

GUILLAUME CLÉMENT-MATHIEU

**ÉVALUATION DE LA CROISSANCE ET DE L'ACTIVITÉ ANTAGONISTE DE
PSEUDOZYMA SPP. EN CONDITIONS IN SITU**

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en biologie végétale
pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

DÉPARTEMENT DE PHYTOLOGIE
FACULTE DES SCIENCES DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2008

© Guillaume Clément-Mathieu, 2008

Résumé

Dans cette étude, nous avons évalué l'activité antagoniste et le développement de quatre espèces du genre *Pseudozyma* en présence de blanc, soit *P. flocculosa*, *P. antarctica*, *P. fusiformata* et *P. rugulosa*, et ce à l'aide de la microscopie à balayage, de la technologie GFP et de la PCR quantitative en temps réel. Ces espèces ont été choisies en fonction de leur production de glycolipides, molécules soupçonnées de conférer un avantage écologique de par leur action antimicrobienne. Les résultats obtenus ont démontré que seul *P. flocculosa* luttait efficacement contre le blanc et se développait en sa présence. Au contraire, les autres espèces ont vu leur population décliner suivant leur application sur feuilles saines ou infectées. Ces résultats suggèrent que si la sécrétion de glycolipides est un élément important dans l'activité antagoniste de *Pseudozyma* spp. contre le blanc, l'aptitude de ces organismes à utiliser les nutriments relâchés par ce dernier l'est tout autant dans une optique de lutte biologique.

Avant-propos

Le premier chapitre de ce mémoire de maîtrise est une revue bibliographique portant principalement sur la compréhension des mécanismes intrinsèques à l'activité antagoniste de *Pseudozyma flocculosa* contre plusieurs espèces de blanc et sur les différentes fonctions des glycolipides produits par *Pseudozyma* spp. Le second chapitre est écrit sous forme d'article scientifique. Les coauteurs Geneviève Marchand et Florian Chain ont grandement contribué à la planification et aux manipulations en qRT-PCR, alors que Caroline Labbé et Richard Bélanger m'ont été d'un grand secours pour l'analyse des résultats et la rédaction de l'article.

Je tiens à remercier sincèrement mon directeur de recherche, M. Richard R. Bélanger, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. J'ai beaucoup apprécié son support tout au long de la maîtrise, particulièrement pour l'opportunité qu'il m'a offerte de présenter mes travaux à l'*Annual Meeting of the American Phytopathological Society Northeastern Division* et pour ses commentaires éloquents tout au long du processus de rédaction. La maîtrise au sein du Laboratoire de Biocontrôle a vraiment été une expérience enrichissante au niveau professionnel, mais surtout au niveau personnel et social.

Un merci tout spécial à Geneviève Marchand et Caroline Labbé pour leur support technique et moral, lire ici leur patience et écoute. J'ai eu un réel plaisir à côtoyer tous les membres du Laboratoire de Biocontrôle. Je salue également tous ceux que j'ai côtoyés de près ou de loin à l'Environnement, ainsi que la gang de hockey du lundi.

Je veux finalement remercier Sabrina, ma famille et tous mes amis pour leur soutien indéfectible que j'apprécie grandement.

Table des matières

Résumé	ii
Avant-Propos.....	iii
Liste des figures.....	v
Introduction.....	1
Chapitre 1	3
Revue bibliographique	3
1. Le genre <i>Pseudozyma</i>	4
1.1 Classification et écologie	4
1.2 Le cas <i>Pseudozyma flocculosa</i>	4
2. Les glycolipides	5
2.1 Caractéristiques des glycolipides.....	5
2.2 Production de glycolipides chez <i>Pseudozyma</i> spp.....	6
2.3 Activité antagoniste des glycolipides sécrétés par <i>Pseudozyma</i> spp.	7
2.4 Activité antagoniste potentielle de <i>Pseudozyma</i> spp.	8
3. La technologie GFP	8
4. La PCR quantitative en temps réel	10
5. Problématique	11
Chapitre 2	12
Ecology and Biocontrol Potential of <i>Pseudozyma</i> spp. against Powdery Mildews.....	12
Résumé.....	14
Abstract.....	14
Introduction.....	15
Materials and methods	17
Fungal and plant-pathogen materials.....	17
Fungal transformation and plasmid material	17
Selection of transformants	18
<i>In situ</i> bioassays with <i>Pseudozyma</i> spp.	18
Fluorescence microscopy observations	19
Scanning electron microscopy observations.....	19
Population monitoring of <i>Pseudozyma</i> spp.	20
Results.....	21
Fungal transformation and selection of transformants	21
<i>In situ</i> bioassays with <i>Pseudozyma</i> spp.	21
Fluorescence microscopy observations	23
Scanning electron microscopy observations.....	25
Population monitoring of <i>Pseudozyma</i> spp.	25
Discussion.....	26
Acknowledgments	29
References.....	30
Chapitre 3	33
Discussion générale et conclusions	33
Bibliographie	36

Liste des figures

- Figure 1. Chemical structures of (A) ustilagic acid, (B) flocculosin and (C) mannosylerythritol lipid, three glycolipids produced by some Ustilaginales species16
- Figure 2. Microscope observations of GFP-transformed *Pseudozyma flocculosa* Act-4 (A, E), *P. rugulosa* Hsp70-14 (B, F), *P. fusiformata* Act-1 (C, G) and *P. antarctica* Act-12 (D, H) under visible (A-D) and blue light (E-H)22
- Figure 3. Evaluation of conidial chain collapse on (A) *Podosphaera xanthii*-infected cucumber leaves and (B) *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*-infected wheat leaves, 72 h after treatments with conidial suspensions of GFP-transformed *Pseudozyma* species22
- Figure 4. Microscope observations of leaf colonization by four GFP-transformed *Pseudozyma* spp. on both healthy (B-) and *Podosphaera xanthii*-infected (B+) leaf disks from *Cucumis sativus* L. cv Corona, 24 h after treatment24
- Figure 5. SEM observations of (A) *Pseudozyma flocculosa* (single arrow) developing over collapsed structures of *Podosphaera xanthii* (double arrow), (B) *Pseudozyma fusiformata* (single arrow) intertwined with unaltered structures of *P. xanthii* (double arrow) and (C) *Pseudozyma antarctica* (single arrow) in proximity of germinating conidia of *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (double arrow).....25
- Figure 6. Quantification by qRt-PCR of population development over time of four *Pseudozyma* spp. following inundative application of conidial suspensions on A) healthy and B) *Podosphaera xanthii*-infected leaf disks from *Cucumis sativus* L. cv Corona.....26

Introduction

Pseudozyma flocculosa est un basidiomycète levuroïde étudié depuis plus de 18 ans au Laboratoire de Biocontrôle de l'Université Laval, et ce largement en raison de ses propriétés antifongiques contre les champignons du blanc. Il est d'ailleurs l'élément actif de Sporodex[®], un biofongicide développé spécifiquement contre le blanc du rosier et du concombre de serre. De nombreuses recherches ont déjà été réalisées afin de bien comprendre le mode d'action de *P. flocculosa*, soit l'antibiose via le relâchement extracellulaire d'un glycolipide, la flocculosine.

D'autre part, plusieurs espèces du genre *Pseudozyma* sécrètent également différents glycolipides. Par exemple, *P. fusiformata* produit l'acide ustilagique, un cellobiose lipide dont la structure chimique est pratiquement identique à celle de la flocculosine. La nature de l'activité antagoniste de ces espèces contre le blanc et de la fonction écologique des différents glycolipides qu'elles sécrètent demeure toutefois largement inconnue.

Considérant le lien étroit existant vraisemblablement entre les propriétés antifongiques de *P. flocculosa* et sa production de flocculosine, il s'avérait donc intéressant d'évaluer si une telle relation était également présente chez les autres espèces du genre *Pseudozyma*. Dans cette optique, l'hypothèse de ce mémoire était la suivante : « Les espèces du genre *Pseudozyma*, reconnues pour produire des glycolipides aux propriétés antifongiques, possèdent une activité antagoniste contre le blanc ». Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons établi quatre principaux objectifs :

- Transformer génétiquement les espèces *P. flocculosa*, *P. antarctica*, *P. fusiformata* et *P. rugulosa* afin qu'elles expriment la *Green Fluorescent Protein*.
- Analyser in situ le développement de transformants GFP appliqués sur des feuilles de concombre infectées ou non par l'agent du blanc *Podosphaera xanthii*.

- Évaluer l'activité antagoniste de transformants GFP en estimant l'affaissement des conidiophores de blanc du concombre et du blé (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*).
- Quantifier les populations de *Pseudozyma* spp., à l'aide de la PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR), sur des feuilles de concombre infectées ou non par *P. xanthii*.

Chapitre 1
Revue bibliographique

1. Le genre *Pseudozyma*

1.1 Classification et écologie

En 1995, plusieurs basidiomycètes levuroïdes ont été reclassés par Boekhout (1995) dans un nouveau taxon, le genre *Pseudozyma*, selon différents critères morphologiques, physiologiques et génétiques. Le genre *Pseudozyma* est inclus dans l'ordre des Ustilaginales, qui contient notamment *Ustilago maydis*, agent du charbon du maïs. Les espèces du genre *Pseudozyma* sont anamorphes, c'est-à-dire qu'elles se reproduisent uniquement de façon asexuée. Ces espèces sont pour la plupart des épiphytes et se nourrissent principalement d'exsudats à la surface des feuilles. Elles occupent une niche écologique limitée, croissant habituellement dans les zones humides, à proximité des nervures et à la base des trichomes d'une feuille (Jarvis et coll., 1989). D'autre part, elles peuvent être présentes sur diverses plantes hôtes. Par exemple, *P. flocculosa* a été isolé entre autres sur le rosier et le trèfle des prés (Avis et coll., 2001).

1.2 Le cas *Pseudozyma flocculosa*

Les propriétés antagonistes de *P. flocculosa* ont été initialement constatées lorsque cet organisme a été confronté au blanc du concombre (Jarvis et coll., 1989), du rosier (Hajlaoui et Bélanger, 1991) et du blé (Hajlaoui et Bélanger, 1993). Lors de ces expériences, l'aspersion de conidies sur les feuilles infectées de ces différentes espèces végétales a causé un affaissement notable du blanc, détruisant hyphes et conidiophores de ce parasite obligatoire. La microscopie électronique n'ayant permis de déceler aucune pénétration des hyphes de *P. flocculosa* chez l'agent pathogène, cela suggérait alors un mode d'action par antibiose, soit par relâchement de métabolites extracellulaires (Hajlaoui et coll., 1992).

Dans le but de bien comprendre la nature de l'antibiose, des études ont été réalisées afin d'identifier les métabolites responsables de l'activité antifongique de *P. flocculosa*. Plusieurs acides gras comportant une activité antibiotique furent isolés chez ce champignon (Hajlaoui et coll., 1994 ; Benyagoub et coll., 1996 ; Avis et coll., 2000). Ces derniers étant

extraits de cultures de 28 jours, il est fort probable qu'il s'agissait plutôt de produits de dégradation. En effet, Cheng et coll. (2003) ont par la suite découvert, à l'aide de la mutagenèse insertionnelle, un glycolipide produit par *P. flocculosa*. Cette technique consiste à transformer un organisme (Cheng et Bélanger, 2000 ; Cheng et coll., 2001) en y intégrant de l'ADN afin d'inactiver des gènes d'intérêt et ainsi créer un phénotype différent. Dans leur expérience, l'activité antagoniste des transformants obtenus a été établie à l'aide de bioessais évaluant la zone d'inhibition entre les différents transformants de *P. flocculosa* et le champignon témoin *Phomopsis* sp. Fait intéressant, quelques transformants n'ont présenté aucune zone d'inhibition lors des bioessais. En comparant leurs métabolites extracellulaires à ceux de la souche sauvage par chromatographie sur couche mince, il a été possible de discriminer une molécule, la flocculosine. Ce glycolipide est depuis considéré comme le déterminant primaire conférant à *P. flocculosa* ses propriétés antagonistes. La flocculosine est constituée d'un disaccharide, le cellobiose, relié à deux acides gras (Fig. 1) (Mimee et coll., 2005 ; Hewald et coll., 2005 ; Hewald et coll., 2006). Celle-ci agirait en affectant l'intégrité membranaire des organismes sensibles (Avis et Bélanger, 2001).

