



HAL
open science

**A new real time PCR method for "complex" SNP
quantification in gDNA pools: a case study on causal
mutations of fenhexamid resistance in the
phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea***

Alexis A. Billard, Valerie Laval, Pierre P. Leroux, H. Lachaise, R. Beffa,
Danièle D. Debieu, . Bayer Cropscience France

► **To cite this version:**

Alexis A. Billard, Valerie Laval, Pierre P. Leroux, H. Lachaise, R. Beffa, et al.. A new real time PCR method for "complex" SNP quantification in gDNA pools: a case study on causal mutations of fenhexamid resistance in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. 8. Rencontres de Phytopathologie - Mycologie de la Société Française de Phytopathologie (SFP), Jan 2010, Aussois, France. hal-02754100

HAL Id: hal-02754100

<https://hal.inrae.fr/hal-02754100>

Submitted on 3 Jun 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.

Geographical gradient for teliosore production of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* isolates in relation to their phylogenetic position

S. Ali, M. Leconte, L. Gerard, J. Enjalbert, C. De Vallavieille-Pope

UMR 1290 BIOGER-CPP, INRA-AgroParisTech, BP 01, 78 850 Thiverval-Grignon, France

Puccinia striiformis f. sp. *tritici* (PST) is a basidiomycete, considered to reproduce asexually through dicaryotic uredospores on wheat. At the end of cropping season, teliosores are differentiated to produce the teliospores, which in turns can germinate to form haploid basidiospores after meiosis. In Uredinales, basidiospores infect an alternate host, not described so far for PST. Accordingly, genetic studies had shown a clonal PST population structure in Europe, Australia and USA. However, our team has recently shown the genetic signature of recombination in Chinese populations along with the presence of genetically diverse populations in Middle-East and Pakistan, suggesting an overall gradient of diversity from Western Europe to Eastern Asia (Bahri *et al.*, 2009; Mboup *et al.*, 2009). A higher teliosore production for recombinant (Chinese) isolates than clonal (French) isolates was equally observed. Here we attempted to assess the difference for teliosore production in populations belonging to different geographical origins, and exhibiting different levels of genetic diversity. A set of 56 isolates from six geographical origins were genotyped with 16 SSR markers, which amplified 17 loci. Genetic analysis of SSR data assigned them to 5 genetic groups corresponding to their geographical origin with some off-type and hybrid isolates. An overall variability for teliosore production was observed in accordance with their phylogenetic position and geographical origin. Isolates from China, Nepal and Pakistan had high teliosore production, while the clonal populations of France and Mediterranean region had very low teliosore production. This geographic gradient in teliosore production corresponded to the gradient of genetic diversity mentioned above, suggesting a clear relationship of teliosore production aptitude with genetic diversity. This could help in orienting the efforts to search for its alternate host and centre of diversity. The overall relation between teliosore production, phylogenetic position and geographical origin, as detected by F_{st} and Q_{st} analysis, suggests that the selection pressure on teliosore production could be stronger than those influencing neutral markers.

(1) Bahri *et al.* (2009) *Molecular Ecology*, 18, 4165-4179.

(2) Mboup *et al.* (2009) *Fungal Genetics and Biology*, 46, 299-307.

Keywords: wheat yellow rust, genetic structure, microsatellites, sexual reproduction trait

A new Real Time PCR method for « complex » SNP quantification in gDNA pools: a case study on causal mutations of fenhexamid resistance in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*.

