HAL
open science

Comparative genomics of Botrytis cinerea and related Ascomycota species

Nicolas Lapalu, Joelle J. Amselem, Hadi Quesneville, Marc-Henri M.-H. Lebrun

To cite this version:

Nicolas Lapalu, Joelle J. Amselem, Hadi Quesneville, Marc-Henri M.-H. Lebrun. Comparative genomics of Botrytis cinerea and related Ascomycota species. 8. Rencontres de Phytopathologie - Mycologie de la Société Française de Phytopathologie (SFP), Jan 2010, Aussois, France. hal-02751266

HAL Id: hal-02751266

https://hal.inrae.fr/hal-02751266v1

Submitted on 3 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Poster n°3.1

Use of transposon mutagenesis for tagging genes involved in trichothecenes production in two plant pathogenic *Fusarium* spp

C. Barreau (1), M. Dufresne (2), C. Vasnier (2), G. Ortu (2), V. Atanasova (1), J. Merhej (1), P. Lopez (1), M.-N. Bonin-Verdal (1), F. Turtaut (1), M.-J. Daboussi (2)

(1) MycSA INRA UR1264, BP81, 33883 Villenave d'Ornon Cedex, France
(2) Institut de Génétique et Microbiologie, Université Paris-Sud, 91405 Orsay Cedex, France

In the past ten years, insertional mutagenesis has been widely used to identify pathogenicity determinants in plant pathogenic fungi. One of the interesting approaches involves transposons. In order to estimate the efficiency of the *Fusarium oxysporum impala* or *mimp1*-based mutagenesis systems as mutagenic tools in two heterologous pathogenic *Fusarium* species (*F. graminearum* and *F. culmorum*) producing the mycotoxins deoxynivalenol (DON) or acetylated deoxynivalenol (3- or 15- ADON), two collections of several hundred revertant strains were generated for each species. The *impala* autonomous element was used in *F. culmorum* and the double component system *mimp1/impala* (Dufresne *et al.,* 2007 Genetics 175: 441-452) was developed in *F. graminearum*. The two generated collections have been previously screened for pathogenicity on wheat host (Dufresne *et al.* JJC 2008, n°26; Dufresne *et al.* 2008 FGB 45: 1562-1561). Here we evaluated the potential use of these collections to screen for mutations affecting trichothecenes production. This approach is expected to allow identification of new unpredictable genes implicated in regulation of trichothecene B production. About 300 *F. culmorum* strains revertant for *impala* insertion were grown in a synthetic medium and screened by HPLC/MS direct analysis for DON and 3-ADON production. After three rounds of screening, 5 strains producing no detectable level of toxin and 4 strains producing low to very low level of toxin were obtained. Molecular analysis of these revertants is underway in order to determine if the *impala* transposon moved and inserted into a gene directly or indirectly involved in trichothecene B biosynthesis. About 350 *F. graminearum* revertant strains obtained using the double *mimp1/impala* component system were also screened as above and 10 strains affected in production of DON and 15-ADON were retained after three rounds of selection. Of these, 4 did not produce any DON nor 15-ADON, 4 produced very low levels of the toxins and 2 produced a higher level of toxin than the control. Molecular analysis of the revertant strains showed that for 2 strains no *mimp1* excision was detected suggesting these are false revertants. For 5 other strains the insertion was in a non coding region far away (>1000 bp) from any ORF. For 2 non-producing mutants, the insertion was closer.

Keywords: Fusarium, mycotoxines, trichotecenes, mutants, transposon tagging

Poster n°3.2

Diversité intra-spécifique des fonctions protéolytiques chez *Laccaria bicolor* : analyse transcriptomique par oligo-array

M. Buée (1), A. Kohler (1), P. Rosikiewicz (1), C. Bach (1), E. Lucic (2), A. Brun-Jacob (1,2), F. Martin (1)

(1) UMR INRA/UHP 1136, Interactions Arbres - Microorganismes, INRA de Nancy, 54280 Champenoux, France
(2) UMR INRA/UHP 1136 Interactions Arbres - Microorganismes, Nancy Université, 54506 Vandoeuvre cedex, France

