



La génomique au service de l'écologie microbienne des truffières

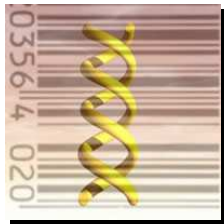
Claude Murat, Herminia De la Varga, Christophe Robin, François Le Tacon, Francis Martin

UMR Interactions Arbres/Micro-organismes

Laboratoire d'Excellence ARBRE

Equipe d'Ecogénomique

INRA-Champenoux



DNA Barcoding

**ANR SYSTRUF
2010-2013**

**JGI Community Sequencing Programm 2012
Metatranscriptomics of Forest Soil Ecosystems**



Contexte

Que sont les truffes?

Class: Ascomycota
Order: Pezizales
Family: Tuberaceae
Genus: *Tuber*

Les truffes sont des champignons ascomycètes formant des associations symbiotiques ectomycorhiziennes avec des arbres et arbustes

~ 180 espèces de truffes dans le monde

Truffe noire du Périgord



Tuber melanosporum



500-1000 €/Kg

Truffe noire de Chine



Tuber indicum



50-100 €/Kg

Truffe de Bourgogne



Tuber aestivum

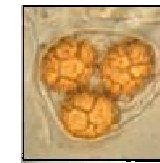


300-600 €/Kg

Truffe blanche du Piémont



Tuber magnatum



2000-6000 €/Kg

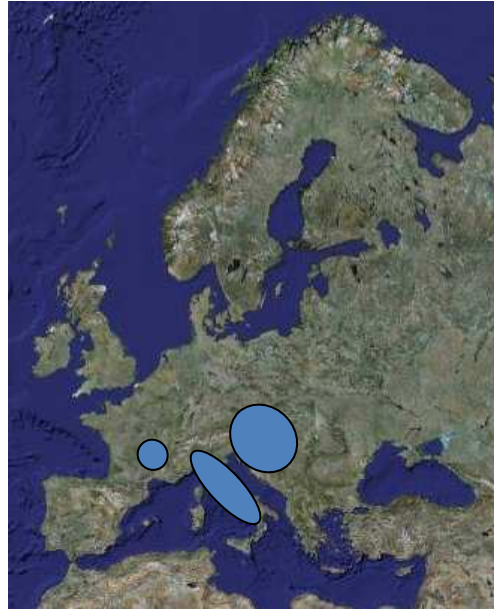
Distribution naturelle de trois truffes Européennes

Tuber melanosporum



France, Italie, Espagne

Tuber magnatum



Italie, Croatie, Hongrie,
France...

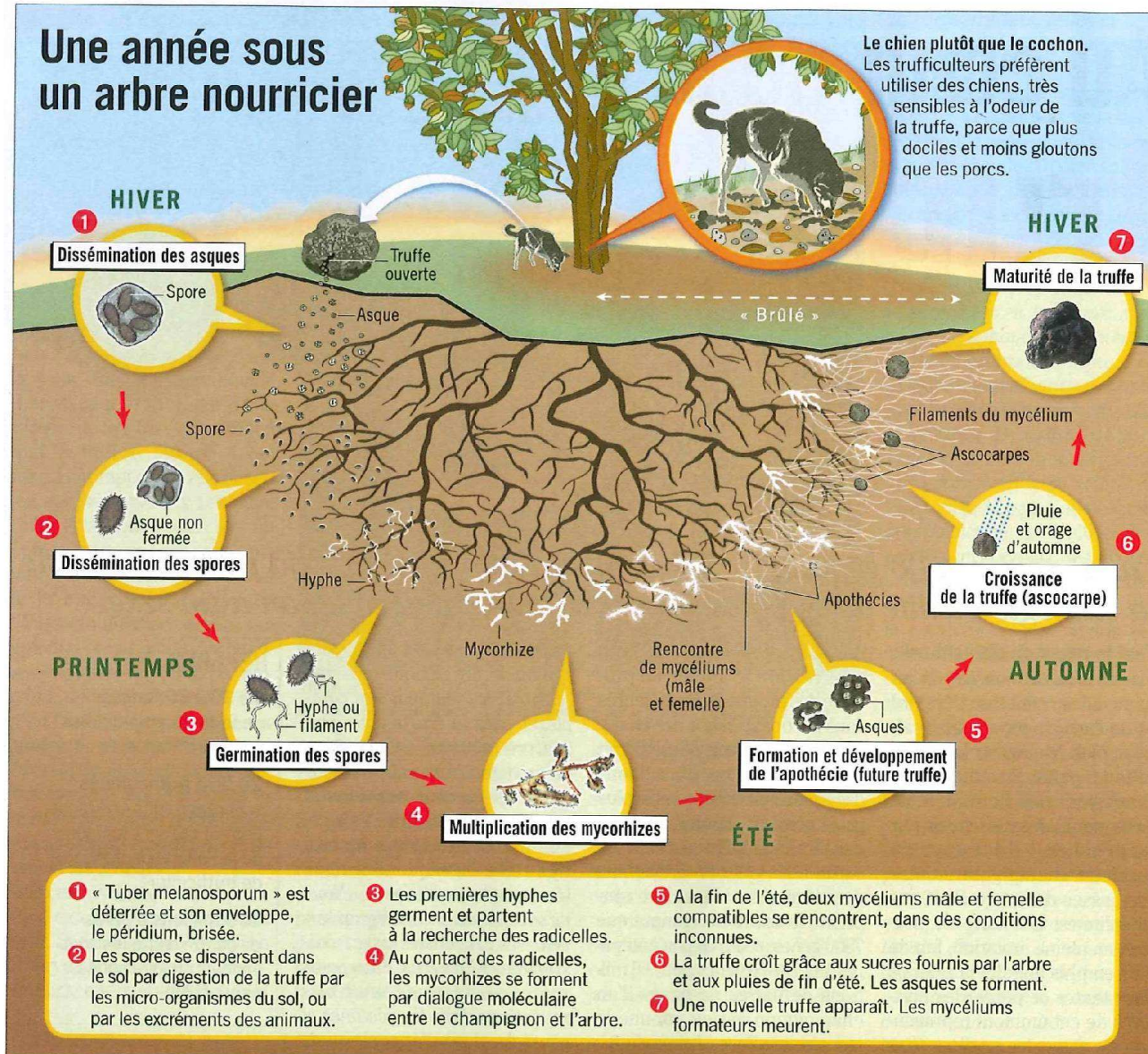
Tuber aestivum



Toute l'Europe

Ces différences de distribution géographique peuvent être dues à:

- leurs exigences écologiques (climat, caractéristiques du sol...)
- leur taux de diversité génétique
- leur histoire démographique

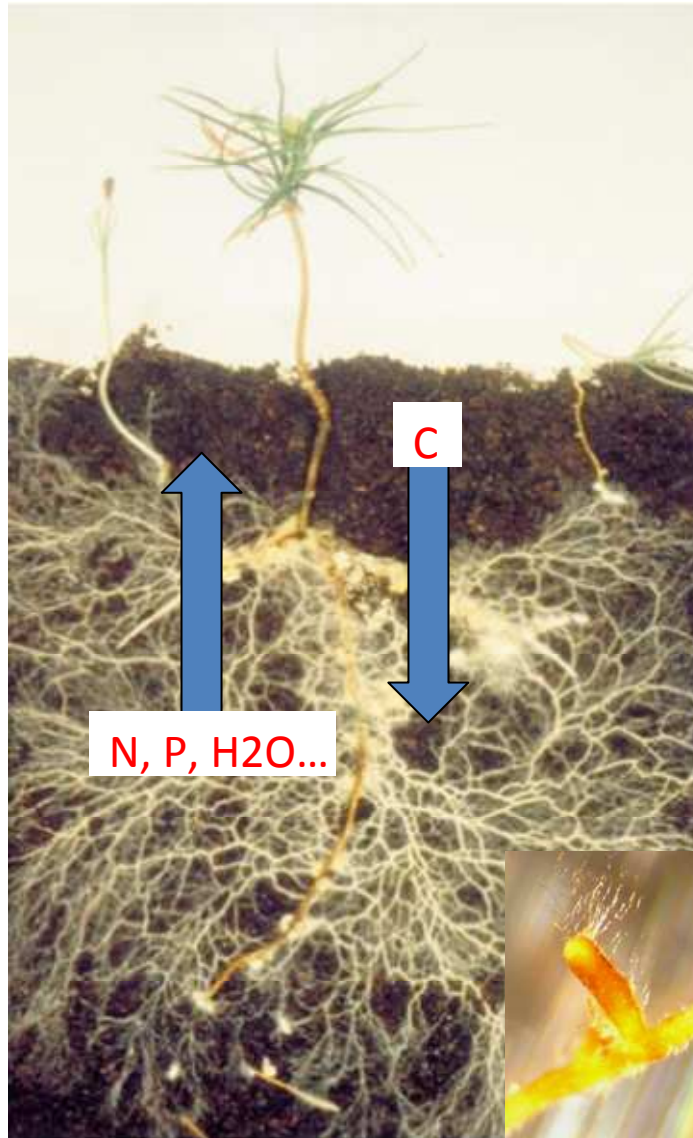


- 1 « *Tuber melanosporum* » est déterrée et son enveloppe, le périodum, brisée.
- 2 Les spores se dispersent dans le sol par digestion de la truffe par les micro-organismes du sol, ou par les excréments des animaux.
- 3 Les premières hyphes germent et partent à la recherche des radicelles.
- 4 Au contact des radicelles, les mycorhizes se forment par dialogue moléculaire entre le champignon et l'arbre.
- 5 A la fin de l'été, deux mycéliums mâle et femelle compatibles se rencontrent, dans des conditions inconnues.
- 6 La truffe croît grâce aux sucres fournis par l'arbre et aux pluies de fin d'été. Les asques se forment.
- 7 Une nouvelle truffe apparaît. Les mycéliums formateurs meurent.



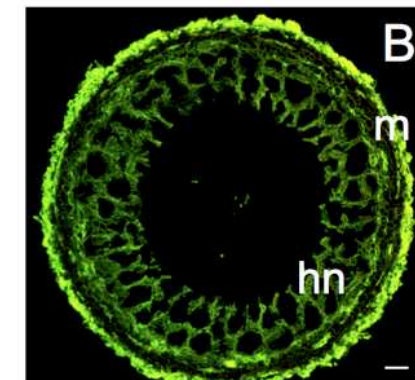
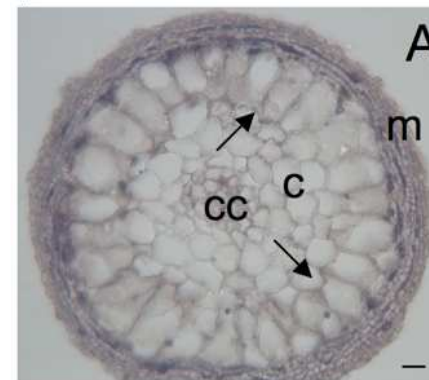
Contexte

La symbiose mycorrhizienne: un kit de survie pour les arbres



Non mycorrhizés

Mycorrhizés

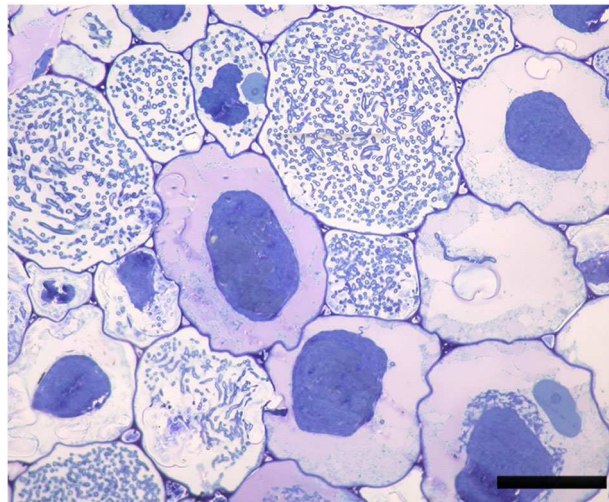
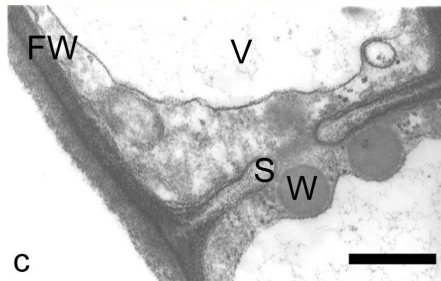


(A) Ectomycorrhizal Transversal section (B) stained WGA (Wheat Germ Agglutinin)-FITC to localize chitin in the fungal cell wall

Le cycle biologique des truffes

Tuber excavatum and *T. aestivum* (Selosse et al., 2004)

T. maculatum (Bidartondo et al., 2004)

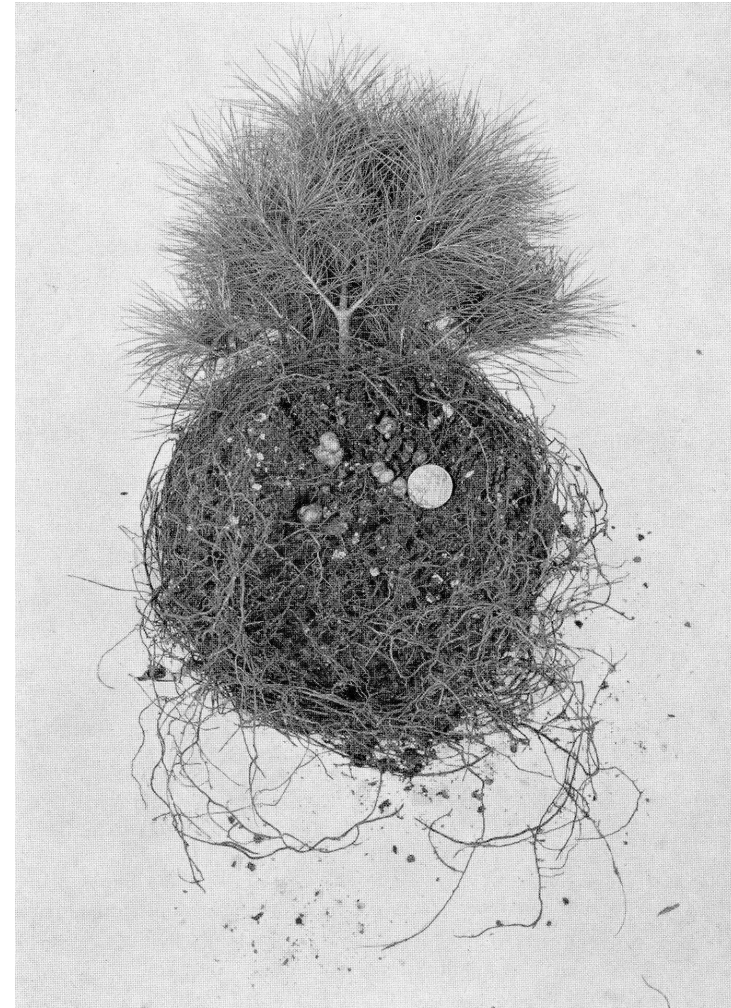


Endomycorhizes typiques du point de vue morphologique avec les orchidées!