A. Billard (1,3), V. Laval (2), P. Leroux (1), H. Lachaise (3), R. Beffa (3), D. Debieu (1)

(1) INRA Versailles BIOGER CPP Fungicides

(2) INRA Versailles BIOGER CPP ReSyst

(3) Bayer CropScience Biochemistry Department (Lyon)

In France, since 2000, the Sterol Biosynthesis Inhibitor (SBI) fungicide of class III, fenhexamid, is usually used, on vineyards against *Botrytis cinerea*, causal agent of grey mould. This compound inhibits the 3-ketoreductase activity encoded by the gene *erg27* involved in C4 demethylation from the ergosterol biosynthesis pathway (Debieu *et al.*, 2001). During the five last years, two kinds of *B. cinerea* isolates resistant to fenhexamid are commonly detected in french vineyards, called HydR3⁺ and HydR3⁻ (Hydroxyanilide Resistance). *Erg27* sequencing analysis of the most resistant (EC50>10) and the most frequent ones (HydR3⁺) showed a « complex » SNP, where the amino acid phenylalanine (codon TTC) at the position 412 was substituted by Serine (TCC), valine (GTC) or isoleucine (ATC) (Fillinger *et al.*, 2008). To follow the evolution of fenhexamid resistant populations, crop pathogen monitorings are systematically carried out to prevent the risk of dramatic resistance situations. Real time PCR methods have been established for fine SNP quantification such as ARMS PCR or MAMA PCR, but they exhibit poor precision on biallelic SNP (>1%). A new real time PCR method called « Double Strand Analysing Real Time PCR » (DSA RT-PCR) mixing specific MGB Taqman® probes and allele specific primers has been developed to allow fine quantification of this « complex » SNP from a gDNA pool. This method shows a 10 folds decrease of aspecific amplification compared to classical real time PCR. With this new method of quantification a quadriallelic SNP in a DNA pool is possible with a precision lower than 1%.

Keywords: SNP, fenhexamid, real time -PCR, *Botrytis cinerea*

Caractérisation phénotypique d'isolats de *Phytophthora infestans* originaires de la région nord-ouest de l'Algérie

F. Zohra Rekad (1), Y. Guenaoui (1), D. Andrivon (2), R. Corbière (2)

(1) Université Addelhamid Ibn Badis, Faculté des Sciences et Sciences de l'Ingénieur, Site I, Route de Belahcel, BP 300, Mostaganem, Algérie

(2) INRA, UMR 1099 BiO3P INRA - Agrocampus Ouest - Université de Rennes I, BP 35327, 35653 Le Rheu Cedex, France

La pomme de terre et la tomate représentent les principales cultures maraîchères en Algérie, mais le mildiou, dû à l'Oomycète hétérothallique, *Phytophthora infestans*, provoque de graves dégâts sur ces cultures. Pour élaborer des stratégies de lutte contre cette maladie, la connaissance des populations algériennes de *P. infestans* est indispensable. Dans cette étude, neuf isolats, collectés en 2007 et 2008 sur pommes de terre et tomates, dans la région du nord-ouest algérien, ont été analysés pour: (1) leur type sexuel, (2) leur résistance au métalaxyl, fongicide largement employé en Algérie, (3) leur croissance mycélienne sur milieu de culture à cinq températures (11, 15, 19, 23 et 27°C) et (4) leur pouvoir pathogène. Des différences importantes sont apparues selon le type sexuel des isolats et leur plante-hôte. Les six isolats prélevés de pomme de terre en 2008 sont de type sexuel A2, résistants au métalaxyl et contournent les 11 gènes de résistance spécifique testés. Ces résultats concordent avec ceux obtenus avec dix autres isolats algériens (Beninal *et al.*, 2009). En revanche, l'isolat prélevé en 2007 est différent : A1, résistance intermédiaire au métalaxyl et profil de virulence assez simple. Les isolats de tomates sont également particuliers : A1, sensibles au métalaxyl et avec un spectre de virulence assez complexe. La croissance mycélienne de ces isolats a été comparée à celle d'isolats français, aux cinq températures. Après sept jours de culture, la croissance la plus élevée est obtenue à 19°C, pour tous les isolats, mais les A1 de pomme de terre poussent plus vite que les A2, quel que soit le pays d'origine. L'agressivité des isolats a été évaluée en mesurant la taille des lésions et leur sporulation sur folioles détachées de quatre variétés : Bintje, sensible au mildiou, mais non cultivée en Algérie ; Spunta et Désirée largement cultivées dans ce pays depuis de nombreuses années et Atlas, récemment introduite. Les isolats sont les plus agressifs sur Bintje, quels que soient leur type sexuel et leur origine géographique, et les moins agressifs sur Atlas et Désirée. En particulier, la sporulation des isolats est la plus faible sur Désirée ; la résistance partielle de cette variété ne semble donc pas érodée en Algérie. Cependant, le classement des isolats est différent selon les variétés et les composantes. La caractérisation des populations algériennes doit maintenant être élargie à un plus grand nombre d'échantillons et par génotypage.