Au niveau de la phyllosphère, *P. flocculosa* n'est pas en mesure de compétitionner avec les divers organismes saprophytes et nécrotrophes qui envahissent rapidement le substrat disponible. En effet, différentes observations tendent à démontrer que cet épiphyte occupe une niche écologique restreinte. Par conséquent, *P. flocculosa* protège possiblement sa niche contre des envahisseurs potentiels en relâchant la flocculosine (Bélanger et Avis, 2002).

2. Les glycolipides

2.1 Caractéristiques des glycolipides

Les glycolipides peuvent être définis comme des biosurfactants de faible poids moléculaire. Ces métabolites, produits par plusieurs micro-organismes, sont de nature amphiphilique, c'est-à-dire qu'ils sont composés d'une portion hydrophobe et d'une portion polaire. Grâce à cette structure chimique particulière, ils ont la propriété d'abaisser les

tensions superficielle et interfaciale à l'interface entre liquides, solides et gaz (Banat et coll., 2000). Plusieurs fonctions écologiques sont d'ailleurs attribuées aux biosurfactants. Ceux-ci contribuent notamment à favoriser la biodisponibilité de substrats insolubles à l'eau et à faciliter la croissance du micro-organisme en cause sur une surface hydrophobe. L'activité antimicrobienne de certains biosurfactants a été rapportée par plusieurs auteurs (Ron et Rosenberg, 2001). Selon Kitamoto et coll. (2002), l'accumulation de glycolipides chez un micro-organisme peut également être une façon d'emmagasiner de l'énergie pour une utilisation ultérieure.

Les biosurfactants de type glycolipide constituent une solution de remplacement intéressante aux surfactants chimiques utilisés couramment dans plusieurs secteurs et procédés industriels. En effet, ils sont biodégradables, peu toxiques et faciles à produire (Banat et coll., 2000) à partir d'hydrates de carbone (Kitamoto et coll., 2002). Pour cette raison, plusieurs recherches ont été récemment entreprises afin de comprendre la biosynthèse de glycolipides, notamment chez les basidiomycètes *U. maydis* (Hewald et coll., 2005 ; Hewald et coll., 2006 ; Teichmann et coll., 2007) et *P. antarctica* (Morita et coll., 2006).

2.2 Production de glycolipides chez *Pseudozyma* spp.

Deux types de glycolipides sont produits par les espèces du genre *Pseudozyma* : les mannosylérythritol lipides (MELs) et les cellobioses lipides. Ces deux composés furent initialement décrits et isolés chez *U. maydis* (Haskins, 1950 ; Fluharty et O'Brien, 1969). Les MELs sont composés d'un dissaccharide formé par le mannose et l'érythritol, dont la portion mannosyl est reliée à deux chaînes d'acides gras de longueur variable. Les MELs existent sous quatre formes (A, B, C ou D) selon l'acétylation de la portion mannosyl. Les cellobioses lipides, soit l'acide ustilagique et la flocculosine, sont quant à eux constitués d'un disaccharide, le cellobiose, relié à une longue chaîne d'acides gras. Le cellobiose est également acétylé et associé à une moyenne chaîne d'acides gras (Hewald et coll., 2005). La structure chimique des trois glycolipides mentionnés précédemment est illustrée à la Figure 1.

Morita et coll. (2007) ont récemment identifié six producteurs de MELs chez les espèces du genre *Pseudozyma* : *P. antarctica*, *P. aphidis*, *P. parantarctica*, *P. rugulosa*, *P. tsukubaensis* et *P. fusiformata* en moindre quantité. D'autre part, la production de cellobioses lipides chez *Pseudozyma* spp. a été rapportée uniquement chez *P. flocculosa* (Cheng et coll., 2003) et *P. fusiformata* (Kulakovskaya et coll., 2005), deux espèces phylogénétiquement rapprochées qui produisent respectivement la flocculosine et l'acide ustilagique (Konishi et coll., 2007).

2.3 Activité antagoniste des glycolipides sécrétés par *Pseudozyma* spp.

L'activité antagoniste in vitro des glycolipides sécrétés par *Pseudozyma* spp. et certaines espèces apparentées de l'ordre des Ustilaginales est très bien documentée dans la littérature scientifique. Par exemple, les MELs s'accumulant chez *Schizonella melanogramma* ont inhibé la croissance des champignons *Botrytis cinerea* et *Penicillium notatum* (Deml et coll., 1980). Selon Kitamoto et coll. (1993), les MEL-A et MEL-B de *P. antarctica* ont également démontré une activité in vitro contre certaines bactéries Gram positif, bien qu'ils aient été inactifs contre *Candida albicans* et *Aspergillus niger*. De plus, Fukuoka et coll. (2007) ont récemment identifié un nouveau type de MEL produit par *P. antarctica* à partir de glucose, dont la portion mannosyl comporte uniquement une chaîne d'acide gras et aucun groupement acétyl. Fait intéressant, son activité antimicrobienne était largement inférieure à celle obtenue chez les MELs traditionnels, ce qui précise en quelque sorte la portion active de la molécule.

Haskins et Thorn (1951) ont été les premiers à découvrir l'activité antagoniste de l'acide ustilagique produit par *U. maydis*. En effet, leurs bioessais ont démontré que cette molécule possédait un large spectre antimicrobien et antifongique. Pour leur part, Golubev et coll. (2001) ont constaté une activité similaire des cellobioses lipides chez *P. fusiformata*. Ceux-ci ont provoqué un important relâchement extracellulaire d'ATP chez certaines levures et autres organismes levuroïdes (Kulakovskaya et coll., 2003). En outre, il a été prouvé lors de bioessais que *P. flocculosa*, *P. fusiformata* et *P. antarctica* inhibaient la

croissance de certains champignons (Buzzini et Martini, 2000 ; Golubev et coll., 2001 ; Cheng et coll., 2003).

2.4 Activité antagoniste potentielle de *Pseudozyma* spp.

Récemment, Cheng et coll. (2003) ont obtenu des mutants ne produisant plus la flocculosine et étant incapables de réprimer efficacement le blanc du concombre. D'autre part, Teichmann et coll. (2007) ont été en mesure d'inhiber la germination des conidies et le développement des conidiophores de *Botrytis cinerea* sur des feuilles de tomates en y aspergeant des spores d'*U. maydis*, alors qu'un mutant $\Delta cyp1$ incapable de sécréter l'acide ustilagique n'a eu aucun effet sur *B. cinerea*. Ces études révèlent ainsi que la biosynthèse de glycolipides semble directement reliée aux propriétés antifongiques de ces deux espèces.

De façon analogue, selon la section précédente, il semble exister un lien étroit entre la production de glycolipides chez *Pseudozyma* spp. et leur activité antagoniste in vitro. Serait-il donc possible que cette association s'étende à leur activité antagoniste in situ? Le cas échéant, d'autres espèces du genre *Pseudozyma* pourraient ainsi être de potentiels agents de lutte biologique. Incidemment, Jarvis et coll. (1989) ont observé un affaïssement de *Podosphaera xanthii*, le blanc du concombre, en présence de *P. rugulosa*, alors qu'Hajlaoui et coll. (1991) ont obtenu des résultats similaires sur le blanc du rosier. Par contre, Avis et coll. (2001) n'ont pu confirmer ces résultats. À la lumière de ces informations, l'activité antagoniste in situ du genre *Pseudozyma* spp. et le rôle écologique de leurs glycolipides mériteraient d'être investigués plus en profondeur à l'aide de technologies nouvellement disponibles.

3. La technologie GFP

La *Green Fluorescent Protein* (GFP) est une protéine de 238 acides aminés qui a la propriété de fluorescer lorsqu'excitée par certaines longueurs d'onde. Elle a été initialement découverte par Shimomura et coll. (1962) chez la méduse *Aequorea victoria*. L'ADNc du gène *gfp*, séquencé par Prasher et coll. (1992), a par la suite été introduit avec succès chez

Escherichia coli et *Caenorhabditis elegans* (Chalfie et coll., 1994), résultant en la fluorescence de ces deux organismes sous rayons UV. Contrairement aux autres protéines bioluminescentes, la GFP ne requiert aucun cofacteur ; elle n'a besoin que d'oxygène et d'une stimulation par des longueurs d'onde précises pour fluorescer. De plus, elle est non-toxique, stable et très résistante au photoblanchiment, c'est-à-dire à la perte de fluorescence après un certain temps d'excitation (Tsien, 1998).

Ces caractéristiques avantageuses en font une protéine reporthrice de choix, l'une des plus utilisées en biologie cellulaire. De nombreux organismes ont ainsi été transformés avec le gène *gfp* afin d'exprimer cette protéine et de permettre leur visualisation in situ en microscopie à fluorescence, alors qu'ils ne peuvent être discernés en microscopie conventionnelle. D'autre part, la GFP peut avoir plusieurs utilités ; la transcription et la traduction fusionnelle du gène *gfp* permettent notamment d'évaluer l'expression d'un gène et de localiser une protéine spécifique chez un spécimen (Jensen et Schulz, 2003). Différentes variantes du gène *gfp* ont également été créées afin d'accentuer la fluorescence chez les levures, les plantes et les mammifères. La variante la plus commune est la classe 2, qui confère une légère modification au chromophore de la GFP, la sérine étant substituée par la thréonine au 65^e acide aminé. Cette protéine modifiée possède un spectre d'excitation à 488-489 nm correspondant à la lumière bleue et un spectre d'émission à 509-511 nm (Tsien, 1998).

Chez les champignons filamenteux, l'application de la technologie GFP a été réalisée avec succès pour la première fois par Spellig et coll. (1996) chez *Ustilago maydis*. Selon Spear et coll. (1999), l'expression adéquate de GFP chez un champignon filamenteux dans l'optique d'une observation in situ requiert trois éléments : une variante *gfp* traduite efficacement dans l'organisme, un système de transformation fonctionnel ainsi qu'un promoteur constitutif fort précédant ce gène. De nombreuses espèces chez les ascomycètes et les basidiomycètes ont été depuis transformées avec le gène *gfp* (Lorang et coll., 2001 ; Burns et coll., 2005). Cette technologie a permis sans contredit une meilleure compréhension des interactions entre champignons pathogènes et plantes hôtes. Par exemple, Skadsen et Hohn (2004) ont pu évaluer le développement de *Fusarium*

oxysporum sur les différents organes végétatifs et reproducteurs de l'orge et d'*Arabidopsis*. L'obtention de la souche *Trichoderma harzianum* ThzIDI-M3 a largement facilité l'observation et la quantification de la biomasse fongique de cet agent de lutte biologique dans le temps (Bae et Knudsen, 2000 ; Orr et Knudsen, 2004), celle-ci étant aisément différenciée de la communauté microbienne indigène de par sa fluorescence. L'interaction entre agent de lutte biologique et pathogène en conditions naturelles a depuis été explorée chez plusieurs espèces, notamment *Ophiostoma piliferum* (Lee et coll., 2002), *Clonostachys rosea* IK726 (Lübeck et coll., 2002 ; Jensen et coll., 2004), *Trichoderma atroviride* (Lu et coll., 2004), une souche bénéfique de *Fusarium oxysporum* (Bolwerk et coll., 2005), *Trichoderma virens* (Sarrocco et coll., 2006) et *Trichoderma asperellum* (Watanabe et coll., 2007).

