HAL open science

Aptitude au contournement d'un gène majeur de résistance quantitative à Melampsora larici-populina : dispositif de criblage rapide, constitution de collections de souches et fréquence du phénomène

Arnaud A. Dowkiw, Pascal Frey, Virginie Diévart, Axelle Andrieux, Constance Xhaard, Vanina Guérin, Patrick Poursat, Jocelyn Tissot, Brigitte Viguier, Catherine Bastien

To cite this version:

Arnaud A. Dowkiw, Pascal Frey, Virginie Diévart, Axelle Andrieux, Constance Xhaard, et al.. Aptitude au contournement d'un gène majeur de résistance quantitative à Melampsora larici-populina : dispositif de criblage rapide, constitution de collections de souches et fréquence du phénomène. Innovations Agronomiques, 2014, 35, pp.39-47. hal-02629623

HAL Id: hal-02629623

https://hal.inrae.fr/hal-02629623

Submitted on 27 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

Innovations Agronomiques 35 (2014), 39-47

Aptitude au contournement d'un gène majeur de résistance quantitative à *Melampsora larici-populina* : dispositif de criblage rapide et fréquence du phénomène.

Dowkiw A.[1], Frey P.[3], Voisin E.[1], Dievart V.[2], Andrieux A.[3], Xhaard C.[3], Guerin V.[1], Poursat P.[2], Tissot J.[1], Viguier B.[1], Bastien C.[1]

[1] INRA, UR0588 AGPF, 45075 Orléans Cedex 2, France

[2] INRA, UE GBFOR, 45075 Orléans Cedex 2, France

[3] INRA UMR1136 IAM, 54280 Champenoux, France

Correspondance : Arnaud.Dowkiw@orleans.inra.fr

Résumé

Rien n'est actuellement connu des gènes de la rouille foliaire à *Melampsora larici-populina* qui interagissent avec les gènes de résistance de son hôte. Ce projet a permis de mettre en œuvre et d'évaluer un dispositif de criblage « rapide » visant à identifier des souches pathogènes aptes au contournement de Rus, gène de résistance modèle en cours de clonage. Ce projet a également permis de quantifier la fréquence de l'aptitude au contournement (50% en moyenne) dans des populations pathogènes potentiellement soumises à une pression de sélection par ce gène ou, au contraire, a priori non soumises à son influence. Les résultats confirment le considérable potentiel d'adaptation de l'agent pathogène et ouvrent des perspectives pour la recherche des déterminants génétiques du contournement au niveau individuel et populationnel.

Abstract: Ability of *Melampsora larici-populina* to overcome a major quantitative resistance gene: rapid screening procedure and frequency of the phenomenon

Nothing is currently known about *Melampsora larici-populina* leaf rust genes that interact with resistance genes from its host. This project helped implement and evaluate a "fast" screening device to identify pathogenic strains capable of overcoming Rus, a model resistance gene being cloned. The project also allowed quantifying the frequency of Rus-defeating strains (50% in average) in pathogen populations potentially subject to selection pressure by this gene or, conversely, *a priori* not subject to its influence. The results confirm the considerable adaptive potential of the pathogen and open perspectives in the search for genetic determinants of the ability to overcome resistance at both the individual and population levels.

Introduction

Sélectionner des peupliers résistants à Melampsora larici-populina : comprendre et anticiper avant de diffuser.

Les peupleraies cultivées représentent environ 230 000 hectares en France et assurent une production annuelle de plus de 2 millions de m^3 de bois d'œuvre (2ème essence feuillue après le chêne). Les travaux d'évaluation et d'amélioration génétique du peuplier sont assurés par les trois organismes FCBA, Cemagref et INRA, membres du Groupement d'Intérêt Scientifique "Génétique, Amélioration et Protection du Peuplier" (GIS Peuplier). Le GIS Peuplier a pour missions de concevoir et de gérer un

programme d'amélioration génétique afin de proposer à la filière des cultivars performants et aux caractéristiques stables.