Dans les sols des forêts boréales, tempérées et méditerranéennes, l'azote est majoritairement séquestré sous des formes organiques et l'acquisition de cet élément par les arbres est intimement dépendante des activités protéolytiques des champignons ectomycorhiziens (ECM) qui leur sont associés. Différentes études focalisées sur la production de protéases extracellulaires ont montré que ces champignons avaient des capacités saprotrophiques variables pour mobiliser l'azote à partir de sources organiques puis absorber et transférer l'azote à l'arbre-hôte. Cependant, les données acquises restent encore parcellaires et l'immense diversité spécifique des communautés ECM et la multiplicité des protéases potentiellement impliquées dans ces fonctions soulignent l'importance de pouvoir se focaliser, dans un premier temps, sur un modèle biologique. Le séquençage du champignon ectomycorhizien, souche H82 de *Laccaria bicolor* (Martin *et al.* 2008), offre une perspective remarquable pour l'étude des capacités de mobilisation de l'azote organique et de transfert de l'azote vers l'arbre par son partenaire fongique. Les capacités protéolytiques de la souche H82 ont été comparées à celles de diverses autres souches homocaryotiques issues de la même descendance. A l'instar de ce qui avait été rapporté par différents auteurs (Guidot *et al.* 2005), nous avons observé une forte variabilité intra-specifique pour cette capacité protéolytique. Ainsi, en sélectionnant deux souches homocaryotiques de *L. bicolor* aux capacités protéolytiques très contrastées, nous avons pu étudier à partir d'oligo-puces NimbleGen génome entier l'expression des différents gènes codant des peptidases ou liés au transport et au métabolisme de l'azote. Cette analyse transcriptomique a permis d'identifier des gènes, codant des peptidases, surexprimés jusqu'à 300 fois dans la souche offrant la plus grande activité protéolytique. L'analyse de l'expression de ces peptidases et la co-régulation d'autres modèles de gènes associés (en particulier transporteurs de peptides, d'acides aminés et d'ammonium) sera discutée. Enfin, la généricité des ces marqueurs pourra être éprouvée par l'exploitation de collections de souches fongiques dans la perspective d'étude *in situ* de l'expression des gènes liés à la mobilisation de l'azote organique dans les sols forestiers.

(1) Guidot, A. *et al.* 2005. Mycorrhiza 15, 167-177.
(2) Martin F. *et al.* 2008. Nature 452, 88-92.

Mots-clés : protéases, *Laccaria*, champignon ECM, Azote organique, mobilisation, transport

Une nouvelle famille fongique de transporteurs de dipeptides, isolés par une approche métatranscriptomique à partir d'un sol forestier.

C. Damon, L. Vallon, L. Fraissinet-Tachet, R. Marmeisse

Université Lyon 1, Ecologie Microbienne, UMR CNRS 5557, USC INRA 1193, Bâtiment André Lwoff, 43 Boulevard du 11 Novembre 1918, F-69622 Villeurbanne Cedex, France.

Dans les sols forestiers des régions tempérées, l'azote est un élément limitant de la croissance des organismes vivants. Jusqu'à 95 % de l'azote total est séquestrée sous forme de polymères organiques récalcitrants (protéines, peptides, sucres aminés, acides nucléiques, composés polyphénoliques) (Chalot & Brun, 1998). Les microorganismes du sol mettent en place diverses stratégies de dégradation et d'assimilation de l'azote organique. Contrairement au transport d'acides aminés, qui est globalement bien étudié, le transport de petits peptides est beaucoup moins connu. Chez les microorganismes, la capacité de transport de dipeptides présente un avantage nutritionnel, comme sources d'acides aminés, de carbone et d'azote. Cependant, les systèmes de transport de dipeptides peuvent également être la cible d'agents antifongiques ou antimicrobiens et être une source de vulnérabilité biologique. Chez les champignons, le transport d'oligopeptides n'est bien étudié que chez quelques organismes modèles (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*) (Chalot & Brun, 1998). Afin de mieux comprendre la diversité des stratégies fongiques en relation avec le transport de dipeptides, nous avons recherché des gènes impliqués dans cette fonction par l'étude du métatranscriptome eucaryote d'un sol forestier. Le « métatranscriptome » correspond à l'ensemble des gènes exprimés par les différents microorganismes d'un environnement. Les ARN messagers polyadénylés ont été spécifiquement isolés à partir de l'ARN total du sol, convertis en ADNc pour construire une banque d'ADNc. Des gènes liés au transport de dipeptides ont été recherchés dans cette banque, par complémentation fonctionnelle hétérologue d'une souche de levure mutée pour les transporteurs de dipeptides Ptr2p et Dal5p. Cette technique a permis d'isoler 6 gènes différents, codant potentiellement des transporteurs de dipeptides fongiques, dont la séquence et la structure diffèrent par rapport aux autres transporteurs de dipeptides connus. Pour 2 de ces transporteurs, nous avons déterminé le spectre d'utilisation des dipeptides dans la souche de levure double mutante Ptr2/Dal5p transformée par ces transporteurs, en utilisant le système Omnilog/Biolog. Les premiers résultats montrent un spectre d'utilisation des dipeptides relativement large, mais qui diffère entre les 2 transporteurs.

