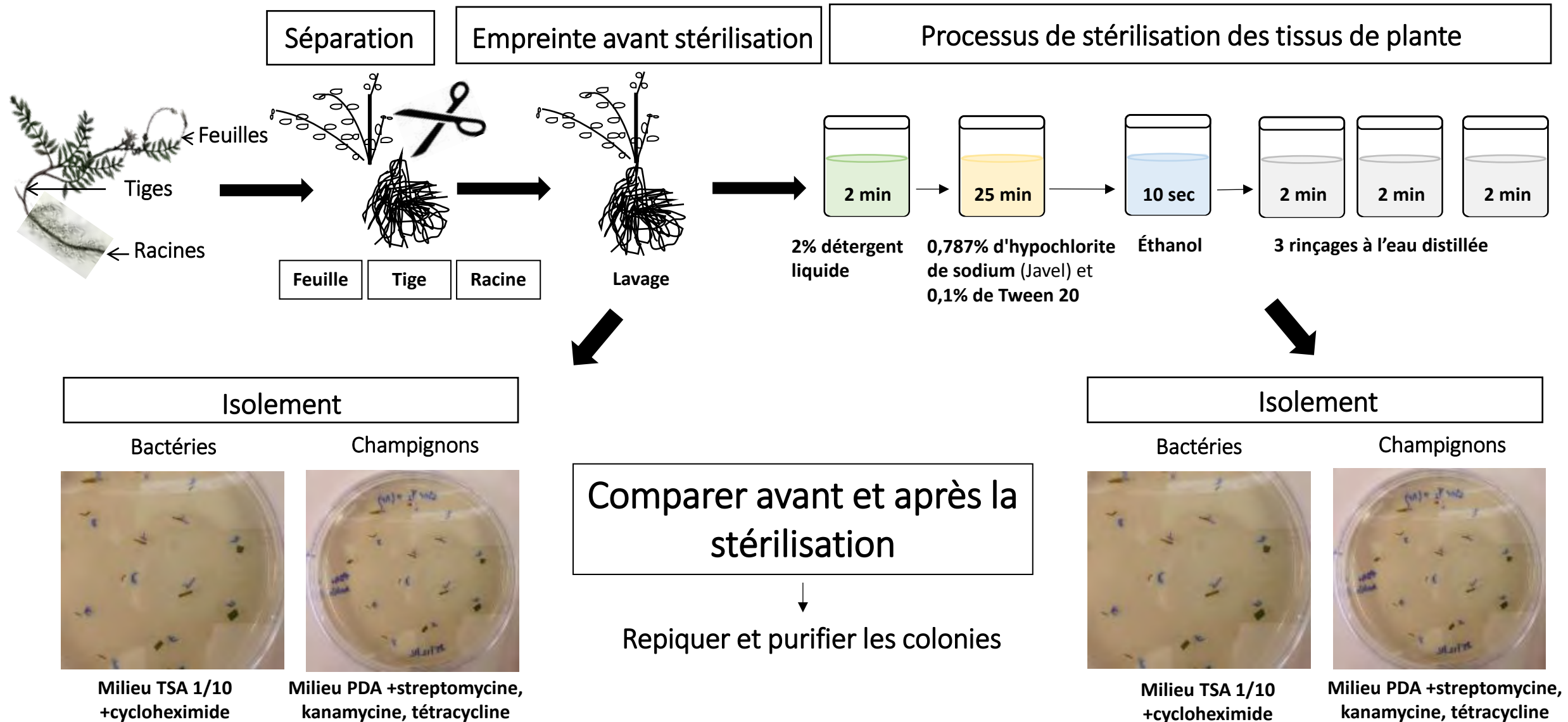
Production
organique (Y)

- 7 Champs échantillonnés
- 3 plantes par champ
- Variété Stevens
- **Choix de champs et de plantes les plus productives**

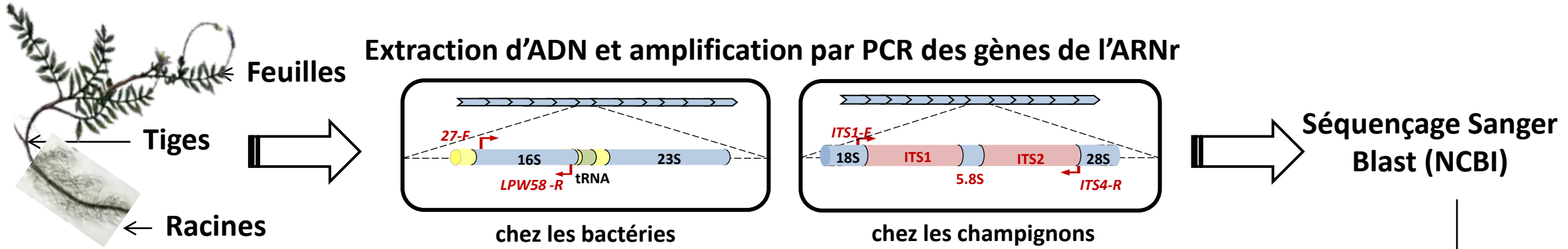
***Phialocephala* sp., en intérieurs des racines de canneberges**



