



**HAL**  
open science

## In the neighborhood of resistance to *Puccinia hordei* QTL2

Thierry T. Marcel, F.K.S. Yeo, Paul P. Chalhoub, E. Niks, . Umr Inra / Univ.  
Evry : Génomique Végétale, . Biologie Gestion Des Risques En Agriculture -  
Champignons Pathogènes Des Plantes, . Laboratory of Plant Breeding

### ► To cite this version:

Thierry T. Marcel, F.K.S. Yeo, Paul P. Chalhoub, E. Niks, . Umr Inra / Univ. Evry : Génomique Végétale, et al.. In the neighborhood of resistance to *Puccinia hordei* QTL2. 8. Rencontres de Phytopathologie - Mycologie de la Société Française de Phytopathologie (SFP), Jan 2010, Aussois, France. pp.37. hal-02819640

**HAL Id: hal-02819640**

**<https://hal.inrae.fr/hal-02819640>**

Submitted on 6 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.

## Recherche d'effecteurs fongiques chez *Melampsora larici-populina*, l'agent de la rouille foliaire du peuplier

S. Hacquard (1), D. Joly (2), Y-C. Lin (3), E. Tisserant (1), P. Frey (1), R. Hamelin (2), F. Martin (1), S. Duplessis (1)

(1) UMR Interactions Arbres - Microorganismes, INRA Nancy, Champenoux, France;

(2) Laurentian Forestry Centre, Natural Resources Canada, Québec, Canada;

(3) VIB, Department of Plant Systems Biology, Gand, Belgique.

La maladie de la rouille foliaire du peuplier, causée par le basidiomycète *Melampsora larici-populina*, est responsable d'une réduction de croissance et d'un affaiblissement général des plants provoquant des pertes économiques importantes. Désormais, la totalité des cultivars de peuplier disponibles sur le marché sont sensibles à *M. larici-populina* et il apparaît essentiel de comprendre les mécanismes d'interaction entre le champignon et sa plante-hôte afin de développer des moyens de lutte contre la maladie. Le projet de séquençage du génome de *M. larici-populina* par le Joint Genome Institute\* est un atout majeur pour identifier les gènes impliqués dans les processus d'infection et plus particulièrement ceux codant des effecteurs fongiques. Ces protéines manipuleraient la structure et le fonctionnement de la cellule hôte pour faciliter l'infection et/ou pourraient déclencher des réactions de défense chez la plante via l'interaction avec des protéines de résistance (R-Avr). L'analyse du sécrétome de *M. larici-populina* a révélé un large arsenal de protéines secrétées (1848, 11 % des gènes) dont la moitié correspond à de petites protéines secrétées (<300 aa). Parmi celles-ci, des homologues ont pu être mis en évidence avec des effecteurs précédemment décrits chez des Pucciniales tels que les Haustorially Expressed Secreted Protein (HESP) ou des facteurs d'virulence (Avr) de *Melampsora lini* ainsi que trois homologues de la Rust Transferred Protein (RTP1) d'*Uromyces fabae*. L'analyse du transcriptome fongique, basée sur le séquençage d'ESTs et l'analyse de puces à oligonucléotides NimbleGen a notamment permis de mettre en évidence la forte accumulation de transcrits codant des petites protéines secrétées au cours du processus infectieux. Nous avons aussi pu valider ces profils d'expression à des stades précoces d'interaction par RT-qPCR. Ces différentes approches ont conduit à l'identification d'effecteurs candidats pour lesquels une analyse fonctionnelle est en cours. Nous avons notamment déjà pu montrer l'expression de plusieurs candidats au niveau des structures haustoriales d'infection par immunolocalisation.

\*JGI, Département de l'Energie, Etats-Unis, <http://genome.jgi-psf.org/Mellp1/Mellp1.home.html>

*Mots-clés* : rouille, biotrophe obligatoire, haustorium, effecteurs

## Analyse globale du transcriptome de *Tuber melanosporum*

E. Tisserant (1), A. Kohler (1), E. Morin (1), C. Da Silva (2), P. Wincker (2), F. Martin (1)

(1) UMR 1136, INRA-Nancy Université, Interactions Arbres-Microorganismes, INRA Nancy.

(2) GENOSCOPE, Centre National de Séquençage.

Les symbiotes mutualistes ectomycorhiziens jouent un rôle clef au sein des forêts boréales et tempérées en tant que moteurs des fonctions écologiques et des processus d'évolution de ces écosystèmes. Le séquençage récent du premier génome d'ascomycète symbiotique, *Tuber melanosporum*, fait de cet organisme un nouveau modèle pour l'étude des interactions ectomycorhiziennes. Afin d'acquies une meilleure connaissance des réseaux de gènes impliqués dans l'interaction symbiotique, nous présentons ici une étude globale du transcriptome de *T. melanosporum* au sein de trois tissus : fructification, mycélium et ectomycorhize. En effet, explorer l'expression des gènes et leurs régulations en réponses aux conditions développementales et environnementales est nécessaire pour comprendre le fonctionnement des symbioses ectomycorhiziennes. Ici, nous avons utilisé différentes méthodes de quantification de l'expression des gènes afin d'évaluer le profil transcriptionnel de *T. melanosporum* à l'échelle du génome entier : une approche basée sur l'hybridation de séquences (puce à ADN) et une approche basée sur le séquençage de transcrits à très haut débit (RNA-Seq). La comparaison des mesures produites par ces deux méthodes montre des résultats cohérents permettant de valider ces données d'expression. L'analyse de ces données révèle que plus de 95 % des gènes prédits chez *T. melanosporum* sont exprimés au sein des trois tissus. Par ailleurs, seul un nombre restreint de gènes montrent une différence d'expression entre les différents tissus et peu de transcrits spécifique à un tissu ont été détectés. Parmi les gènes surexprimés au sein des tissus symbiotiques, plusieurs transcrits codant pour des enzymes impliquées dans la dégradation des parois végétales sont retrouvés. Ce répertoire de gènes induit lors de la mycorhization joue probablement un rôle important dans l'adhésion à la cellule hôte et la colonisation des racines. D'autre part, il ne semble pas exister de gènes effecteurs sécrétés spécifiquement régulés lors de l'établissement de l'interaction symbiotique chez *T. melanosporum* comme c'est le cas chez le basidiomycète ectomycorhizien *Laccaria bicolor*.