Dans une récente étude, Neveu et coll. (2007b) ont appliqué la technologie GFP chez *P. flocculosa*. Ils ont pu ainsi étudier son comportement écologique en aspergeant un transformant fluorescent sur des feuilles saines et infectées de rosier, blé, concombre et tomate. Les différentes observations en microscopie à fluorescence ont clairement démontré une corrélation positive entre la présence du blanc et le développement de *P. flocculosa*. En effet, les auteurs ont dénoté une abondance d'hyphes fluorescents à proximité des colonies de blanc, alors qu'une faible présence du champignon était observée sur les échantillons exempts de blanc. Deux promoteurs constitutifs ont également été caractérisés chez *P. flocculosa*, soit les promoteurs associés aux gènes codant pour l'actine (Neveu et coll., 2007c) et la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (Neveu et coll., 2007a). Fait intéressant, ces deux promoteurs ont conféré à *P. flocculosa* et *P. antarctica* une fluorescence appréciable lorsqu'insérés en amont du gène *gfp*.

4. La PCR quantitative en temps réel

Bien qu'elle n'offre pas d'appréciation qualitative comme la technologie GFP, la PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR) permet la détection et la quantification in situ des micro-organismes. En bref, la qRT-PCR consiste en la mesure du signal fluorescent émis par l'amplicon à chaque cycle d'amplification. Cette fluorescence résulte de la

présence d'un marqueur se fixant exclusivement à l'ADN double-brin. De cette façon, il est possible de suivre la cinétique de l'amplification pour en déduire la quantité initiale d'ADN dans l'échantillon. En utilisant des amorces spécifiques à une espèce ou une souche, une inférence entre la quantité initiale d'ADN dans un échantillon et le nombre de micro-organismes correspondant peut être déterminée. Par exemple, Le Floch et coll. (2007) ont constaté la persistance de trois souches de *Pythium oligandrum* dans la rhizosphère d'une culture hors-sol de tomates sur une période de 6 mois. Les agents de lutte biologique *Hirsutella rhossiliensis* (Zhang et coll., 2006), *Paecilomyces lilacinus* (Atkins et coll., 2005), *Trichoderma harzianum* (Rubio et coll., 2005) et *Pichia anomala* (Pujol et coll., 2004) ont également été quantifiés dans leur environnement respectif. La qRT-PCR pourrait ainsi bien compléter la technologie GFP dans l'optique d'une comparaison des populations de *Pseudozyma* spp. sur plants sains et infectés par le blanc.

5. Problématique

Somme toute, cette revue bibliographique a mis en lumière plusieurs éléments ambigus quant aux propriétés antifongiques et à l'écologie du genre *Pseudozyma*. D'une part, *Pseudozyma* spp. et leurs glycolipides démontrent généralement une activité antifongique in vitro. D'autre part, les avis divergent quant à leur activité antagoniste in situ contre le blanc. L'influence de ces glycolipides sur le fitness de *Pseudozyma* spp. en conditions naturelles demeure toujours largement inconnue. Afin de résoudre cette problématique, l'utilisation de la technologie GFP et de qRT-PCR pourrait apporter des données qualitatives et quantitatives dans l'optique d'un suivi de différentes espèces de *Pseudozyma* dans la phyllosphère. En effet, différentes méthodes de transformation (Cheng et coll., 2003 ; Marchand et coll., 2007) et des promoteurs constitutifs ont déjà permis l'expression adéquate de GFP chez *P. flocculosa* et *P. antarctica* (Neveu et coll., 2007a ; Neveu et coll., 2007c). De cette façon, il serait possible d'établir leur potentiel de lutte biologique et d'évaluer leur développement en conditions naturelles.

Chapitre 2

Ecology and Biocontrol Potential of *Pseudozyma* Species against Powdery Mildews

Soumis à Fungal Ecology

Ecology and Biocontrol Potential of *Pseudozyma* Species against Powdery Mildews

Clément-Mathieu, G., Chain, F., Marchand, G. and Bélanger, R. R.*

Département de Phytologie, Centre de recherche en horticulture, Pavillon de l'Environnement, Université Laval, Québec, Québec, Canada, G1V 0A6

*Corresponding author. Mailing address: Département de Phytologie, Centre de recherche en horticulture, Pavillon de l'Environnement, Université Laval, Québec, Québec, Canada, G1V 0A6. Phone: (418) 656-2758. Fax: (418) 656-7856. E-mail: richard.belanger@plg.ulaval.ca

Résumé

Dans cette étude, nous avons comparé le potentiel de lutte biologique et le développement de quatre espèces du genre *Pseudozyma* (*P. antarctica*, *P. flocculosa*, *P. fusiformata* et *P. rugulosa*), reconnues pour leur production de glycolipides aux propriétés antifongiques *in vitro*. Pour ce faire, nous avons d'abord généré des transformants GFP et conçu des amorces spécifiques pour chacune des espèces testées. Par la suite, nous avons pu observer ces espèces en conditions naturelles et quantifier leurs populations en temps réel, sur des feuilles saines et infectées par le blanc. Bien que *Pseudozyma* spp. présentent plusieurs caractéristiques similaires, seulement *P. flocculosa* a été en mesure de contrôler efficacement le blanc et de croître en sa présence, comme en témoigne l'augmentation constante de sa population, tel qu'observée en qRT-PCR. De tels résultats suggèrent ainsi que la production de glycolipides n'est pas le seul facteur définissant l'activité antagoniste de *Pseudozyma* spp. en conditions naturelles. De plus, ces résultats soulignent également la nécessité d'avoir recours à des tests *in situ* pour une juste évaluation du potentiel de lutte biologique d'un champignon ainsi qu'une compréhension exhaustive de son écologie, et ce toujours dans le but d'optimiser l'efficacité d'un agent de lutte biologique potentiel.

Abstract

In this work, we compared the biocontrol potential and the ecological behavior of four related species of *Pseudozyma* (*P. antarctica*, *P. flocculosa*, *P. fusiformata* and *P. rugulosa*) all known to release glycolipids with antifungal activity *in vitro*. To this end, we developed GFP transformants and specific primers for each species and conducted *in situ* observations and quantification of their population over time on both healthy and powdery mildew-infected leaves. Although all species shared many similar features, only *P. flocculosa* was able to antagonize powdery mildew colonies and grow specifically in their presence. Population quantification by qRT-PCR showed a drastic decline in population for all species, including *P. flocculosa* on healthy leaves, but a sharp and steady increase of the latter on infected leaves, thus suggesting that glycolipid production is not the sole factor dictating biocontrol activity among *Pseudozyma* spp. These results stress the limited

reliability of *in vitro* assays in screening for potential biocontrol agents and the importance to understand their ecology in trying to optimize their development and efficacy.

Keywords: *Pseudozyma* - biocontrol activity - antibiosis - glycolipid

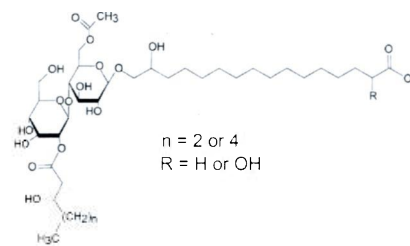
Introduction

The biocontrol activity of *Pseudozyma flocculosa* (Traquair, L. A. Shaw & Jarvis) Boekhout & Traquair against powdery mildews has been documented extensively over the past years (Paulitz & Bélanger 2001). On the basis of the reported modes of action for biocontrol agents (BCAs), *P. flocculosa* is described as exerting its antagonistic activity through antibiosis, presumably by releasing flocculosin, an antifungal glycolipid (Cheng *et al.* 2003).

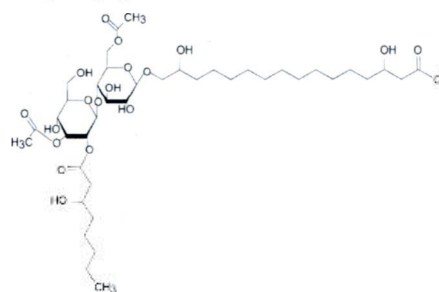
Glycolipids can be categorized as biosurfactants, i.e. amphiphatic compounds of microbial and fungal origins that reduce tension between surfaces (Banat *et al.* 2000). Physiological roles of biosurfactants are rather diverse, ranging from increasing bioavailability of hydrophobic water-insoluble substrates to displaying antimicrobial activity (Ron & Rosenberg 2001). Interestingly, fungal species within or close to the *Pseudozyma* genus have been linked by the production of unusual glycolipids. Indeed, *Pseudozyma* spp. produce two classes of glycolipids: mannosylerythritol lipids (MELs) and cellobiose lipids (Fig. 1) (Mimee *et al.* 2005; Hewald *et al.* 2005; Hewald *et al.* 2006). Molecules of each class were first isolated from the smut pathogen *Ustilago maydis* (Haskins 1950; Fluharty & O'Brien 1969), a basidiomycetous fungus phylogenetically related to the *Pseudozyma* genus (Begerow *et al.* 2000). In a recent survey, Morita *et al.* (2007) identified six MEL producers within the *Pseudozyma* genus: *Pseudozyma antarctica* (Goto, Sugiyama & Lizuka) Boekhout, *Pseudozyma fusiformata* (Buhagiar) Boekhout, *Pseudozyma rugulosa* (Traquair, L. A. Shaw & Jarvis) Boekhout & Traquair, *Pseudozyma aphidis*, *Pseudozyma parantarctica* and *Pseudozyma tsukubaensis*. For their part, cellobiose lipids are known to be produced by only two *Pseudozyma* spp., *P. fusiformata* (Kulakovskaya *et al.* 2005) and *P. flocculosa* (Cheng *et al.* 2003), which respectively produce ustilagic acid and flocculosin.

The *in vitro* antibiotic activity of glycolipids secreted by Ustilaginales has been reported in several separate studies. Kitamoto *et al.* (1993) showed that MELs from *P. antarctica* were particularly active against Gram-positive bacteria. Deml *et al.* (1980) reported that MELs accumulating in *Schizonella melanogramma* were active against some fungal strains. Ustilagic acid from *P. fusiformata* also showed a broad antifungal spectrum (Golubev *et al.* 2001), similar to that of ustilagic acid from *U. maydis* (Haskins & Thorn 1951). Moreover, several pathogenic yeasts were found to be sensitive to flocculosin, whose chemical structure is almost identical to that of ustilagic acid (Mimee *et al.* 2005). In addition, *P. antarctica*, *P. fusiformata* and *P. flocculosa* all displayed *in vitro* antagonistic activity against a few fungal species (Buzzini & Martini 2000; Golubev *et al.* 2001; Cheng *et al.* 2003). Thus, glycolipid production and *in vitro* antagonistic activity by *Pseudozyma* spp. appear to be closely linked. If it is indeed the case, this would suggest that glycolipid production might confer biocontrol activity to other *Pseudozyma* spp. Incidentally, some earlier studies (Jarvis *et al.* 1989; Hajlaoui & Bélanger 1991) did report that *P. rugulosa* had antagonistic activity against powdery mildews of rose and cucumber although Avis *et al.* (2001) could not confirm these results. Therefore, the ecological function of glycolipids, or the role played by glycolipids in the ecological fitness and biocontrol activity of *Pseudozyma* spp. remain enigmatic.

a. Ustilagic acid



b. Flocculosin



c. Mannosylerythritol lipids

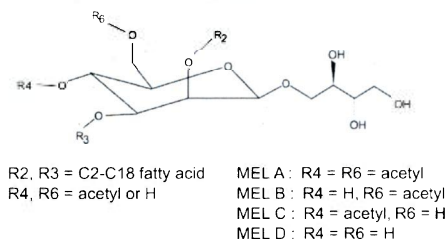


Figure 1. Chemical structures of (A) ustilagic acid, (B) flocculosin and (C) mannosylerythritol lipid, three glycolipids produced by some Ustilaginales species.