Procédures: : isolement des endo- et exo-phytes



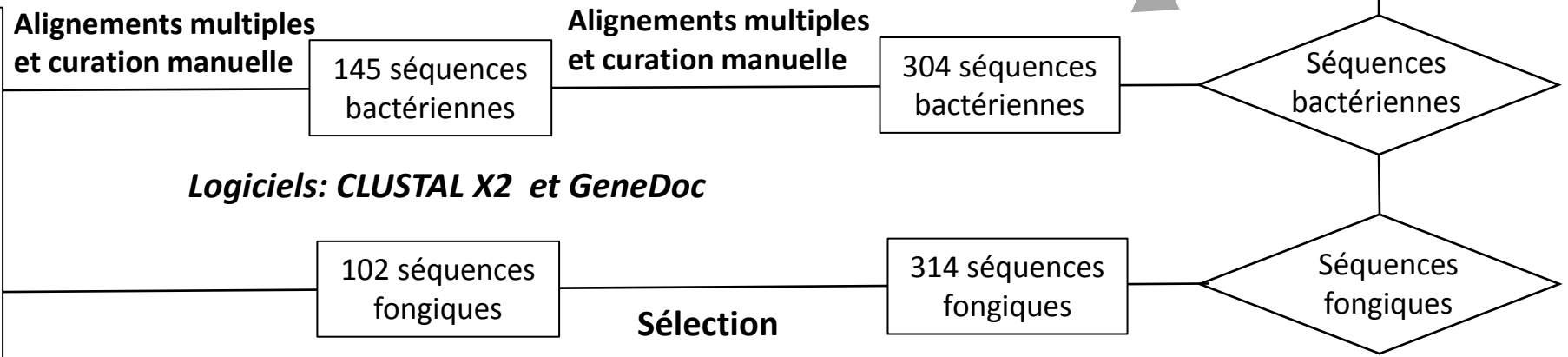
Identification taxonomique des endophytes



Isolement et culture

Espèces proches téléchargées de NCBI

- **Construction des arbres phylogénétiques (Mr. Bayes)**
 - Méthode bayésienne
 - Les chaînes de Markov
 - Technique de Monte Carlo
 - Identification des espèces par placement sur les arbres



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

Une diversité d'endophytes inattendue: 136 microbes isolés



25 % : partie aérienne

| Stevens | Mullica Queen |
|--|--|
| Bactéries <i>Rhodococcus sp.</i> | Bactéries <i>Bacillus velezensis</i> |
| Champignons <i>Godronia cassandrae</i> <i>Nemania serpens</i> <i>Diaporthe sp.</i> | Champignons <i>Diaporthe sp.</i> |
| Bactéries <i>Pseudomonas sp.</i> <i>Burkholderia sp.</i> | Bactéries <i>Bacillus thuringiensis</i> |
| Champignons <i>Phomopsis vaccinii</i> <i>Meliniomyces variabilis</i> <i>Uncultured Helotiales</i> <i>Cytospora chrysosperm</i> <i>Colletotrichum sp.</i> | <i>Phialocephala sp.</i> <i>Godronia cassandrae</i> <i>Pythium sp.</i> <i>Lachnum sp.</i> |

