



dsRNAs assay with *C. geophilum* mycelium. Left to right, *C. geophilum* control mycelium, fluorescein-labelled control as well as GAPDH-dsRNAs and Cenge3:69816-dsRNAs added to *C. geophilum* mycelium. The fluorescent signals were monitored after 12 h culturing on liquid *C. geophilum* medium.

Responsable scientifique : Maira DE FREITAS PEREIRA, UMR 1136/INRA, Forest Dynamics WSL

Partenaires Labex : Annegret Kohler, Claire Veneault-Fourrey, UMR Interactions Arbres/Micro-organismes)

Collaborations : Martina Peter (Forest Dynamics, WSL)

Contexte — *Cenococcum geophilum* est l'un des champignons ectomycorhiziens (ECM) les plus fréquemment rencontrés dans la nature, il est également souvent l'espèce dominante dans les systèmes racinaires d'arbres de divers hôtes dans les écosystèmes forestiers. Cet ascomycète est particulièrement abondant dans les environnements extrêmes et en période de sécheresse, ce qui suggère un rôle important dans la tolérance à la sécheresse de ses arbres hôtes. Le projet initial BLACKSECRET visait à élucider le rôle des petites protéines secrétées (PPS) de type effecteur dans la formation et le fonctionnement de mycorhizes de *C. geophilum*. Nous avons développé un système *in vitro* pour étudier l'interaction de *C. geophilum* avec les racines de l'arbre modèle, peuplier. Nous avons effectué des analyses transcriptomiques de *C. geophilum* en interaction avec deux hôtes différents, le pin et peuplier. *C. geophilum* utilise un arsenal de gènes très similaire pour communiquer avec les racines de pin et de peuplier, y compris des gènes codant pour les PPS. En utilisant les données de souches re-séquencées de *C. geophilum*, nous pourrions montrer que certaines sont conservées dans tous les génomes alors que d'autres sont hautement polymorphes ou même absentes dans certains des génomes re-séquencés étudiés. Enfin, nous avons fonctionnellement caractérisé nos effecteurs candidats par des expériences de localisation dans des cellules foliaires de *Nicotiana benthamiana* (Pereira et al. 2018). Pour Blacksecret2, nous avons proposé de caractériser davantage trois SSP par une approche de transformation.

Objectifs — En raison de l'absence de protocole de transformation de *C. geophilum*, nous avons décidé de tester une méthode prometteuse utilisant de l'ARN interférant double brin pour bloquer la transcription des SSP afin de progresser dans leur caractérisation fonctionnelle chez *C. geophilum*.

Démarche — Nous avons utilisé de l'ARN interférant double brin pour bloquer la transcription. A partir de nos résultats transcriptomiques, les PPS sélectionnés sont fortement exprimés à la fois dans les contacts précoces et tardifs avec *C. geophilum* et en interaction avec deux plantes hôtes : *Pinus sylvestris* et *Populus tremula x alba*. De plus, un gène domestique de *C. geophilum* (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)) a été utilisé entant que contrôle expérimental. Cette méthode a été utilisée avec succès pour différents systèmes plante-champignon, tels que *Botrytis cinerea*, un pathogène agressif (Wang et al., 2016) ou *Pisolithus albus*, un champignon ectomycorhizien chez *Eucalyptus* sp. (Jonathan Plett, personal communication).

Résultats marquants —

Nous avons été capables de produire de l'ARN interférant double brin pour quatre PPS : Cg668273, Cg698167, Cg659858, Cg659240 ainsi que le gène domestique Cg679752. Après 12h, nous avons détecté des signaux fluorescents dans le mycélium de *C. geophilum* cultivé en milieu liquide.

Principales conclusions incluant des points-clés de discussion —

Les signaux fluorescents ont été détectés seulement dans les hyphes de jeunes *C. geophilum* ce qui suggère que la mélanine produite par ce champignon pourrait influencer la transformation génétique. Pour les cinq gènes restant, une analyse confocale a révélé un signal fluorescent prometteur mais faible, suggérant que des modifications supplémentaires du protocole sont nécessaires.

Perspectives —

Blacksecret2 a permis de réaliser des tests préliminaires concernant la transformation de *Cenococcum geophilum*. Plus de temps est nécessaire pour adapter la méthode mentionnée ci-dessus et l'utiliser de manière fiable. La possibilité de transformer *Cenococcum* pourrait ouvrir de nouvelles portes pour mieux comprendre le rôle de certains gènes dans l'établissement de cette symbiose.

Valorisation —

A first manuscript dealing with the role of SSPs during *Cenococcum* mycorrhiza development was published in January 2018 as Research Topic "Mycorrhizosphere Communication: Mycorrhizal Fungi and Endophytic Fungus-Plant Interactions" in *Frontiers in Microbiology*. A second publication entitled "Comparative and transcriptional landscape of *Cenococcum geophilum* during the colonization of diverse host plants" is ready and submission is planned for March 2020 in *Environmental Microbiology*.

Effet levier du projet —

Both Blacksecret projects allowed us to reinforce our collaboration with the Forest Dynamics team at WSL. Future common projects are already planned. The results from BLACKSECRET enabled us also to introduce *Cenococcum* as emerging model system to the IAM "Plant-Microbe Interfaces" project funded by the U.S. DOE Genomics: GTL: Systems Biology for Energy and Environment, in collaboration with colleagues from Oak Ridge National Laboratory, Tennessee, USA (<http://genomicscience.energy.gov/research/sfas/ornlpmi.shtml>).