Interactions plante-microbiotes-bioagresseurs

Thierry Langin

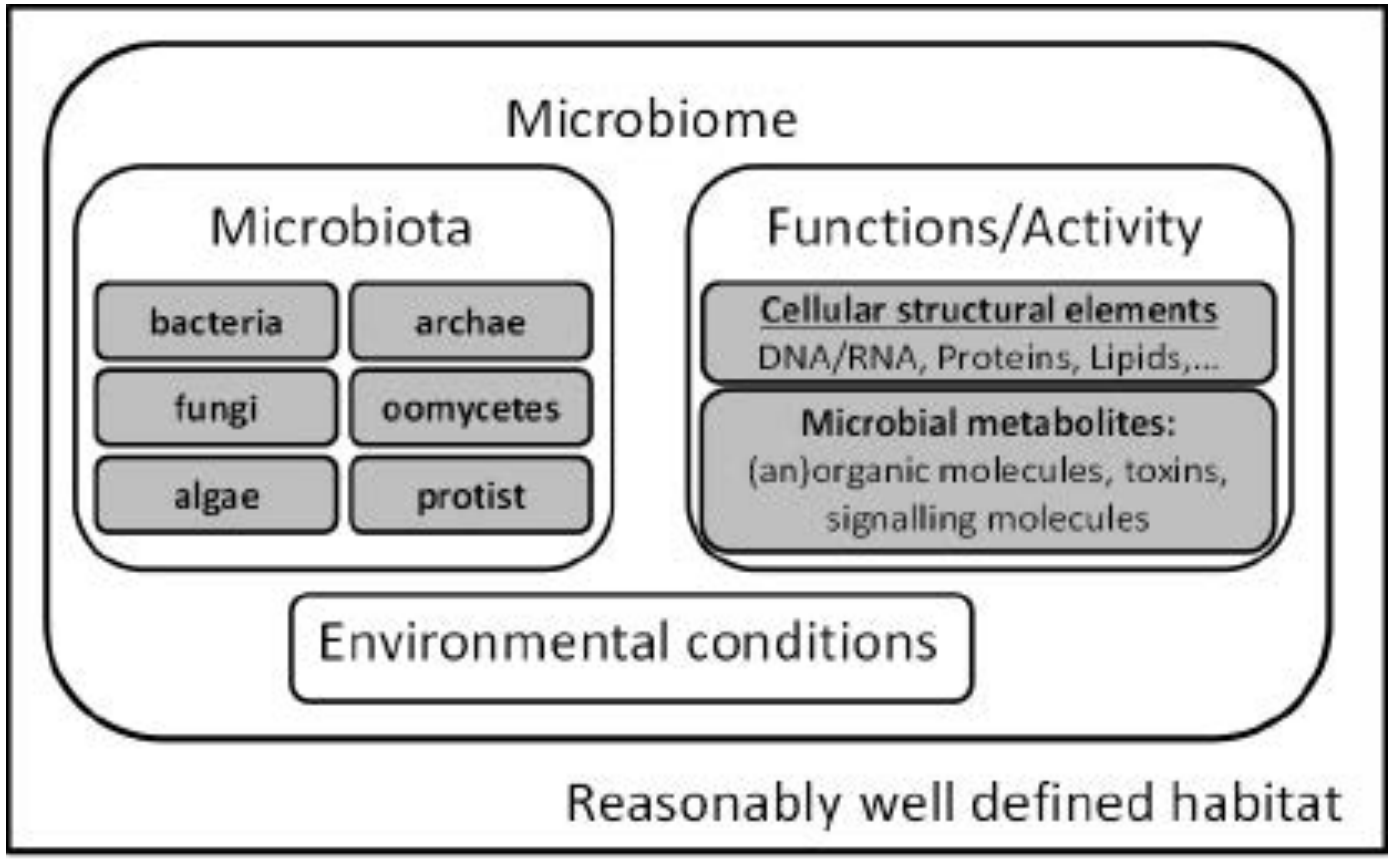
Le microbiote est constitué de bactéries, virus, archées, protistes et champignons microscopiques hébergés par un hôte, plante ou animal

Une petite partie de ce microbiote est héritable, transmis de génération en génération (exemple des endophytes chez les plantes)

Le microbiome de la plante est appelé phytobiome

- microbiote rhizosphèrique
- microbiote phyllosphèrique (épiphyte)
- microbiote endophytes
- Microbiote associé à la graine

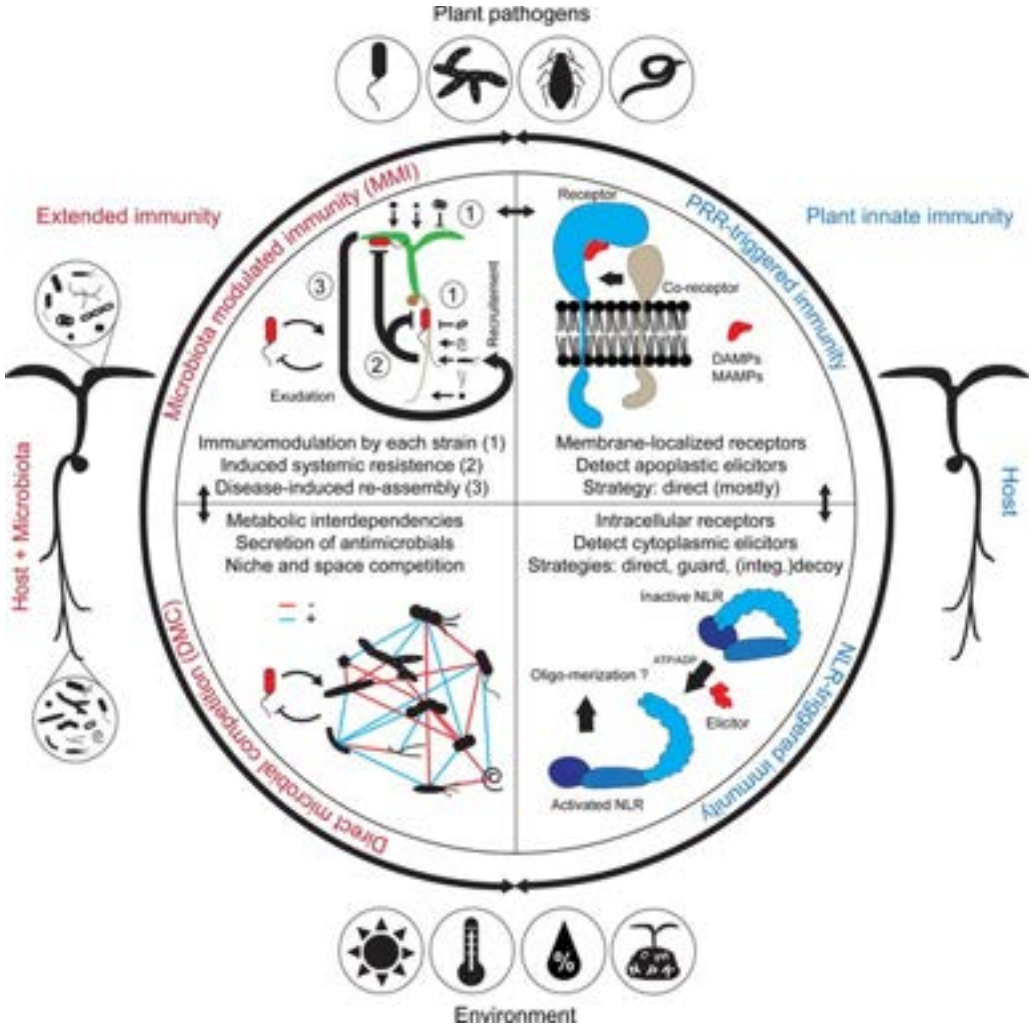
Microbiote *versus* Microbiome



The 'microbiota' consists of the assembly of microorganisms (community) belonging to different kingdoms (Prokaryotes [Bacteria, Archaea], micro-Eukaryotes [e.g. Protozoa, Fungi, Algae]) in a defined environment which interact together

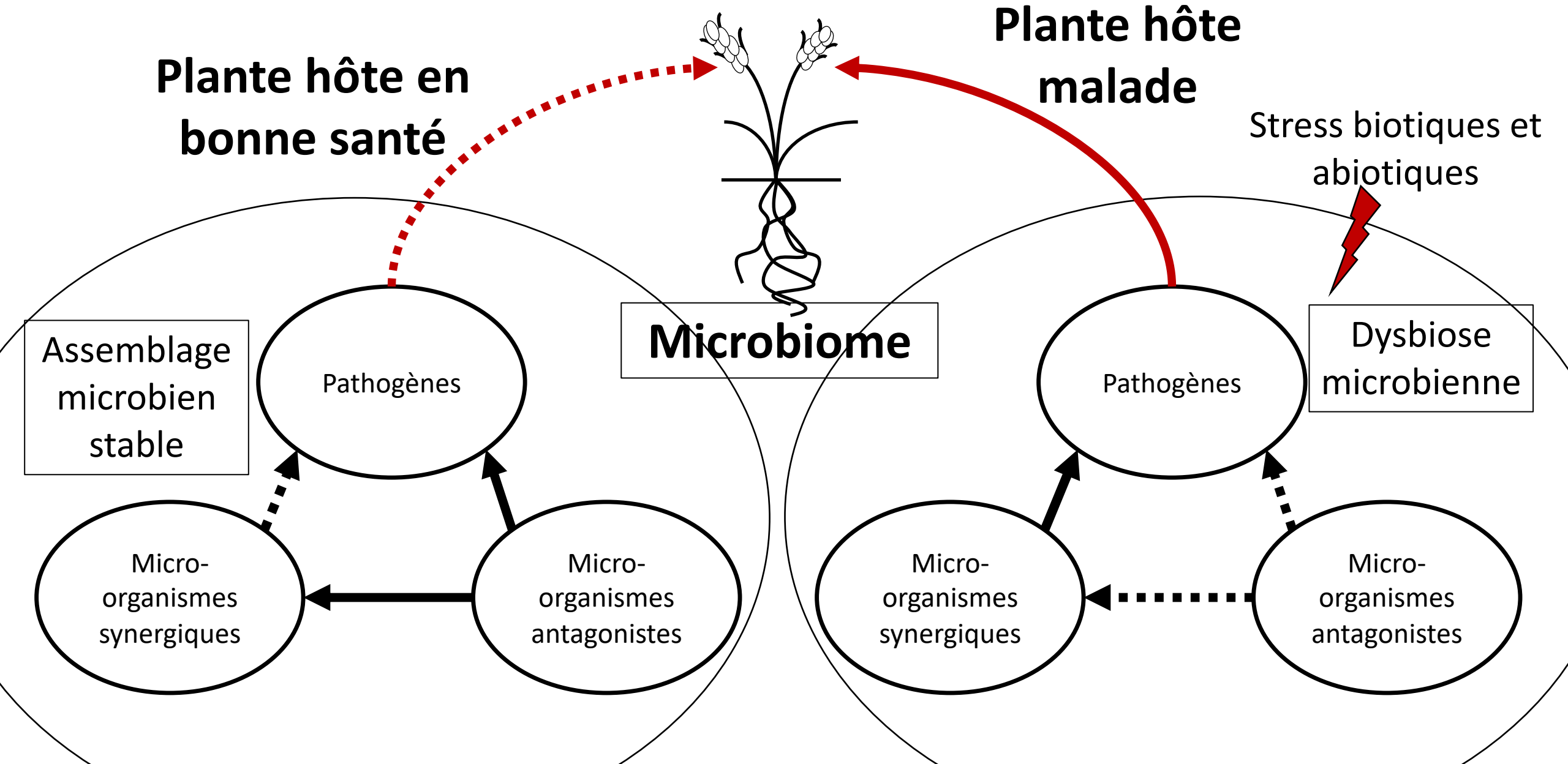
'Microbiome': not only the microbiota, but also their functions/activities (structural elements and metabolites) and the surrounding environmental conditions = dynamic ecosytem

Fig 1. Microbiota-mediated extension of the plant immune system.