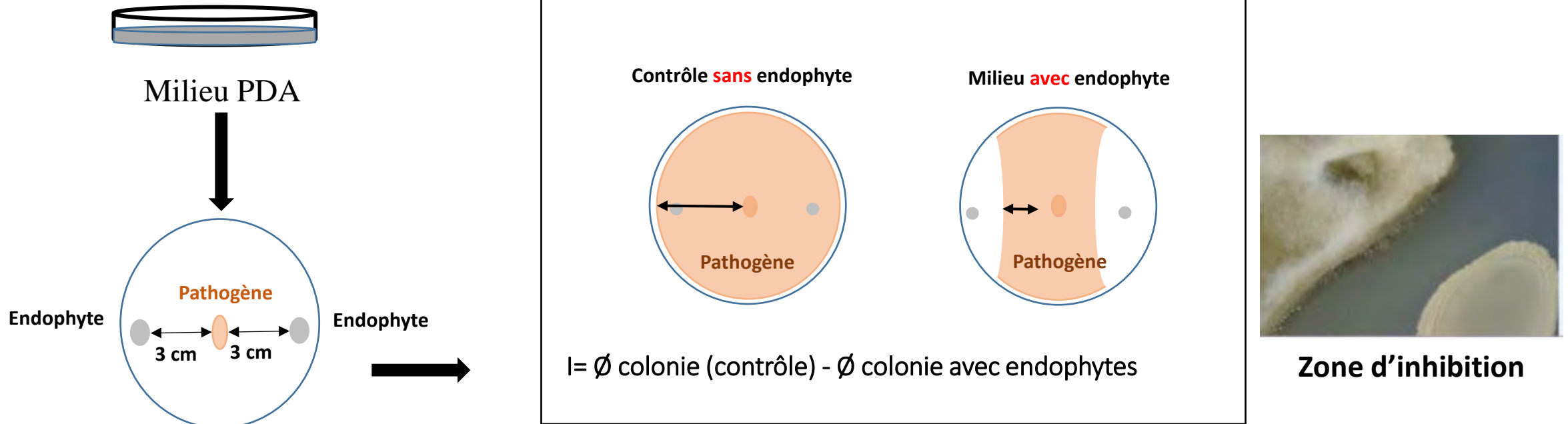
Noir:
Potentiellement bénéfique

Rouge:
Pathogène potentiel

**Donc les plantes en santé
vivent en symbiose avec des
pathogènes (dormants)**

75 % : Racines

Démonstration de biocontrôle : zones d'inhibition

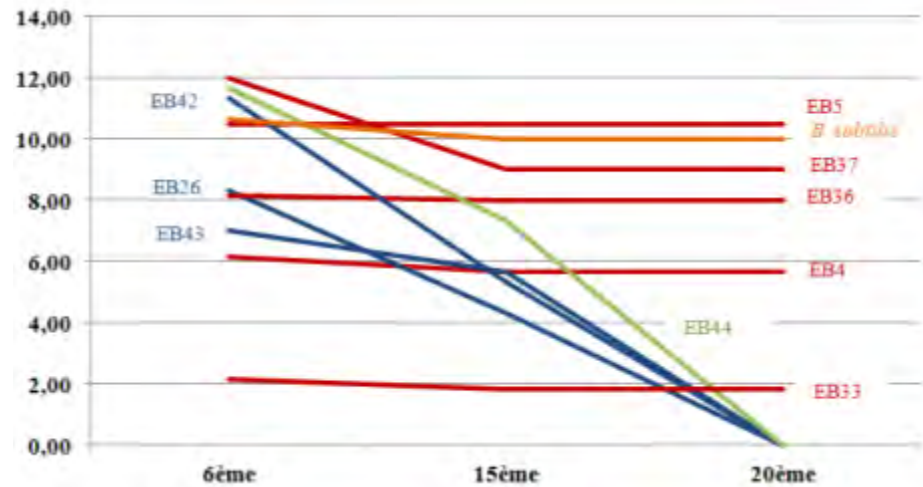


Pathogènes fongiques utilisés:

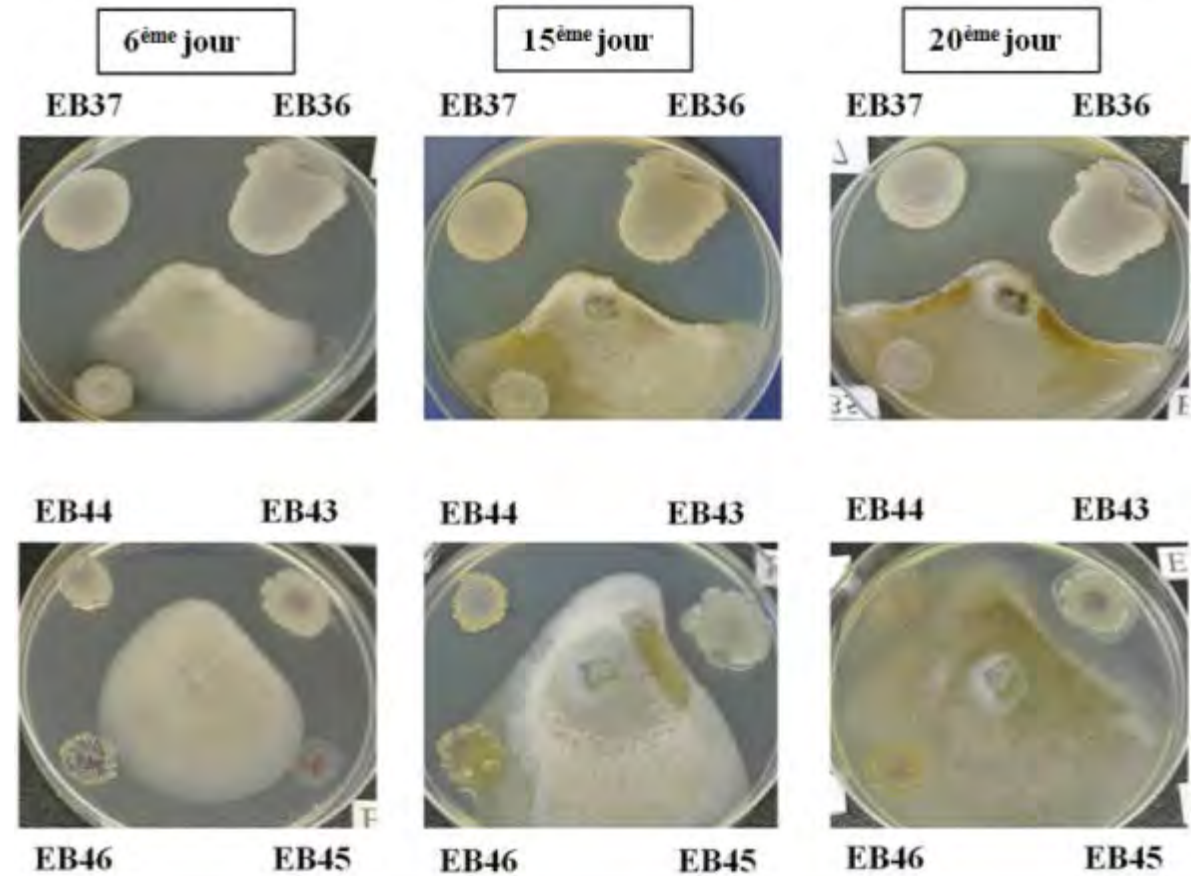
- *Colletotrichum gloeosporioides*
- *Phomopsis vaccinii*
- *Cytospora chrysosperma*
- *Godronia cassandrae*