*Mots-clés* : *Tuber melanosporum*, transcriptome, symbiose ectomycorhizienne

## Identification de nouveaux réseaux de régulation spécifiques de l'appressorium chez *Magnaporthe grisea*

L. Muszkieta, C. Ant, M.-H. Lebrun, N. Poussereau

UMR 5240 CRNS-UCBL-INSA-BCS Equipe de Genomique Fonctionnelle des Champignons Pathogènes des Plantes. Bayercropscience, centre de recherche de la Dargoire, 14-20 rue Pierre Baizet, 69009 Lyon contact: laetitia.muszkieta@bayercropscience.com

Le champignon hémibiotrophe *Magnaporthe grisea* est l'agent responsable de la pyriculariose, principale maladie du riz. Son processus infectieux débute par la différenciation d'une cellule spécialisée appelée appressorium, permettant la pénétration du champignon dans les tissus de la plante hôte. La différenciation de cette cellule spécialisée nécessite des réorientations métaboliques et des programmes de développement spécifiques. Ces programmes dépendent de l'activation de réseaux de régulation qui mettent en jeu des facteurs de transcription vraisemblablement spécifiques de l'appressorium. Une approche transcriptomique a permis d'identifier 900 gènes surexprimés dans l'appressorium parmi lesquels 29 codent des facteurs de transcription. L'expression de ces gènes a été analysée par qRT-PCR à différents stades de développement fongique (mycélium, spore, appressorium) et de l'infection de feuilles d'orge. Six de ces gènes sont fortement surexprimés au stade précoce de l'infection et dans les appressoria. Ils ne possèdent pas de fonction connue chez les différents ascomycètes et ont été choisis comme gènes candidats et analysés au niveau fonctionnel par génétique inverse. Des mutants de délétion ont été obtenus par remplacement de gène pour 5 de ces 6 gènes. Seul le mutant de délétion du gène *MgTF7* présente une réduction de pathogénie de plus 75 % résultant d'un défaut de pénétration appressoriale. De plus, les appressoria du mutant delta-*TF7* différenciés sur membrane de téflon présentent des altérations morphologiques, puisqu'ils collapsent au bout de quatorze heures. Afin d'identifier le réseau de régulation contrôlé par le facteur de transcription *MgTF7* et préciser sa fonction cellulaire, une analyse du transcriptome différentiel entre les appressoria de la souche mutée et la souche sauvage a été effectuée. Les résultats de l'analyse transcriptomique seront présentés.

*Mots-clés* : appressorium, *Magnaporthe*, facteur de transcription

## Identification and functional analysis of *Magnaporthe oryzae* effectors

C. Ribot (1), S. Cesari (1), J. Hirsch (1), D. Vincent (3), M.-J. Gagey (2), J. Vallet (2), P. Gautier (2), J.-L. Notteghem (1), C. Job (2), D. Job (2), C. Plomion (3), E. Fournier (1), J.-B. Morel (1), M.-H. Lebrun (2), **T. Kroj** (1)

(1) UMR BGPI, Montpellier, France

(2) Bayer CropScience-CNRS, Lyon, France

(3) INRA, Bordeaux, France

The ascomycete *Magnaporthe oryzae* causes « blast disease » affecting several cereals in particular rice. During the compatible interaction, the first phase of *M. oryzae* infection cycle is biotrophic. *M. oryzae* is suspected to secrete, as bacterial and oomycete pathogens, an arsenal of effector proteins that disrupt the activation and execution of plant defenses. In order to identify *M. oryzae* effectors, a search for putatively secreted proteins during rice infection was performed from different sequence datasets such as, genome annotation data, transcriptome data of blast fungus-infected rice leaves, and proteomic data of blast proteins released in culture media. A list of 370 candidate effectors expressed during rice infection and possessing a putative signal peptide for secretion was generated. Among them, 58 were shown to be secreted in vitro in proteomic analyses, while the expression of 10 was found to be down-regulated in the *M. oryzae bip1* mutant impaired in a b-zip transcription factor essential for the pathogenesis of the blast fungus. First results of the functional analysis of these candidate effectors will be presented.

*Mots-clés* : Effecteur, champignon, *Magnaporthe*

## The transcriptome of an intracellular hemibiotroph, *Colletotrichum higginsianum*

R. O'Connell, H. Takahara, J. Kleemann

Molekulare Phytopathologie, Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, 50829 Köln.

*Colletotrichum higginsianum* causes anthracnose disease on *Arabidopsis thaliana*, providing a model pathosystem in which pathogen and host genomes are available and both partners can be genetically manipulated. After initial penetration by appressoria, the fungus grows biotrophically in living epidermal cells, producing bulbous hyphae that invaginate the host plasma membrane, before entering a destructive necrotrophic phase. To survey fungal gene expression during biotrophy, we made a stage-specific cDNA library from hyphae isolated from infected leaves by fluorescence-activated cell sorting. The high purity of the isolated hyphae eliminates contamination by transcripts from host cells or other fungal cell types. EST sequencing showed that genes related to redox homeostasis, biosynthesis of amino acids and vitamins and the uptake of amino acids, mono- and disaccharides were well-represented. To search for fungal effectors, we used computational prediction tools to identify genes encoding small, soluble secreted proteins. Expression profiling showed that many candidate effector genes are plant-induced and highly stage-specific. *CIH1* encodes a protein with two LysM chitin-binding domains that accumulates at the biotrophic interface and may function in PAMP concealment. Targeted gene disruption suggests *CIH1* is required for successful host invasion. *DN3* encodes an effector that suppresses cell death induced by a *C. higginsianum* Nep1-like protein in *Nicotiana benthamiana* transient expression assays. Overall, our results suggest that *Colletotrichum* biotrophic hyphae are organs for both nutrient acquisition and effector delivery.

Takahara, H., A. Dolf, E. Endl and R. O'Connell: Flow cytometric purification of *Colletotrichum higginsianum* biotrophic hyphae from *Arabidopsis* leaves for stage-specific transcriptome analysis. *Plant Journal* 59: 672–683 (2009).

Huser, A; Takahara, H; Schmalenbach, W; O'Connell, R: Discovery of Pathogenicity Genes in the Crucifer Anthracnose Fungus *Colletotrichum higginsianum*, Using Random Insertional Mutagenesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22: 143-156 (2009).

*Keywords:* *Colletotrichum higginsianum*, *Arabidopsis thaliana*, biotrophy

## Rôle du mannitol dans l'expression du pouvoir pathogène chez le champignon phytopathogène *Alternaria brassicicola*

B. Calmes (1), T. Guillemette (1), R. Lemoine (2), P. Simoneau (1)

(1) UMR PaVé A77 équipe Complexe Fongique Nérotrophe, Université d'Angers-INRA-Agrocampus Ouest, 2 Bd Lavoisier 49045 Angers

(2) Physiologie Moléculaire du Transport des Sucres chez les végétaux", CNRS/Université de Poitiers Bâtiment Botanique, 40, Avenue du Recteur Pineau 86022 Poitiers