Le cycle biologique des truffes

Production de truffes en vase (*Tuber maculatum*)... (Fassi et Fontana, 1969)

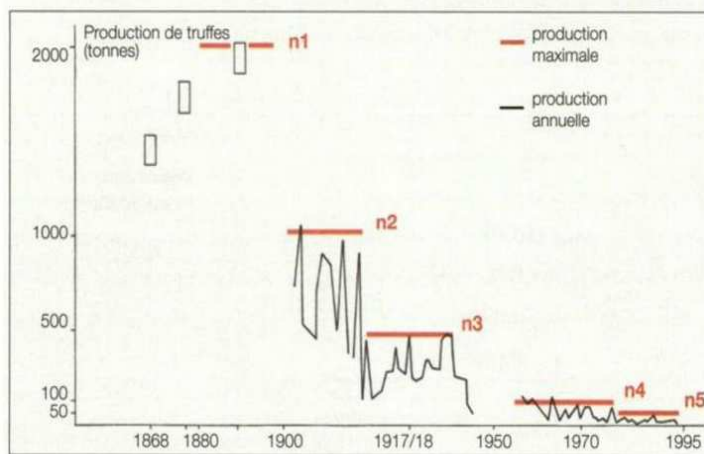




Contexte

La production de truffe noire en France

Chute de production au cours du XXème siècle

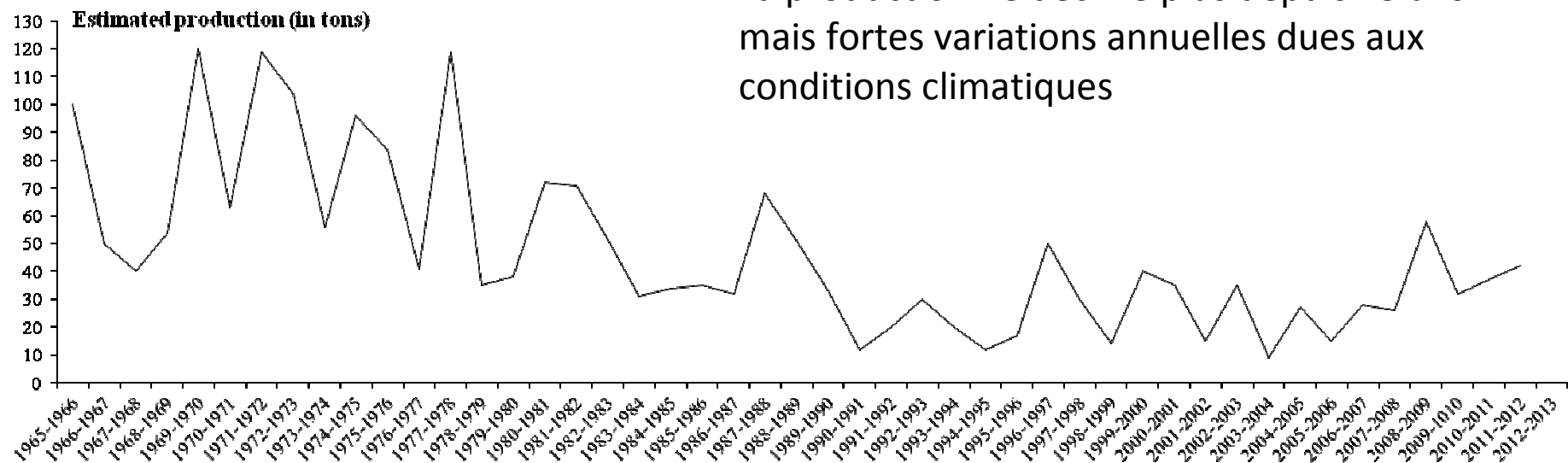


Mycorrhiza
DOI 10.1007/s00572-014-0568-5

ORIGINAL PAPER

Climatic variations explain annual fluctuations in French Périgord black truffle wholesale markets but do not explain the decrease in black truffle production over the last 48 years

Francois Le Tacon · Benoît Marcais ·
Michel Courvoisier · Claude Murat · Pierre Montpied ·
Michel Becker



La production ne décline plus depuis 25 ans
mais fortes variations annuelles dues aux
conditions climatiques



Contexte

Depuis 40 ans l'INRA investi dans les recherches sur les truffes

Licence de savoir faire pour la production de plants mycorhizés

-> Révolution dans la culture des truffes



1972 : licence de savoir faire avec la pépinière AGRITRUFFE pour la production de plants mycorhizés avec les truffes noires

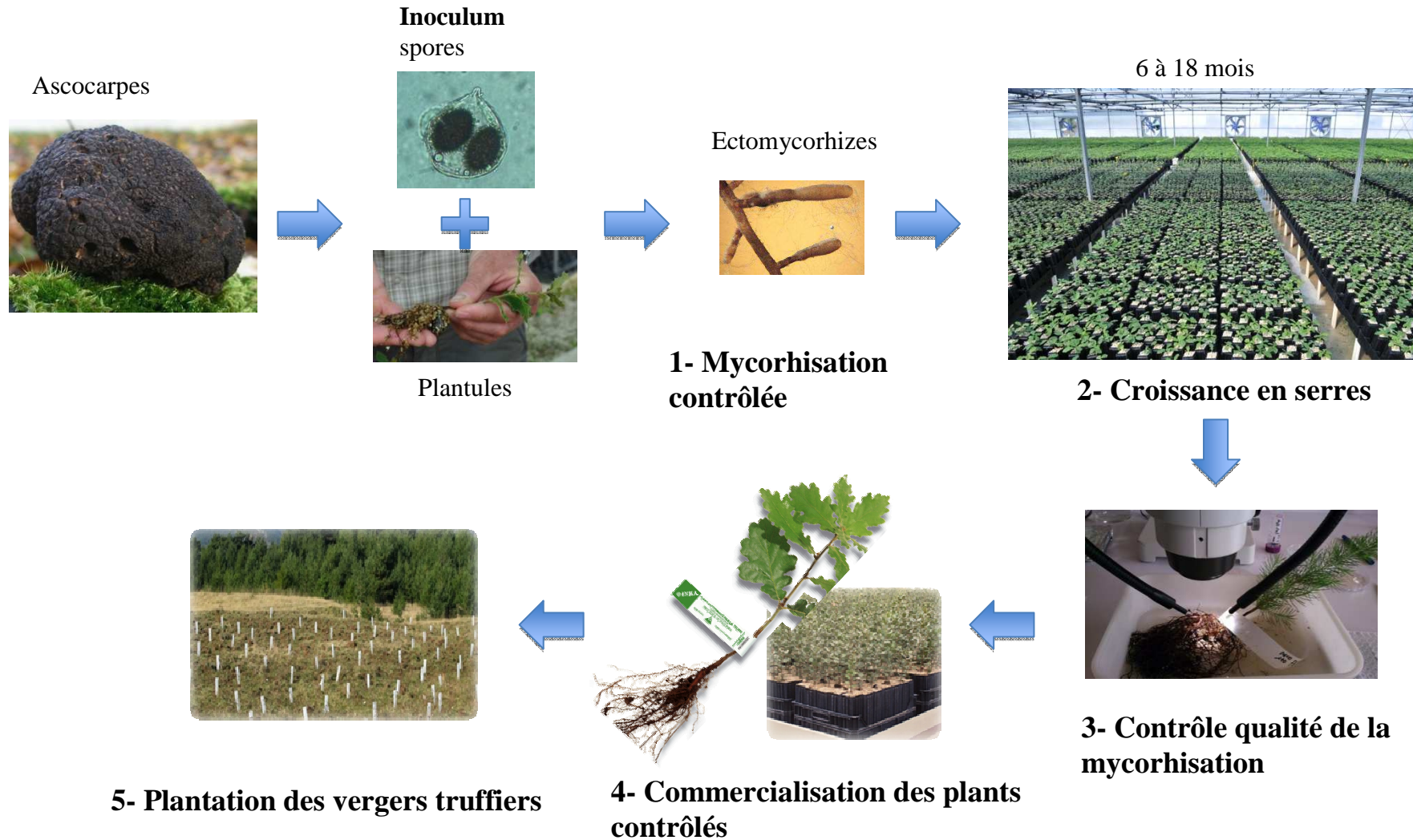
1996 : Ouverture de la licence truffes noires aux pépinières ROBIN

2010: licence de savoir faire avec les pépinières ROBIN pour la production de plants mycorhizés avec la truffe blanche



Contexte

Processus de production des plants mycorhizés





Contexte

La trufficulture: une vraie culture

Travail du sol et apports de spores



Irrigation



Taille des arbres



Jusqu'à 200-300 heures de travail par ha



Contexte

La filière trufficole en France

Fédération Française des Trufficulteurs (> 5000 adhérents; Président M. Tournayre)

Pépiniéristes, Conserveurs, Restaurateurs, Hôtellerie...

Impact économique estimé en France (production 50 t)= ~100 millions d'€

Dans l'UE = ~1 milliard d'€

Mycorrhiza
DOI 10.1007/s00572-014-0593-4

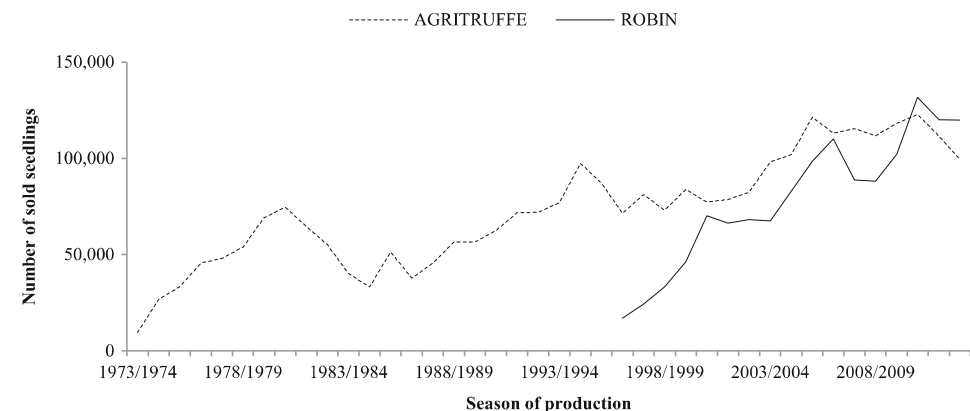
COMMENT

Forty years of inoculating seedlings with truffle fungi: past and future perspectives

Claude Murat

Fig. 1 Number of sold seedlings inoculated with truffles by AGRITRUFFE (*dotted line*) and ROBIN (*solid line*) nurseries since 1973 and 1996, respectively, in the frame of the know-how license INRA/ANVAR

Filière dynamique
~ 1000 ha/an de nouvelles plantations





Contexte

La trufficulture: impacts économiques et écologiques

Truffières: agroforesterie à haute valeur ajoutée



Modification du paysage



Valorisation des terres pauvres



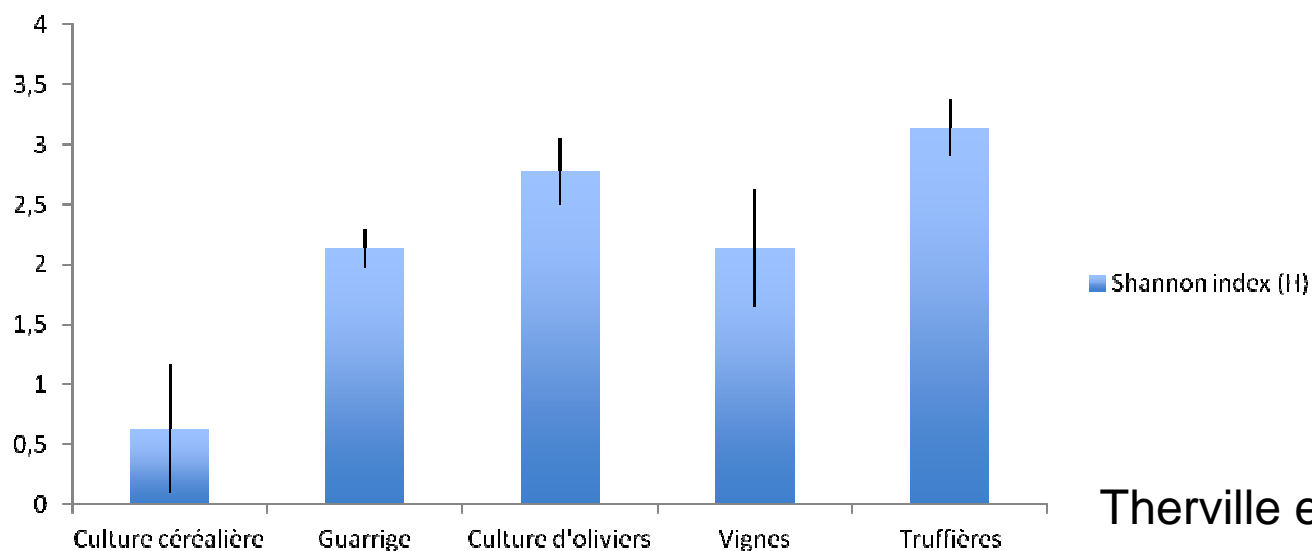
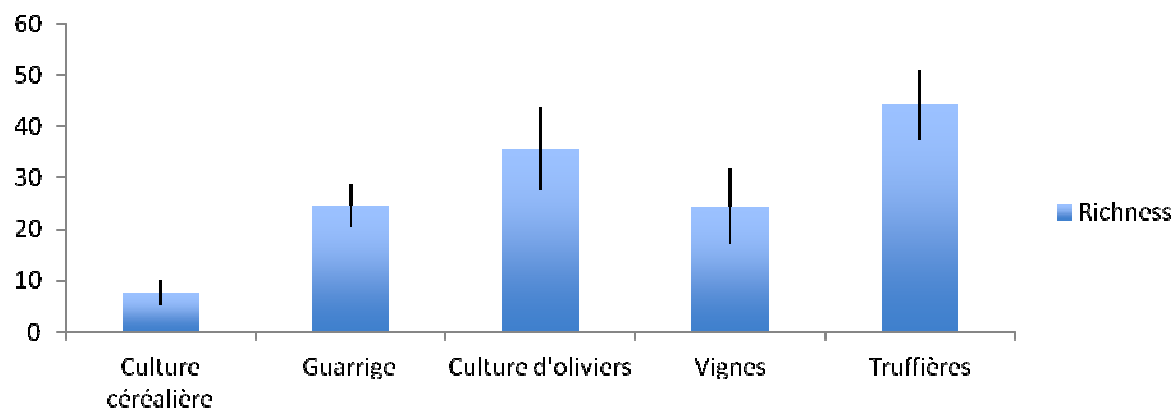
Barrières à feu en Espagne