Vannier N, Agler M, Hacquard S (2019) Microbiota-mediated disease resistance in plants. PLOS Pathogens 15(6): e1007740. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007740
https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1007740

Microbiome et santé de la plante



Le microbiome du sol : un levier pour la régulation des pathogènes du blé
Thèse L. Simon

Campagne de prélèvements

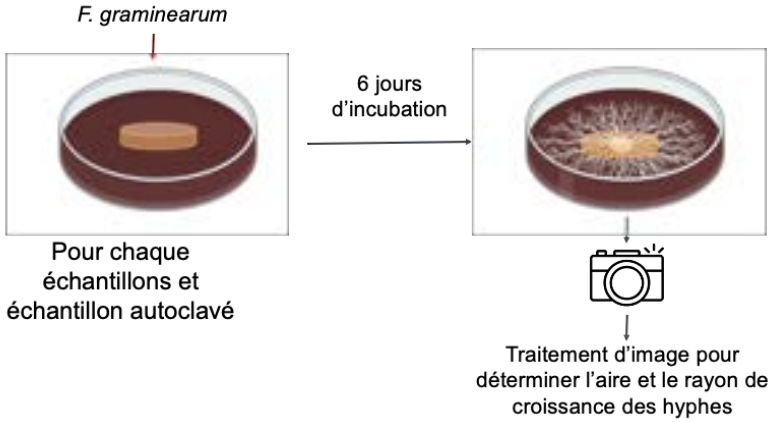
3 au 12 mai 2021

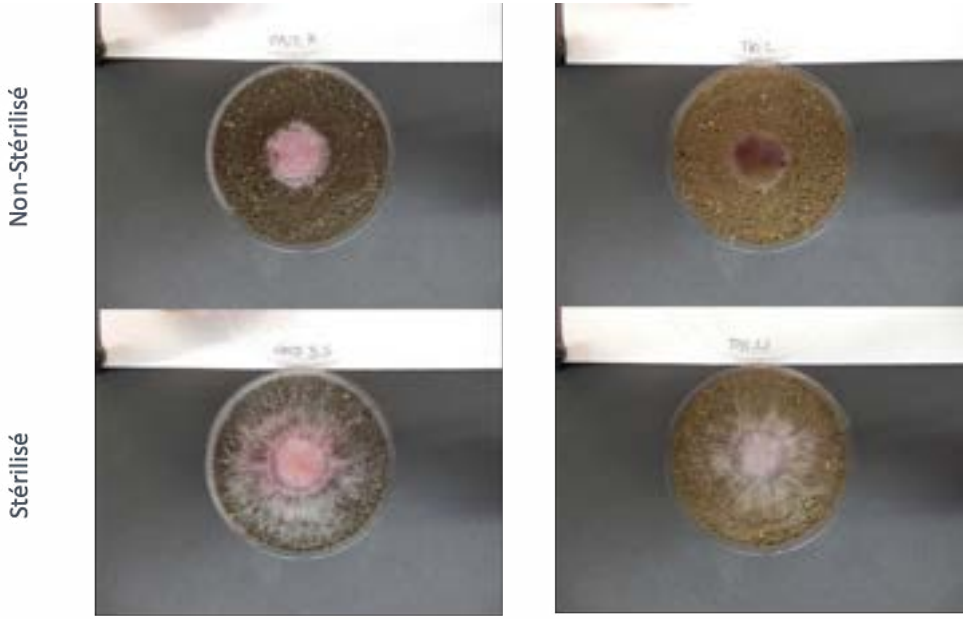
103 parcelles sélectionnées

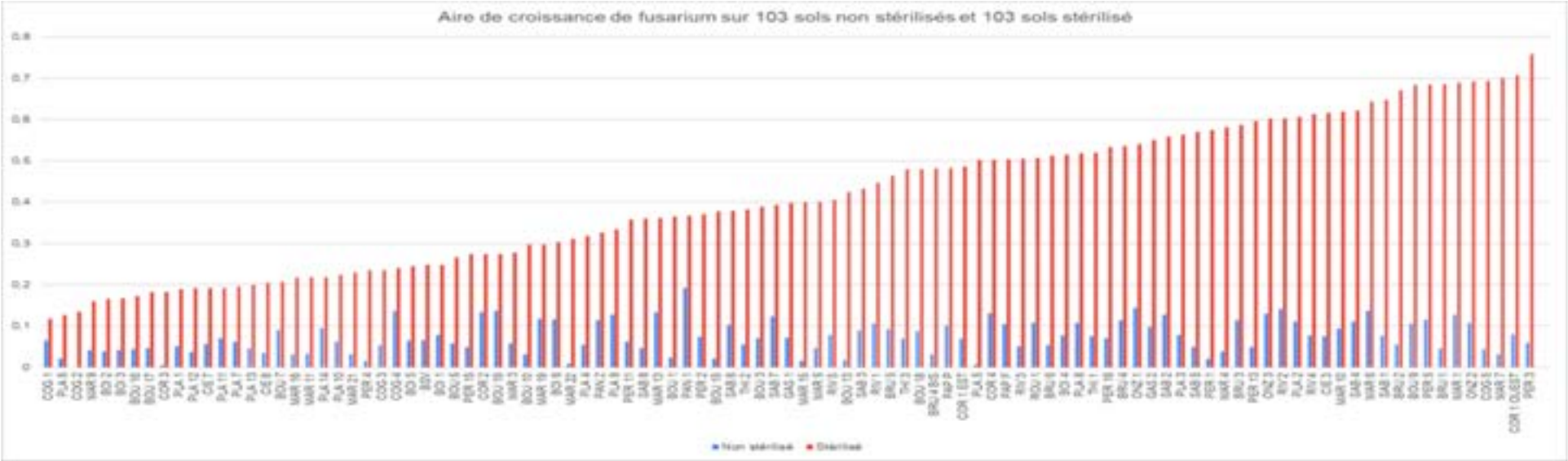
19 agriculteurs

	Conventionnel	Conservation	Biologique
Parcelles	60	19	24
Agriculteurs	9	2	8

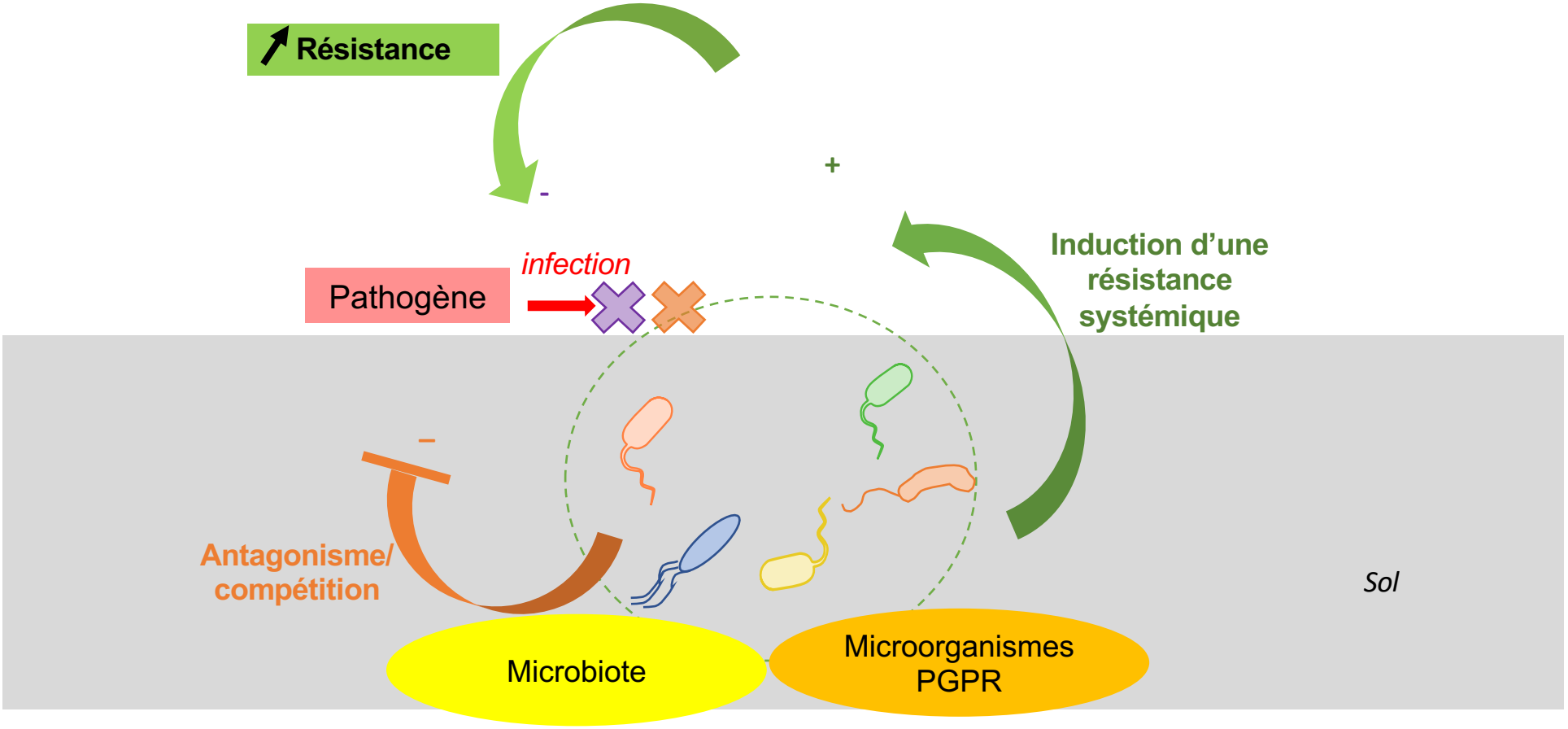
Tests de fongistase







Combiner les mécanismes de phytoprotection résultant de l'interaction blé - microbiote