(1) Beninal L., Corbière R., Kedad A., Andrivon D., Bouznad Z., 2009. A2 mating type, metalaxyl resistance and complex virulence profiles : common features in some *Phytophthora infestans* isolates from Algeria. Proceedings of the eleventh Euroblight Workshop, 28-31 October 2008, Hamar, Norway, 237-241. <http://www.euroblight.net/Workshop/2008Hamar/Proceedings/2008Hamar.pdf>

Mots-clés : mildiou, *Solanum tuberosum*, *Lycopersicon esculentum*, type sexuel, virulence, agressivité, températures de croissance, métalaxyl

Détection et quantification par q-PCR des biotypes de l'oïdium de la vigne et de la résistance aux fongicides en France

M.-F. Corio-Costet, M.-C. Dufour

INRA, UMR Santé végétale, ISVV, 71 avenue Edouard Bourleaux, BP81, 33883, Villenave d'Ornon, France

Des outils de détection et de quantification rapides ont été développés pour *Erysiphe necator* (l'oïdium de la vigne) pour évaluer la distribution des deux groupes génétiques A et B dans le vignoble français, ainsi que le niveau de résistance aux fongicides IDMs (Inhibiteur de la C14-sterol déméthylase) et QoIs (Quinone outside inhibitor, inhibiteur de la respiration mitochondriale). Sur la base de la détection de différents SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) positionnés respectivement en position G37V et Y136F du gène Cyp51 de la C14-éburicol déméthylase et en position G143A du gène mitochondrial du cytochrome b, différents marqueurs de PCR quantitative ont été développés et testés dans le vignoble français. Cinquante populations d'oïdium de la vigne collectées en 2008 et provenant de différentes régions ont permis de décrire un nouvel état de la variabilité et de la résistance de l'oïdium de la vigne en France.

Mots-clés : Oïdium de la vigne, fongicide QoI, IDM, résistance, groupe génétique A et B, Detection, Q-PCR

Resistance de *Plasmopara viticola* aux fongicides QoIs: variabilité et compétitivité

M.-F. Corio-Costet (1), M.-C. Dufour (1), J. Cigna (1), P. Abadie (1,2), W. J.. Chen (1,3)

(1) INRA, UMR Santé végétale, 71 avenue Edouard Bourleaux, BP81, 33883, Villenave d'Ornon, France
(2) INRA, UMR 1202 BIOGeCo, Laboratoire de génétique des arbres forestiers, 69 route d'Arcachon, 33612, Cestas, France; 3 : Institute of Oceanography, National Taiwan University, No.1 Sec. 4 Roosevelt Rd., Taipei 10617, Taiwan

Depuis son introduction en Europe, *Plasmopara viticola* (mildiou de la vigne) développe régulièrement des résistances aux produits phytosanitaires, y compris à des molécules récentes telles que les inhibiteurs de la respiration mitochondriale de type QoI (Quinone outside Inhibitor). L'analyse du gène codant pour l'enzyme cible (cytochrome b) révèle la présence d'une mutation majeure en position G143A, impliquée dans l'acquisition de cette résistance. L'étude de la variabilité de cette zone du génome mitochondrial démontre l'existence d'au moins deux phénomènes d'apparition de la résistance indépendants chez le mildiou de la vigne en Europe. À partir de 1015 isolats de mildiou collectés dans le vignoble français en 2003 et 2004, nous montrons la prévalence de 4 haplotypes majeurs que nous avons appelés IS, IR, IIS et IIR. L'haplotype I est le plus fréquent (77,44%). La distribution des allèles de résistance en début de saison représente 23,25% en France. L'évaluation de différents paramètres impliqués dans le développement de l'agent pathogène durant son cycle de reproduction asexuée et la mise au point d'un indice de fitness (IA) ont permis d'estimer le coût de la résistance. Des tests de compétitivité réalisés entre une souche sensible et deux résistantes aux QoIs complètent cette étude qui montre que les souches résistantes possèdent un aussi bon potentiel de survie que les souches sensibles durant la phase asexuée en conditions de laboratoire, lequel dépend essentiellement de leur fitness.