La rouille foliaire du peuplier à *Melampsora larici-populina* (*Mlp*) constitue l'un des dix problèmes phytosanitaires majeurs de la forêt française et le problème principal de la populiculture. Ce champignon phytopathogène a fait preuve d'un potentiel d'adaptation considérable puisqu'il est venu à bout de toutes les résistances qualitatives (*i.e.* complètes) déployées dans les variétés hybrides issues des programmes d'amélioration européens. Ces programmes avaient tous pour point commun de valoriser les résistances qualitatives exaptées présentes dans l'espèce nord-américiane *Populus deltoides*. La situation est telle que quasiment aucune des variétés de peuplier inscrites au catalogue européen ne porte de résistance qualitative qui ne soit contournée par *Mlp*.

Résistance quantitative : une alternative durable ?

Partant du constat que l'espèce européenne *Populus nigra*, qui a co-évolué avec *Mlp*, n'est porteuse que de résistances quantitatives, les sélectionneurs ont, pour la plupart, réorienté leurs efforts vers ce type de résistance supposée plus durable. Plusieurs régions du génome (QTLs) codant pour des paramètres quantitatifs de résistance (latence, taille des urédosores …) ont été identifiées par l'INRA Orléans (Jorge *et al.,* 2005). Parmi ces régions figure un gène majeur (Rus) hérité de l'espèce *Populus trichocarpa* qui limite fortement la taille des fructifications (urédosores) du champignon sur son hôte (Dowkiw et Bastien, 2004). L'ensemble des gènes sous-jacents à ces QTLs constitue une liste de candidats pour la création de variétés à résistances complexes, et potentiellement durables, par sélection assistée par marqueurs.

Rus a été récemment localisé sur le génome du peuplier dans une zone riche en analogues de gènes de résistance de type NBS-LRR (Bresson *et al.,* 2011), ce qui en fait un gène original à mi-chemin entre résistance quantitative et résistance qualitative. Rien n'est connu des gènes de l'agent pathogène qui interagissent avec ce gène. D'une façon générale, rien n'est connu des gènes de *Mlp* qui interagissent avec les gènes de résistance du peuplier, mais les choses pourraient s'accélérer avec le séquençage récent du génome de cet agent pathogène après celui du peuplier en 2006.

Au sein d'un premier lot de 8 souches de *Mlp* confrontées à Rus dans des tests d'inoculation en laboratoire, l'INRA a pu identifier une souche de *Mlp* insensible à la présence de Rus. Des récoltes orientées en pépinière (gros urédosores sur génotypes hôtes porteurs de Rus) effectuées en marge du projet ici présenté ont permis d'en identifier d'autres (Dowkiw *et al.,* 2010). Ces résultats constituent une alerte puisqu'ils incitent à ne pas déployer ce facteur de résistance. Ils offrent également une opportunité d'étudier les déterminants génétiques, au niveau individuel et populationnel, du contournement d'une résistance non encore déployée.

Objectifs de l'étude

Cette étude répondait à deux actions ciblées par le CTPS dans le cadre de son appel à co-financement de projets de recherche 2009, à savoir « choix ou mise au point de dispositifs expérimentaux susceptibles de mettre en évidence la durabilité des résistances » et « choix, caractérisation, conservation des souches pathogènes permettant de tester des résistances durables ».

Entre autres objectifs, ce projet devait permettre de

- évaluer un dispositif de criblage rapide permettant d'identifier les souches de *Mlp* contournant Rus
- Quantifier, via un dispositif de criblage rapide, la fréquence des souches de *Mlp* insensibles à (ou « contournant », par extension de langage) Rus dans des milieux contrastés pour la fréquence de ce gène de résistance.

- Constituer des collections de souches « contournantes » et « non-contournantes » d'agressivités variables qui permettraient, à terme :
  - D'étendre la gamme d'agressivité des souches utilisées pour l'évaluation des constructions de résistance du GIS Peuplier
  - D'identifier les déterminants génétiques de l'aptitude au contournement du gène modèle Rus.