Thèse de L. Simon (2021 - 2023, financement CAP20-25)

Thèse A. Ballot (2018 – 2022, financement région)

Projet Région DOPELARA
PIA PPR DEEPIMPACT (2021 – 2026)
PIE PPR SUCSEED (2021 – 2026)

Besset-Manzoni et al , 2019 PLoS One

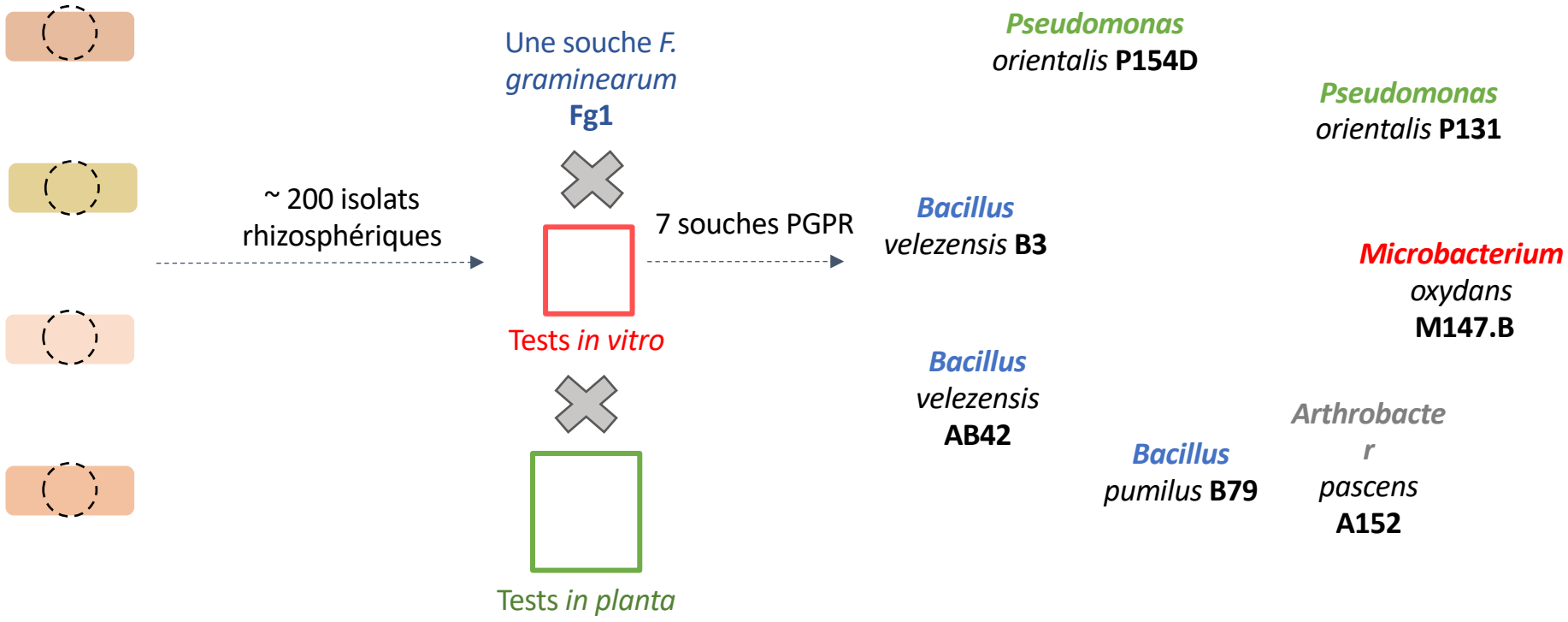
DOPELARA : *Recherche d'un agent de lutte bactérien à spectre large contre les principales maladies fongiques du blé (Thèse A. Ballot)*

Criblage de bactéries rhizosphériques du blé

4 sols de France

Criblage rapide:

Sélection de 7 PGPR:

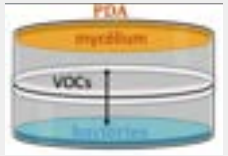


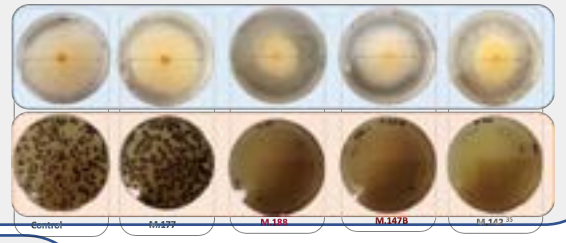
Evaluation du potentiel d'antagonisme et de phytoprotection des 7 souches de rhizobactéries issues

Inhibition de la croissance de différentes souches de *Fusarium graminearum et Zymoseptoria tritici*

Par confrontation directe sur milieu solide (PDA)/mycélium

Par exposition à des composés volatiles (VOCs) émis par les souches bactériennes





Évaluée sur fonte semis et pourriture du collet

Phytoprotection

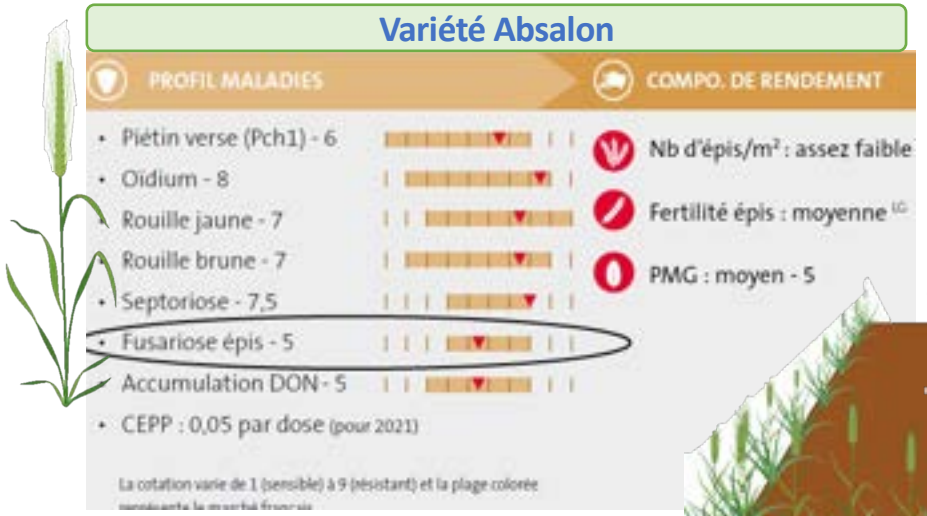
Thèse Aline Ballot

VEGEPOLYS VALLEY
CULTIVONS L'AUDACE VÉGÉTALE

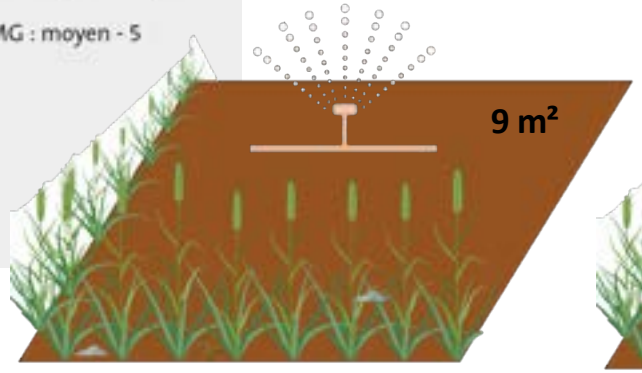
Production et formulation d'un inoculum bactérien utilisable en champs

Bacillus velezensis **B3**

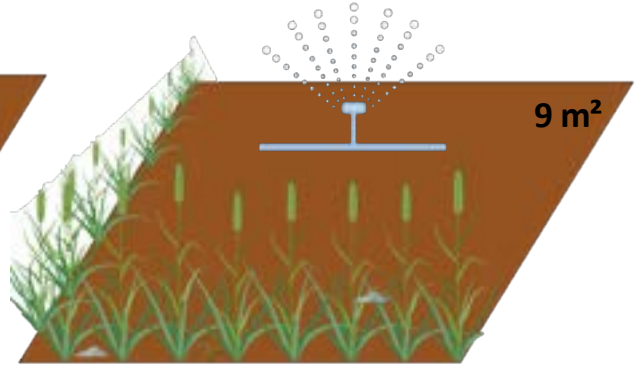
Essai de biocontrôle en champs sur fusariose de l'épi



B3
1.10^{13} UFC/ha



Témoin
H2O



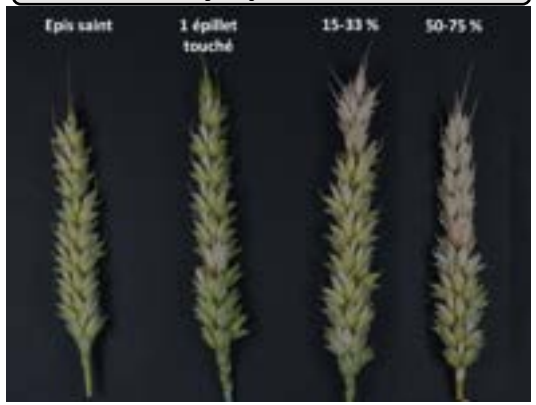
29/05 : Inoculation bactérienne
31/05 et 01/06: Inoculations de la souche R94-6 (1.10^6 spores/ml)