(1) Chalot, M. & Brun, A. (1998). Physiology of organic nitrogen acquisition by ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizas. FEMS Microbiology Reviews 22, 21- 44.

Mots-clés : transport de dipeptides, champignons, métatranscriptome, sol forestier

Poster n°3.4

Identification de transcrits d'*Hemileia vastatrix*, l'agent de la rouille orangée du caféier, par pyro-séquençage 454 de feuilles infestées de *Coffea arabica*

D. Fernandez (1), E. Tisserant (2), P. Talhinhas (3), H. Azinheira (3), A-S. Petitot (1), S. Duplessis (2)

(1) IRD, Institut de Recherche pour le Développement, UMR 186 IRD-Cirad-UM2 Résistance des Plantes aux Bioagresseurs, 911 avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France
(2) INRA, UMR 1136 INRA/Nancy Université, Interactions Arbres - Microorganismes, Centre INRA de Nancy, 54280 Champenoux, France.
(3) CIFC - Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro, Quinta do Marquês, 2784-505 Oeiras, Portugal.

Hemileia vastatrix, l'agent de la rouille orangée du caféier (*Coffea arabica*) est un champignon Basidiomycète appartenant à la classe des Pucciniales. Dans le cadre d'un projet collaboratif avec le Génoscope, une analyse transcriptomique est en cours pour identifier des petites protéines chez *H. vastatrix* qui seraient spécifiquement secrétées au cours du processus infectieux, et qui pourraient contrôler l'interaction avec le caféier. Nos travaux précédents ont montré que la reconnaissance spécifique d'*H. vastatrix* par la plante a lieu lorsque le champignon produit des haustoria dans les cellules du mésophylle (Ramiro *et al.,* 2009), suggérant que la production de facteurs d'avirulence aurait lieu à ce stade. Chez *H. vastatrix*, il existe actuellement 9 gènes de virulence, et la souche d'*H. vastatrix* 178a (contenant les gènes de virulence v2,3,4,5) a été choisie comme support de cette étude. Dans un premier temps, le transcriptome du champignon a été analysé lors d'une interaction compatible pour obtenir un répertoire exhaustif des gènes exprimés au cours de l'infection. La technique de pyroséquençage (454-Titanium, Roche) appliquée à des ADNc issus de feuilles infestées a permis de générer 352 146 séquences qui ont été rassemblées en 36 548 contigs. Ces séquences ont été annotées à partir des bases de données internationales (nr, Swissprot, GO, KOG) afin d'attribuer une fonction putative aux séquences exprimées par le champignon et la plante. Afin de séparer les transcrits fongiques des transcrits de plante en l'absence des séquences des génomes des deux organismes, nous avons appliqué une approche par tri reposant sur les fréquences spécifiques de trinucléotides au sein des ESTs (programme EST3, MIPS), le pourcentage en GC et les scores des analyses d'homologie par blastn contre les génomes d'angiospermes, de basidiomycètes et d'ESTs spécifiques de Pucciniales et de Caféier. En parallèle, la recherche des protéines secrétées par *H. vastatrix* est effectuée *in silico* par la détection systématique de séquences signal. En associant les données issues des deux partenaires de l'interaction, les résultats obtenus nous permettent de cibler des gènes candidats pour la virulence chez *H. vastatrix* et marqueurs de l'interaction compatible chez le caféier.

