



Asques avec 8 spores d'*Ascobolus immersus* produites in vitro (Photo Fabienne Malagnac)

In vitro and in situ unraveling truffle sexual reproduction using *Ascobolus immersus* as a test tub

Responsable scientifique : Claude MURAT (UMR 1136 Interactions Arbres/Micro-organismes)

Collaborations : Francesco Paolocci, CNR-Institute of Biosciences and Bioresources (IBBR-CNR), Perugia (Italy), Fabienne Malagnac, I2BC, UMR 9198 CEA, CNRS, University Paris Sud, Dominique Barry, ALCINA private company, Michel Tournayre, Fédération Française des Trufficulteurs (FFT)

(Rapport intermédiaire)

Les truffes sont des champignons appartenant à la classe des Pézizomycètes et formant des associations symbiotiques ectomycorhiziennes avec des arbres et des arbustes. Il existe 200 genres et environ 1700 espèces dans la classe des Pézizomycètes. Il s'agit d'une classe basale parmi les Ascomycètes qui est composée d'espèces saprotrophes, symbiotiques et pathogènes retrouvées dans le sol, le bois, les racines et les excréments. Certaines espèces de Pézizomycètes produisent des fructifications très recherchées comme les truffes et les morilles. Une autre espèce de Pézizomycète est aussi connu depuis longtemps, il s'agit d'*Ascobolus immersus* qui est un modèle en génétique depuis les années 1930. En dépit de leur intérêt, le génome d'uniquement deux espèces de Pézizomycètes est publié pour l'instant : *Pyronema confluens* et *Tuber melanosporum*. Le séquençage du génome de la truffe noire (*T. melanosporum*) a permis d'identifier des microsatellites polymorphes et les gènes de compatibilité (MAT1-1 et MAT1-2 ; brevet international n°WO2012/032098). La truffe noire est une espèce hétérothallique, nécessitant la rencontre de deux souches portant chacun un gène de compatibilité différent pour initier le cycle de reproduction sexuée. Plusieurs études ont montré une distribution non aléatoire au niveau du système racinaire des génotypes avec de larges zones ayant plusieurs génotypes du même type de compatibilité. Les mécanismes contrôlant cette compétition entre génotypes et aussi l'origine des génotypes paternels reste encore inconnue. Une question devant être élucidée est l'implication du locus MAT dans cette compétition. Il est malheureusement impossible actuellement de réaliser des analyses fonctionnelles avec la truffe en produisant des mutants.

D'ailleurs c'est le cas pour la plupart des ascomycètes qui ont un intérêt écologique (ex. *Cenococcum geophylum*, *Sphaerospora brunnea*) et économique (ex. morilles, *Terfezia boudieri*). Le Pézizomycète saprotrophe *A. immersus* est une espèce modèle en génétique qui vit dans des excréments. Il se développe très rapidement *in vitro* et il est possible de réaliser son cycle de reproduction sexuée en boîte de pétri en seulement 15 jours. Toutefois, quelques optimisations sont encore nécessaires utiliser plus facilement *A. immersus* en génétique inverse.

L'objectif d'AscoTube est d'étudier *in vitro* et *in situ* la reproduction sexuée de la truffe noire. Comme *A. immersus* appartient aux Pézizomycètes, comme les truffes, et que son génome a été récemment séquencé notre hypothèse est d'utiliser ce champignon comme modèle hétérologue pour étudier la fonction des gènes de la truffe noire. Plus généralement nous voulons tester la faisabilité du modèle *A. immersus* comme modèle hétérologue pour les ascomycètes. AscoTube est un projet innovant qui va produire plusieurs résultats en terme de 1) nouveaux outils pour étudier la fonction des gènes chez les ascomycètes en utilisant *A. immersus* ; 2) connaissance sur le cycle de reproduction sexuée et de la compétition entre souches de la truffe ; 3) hybridation possible entre la truffe noire et la truffe de Chine ce qui est fortement demandé par la filière trufficole et 4) l'identification et la localisation *in situ* des génotypes paternels et maternels. Les principaux résultats obtenus pour l'instant sont :