Le mannitol est un des polyols les plus représentés chez les champignons. Certaines études suggèrent une implication dans les processus de protection contre divers stress ou comme ressource carbonée (Dulermo *et al.*, 2009). Pour certains pathosystèmes, l'accumulation de mannitol fongique dans les feuilles infectées semble indiquer un rôle dans l'interaction plante / pathogène (Voegelé *et al.*, 2005). Les propriétés anti-oxydantes du mannitol (Jennings *et al.*, 1998) en font une molécule candidate pour la protection du champignon contre le stress oxydatif généré par la plante lors de l'infection. Un des objectifs de cette étude est de tester l'hypothèse selon laquelle certains champignons pathogènes disposeraient d'un système de neutralisation du stress oxydatif via la production et la sécrétion de mannitol. Les travaux sont conduits sur un pathosystème nécrotrophe modèle : l'interaction entre les Brassicacées et *Alternaria brassicicola*. Ce champignon phytopathogène, transmissible par les semences est à l'origine d'importants dégâts sur les Brassicacées cultivées. Le dosage des sucres solubles présents dans le mycélium et dans son filtrat de culture, nous a permis de mettre en évidence l'accumulation et la sécrétion de mannitol par *A. brassicicola*. Deux voies métaboliques indépendantes aboutissent à la synthèse de mannitol. Les gènes *mdh* (mannitol déshydrogénase) et *mpd* (mannitol-1-phosphate déshydrogénase) codent chacun une enzyme clef de ces deux voies. Ces deux gènes ont été caractérisés chez *A. brassicicola* et leur expression a été quantifiée *in planta* par RT-qPCR, révélant une surexpression du gène codant la MDH lors de l'interaction avec la plante hôte. L'obtention, chez *A. brassicicola*, de mutants nuls pour chacun de ces gènes nous permet d'appréhender l'implication spécifique des deux voies métaboliques dans la synthèse de mannitol. Le double mutant délété simultanément dans les gènes *mdh* et *mpd* a été également obtenu. Le mannitol accumulé par cette souche représente moins de 10% de la quantité retrouvée le génotype sauvage. Le comportement de ces transformants face à divers stress, notamment oxydatif, leur croissance en présence de diverses sources de carbone et lors de l'infection de plantes hôtes sera présenté.

(1) Dulermo T, Rasclé C, Chinnici G, Gout E, Bligny R, Cotton P: Dynamic carbon transfer during pathogenesis of sunflower by the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*: from plant hexoses to mannitol. 2009;183(4):1149-62. Epub 2009 Jun 4

(2) Jennings DB, Ehrenshaft M, Pharr DM, Williamson JD: Roles for mannitol and mannitol dehydrogenase in active oxygen-mediated plant defense. Proc Natl Acad Sci U S A 1998, 95(25):15129-15133

(3) Voegelé RT, Hahn M, Lohaus G, Link T, Heiser I, Mendgen K: Possible roles for mannitol and mannitol dehydrogenase in the biotrophic plant pathogen *Uromyces fabae*. Plant Physiol 2005, 137(1):190-198

Mots-clés : *Alternaria brassicicola*, mannitol, pouvoir pathogène, stress oxydatif

## Rôle des voies de signalisation HOG et CWI dans la mise en place d'un mécanisme compensatoire lors de l'exposition des champignons à la camalexine

A. Joubert (1), T. Guillemette (1), C. Campion (1), N. Bataillé-Simoneau (1), A. Sellam (1), S. Georgeault (2), P. Hudhomme (3), P. Simoneau (1)

(1) UMR Pathologie Végétale A77

(2) SCIAM Angers

(3) UMR CNRS 6200

*Alternaria brassicicola* est un champignon nécrotrophe à l'origine de nombreux dégâts sur les *Brassicaceae*. Chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, également de la famille des *Brassicaceae*, la synthèse de la phytoalexine camalexine est un élément majeur de résistance à ce pathogène (Thomma *et al.*, 1999). Une analyse du transcriptome d'*A. brassicicola* a permis de préciser le mode d'action cellulaire de cette phytoalexine qui agirait sur l'intégrité membranaire et/ou pariétale du pathogène (Sellam *et al.*, 2007). Il a été également émis l'hypothèse de la mise en place par le champignon d'un mécanisme de type compensatoire au niveau de la paroi afin de faire face à la toxicité de la camalexine. Pour préciser les mécanismes régulant la mise en place de ce mécanisme de protection, des analyses préliminaires de phénotypage de mutants de *S. cerevisiae* ont été réalisées. Parmi les différents mutants testés, les souches déficientes pour des composantes des deux voies de signalisation, HOG (High Osmolarity Glycerol) et CWI (Cell Wall Integrity) ont montré une hypersensibilité à la camalexine. Chez *A. brassicicola*, les deux MAP kinases AbHog1 et AbSlt2, intervenant respectivement dans la voie HOG et la voie CWI, ont été identifiées. L'analyse de leur niveau de phosphorylation a montré que les deux voies sont activées chez le champignon lors d'une exposition à la phytoalexine. Des mutants  $\Delta AbHog$  et  $\Delta AbSlt2$  ont été générés chez *A. brassicicola* par mutagenèse dirigée. Ces mutants se sont révélés hypersensibles à la camalexine et sévèrement affectés dans leur pouvoir pathogène. De plus, ils présentent une sensibilité accrue aux agents de stress pariétaux. L'ensemble de nos données suggère que les deux voies de signalisation HOG et CWI seraient impliquées dans la mise en place d'une réponse adaptative du champignon lors d'une exposition à la camalexine. En effet, ces deux voies seraient impliquées dans un mécanisme de protection visant à renforcer la paroi. Elles constitueraient dès lors pour les espèces pathogènes d'*A. thaliana* des composantes clés de leur pouvoir infectieux.

(1) Thomma BP, Nelissen I, Eggermont K, Broekaert WF (1999) Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the fungus *Alternaria brassicicola*. *Plant J* 19: 163-171

(2) Sellam A, Dongo A., Guillemette T, Hudhomme P., P. Simoneau (2007) Transcriptional responses to exposure to the brassicaceous defence metabolites camalexin and allyl-isothiocyanate in the necrotrophic fungus *Alternaria brassicicola*. *Molecular plant pathology* 8: 195-208

**Mots-clés :** *Alternaria brassicicola*, camalexine, osmolarité, intégrité pariétale, pouvoir pathogène, mutagenèse dirigée



**The chitin synthase BCCHS3a of *Botrytis cinerea* plays an essential role in early infection steps on *Arabidopsis thaliana* by interfering with camalexin accumulation at infection sites**

C. Kunz, P. Malfatti, M.-C. Soulie

UMR 217 INRA/Université ParisVI/INA-PG, Laboratoire Interactions plantes-pathogènes, 16 rue Claude Bernard, 75231 Paris cedex 05, France

Epidemics caused by the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* can be severe and economically damaging to many agricultural and horticultural crops. Chitin, an essential ultra-structural constituent of fungal cell walls, and chitin biosynthesis could be a suitable target for botryticides. The  $\beta$ -1,4 N-acetylglucosamine polymer is biosynthesized by a family of chitin synthases. Seven chitin synthase genes (*Bcchs*) have been identified in *B. cinerea* and, so far, four mutants disrupted in class I, IIIa, IV and VII were obtained and characterized (1,2). In this work we describe mutant  $\Delta Bcchs3a$  (class IIIa) that shows a drastically reduced virulence on the major host plant grapevine (2) as well as on the model plant *Arabidopsis thaliana*. The mutant shows a 39% reduction of the chitin content in its cell wall and the presence of an unusual extra-cellular matrix. A change in the cell wall constitution could lead to either (i) increased sensitivity to plant defence molecules or (ii) to over-induction of plant defence genes. We tested these hypothesis by inoculating *A. thaliana* mutants impaired in different defence mechanisms with  $\Delta Bcchs3a$  and wild type strain Bd90. Hereby, we found restoration of  $\Delta Bcchs3a$  virulence on camalexin deficient *pad3-1 A. thaliana* mutant plants, but no increase of  $\Delta Bcchs3a$  virulence was found on any other *A. thaliana* mutant tested. We then investigated sensitivity of  $\Delta Bcchs3a$  and wild type strain Bd90 towards camalexin in vitro and in planta. Moreover, *pad3-1* expression and camalexin accumulation in  $\Delta Bcchs3a$  and wild type Bd90 infected Col-0 plants was measured. Results obtained will be presented and the role of chitin synthase BCCHS3a in *B. cinerea* infection will be discussed.