Évaluation de l'inhibition du mycélium fongique

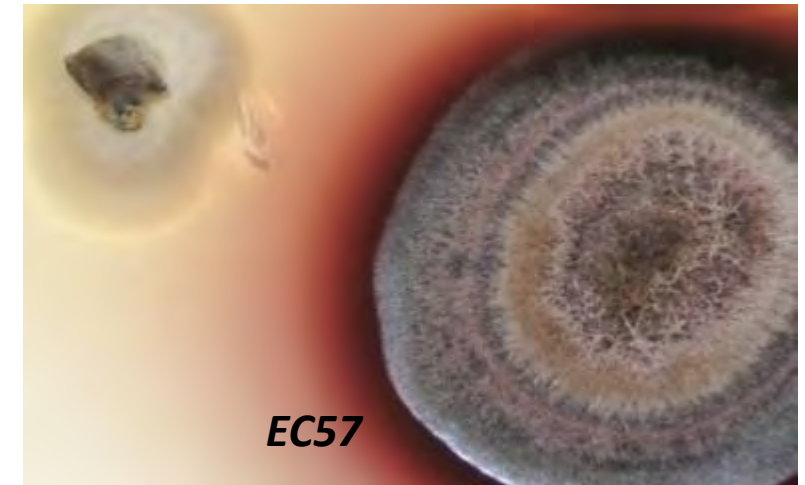
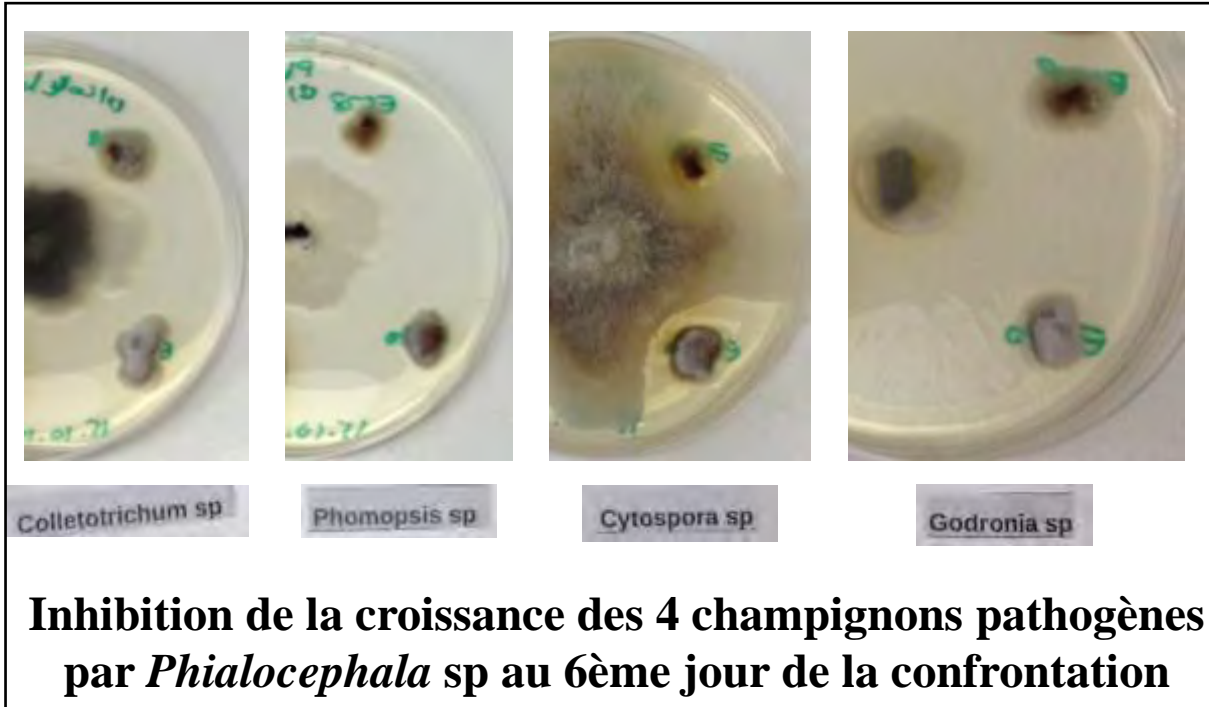
Bactéries: biocontrôle durable par *Bacillus velezensis*



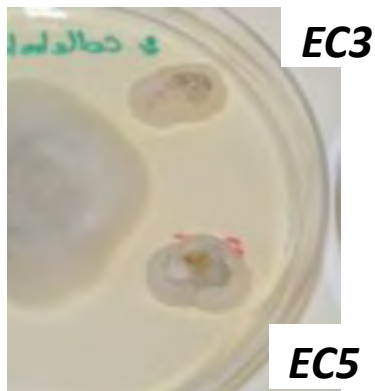
- *Bacillus subtilis* (réf)
- *Bacillus velezensis* (EB 4, EB33, EB5, EB36, EB37)
- *Pseudomonas* sp. (EB 26, EB42, EB 43)
- *Rahnella aquatilis* (EB 44)