Contexte

La trufficulture: impacts économiques et écologiques

Les truffières favorisent la biodiversité

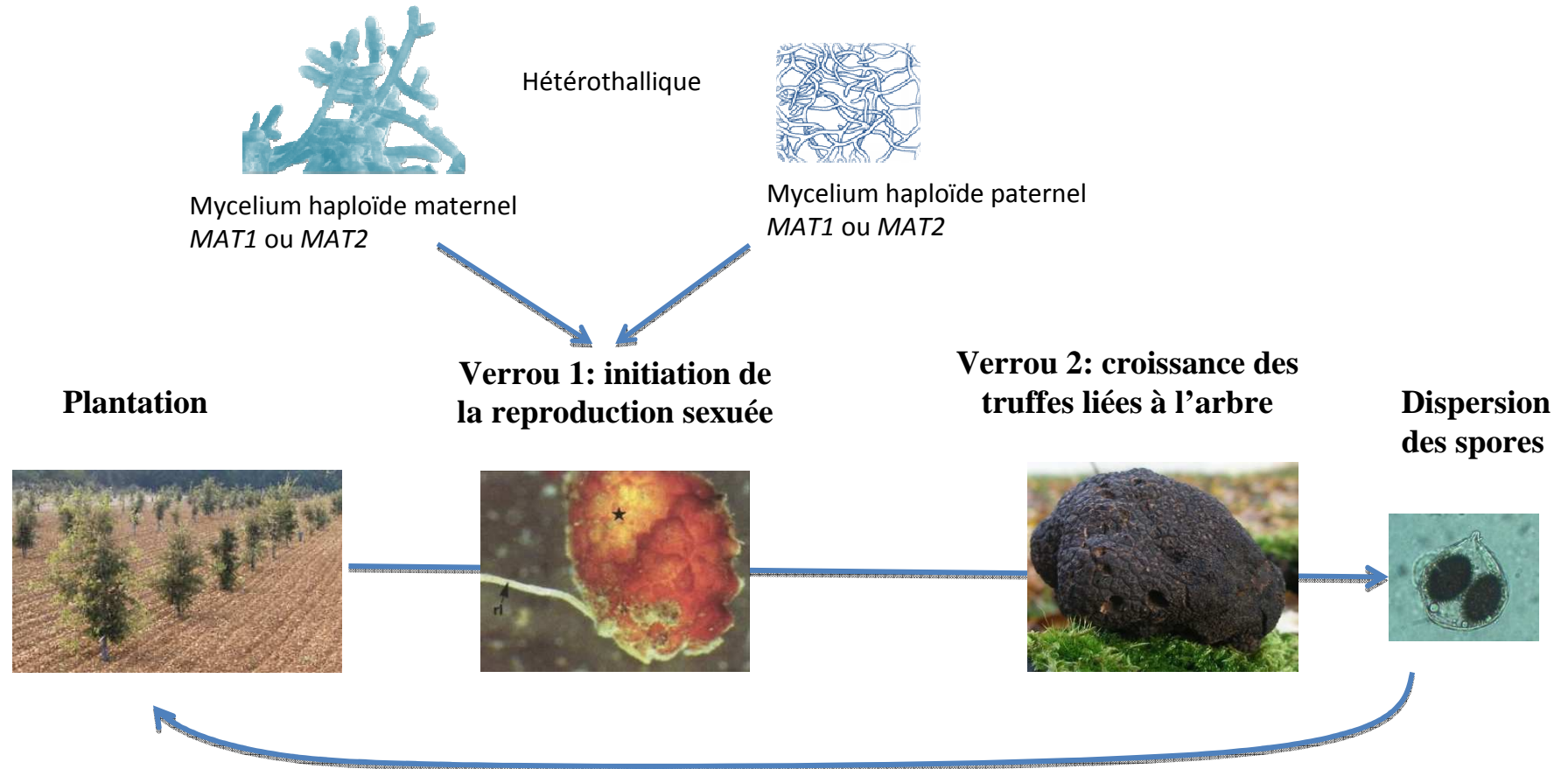


Therville et al. 2013



Contexte

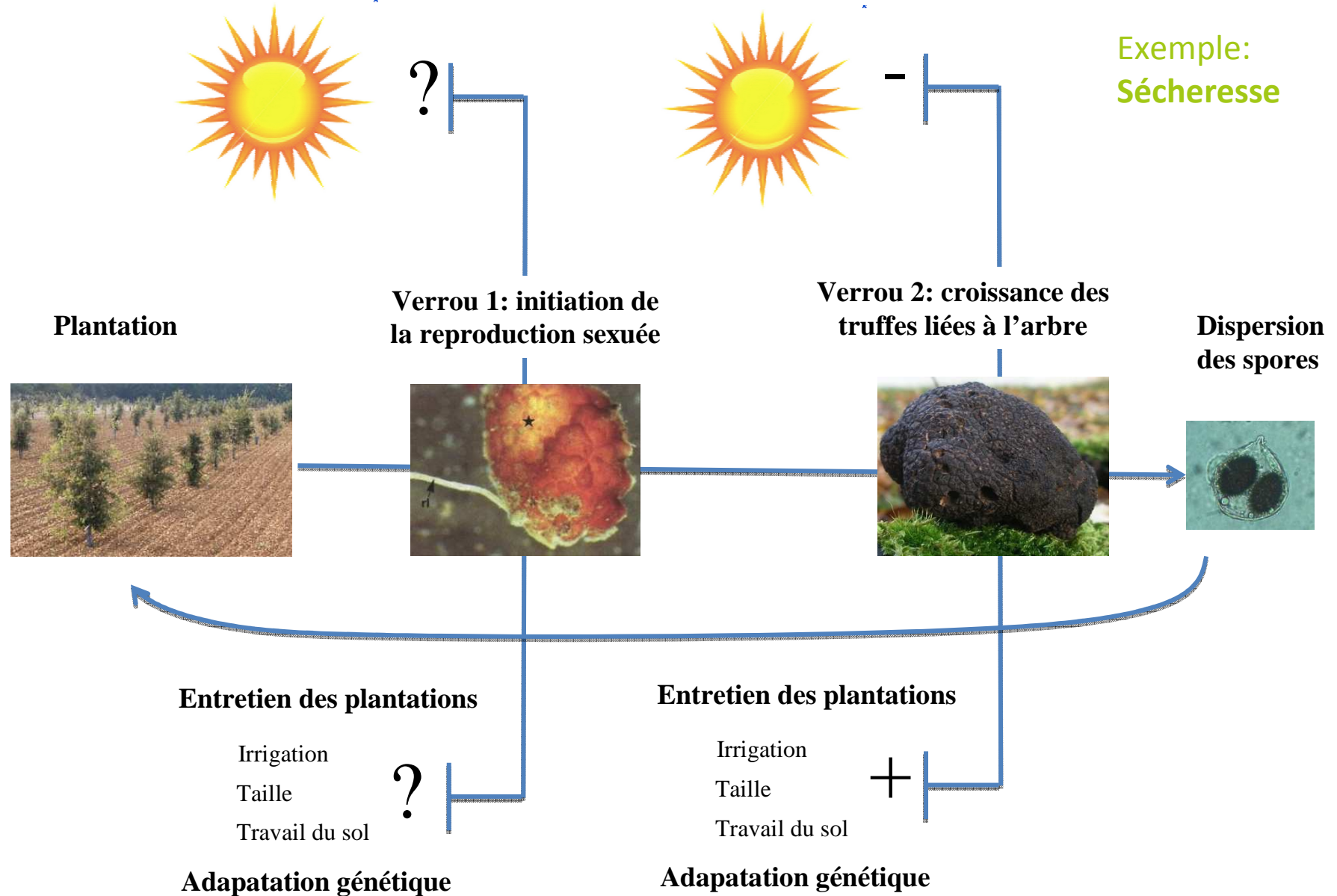
Processus de production de truffes noires





Contexte

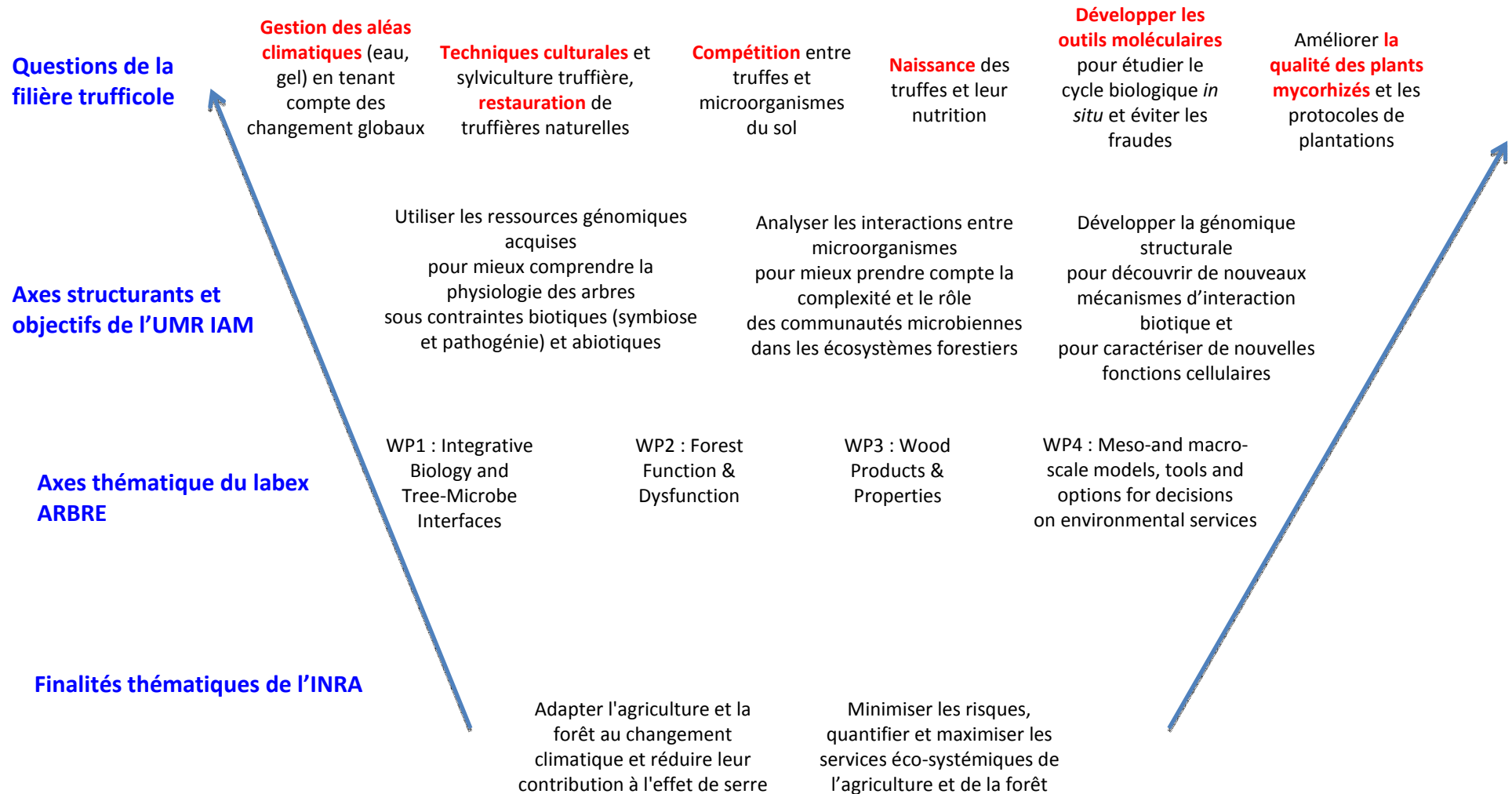
Processus de production de truffes noires





Contexte

Les questions que se posent la filière trufficole





TUBEREVOL: Comparative Genomics of Truffle Species and the Evolution of Ectomycorrhizal Symbiotic Genomes

Claude Murat, Annegret Kolher, Emmanuelle Morin, Thibaut Payen, Francis Martin - INRA Nancy