(1) Soulie, M-C, Piffeteau, A., Choquer, M., Boccara, M. and Vidal-Cros A. 2003. Fungal Genet. Biol. 40 (1): 38-46.

(2) Soulie, M-C, Perino C., Piffeteau A., Choquer M., Malfatti P., Cimerman A., Kunz C., Boccara M. and Vidal-Cros A. 2006. Cell Microbiol, 8 (8): 1310-1321.

*Mots-clés* : *Botrytis cinerea*, chitin synthase, *Arabidopsis thaliana*, camalexin

## Appressorium-like chez un champignon saprophyte, *Podospora anserina*

S. Brun (1,2), F. Malagnac (1,2), F. Bidard (2), H. Lalucque (1,2), P. Silar (1,2)

(1) UFR des Sciences du Vivant, Université Paris Diderot-Paris 7, 75013 Paris

(2) Institut de Génétique et Microbiologie, UMR 8621, 91400 Université Paris-sud, Orsay

Les NADPH oxydases (Nox) sont des enzymes membranaires qui produisent des ROS après oxydation du NADPH. Initialement cantonnées à des processus de défenses chez les animaux et les plantes, les Nox et les ROS qu'elles produisent seraient impliqués d'une manière plus large dans des processus de communication extra-cellulaire dont la réponse immunitaire ne représente qu'un aspect. Les Nox sont conservées chez les champignons filamenteux. Elles sont requises pour l'interférence hyphale (un mécanisme de défense), la pathogénie, la symbiose et pour l'élaboration de structures pluri-cellulaires comme l'enveloppe de la fructification au cours du cycle sexuel (1). Notre modèle d'étude, *Podospora anserina*, est un champignon ascomycète modèle en génétique classique et moléculaire. En collaboration avec l'équipe de M. H. Lebrun, nous avons montré que la germination des ascospores de *P. anserina* et l'extrusion du peg de pénétration de l'appressorium de *M. grisea* sont deux phénomènes analogues contrôlés par Nox2 et Pls1 (2, 3). Nous venons à présent de montrer que ce champignon coprophile est capable de différencier des structures de pénétration de la cellophane, semblables aux appressoriums/appressorium-like de pathogènes de plantes tels que *M. grisea* et *B. cinerea*. Surtout, comme chez ces deux pathogènes ainsi que chez *C. purpurea*, les Nox jouent un rôle majeur dans l'étape de pénétration. L'étude minutieuse des phénotypes de souches mutées pour Nox1, Nox2, NoxR (leur sous-unité régulatrice) et pour la tétraspanine Pls1, nous a conduit à proposer un modèle dans lequel ces protéines joueraient un rôle fondamental dans le tropisme qui guide la pénétration d'une surface composée de cellulose comme l'est la paroi des cellules végétales (4). Nous possédons, au laboratoire, une collection de mutants impliqués dans les mêmes processus que Nox1 et Nox2 qui sont en cours d'identification et d'analyse. La facilité d'obtention de mutants et d'analyse génétique, couplées à des outils de génétique moléculaire performants (génomique, puces à ADN, délétion de gènes, etc) vont nous permettre d'identifier de nouveaux acteurs des voies de signalisation Nox1 et Nox2. L'identification de ces gènes devrait contribuer à élucider la régulation de mécanismes clefs de la pathogénie chez des champignons d'intérêt phytosanitaire majeur afin d'identifier de nouvelles cibles pour le développement de molécules antifongiques.

(1) Takemoto, D., A. Tanaka & B. Scott, (2007) NADPH oxidases in fungi: Diverse roles of reactive oxygen species in fungal cellular differentiation. *Fung. Genet. Biol.* 44: 1065-1076.

(2) Lambou, K., F. Malagnac, C. Barbisan, D. Tharreau, M. H. Lebrun & P. Silar, (2008) A crucial role for the Pls1 tetraspanin during ascospore germination of the saprophytic fungus *Podospora anserina*. *Euk. Cell* 7: 1809-1818.

(3) Malagnac, F., F. Bidard, H. Lalucque, S. Brun, K. Lambou, M. H. Lebrun & P. Silar, (2008) Convergent evolution of morphogenetic processes in fungi: Role of tetraspanins and NADPH oxidases 2 in plant pathogens and saprobes. *Comm. Int. Biol.* 1: 180-181.

(4) Brun, S., F. Malagnac, F. Bidard, H. Lalucque & P. Silar, (2009) Functions and regulation of the Nox family in the filamentous fungus *Podospora anserina*: a new role in cellulose degradation. *Molecular Microbiol.* (sous presse) DOI 10.1111/j.1365-2958.2009.06878.x

*Mots-clés* : NADPH oxydase, appressorium, pénétration et dégradation de la cellulose, *Podospora anserina*

## Singularité du métabolisme des stérols chez *Glomus intraradices*, champignon arbusculaire mycorrhizien (MA), effets des fongicides Inhibiteurs de la Biosynthèse des Stérols (IBS)

A. Grandmougin-Ferjani (1), E. Campagnac (1), M. Calonne (1), D. Debiane (1), J. Fontaine (1), A. Lounes Hadj Sahraoui (1), F. Laruelle (1), E. Ogier (2), L. Lanfranco (2)

(1)- Laboratoire de Mycologie-Phytopathologie-Environnement, PRES Lille Nord de France, Université du Littoral Côte d'Opale, 17 avenue Blériot, BP 699, 62228 Calais cedex.

