

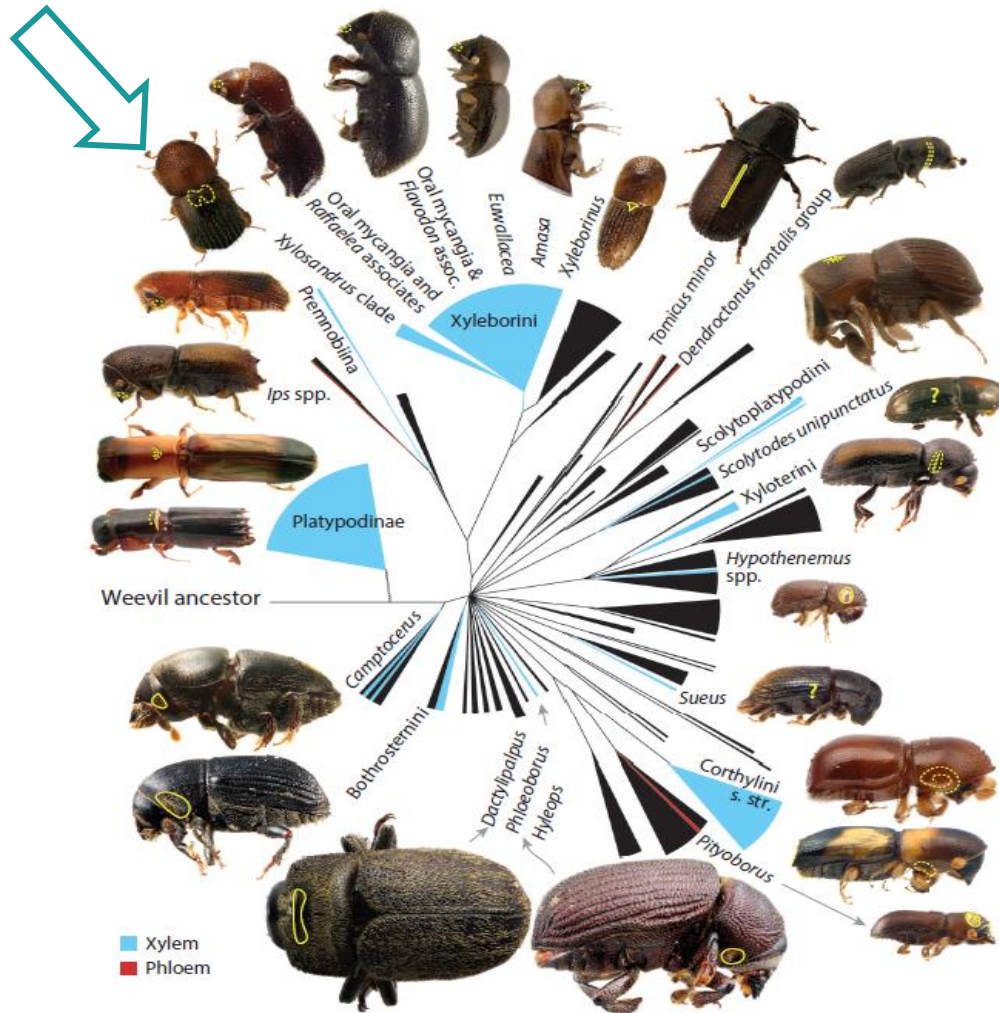
INRAE

➤ Les alliés de nos ennemis sont-ils nos ennemis ? caractérisation des champignons associés aux *Xylosandrus spp*

**Pilar Fernandez-Conradi, Benjamin Penaud, Julie Faivre d'Acier, Emilie Chancerel, Xavier Capdevielle, Gilles Saint-Jean, Martine Martin-Clotte, Thomas Boivin, Teddy Urvois, Marie-Anne Auger-Rozenberg, Alain Roques et Cécile Robin**