P. Wincker et al. - Génomoscope

I. Grigoriev et al. - DOE Joint Genome Institute

P. Bonfante et al. - University of Turin

D. Wipf and V. Molinier – University of Dijon

A. Zambonelli, S. Boutahir, M. Iotti – University of Bologna

G. Bonito, R. Vilgalys – University of Duke

J. XU – University of Kunming

Tuber Genome consortium



Etudier l'évolution de génomes fongiques en fonction de leurs stratégies de vie (saprotrophes versus mycorrhiziens)



nature

Vol 452 | 6 March 2008 | doi:10.1038/nature06556

LETTERS

The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis

F. Martin¹, A. Aerts², D. Ahrné³, A. Brun¹, E. G. J. Danchin⁴, F. Duchaussoy¹, J. Gibon¹, A. K. V. Pereda¹, A. Salamov⁵, H. J. Shapiro⁶, J. Wuys^{1,7}, D. Blaudez¹, M. Buée¹, P. Brokstein⁸, B. P. E. Courty¹, P. M. Coutinho⁴, C. Delaruelle¹, J. C. Detter², A. Deveau¹, S. DiFazio⁹, S. Dupl. L. Fraissinet-Tachet⁸, E. Lucic¹, P. Frey-Klett¹, C. Fourrey¹, I. Feussner⁷, G. Gay⁸, J. Grimwo P. Jain¹, S. Kilaru¹⁰, J. Labbé¹, Y. C. Lin¹¹, V. Legué¹, F. Le Tacon¹, R. Marmeisse⁸, D. Melay M. Muratet¹¹, U. Nehls¹², H. Niculita-Hirzel¹³, M. P. Oudot-Le Secq¹, M. Peter^{11,14}, H. Quesn M. Reich^{11,10}, N. Roushier¹, J. Schmutz⁹, T. Yin¹⁶, M. Chalot¹, B. Henrissat⁴, U. Kües¹⁰, S. Luc G. K. Podila¹¹, A. Polle¹⁰, P. J. Pukkila¹⁷, P. M. Richardson², P. Rouzé^{11,18}, I. R. Sanders¹³, J. E. G. Tuskan¹⁶ & I. V. Grigoriev²



Vol 464 | 15 April 2010 | doi:10.1038/nature08867

nature

LETTERS

Périgord black truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis

Francis Martin¹, Annegret Kohler¹, Claude Murat¹, Raffaella Balestri Barbara Montanini¹, Emmanuelle Morin¹, Benjamin Noel⁴⁻⁶, Riccar Andrea Rubini⁷, Antonella Amicucci⁹, Joelle Amselem¹⁰, Véronique François Artiguenave⁴⁻⁶, Jean-Marc Aury⁴⁻⁶, Paola Ballario¹¹, Ange Marc Buée¹, Brandi Cantarel¹, Gérard Chevalier¹², Arnaud Couloux⁴ Sébastien Duplessis¹, Stefano Ghignone², Benoît Hilselberger^{11,10}, Mir Michele Miranda¹⁴, Giovanni Pacioni¹⁵, Hadi Quesneville¹⁰, Claudia R Vilberto Stocchi⁷, Emilie Tisserant¹, Arturo Roberto Viscomi⁷, Aless Bernard Henrissat², Marc-Henri Lebrun¹⁷, Francesco Paolucci⁸, Paol & Patrick Wincker⁴⁻⁶



Science

The Plant Cell Wall–Decomposing Machinery Underlies the Functional Diversity of Forest Fungi

Daniel C. Eastwood,^{1*}† Dimitrios Floudas,^{2*} Manfred Binder,^{2*} Andrzej Majcherczyk,^{3*} Patrick Schneider,^{4*} Andrea Aerts,⁵ Fred O. Asiegbu,⁶ Scott E. Baker,⁷ Kerrie Barry,⁵ Mika Bendiksby,⁸ Melanie Blumentritt,⁹ Pedro M. Coutinho,¹⁰ Dan Cullen,¹¹ Ronald P. de Vries,¹² Allen Gathman,¹³ Barry Goodell,^{9,14} Bernard Henrissat,¹⁰ Katarina Ihrmark,¹⁵ Hävard Kauserud,¹⁶ Annegret Kohler,¹⁷ Kurt LaButti,⁵ Alla Lapidus,⁵ José L. Lavin,¹⁸ Yong-Hwan Lee,¹⁹ Erika Lindquist,⁵ Walt Lilly,¹³ Susan Lucas,⁵ Emmanuelle Morin,¹⁷ Claude Murat,¹⁷ José A. Oguiza,¹⁸ Jongsun Park,¹⁹ Antonio G. Pisabarro,¹⁸ Robert Riley,⁵ Xinfeng Xie,⁹ Ursula Kües,^{3*} David S. Hibbett,^{2*} Dirk Hoffmeister,^{4*} Francis Martin,^{17*} Igor V. Grigoriev,^{5*} Sarah C. Watkinson^{21*}

PNAS

Genome sequence of the button mushroom *Agaricus bisporus* reveals mechanisms governing adaptation to a humic-rich ecological niche

Emmanuelle Morin^{1,1}, Annegret Kohler^{1,1}, Adam R. Baker^{1,1}, Marie Foulongne-Oriol^{1,1}, Vincent Lombard^{1,1}, Laszlo G. Nagy¹, Robin A. Ohm^{1,9}, Aleksandrina Patyshakuliyeva¹, Annick Brun¹, Andrea L. Aerts¹, Christophe Billeter¹, Pedro M. Coutinho¹, Greg Deakin¹, Harshavardhan Doddapaneni¹, Dimitrios I. Jane Grimwood¹, Kristiina Hildén¹, Ursula Kües¹, Kurt M. LaButti¹, Alla Lapidus¹, Erika A. Lindquist¹ Claude Murat¹, Robert W. Riley¹, Asaf A. Salamov¹, Jeremy Schmutz¹, Venkataraman Subraman Han A. B. Wösten¹, Jianping Xu¹, Daniel C. Eastwood¹, Gary D. Foster¹, Anton S. M. Sonnenberg¹, Ronald P. de Vries¹, Taina Lundell¹, David S. Hibbett¹, Bernard Henrissat¹, Kerry S. Rich¹, Michael P. Challen^{1,2,3}, Igor V. Grigoriev^{1,2,3}, and Francis Martin^{1,2,3}

¹Institut National de la Recherche Agronomique, Unité Mixte de Recherche 1136 Université Henri Poincaré, Interactions Arbre Champignon, France; ²University of Warwick, Wellesbourne, Warwick CV35 9EF, United Kingdom; ³Institut National de la Recherche Mycologie et sécurité des aliments, F-33883 Villenave d'Ornon, France; ⁴Aix-Marseille Université, Centre National de la Recherche Recherche 7257, 13288 Marseille Cedex 9, France; ⁵Biology Department, Clark University, Worcester, MA 01610, US; ⁶Department of Microbiology, Utah State University, 5200 Old Main Drive, Logan, UT 84302, USA; ⁷Department of Microbiology, University of California, Davis, CA 95616, USA; ⁸Department of Microbiology, University of Wisconsin, Madison, WI 53706, USA; ⁹Department of Microbiology, University of Tennessee, Knoxville, TN 37901, USA; ¹⁰Department of Microbiology, University of California, Davis, CA 95616, USA; ¹¹Department of Microbiology, University of California, Davis, CA 95616, USA; ¹²Department of Microbiology, University of California, Davis, CA 95616, USA; ¹³Department of Microbiology, University of California, Davis, CA 95616, USA; ¹⁴Department of Microbiology, University of California, Davis, CA 95616, USA; ¹⁵Department of Microbiology, University of California, Davis, CA 95616, USA; ¹⁶Department of Microbiology, University of California, Davis, CA 95616, USA; ¹⁷Department of Microbiology, University of California, Davis, CA 95616, USA; ¹⁸Department of Microbiology, University of California, Davis, CA 95616, USA; ¹⁹Department of Microbiology, University of California, Davis, CA 95616, USA; ²⁰Department of Microbiology, University of California, Davis, CA 95616, USA; ²¹Department of Microbiology, University of California, Davis, CA 95616, USA



Science

The Paleozoic Origin of Enzymatic Lignin Decomposition Reconstructed from 31 Fungal Genomes

Dimitrios Floudas,¹ Manfred Binder,¹ Robert Riley,² Kerrie Barry,² Robert A. Blanchette,³ Bernard Henrissat,⁴ Angel T. Martinez,⁵ Robert Otillar,² Joseph W. Spatofara,⁶ Jagjit S. Yadav,⁷ Andrea Aerts,⁸ Isabelle Benoit,^{8,9} Alex Boyd,^{8,9} Alexis Carlson,¹ Alex Copeland,² Pedro M. Coutinho,⁴ Ronald P. de Vries,^{8,9} Patricia Ferreira,¹⁰ Keisha Findley,¹¹ Brian Foster,¹² Jill Gaskell,¹² Dylan Glotzer,¹³ Paweł Görecki,¹³ Joseph Heitman,¹¹ Cedar Hesse,⁶ Chiaki Hori,¹⁴ Kiyohiko Igarashi,¹⁴ Joel A. Jurgens,¹⁵ Nathan Kallen,¹ Phil Kersten,¹² Annegret Kohler,¹⁵ Ursula Kües,¹⁶ T. K. Arun Kumar,¹⁷ Alan Kuo,² Kurt LaButti,² Luis F. Larrondo,¹⁸ Erika Lindquist,² Albee Ling,¹ Vincent Lombard,² Susan Lucas,² Taina Lundell,¹⁹ Rachael Martin,² David J. McLaughlin,¹⁷ Ingo Morgenstern,²⁰ Emmanuelle Morin,¹⁹ Claude Murat,¹⁵ Laszlo G. Nagy,² Matt Nolan,² Robin A. Ohm,² Aleksandrina Patyshakuliyeva,² Antonis Rokas,²¹ Francisco J. Ruiz-Duenas,³ Grzegorz Sabat,²² Asaf Salamov,² Masahiro Samejima,¹⁴ Jeremy Schmutz,²³ Jason C. Slot,²¹ Franz St. John,¹² Jan Stenlid,²⁴ Hui Sun,² Sheng Sun,¹¹ Khajamohiddin Syed,² Adrian Tsang,²⁰ Ad Wiebenga,² Darcy Young,¹ Antonio Pisabarro,²⁵ Daniel C. Eastwood,²⁶ Francis Martin,¹⁵ Dan Cullen,¹² Igor V. Grigoriev,^{2*} David S. Hibbett^{1*}





Vol 464 | 15 April 2010 | doi:10.1038/nature08867

nature

LETTERS

Périgord black truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis

Francis Martin¹, Annegret Kohler¹, Claude Murat¹, Raffaella Balestrini², Pedro M. Coutinho³, Olivier Jaillon⁴⁻⁶, Barbara Montanini⁷, Emmanuelle Morin¹, Benjamin Noel⁴⁻⁶, Riccardo Percudani⁷, Bettina Porcel⁴⁻⁶, Andrea Rubini⁸, Antonella Amicucci⁹, Joelle Amselem¹⁰, Véronique Anthouard⁴⁻⁶, Sergio Arcioni⁸, François Artiguenave⁴⁻⁶, Jean-Marc Aury⁴⁻⁶, Paola Ballario¹¹, Angelo Bolchi⁷, Andrea Brenna¹¹, Annick Brun¹, Marc Buée¹, Brandi Cantarel³, Gérard Chevalier¹², Arnaud Couloux⁴⁻⁶, Corinne Da Silva⁴⁻⁶, France Denoeud⁴⁻⁶, Sébastien Duplessis¹, Stefano Ghignone², Benoît Hilselberger^{1,10}, Mirco Iotti¹³, Benoît Marçais¹, Antonietta Mello², Michele Miranda¹⁴, Giovanni Pacioni¹⁵, Hadi Quesneville¹⁰, Claudia Riccioni⁸, Roberta Ruotolo⁷, Richard Splivallo¹⁶, Vilberto Stocchi⁹, Emilie Tisserant¹, Arturo Roberto Viscomi⁷, Alessandra Zambonelli¹³, Elisa Zampieri², Bernard Henrissat³, Marc-Henri Lebrun¹⁷, Francesco Paolocci⁸, Paola Bonfante², Simone Ottonello⁷ & Patrick Wincker⁴⁻⁶



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI TORINO



Tuber Genome Consortium – Alba Workshop (12-14 October 2009)



TUBEREVOL: Comparative Genomics of Truffle Species and the Evolution Ectomycorrhizal Symbiotic Genomes



Species	Material	DNA	RNA	Genome size	Sequencing centre
<i>Tuber aestivum</i>	Fruiting body	complete	Complete	145 Mb	Génoscope
<i>Tuber borchii</i>	Mycelium	Sequencing	Sequencing	?	JGI
<i>Tuber brumale</i>	Fruiting body	Assembly ongoing	Complete	180 Mb estimated	INRA
<i>Tuber indicum</i>	Fruiting body	Complete	Complete	147 Mb estimated	INRA – Univ Kunming
<i>Tuber magnatum</i>	Fruiting body	Complete	Complete	190 Mb	INRA – UNITO - JGI
<i>Tuber lyonii</i>	Mycelium	Sequencing	Sequencing	?	Duke Univ.
<i>Tuber melanosporum</i>	Mycelium	complete	Complete	125 Mbp	Génoscope

Payen, Murat, Bonito (2014). Truffle phylogenomics: new insights into truffle evolution and truffle life cycle. In Genomics of Plant-Related Fungi (edt, F Martin) Advances in Botanical Research

TUBEREVOL: Comparative Genomics of Truffle Species and the Evolution Ectomycorrhizal Symbiotic Genomes



Species	Size (Mb)	# scaffold	N50 scaffold (Mb)	% of TE	# of genes	# of 248 CEGMA genes	Sequencing strategy
<i>Tuber aestivum</i>	145	3 244	0,4	49	9 344	239	454
<i>Tuber magnatum</i>	192	1 283	1,8	58	9 433	234	Illumina, 454
<i>Tuber melanosporum</i>	125	398	0,6	58	10 763	239	Sanger



Pourquoi étudier les génomes des truffes?