- Une publication dans un journal international présentant la distribution *in situ* des génotypes paternels et maternels
- Un article de divulgation scientifique, huit conférences et un poster
- Le recrutement d'un postdoc : Simone Belmondo

Le projet a commencé par les analyses *in situ* et un article a été publié dans la revue *Environmental Microbiology*. Dans cet article nous suggérons que les ascospores ont probablement un rôle important dans le cycle de reproduction des truffes. A ce propos nous sommes en train de mettre en place des expériences pour étudier en détail ce rôle. Simone Belmondo a commencé un contrat postdoctoral le 1^{er} avril 2017 et il a été recruté pour 18 mois. Il est depuis le 1^{er} novembre 2017 à Saclay pour commencer les analyses sur *A. immersus*. Il travaille entre autre sur le développement de souches CRISPR-CAS9 ce qui facilitera les analyses génétiques.

Valorisation scientifique :

Préprint:

- De la Varga H, Le Tacon F, Lagouet M, Todesco F, Varga T, Miquel I, Barry-Etienne D, Robin C, Halkett F, Martin F, Murat C (2016) Five years investigation of female and male genotypes in Perigord black truffle (*Tuber melanosporum* Vittad.) revealed contrasted reproduction strategies. bioRxiv. DOI:<http://dx.doi.org/10.1101/073650>

Revue internationale :

- De la Varga H, Le Tacon F, Lagouet M, Todesco F, Varga T, Miquel I, Barry-Etienne D, Robin C, Halkett F, Martin F, Murat C (2017) Five years investigation of female and male genotypes in Perigord black truffle (*Tuber melanosporum* Vittad.) revealed contrasted reproduction strategies. *Environmental Microbiology*, 19 (7): 2604-2615

Diffusion :

Divulgation:

- Murat C, Selosse MA, Taschen E, Schneider-Maunoury L, Richard F, Martin F, Le Tacon F (2017). Quelques considérations sur le réensemencement par ascospores des truffières à *Tuber melanosporum*. *Le Trufficulteur* 98, 12-13

-

Séminaires:

- Murat, C. (2017) Le cycle de reproduction sexuée de la truffe noire, Syndicat des trufficulteurs du Vaucluse, 14 octobre 2017

- Murat, C. (2017) L'evoluzione della simbiosi microbica studiata mediante il sequenziamento dei genomi fungini. Università d'Urbino (Italy), 17 février 2017
- Belmondo, S. (2017) Characterization of fungal genes involved in the establishment and the functioning of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. INRA Centre Grand Est Nancy (France), 19 mai 2017
- Murat, C. (2016). La trufficulture avance, grâce à la recherche. Grands salon de l'hotel de ville de Nancy, 11 novembre 2016
- Murat, C. (2016). Le programme d'expérimentation national CulturTruf et les dernières avancées de la recherche. Syndicat des trufficulteurs de la Drôme des collines. Génissieux, 29 octobre 2016
- Murat, C. (2016). Le programme d'expérimentation national CulturTruf et les dernières avancées de la recherche. Syndicat des trufficulteurs de l'Ardèche. Serrière, 28 octobre 2016
- Murat, C. (2016). Le programme d'expérimentation national CulturTruf et les dernières avancées de la recherche. Syndicat des trufficulteurs de l'Ain. Belley, 21 octobre 2016.
- Murat, C. (2016). Dynamique de la reproduction sexuée de *Tuber melanosporum*. Journée de restitution des résultats de la recherche. Dijon, 22 avril 2016.

Posters:

- Belmondo, S., Grognet P., Paolucci F., Malagnac F., Martin F., Murat C. (2017) AscoTube: *in vitro* and *in situ* unraveling truffle sexual reproduction using *Ascobolus immersus* as a test tube model. Doc & Post-Doc Day. INRA Centre Grand Est Nancy (France), 14 juin 2017

Effet levier du projet

Le projet est en cours donc pour l'instant nous n'avons pas encore d'effet levier.