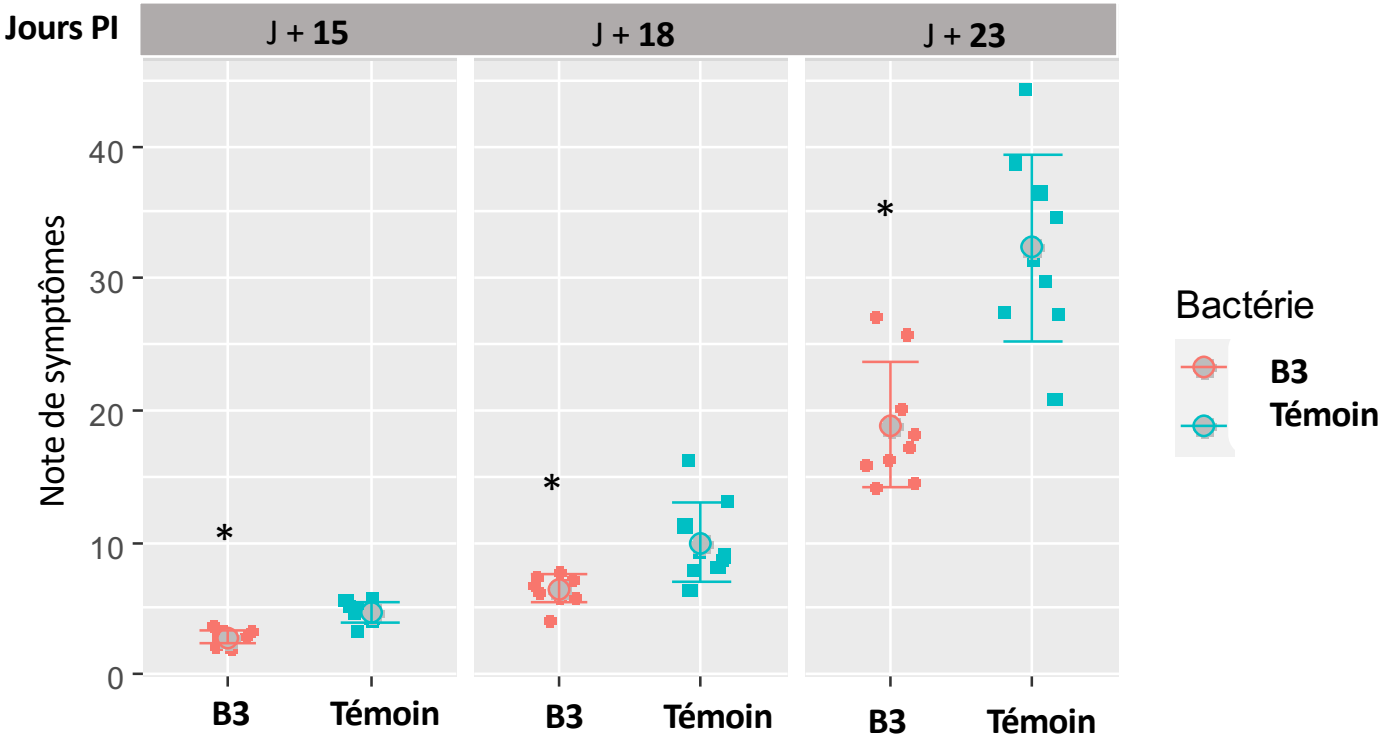
Production et formulation d'un inoculum bactérien utilisable en champs

Bacillus velezensis **B3**

Suivi et notation de symptômes en champs

Symptômes





* Valeurs de moyenne significativement différentes de celle du témoin (test de Wilcox)

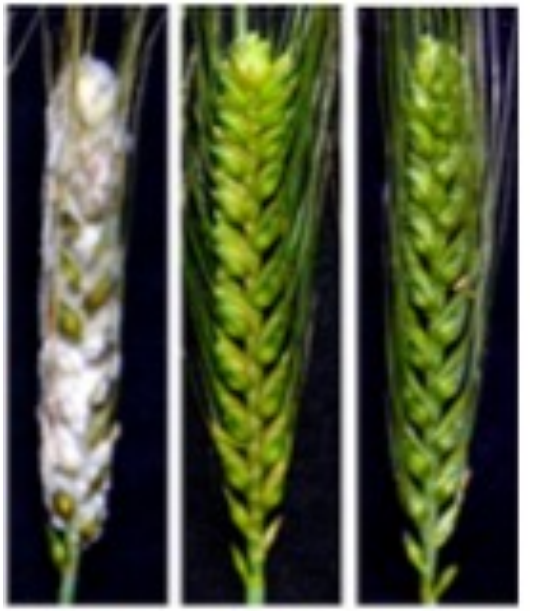
Table 1
Examples of the application of bacterial consortia.

Plant and growth conditions	Consortia/origin of bacteria	Stress	Consortia effect	References
Arabidopsis thaliana, growth chamber, non-sterile soil	*Xanthomonas* sp. WCS2014-23, *Stenotrophomonas* sp. WCS2014-113, *Microbacterium* sp. WCS2014-259/ field soil with endemic *Arabidopsis* plants	*Hyaloperono-spora arabidopsidis*	Less fungal spores and higher plant fresh weight	[74]
Solanum lycopersicum cv. Moneymaker, growth chamber	*Bacillus megaterium* SOGA_2, *Curtobacterium ceanosedimentum* SOGA_3, *Curtobacterium* sp. SOGA_6, *Massilia aurea* SOGA_7, *Pseudomonas coleopterorum* SOGA_5, 11 and 12, *Pseudomonas psychrotolerans* SOGA_13, *Pseudomonas rhizosphaerae* SOGA_14 and 19, *Frigoribacterium faeni* SOGA_17, *Xanthomonas campestris* SOGA_20/phyllosphere of field-grown tomato plants	*Pseudomonas syringae* pv. tomato	Fewer pathogen DNA copies on leaf disks	[58]
Solanum tuberosum cv. Lady Clair, cv. Victoria, cv. Bintje, leaf disks in petri dishes	Double or triple combinations of *Pseudomonas* spp. R32, R47, R76, R84, S04, S19, S34, S35, S49/rhizosphere and phyllosphere of field-grown potatoes	*Phytophthora infestans*	Reduced fungal sporangiophore development	[56]
Lycopersicon esculentum cv. Jiangshu, greenhouse pots with soil	*Pseudomonas* spp. CHA0, PF5, Q2-87, Q8R1-96, 1M1-96, MVP1-4, F113, Phl1C2/pea, wheat, cotton, tomato, sugar beet, tobacco	*Ralstonia solanacearum*	Reduced disease severity and pathogen abundance	[78]
Blue maize CAP15-1 TLAX/greenhouse pots with vermiculite	*Pseudomonas putida* KT2440, *Sphingomonas* sp. OF178, *Azospirillum brasilense* Sp7, *Acinetobacter* sp. EMM02/unknown	Dessica-tion	Increase of shoot and root dry weight, plant height and plant diameter	[75]
Capsicum annuum, *Vitis vinifera* cv. Barbera, growth chamber, greenhouse	*Acinetobacter* sp. S2 and *Bacillus* sp. S4, *Sphingobacterium* sp. S6, *Enterobacter* sp. S7 and *Delftia* sp. S8/*Vitis vinifera* rhizosphere and endosphere	Drought	Increased fresh root, aerial biomass and photosynthesis	[73]
Nicotiana attenuate, field	*Arthrobacter nitroguajacolicus* E46, *Bacillus mojavensis* K1, *Pseudomonas frederiksbergensis* A176, *Arthrobacter nitroguajacolicus* E46, *Bacillus cereus* CN2, *Bacillus megaterium* B55, *Bacillus mojavensis* K1, *Pseudomonas azotoformans* A70, *Pseudomonas frederiksbergensis* A176, *Bacillus megaterium* B55, *Pseudomonas azotoformans* A70/tobacco plants	Natural wilt disease	Less dead plants	[59]

Wheat microbiome can reduce virulence of a plant fungus by altering histone acetylation
Y. Chen, J. Wang, N. Yang, Z. Wen, X. Sun, Y. Chai2 & Z. Ma, Nature Genetics 2018

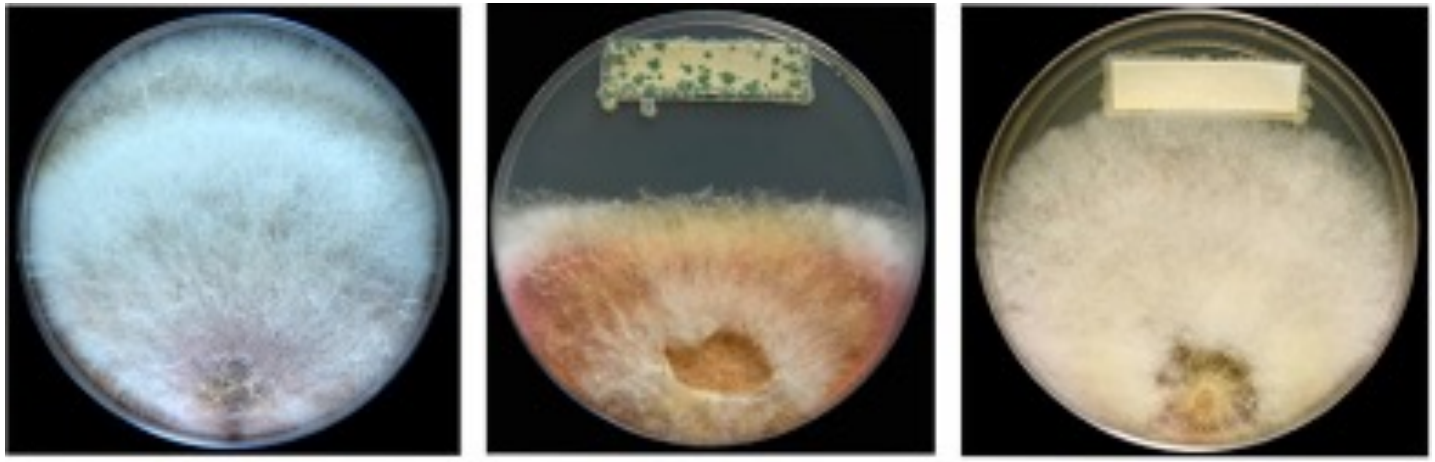
Le microbiote de l'épi de blé présente une forte activité antagoniste contre *F. graminearum (Fg)* responsable du FHB (biocontrôle)

Identification de la composante du microbiote responsable de l'effet antagoniste : la souche de *Pseudomonas piscium ZJU60*



Control ZJU60 Phenamacri

Wheat microbiome can reduce virulence of a plant fungus by altering histone acetylation
Y. Chen, J. Wang, N. Yang, Z. Wen, X. Sun, Y. Chai2 & Z. Ma, Nature Genetics 2018



Control ZJU60 Δ*phzA-H*

En co-culture avec *Fg*, la souche ZJU60 exprime une forte activité inhibitrice, avec un rayon d'inhibition >20 mm

Le PCN, synthétisé par l'opéron *phzA-H*, est le principal composé antifongique produit par *ZJU60*.