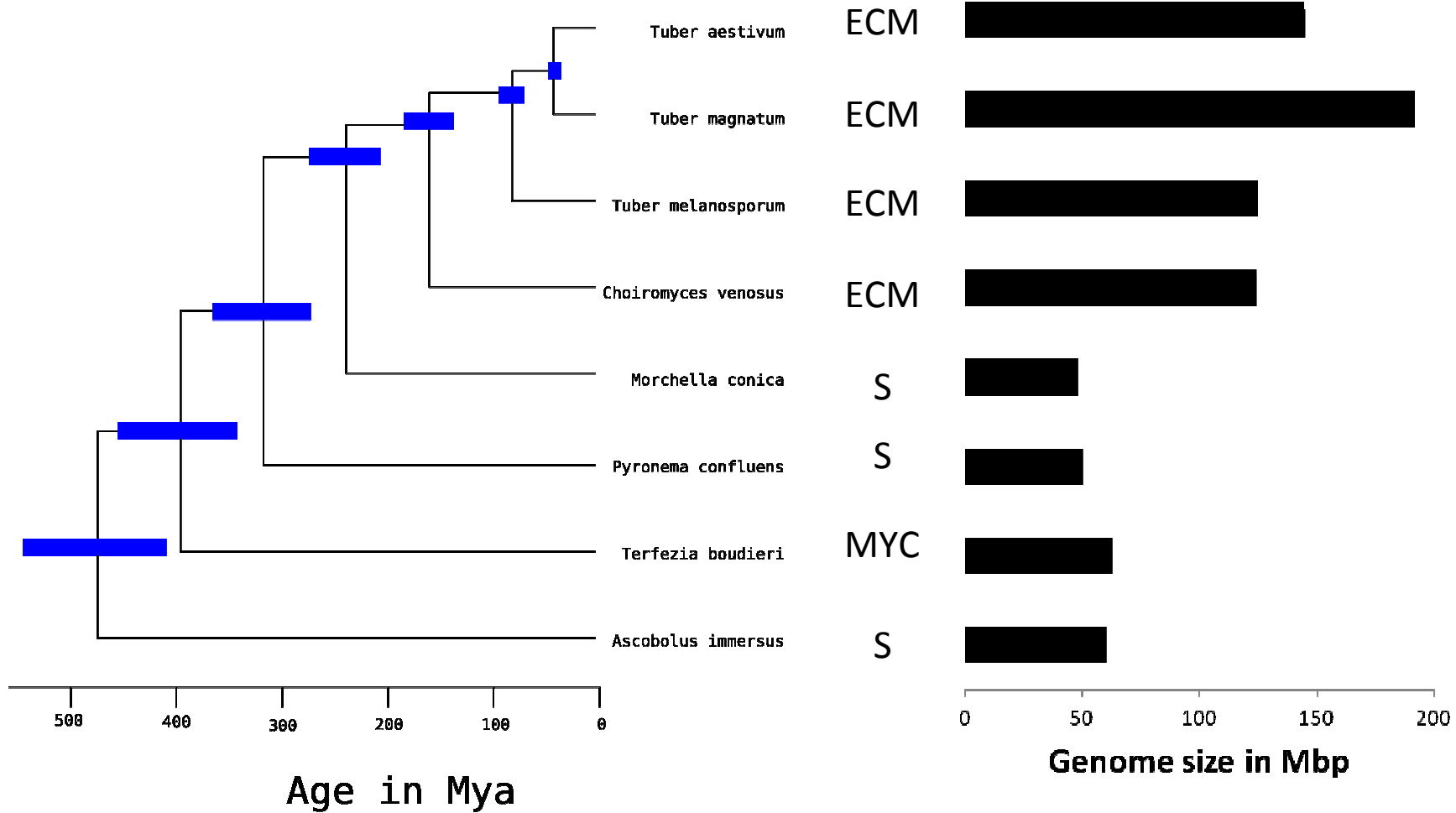
1) Utiliser les ressources génomiques pour comprendre pourquoi ces champignons forment:

- des symbioses ectomycorhiziennes et dans certains cas des symbioses endomycorhiziennes avec les orchidées

- des ascocarpes ayant des qualités organoleptiques si particulières

-> Comparer le génomes des truffes à celui d'autres champignons pézizomycètes

Génomique comparative au sein des Pézizomycètes





Pourquoi étudier les génomes des truffes?

1) Utiliser les ressources génomiques pour comprendre pourquoi ces champignons forment:

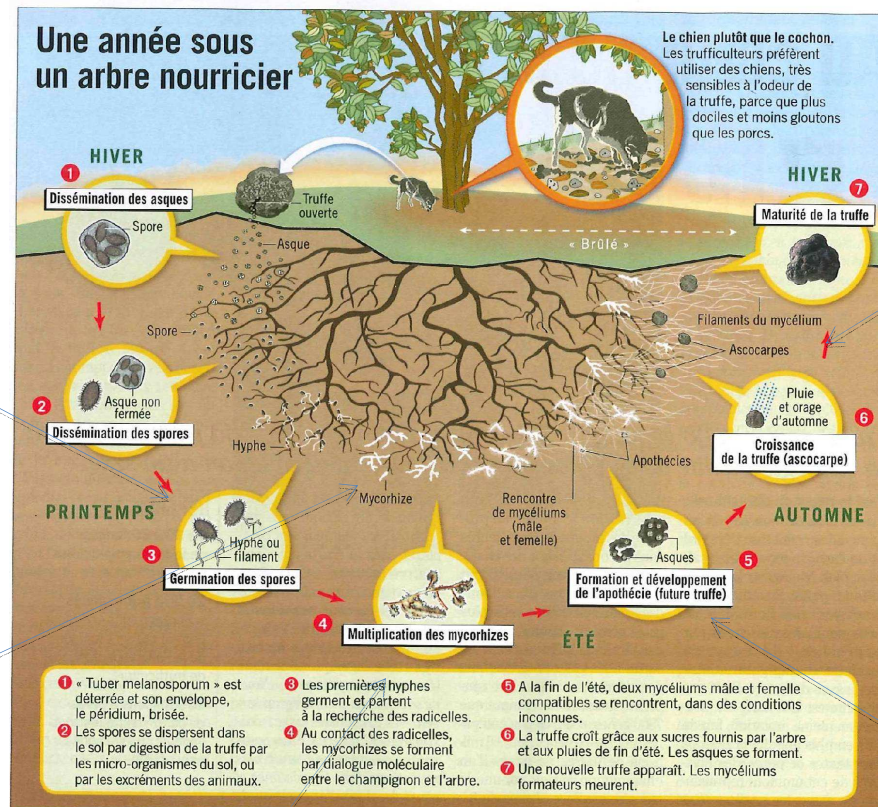
-des symbioses ectomycorhiziennes et dans certains cas des symbioses endomycorhiziennes avec les orchidées

-des ascocarpes ayant des qualités organoleptiques si particulières

2) Utiliser les ressources génomiques pour mieux connaître le cycle biologique des truffes

Utiliser le génome de *T. melanosporum* pour mieux comprendre son cycle biologique

Questions scientifiques méritant d'être abordées pour espérer augmenter la production



Quels sont les facteurs favorisant la germination des spores ?

Ceci est important pour la production de plants mycorhizés mais aussi dans les truffières

Comment la truffe interagit-elle avec l'arbre?

Est ce que toutes les truffes ont le même comportement (« boîte à outils ») pour établir et maintenir la symbiose?

Quelle est la taille et la durée de vie des génotypes de truffes ?

Est ce que la truffe investie plus dans la reproduction végétative ou sexuée -> génétique des populations

Quel est l'impact du réensemencement?

Quelle est l'origine de l'arome de la truffe: le champignon *Tuber* ou bien les bactéries

Comment aider et préserver les ascocarpes durant leur grossissement et leur maturation?

D'où vient le carbone de l'ascocarpe ?
Comment les techniques culturales permettent de contrecarrer les stresses environnementaux ?

Comment peut-on promouvoir la reproduction sexuée ?

Quelle est la distribution des génotypes des deux types de compatibilité sexuelle dans les truffières?

Où sont les mycélium maternel et paternel? Quels sont les facteurs favorisant l'initiation de la reproduction sexuée ?

Quels sont les effets des techniques culturales sur le cycle biologique?

Est ce que les truffes sont capables de s'adapter aux stresses environnementaux?

Comment la microfaune et les microbes (bactéries, levures, champignons) influencent le cycle biologique?

Utilisation des ressources génomiques pour identifier des marqueurs moléculaires

Vol 464 | 15 April 2010 | doi:10.1038/nature08867

nature

LETTERS

Périgord black truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis

Francis Martin¹, Annegret Kohler¹, Claude Murat¹, Raffaella Balestrini², Pedro M. Coutinho³, Olivier Jaillon⁴⁻⁶, Barbara Montanini⁷, Emmanuelle Morin¹, Benjamin Noel⁴⁻⁶, Riccardo Percudani⁷, Bettina Porcel⁴⁻⁶, Andrea Rubini⁸, Antonella Amicucci⁹, Joelle Amselem¹⁰, Véronique Anthonard⁴⁻⁶, Sergio Arcioni⁸, François Artiguenave⁴⁻⁶, Jean-Marc Aury⁴⁻⁶, Paola Ballario¹¹, Angelo Bolchi⁷, Andrea Brenna¹¹, Annick Brun¹, Marc Buée¹, Brandi Cantarel³, Gérard Chevalier¹², Arnaud Couloux⁴⁻⁶, Corinne Da Silva⁴⁻⁶, France Denoed⁴⁻⁶, Sébastien Duplessis¹, Stefano Ghignone³, Benoît Hilselberger^{1,10}, Mirco Iotti¹³, Benoît Marçais¹, Antonietta Mello², Michele Miranda¹⁴, Giovanni Pacini¹⁵, Hadi Quesneville¹⁰, Claudia Riccioni⁸, Roberta Ruotolo⁷, Richard Spivak¹⁶, Vilberto Stocchi⁹, Emilie Tisserant¹, Arturo Roberto Viscomi⁷, Alessandra Zambonelli¹³, Elisa Zampieri², Bernard Henrissat⁴, Marc-Henri Lebrun¹⁷, Francesco Paolocci⁸, Paola Bonfante², Simone Ottonello⁷ & Patrick Wincker⁴⁻⁶



Marqueurs moléculaires neutres
-> microsatellites

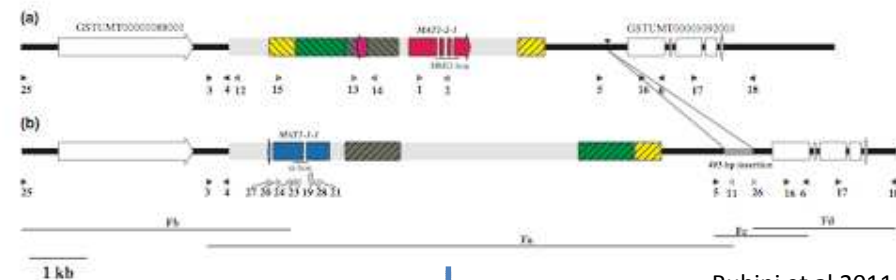
Gènes fonctionnels
-> mating type

Table 4
Characteristics of the 27 SSRs loci selected for *T. melanosporum* and analysed on 139 isolates.

SSR name	Motif	Localisation	Na ^a	Size range (bp)	He ^b
09ssrme11	(A)43	Intergenic region	18	278–304	0.534
09ssrme08	(T)28	Intergenic region	4	314–318	0.362
08ssrme49	(AG)12	Intergenic region	3	131–135	0.069
08ssrme55	(AG)13	Intergenic region	3	112–116	0.280
08ssrme11	(AG)16	Intron	4	270–282	0.253
08ssrme27	(AG)18	Intergenic region	6	273–295	0.163
08ssrme02	(AG)23	Intergenic region	14	139–183	0.476
08ssrme09	(AG)29	Intergenic region	13	265–319	0.727
08ssrme07	(AT)13	UTR	2	139–143	0.236
08ssrme13	(AT)13	Intergenic region	2	117–118	0.475
08ssrme29	(CT)19	Intergenic region	4	308–314	0.354
08ssrme14	(CT)21	Intergenic region	5	145–157	0.506
08ssrme30	(CT)23	Intergenic region	5	457–467	0.291
09ssrme02	(TC)16	Intergenic region	6	315–340	0.209
Tm16_ATA12	(ATA)12	Intergenic region	4	169–178	0.124
Tm21_ATA26	(ATA)26	TE	14	255–366	0.687
Tm241_TAA17	(TAA)17	TE	4	250–259	0.200
Tm2_TAT15	(TAT)15	Intergenic region	16	144–231	0.815
Tm98_TAT15	(TAT)15	Intergenic region	6	204–255	0.494
Tm112_TAT19	(TAT)19	Intron	6	248–323	0.305
Tm9_ATCA12	(ATCA)12	Intergenic region	9	302–354	0.452
Tm1_ATTG18	(ATTG)18	Intergenic region	12	304–372	0.769
Tm75_GAAA14	(GAAA)14	Intergenic region	7	315–355	0.465
Tm127_TTTA14	(TTTA)14	TE	13	152–204	0.681
Tm22_CCTCAT17	(CCTCAT)17	Intergenic region	7	312–354	0.607
Tm269_TGTTGC15	(TGTTGC)15	Intergenic region	10	338–398	0.491
08ssrme18	(AT)41(AT)12	Intergenic region	2	141–143	0.304

^a Na = Number of alleles observed.

^b He = expected heterozygosity. As expected, no heterozygosity was observed due to the fact that the fruiting body is formed by a haploid mycelium [Riccioni et al., 2008].

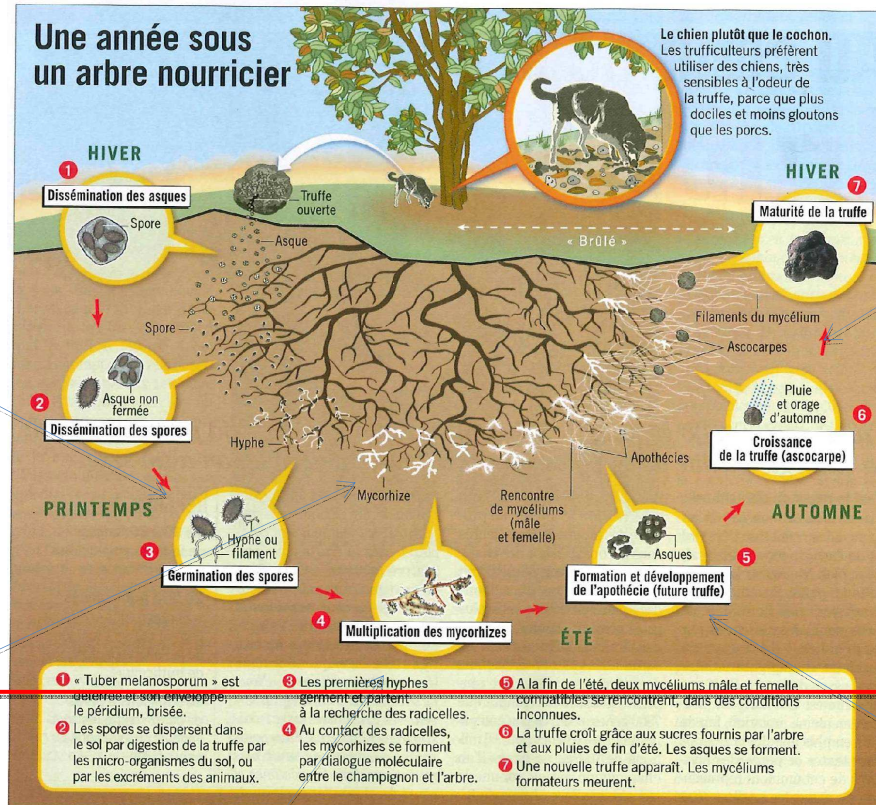


Rubini et al 2011

Brevet international

Utiliser le génome de *T. melanosporum* pour mieux comprendre son cycle biologique

Questions scientifiques méritant d'être abordées pour espérer augmenter la production



Quels sont les facteurs favorisant la germination des spores ?