(2)- Dipartimento di Biologia Vegetale, Università degli Studi di Torino, viale Mattiolo 25, 10125 Torino, Italy

Les champignons arbusculaires mycorrhiziens (AM) sont des microorganismes du sol qui établissent des relations symbiotiques avec la majorité des plantes vasculaires terrestres dans tous les écosystèmes. Les connaissances sur la biologie de cet organisme restent encore très fragmentaires, l'obstacle principal étant sa biotrophie. Le développement de systèmes de cultures monoxéniques ont permis ces dernières années d'étudier certains aspects de la génétique, biologie cellulaire et physiologie de ces symbiotes jusqu'alors inabordés. Le métabolisme des lipides joue chez ces champignons un rôle prépondérant. Dans tous les stades du cycle de développement, les lipides sont la forme majeure du carbone et constituent plus de 45% de la masse sèche. Peu d'études ont été conduites sur une classe particulière de lipides : les stérols. Ce sont d'importants composés cellulaires qui contrôlent la fluidité, la perméabilité membranaire et l'activité d'enzymes associées. Ils sont présents dans les rafts qui jouent un rôle certain en terme de signaux cellulaires, polarité, morphogenèse et croissance des hyphes. Les champignons AM possèdent une composition stérolique originale avec comme stérols, des 24-alkylstérols et non de l'ergosterol comme la plupart des champignons. Nous avons démontré récemment que les proportions des 24-méthyl et 24 éthylstérols varient de façon très importante selon le cycle de développement du champignon. La voie de biosynthèse via le mévalonate peut être inhibée par différents fongicides de la classe des IBS. Ces molécules ont été conçues dans le cadre de la lutte contre les champignons phytopathogènes des cultures. Mais il s'avère que les IBS affectent clairement le développement des structures fongiques de ces champignons AM non-cibles (ex germination, croissance hyphale, sporulation). Les études conduites avec les IBS de trois classes différentes (morpholines, triazoles, hydroxyanilide) nous ont permis de déterminer que : 1/- une composition stérolique normale des racines est requise pour le développement correct de la symbiose. 2/- Les IBS de la classe des morpholines (fenpropimorph) inhibent le développement des champignons AM et ralentissent la biosynthèse des stérols de façon drastique à partir de faibles concentrations (0.02 mg/l), ceux de classe des triazoles (propiconazole) inhibent classiquement l'étape de 14a-déméthylation alors que ceux du type hydroxyanilide (fenhexamide) ne provoquent pas d'effet marquant. 3/- Les IBS induisent une régulation de la transcription des gènes *erg* de *Glomus* en réponse aux traitements (*GintSMO*, *erg 25* ; oxidosqualene synthase, *erg 7* ; C24-méthyl transferase, *erg 6*) (collaboration UNITO, équipe de L. Lanfranco). Projet FUNGIMYC financé par la Communauté Européenne « Sixth Framework Programme » sous le n° de contrat MEST-CT-2004-514213

(1) ZOCCO D., FONTAINE J., LOZANOVA E., RENARD L., BIVORT C., GRANDMOUGIN-FERJANI A., DURAND R and DECLERCK S. (2008) Influence of two sterol biosynthesis inhibitor fungicides (fenpropimorph and fenhexamid) on the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycological Research* 112: 592-601. (2) CAMPAGNAC E., FONTAINE J., LOUNES-HADJ SAHRAOUI A., LARUELLE F., DURAND R. and GRANDMOUGIN-FERJANI A (2009) Differential effects of fenpropimorph and fenhexamid, two sterol biosynthesis inhibitor fungicides, on arbuscular mycorrhizal development and sterol metabolism in carrot roots, *Phytochemistry* 69, 2912-2919. (3) CAMPAGNAC E., FONTAINE J., LOUNES-HADJ SAHRAOUI A., LARUELLE F., DURAND R. and GRANDMOUGIN-FERJANI A (2009) Fenpropimorph slows down the sterol pathway and the development of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*, *Mycorrhiza*, 19, 365-374. (4) OGER E., GHIGNONE S., CAMPAGNAC E., FONTAINE J., GRANDMOUGIN-FERJANI A. and LANFRANCO L. (2009) Functional characterization of a C-4 sterol methyl oxidase from the endomycorrhizal fungus *Glomus intraradices*, *Fungal Genetics and Biology*, DOI 10.1016/j.fgb.2009.03.002.

*Mots-clés* : mycorrhizes, lipid, stérol, acides gras, fenpropimorph, fenhexamide, propiconazole

## ***Arbuscular mycorrhizal symbiosis in cereals***

**U. Paszkowski**

Department of Plant Molecular Biology, University of Lausanne, 1015 Lausanne, Switzerland.  
uta.paszkowski@unil.ch

The arbuscular mycorrhizal (AM) symbiosis is the most widespread plant-fungal interaction between roots of terrestrial plants and fungi of the Glomeromycota. The association receives increasing scientific attention because of the nutritional benefit it confers to host plants, its ubiquitous occurrence among extant plants, its influence on plant diversity in natural ecosystems and its possible ancestral relationship to other plant interactions. Our research concentrates on the identification of plant-encoded factors required for development and functioning of the symbiosis. We have taken complementary approaches: a forward genetic mutant screen in maize plus a combination of transcriptomics and functional genomics in rice. Maize mutants impaired in their AM properties have been identified (Paszkowski *et al.*, 2006) and attempts to clone the causal mutations yields first candidates. In rice transcriptome analysis of mycorrhizal rice roots revealed a list of genes induced during mycorrhizal colonization (Güimil *et al.*, 2005). Among these a subset was expressed in a symbiosis-dependent fashion permitting the analysis of AM-specific signaling events. We found that the common SYM signaling pathway (Parniske, 2008) is functionally conserved between legumes and rice and that additional AM-specific signaling exists operating in parallel and diverging from the common SYM pathway (Gutjahr *et al.*, 2008).

(1) Güimil, S., Chang, H., Zhu, T., Sesma, A., Osbourn, A., Roux, C., Ioannidis, V., Oakely, E.J., Docquier, M., Descombes, P., Briggs, S.P., and Paszkowski, U. (2005). Comparative transcriptomics of rice reveals an ancient pattern of response to microbial colonization. *Proc Natl Acad Sci* 102, 8066-8070.

(2) Gutjahr, C., Banba, M., Croset, V., An, K., Miyao, A., An, G., Hirochika, H., Imaizumi-Anraku, H., and Paszkowski, U. (2008). Arbuscular mycorrhiza-specific signaling in rice transcends the common symbiosis signaling pathway. *Plant Cell* 20, 2989-3005.

(3) Parniske, M. (2008). *Arbuscular mycorrhiza*: the mother of plant root endosymbioses. *Nat Rev Microbiol* 6, 763-775.

(4) Paszkowski, U., Jakovleva, L., and Boller, T. (2006). Maize mutants affected at distinct stages of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant J.* 47, 165-173.