Considering their production of glycolipids with intriguing biological properties and our limited knowledge of the ecological behavior of *Pseudozyma* spp., the main objective of this study was to compare the development of *P. antarctica*, *P. rugulosa* and *P. fusiformata* to that of *P. flocculosa* following inundative applications on both healthy and powdery mildew-infected leaves. To this end, we took advantage of the Green Fluorescent Protein (GFP) (Neveu *et al.* 2007a) and the quantitative real-time PCR (qRT-PCR) technologies to conduct *in situ* observations, and quantification of their population over time and to assess their respective biocontrol activity.

Materials and Methods

Fungal and plant-pathogen materials. The fungal isolates used in this study all came from the Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS; Utrecht, NL) and were *P. flocculosa* (CBS 167.88), *P. antarctica* (CBS 516.83), *P. fusiformata* (CBS 423.96) and *P. rugulosa* (CBS 170.88). All four species together with *Phomopsis* sp. were maintained on potato-dextrose-agar (PDA) at 4°C and subcultured every two weeks. *Pseudozyma* transformants were grown on PDA amended with 300 µg ml⁻¹ hygromycin for all species but *P. flocculosa* (100 µg ml⁻¹). Powdery mildews were maintained on their respective host plants: *Podosphaera xanthii* (Castagne) U. Braun & Shishkoff on *Cucumis sativus* L. cv. Corona and *Blumeria graminis* (DC.) E. O. Speer f. sp. *tritici* Em. Marchal (Bgt) on *Triticum aestivum* AC Drummond. All plants were grown in growth chambers at Université Laval and were subjected to a 16 h photoperiod.

Fungal transformation and plasmid material. PEG/CaCl₂-mediated transformation for each *Pseudozyma* spp. was performed using the gene transfer system established by Cheng *et al.* (2001) in order to obtain GFP-expressing transformants. Briefly, protoplast preparation was achieved using a 15% Glucanex solution as described by Cheng and Bélanger (2000). Transformation was then completed using either both p*SceI*-Hyg and pCAct.GFP (10 µg per plasmid) or only pSPF.GFP (10 µg) for each species. Plasmids p*SceI*-Hyg, pCAct.GFP and pSPF.GFP were respectively linearized with *XhoI*, *XmnI* and *SacI*.

Plasmid pSceI-Hyg was donated by Dr. J. Kronstad (University of British Columbia, Canada) and contains a selection cassette including the *Escherichia coli* hygromycin phosphotransferase (*hph*) gene under the control of *U. maydis* HSP70 promoter and terminator sequences. Plasmid pCAct.GFP (Neveu *et al.* 2007b) contains a GFP expression cassette composed of the SGFP gene (Tsien 1998) preceded by the *P. flocculosa* actin promoter. Plasmid pSPF.GFP (Avis *et al.* 2005) consists of two cassettes in the same orientation, that is the selection cassette from pSceI-Hyg and a GFP expression cassette including the SGFP gene under the control of *U. maydis* HSP70 promoter and terminator sequences.

Selection of transformants. Transformants of *Pseudozyma* spp. maintained on hygromycin-amended PDA were grown in 50-ml tubes containing 5 ml of enriched YM broth and observed under both conventional and fluorescence microscopy to assess their GFP expression in the absence of hygromycin. For each species, ca. 100 transformants were screened based on cell fluorescence intensity. Selected transformants were then further screened using a bioassay against *Phomopsis* sp. as described by Neveu *et al.* (2007a) and another bioassay against cucumber powdery mildew colonies as described by Avis *et al.* (2001). Final candidates were selected when they displayed comparable growth on PDA as well as similar antagonistic activity against both *Phomopsis* sp. and powdery mildew compared to their wild-type (WT) counterpart.

***In situ* bioassays with *Pseudozyma* spp.** *In situ* bioassays consisted in the inundative application of conidial suspensions of all tested fungi on both cucumber (16 mm disks) and wheat (20 mm segments) leaves infected with their respective powdery mildew pathogen. Treatments comprised 1) an unsprayed control, 2) an enriched YM broth control, 3) a *P. flocculosa* WT control, and transformants of 4) *P. flocculosa*, 5) *P. antarctica*, 6) *P. fusiformata* and 7) *P. rugulosa*. Briefly, fungi were cultured for three days at 25°C in 500-ml flasks containing 100 ml of enriched YM broth in absence of hygromycin. Fungal cell concentration was calculated with a haemocytometer and adjusted to 5×10^6 cells ml⁻¹ with physiological water. Treatments 2 to 7 were sprayed uniformly on leaf samples placed in 9-cm Petri dishes and repeated four times. In each Petri dish, three infected leaf samples and

one healthy leaf sample were laid on a humidified filter paper. The Petri dishes were then sealed with parafilm and placed in a growth chamber with a 16-h photoperiod at 22/20°C as described by Hajlaoui and Bélanger (1993). Cucumber and wheat leaves were used in two separate experiments.

Biocontrol activity of all four species of *Pseudozyma* was assessed using a quantitative scale for conidial chains collapse prior to microscope observations. Each leaf sample was observed with a binocular and rated according to the proportion of collapsed conidial chains, as described by Jarvis *et al.* (1989), where 0 = no collapse of conidial chains, 1 = 1 to 25%, 2 = 26 to 50%, 3 = 51 to 75% and 4 = 76 to 100%. For statistical analysis, one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey-Kramer HSD comparisons were performed on SAS/JMP version 7.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC) with a significance level of $P < 0.05$.

Fluorescence microscopy observations. Observations of cucumber leaf samples were taken at 24 h, 48 h and 72 h with an Olympus model BH2-RFCA microscope (Olympus, Tokyo, Japan) at 25× and 40×. The microscope was equipped with a BH2-RFL-T3 mercury lamp for fluorescence microscopy observations. Pictures were recorded with a Coolsnap-pro (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) color camera and analyzed with Image Pro Plus software (MediaCybernetics) under visible and blue light (488 nm). Treatments 1 to 3 (unsprayed control, YM broth control and *P. flocculosa* WT control) were used to assess the autofluorescence emitted respectively by the powdery mildew colonies, the culture medium and the *Pseudozyma* structures.

Scanning electron microscopy observations. Conidial suspensions from each wild-type species of *Pseudozyma* were sprayed on a healthy and a mildewed leaf sample excised from cucumber plants, as described previously. SEM observations were made after 24 h using a Jeol JSM6360LV microscope (JEOL, Peabody, MA) at an operating voltage of 30 kV. The experiment was repeated with healthy and infected wheat leaf segments.

Population monitoring of *Pseudozyma* spp. Population monitoring of *Pseudozyma* spp. on cucumber disks was achieved using qRT-PCR. Conidial suspensions from each wild-type species of *Pseudozyma* were obtained as described above and respectively sprayed on four Petri dishes, each containing 18 cucumber leaf disks, nine of them being infected with *P. xanthii*. The leaf disks were individually sprayed once (ca. 100 μ l) from a 15 cm distance. For each species, leaf samples were taken after inoculation periods of 0 h, 24 h, 48 h and 72 h. At each harvest time, healthy and infected disks were respectively pooled into three 2-ml collection tubes, flash-frozen in liquid nitrogen and stored at -20°C until further use. Genomic DNA from leaf samples was then isolated using the QIAGEN Genomic Tips 20/G kit (Qiagen). Concentration and ratios of absorbance ($\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ and $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230}$) of genomic DNA were measured with a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE).

qRT-PCR was performed with an Eppendorf Mastercycler Ep Realplex 2 S (Eppendorf, Hamburg, Germany) using the following conditions: an initial denaturation of 15 min at 95°C , 50 cycles of 30 s at 95°C , 30 s at 58°C , 30 s at 72°C , and a final step of 3 min at 72°C . QuantitectTM SYBR[®] Green PCR Kit was used for qRT-PCR. Reaction mixture included 10 μ l SYBR[®] Green PCR Master Mix, 1 μ l of each primer (5 μ M) and 1 μ g total genomic DNA. Volume was adjusted to 20 μ l with water for each reaction. The following primers were designed to amplify species-specific DNA sequences: 5'-CTGACCCTTCTCTGCCTGTC-3' and 5'-AGGTCGAGGTAGCCAACAAA-3' for the *P. flocculosa* *uat1* gene, 5'-AGACGGTCGACACTTTACCAAA-3' and 5'-TTTAGACGACCGCATTACCAGT-3' for the *P. antarctica* 18S ribosomal rNA gene, 5'-CCGGATAAGCCAGACACATT-3' and 5'-ATCTTCCTTCCGGTTTCGTT-3' for the *P. fusiformata* *cy1* gene and 5'-CGATTTATTTCCGCCACCGC-3' and 5'-AACCAAGAGATCCGTTGCCAAAAG-3' for the *P. rugulosa* 18S ribosomal rNA gene. Genbank accession numbers for these sequences are respectively **EU556541**, **AF294698**, **EU556541** and **AF294697**. Specificity of PCR products was controlled both by gel electrophoresis and melting curve analysis.

In order to correlate amplicons obtained from samples to a precise cell count, the four wild-type species of *Pseudozyma* were cultured for three days at 25°C in 50-ml collection tubes containing 5 ml of enriched YM broth and their cell concentration was calculated with a haemocytometer. Genomic DNA from these broth cultures was then extracted and measured as described above and diluted in order to generate standard curves for an appropriate cell quantification of *Pseudozyma* spp.

Results

Fungal transformation and selection of transformants. PEG/CaCl₂-mediated transformation of *Pseudozyma* protoplasts was successful for all tested species with either pSPF.GFP or both pSceI-Hyg and pCAct.GFP. Fluorescence levels among transformants varied depending on the chosen construct. For instance, *P. rugulosa* transformants did not appear to fluoresce when GFP expression was under the control of the *P. flocculosa* actin promoter. In the end, candidates *P. flocculosa* Act-4, *P. antarctica* Act-12 and *P. fusiformata* Act-1, carrying both pSceI-Hyg and pCAct.GFP, and *P. rugulosa* Hsp70-14, carrying pSPF.GFP, were chosen. These selected transformants all displayed bright fluorescence (Fig. 2) and showed similar growth and antagonistic properties to their WT counterpart.

In situ bioassays with *Pseudozyma* spp. When conidial suspensions of the different *Pseudozyma* spp. were sprayed on powdery mildew colonies, only *P. flocculosa* and its derived transformant induced a significantly higher rate of conidial chain collapse than the controls. This observation held true whether the assay was run against *P. xanthii* on cucumber leaves or Bgt on wheat leaves (Fig. 3). Under our experimental conditions, none of the other tested *Pseudozyma*, *P. antarctica* Act-12, *P. fusiformata* Act-1 and *P. rugulosa* Hsp70-14, was able to attack powdery mildew colonies at a level exceeding that of the controls (Fig. 3).