Ceci est important pour la production de plants mycorhizés mais aussi dans les truffières

Comment la truffe interagit-elle avec l'arbre?

Est ce que toutes les truffes ont le même comportement (« boîte à outils ») pour établir et maintenir la symbiose?

Quelle est la taille et la durée de vie des génotypes de truffes ?

Est ce que la truffe investie plus dans la reproduction végétative ou sexuée -> génétique des populations

Quel est l'impact du réensemencement?

Quelle est l'origine de l'arome de la truffe: le champignon Tuber ou bien les bactéries

Comment aider et préserver les ascocarpes durant leur grossissement et leur maturation?

D'où vient le carbone de l'ascocarpe ?
Comment les techniques culturales permettent de contrecarrer les stress environnementaux ?

Comment peut-on promouvoir la reproduction sexuée ?

Quelle est la distribution des génotypes des deux types de compatibilité sexuelle dans les truffières?

Où sont les mycélium maternel et paternel? Quels sont les facteurs favorisant l'initiation de la reproduction sexuée ?

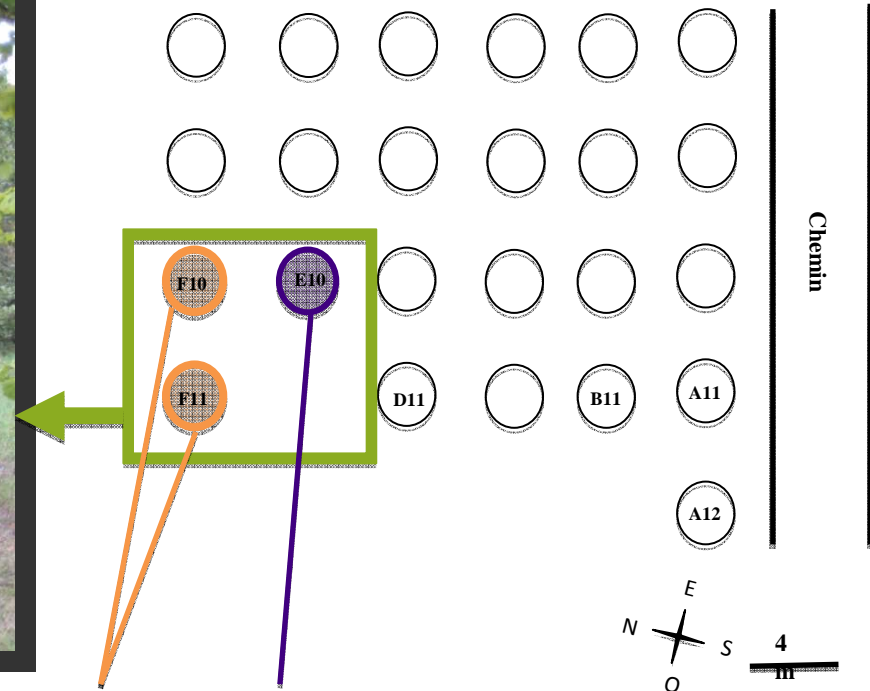
Quels sont les effets des techniques culturales sur le cycle biologique?

Est ce que les truffes sont capables de s'adapter aux stress environnementaux?

Comment la microfaune et les microbes (bactéries, levures, champignons) influencent le cycle biologique?

Site d'étude

Truffière expérimentale de Rollainville (Vosges)



Noisetiers Chênes



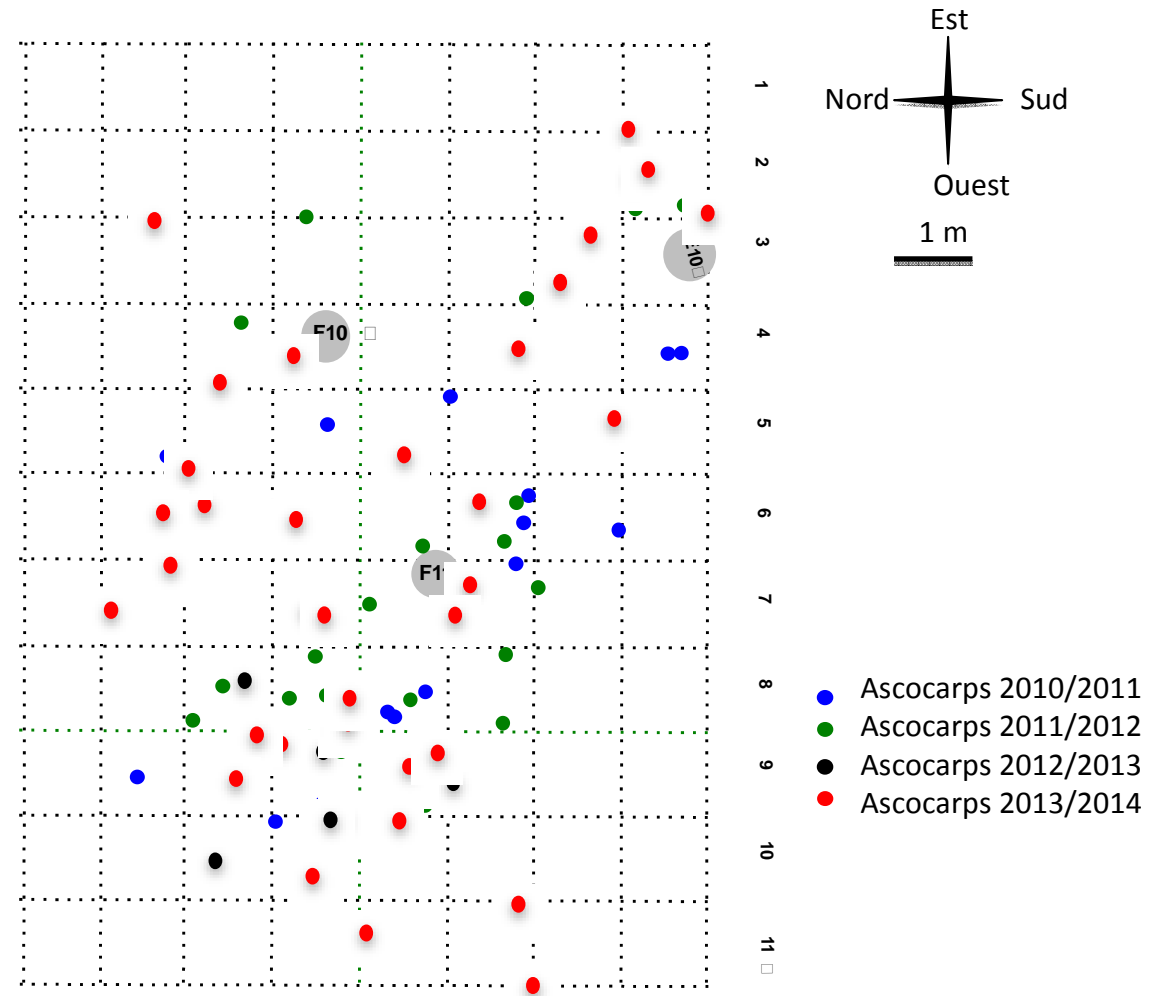
Fine-scale spatial genetic structure of the black truffle (*Tuber melanosporum*) investigated with neutral microsatellites and functional mating type genes

Claude Murat^{1*}, Andrea Rubini^{2*}, Claudia Riccioni², Herminia De la Varga¹, Emila Akroume¹, Beatrice Belfiori², Marco Guaragno², François Le Tacon¹, Christophe Robin³, Fabien Halkett¹, Francis Martin¹ and Francesco Paolocci²

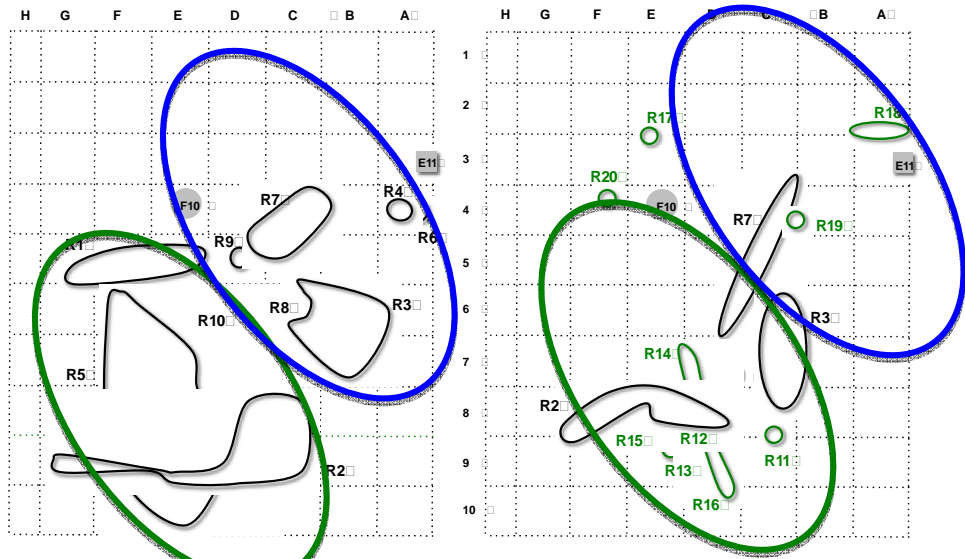
¹INRA, UMR 1136 INRA Université de Lorraine 'Interactions Arbres-Microorganismes', Labex ARBRE, FR EFABA, 54280, Champenoux, France; ²Plant Genetics Institute - Perugia Division, National Research Council, Via della Madonna Alta 130, 06128, Perugia, Italy; ³Université de Lorraine - INRA, UMR 1121 'Agriculture et Environnement Nancy-Colmar', BP 172, 54505, Vandœuvre les Nancy Cedex, France

Site d'étude

Toutes les truffes cartographiées durant 4 ans



Distribution des génotypes : tissu maternel

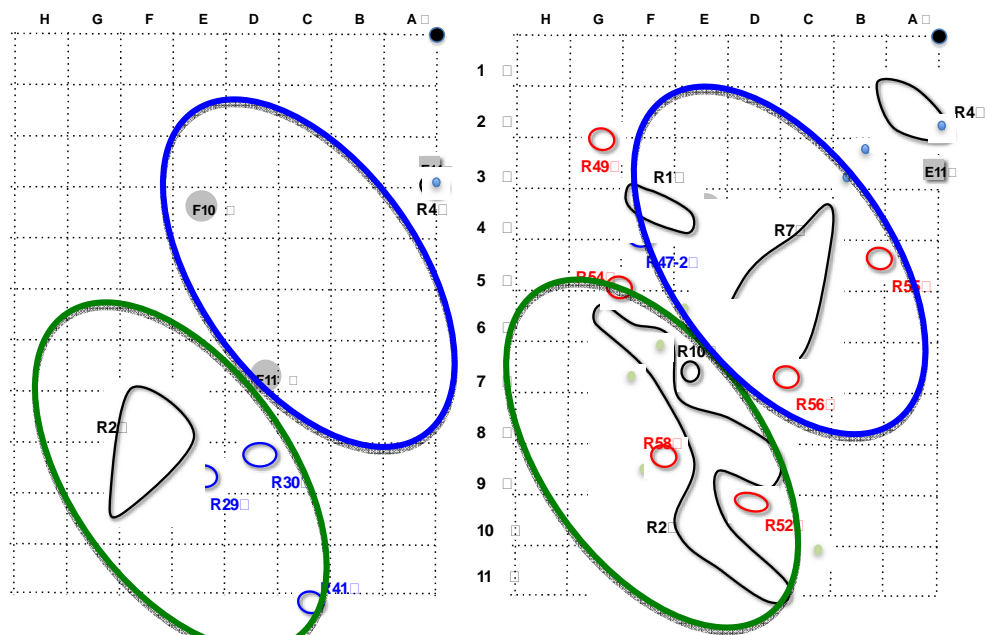


2010-2011

2011-2012

	GENOTYPES	Nouveau	ancien
2010/2011	10	10	
2011/2012	13	10	3
2012/2013	5	3	2
2013/2014	12	6	6
TOTAL	30		

Seulement 6 génotypes sur 30 retrouvés plus d'une saison
 -> renouvellement des génotypes



2012-2013

2013-2014

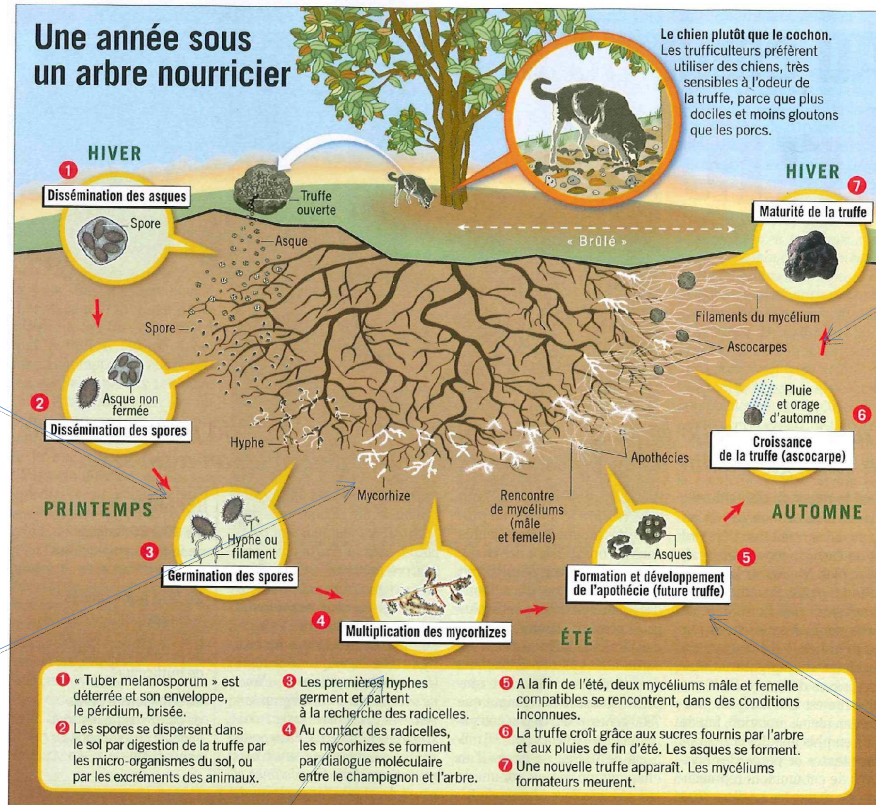
● MAT 2
 ● MAT 1

Distribution non aléatoire des génotypes des deux types sexuels

● MAT 2
 ● MAT 1

Utiliser le génome de *T. melanosporum* pour mieux comprendre son cycle biologique

Questions scientifiques méritant d'être abordées pour espérer augmenter la production



Quels sont les facteurs favorisant la germination des spores ?