(1) Chen WJ., Delmotte F., Richard-Cervera S., Douence L., Greif C., Corio-Costet MF., 2007 - At least two origins of fungicide resistance in grapevine downy mildew populations. *Applied Environ. Microbiol.* 73: 5162-6172.

(2) Corio-Costet M-F., Delmotte F., Martinez F., Giresse X., Raynal M., Richart-Cervera S., Douence L., Panon ML., Chen WJ., 2006 - Resistance aux QoIs du mildiou de la vigne (*Plasmopara viticola*) : origine et diversité. 8th Int. Conf on Pest and Diseases, AFPP, Tours, 5-6 décembre, France).pp 612-620 CD-Rom.

(3) Corio-Costet M-F., Martinez F., Delmotte F., Douence L., Richart-Cervera S., Chen WJ., 2008 - Resistance of *Plasmopara viticola* to QoIs fungicides : Origin and Diversity. In: *Modern fungicides and antifungal compounds V.* Dehne H.W., Deising H.B., Gisi U., Kuck K.H., Russell P.E., and Lyr H (eds). DPG, Braunschweig, Germany, 107-112

(4) Corio-Costet MF., Dufour MC., Cigna J., Abadie P., Martinez F., Chen WJ., 2008 - Resistance of *Plasmopara viticola* to QoI fungicides : origin, diversity and fitness. *J Plant Pathol*, 90, 31.6, p S2.136

(5) Corio-Costet MF., Dufour MC., Cigna J., Abadie P., Chen WJ., 2009 - Diversity and fitness of *Plasmopara viticola* isolates resistant to QoI fungicides. Special issue downy mildew, Ed A Lebeda. Soumis à *Eur J Plant Pathol*.

Mots-clés : Mildiou de la vigne, résistance fongicide, variabilité mitochondriale, QoIs, fitness

L'origine multiple de l'introduction en France du *Cryphonectria parasitica*, l'agent du chancre du châtaignier

C. Dutech (1), C. Robin (1), O. Fabreguettes (1), X. Capdevielle (1), M. Martin (1), M. Milgroom (2)

(1) INRA, UMR 1202 BIOGECO, Domaine de Pierroton, 33662 Cestas cedex, France.

(2) Department of Plant Pathology & Plant-Microbe Biology, Cornell University, Ithaca, NY, 14853 Etats-Unis d'Amérique

Cryphonectria parasitica est un champignon phytopathogène introduit au début du 20ème siècle en Europe qui cause de nombreux dégâts aux vergers et aux forêts de châtaigniers. Originaire d'Asie, son introduction en Europe est sans doute multiple. L'origine supposée de *C. parasitica* est le sud-est asiatique (Chine – Japon), mais la première détection du champignon en Europe en 1938 en Italie fut associée à une introduction venant des Etats-Unis, où *C. parasitica* a quasiment fait disparaître le châtaignier américain de la strate dominante des forêts des Appalaches. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons analysé 509 isolats provenant de populations chinoises, japonaises, américaines et françaises à l'aide de 10 marqueurs microsatellites. Nous montrons que l'introduction en France, bien que de diversité génétique réduite par rapport à la zone d'origine, s'est cependant réalisée à partir de multiples sources asiatiques et américaines. Ces multiples fondations n'ont cependant pas conduit à de fortes recombinaisons entre les génotypes introduits. Ces résultats posent la question de l'avantage adaptatif des introductions multiples dans le succès invasif de l'espèce.