(1) Ramiro D., Escoute J., Petitot A.-S., Nicole M., Maluf M. and Fernandez D. 2009. Biphasic haustorial differentiation of the orange rust *Hemileia vastatrix* race II associated with differential defense responses in resistant coffee cultivar. Plant Pathology, 58, 944-955.

Mots-clés : rouille, caféier, Pucciniale, protéines secrétées, transcriptome

Poster n°3.5

GEMO: an innovative project on Evolutionary Genomics of *Magnaporthe oryzae*.

E. Fournier (2), D. Tharreau (1), T. Kroj (2), H. Chiapello (3), G. Aguileta (3), F. Rodolphe (3), A. Gendrault (3), M.-H. Lebrun (4)

(1) CIRAD, UMR BGPI, TA 54K, 34398 Montpellier, France;
(2) INRA, UMR BGPI, TA 54K, 34398 Montpellier, France;
(3) INRA, UR MIG, 78352 Jouy-en-Josas, France;
(4) CNRS, UMR BIOGER, 78 850 Thiverval Grignon, France.

Developing integrated control methods against pests of cultivated plants can significantly contribute to increasing food production while reducing inputs threatening the environment. The durability of a control method can be improved by a better knowledge of the pathogen's genetic determinants that are responsible for this adaptation. We were granted by the French National Research Agency for a project that aims at sequencing the genomes of several strains of the phytopathogenic model species *Magnaporthe oryzae* and at exploiting these complete sequences to characterize the repertoire of genes involved in pathogenicity and host specificity, and study their evolution. We will sequence 7 strains of the species *M. oryzae* representing different genetic groups pathogenic of different species of Poacees and one strain of the sister species *M. grisea*. ESTs produced during the infection by two strains pathogenic of rice and wheat on their respective host will also be sequenced. Different available annotation pipelines will permit to list and do comparative analyses of different gene families known or speculated to be involved in pathogenicity. Transcriptomic data of the two strains with different host specificities will be compared to identify key genes in specialization to the host. Genome fluidity will be characterized by synteny analyses and by the identification and localization of repeated elements. The impact of these rearrangements on pathogenicity genes and host specificity genes will be tested. Molecular signatures of positive or purifying selection in coding and regulatory sequences will be searched for by different methods. The whole set of data will be integrated in a database that will be designed to be accessible publicly.

Keywords: Magnaporthe, génome, effecteur, séquençage

Poster n°3.6

Comparative genomics of *Botrytis cinerea* and related *Ascomycota species*

N. Lapalu (1,2), J. Amselem (1,2), H. Quesneville (1,2), M-H. Lebrun (2)

(1) INRA Unité de recherche en Génomique-Info, Route de St Cyr, 78026 Versailles Cedex France
(2) INRA Biologie et Gestion des Risques en Agriculture-Champignons Pathogènes des Plantes, av Lucien Brétignières - 78 850 Thiverval Grignon

The availability of a large number of complete and annotated fungal genome sequences allows the development of coherent comparative genomic studies that are helpful for structural and functional annotation. Protein sequence alignments "all against all" provide a resource to detect orthologous gene families as well as paralogs and multigenic families. In-depth analyses of the distribution of these families among genomes reveal species specific features (expansion, contraction of gene families) and help annotating protein functions for orthologous genes. Here, we compared the complete set of proteins from *Botrytis cinerea* T4 isolate (BT4) to proteins from 11 other species of the Ascomycota Phylum. We defined protein families with OthoMCL (a Markov Clustering based tool) that detect orthologs from multiple sequences alignments. A total of 15184 families was found among the 11 genomes analysed, 3549 being shared by all species, and 2879 of them were assigned to single-copy orthologous gene clusters. Only few multigenic families with more than 6 genes per species were detected, most of them being open reading frames corresponding to transposons. Only 60 % of BT4 proteins were clustered in families with proteins shared with at least one other fungal species (40% of BT4 genes are specific to BT4). BT4 genome contains 492 multigenic families, including 12 species specific. We have also shown that more than 1000 families are shared only by BT4 and *Sclerotinia sclerotiorum* (Ss). This is likely due to the fact that these 2 genomes are closely related (86% of protein identity) highlighting protein families that are apparently specific to this clade of the Ascomycetes. We have used a set of protein families with phylogenetic performance according to Aguileta *et al* (http://genome.jouy.inra.fr/funybase) to obtain a phylogenetic tree of the 12 fungal species studied. Multiple alignments of the corresponding orthologs were performed with MUSCLE and cleaned with Gblocks. Recovered trees and orthologs families were supplied to CAFE. (Computational Analysis of gene Family), which implements a stochastic birth and death process, identifying gain and loss of families along the phylogenetic tree branches (expansion or contraction of gene families). This analysis emphasized 80 gene families (among the 15184 previously identified) with significant p-value, currently confirmed by manual inspection. These data will highlight some of the evolutionary trends that have shaped these genomes.