Ceci est important pour la production de plants mycorhizés mais aussi dans les truffières

Comment la truffe interagit-elle avec l'arbre?

Est ce que toutes les truffes ont le même comportement (« boîte à outils ») pour établir et maintenir la symbiose?

Quelle est la taille et la durée de vie des génotypes de truffes ?

Est ce que la truffe investie plus dans la reproduction végétative ou sexuée -> génétique des populations

Quel est l'impact du réensemencement?

Quelle est l'origine de l'arome de la truffe: le champignon Tuber ou bien les bactéries

Comment aider et préserver les ascocarpes durant leur grossissement et leur maturation?

D'où vient le carbone de l'ascocarpe ?
Comment les techniques culturales permettent de contrecarrer les stresses environnementaux ?

Comment peut-on promouvoir la reproduction sexuée ?

Quelle est la distribution des génotypes des deux types de compatibilité sexuelle dans les truffières?

Où sont les mycélium maternel et paternel? Quels sont les facteurs favorisant l'initiation de la reproduction sexuée ?

Quels sont les effets des techniques culturales sur le cycle biologique?

Est ce que les truffes sont capables de s'adapter aux stresses environnementaux?

Comment la microfaune et les microbes (bactéries, levures, champignons) influencent le cycle biologique?



Nouvelles techniques de séquençage

-> baisse importante des coûts de séquençage

1 History of DNA Sequencing Technologies

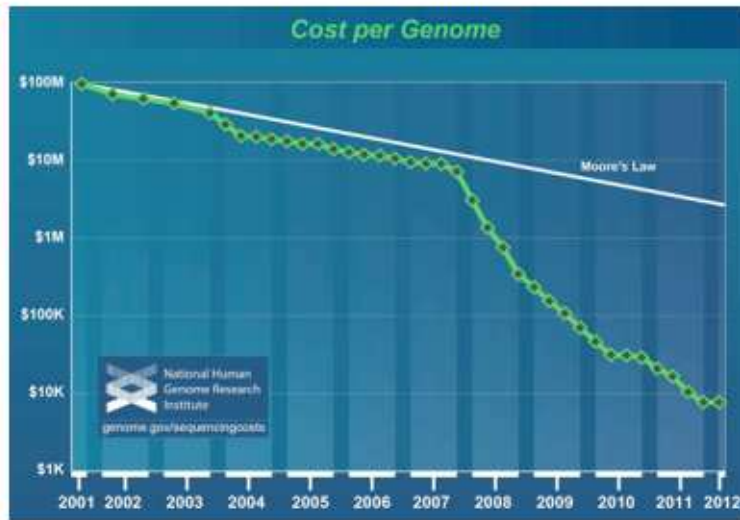


Fig. 1.4 Graph of sequencing costs per genome (estimated on a genome the relative size of the human genome). Moore's law (hypothetical computer industry that predicts the doubling of technology every 2 years) is illustrated on the graph. The abrupt drop in sequencing costs in 2008 represents the change from Sanger-based (dideoxy chain termination) sequencing to the "second-" or next-generation sequencing technologies (Data from NIH [17])

9

- 454
- Solid
- Illumina
- Ion Torrent
- PacBio

Illumina MiSeq

~1000 € pour 16 M séquences 2x250 bp
-> 6.2×10^{-5} €/séquences

From White In L.-J.C. Wong (ed.), Next Generation Sequencing: Translation to Clinical Diagnostics, 3

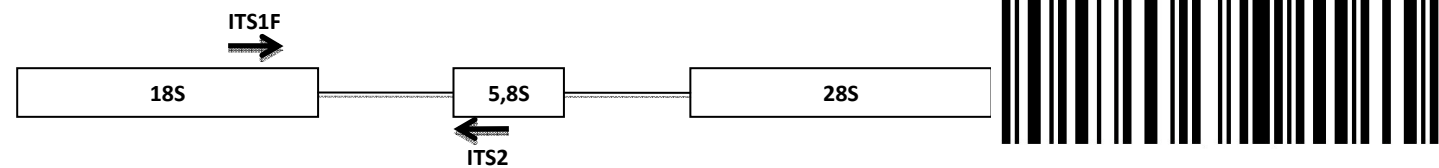
DOI 10.1007/978-1-4614-7001-4_1, © Springer Science+Business Media New York 2013

Meta-taxonomie : étudier la biodiversité du sol



Extraction d'ADN

Amplification des codes barres dans l'ADN



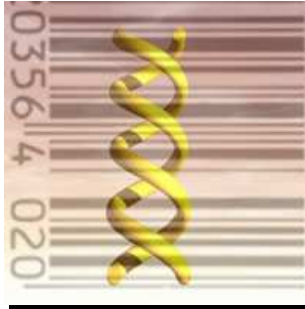
Séquençage



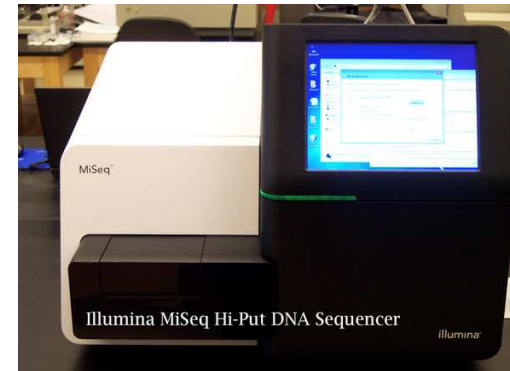
Analyses bioinformatiques

Identification des espèces

JGI Community Sequencing Programm 2012 Metatranscriptomics of Forest Soil Ecosystems



DNA Barcoding



Objectif: quelle est la composition de la communauté fongique dans et hors brûlé sur le site de Rollainville: utilisation de la technologie de séquençage illumina

Claude Murat, Thibaut Payen, Marc Buée, Juliette Lengelle, Emmanuelle Morin, Stéphane Uroz, Francis Martin

*UMR Interactions Arbres/Micro-organismes
Laboratoire d'Excellence ARBRE
INRA-Champenoux*

Le « brulés » l'environnement typique de la truffe noire

Site expérimental de Rollainville (Vosges, France)



Black truffle-associated bacterial communities during the development and maturation of *Tuber melanosporum* ascocarps and putative functional roles

Sanjay Antony-Babu,^{1,2†} Aurélie Deveau,^{1,2†} Joy D. Van Nostrand,³ Jizhong Zhou,^{3,4,5} François Le Tacon,^{1,2} Christophe Robin,^{6,7} Pascale Frey-Klett^{1,2} and Stéphane Uroz^{1,2}
¹INRA, Interactions Arbres – Microorganismes, UMR1136, F-54280 Champenoux, France.
²Interactions Arbres – Microorganismes, Université de Lorraine, UMR1136, F-54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France.

ascocarps provide a habitat to complex bacterial communities that are clearly differentiated from those of the surrounding soil and the ectomycorrhizosphere. The composition of these communities is dynamic and evolves during the maturation of the ascocarps with an enrichment of specific taxa and a differentiation of the gleba and peridium-associated bacterial communities. Genes related to nitrogen and sulphur cycling were enriched in the ascocarps.



Fine-scale spatial genetic structure of the black truffle (*Tuber melanosporum*) investigated with neutral microsatellites and functional mating type genes

Claude Murat^{1,*}, Andrea Rubini^{2,*}, Claudia Riccioni², Herminia De la Varga¹, Emila Akroume¹, Beatrice Belfiori², Marco Guaragno², François Le Tacon¹, Christophe Robin³, Fabien Halkett¹, Francis Martin¹ and Francesco Paolucci²

¹INRA, UMR 1136 INRA Université de Lorraine 'Interactions Arbres-Microorganismes', Labex ARBRE, FR EFARA, 54280, Champenoux, France; ²Plant Genetics Institute – Perugia Division, National Research Council, Via della Madonna Alta 130, 06128, Perugia, Italy; ³Université de Lorraine – INRA, UMR 1121 'Agronomie et Environnement Nancy-Colmar', BP 172, 54505, Vandœuvre les Nancy Cédex, France

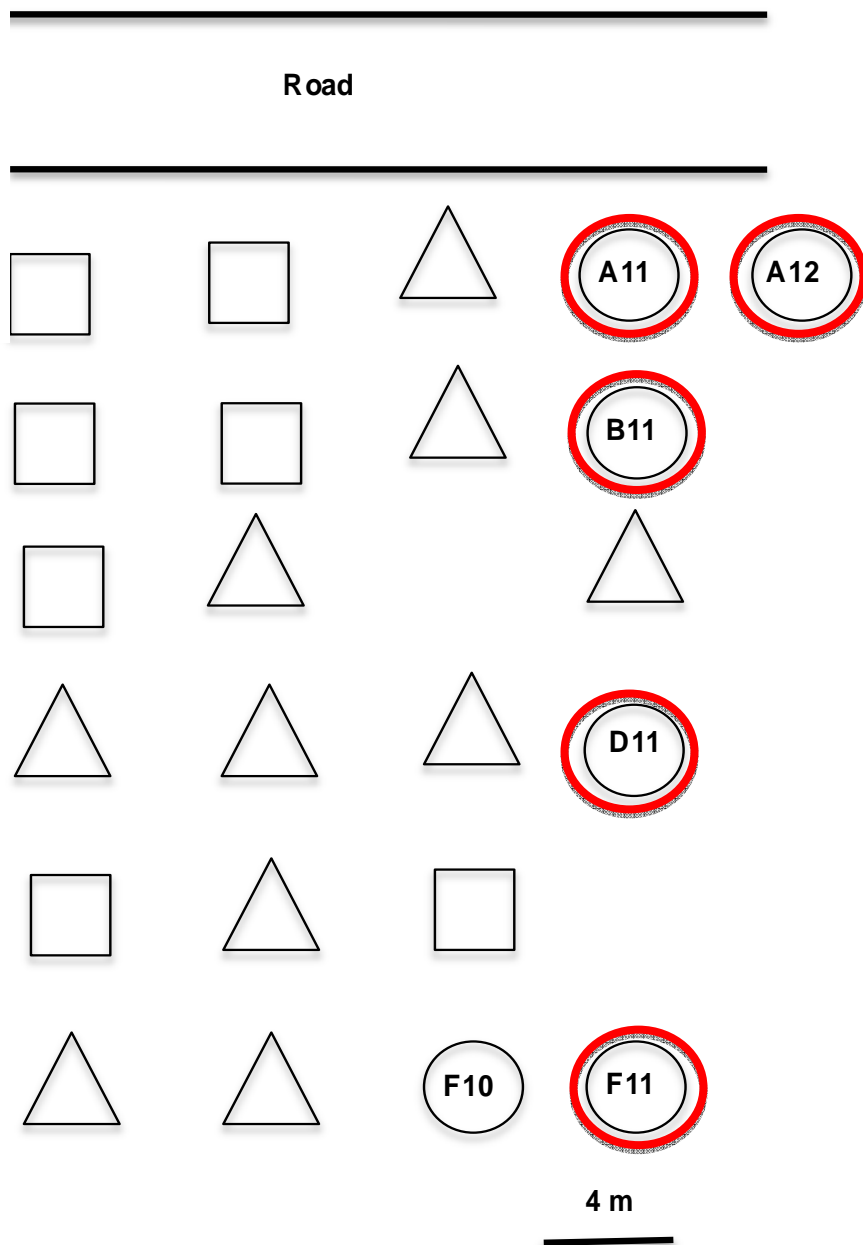
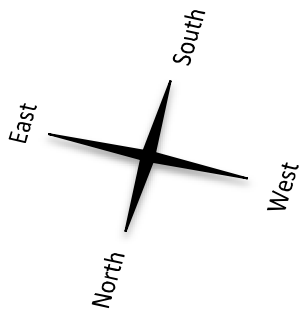


Carbon Transfer from the Host to *Tuber melanosporum* Mycorrhizas and Ascocarps Followed Using a ¹³C Pulse-Labeling Technique

François Le Tacon^{1,2}, Bernd Zeller^{3,*}, Caroline Plain^{4,5}, Christian Hossann^{4,5}, Claude Bréchet^{4,5}, Christophe Robin^{6,7}

¹INRA, UMR 1136, Interactions Arbres/Microorganismes (IAM), Centre INRA de Nancy, Champenoux, France, ²Université de Lorraine, UMR 1136, Interactions Arbres/Microorganismes (IAM), Faculté des Sciences, Vandœuvre les Nancy, France, ³INRA, UR 1138, Biogéochimie des Ecosystèmes Forestiers (BEF), Centre INRA de Nancy, Champenoux, France, ⁴INRA, UMR 1137, Ecologie et Ecophysiologie Forestières (EEF), Centre INRA de Nancy, Champenoux, France, ⁵Université de Lorraine, UMR 1137, Ecologie et Ecophysiologie Forestières (EEF), Faculté des Sciences, Vandœuvre les Nancy, France, ⁶Université de Lorraine, UMR 1121 « Agronomie & Environnement » Nancy-Colmar, Vandœuvre les Nancy, France, ⁷INRA, UMR 1121 « Agronomie & Environnement » Nancy-Colmar, Centre INRA de Nancy, Vandœuvre les Nancy, France