L'inactivation de l'opéron *phzA-H* (*DphzA-H*) conduit à une perte totale de l'activité antifongique

Wheat microbiome can reduce virulence of a plant fungus by altering histone acetylation
Y. Chen, J. Wang, N. Yang, Z. Wen, X. Sun, Y. Chai2 & Z. Ma, Nature Genetics 2018

Caractérisation du mode d'action d'action de PCN

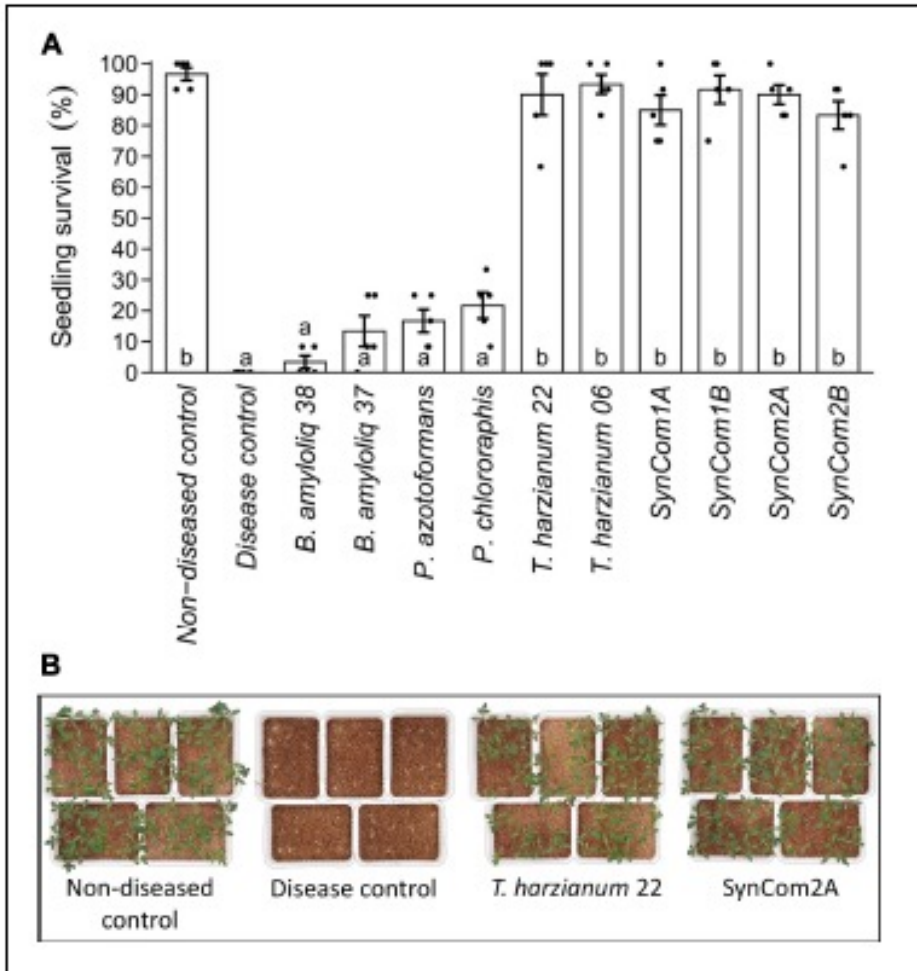
L'analyse, par immunoblotting, de l'acétylation des histones H2BK11 et H3K18 en présence ou non de PCN a permis de montrer que PCN inhibe spécifiquement l'activité d'acétylation d'histone (HAT) de Gcn5

Le complexe SAGA est responsable de l'acétylation des histones, impliqués dans la régulation de la transcription RNA polymerase II dépendante

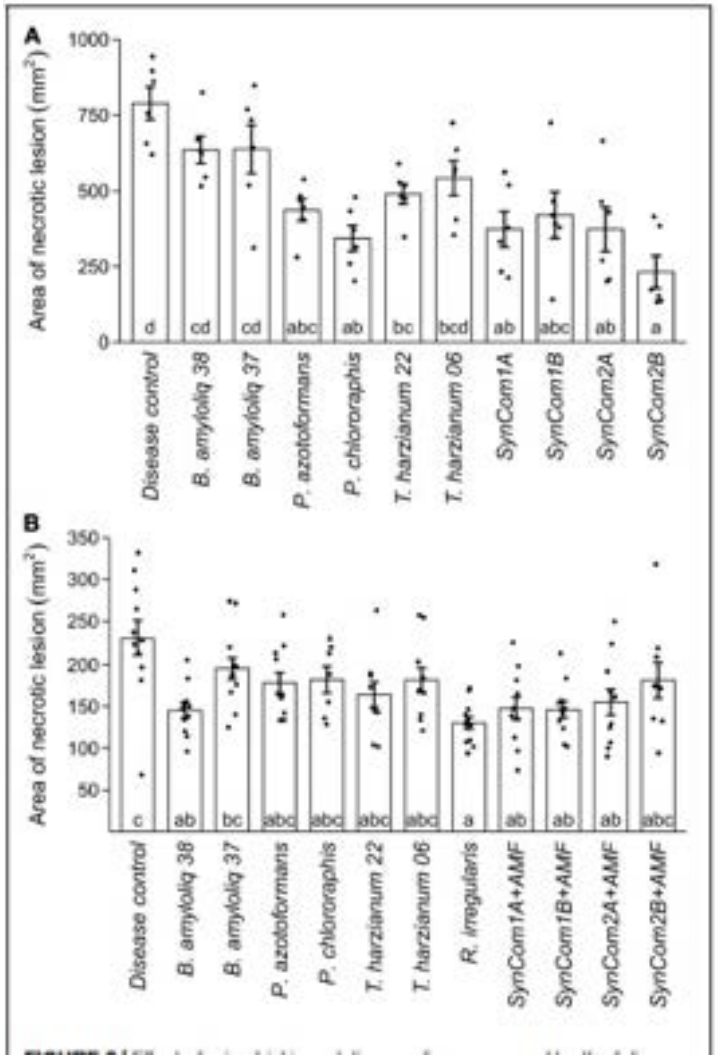
L'inactivation du complexe SAGA réduit significativement la croissance mycélienne, la production in planta de la mycotoxine DON et diminue fortement la virulence de *Fg*

Effets d'un traitement avec de consortia microbiens (*SynCom*) sur deux maladies de la tomate

Fusarium oxysporum

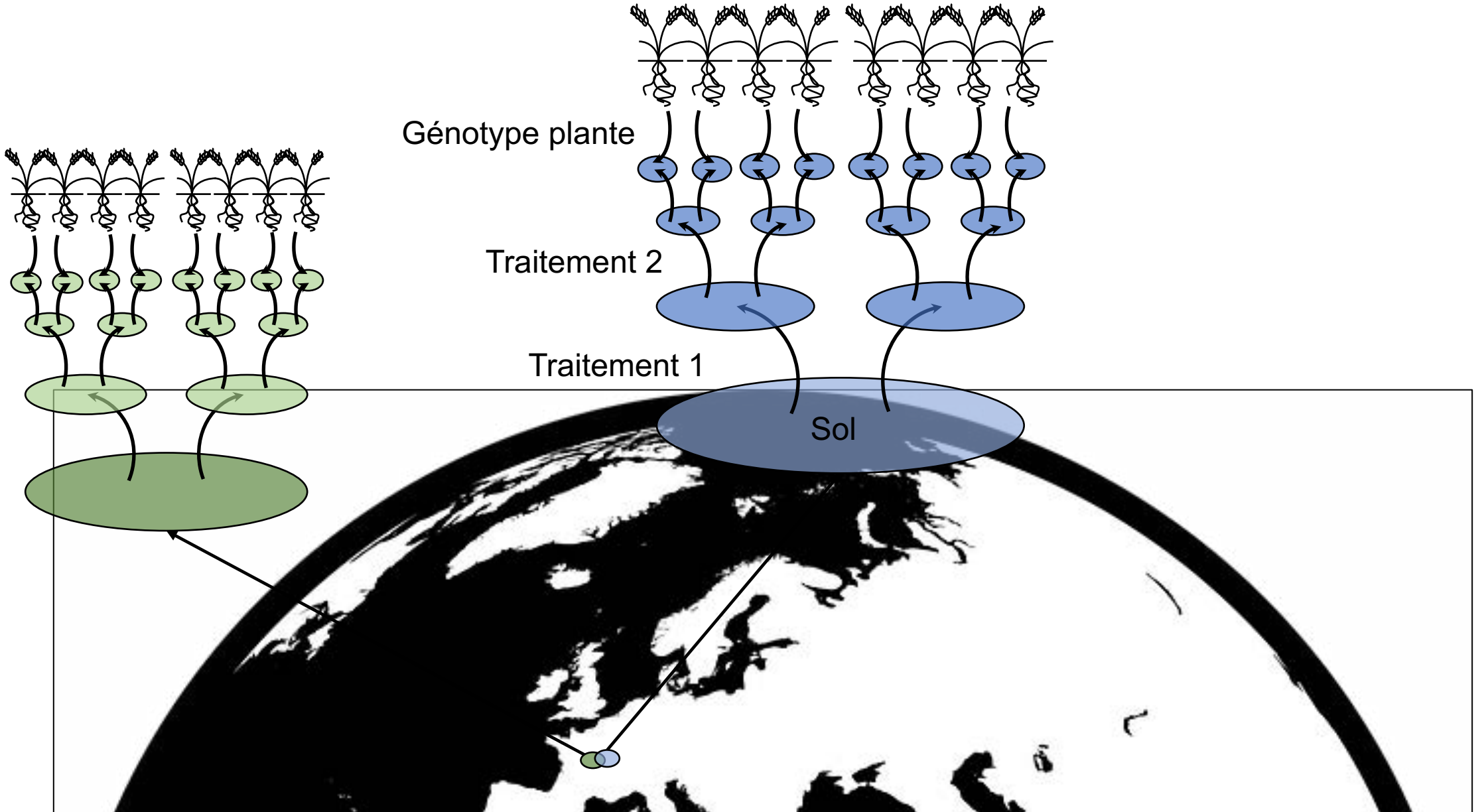


Botrytis cinerea



Peut-on contrôler ces interactions?