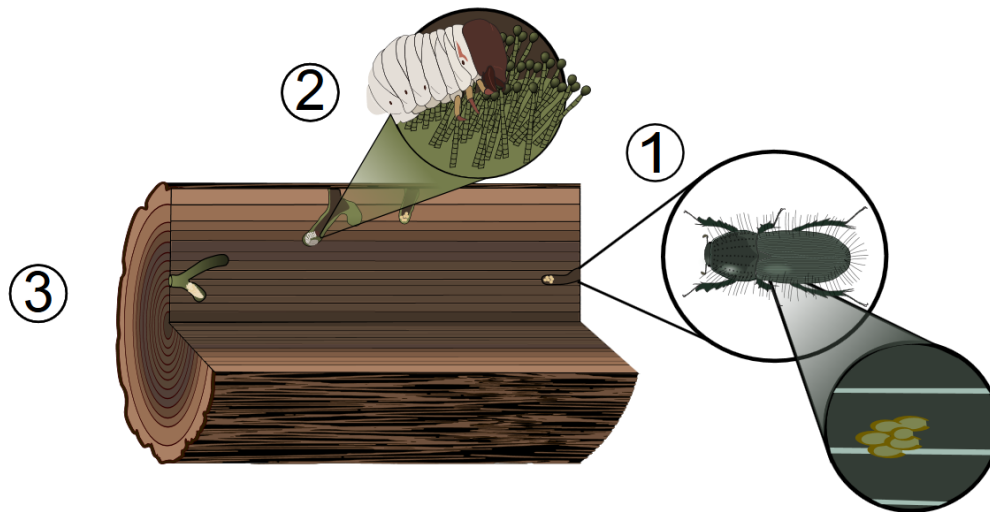


# Les scolytes à Ambrosia



Mycangia de *Xylosandrus crassiusculus*

# La symbiose scolyte - champignon



*X. crassiusculus* dans son « jardin »  
d'*Ambrosiella xylebori*

- 1: L'adulte femelle fait un trou dans le bois et dépose les oeufs, en même temps les champignons qu'elle porte.
- 2: Les larves se nourrissent des champignons qui pré-digèrent le bois, en enlevant les toxines.
- 3: Les larves font des pupes et éclosent, s'accouplent et seules les femelles, ayant acquis des champignons dans leur mycangia, émergent.

# Caractérisation des champignons

## 1) Isolements à partir des scolytes morts ou leur galeries



Isolement des champignons  
dans les galeries



Isolement des champignons  
dans le corps des insectes

# Isolements

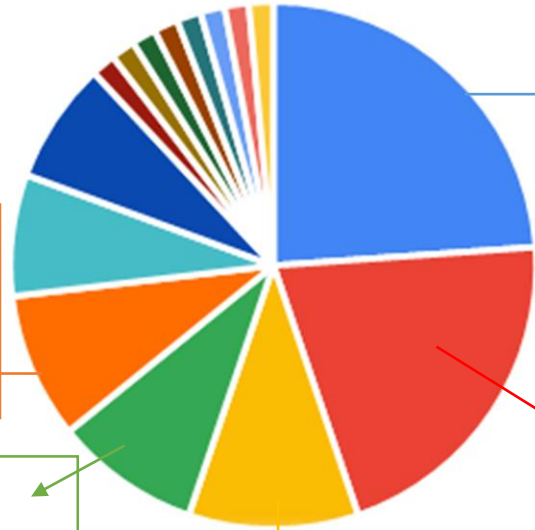
- Repiquage dans une boîte/ morphotype et classification dans 126 morphotypes  
→ Extraction d'ADN et séquençage Sanger (166 Isolats)



# Isolements

126 morphotypes

= 67 espèces différentes



*Aspergillus\_niger*  
*Penicillium\_expansum*  
*Penicillium\_glabrum*  
*Penicillium\_sp*  
*Talaromyces\_cecidicola*  
*Talaromyces\_minioluteus*

*Diplodia\_alatafructa*  
*Diplodia\_juglandis*  
*Diplodia\_pseudoseriata*  
*Diplodia\_scrobiculata*  
*Neofusicoccum\_australe*  
*Neofusicoccum\_mediterraneum*

*Biscogniauxia\_mediterranea*  
*Paraconiothyrium\_archidendri*  
*Pestalotiopsis\_cocculi*  
*Pestalotiopsis\_microspora*

*Alternaria\_alternata*  
*Alternaria\_infectoria*  
*Bipolaris\_sorokiniana*  
*Coniothyrium\_dispersellum*  
*Didymella\_glomerata*  
*Didymella\_sp*  
*Didymosphaeria\_variabile*  
*Epicoccum\_nigrum*

*Parathyridaria\_ramulicola*  
*Periconia\_byssoides*  
*Phialemoniopsis\_ocularis*  
*Phoma\_sp*  
*Pithomyces\_chartarum*  
*Pleosporales\_sp*  
*Teichospora\_rubiostiolata*