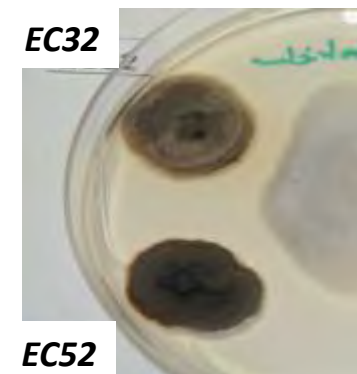
Biocontrôle avec les isolats de **champignons endophytes**



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

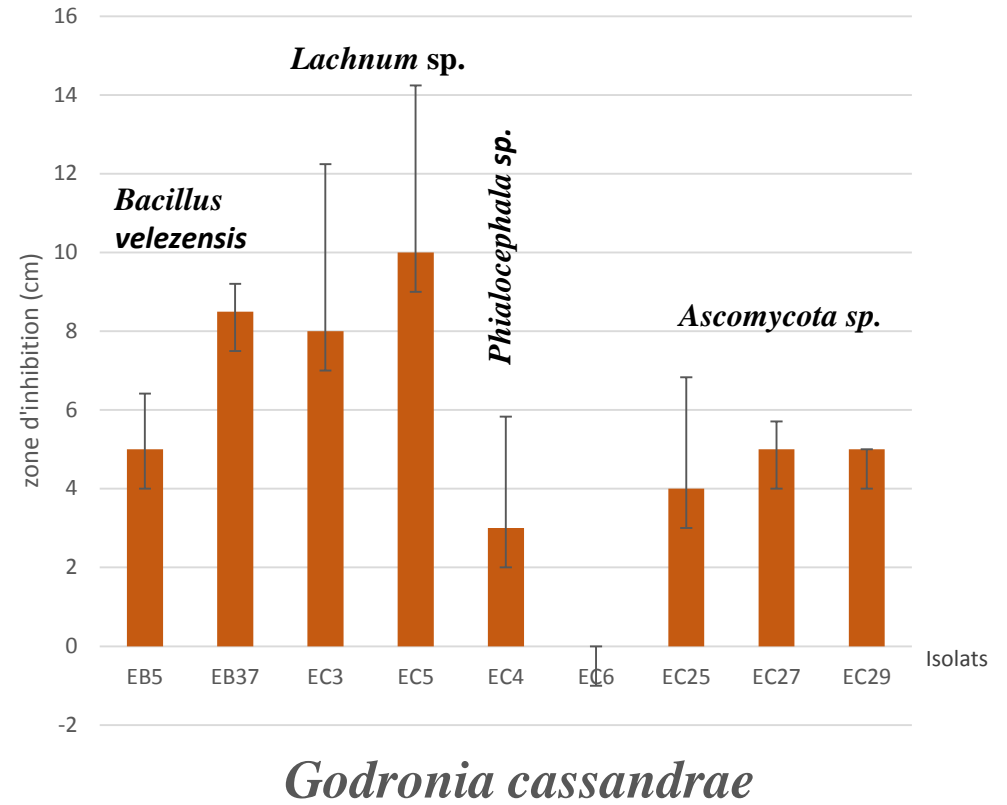
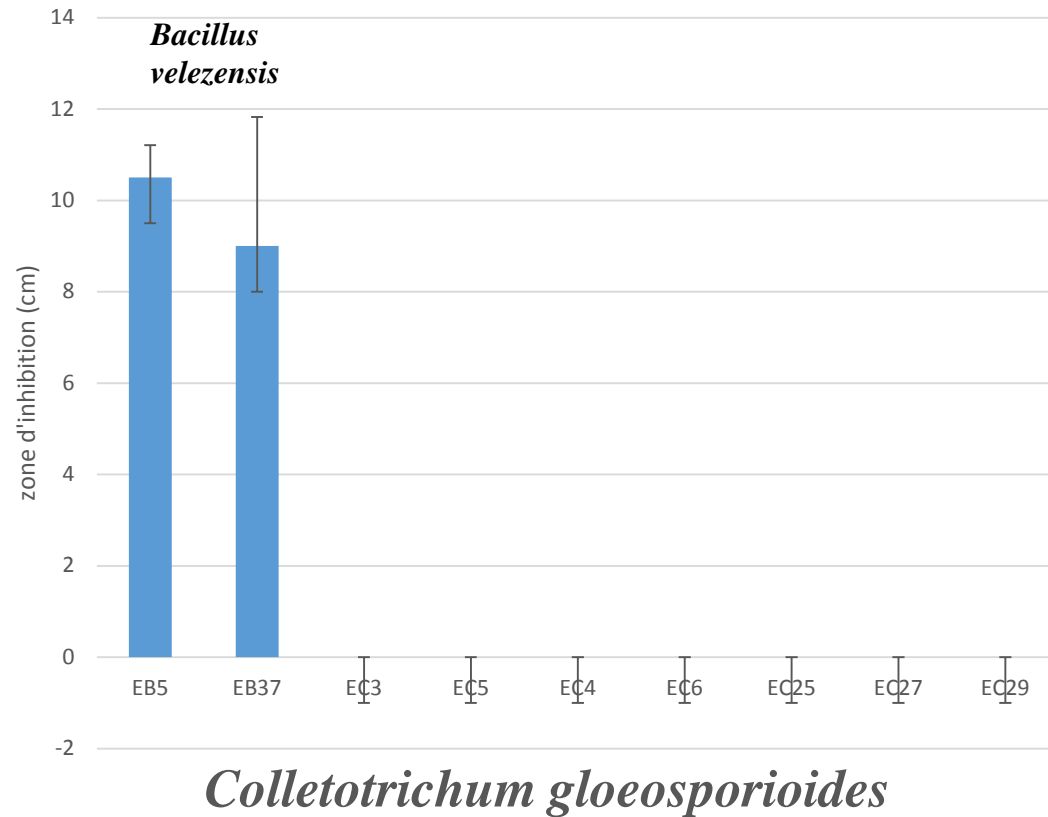