Matériel et méthodes

Populations de Melampsora larici-populina

Quatre populations de *Melampsora larici-populina* ont été récoltées dans des environnements *a priori* contrastés pour la pression de sélection exercée par le gène de résistance Rus (Figure 2).

- Pépinière INRA Orléans (ORL). Plusieurs centaines de génotypes de peuplier issus du parent *P. trichocarpa* 101-74 et porteurs de Rus y sont élevés (tests et parcs à pieds-mères) depuis plus de dix ans.
- Pépinière INRA Nancy (NCY). Quelques dizaines de géntoypes issus du parent *P. trichocarpa* 101-74 et porteurs de Rus y ont été régulièrement élevés jusqu'à aujourd'hui.
- Ripisylves à peupliers noirs sauvages de Prelles (PRL, Hautes Alpes, Durance) et Nievroz (NVZ, Ain, Rhône). Rus étant hérité de l'espèce nord-américaine *P. trichocarpa* et n'ayant *a priori* pas été déployé en populiculture, les populations de *Mlp* prélevées dans ces deux environnements n'ont pas été confrontées à ce gène de résistance.

Il est à noter que des mélèzes, hôtes alternants de *Mlp* sur lesquels le champignon effectue une reproduction sexuée obligatoire, sont présents dans les deux pépinières INRA échantillonnées.

Les populations pathogènes ORL et NCY ont été constituées par isolement d'urédies en cours d'été sur des feuilles du cultivar *P. x euramericana* (*i.e. P. deltoides* x *P.nigra*) 'Robusta' porteuses d'une dizaine d'urédies distantes. 'Robusta' est un témoin sensible des expérimentations en laboratoire et en pépinière chez lequel aucune résistance complète à *Mlp* n'a jamais été détectée. Les plants de 'Robusta' échantillonnés étaient tous localisés à proximité de dispositifs ou de parcs à pieds-mères non traités contenant des plants porteurs de Rus.

Les populations pathogènes PRL et NVZ ont été constituées par isolement d'urédies en cours d'été sur des peupliers noirs spontanés de ripisylve.

Des urédies ont été isolées au laboratoire par prélèvement à la pipette dans une goutte d'eau et inoculées sur des disques foliaires de Robusta de 1 cm de diamètre. Les disques inoculés, mis en flottaison sur de l'eau distillée face abaxiale vers le haut dans des boites à puits à une température de 20°C, sporulaient au bout de 10 jours environ. Une seconde étape de multiplication a été effectuée selon le même principe en ajoutant au disque de 'Robusta' un disque de chacun des huit génotypes de peuplier qui constituent la gamme différentielle permettant de discriminer les huit virulences définies par l'INRA Nancy (Pinon et Frey, 2005). Les disques foliaires de 'Robusta' ayant servi en première étape de multiplication ont été conservés à -20°C en vue du génotypage des souches pathogènes. Les disques sporulants issus de la seconde étape de multiplication ont été conservés à -80°C après dessiccation. A partir de ces disques sporulants, une ou deux étapes de multiplication supplémentaires en masse sur feuilles entières excisées de 'Robusta' ont été nécessaires pour obtenir la quantité suffisante à la conduite des tests. Les inocula ont été conservés à -4°C préalablement à chaque test.