Hiérarchisation des différents facteurs impactant la structure des microbiotes

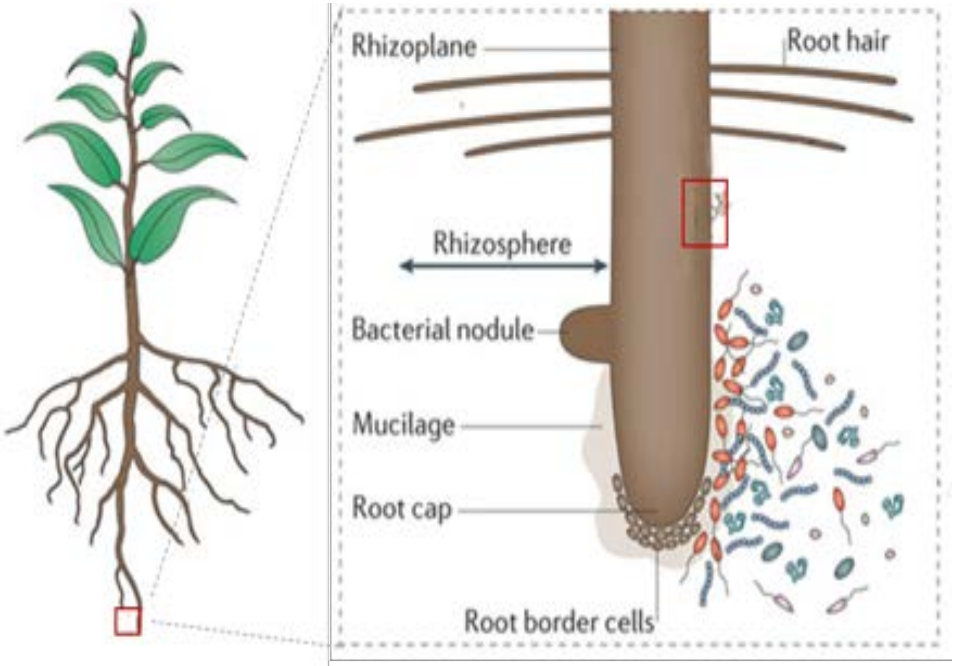


- Rhizosphère : fraction de sol qui est contact avec les racines

- Les plantes libèrent ~ 20% de leurs photosynthétats au niveau des racines

- Ces rhizodépôts constituent une source majeure de composés organiques pour les microorganismes telluriques qui sont essentiellement hétérotrophes voire biotrophes

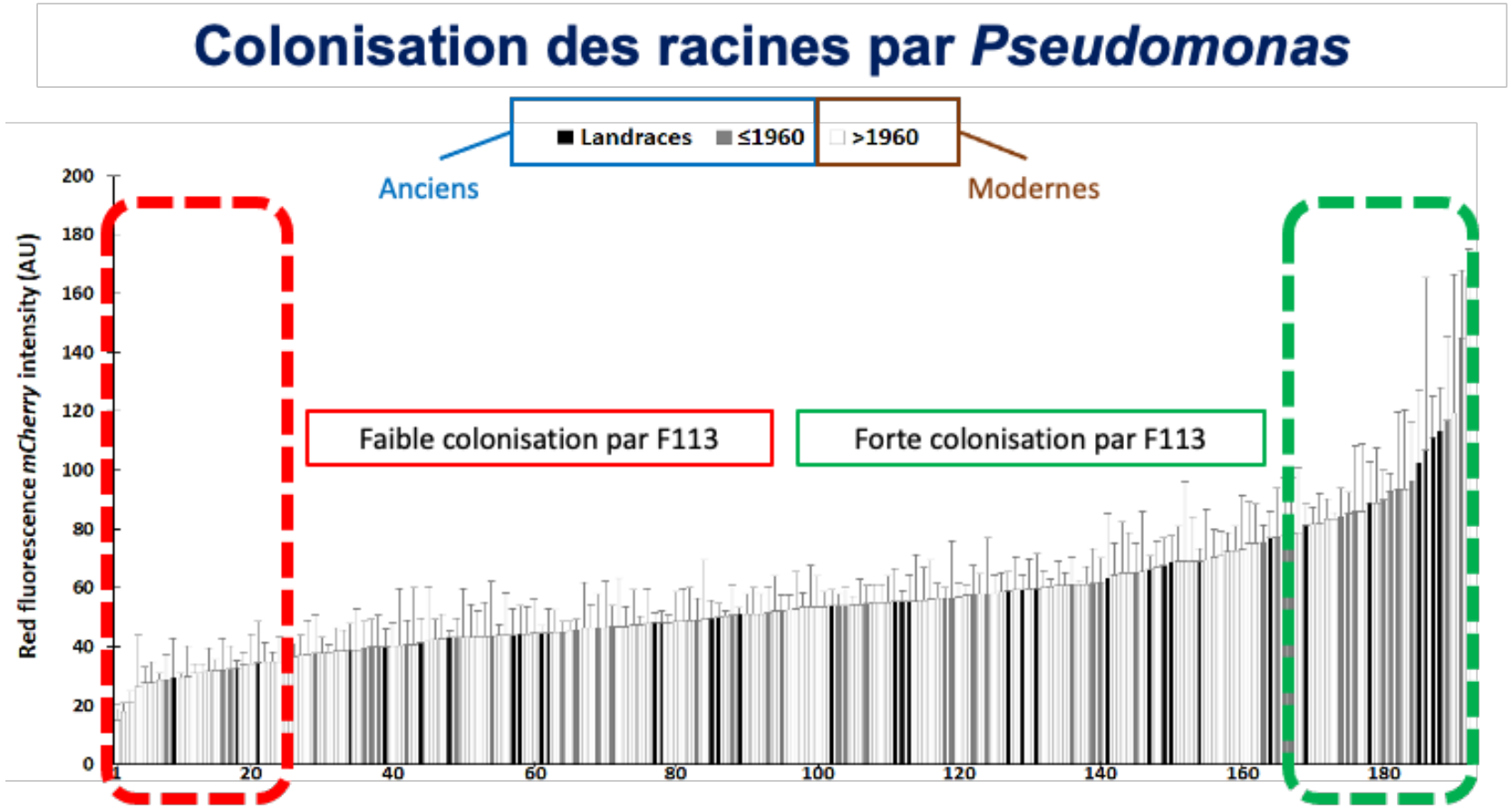
- Forte colonisation : ~10^8 à 10^9 bactéries par g de rhizosphère et 1.0 à 1.5 m de filament fongique par cm^2 de surface racinaire (Moënne-Loccoz et al. 2014)



Philippot et al. (2013)

Génotypes anciens/modernes

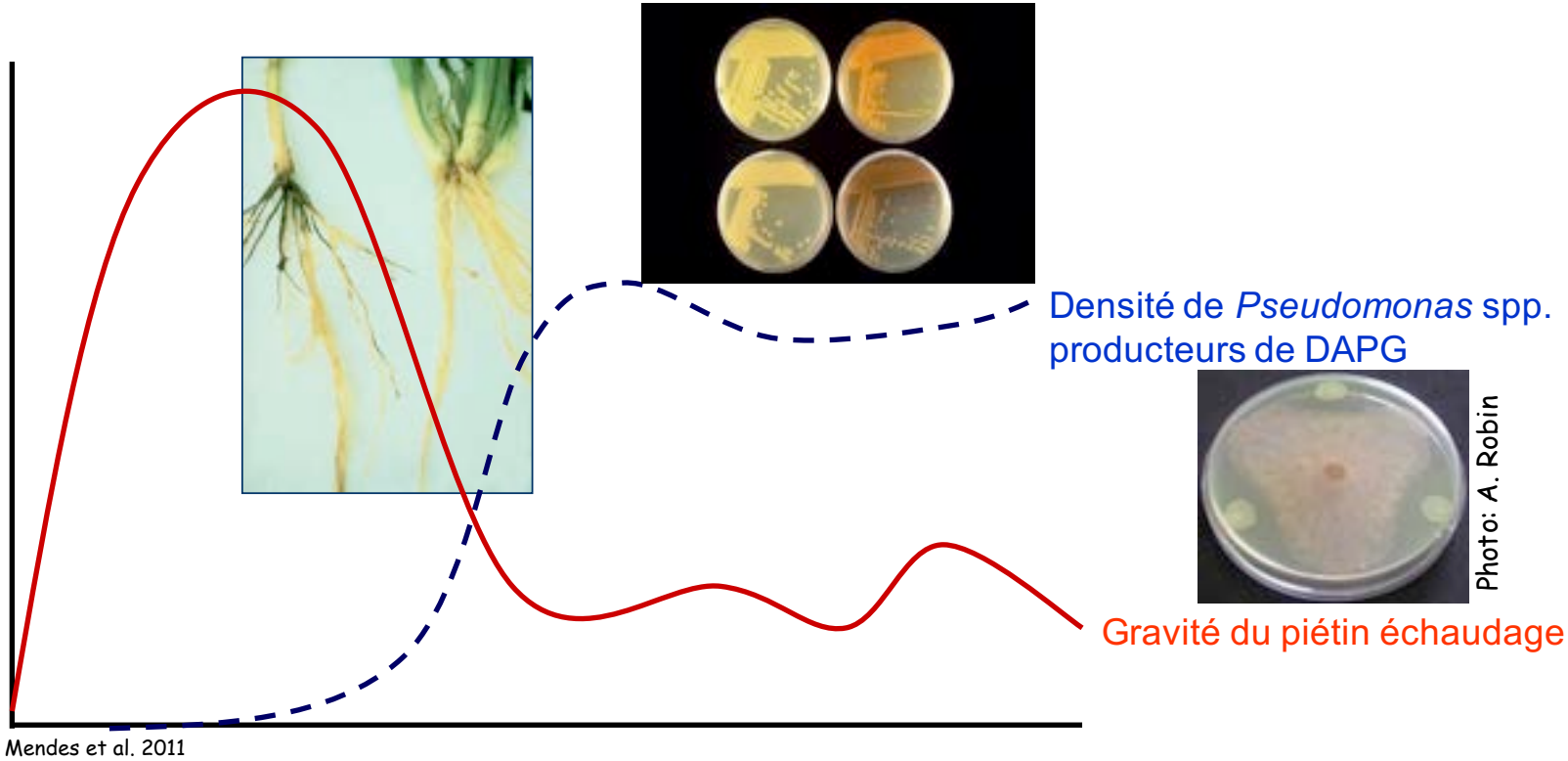
- Les génotypes anciens interagissent mieux avec les PGPR
- Mais de nombreux génotypes modernes sont encore capables de le faire



(J. Valente, Y. Moenne-Loccoz, C. Prigent-Combaret)

La plante est capable de sélectionner au sein de la biodiversité microbienne tellurique des populations favorables à sa croissance et à sa santé

Exemple de la résistance au piétin échaudage



Années de monoculture de blé

Adapté de diapositives fournies par J. Raaijmakers

Génotypes anciens/modernes

- Les génotypes anciens interagissent mieux avec les PGPR
- Mais de nombreux génotypes modernes sont encore capables de le faire

QTL

- Encore très peu d’analyses génétiques
- En systèmes très simplifiés (*in vitro*)
- Des régions associées sont détectées
- Des régions plutôt spécifiques

Comparaison avec données agronomiques nécessaires

- Recherche de zones communes
- Validation des résultats au champ
- En conditions stressantes

Impact de la résistance *vs* sensibilité aux maladies sur la composition du microbiote racinaire

Total populations and selected physiological groups of micro-organisms in rhizosphere and non-rhizosphere soil*

Rhizosphere soil	Disease reaction**	Bacteria ($\times 10^6$)	Cellulo-lytic ($\times 10^3$)	Pectino-lytic ($\times 10^4$)	Amylo-lytic ($\times 10^6$)	Ammoni-fying ($\times 10^6$)	Nitrate-reducing ($\times 10^5$)
Cadet***	Resistant	165.4b††	4.7b	4.1d	2.4c	18.1c	1.2b
Rescue***	Susceptible	335.2a	131.2a	570.2a	38.1b	116.1b	3.8b
C–R5*B*†	Susceptible	325.9a	146.9*a*	270.4b	70.3a	221.2a	2.6b
C–R5*D*†	Resistant	180.4b	3.2b	62.2c	4.4c	15.6c	14.6a
Non-rhizosphere	–	32.1c	0.2c	0.3e	2.0c	1.1d	1.2b

* Per gram of soil, oven-dry basis. Each value represents a geometric mean of three replicates.