Inhibition de la croissance de *Colletotrichum gloeosporioides* par *Lachnum* sp. au 6ème jour de la confrontation



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

Biocontrôle sur deux pathogènes fongiques importants



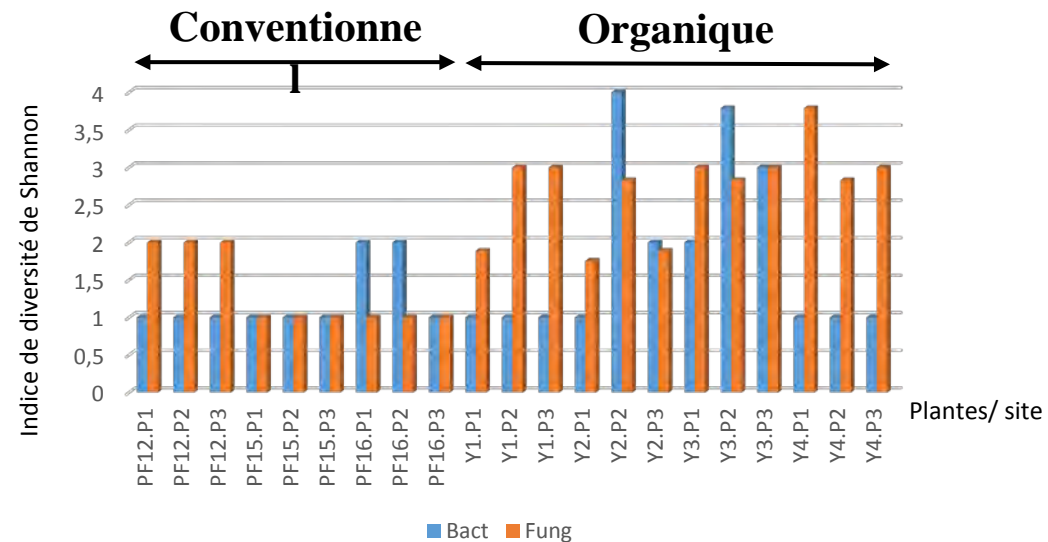
**Pour les gagnants en biocontrôle et biofertilisation,
la bactérie *Bacillus velezensis*
et les champignons *Lachnum* et *Phialocephala***

**nous avons des protocoles de production en quantité
industrielle.**

**(Les mycorhizes AMF ne fonctionnent pas avec les canneberges,
sont très chers, et difficiles à propager ...)**

La production organique augmente la diversité d'endophytes

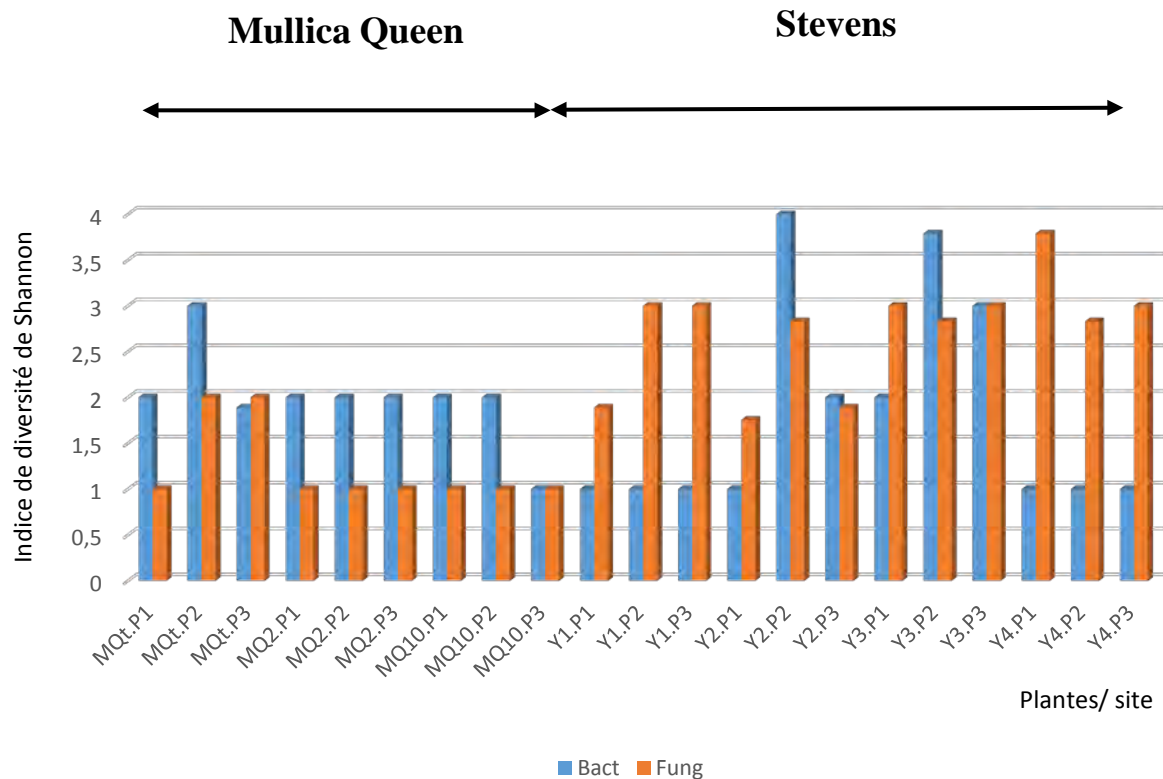
Diversité en espèces endophytes entre les systèmes de production organique et conventionnel