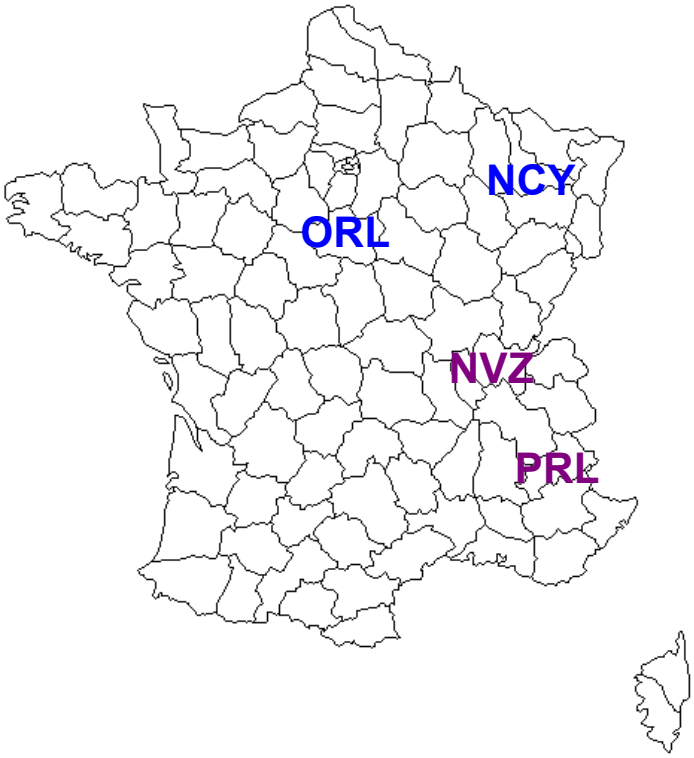

Figure 1 : Populations de *Melampsora larici-populina* étudiées. En bleu, les populations pathogènes récoltées sur le cultivar 'Robusta' en situation de présence de génotypes hôtes porteurs de Rus. En violet, les populations récoltées sur peupliers noirs spontanés de ripisylve.

Au total, plus de 600 isolats ont été récoltés et ont fait l'objet de tentatives de multiplication, 436 d'entre eux ont pu être pathotypés et passer ainsi du statut d'isolat à celui de « souche ». Trente souches de chacune des 4 populations pathogènes ont fait l'objet de multiplications en masse. Ces souches ont été choisies de manière à représenter la diversité pathotypique (pathotype = combinaison de virulences) présente dans chaque population.

Génotypage de l'agent pathogène

Nous avons tiré parti du séquençage du génome de Mlp (http://genome.jgi-psf.org/Mellp1/Mellp1.home.html) pour développer de nouveaux marqueurs microsatellites *in silico* (Xhaard *et al.,* 2009). La séquence du génome de *Mlp* a été analysée à l'aide du logiciel de recherche de motifs microsatellites Magellan. Avec des critères de sélection stringents, 654 loci (di, tri, tétra, penta et haxanucléotidiques) ont été localisés dans les 102 Mb de la séquence, parmi lesquels 58 ont été testés.

Pour chaque souche utilisée en test, l'ADN fongique a été extrait à l'aide d'un kit commercial à partir des disques du cultivar 'Robusta' ayant servi à la première phase de multiplication des isolats et conservés à -80°C. Pour une souche donnée, jusqu'à 23 loci microsatellites ont été utilisés, combinés en quatre réactions de PCR correspondant aux quatre fluorochromes. La séparation des fragments a été effectuée par électrophorèse capillaire sur séquenceur. L'assignation des allèles à chaque locus a été réalisée avec le logiciel GeneMapper 3.7.

La recherche de clonalité a faite à l'aide du logiciel Genclone 2.0 (Arnaud-Haond et Belkhir, 2007).

Matériel peuplier de criblage rapide

Sur la base de données préalable à cette étude, huit génotypes de peuplier plein-frères F_1 issus du croisement *Populus deltoides* 73028-62 (rus/rus) x *P. trichocarpa* 101-74 (Rus/rus) ont été sélectionnés pour leurs phénotypes « Rus » *vs* « rus » très contrastés (*i.e.* 4 génotypes supposés Rus/rus et 4 génotypes supposé rus/rus)) et leurs latences comparables et courtes afin d'éviter que ce facteur n'ait pu limiter l'expression de la taille des urédosores (Figure 2).

Ce matériel a été élevé en serre à partir de boutures.