(1) Tijl De Bie, Nello Cristianini, Jeffery P. Demuth, and Matthew W.Hahn. Cafe: a computational tool for the study of gene family evolution. Bioinformatics, 22(10):1269-1271, May 2006.
(2) Sylvain Marthey, Gabriela Aguileta, Francois Rodolphe, Annie Gendrault, Tatiana Giraud, Elisabeth Fournier, Manuela Lopez-Villavicencio, Angelique Gautier, Marc-Henri Lebrun, and Helene Chiapello. Funybase: a fungal phylogenomic database. BMC Bioinformatics, 9:456+, October 2008.
(3) Li Li, Christian J. Stoeckert, and David S. Roos. Orthomcl: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. Genome research, 13(9):2178-2189, September 2003.
(4) Aguileta, G., Marthey, S., Chiapello, H., Lebrun, H, Rodolphe, F.,Fournier, E., Gendrault-Jacquemard, A., Giraud, and T. Assessing the performance of single-copy genes for recovering robust phylogenies. Systematic Biology, 57(4):613 -627, August 2008

Keywords: Botrytis cinerea, orthologs, multigenic families

Poster n°3.7

Les éléments transposables dans le génome de la truffe noire du Périgord : une clef pour comprendre l'évolution des truffes

C. Murat (1), J. Anselem (2), A. Kohler (1), J. Labbé (1), E. Tisserant (1), P. Wincker (3), F. Martin (1)

(1) UMR 1136, INRA-Nancy Université, Interactions Arbres - Microorganismes, INRA-Nancy, 54280 Champenoux, France
(2) INRA, URGI, Route de Saint-Cyr 78026 Versailles cedex
(3) Centre National de Séquençage-Génoscope, 2 rue Gaston Crémieux CP5706 91057 Evry cedex-France

Les truffes sont des champignons ascomycètes appartenant au genre Tuber formant des associations ectomycorrhiziennes avec les arbres et les arbustes. Parmi la soixantaine d'espèces de truffes existant dans le monde, la truffe noire du Périgord (*Tuber melanosporum* Vittad.*)* est une des espèces les plus appréciées à cause de ces qualités organoleptiques. Afin de mieux comprendre la biologie et l'évolution de cette truffe, son génome a été récemment séquencé grâce aux efforts du Tuber Genome Consortium et du Génoscope. Avec une taille de 125 Mpb ce génome est l'un des plus gros génome de champignon séquencé. Après identification des éléments transposable (TE), nous avons observé que 62 % du génome de *T. melanosporum* correspond à des TE. En analysant la distribution des TE comparée à celle des gènes nous pouvons résumer le paysage génomique de *T. melanosporum* comme des îles de régions codantes dans un océan de TE. En réalisant une étude des régions intergénique nous avons observé chez *T. melanosporum* une distribution en « V-Shape » similaire à ce qui a été observé chez *Phytophthora infestans*. Nous avons aussi trouvé d'autres point communs entre *P. infestans* et *T. melanosporum* comme la richesse en retrotransposons à LTR gypsy qui sont les plus nombreux et couvrent 30 % du génome. Nous avons identifié et caractérisé, entre autres, une famille de gypsy qui est l'une des plus nombreuse et une famille de copia qui présente peu de copies mais qui est très exprimée et qui pourrait être active. Afin de mieux comprendre l'évolution du genre Tuber nous avons recherché la présence de certaines familles de TE identifiées chez *T. melanosporum* dans d'autres espèces de truffes. Pour résumer, les éléments transposables ont joué et jouent encore probablement un rôle fondamental dans l'évolution du génome de la truffe noire du Périgord et plus généralement du genre *Tuber*.

Mots-clés : génome, truffe, *Tuber melanosporum*, élément transposable, évolution