Echantillonnages



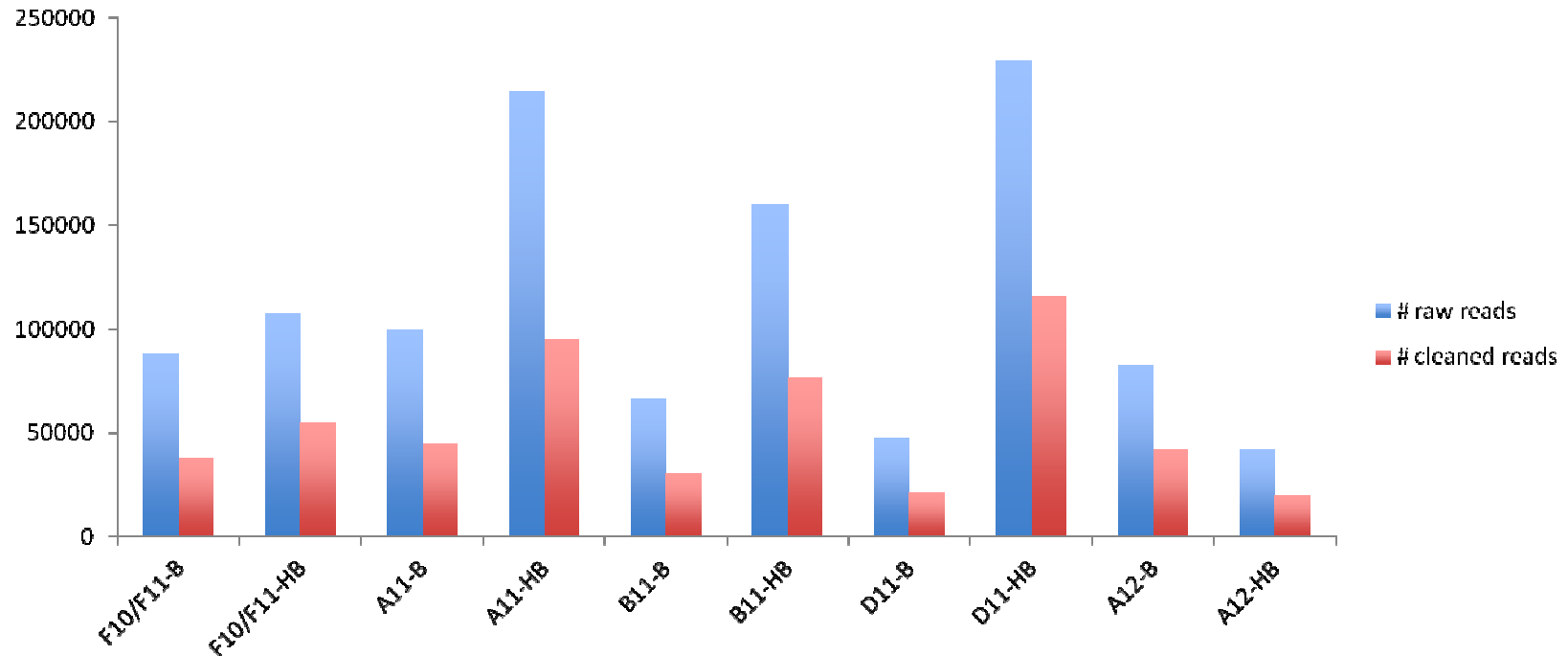
3 carottes dans brulé (B)
3 carottes hors brulé (HB)

3 extractions d'ADN

Pool -> 5 B et 5 HB

MiSeq illumina (ITS2)

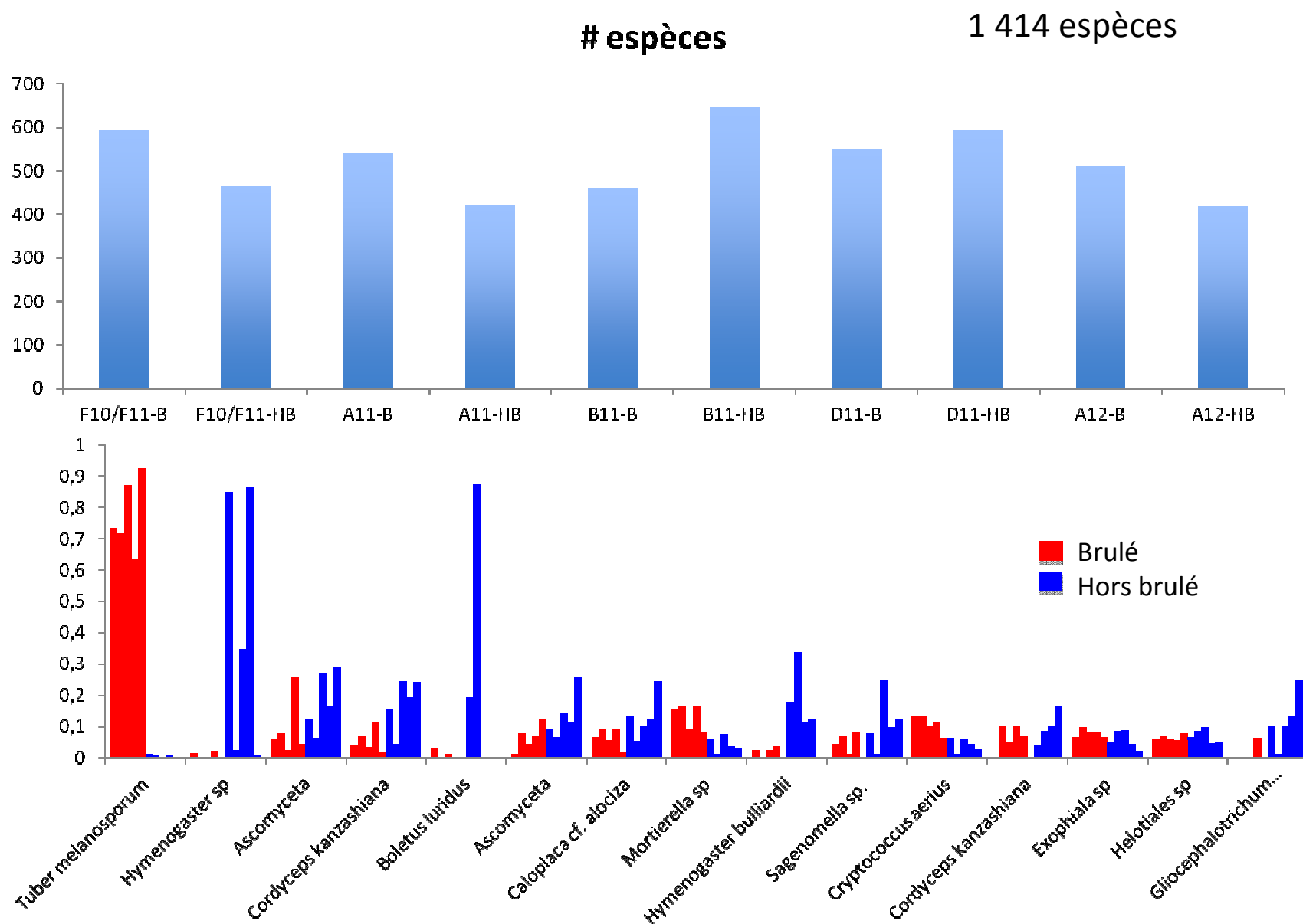
Séquençage et nettoyage des séquences



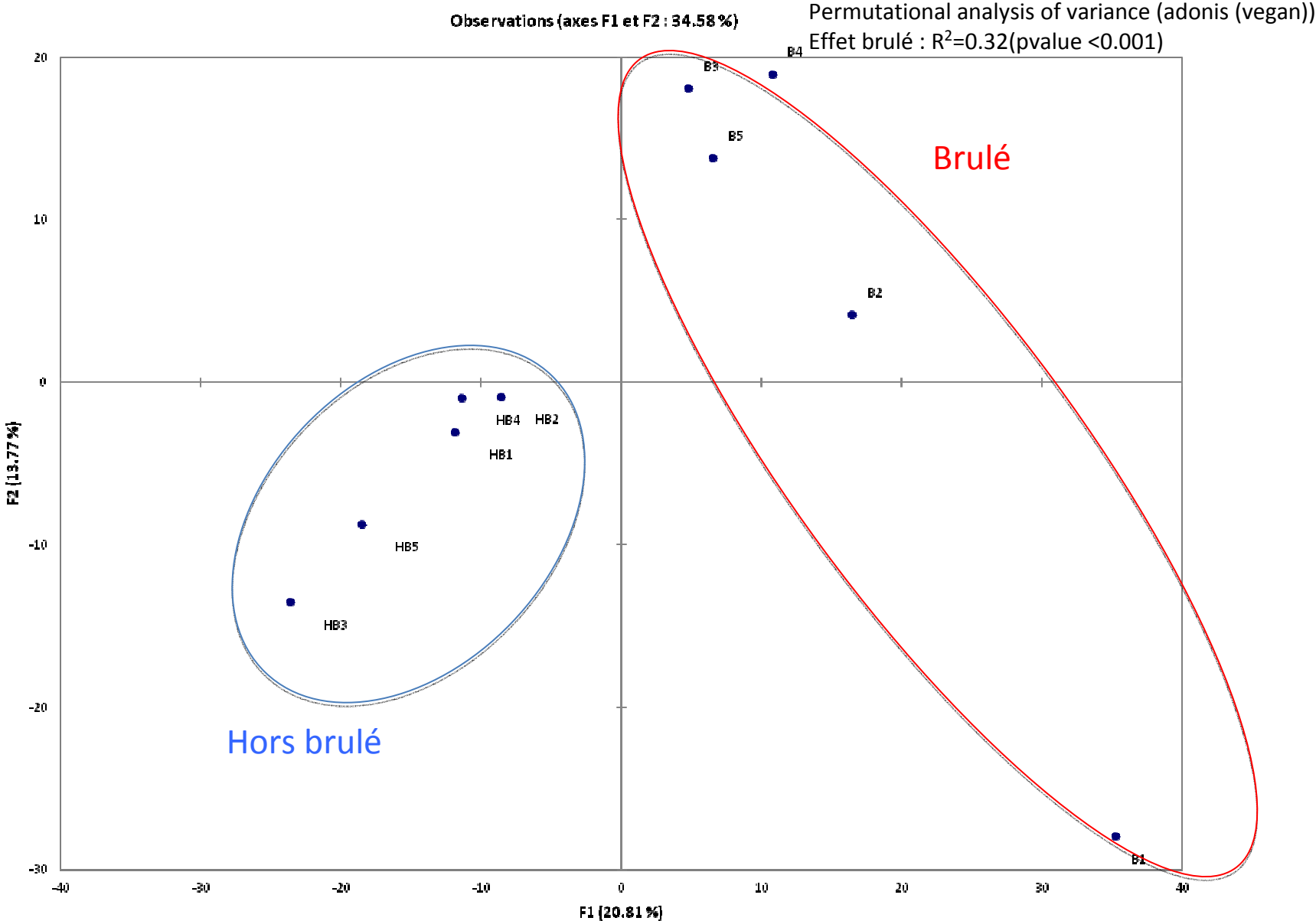
1 136 494 séquences brutes

538 166 séquences nettoyées (47 %) en utilisant UPARSE

Identification des espèces et espèces les plus fréquentes



Il existe un fort effet brûlé sur la communauté fongique



Existe-t'il des espèces indicatrices du sol des brulés et du sol hors brulés ?

Indicator species analysis (indval(labstd))

Indicator value = 1 -> l'espèce n'est présente que dans un seul traitement

Taxonomic affinity	Most frequent	indicator_value	p-value
<i>Rhizophydiales sp</i>	Hors brulé	1	0,00746
<i>Cortinarius sp</i>	Hors brulé	1	0,00806
<i>Glomus etunicatum</i>	Hors brulé	0,9809	0,00814
<i>Hymenogaster sp</i>	Hors brulé	0,976	0,03218
Calluna vulgaris root associated fungus	Hors brulé	0,9559	0,00756
<i>Candida sp.</i>	Hors brulé	0,9396	0,01574
<i>Diaporthe saccharata</i>	Hors brulé	0,9252	0,02418
<i>Glomus claroideum</i>	Hors brulé	0,9187	0,01516
<i>Leptosphaeria sp</i>	Hors brulé	0,9185	0,01648
<i>Clavaria falcata</i>	Hors brulé	0,9041	0,01628
<i>Ramularia miae</i>	Brulé	1	0,0083
<i>Tuber melanosporum</i>	Brulé	0,9907	0,00798
<i>Rhizophlyctis rosea</i>	Brulé	0,988	0,00708
<i>Helotiales sp.</i>	Brulé	0,9724	0,00892
<i>Ascomycota sp</i>	Brulé	0,9711	0,00836
<i>Truncatella angustata</i>	Brulé	0,961	0,00764
<i>Pyrenochaeta</i>	Brulé	0,9267	0,00768
no hits	Brulé	0,922	0,0076
<i>Schizothecium glutinans</i>	Brulé	0,9182	0,00894
<i>Tomentella cf. sublilacina</i>	Brulé	0,9164	0,00844

58 espèces sont plus fréquentes dans les sols hors brulé et 84 dans les sols des brulés

Que veut dire séquencer un génome?



Remerciements



Paola Bonfante et al. -> University Turin

F. Paolocci, et al. -> CNR Perugia

A.Zambonelli et al
Bologna -> University

D. Wipf et al. -> University Dijon

Tuber Genome Consortium

Mycorrhizal Genome Initiative

Toutes les personnes nous fournissant des échantillons

FFT

**Michel Tournayre
Jean Charles Savignac
Michel Courvoisier**



ANR SYSTRUF

**Christophe Robin, Nancy
MA Selosse, Montpellier**

**Pépinière Agritruffe
Pépinière Robin**

Remerciements

UMR 1136
Equipe Ecogénomique

Francis Martin

Herminia De la Varga

Annick Brun

Marc Buée

Carine Commun

Sébastien Duplessis

Claire Fourrey

Benoît Hilselberger

Annegret Kohler

Valérie Legué

François Le Tacon

Emmanuelle Morin

Thibaut Payen

Jonathan Plett

Emilie Tisserant

Emila Akroume

Hermila De la Varga