La distribution en endophytes est influencée par les pratiques culturales. La production organique favorise la diversité des espèces endophytes

La diversité des endophytes influencée par le cultivar

Diversité en espèces endophytes entre les variétés Stevens et Mullica Queen



- Diversité en espèces endophytes plus importante chez Stevens
- Bactéries prédominantes chez Mullica Queen, Champignons prédominants chez Stevens

Les endophytes de la canneberge possèdent des **spécificités variétales** et sont plus diverses chez la variété Stevens vs Mullica Queen

Solubilisation du phosphate et stimulation de la croissance racinaire





Bacillus velezensis
Milieux avec de l'hydroxyapatite



Bacillus velezensis
Milieux avec phytate

Plante inoculée avec *Lachnum* sp.

Plante sans endophyte



SF: sans fertilisation
F: avec fertilisation
-N: manque d'azote
PI: présence de phosphate insoluble

***Lachnum* sp. stimule la croissance des racines (*) en présence de fertilisation (F) et de phosphate insoluble (PI) par rapport au contrôle sans endophyte**

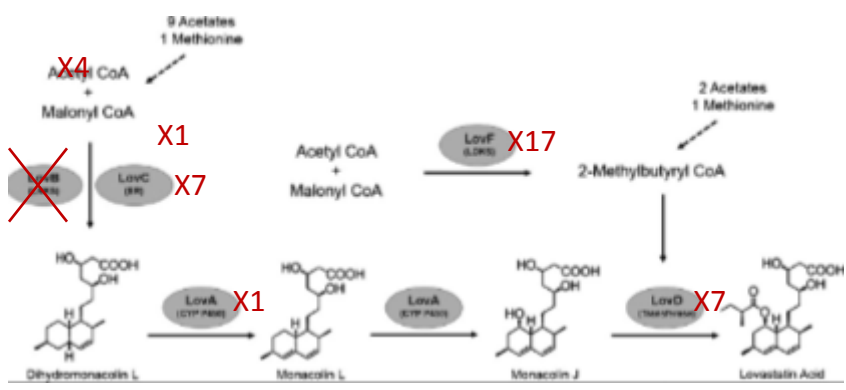
Lachnum sp. et *Bacillus velezensis* :
des machines de production de biopesticides