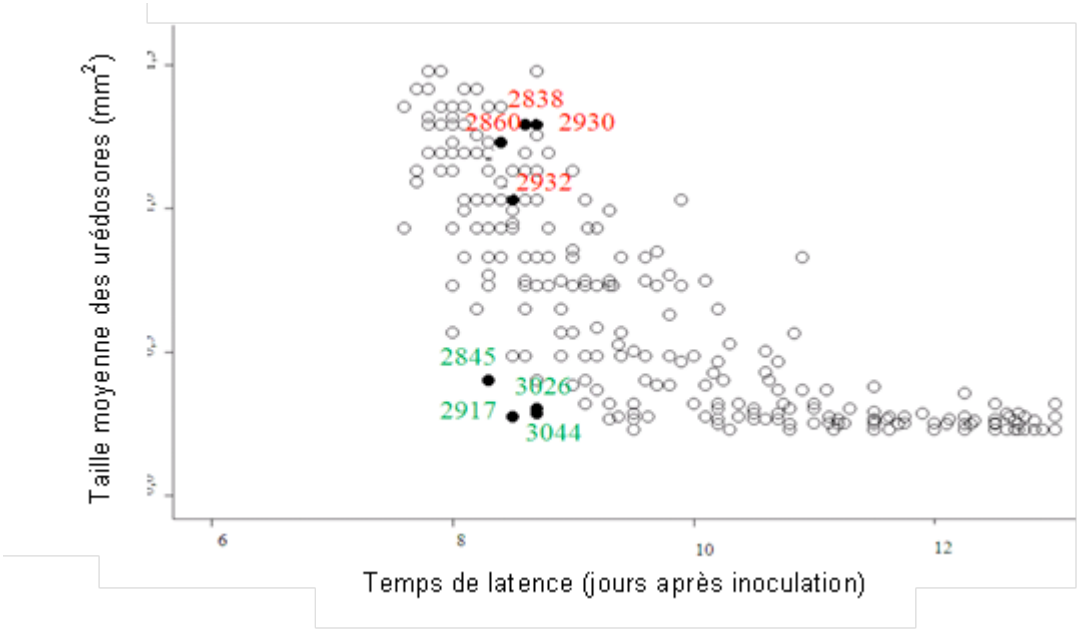

Figure 2 : Positionnement relatif des 8 génotypes hôtes de peuplier utilisés pour l'identification « rapide » des souches contournant R_{US} au sein de leur famille de pleins frères (F_1 *P. deltoides* 73028-62 x *P. trichocarpa* 101-74). Les individus Rus et rus apparaissent respectivement en vert et rouge. Données issues d'un test en laboratoire préalable à cette étude avec la souche 98AG69 de *Melampsora larici-populina*.

Matériel peuplier de validation

Les huit génotypes servant au criblage rapide ainsi que 19 autres aléatoirement choisis dans le même pédigrée F_1 (10 Rus et 9 rus, 1 rus ayant été perdu en cours d'élevage), soit un total de 27 génotypes, ont été utilisés dans un but de validation du dispositif de criblage rapide.

L'ensemble de ce matériel a été élevé en serre à partir de boutures.

Test de criblage « rapide »

Chaque souche, préalablement mise en suspension dans de l'eau distillée additionnée d'une goutte d'agent dispersant (Tween 20), a été inoculée à l'aide d'un pulvérisateur manuel sur des disques foliaires de 3 cm de diamètre de chacun des 8 génotypes hôtes de criblage rapide mis en flottaison sur de l'eau distillée.

Le premier test (population NCY), conduit avec une concentration d'un mg de spores pour 5 mL de suspension a du être renouvelé à pression plus faible (0.3mg / 5mL), une trop forte concentration d'urédosores ayant semblé empêcher une expression optimale de leur taille. Les autres tests de criblage rapide ont tous été conduits à 1mg / 5mL sans que ce phénomène – non élucidé et aux causes certainement multiples – ne se renouvelle.