Keywords: arbuscular mycorrhizal symbiosis, Glomeromycota, genomics, rice

## **WAKomics: large-scale functional analysis of the WAK genes involved in the rice/*Magnaporthe oryzae* interaction**

**A. Delteil** (1), M. Blein (2), C. Michel (2), J.-B. Morel (2)

(1) UMR BGPI - CIRAD - Campus International de Baillarguet TA-A54/K, 34398 Montpellier

(2) UMR BGPI - INRA - Campus International de Baillarguet TA-A54/K, 34398 Montpellier

Wall-associated protein kinases (WAKs) are a new group of receptor-like kinases recently identified in *Arabidopsis* and in rice. A gene responsible for the quantitative resistance to *Fusarium oxysporum* in *Arabidopsis*, *RFO1*, encodes a WAK-like protein (WAKL22) (Diener and Ausubel, 2005). This finding suggests an important role for some WAKs in disease resistance. The first WAK in rice was recently identified as *OsWAK1*. The induction and overexpression of this gene in rice led to enhanced resistance to rice blast (Li *et al.*, 2008). Furthermore, WAKs also seem to interact with a wide range of proteins involved in cell-wall composition, phosphorylation or transcription processes (Li *et al.*, 2008, Rohila *et al.*, 2006, Yang *et al.*, 2003). Altogether, the evidences suggest that WAKs are novel receptor-like kinases playing an important role in plant disease resistance. Microarray data reveal differential expression of some WAKs in rice leaves infected with *Magnaporthe oryzae* (Vergne *et al.*, 2007). This set of WAKs was analysed by real time PCR in a time course experiment and confirmed the microarray results. This analysis also revealed differential expression for some WAKs very early after infection (4, 6 or 8 hours post inoculation), suggesting an early role in pathogen recognition. This early expression may be due to the recognition of common motifs of the fungal pathogens like chitin. Rice was sprayed with chitin and WAK expression was quantified at different time point after treatment. The results show that some WAKs are highly induced very early after chitin treatment (since 30 minutes and until 24 hours post treatment). Therefore some WAKs could play a role in basal resistance. To confirm a role of these WAKs in rice blast resistance, Knock-Out and transgenic rice lines with constitutive expression of a subset of WAKs were produced. Preliminary data supporting the role of this gene family in disease resistance in rice will be presented.

*Keywords:* *Magnaporthe oryzae*, rice, wall-associated kinase, basal resistance

## Plant cell wall integrity surveillance: a novel perception system for cellulose-binding effectors?

M. Larroque, G. Borderies, C. Lafitte, B. Dumas, E. Gaulin

UMR 5546- CNRS-Université Paul Sabatier Toulouse III, Pôle de Biotechnologie Végétale, BP 42617  
Auzeville, 31326, Castanet-Tolosan

The plant cell wall, one of the first barriers against pathogen intrusion, is targeted by cell-wall degrading enzymes secreted during infection. Wall degradation results in the release of cell wall fragments that can be detected as DAMPs (Danger Associated Molecular Patterns) inducing plant immunity (Boller and Felix, 2009). Structural modification of plant cell wall could also occur during the interaction of cellulose with non-enzymatic microbial proteins harboring CBM1 (Carbohydrate-Binding Module family 1). CBM1s were originally characterized in fungal cellulases where they enhance substrate accessibility, and in non-enzymatic CBEL proteins of *Phytophthora* where they play an essential role in adhesion and recognition of cellulosic substrates (Gaulin *et al.*, 2002). CBEL-like proteins were detected in all oomycete genomes analysed so far, including the legume pathogen *Aphanomyces euteiches*. In this species, CBEL-like proteins containing up to six associated CBM1 have been identified (Gaulin *et al.*, 2008). Strikingly, CBM1 from *P. parasitica* acts as a PAMP (Pathogen Associated Molecular Pattern) by inducing plant immune responses in several plant species including *Arabidopsis* and tobacco. This activity is correlated with the ability of CBM1 to bind cellulose (Gaulin *et al.*, 2006). Based on these data, a model linking CBM1-induced structural modification of cellulose to defense induction was proposed involving a cell-wall integrity surveillance system involving different players such as the cellulose synthase machinery, plasmalemma-localized stretch-activated calcium channel or RLKs (Receptor Like Kinases) (Dumas *et al.*, 2009). To validate this model, a reverse-genetic approach was developed. We first evaluated activity in *A. thaliana* of a synthetic peptide designed from an *A. euteiches* CBM1 sequence and a recombinant protein obtained in yeast, corresponding to a repetition of three CBM1s derived from an *A. euteiches* gene. Both approaches led to the obtention of active molecules which induce defense responses in *Arabidopsis thaliana* and in sufficient yield to engage a screening strategy. Results concerning responses obtained with RLK and cell wall mutants will be presented.

(1) Boller, T., and Felix, G. (2009) A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger Signals by pattern-recognition receptors. *Annu Rev Plant Biol* 60, 379-406

(2) Dumas, B., Bottin, A., Gaulin, E., and Esquerré-Tugayé, M.T. (2008) Cellulose binding domains: cellulose-associated defense sensing partners? *Trends Plant Sci*, 13, 160-164.

(3) Gaulin, E., Drame, N., Lafitte, C., Torto-Alalibo, T., Martinez, Y., Ameline-Torregrosa, C., Khatib, M., *et al.*, (2006) Cellulose binding domains of a *Phytophthora* cell wall protein are novel pathogen-associated molecular patterns. *Plant Cell*, 18, 1766-1777.

(4) Gaulin, E., Madoui, M.A., Bottin, A., Jacquet, C., Mathé, C., Couloux, A., Wincker, P., and Dumas, B. (2008) Transcriptome of *Aphanomyces euteiches*: new oomycete putative pathogenicity factors and metabolic pathways. *Plos One*, 3, e1723.

(5) Gaulin, E., Jauneau, A., Villalba, F., Rickauer, M., Esquerré-Tugayé, M. T., Bottin A. (2002) The CBEL glycoprotein of *Phytophthora parasitica var-nicotianae* is involved in cell wall deposition and adhesion to cellulosic substrates. *J. Cell Sci.* 115: 4565-4575

**Keywords:** oomycete, cell wall, plant immunity, CBM1

## **Biology and ecology of biofilms formed by the oomycete, *Phytophthora parasitica***

**E. Galiana** (1), N. Theodorakopoulos (1), B. Industri (1), L. Massi (2), M. Gaysinski (2), C. Mura (1), E. Deleury (1), A. Marais (1), G. Arbiol (1), A. Burger (2), F. Panabières (1), M. Ponchet (1)

(1) UMR Interactions Biotiques et Santé Végétale (INRA, CNRS, UNSA), F-06903 Sophia Antipolis, France

(2) Institut de Chimie de Nice, UMR6001, Faculté des Sciences Parc Valrose, F06108 Nice cedex 2, France

Oomycetes from the genus *Phytophthora* represent a major class of eukaryotic plant pathogens, most species causing devastating diseases in natural ecosystems as well as in numerous economically important crops. Alternatively to single cell behaviour (zoospore encystment and germ tube penetration), the infection cycle may also involve cell population dynamics via the formation of biofilms. Initially the founder cells adhere at host surface, aggregate to form a microcolony and drive the migration of a second wave of zoospores leading to massive encystment and cyst-orientated germination. The structure is rapidly colonized by different rhizospheric microorganisms forming a shared community in a mixed-species biofilm. Using this model a study is developed to understand molecular basis of microcolony formation in *P. parasitica*. A first aim is to identify molecules which coordinate the behavior of the swimming unicellular zoospores during formation of microcolonies. This part combines analysis of microcolony transcriptome (comparison between «lonely» cysts and cysts structured in microcolonies) with purification (HPLC) and structural elucidation (mass spectrometry determination, NMR analysis) of the molecules governing *P. parasitica* cellular responses. Microarray analyses revealed that microcolonies are mainly characterized by the coordinate up-regulation of genes for extracellular matrix structural constituents and for export/ import of substrates. This set of genes is now functionally analyzed and will be used as molecular markers for characterization of molecules activating cellular responses. The second part of the study aims to define the activity of these molecules within the biofilm microbial community and within the class of oomycetes. The approach associates molecular identification of species constituting mixed-species biofilms and biological screening for investigating the properties and the potential of these molecules to define tools for ecological engineering.