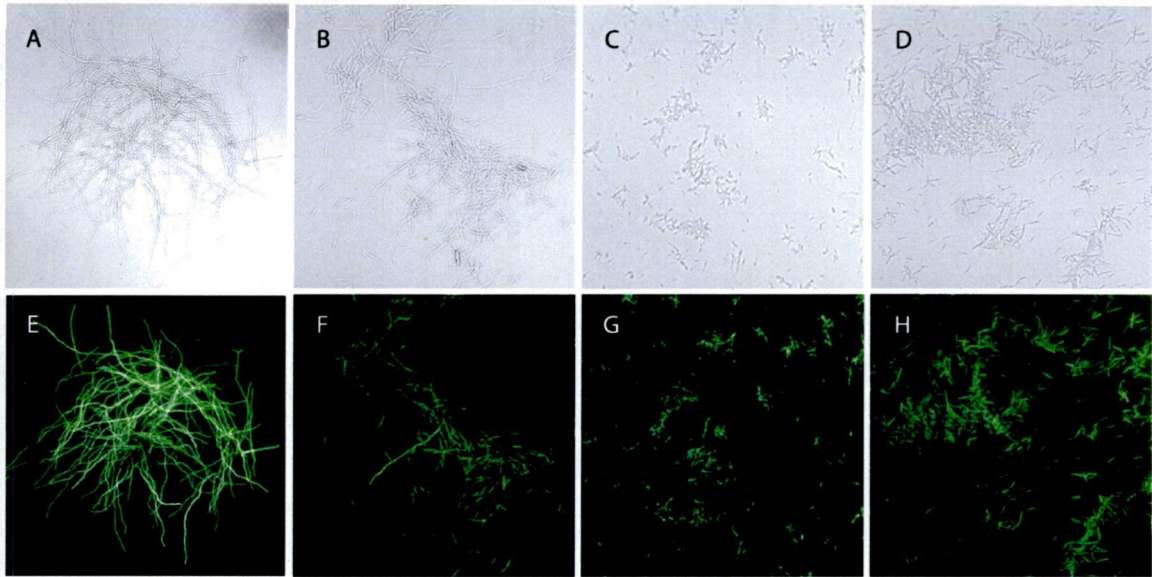


Figure 2. Microscope observations of GFP-transformed *Pseudozyma flocculosa* Act-4 (A, E), *P. rugulosa* Hsp70-14 (B, F), *P. fusiformata* Act-1 (C, G) and *P. antarctica* Act-12 (D, H) under visible (A-D) and blue light (E-H).

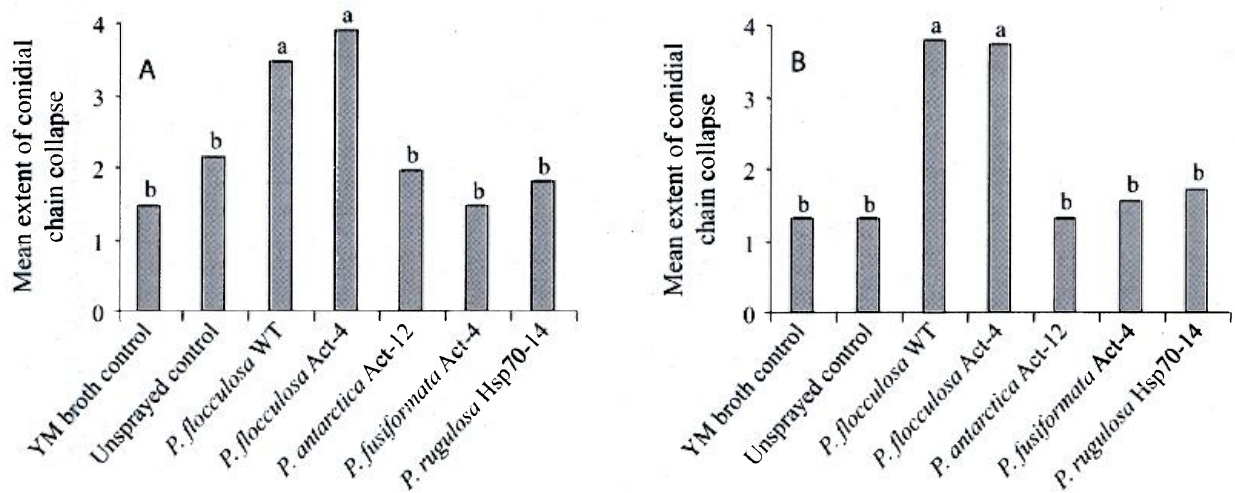


Figure 3. Evaluation of conidial chain collapse on (A) *Podosphaera xanthii*-infected cucumber leaves and (B) *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*-infected wheat leaves, 72 h after treatments with conidial suspensions of GFP-transformed *Pseudozyma* species.

Fluorescence microscopy observations. Following inundative applications of GFP-expressing transformants of four *Pseudozyma* spp. on healthy cucumber leaves, fluorescence levels were weak to absent as early as 24 h after treatment. Upon close observation, only *P. flocculosa* appeared to be visually present as scattered fluorescent spots along the base of trichomes. On the other hand, *P. flocculosa* Act-4 appeared to develop densely on powdery mildew colonies as expressed by the level of fluorescence emitted on infected leaves. This fluorescence was confined to *P. xanthii* colonies but was systematically present wherever there was a zone of infection (Fig. 4). For their part, the other three species of *Pseudozyma* sometimes displayed faint spots of fluorescence in association with powdery mildew colonies at 24 h. Neither *P. antarctica*, Act-12 nor *P. rugulosa* Hsp70-14 nor *P. fusiformata* Act-1 emitted observable fluorescence after 48 or 72 h whether they were applied on infected or healthy leaves.

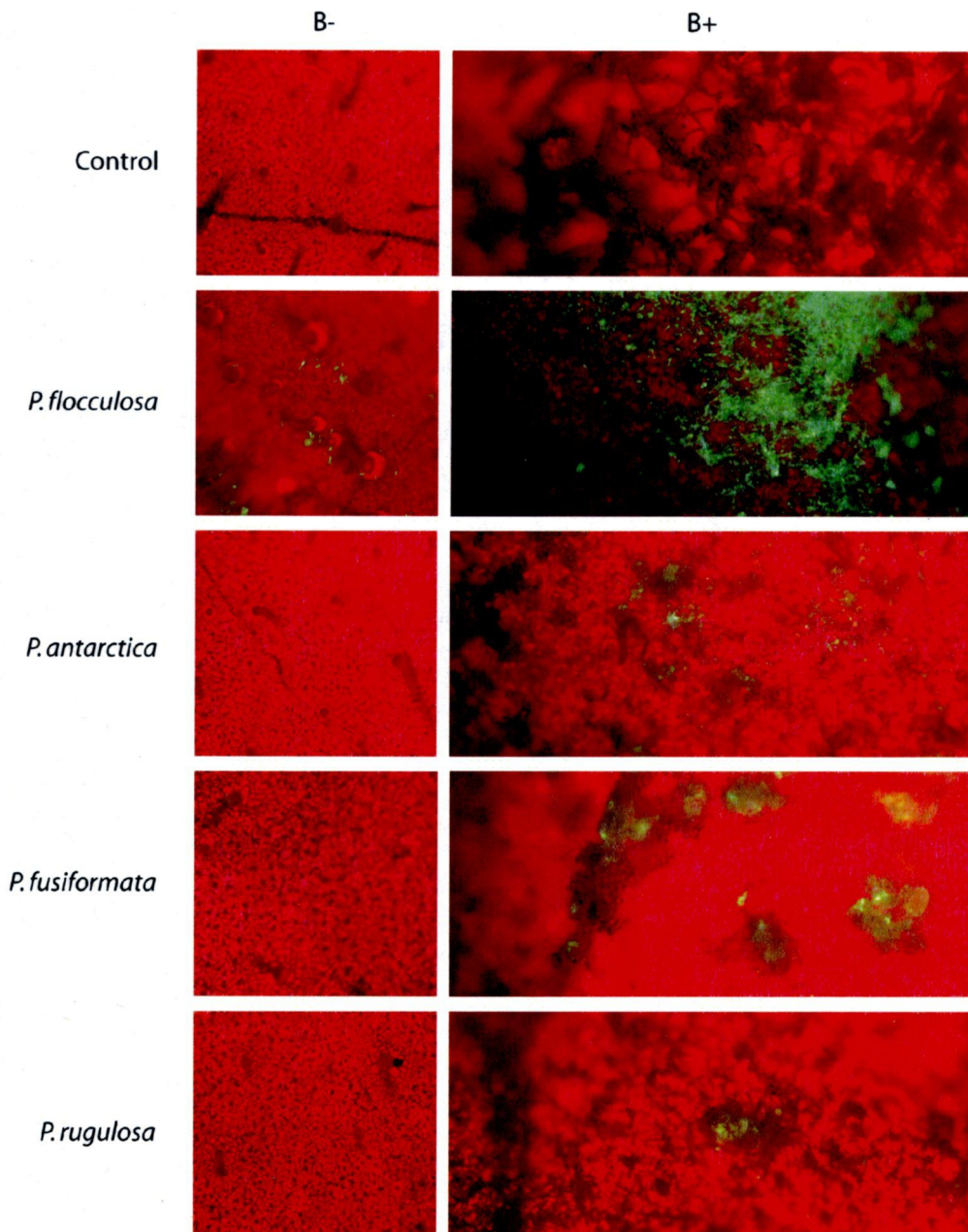


Figure 4. Microscope observations of leaf colonization by four GFP-transformed *Pseudozyma* spp. on both healthy (B-) and *Podosphaera xanthii*-infected (B+) leaf disks from *Cucumis sativus* L. cv Corona, 24 h after treatment.

Scanning electron microscopy observations. SEM observations of the interaction between powdery mildew structures and different wild-type species of *Pseudozyma* highlighted distinct development patterns among the tested species (Fig. 5). In the case of *P. flocculosa*, it was clear that the fungus developed quite profusely over *P. xanthii* structures which in turn induced a collapse and plasmolysis of the mycelium and conidia of the pathogen (Fig. 5a). For all the other species, while it was possible to record the presence of mycelium and conidia in contact with powdery mildew structures, the latter never appeared to show evidence of alteration (Fig. 5b-c).

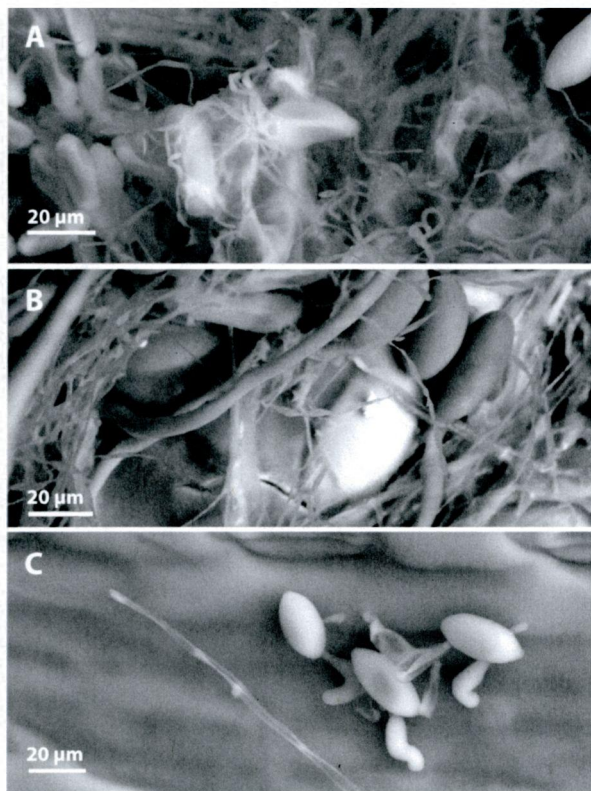


Figure 5. SEM observations of (A) *Pseudozyma flocculosa* (single arrow) developing over collapsed structures of *Podosphaera xanthii* (double arrow), (B) *Pseudozyma fusiformata* (single arrow) intertwined with unaltered structures of *P. xanthii* (double arrow) and (C) *Pseudozyma antarctica* (single arrow) in proximity of germinating conidia of *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (double arrow).