** Relative resistance to common root rot[7].

*** Recipient and donor parental varieties, respectively.

† Substitution lines, identical to Cadet except for substitution of chromosome pair, *5B* and *5D*, respectively.

†† Data in each column followed by same letter do not differ statistically ($P = 0.01$).

(Neal et al 1973)

projet ANR BacterBlé (2014 – 2019)

- Phénotypage d'une Core-Collection de 196 accessions
- Génétique d'association (GWAS)

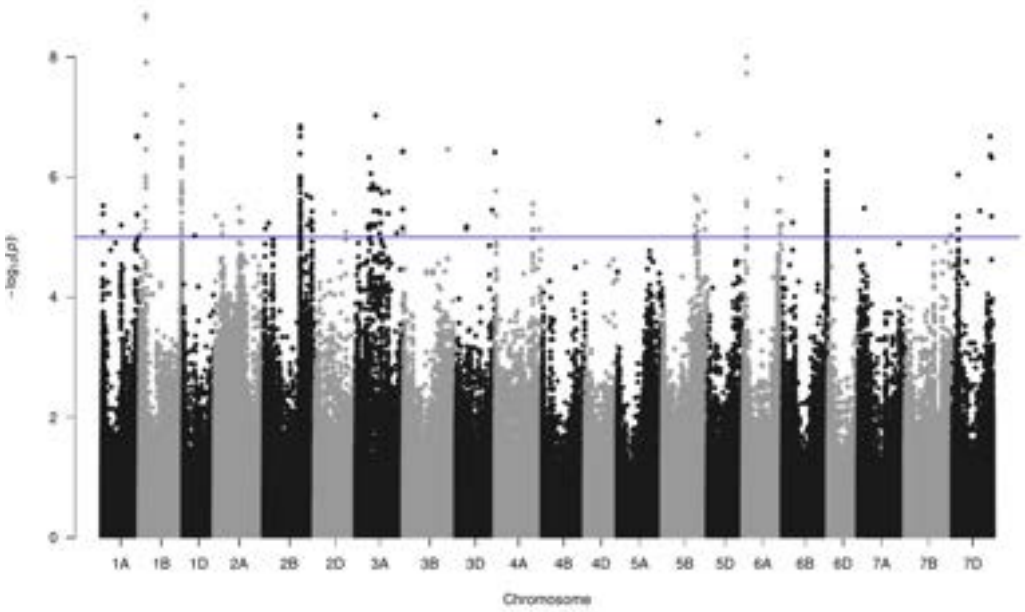
- Pour les inoculations avec rhizobactéries de type PGPR
  - *Pseudomonas kilonensis* F113
  - *Azospirillum brasilense* Sp245

- Pour les caractères
  - Colonisation racinaire
  - Expression des gènes bactériens

ANR BacterBlé
(ANR-14-CE19-0017)

Données de génotypage de PIA BreedWheat

Identification de régions génétiques impliquées dans le contrôle entre la plante et des composantes du microbiote



LOD > 5 ➔ 302 SNP associés à au moins 1 caractère

- Des nombres et des localisations différentes entre bactéries
  - Peu de régions associées à *Pseudomonas*
  - Un nombre important pour *Azospirillum*
- Des régions communes et spécifiques de la colonisation et de l'expression racinaire de *ppdC*
- Des régions pour l'expression corrigée de la colonisation racinaire (induction)

Table 1

Approaches that have identified plant genes that shape the microbiome

Plant genes

Approaches		Process studied	Genes/Loci identified	Model	Refs.
Reverse genetic		Plant hormone biosynthesis	Plant hormones	*Arabidopsis*	[19,20]
	SynComs and amplicon sequencing	Antimicrobial biosynthesis	Triterpene biosynthesis	*Arabidopsis*	[23••]
		Iron homeostasis	Coumarin biosynthesis	*Arabidopsis*	[24•,28,29]
		Nitrogen homeostasis	*NRT1.1B*	*Oryza sativa*	[26•]
		Phosphate homeostasis	*PHR1*	*Arabidopsis*	[27]
	Transcriptional profiling	Induced systemic resistance	*MYB72* and *BGLU42*	*Arabidopsis*	[31,32]
		Microbiome structure	*CYP71A12*	*Arabidopsis*	[62••]
	Genome-wide association studies (GWAS)	Microbiome structure	Plant loci responsible for defense and cell wall integrity	*Arabidopsis*	[60,61]
Forward genetic		Dysbiosis	*CAD1* and *MIN7 FLS2 ERF CERK1 (mfec)*	*Arabidopsis*	[51••]
	Rescreening mutant collections	Beneficial microbe enrichment	*FERONIA*	*Arabidopsis*	[53••]

Table 2

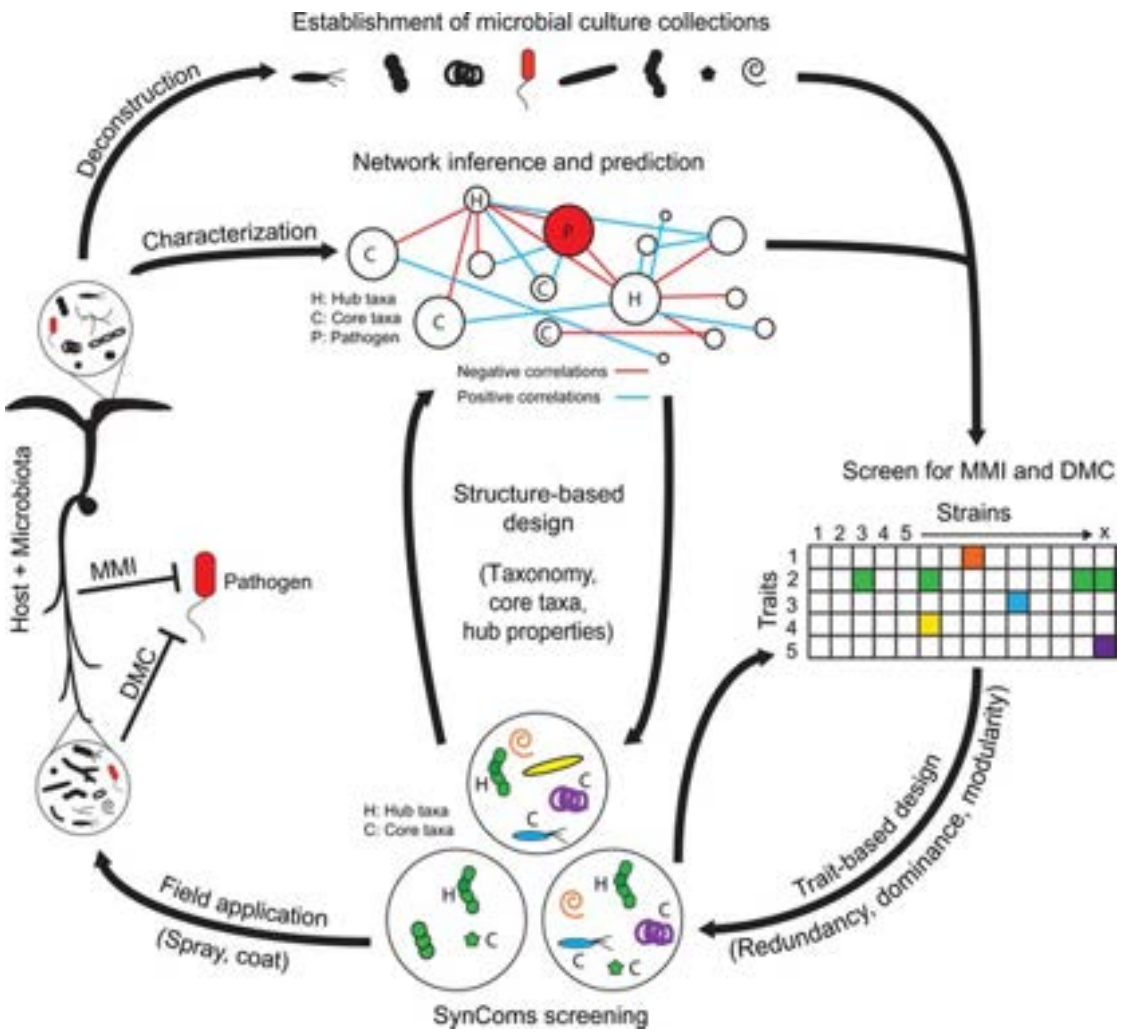
Approaches that have identified bacterial genes involved in colonizing the microbiome and modulating plant health

Bacterial genes

Approaches		Process studied	Genes/Loci identified	Model	Refs.
Forward genetic	Tn-seq	Host colonization	Amino acid biosynthesis, polyamine metabolism, outer membrane modification	*Pseudomonas* spp. WCS417, WCS365	[39•,40]
		Host colonization	Two component signaling ColR/S	*Pseudomonas* sp. WCS365	[41]
	Genetic screening	Pathogen protection	Amino acid metabolism, putative regulators	*Sphingomonas*, *Pseudomonas*	[43,44]
		Immunity suppression	Gluconic acid	*P. capeferrum* WCS358	[49•]
Reverse genetic		Growth promotion, root growth inhibition	Gene clusters of unknown function	Rhizobiales	[48]
		Pathogenesis	Syringomycin/ syringopeptin	*Pseudomonas* spp.	[54]
		Induced systemic susceptibility	Single locus of unknown function	*Pseudomonas* spp.	[55]
	Comparative genomics	Root growth inhibition	Auxin and ethylene degrading enzymes	*Variovorax*	[56]
		Plant-association factors	Carbohydrate metabolism, microbe-microbe interactions, nitrogen fixation, chemotaxis, secretion systems	Diverse bacteria	[57••]
		Disease suppression	Antifungal effectors, chitinases, nonribosomal peptide synthetases (NRPSs) and polyketide synthases (PKSs)	*Flavobacterium*	[58•]