Mots-clés : Affectation, ascomycète, diversité génétique, introductions multiples, invasion biologique

Variabilité et déterminisme génétique des traits de vie impliqués dans l'évolution de l'agressivité et l'adaptation à la résistance partielle

E. Fournier, S. Mississippi, J. Milazzo, C. Tertois, V. Ravigné, D. Tharreau

INRA UMR BGPI TA A 54/K Campus International de Baillarguet 34398 Montpellier cedex 5

La recherche des traits impliqués dans la virulence et adaptatifs pour un hôte ou son parasite, l'étude des compromis entre ces traits et des bases génétiques de ces traits, sont cruciales pour la compréhension de l'évolution de la virulence. Dans les pathosystèmes cultivés, la virulence (classiquement définie comme la baisse de fitness infligée à l'hôte par son parasite) est remplacée par la notion de pouvoir pathogène défini comme la quantité de dommages infligée à l'hôte. Une partie du pouvoir pathogène dépend d'interactions spécifiques qualitatives de type gène pour gène prenant de facto en compte la variabilité des génotypes hôtes et parasites. Par contre, très peu de travaux intégrant les interactions génotype X génotype (G X G) ont porté sur l'agressivité, composante qualitative du pouvoir pathogène, qui correspond à la réponse du parasite aux résistances partielles des hôtes. Nous étudions l'adaptation du pathogène fongique modèle *Magnaporthe oryzae* aux résistances partielles du riz. Nous avons recherché des traits adaptatifs impliqués dans l'agressivité en prenant en compte les interactions G X G, étudié les corrélations entre traits, et recherché leurs bases génétiques. Nous avons d'abord testé 18 isolats de *M. oryzae* représentatifs de la diversité génétique mondiale sur une variété de riz très sensible. Le nombre de lésions par feuille, la taille des lésions, le nombre de spores par unité de surface de lésion ont été mesurés. Les résultats ont montré des différences significatives entre souches pour les 3 traits évalués. Ces données nous donnent accès à l'héritabilité des caractères mesurés. Nous avons ensuite testé 4 des 18 isolats précédents sur 4 variétés de riz de niveaux de résistance variables et mesuré les mêmes caractères. Nous avons détecté des variations significatives entre souches pour tous les facteurs mesurés, ainsi que des interactions G X G. Des essais préliminaires ont également été réalisés sur la capacité de transmission à des plantes saines. Enfin, un croisement sexué a été réalisé entre les 2 souches ayant des positions extrêmes dans les gammes de variation des traits. Deux cents descendants ont été générés, et génotypés avec 35 marqueurs microsatellites. Cette carte sera complétée par 300 marqueurs développés à partir des génomes complets des 2 parents, qui seront acquis courant 2010. Cette densité devrait permettre de cartographier finement les QTL sous-tendant les traits impliqués dans l'adaptation aux résistances partielles.

Mots-clés : adaptation, résistances partielles, pouvoir pathogène, traits de vie, *Magnaporthe oryzae*

Balance entre mécanismes évolutifs (sélection locale, flux de gènes) dans l'adaptation pour l'agressivité chez l'agent du mildiou de la pomme de terre, *Phytophthora infestans*

I. Glais, B. Marquer, C. Pasco, R. Corbière, H. Magalon, D. Andrivon

UMR 1099 BiO3P INRA/Agrocampus ouest/Université Rennes 1, BP 35327, 35653 Le Rheu, France