Population monitoring of *Pseudozyma* spp. Given that GFP technology could only provide a qualitative appreciation of *Pseudozyma* populations, we attempted to obtain an accurate quantification of *Pseudozyma* spp. on cucumber leaves by using qRT-PCR. Based on our results, it was quite clear that all four wild-type species of *Pseudozyma* could not maintain any appreciable populations on healthy cucumber leaves, even after inundative applications (Fig. 6a). On the other hand, in presence of the powdery mildew pathogen *P.*

xanthii, *P. flocculosa* population expanded significantly over the first 48 h to gradually level off over the next 24 h (Fig. 6 b). By contrast, all other species, including *P. fusiformata*, saw a rapid decline of their population to near extinction after 72 h, when confronted to *P. xanthii*.

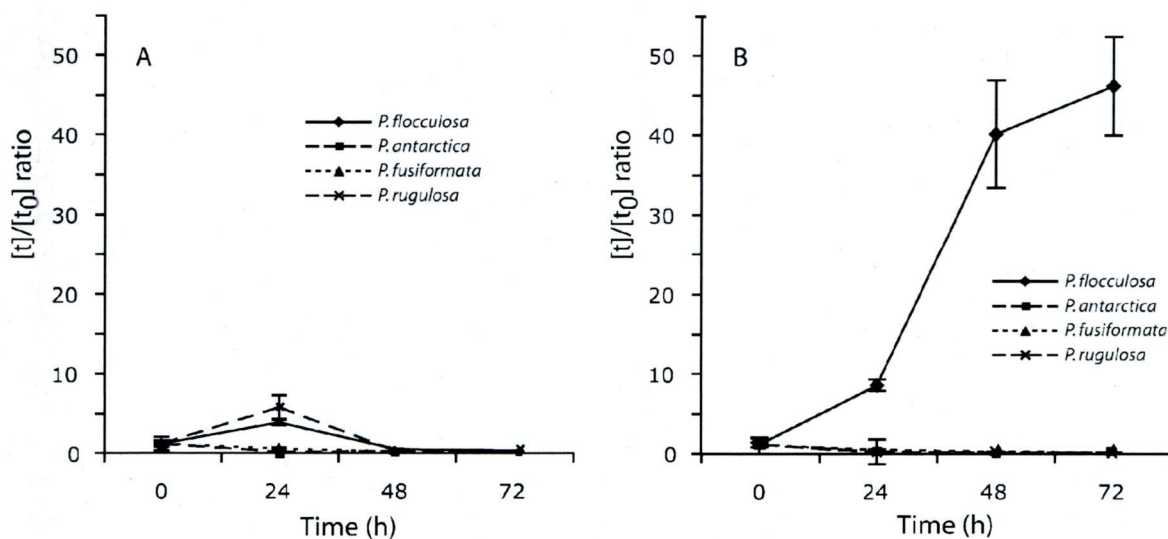


Figure 6. Quantification by qRt-PCR of population development over time of four *Pseudozyma* spp. following inundative application of conidial suspensions on A) healthy and B) *Podosphaera xanthii*-infected leaf disks from *Cucumis sativus* L. cv Corona.

Discussion

Historically, many fungi and bacteria have been screened for biocontrol activity by measuring their ability to repel the development of a fungal or bacterial plant pathogen *in vitro*. This phenomenon, commonly referred to as antibiosis, has often been used as the guiding standard to select potential BCAs (Fravel 1988; McSpadden Gardener 2007). In this study, we have highlighted the precarious reliability of this approach and the complex nature of the interaction between a BCA and a plant pathogen. In spite of their genetic relatedness, their antagonistic activity *in vitro*, and their ability to produce antifungal glycolipids, no species of the genus *Pseudozyma* other than *P. flocculosa* were able to display biocontrol activity against powdery mildew. These results stress the importance to understand the ecology of a BCA in trying to optimize its development and efficacy.

As a first approach, the GFP technology proved quite informative to analyse and compare the ecological development of several species of *Pseudozyma* under varying conditions. For all tested species, fluorescent cells were invariably concentrated on or around powdery mildew colonies. This was further evidenced by SEM observations showing hyphae of *Pseudozyma* spp. in close association with hyphae and spores of the pathogen. Previous studies have clearly shown that the hyphal network of filamentous fungi will expand as influenced by availability and distribution of nutrients and favourable conditions (Klein & Paschke 2004). While the genus *Pseudozyma* has only been recently proposed for a relatively small group of species, very little is known about the ecological commonality, if any, of its members and close relatives. In fact, related members of this genus can display varying characteristics ranging from plant pathogen, to biocontrol agents to strict epiphytes (Traquair *et al.* 1988; Paulitz & Bélanger 2001; Martinez-Espinoza *et al.* 2002). For its part, *P. flocculosa* will thrive in high humidity areas on the leaf surface (Jarvis *et al.* 1989). Thus, a highly humid microclimate within powdery mildew colonies might explain, partially, the development of *Pseudozyma* spp. in association with areas of high fungal density. Furthermore, conditions of high humidity must prevail in the environment for efficient biocontrol activity by *P. flocculosa*, as its development was severely reduced in presence of powdery mildew colonies when the ambient relative humidity went below 70% (Jarvis *et al.* 1989; Hajlaoui & Bélanger 1993).

Based on our results, *P. antarctica* and *P. rugulosa*, reported to produce MELs, did not display any antifungal activity on infected leaves, which supports the results obtained by Avis *et al.* (2001). On the other hand, *P. rugulosa* had been described previously as a potential biocontrol agent of powdery mildews in at least two studies (Traquair *et al.* 1988; Hajlaoui & Bélanger 1991). It may be noteworthy, however, to point out that these studies were carried out before Begerow *et al.* (2000) clarified the taxonomy of *Pseudozyma*. Our results suggest that MELs are either not released by *P. antarctica* and *P. rugulosa* in the environment of powdery mildew colonies or simply not active against powdery mildews, as it is the case against other fungi such as *Candida albicans* and *Aspergillus niger* (Kitamoto

et al. 1993). Consequently, MELs do not appear to be a primary determinant of the antagonistic activity of *Pseudozyma* spp. against powdery mildews.

All conditions being equal, it was evident that growth of *P. flocculosa* was superior to that of other *Pseudozyma* spp. on infected leaves, as evidenced by *in situ* fluorescent and SEM observations and qRT-PCR data. This specific development pattern along with the unique antagonistic properties of *P. flocculosa* could be ultimately explained by the extracellular release of flocculosin. The antifungal properties of this glycolipid are already well established (Mimee *et al.* 2005). When in contact with powdery mildew colonies, the release of flocculosin by *P. flocculosa* would result in plasmolysis of the pathogen cells and the accompanying release of nutrients. Nutrient availability and adequate relative humidity in proximity to damaged powdery mildew colonies would favour the rapid growth of *P. flocculosa* as revealed by our qRT-PCR data. Upon saturation of the ecological niche, the expansion of *P. flocculosa* would stagnate as resources become sparse, a phenomenon reflected by the levelling off of the population after 48 h in our experiment.

If indeed flocculosin dictates the biocontrol activity of *P. flocculosa*, it is then surprising that *P. fusiformata*, a well-known ustilagic acid producer, would not share similar biocontrol properties, given that ustilagic acid is reported to possess a similar antifungal spectrum and mode of action as flocculosin (Golubev *et al.* 2001; Kulakovskaya *et al.* 2003). Incidentally, Teichmann *et al.* (2007) were able to alter the development of *Botrytis cinerea* on tomato leaves treated with *U. maydis* spores, whereas a *U. maydis* mutant $\Delta cyp1$ defective in ustilagic acid production failed to affect the pathogen. This study would seem to associate ustilagic acid release with antagonistic activity. In our case, the lack of biocontrol activity by *P. fusiformata* could therefore be attributable to either an inability to release ustilagic acid or an inability to grow in the tested environment

In conclusion, this study has highlighted some important factors defining the ecology and biocontrol potential of several representative species of the newly described genus *Pseudozyma*, *P. flocculosa*, *P. antarctica*, *P. fusiformata* and *P. rugulosa*, using GFP technology, SEM and qRT-PCR. In spite of their genetic relatedness and their ability to

produce similar glycolipids, it seems that only *P. flocculosa* possesses the ability to induce collapse of powdery mildews when sharing the same environment. These results confirm the biocontrol specificity of *P. flocculosa* over other *Pseudozyma* species and suggest that its activity, if modulated by flocculosin, is highly dependent on other factors stimulating its ability to develop and grow in the presence of powdery mildew colonies.

Acknowledgments

The authors would like to thank C. Labbé for technical assistance in scanning electron microscopy, in statistics and with the figures.

This research was supported by grants from Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT), and the Canada Research Chairs Program to R. R. Bélanger.

References

- Avis TJ, Caron SJ, Boekhout T, Hamelin RC, Bélanger RR, 2001. Molecular and physiological analysis of the powdery mildew antagonist *Pseudozyma flocculosa* and related fungi. *Phytopathology* **91**: 249 - 254.
- Avis TJ, Cheng YL, Zhao YY, Bolduc S, Neveu B, Anguenot R, Labbé C, Belzile F, Bélanger RR, 2005. The potential of *Pseudozyma* yeastlike epiphytes for the production of heterologous recombinant proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology* **69**: 304 - 311.
- Banat IM, Makkar RS, Cameotra SS, 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology* **53**: 495 - 508.
- Begerow D, Bauer R, Boekhout T, 2000. Phylogenetic placements of ustilaginomycetous anamorphs as deduced from nuclear LSU rDNA sequences. *Mycological Research* **104**: 53 - 60.
- Buzzini P, Martini A, 2000. Biodiversity of killer activity in yeasts isolated from the Brazilian rain forest. *Canadian Journal of Microbiology* **46**: 607 - 611.
- Cheng YL, Bélanger RR, 2000. Protoplast preparation and regeneration from spores of the biocontrol fungus *Pseudozyma flocculosa*. *FEMS Microbiology Letters* **190**: 287 - 291.
- Cheng YL, Belzile F, Tanguay P, Bernier L, Bélanger RR, 2001. Establishment of a gene transfer system for *Pseudozyma flocculosa*, an antagonistic fungus of powdery mildew fungi. *Molecular Genetics and Genomics* **266**: 96 - 102.
- Cheng YL, McNally DJ, Labbé C, Voyer N, Belzile F, Bélanger RR, 2003. Insertional mutagenesis of a fungal biocontrol agent led to discovery of a rare cellobiose lipid with antifungal activity. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 2595 - 2602.
- Deml G, Anke T, Oberwinkler F, Giannetti BM, Steglich W, 1980. Schizonellin A and B, new glycolipids from *Schizonella melanogramma*. *Phytochemistry* **19**: 83 - 87.
- Fluharty AL, O'Brien JS, 1969. A mannose- and erythritol-containing glycolipid from *Ustilago maydis*. *Biochemistry* **8**: 2627 - 2632.
- Fravel DR, 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. *Annual Review of Phytopathology* **26**: 75-91.
- Golubev WI, Kulakovskaya TV, Golubeva EW, 2001. The yeast *Pseudozyma fusiformata* VKM Y-2821 producing an antifungal glycolipid. *Microbiology* **70**: 553 - 556.