Song et al, Current Opinion in Plant Biology 2021

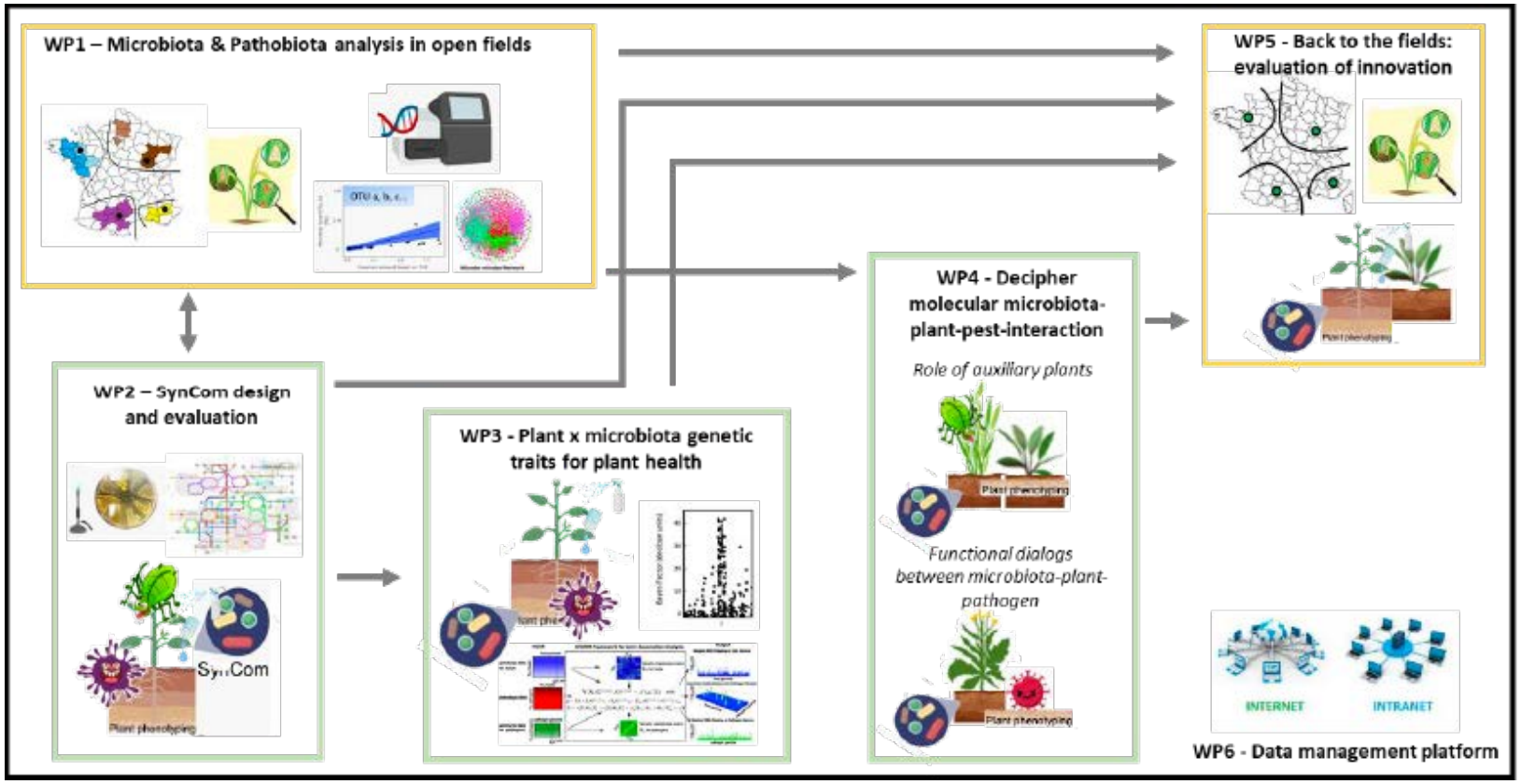
Fig 2. Rational design of SynComs with predictable pathogen biocontrol activities.



Vannier N, Agler M, Hacquard S (2019) Microbiota-mediated disease resistance in plants. PLOS Pathogens 15(6): e1007740. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007740
https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1007740

PIA PCA 2021 – 2026
DEEP IMPACT: DEEP IMPACT Deciphering plant-microbiota interactions to enhance crop defenses to pests

Coord° C. Mougel (IGEPP, Rennes)



3 M€
6 ans

SUCSEED
Stopping the use of -cides in seeds

Kick-off meeting

20 janvier 2021

Partenaires - *Prestataires

ACADEMIC PARTNERS

- Institut de Recherche en Horticulture et Semences (Angers)
- Institut Jean-Pierre Bourgin (Versailles)
- Génétique Diversité Ecophysiologie des Céréales (Clermont Fd)
- Institut de Génétique, Environnement et Protection des Plantes (Rennes)
- Institut des Sciences des Plantes - Paris-Saclay (Paris)
- Institut de Biologie de l'École Normale Supérieure (Paris)
- Micro et Nanomedicine translationnelle (Angers)
- Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes (Avignon)
- Science Action Développement - Activités Produits Territoires (Paris)
- Institut de Recherche en Propriete Intellectuelle (Paris)
- Clermont Recherche Management (Clermont Fd))

ASSOCIATIONS

Union Française des semenciers

Syndicat professionnel du marché d'intrant agricole

International Biocontrol manufacturer association

* Fédération Nationale des Agriculteurs Multiplicateurs de Semences

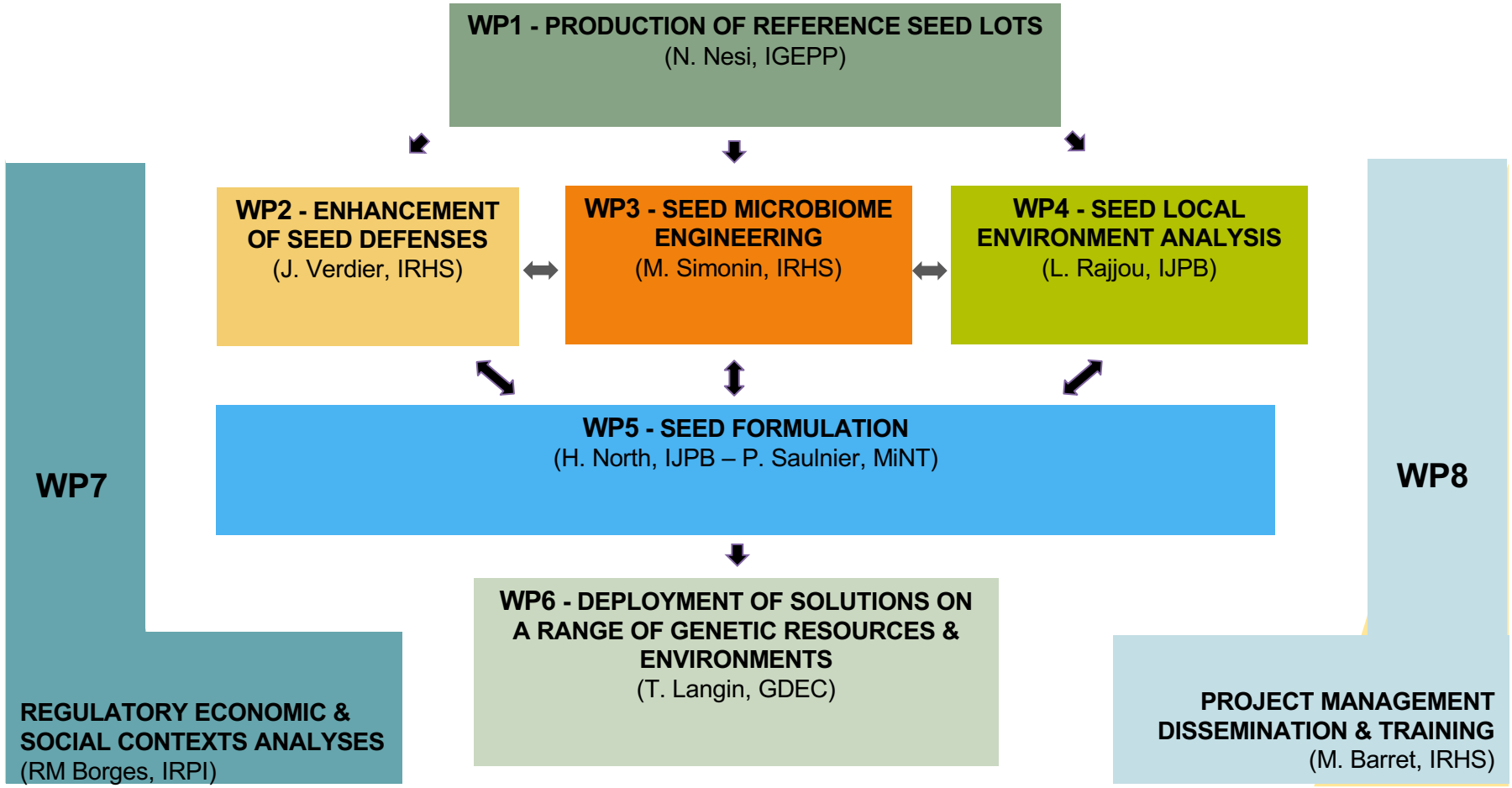
Groupe d'Etude et de contrôle des Variétés Et des Semences

PRIVATE SECTOR

FRAYSSINET

* KAPSERA
* iMEAN
* MilliDrop
* IMMUNRise

SUCSEED - Project overview



Métaprogramme HOLOFLUX “*Holobiontes et flux microbiens au sein des systèmes agri-alimentaires*”, 2019

Réseaux INRA :

- SymbiFix : favoriser les interactions entre les communautés de recherche sur la fixation symbiotique de l’azote et sur les céréales
- AgroSym : intensifier, généraliser et élargir les services rendus par les symbioses et les associations mutualistes

Plant Alliance (exGIS BV) Groupe de réflexion sur Microbiome

…

Merci pour votre attention