Selon la disponibilité en inocula, le test de criblage rapide d'une population pathogène pouvait contenir des souches témoins issues d'une ou plusieurs autres populations déjà caractérisées. Dans ce cas, 4 souches témoins étaient utilisées pour représenter une population donnée : 2 souches contournantes et 2 souches non contournantes.

Chaque dispositif était composé de 3 blocs complets non randomisés. Pour chaque souche, les 8 génotypes hôtes de criblage étaient disposés de sorte que les génotypes Rus et rus étaient disposés sur deux colonnes distinctes (gauche et droite, respectivement). Pour chaque dispositif, plus de 720 disques foliaires ont donc été inoculés et mesurés. Pour une souche donnée, une suspension de 5mL a

été préparée pour chaque bloc. Chaque bloc a été inoculé par un expérimentateur différent à raison d'une pulvérisation par disque foliaire. Le matériel inoculé a ensuite été placé en chambre climatisée à 17°C sous une photopériode de 16 heures.

Du 6ème au 14ème jour après inoculation, un relevé biquotidien a été conduit afin de noter, pour chaque disque, la date d'apparition du premier urédosore sporulant. Ce caractère est appelé « latence ».

Quatorze jours après inoculation, trois notateurs ont observé l'ensemble des trois blocs de façon indépendante. Le criblage « rapide » consistait à regarder si la taille moyenne des urédosores différait significativement entre les colonnes droite et gauche pour chaque souche (Figure 3).

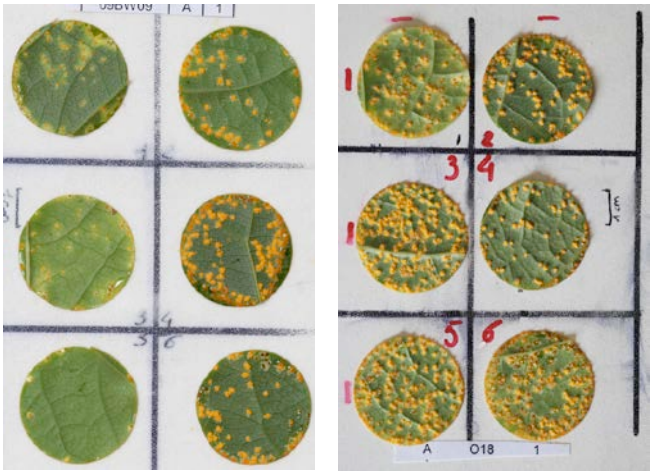

Figure 3 – Criblage rapide : souche « non contournante » à gauche et « contournante » à droite.

Dans un dispositif donné, chaque souche a ensuite été classée dans l'une des trois catégories suivantes ;

- « contournante » si dans au moins deux blocs aucun des trois observateurs n'a relevé de différence de taille moyenne d'urédosores entre les colonnes droite et gauche.
- « non contournante » si dans au moins deux blocs l'ensemble des trois observateurs a relevé une différence de taille moyenne d'urédosores entre les colonnes droite et gauche.
- « indéterminée » dans l'ensemble des autres cas.

Vérification par analyse d'image

Après criblage visuel, les disques foliaires sporulants ont été photographiés. Les tailles réelles des urédosores ont été mesurées par analyse d'image à l'aide du logiciel ImageJ. Seuls les urédosores en bon état et isolables ont été retenus pour cette mesure. Les disques sur lesquels moins de 3 urédosores analysables étaient présents ont été éliminés de l'analyse. Les souches vis-à-vis desquelles moins de 3 génotypes Rus et/ou moins de 3 génotypes rus portaient moins de 3 urédosores analysables dans au moins deux blocs ont été exclues de l'analyse.

La significativité de la différence de taille des urédosores entre les génotypes Rus et rus a été testée pour chaque souche et chaque dispositif par ANOVA selon le modèle suivant :

$$Y_{ijk} = \mu + C_i + G_{j(i)} + \varepsilon_{ijk}$$

où Y est la taille moyenne des urédosores d'un génotype hôte ajusté à d'éventuels effets bloc, C est la catégorie du génotype hôte génotype (Rus ou rus), G est le génotype hôte hiérarchisé à C.