- Hajlaoui MR, Bélanger RR, 1991. Comparative effects of temperature and humidity on the activity of three potential antagonists of rose powdery mildew. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **97**: 203 - 208.
- Hajlaoui MR, Bélanger RR, 1993. Antagonism of the yeast-like phylloplane fungus *Sporothrix flocculosa* against *Erysiphe graminis* var *tritici*. *Biocontrol Science and Technology* **3**: 427 - 434.
- Haskins RH, 1950. Biochemistry of the Ustilaginales. I. Preliminary cultural studies of *Ustilago zaeae*. *Canadian Journal of Research* **28**: 213 - 223.
- Haskins RH, Thorn JA, 1951. Biochemistry of the Ustilaginales. VII. Antibiotic activity of ustilagic acid. *Canadian Journal of Botany* **29**: 585 - 592.
- Hewald S, Josephs K, Bolker M, 2005. Genetic analysis of biosurfactant production in *Ustilago maydis*. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 3033 - 3040.
- Hewald S, Linne U, Scherer M, Marahiel MA, Kamper J, Bolker M, 2006. Identification of a gene cluster for biosynthesis of mannosylerythritol lipids in the basidiomycetous fungus *Ustilago maydis*. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 5469 - 5477.
- Jarvis WR, Shaw LA, Traquair JA, 1989. Factors affecting antagonism of cucumber powdery mildew by *Stephanoascus flocculosus* and *Stephanoascus rugulosus*. *Mycological Research* **92**: 162 - 165.
- Kitamoto D, Yanagishita H, Shinbo T, Nakane T, Kamisawa C, Nakahara T, 1993. Surface-active properties and antimicrobial activities of mannosylerythritol lipids as biosurfactants produced by *Candida antarctica*. *Journal of Biotechnology* **29**: 91 - 96.
- Klein DA, Paschke MW, 2004. Filamentous fungi: the indeterminate lifestyle and microbial ecology. *Microbial Ecology* **47**: 224 - 235.
- Kulakovskaya TV, Kulakovskaya EV, Golubev WI, 2003. ATP leakage from yeast cells treated by extracellular glycolipids of *Pseudozyma fusiformata*. *FEMS Yeast Research* **3**: 401 - 404.
- Kulakovskaya TV, Shashkov AS, Kulakovskaya EV, Golubev WI, 2005. Ustilagic acid secretion by *Pseudozyma fusiformata* strains. *FEMS Yeast Research* **5**: 919 - 923.
- Martinez-Espinoza AD, Garcia-Pedrajas MD, Gold SE, 2002. The Ustilaginales as plant pests and model systems. *Fungal Genetics and Biology* **35**: 1 - 20.
- McSpadden Gardener BB, 2007. Diversity and ecology of biocontrol *Pseudomonas* spp. in agricultural systems. *Phytopathology* **97**: 221-226

- Mimee B, Labbé C, Pelletier R, Bélanger RR, 2005. Antifungal activity of flocculosin, a novel glycolipid isolated from *Pseudozyma flocculosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**: 1597 - 1599.
- Morita T, Konishi M, Fukuoka T, Imura T, Kitamoto HK, Kitamoto D, 2007. Characterization of the genus *Pseudozyma* by the formation of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids. *FEMS Yeast Research* **7**: 286 - 292.
- Neveu B, Labbé C, Bélanger RR, 2007a. GFP technology for the study of biocontrol agents in tritrophic interactions: a case study with *Pseudozyma flocculosa*. *Journal of Microbiological Methods* **68**: 275 - 281.
- Neveu B, Michaud M, Belzile F, Bélanger RR, 2007b. The *Pseudozyma flocculosa* actin promoter allows the strong expression of a recombinant protein in the *Pseudozyma* species. *Applied Microbiology and Biotechnology* **74**: 1300 - 1307.
- Paulitz TC, Bélanger RR, 2001. Biological control in greenhouse systems. *Annual Review of Phytopathology* **39**: 103 - 133.
- Ron EZ, Rosenberg E, 2001. Natural roles of biosurfactants. *Environmental Microbiology* **3**: 229 - 236.
- Teichmann B, Linne U, Hewald S, Marahiel MA, Bolker M, 2007. A biosynthetic gene cluster for a secreted cellobiose lipid with antifungal activity from *Ustilago maydis*. *Molecular Microbiology* **66**: 525 - 533.
- Traquair JA, Shaw LA, Jarvis WR, 1988. New species of *Stephanoascus* with *Sporothrix* anamorphs. *Canadian Journal of Botany* **66**: 926 - 933.
- Tsien RY, 1998. The green fluorescent protein. *Annual Review of Biochemistry* **67**: 509 - 544.

Chapitre 3
Discussion générale et conclusions

Dans cette étude, nous avons tenté d'évaluer le potentiel de lutte biologique et le développement de quatre espèces du genre *Pseudozyma* en présence de blanc. Il était déjà reconnu que plusieurs espèces du genre *Pseudozyma* produisaient différents glycolipides, dont certains étaient analogues à la flocculosine. Rappelons que la flocculosine est considérée comme le déterminant primaire conférant à *P. flocculosa* son activité antagoniste contre le blanc. Considérant les nombreuses mentions de l'activité antifongique in vitro de *Pseudozyma* spp. dans la littérature scientifique, il s'avérait tout à fait rationnel de déterminer le potentiel de lutte biologique et le développement de *Pseudozyma* spp. en interaction avec le blanc. Pour ce faire, nous avons combiné plusieurs techniques, soit la technologie GFP, la qRT-PCR et la microscopie à balayage, et ce afin d'obtenir une représentation exhaustive de la croissance et de l'activité antagoniste de *Pseudozyma* spp. en conditions naturelles.

La transformation génétique de *P. flocculosa*, *P. antarctica*, *P. fusiformata* et *P. rugulosa* a été un succès, leurs cellules émettant une forte fluorescence lorsqu'excitées sous lumière bleue. Cette étude est d'ailleurs la première mention de transformation génétique chez *P. fusiformata*. Seules les aspersiones de *P. flocculosa* WT et *P. flocculosa* Act-4 ont causé un affaissement significatif des conidiophores de *P. xanthii* et *B. graminis*. D'autre part, les observations en microscopie ont appuyé les résultats obtenus en qRT-PCR. Elles ont démontré une importante croissance chez *P. flocculosa* en présence de blanc, alors que les autres espèces se sont peu développées, localisées sur quelques colonies de blanc.

À la lumière de ces résultats, force est de constater que les espèces productrices de MELs, *P. antarctica* et *P. rugulosa*, n'ont démontré aucune activité antagoniste contre le blanc. Il est toutefois difficile de préciser si ces métabolites sont réellement sécrétés en présence de blanc ou s'ils sont simplement inefficaces contre cet agent pathogène. Fait surprenant, des résultats similaires ont été obtenus avec *P. fusiformata*. Cette espèce produit pourtant l'acide ustilagique, une molécule dont la structure chimique est pratiquement identique à celle de la flocculosine et dont l'activité antifongique in vitro est bien établie (Golubev et coll., 2001). Plusieurs questions peuvent ainsi être soulevées : L'acide ustilagique est-elle vraiment sécrétée par *P. fusiformata* en présence de *P. xanthii*? Si c'est le cas, pourquoi cette espèce n'est-elle pas en mesure de coloniser les structures du blanc,

comme le fait *P. flocculosa*? Nous affirmons ainsi que parmi les quatre espèces de *Pseudozyma* testées, seul *P. flocculosa* est en mesure de lutter efficacement contre le blanc du concombre et du blé. Les résultats obtenus chez *P. fusiformata* suggèrent également que l'aptitude de ces organismes à se développer dans l'environnement immédiat créé par les colonies de blanc, est une composante déterminante de leur activité antagoniste contre cet agent pathogène.

En conclusion, nos travaux ont permis d'identifier différents facteurs impliqués dans l'écologie et l'activité antagoniste chez plusieurs espèces du genre *Pseudozyma*, et ce à l'aide de la technologie GFP, la qRT-PCR et la microscopie à balayage. Malgré la proximité phylogénétique et la production de glycolipides analogues par ces espèces, seul *P. flocculosa* semble en mesure de contrôler le blanc du concombre. En plus de souligner la nécessité d'avoir recours à des tests in situ pour une juste évaluation du potentiel de lutte biologique d'un champignon, nos résultats confirment également la spécificité de l'activité antagoniste de *P. flocculosa* contre le blanc, et suggèrent que cette activité, si modulée par la flocculosine, est également dépendante de la capacité de cette espèce à se développer en présence de blanc. L'identification de gènes impliqués dans la biosynthèse de glycolipides chez *Pseudozyma* spp. représente sans contredit une avenue attrayante dans l'optique future d'une compréhension exhaustive des différents mécanismes de biosynthèse des glycolipides dans l'environnement naturel des *Pseudozyma* spp.

Bibliographie

- Atkins, S. D., Clark, I. M., Pande, S., Hirsch, P. R. et Kerry, B. R. 2005. The use of real-time PCR and species-specific primers for the identification and monitoring of *Paecilomyces lilacinus*. *FEMS Microbiology Ecology* 51 : 257 - 264.
- Avis, T. J. et Bélanger, R. R. 2001. Specificity and mode of action of the antifungal fatty acid cis-9-heptadecenoic acid produced by *Pseudozyma flocculosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 67 : 956 - 960.
- Avis, T. J., Boulanger, R. R. et Bélanger, R. R. 2000. Synthesis and biological characterization of (Z)-9-heptadecenoic and (Z)-6-methyl-9-heptadecenoic acids: fatty acids with antibiotic activity produced by *Pseudozyma flocculosa*. *Journal of Chemical Ecology* 26 : 987 - 1000.
- Avis, T. J., Caron, S. J., Boekhout, T., Hamelin, R. C. et Bélanger, R. R. 2001. Molecular and physiological analysis of the powdery mildew antagonist *Pseudozyma flocculosa* and related fungi. *Phytopathology* 91 : 249 - 254.
- Bae, Y. S. et Knudsen, G. R. 2000. Cotransformation of *Trichoderma harzianum* with beta-glucuronidase and green fluorescent protein genes provides a useful tool for monitoring fungal growth and activity in natural soils. *Applied and Environmental Microbiology* 66 : 810 - 815.
- Banat, I. M., Makkar, R. S. et Cameotra, S. S. 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology* 53 : 495 - 508.
- Bélanger, R. R. et Avis, T. J. 2002. Ecological processes and interactions occurring in leaf surface fungi. Pages 193-207. Dans : *Phyllosphere Microbiology*. Lindow, S., Hecht-Poinar, E. I. et Elliot, V. J. (éditeurs). APS Press. St-Paul.
- Benyagoub, M., Bel Rhlid, R. B. et Bélanger, R. R. 1996. Purification and characterization of new fatty acids with antibiotic activity produced by *Sporothrix flocculosa*. *Journal of Chemical Ecology* 22 : 405 - 413.
- Boekhout, T. 1995. *Pseudozyma* Bandoni Emend Boekhout, a genus for yeast-like anamorphs of Ustilaginales. *Journal of General and Applied Microbiology* 41 : 359 - 366.
- Bolwerk, A., Lagopodi, A. L., Lugtenberg, B. J. J. et Bloemberg, G. V. 2005. Visualization of interactions between a pathogenic and a beneficial *Fusarium* strain during biocontrol of tomato foot and root rot. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18 : 710 - 721.
- Burns, C., Gregory, K. E., Kirby, M., Cheung, M. K., Riquelme, M., Elliott, T. J., Challen, M. P., Bailey, A. et Foster, G. D. 2005. Efficient GFP expression in the mushrooms