*Acremonium\_roseolum*  
*Clonostachys\_rosea*  
*Fusarium\_ensiforme*  
*Fusarium\_metavorans*  
*Fusarium\_solani*  
*Geosmithia\_langdonii*  
*Geosmithia\_omnicola*

*Geosmithia\_pallida*  
*Mariannaea\_elegans*  
*Monocillium\_tenuis*  
*Trichoderma\_atroviride*  
*Trichoderma\_citrinoviride*  
*Trichoderma\_harzianum*  
*Xenoacremonium\_falcatus*

- o\_\_Pleosporales
- o\_\_Botryosphaeriales
- o\_\_Diaporthales
- o\_\_Russulales
- o\_\_unidentified
- o\_\_Hypocreales
- o\_\_Eurotiales
- o\_\_Dothideales
- o\_\_Togniniales
- o\_\_Mucorales
- o\_\_Xylariales
- o\_\_Capnodiales
- o\_\_Microascales
- o\_\_Trichosphaeriales
- o\_\_Calosphaeriales

# Caractérisation des champignons

1) Isolements à partir des scolytes morts ou leur galeries

2) Métabarcoding à partir d'ADN de scolyte ou leur galeries



# Métabarcoding

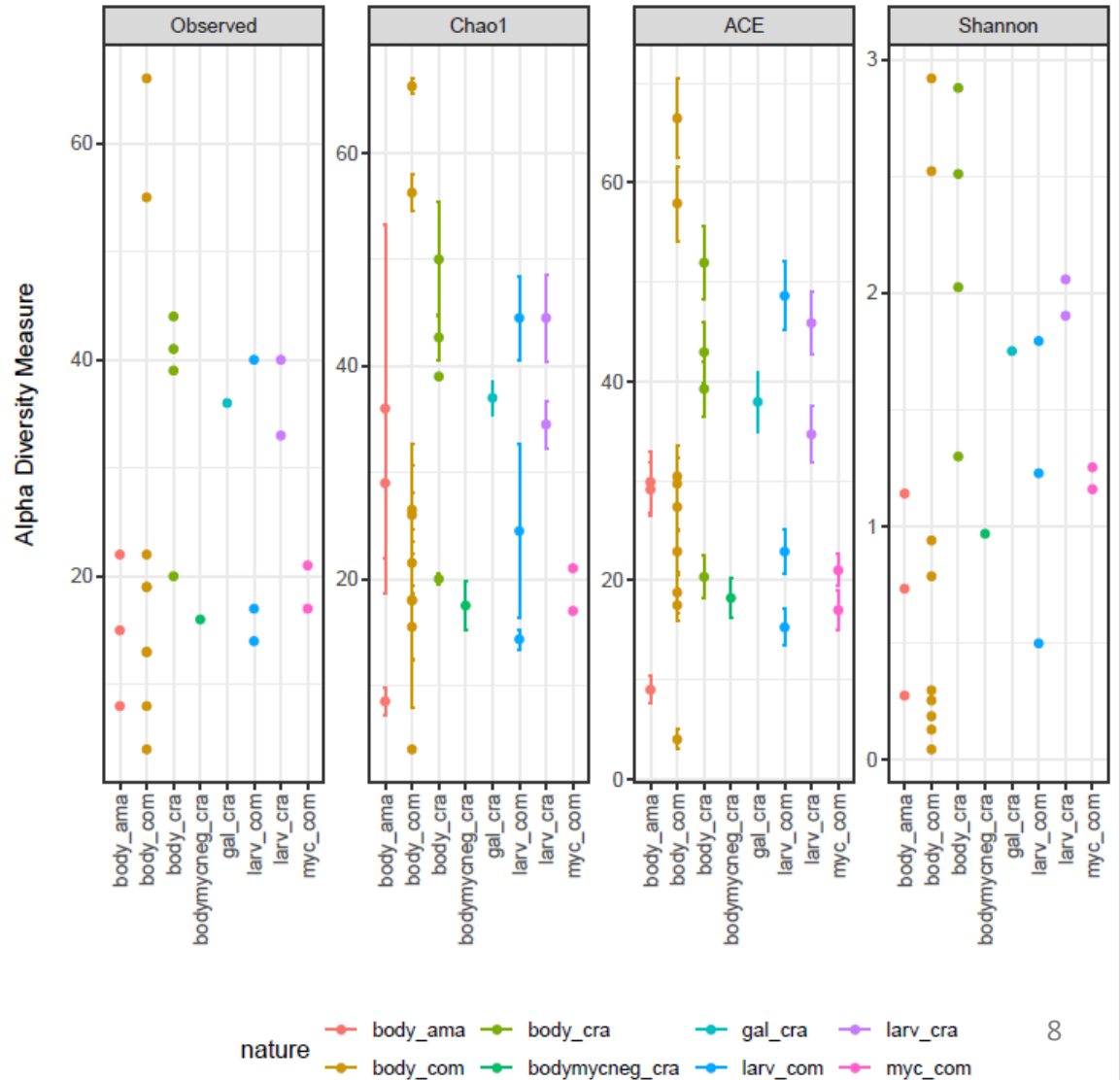
Analyses SAMFIX sur Miseq

56 échantillons

1 101 988 séquences

402 OTUs

258 Assignations au genre/  
espèce





# Métabarcoding

## Mock community

❖ 21 espèces



Espèce retrouvée



Genre retrouvé



Genre et espèce non retrouvés

### Mock ADN

- Blast : 6 + 8 + 7 +3 FP  
 - RDP : 13 + 6 + 2 +3 FP  
 (dont Pseudophthomyces)

### Mock amplicons

- Blast : 6 + 8 + 7 +5 FP  
 - RDP : 14 + 5 + 2 +5 FP  
 (dont Pseudophthomyces)

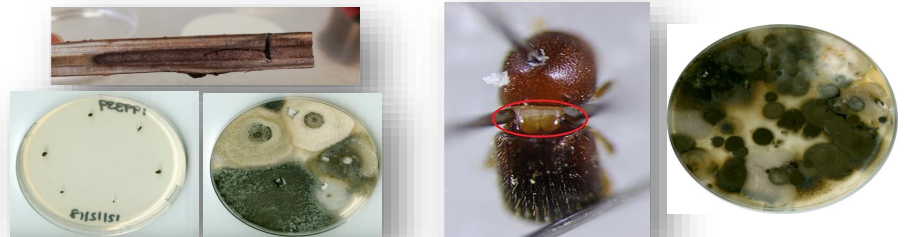
Mock ADN		Mock composition	Mock amplicons	
Blast	RDP		Blast	RDP
		<i>Diplodia pseudoseratia</i>		
		<i>Cladosporium cladosporioides</i>		
		<i>Didymella glomerata</i>		
		<i>Alternaria alternata</i>		
		<i>Alternaria infectoria</i>		
		<i>Pithomyces chartarum</i>		
		<i>Parathyridaria ramulicola</i>		