Lachnum sp: 59 gènes de synthèse de biopesticides polykétides

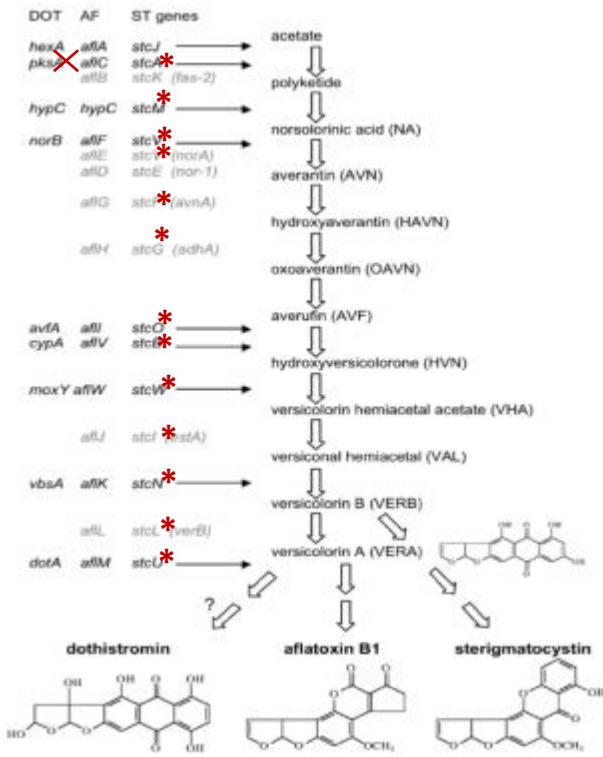
I. Polykétides de type I

1. Phthiocerol/phenolphthiocerol synthesis polyketide synthase type I PpsC

2. Gènes de biosynthèse du polykétide Lovastatin (substance d'intérêt médicale)

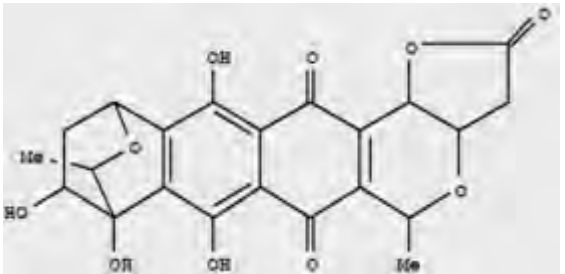


3. Gènes de biosynthèse du polykétide Sterigmatocystin (mycotoxine)



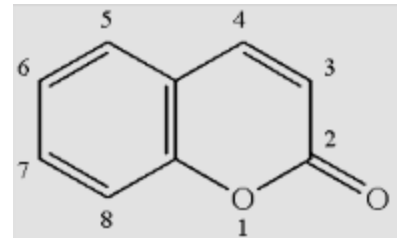
II. Polykétides de type II

Gène de biosynthèse du Granaticin (antibiotique)



II. Polykétides de type III

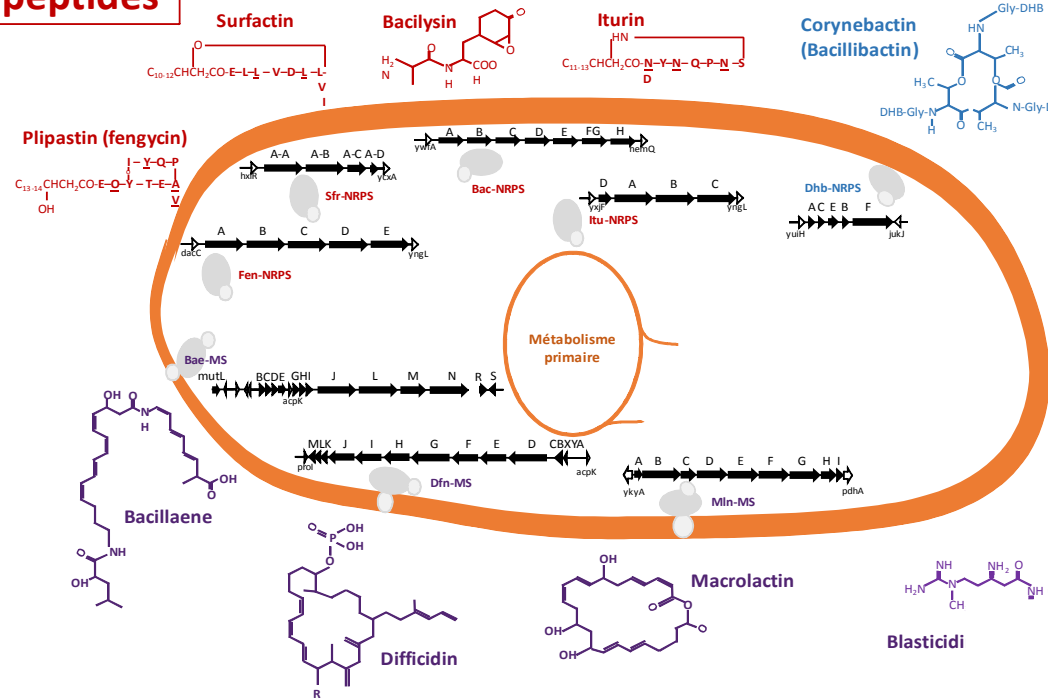
Gène de biosynthèse du alpha-pyrone (antibiotique)



Bacillus velezensis: machine de biocontrôle encore plus performante

Synthèse peptidique non-ribosomique (NRPS)

Lipopeptides



Synthèse de polykétides (PKS)

II. Gènes de résistance aux antibiotiques

- Multidrug resistance protein
- Tetracycline resistance protein
- Tetracenomycin C resistance and export protein
- Tunicamycin resistance protein
- Lincomycin resistance protein

III. Pompes à efflux

- Multidrug-efflux transporter 2 regulator
- Multidrug efflux protein YfmO
- Putative efflux system component YknX

Conclusions

136 taxons d'endophytes identifiés dans la canneberge.

La composition de la communauté d'endophytes dépend du cultivar

La diversité est plus importante en production organique.

Les champignons *Phialocephala* sp et *Lachnum* sp. stimulent la croissance racinaire.

La bactérie *Bacillus velezensis* supprime des pathogènes et stimule la croissance des tiges.

***Lachnum* et *Bacillus* sont compatibles et font équipe!**

Traitement de champs expérimentaux en cours

Remerciements

Matt Sarrasin (analyse de génomes)

Jacques Painchaud (MAPAQ)

Jean-Pierre Deland (Oceanspray)

Producteurs de canneberges:

Bieler, Landreville, Godin, Fortier, Montreuil