A l'issue de cette analyse, chaque souche a été classée dans l'une des trois catégories suivantes :

- « contournante » si la p-value associée à l'effet C était supérieure ou égale à 5%

- « non contournante » si la p-value associée à l'effet C était inférieure à 1%
- « indéterminée » si la p-value associée à l'effet C était inférieure comprise entre 1 et 5%

Validation sur un set de génotypes hôtes élargi

La validation d'un certain nombre de souches sur un set de 27 génotypes hôtes reposait sur un protocole identique à celui du criblage rapide si ce n'est que seule l'analyse d'image a été mise en œuvre.

Résultats et discussion

Génotypage de l'agent pathogène : recherche de clonalité

Sur la base des données marqueurs disponibles à ce jour, aucune trace de clonalité n'a été détectée au sein des souches caractérisées vis-à-vis de Rus. Ceci confirme la forte dichotomie récemment illustrée par Xhaard *et al.* (2011) entre des populations de *Melampsora* pour l'essentiel très diversifiées *vs.* des populations beaucoup plus rares qui, pour des raisons qui restent à élucider, sont très fortement clonales. Cette étude incluait d'ailleurs une population récoltée et pathotypée dans le cadre du projet ici présenté mais non caractérisée vis-à-vis de Rus pour cette même raison de forte clonalité (population de ripisylve à peupliers noirs de Saint Ay, 20 km d'Orléans).

Evaluation de la méthode de criblage rapide

Sur les 124 comparaisons effectuées entre criblage « rapide » visuel et analyse d'images, seule une incohérence significative a été trouvée (Tableau 1).

		Criblage rapide		
		Contournantes	**Non contournantes**	**Indéterminées**
Analyse d'images	**Contournantes**	58	0	2
	Non contournantes	1	39	10
	Indéterminées	6	5	3

Tableau 1 – Comparaison de deux méthodes de caractérisation des souches de *Melampsora larici-populina* vis-à-vis du gène Rus : criblage rapide *vs.* analyse d'images. Les effectifs reportés ici sont supérieurs au nombre de total de souches caractérisées dans le projet, certaines souches étant communes à plusieurs tests.

Evaluation de la pertinence du set de 8 hôtes utilisé en criblage rapide

Le dispositif de validation sur 27 génotypes hôtes a porté sur 21 souches. Il a permis de confirmer la présence de souches contournantes y compris dans les populations où elles sont rares. Vérifier l'absence de « faux positifs » nous semblait particulièrement important pour ces populations à faibles fréquences de souches contournantes car il s'agit là d'un résultat majeur indiquant l'existence d'une pré-adaptation chez l'agent pathogène à un gène de résistance qu'il ne connait *a priori* pas.

Mise à part une souche pour laquelle le niveau d'infection était trop faible, ce dispositif a permis

- d'attribuer un statut à 6 souches qui n'avaient pas pu être analysées pour cause de faible niveau d'infection dans les tests précédents.
- d'attribuer un statut à 4 souches préalablement classées comme indéterminées.
- de confirmer le statut de 9 souches, confirmant au passage la présence de souches contournantes dans toutes les populations étudiées.

Seule une souche a vu son statut infirmé par ce test. Il s'agit de la souche déjà identifiée dans le Tableau 1 comme incohérente entre criblage rapide et analyse d'image. Il est intéressant de noter que le test de validation est cohérent avec le test visuel de criblage rapide.

Fréquence des souches contournantes

En regroupant les données de l'ensemble des dispositifs, un total de 52 souches contournantes a été identifié. Le ratio d'ensemble contournantes / non contournantes s'élève à 50%. De fortes disparités ont été trouvées entre populations.