La gestion durable des résistances variétales suppose une compréhension de ces mécanismes adaptatifs au sein des populations d'agents pathogènes. L'objectif de cette étude est d'évaluer expérimentalement l'interaction entre la sélection locale et les flux de gènes des populations de l'oomycète *Phytophthora infestans*. Nous avons utilisé la situation particulière de l'île de Jersey, proche des côtes normandes et bretonnes, et bénéficiant d'un climat favorable au développement d'épidémie de mildiou. De plus, cette île présente la particularité d'une monoculture exclusive de la variété de pomme de terre Jersey Royal depuis plus de 100 ans, cette dernière étant restreinte à cette île. Par ailleurs, dans les zones de productions côtières voisines (Saint Malo, Paimpol, Val de Saire), la variété Europa est très largement dominante. A partir d'un échantillonnage des populations pathogènes, réalisé dans chacune de ces zones, nous avons évalué (1) les flux de gènes entre les quatre zones de production et (2) l'adaptation des populations locales aux variétés dominantes. Pour cela, les isolats collectés ont été caractérisés phénotypiquement, (typage sexuel, profil de virulence sur une gamme de variétés présentant des gènes R). L'agressivité a également été évaluée pour différentes composantes (taille des lésions, productions de spores) sur trois variétés de pomme de terre (Bintje : témoin sensible, Jersey Royal cultivé uniquement à Jersey et Europa : variété dominante dans les trois zones de production bretonnes et normandes). Ces isolats ont été également caractérisés génotypiquement à l'aide de 9 marqueurs micosatellites. Les premiers résultats montrent que, dans nos conditions de test, les souches provenant de Jersey ne sont pas les plus pathogènes sur la variété Jersey Royal. Elles ne paraissent donc pas adaptées à cette variété, malgré une pression variétale de plus d'un siècle. Ceci est confirmé par l'analyse des données moléculaires : les populations pathogènes de Jersey, St Malo et Val de Saire ne sont aucunement différenciées entre elles, présentant un patron de métapopulation. Seule la population de Paimpol montre une différenciation génétique significative avec les trois autres populations (F_{st} moyen= 0.057***). Ceci peut s'expliquer par des conditions locales (vent, climat et/ou techniques culturales). Nos résultats suggèrent que les échanges entre populations sont suffisants pour balancer la sélection locale à faible échelle géographique.

Mots-clés : *Phytophthora infestans*, adaptation locale, flux de genes

Caractérisation de la variabilité génétique de populations mondiales de *Botrytis cinerea*.

L. Gout (1), A. Ducasse (2), A.-S. Walker (2), A. Gautier (2), J. Amselem (2), C. Neema (1)

(1) AgroParisTech, UMR BIOGER-CPP

(2) INRA, UMR BIOGER-CPP, Thiverval-Grignon, France

Le développement de marqueurs SNP (Single Nucleotide Polymorphism) connaît un essor croissant depuis quelques années pour de nombreuses espèces étudiées en biologie, et ce depuis l'accès aux séquences complètes de génomes. Ces marqueurs, lorsqu'ils sont développés à l'échelle du génome entier, sont des outils puissants pour l'étude des recombinaisons, des réarrangements génomiques, et des liens de parenté génétique entre individus et entre populations. En santé des plantes, ces marqueurs peuvent être utilisés pour le suivi épidémiologique des populations pathogènes, essentiel pour mieux comprendre leur dynamique et leur évolution face aux pressions de sélection (fongicides, plante hôte,...). *B. cinerea* est un modèle biologique intéressant pour développer ce type d'approche. En effet, le séquençage complet du génome d'une souche (T4) de *B. cinerea* a été réalisé récemment par le Centre National de Séquençage à Evry et celui d'une seconde souche (B0510), par le Broad Institute (USA) et Syngenta. L'alignement des génomes de ces deux souches a permis d'identifier plus de 56.000 SNP dont 22.315 sont localisés dans des gènes (13708 SNP synonymes et 8707 SNP non synonymes). Une sélection de 144 SNPs a été faite afin de constituer 3 panels de génotypage haut débit SNPlex (Applied Biosystems). Ces SNPs sont localisés dans les régions exoniques de gènes potentiellement neutres et de gènes de résistance à des fongicides. Ils sont répartis le long des 14 plus grands métacontigs du génome de la souche T4, ce qui couvre environ 75% du génome séquencé. Les trois panels SNP ont permis de génotyper des populations de *B. cinerea* isolées en France, Hongrie, Israël, Australie, Nouvelle-Zélande et Chili. Ces souches ont également été caractérisées à l'aide de marqueurs microsatellites et leur profil de résistance à des fongicides a été déterminé. L'objectif est de caractériser la structure génétique de ces populations prélevées à une échelle mondiale et de localiser des gènes (ou des régions génomiques) soumis à pression de sélection (résistance à différents fongicides par exemple) dans le génome par des approches de génétique d'association.