*Keywords:* Biofilms, Oomycete, Transcriptome, Microbial, Community

## Characterization of nitric oxide production in *Arabidopsis thaliana* elicited by oligogalacturonides

S. Jeandroz (1), S. Rasul (1,2), C. Dubreuil (1), O. Lamotte (2), B. Poinssot (2), G. Alcaraz (1), D. Wendehenne (2)

(1) UPSP PROXISS, Département Agronomie Environnement, AgroSup Dijon, 26 bd Dr Petitjean, BP 87999 21079 Dijon Cedex

(2) UMR Plant-Microbe-Environment INRA 1088/CNRS 5184/ UB, 17, rue Sully BP 86510 21065 Dijon Cedex France

Oligogalacturonides (OGs) are endogenous elicitors of defense responses released after partial degradation of pectin in the plant cell wall. It has been shown that, in *Arabidopsis thaliana*, OGs increased resistance to *Botrytis cinerea* and induced the expression of a variety of defense responses. We have demonstrated that the elicitor H22 (OG) triggered, in Col0 leaves, a significant NO synthesis of the gaseous nitric oxide (NO), recognized as an essential signal molecule for plant biotic stress responses. In order to understand the role of NO in the plant response to OG, we characterized the sources and the role of NO in molecular events involved in plant responses to pathogens. The ability of H22 to induce NO production was analysed in mutants impaired in the expression of genes encoding proteins putatively involved in NO production or associated to NO production. This production was reduced by 47 % in the Nitrate Reductase double mutant (*nia1/nia2*), an enzyme previously shown to catalyze NO synthesis from nitrite. Furthermore, a 50 % inhibition was recorded in the *dnd1* mutant invalidated in the expression of the plasma membrane cyclic nucleotide gated channel CNGC2 mediating Ca<sup>2+</sup> influx in transduction processes. Surprisingly, H22-triggered NO synthesis was suppressed by the mammalian NO synthase inhibitor L-NAME, suggesting that the elicitor-induced NO production might mobilize two pathways for NO synthesis: NR dependent as well as NOS-like dependent pathways. Using the NO scavenger cPTIO, we showed that OG induced MAP Kinases phosphorylation, but independently of NO production. H22 treatment also activated the accumulation of pathogen-induced gene transcripts, in a NO dependent-manner. Using plant mutants partially impaired in NO production or in NO-responsive genes, we investigate the role of NO in the plant response (including OG-induced resistance) to *B. cinerea*.

**Keywords:** Nitric oxide (NO), Oligogalacturonides, Elicitor, Nitrate Reductase (NR), Nitric oxide synthase (NOS), *Arabidopsis thaliana*



## Métabolites secondaires racinaires et résistance d'*Arabidopsis thaliana* à *Fusarium oxysporum*

K. Massoud, M. Garmier, C. Simon, C. Grandclément, P. Saindrenan

UMR 8618, Institut de Biotechnologie des Plantes, CNRS-Université Paris-Sud 11, bât. 630, 91405 Orsay cedex

Les plantes produisent un nombre considérable de métabolites de faible poids moléculaire, aux structures très diverses, les métabolites secondaires (MS). Ces MS sont impliqués dans le développement ainsi que dans les mécanismes d'adaptation des plantes à l'environnement, par exemple lors des réponses aux attaques de microorganismes pathogènes.

Environ 200 MS sont actuellement connus chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Au cours de ce travail, nous avons souhaité évaluer l'implication des MS dans les réactions de défense racinaires d'*Arabidopsis* à un champignon pathogène vasculaire, *Fusarium oxysporum*. Des inoculations de deux formes spéciales (f. sp.) de *Fusarium* ont été réalisées sur plantules d'*Arabidopsis* : 1) la f. sp. *conglutinans* qui induit, dans notre système, un arrêt de la croissance racinaire, une chlorose foliaire suivie d'une nécrose de toute la plantule et 2) la f. sp. *melonis* à laquelle les plantules sont capables de résister.

Une approche expérimentale portant sur l'analyse des teneurs en scopolétine (un MS connu pour participer à la résistance au virus de la mosaïque chez le tabac) et en camalexine (la phytoalexine majeure d'*Arabidopsis*, impliquée dans la résistance à certains champignons nécrotrophes) a tout d'abord été entreprise. Les niveaux de scopolétine sont maintenus dans les racines inoculées par la f. sp. *melonis*, mais décroissent rapidement en réponse à la f. sp. *conglutinans*. Au contraire, une accumulation de camalexine est observée en réponse aux deux f. sp., avec cependant une accumulation plus importante en réponse à la f. sp. *conglutinans*. Des tests de résistance réalisés sur des plantes mutantes d'*Arabidopsis* déficientes dans la synthèse de camalexine (*pad3*, phytoalexin deficient 3) et de scopolétine (*f6'h1-1*, feruloyl CoA hydroxylase 1-1) montrent une plus grande sensibilité du mutant *pad3* à la f. sp. *conglutinans* et a contrario une moindre résistance du mutant *f6'h1-1* à la f. sp. *melonis*. Ces résultats montrent l'implication de ces deux MS dans la résistance d'*Arabidopsis* à *Fusarium*. Enfin, un profilage métabolique d'extraits solubles racinaire a été entrepris et suggère l'implication d'autres MS dans ces mécanismes de résistance.