Résultats annexes

Parmi les résultats annexes, il est intéressant de noter qu'une souche issue de la population PRL n'a pas été en mesure d'infecter le matériel végétal étudié malgré plusieurs tentatives et une bonne faculté germinative. Ce matériel avait pourtant été sélectionné en fonction de nos connaissances en début projet comme n'étant porteur d'aucune résistance complète héritée de l'espèce *P. deltoides*. Cette souche révèle donc une complexité cachée de l'hôte et de l'agent pathogène, à savoir respectivement :

- une résistance qualitative inefficace vis-à-vis de 99 % des souches de *Mlp* actuellement présentes dans nos paysages
- une virulence non encore décrite, présente chez 99 % des souches de *Mlp* présentes dans nos paysages, et qui permet de contourner un gène de résistance qualitative issue d'une espèce exotique.

Conclusions et perspectives

Ce projet a permis de démontrer la pertinence d'un dispositif de criblage rapide, visuel, pour l'identification de souches capables de contourner Rus. Ce gène de résistance n'est bien évidemment qu'un gène de résistance parmi d'autres, faisant apparaitre cette étude comme restrictive. Il s'agit cependant d'un gène modèle en cours de clonage. Les collections de souches de *Mlp* contournantes et non-contournantes constituées dans le cadre de ce projet permettent désormais d'envisager la recherche des déterminants génétiques de l'aptitude au contournement de Rus. Une approche de bulked-segregant analysis sera mise en œuvre très prochainement.

La démonstration que l'aptitude au contournement de ce gène, qui ressemble à bien des égards à un gène de résistance qualitative, pré-existe dans des populations de l'agent pathogène qui n'y ont jamais été confrontées confirme le considérable potentiel d'adaptation de *Mlp*. Elle ouvre également de nouveaux champs d'investigation quant au rôle du compartiment hôte spontané.

Références bibliographiques

Arnaud-Haond S., Belkhir K., 2007. GENCLONE : a computer program to analyse genotypic data, test for clonality and describe spatial clonal organization. Molecular Ecology Notes 7(1), 15-17.

Bresson A., Jorge V., Dowkiw A., Guerin V., Bourgait I., Tuskan G. a., Schmutz J., Chalhoub B., Bastien C., Faivre-Rampant P., 2011. Qualitative and quantitative resistances to leaf rust finely mapped within two nucleotide-binding site leucine-rich repeat (NBS-LRR)-rich genomic regions of chromosome 19 in poplar. The New Phytologist 192, 151-163.

Dowkiw A., Bastien C., 2004. Characterization of Two Major Genetic Factors Controlling Quantitative Resistance to *Melampsora larici-populina* Leaf Rust in Hybrid Poplars: Strain Specificity, Field Expression, Combined Effects, and Relationship with a Defeated Qualitative Resistance Ge. Phytopathology 94, 1358-1367.

Dowkiw A., Voisin E., Bastien C., 2010. Potential of Eurasian poplar rust to overcome a major quantitative resistance factor. Plant Pathology 59, 523-534.

Jorge V., Dowkiw A., Faivre-Rampant P., Bastien C., 2005. Genetic architecture of qualitative and quantitative *Melampsora larici-populina* leaf rust resistance in hybrid poplar: genetic mapping and QTL detection. New Phytologist 167(1), 113-127.

Pinon J., Frey P., 2005. Interactions between poplar clones and *Melampsora* populations and their implications for breeding for durable resistance. Rust diseases of willow and poplar. M. H. Pei and A. R. McCracken. Cambridge, CABI Publishing: 139-154.

Xhaard C., Andrieux A., Halkett F., Frey P., 2009. Characterization of 41 microsatellite loci developed from the genome sequence of the poplar rust fungus, *Melampsora larici-populina*. Conservation Genetics Resources 1, 21-25.

Xhaard C., Fabre B., Andrieux A., Gladieux P., Barrès B., Frey P., Halkett F., 2011. The genetic structure of the plant pathogenic fungus *Melampsora larici-populina* on its wild host is extensively impacted by host domestication. Molecular Ecology 20, 2739-2755.