		<i>Geosmithia pallida</i>		
		<i>Mucor fragilis</i>		
		<i>Phaeoacremonium scolyti</i>		
		<i>Cryphonectria parasitica</i>		
		<i>Diaporthe foeniculina</i>		
		<i>Diaporthe amygdali</i>		
		<i>Trichoderma harzianum</i>		
		<i>Acremonium roseolum</i>		
		<i>Xenoacremonium falcatus</i>		
		<i>Fusarium solani</i>		
		<i>Ambrosiela xylebori</i>		
		<i>Nigrospora oryzae</i>		
		<i>Biscogniauxia mediterranea</i>		
		<i>Pestalotiopsis microspora</i>		

# Metabarcoding vs Isolement

## Coût approximatif?

**Isolement** + Extraction d'ADN + **séquençage Sanger**: environ 20 € / éch.

1 échantillon = 1 champignon



Extraction d'ADN + **métabarcoding**: environ 44€/ échantillon (Soit 4 000 e/ plaque)

1 échantillon = 1-5 insectes (ou galeries)

moyenne 36 OTUs/ éch.



# Metabarcoding vs Isolement

- (+) Plein d'OTUs sur beaucoup d'insectes
- (+) Rapide quand routine en place
- (-) Artéfacts méthodologiques
- (-) Dépendance de bases de données
- (-) Signification biologique??  
Bases de données comme FunGuild
- (-) Moins d'espèces fongiques sur moins d'insectes
- (-) Méthode culture dépendante  
Difficulté d'isoler certaines espèces
- (-) Très couteux en temps
- (+) Possibilité de détermination/description morphologique
- (+) Possibilité de tester leur pouvoir pathogène ou autre rôle fonctionnel ainsi que les possibles interactions plante x insecte x champignon

# Conclusion: Metabarcoding vs Isolement

Des avantages et inconvénients pour les deux méthodes...

Besoin de combiner les deux méthodes pour l'étude des nouvelles introductions de champignons associées aux insectes !  
Et pas que...

**Merci de votre  
attention!**