Mots-clés : *Arabidopsis thaliana*, Métabolites secondaires, *Fusarium oxysporum*

## Conservation de la fonction Non-race Disease Resistance 1 (NDR1) entre le caféier et *Arabidopsis*

D. Fernandez (1), J.-L. Cacas (1)\*, A.-S. Petitot (1), L. Bernier (2), J. Estevan (1)

(1) UMR 186 - Résistance des Plantes aux Bio-agresseurs, Institut de Recherche pour le Développement (IRD), BP64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France

(2) Centre d'Étude de la Forêt, Université Laval, Québec (QC) Canada G1V 0A6

\*Nouvelle adresse : Laboratoire de Biogenèse Membranaire, UMR5200 CNRS-Université Bordeaux 2, 33076 Bordeaux Cedex, France

L'interaction entre le caféier (*Coffea arabica* L.) et le champignon *Hemileia vastatrix*, responsable de la rouille orangée, est gouvernée par une relation de type gène-pour-gène. Dans le cadre spécifique de la résistance à *H. vastatrix*, le caféier développe une réaction dite hypersensible (RH) dont le stade ultime se caractérise par la mort des cellules végétales localisées au site de l'infection. Dans ce travail, l'orthologue potentiel du gène *NDR1* d'*Arabidopsis thaliana* a été identifié chez le caféier, puis cloné. En accord avec sa fonction potentielle dans l'initiation des voies de signalisation conduisant à la résistance, l'expression de ce dernier était activée lors de la RH. Des expériences de complémentation génétique du mutant nul d'*A. thaliana*, *ndr1-1*, ont donc été entreprises afin de confirmer la fonction du gène de caféier (*CaNDR1*). Les lignées sauvage (Col-0), mutante *ndr1-1* et mutantes transformées avec une construction *35S::CaNDR1* (notées T3) ont été inoculées avec *Pseudomonas syringae* pv *tomato* (*Pst*), et la croissance bactérienne *in planta* a été suivie pendant 4 jours. La surexpression de *CaNDR1* permet de rétablir la résistance à la souche avirulente de *Pst* (*DC3000::AvrRpt2*) dans les trois lignées T3 testées. L'analyse par RT-QPCR de gènes marqueurs de défense a également montré que la surexpression de *CaNDR1* chez le mutant restaurait un profil d'expression comparable à celui des plantes sauvages. D'autre part, la localisation subcellulaire de la protéine *CaNDR1* a été analysée par des essais d'expression transitoire (agroinfiltration) chez le tabac (*Nicotiana benthamiana*). Il a ainsi pu être montré par immunoblot que l'extraction de la protéine *CaNDR1* fusionnée à un épitope HA nécessitait l'utilisation d'un détergent, suggérant son association à une membrane. Des observations en microscopie confocale de feuilles transformées avec une construction *35S::GFP-CaNDR1* ont confirmé une localisation au niveau du plasmalemme. L'ensemble de ces résultats montre une conservation de la fonction NDR1 chez *A. thaliana* et *C. arabica*, et suggère par ailleurs que la protéine *CaNDR1* pourrait être impliquée dans la résistance à *H. vastatrix*.

Mots-clés : rouille du caféier, NDR1, réaction d'hypersensibilité

## In the neighborhood of resistance to *Puccinia hordei* QTL2

T. C. Marcel (1,3), F. K. S. Yeo (1), B. Chalhoub (2), R. E. Niks (1)

(1) Laboratory of Plant Breeding, Graduate school for Experimental Plant Sciences, Wageningen University, Droevendaalsesteeg 1, 6708 PB Wageningen, the Netherlands

(2) Unité de Recherches en Génomique Végétale (URGV-INRA), 2 rue Gaston Crémieux - CP 5708, 91057 Évry cedex, France

(3) INRA-AgroParisTech, UMR1290 BIOGER-CPP, Avenue Lucien Brétignières BP01, 78850 Thiverval-Grignon, France

Partial resistance of barley to leaf rust (*Puccinia hordei* Otth) can be considered as a component of plant basal defense. Such a resistance is based on mechanisms associated with the formation of papillae that delays infection and field epidemics, although plants display a compatible infection type. In previous studies, we have found that 3 to 5 QTLs segregated for partial resistance to leaf rust in biparental barley mapping populations. We selected one QTL, Rphq2, as a target for map-based cloning as it was highly effective at seedling stage and mapped in a region with a high recombination rate. Rphq2 was identified in recombinant inbred line populations L94 x Vada and Vada x SusPtrit, the resistance allele coming from Vada. The substitution mapping of Rphq2 localized the QTL in a genetic window of about 0.1 cM. This interval displays synteny with a 70 Kb stretch of rice Chromosome 4 and with a 50 Kb stretch of *Brachypodium distachyon* contig super\_0. We constructed two pooled BAC libraries, one from 'Vada' that contains the resistance allele at Rphq2 and one from 'SusPtrit' that contains a susceptibility allele at this locus. A contig of three BAC clones from Vada spanning the QTL region was successfully constructed and sequenced. Two BAC clones were isolated from SusPtrit that were positive each for a marker flanking Rphq2 but that did not overlap with each other. One of the clones from SusPtrit was sequenced. Among the predicted barley genes from these sequences, six have homology to genes previously involved in disease resistance such as peroxidases, serine/threonine protein kinases and a mitogen-activated protein kinase. Those six genes are candidates as genes involved in Rphq2 mediated resistance. Gene expression experiments are being performed to confirm that these candidate genes are indeed expressed during infection and to possibly detect association between gene expression level and resistance to leaf rust infection. The identification of the gene underlying Rphq2 resistance QTL will provide new insights into the genetic basis of partial resistance of plants to fungal pathogens.

*Mots-clés* : Rouille Brune, QTL, Résistance partielle, Clonage positionnel

## **Plant pathogen effectors with phenotypes that extend beyond the plant host**

**S. A. Hogenhout**

Department of Disease and Stress Biology, The John Innes Centre, Norwich, NR4 7UH.

Phytoplasmas are bacterial pathogens that are limited to the plant phloem and are introduced into plants by phloem-feeding insects, including leafhoppers, planthoppers and psyllids. Phytoplasmas manipulate their hosts in a variety of ways. They interfere with plant development leading to witches' broom (shoot proliferation), phyllody (flowers that become leafy), and bolting (growth of tall stalks) symptoms. They also enhance insect fitness and alter plant chemistry to make volatiles that attract insects. We sequenced the genome of Aster Yellows phytoplasma strain Witches' Broom (AY-WB) to completion and characterized AY-WB virulence factors (effector proteins) that interfere with plant development. One of these virulence factors, secreted AY-WB protein 11 (SAP11), induces leaf crinkling, stunting, shoot proliferation and crinkled siliques when overproduced in *Arabidopsis thaliana*. The induction of these phenotypes correlates with the targeting of SAP11 to plant cell nuclei. The AY-WB leafhopper vector *Macrostelus quadrilineatus* produces more progeny on AY-WB-infected *Arabidopsis* and SAP11 overexpression lines. Thus, SAP11 phenotypes extend beyond its direct interaction with the plant host; it stimulates the generation of more insect vectors that subsequently can disseminate the phytoplasmas to other plant hosts. Recent findings suggest that SAP11 directly interacts with plant transcription factors that regulate plant senescence. We hypothesize that SAP11 delays senescence so that plants live longer and are more attractive to insect vectors. Other pathogens that are dependent on insects for dissemination may also produce effectors that manipulate insects. We investigated the rust fungus *Puccinia monoica*, which is a spectacular plant pathogen that triggers the formation of flower-like structures in its host plant, *Boechera stricta*, a relative of *Arabidopsis*. These pseudoflowers not only mimic plant flowers in color (yellow) and shape (leaves are organized in petiole-like arrangements) but also in the production of sweet nectars and volatile chemicals that are potent attractors of insects thus enabling the dissemination of fungal spores.

*Keywords:* Insect, vector, phytoplasma, *Puccinia*