- Agaricus bisporus* and *Coprinus cinereus* requires introns. *Fungal Genetics and Biology* 42 : 191 - 199.
- Buzzini, P. et Martini, A. 2000. Biodiversity of killer activity in yeasts isolated from the Brazilian rain forest. *Canadian Journal of Microbiology* 46 : 607 - 611.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. et Prasher, D. C. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene-expression. *Science* 263 : 802 - 805.
- Cheng, Y. L. et Bélanger, R. R. 2000. Protoplast preparation and regeneration from spores of the biocontrol fungus *Pseudozyma flocculosa*. *FEMS Microbiology Letters* 190 : 287 - 291.
- Cheng, Y. L., Belzile, F., Tanguay, P., Bernier, L. et Bélanger, R. R. 2001. Establishment of a gene transfer system for *Pseudozyma flocculosa*, an antagonistic fungus of powdery mildew fungi. *Molecular Genetics and Genomics* 266 : 96 - 102.
- Cheng, Y. L., McNally, D. J., Labbé, C., Voyer, N., Belzile, F. et Bélanger, R. R. 2003. Insertional mutagenesis of a fungal biocontrol agent led to discovery of a rare cellobiose lipid with antifungal activity. *Applied and Environmental Microbiology* 69 : 2595 - 2602.
- Deml, G., Anke, T., Oberwinkler, F., Giannetti, B. M. et Steglich, W. 1980. Schizonellin A and B, new glycolipids from *Schizonella melanogramma*. *Phytochemistry* 19 : 83 - 87.
- Fluharty, A. L. et O'Brien, J. S. 1969. A mannose- and erythritol-containing glycolipid from *Ustilago maydis*. *Biochemistry* 8 : 2627 - 2632.
- Fukuoka, T., Morita, T., Konishi, M., Imura, T., Sakai, H. et Kitamoto, D. 2007. Structural characterization and surface-active properties of a new glycolipid biosurfactant, mono-acylated mannosylerythritol lipid, produced from glucose by *Pseudozyma antarctica*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 76 : 801 - 810.
- Golubev, W. I., Kulakovskaya, T. V. et Golubeva, E. W. 2001. The yeast *Pseudozyma fusiformata* VKM Y-2821 producing an antifungal glycolipid. *Microbiology* 70 : 553 - 556.
- Hajlaoui, M. R. et Bélanger, R. R. 1991. Comparative effects of temperature and humidity on the activity of three potential antagonists of rose powdery mildew. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 97 : 203 - 208.
- Hajlaoui, M. R. et Bélanger, R. R. 1993. Antagonism of the yeast-like phylloplane fungus *Sporothrix flocculosa* against *Erysiphe graminis* var *tritici*. *Biocontrol Science and Technology* 3 : 427 - 434.

- Hajlaoui, M. R., Benhamou, N. et Bélanger, R. R. 1992. Cytochemical study of the antagonistic activity of *Sporothrix flocculosa* on rose powdery mildew, *Sphaerotheca pannosa* var *rosae*. *Phytopathology* 82 : 583 - 589.
- Hajlaoui, M. R., Traquair, J. A., Jarvis, W. R. et Bélanger, R. R. 1994. Antifungal activity of extracellular metabolites produced by *Sporothrix flocculosa*. *Biocontrol Science and Technology* 4 : 229 - 237.
- Haskins, R. H. 1950. Biochemistry of the Ustilaginales. I. Preliminary cultural studies of *Ustilago zaeae*. *Canadian Journal of Research Section C-Botanical Sciences* 28 : 213 - 223.
- Haskins, R. H. et Thorn, J. A. 1951. Biochemistry of the Ustilaginales. VII. Antibiotic activity of ustilagic acid. *Canadian Journal of Botany* 29 : 585 - 592.
- Hewald, S., Josephs, K. et Bolker, M. 2005. Genetic analysis of biosurfactant production in *Ustilago maydis*. *Applied and Environmental Microbiology* 71 : 3033 - 3040.
- Hewald, S., Linne, U., Scherer, M., Marahiel, M. A., Kamper, J. et Bolker, M. 2006. Identification of a gene cluster for biosynthesis of mannosylerythritol lipids in the basidiomycetous fungus *Ustilago maydis*. *Applied and Environmental Microbiology* 72 : 5469 - 5477.
- Jarvis, W. R., Shaw, L. A. et Traquair, J. A. 1989. Factors affecting antagonism of cucumber powdery mildew by *Stephanoascus flocculosus* and *Stephanoascus rugulosus*. *Mycological Research* 92 : 162 - 165.
- Jensen, B., Knudsen, I. M. B., Madsen, M. et Jensen, D. F. 2004. Biopriming of infected carrot seed with an antagonist, *Clonostachys rosea*, selected for control of seedborne *Alternaria* spp. *Phytopathology* 94 : 551 - 560.
- Jensen, D. F. et Schulz, A. 2003. Exploitation of GFP-technology with filamentous fungi. Pages 441-451. Dans : *Handbook of Fungal Biotechnology*. Arora, D. K. (rédacteurs). Marcel Dekker. New York.
- Kitamoto, D., Isoda, H. et Nakahara, T. 2002. Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants - from energy-saving materials to gene delivery carriers. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 94 : 187 - 201.
- Kitamoto, D., Yanagishita, H., Shinbo, T., Nakane, T., Kamisawa, C. et Nakahara, T. 1993. Surface-active properties and antimicrobial activities of mannosylerythritol lipids as biosurfactants produced by *Candida antarctica*. *Journal of Biotechnology* 29 : 91 - 96.
- Konishi, M., Morita, T., Fukuoka, T., Imura, T., Kakugawa, K. et Kitamoto, D. 2007. Production of different types of mannosylerythritol lipids as biosurfactants by the newly isolated yeast strains belonging to the genus *Pseudozyma*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75 : 521 - 531.

- Kulakovskaya, T. V., Kulakovskaya, E. V. et Golubev, W. I. 2003. ATP leakage from yeast cells treated by extracellular glycolipids of *Pseudozyma fusiformata*. FEMS Yeast Research 3 : 401 - 404.
- Kulakovskaya, T. V., Shashkov, A. S., Kulakovskaya, E. V. et Golubev, W. I. 2005. Ustilagic acid secretion by *Pseudozyma fusiformata* strains. FEMS Yeast Research 5 : 919 - 923.
- Le Floch, G., Tambong, J., Vallance, J., Tirilly, Y., Lévesque, A. et Rey, P. 2007. Rhizosphere persistence of three *Pythium oligandrum* strains in tomato soilless culture assessed by DNA macroarray and real-time PCR. FEMS Microbiology Ecology 61 : 317 - 326.
- Lee, S., Kim, S. H. et Breuil, C. 2002. The use of the green fluorescent protein as a biomarker for sapstain fungi. Forest Pathology 32 : 153 - 161.
- Lorang, J. M., Tuori, R. P., Martinez, J. P., Sawyer, T. L., Redman, R. S., Rollins, J. A., Wolpert, T. J., Johnson, K. B., Rodriguez, R. J., Dickman, M. B. et Ciuffetti, L. M. 2001. Green fluorescent protein is lighting up fungal biology. Applied and Environmental Microbiology 67 : 1987 - 1994.
- Lu, Z. X., Tombolini, R., Woo, S., Zeilinger, S., Lorito, M. et Jansson, J. K. 2004. *In vivo* study of *Trichoderma*-pathogen-plant interactions, using constitutive and inducible green fluorescent protein reporter systems. Applied and Environmental Microbiology 70 : 3073 - 3081.
- Lübeck, M., Knudsen, I. M. B., Jensen, B., Thrane, U., Janvier, C. et Jensen, D. F. 2002. GUS and GFP transformation of the biocontrol strain *Clonostachys rosea* IK726 and the use of these marker genes in ecological studies. Mycological Research 106 : 815 - 826.
- Marchand, G., Fortier, E., Neveu, B., Bolduc, S., Belzile, F. et Bélanger, R. R. 2007. Alternative methods for genetic transformation of *Pseudozyma antarctica*, a basidiomycetous yeast-like fungus. Journal of Microbiological Methods 70 : 519 - 527.
- Mimee, B., Labbé, C., Pelletier, R., Bélanger, R. R. 2005. Antifungal activity of flocculosin, a novel glycolipid isolated from *Pseudozyma flocculosa*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 49: 1597 - 1599.
- Morita, T., Konishi, M., Fukuoka, T., Imura, T., Kitamoto, H. K. et Kitamoto, D. 2007. Characterization of the genus *Pseudozyma* by the formation of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids. FEMS Yeast Research 7 : 286 - 292.
- Morita, T., Konishi, M., Fukuoka, T., Imura, T. et Kitamoto, D. 2006. Analysis of expressed sequence tags from the anamorphic basidiomycetous yeast, *Pseudozyma antarctica*, which produces glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids. Yeast 23 : 661 - 671.

- Neveu, B., Belzile, F. et Bélanger, R. R. 2007a. Cloning of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene from *Pseudozyma flocculosa* and functionality of its promoter in two *Pseudozyma* species. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 92 : 245 - 255.
- Neveu, B., Labbé, C. et Bélanger, R. R. 2007b. GFP technology for the study of biocontrol agents in tritrophic interactions: A case study with *Pseudozyma flocculosa*. *Journal of Microbiological Methods* 68 : 275 - 281.
- Neveu, B., Michaud, M., Belzile, F. et Bélanger, R. R. 2007c. The *Pseudozyma flocculosa* actin promoter allows the strong expression of a recombinant protein in the *Pseudozyma* species. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74 : 1300 - 1307.
- Orr, K. A. et Knudsen, G. R. 2004. Use of green fluorescent protein and image analysis to quantify proliferation of *Trichoderma harzianum* in nonsterile soil. *Phytopathology* 94 : 1383 - 1389.
- Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G. et Cormier, M. J. 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Gene* 111 : 229 - 233.
- Pujol, M., De Clercq, D., Cagnet, S., Lepoivre, P. et Jijakli, M. H. 2004. Monitoring system for the biocontrol agent *Pichia anomala* strain K using quantitative competitive PCR-ELOSA. *Plant Pathology* 53 : 103 - 109.
- Ron, E. Z. et Rosenberg, E. 2001. Natural roles of biosurfactants. *Environmental Microbiology* 3 : 229 - 236.
- Rubio, M. B., Hermosa, M. R., Keck, E. et Monte, E. 2005. Specific PCR assays for the detection and quantification of DNA from the biocontrol strain *Trichoderma harzianum* 2413 in soil. *Microbial Ecology* 49 : 25 - 33.
- Sarrocco, S., Mikkelsen, L., Vergara, M., Jensen, D. F., Lubeck, M. et Vannacci, G. 2006. Histopathological studies of sclerotia of phytopathogenic fungi parasitized by a GFP transformed *Trichoderma virens* antagonistic strain. *Mycological Research* 110 : 179 - 187.
- Shimomura, O., Johnson, F. H. et Saiga, Y. 1962. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from luminous hydromedusan, *Aequorea*. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 59 : 223 - 239.
- Skadsen, R. W. et Hohn, T. A. 2004. Use of *Fusarium graminearum* transformed with gfp to follow infection patterns in barley and *Arabidopsis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 64 : 45 - 53.
- Spear, R. N., Cullen, D. et Andrews, J. H. 1999. Fluorescent labels, confocal microscopy, and quantitative image analysis in study of fungal biology. *Methods in Enzymology* 307 : 607 - 623.

- Spellig, T., Bottin, A. et Kahmann, R. 1996. Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Molecular & General Genetics* 252 : 503 - 509.
- Teichmann, B., Linne, U., Hewald, S., Marahiel, M. A. et Bolker, M. 2007. A biosynthetic gene cluster for a secreted cellobiose lipid with antifungal activity from *Ustilago maydis*. *Molecular Microbiology* 66 : 525 - 533.
- Tsien, R. Y. 1998. The green fluorescent protein. *Annual Review of Biochemistry* 67 : 509 - 544.
- Watanabe, S., Kunakura, K., Izawa, N., Nagayama, K., Mitachi, T., Kanamori, M., Teraoka, T. et Arie, T. 2007. Mode of action of *Trichoderma asperellum* SKT-1, a biocontrol agent against *Gibberella fujikuroi*. *Journal of Pesticide Science* 32 : 222 - 228.
- Zhang, L., Liu, X. Z., Zhu, S. F. et Chen, S. Y. 2006. Detection of the nematophagous fungus *Hirsutella rhossiliensis* in soil by real-time PCR and parasitism bioassay. *Biological Control* 36 : 316 - 323.