Mots-clés : structure des populations, SNP, pression de sélection, *Botrytis cinerea*

Approche multi-échelles de la dispersion et de la colonisation chez le champignon basidiomycète ectomycorhizien *Tricholoma scalpturatum*

H. Gryta, F. Carriconde, M. Gardes, P. Jargeat, B. Mouhamadou*

Laboratoire Evolution et Diversité Biologique, UMR 5174 Univ. Toulouse 3 - CNRS - ENFA, Bât. 4R3 118, route de Narbonne - 31062 TOULOUSE Cedex 9 - France

*Adresse actuelle : Laboratoire d'Ecologie Alpine - UMR 5553 - Univ. Grenoble - CNRS - 2233, rue de la Piscine - 38041 GRENOBLE Cedex 9 - France

Les capacités de dispersion et de colonisation sont des traits biologiques fondamentaux qui façonnent la distribution de la diversité dans les populations et les communautés. L'incidence de ces traits sur la structure génétique à différentes échelles spatiales (continentales à locales) est recherchée chez *Tricholoma scalpturatum*, un basidiomycète ectomycorhizien de nombreux arbres et arbustes. La structure génétique a été examinée (1) à large échelle sur 30 populations réparties en Europe et (2) à l'échelle locale par le suivi sur 3 ans de 2 sites du sud-ouest de la France. Les carpophores ont été caractérisés par séquençage de l'ITS, par PCR-RFLP de l'ITS et de l'IGS et par ISSR. A l'échelle de l'Europe, les populations sont très différenciées, indiquant des limitations dans les échanges génétiques entre sites. A l'échelle locale, les suivis de populations ont révélé une colonisation reposant surtout sur la production de spores sexuées. Des analyses d'autocorrélations spatiales ont montré un apparentement très fort des génets proches spatialement suggérant une dispersion efficace seulement sur de faibles distances et/ou des effets fondateurs marqués. Ces deux faits expliqueraient les fortes différenciations entre populations trouvées à l'échelle de l'Europe.

Mots-clés : Populations, dispersion, champignons ectomycorhiziens, multi-échelles, marqueurs moléculaires

Flux génique vs adaptation à l'hôte : les limites de la spécialisation chez *Venturia inaequalis* au sein d'un verger multispécifique.

T. Leroy (1), C. Lemaire (1), F. Dunemann (2), B. Le Cam (1)

(1) UMR PAVE 77 INRA- AgroCampus Ouest-Université d'Angers

(2) Julius Kühn Institute, Federal Research Centre for Cultivated Plants, Dresde, Allemagne

Les modèles traitant de l'évolution des pathogènes prédisent une adaptation très rapide des souches à leurs hôtes. Ainsi on peut prédire un flux de gènes restreint entre souches spécialisées. Basée sur les attendus de ces modèles, la spécialisation devrait avoir un impact majeur sur la structure génétique spatiale (SGS) (i.e. la distribution non aléatoire des génotypes dans l'espace) dans un paysage présentant une grande diversité d'hôtes. Les travaux s'intéressant à la SGS à courte distance sur des populations de pathogènes sont rares, a fortiori, dans un environnement hétérogène autorisant la spécialisation d'hôte. *Venturia inaequalis*, l'agent responsable de la tavelure du pommier est un champignon hétérothallique pour lequel la reproduction sexuée ne peut se faire qu'entre deux souches de signe sexuels opposés ayant de surcroît infecté le même hôte. La particularité de ce trait d'histoire de vie constitue a priori un facteur favorable à une adaptation rapide à l'hôte. Dans cette étude nous avons analysé la variation génétique au sein d'une population de *Venturia inaequalis* prélevée sur un verger hétérogène composé de 6 espèces de *Malus* et 2 hybrides. L'analyse de la SGS a été réalisée en génotypant 119 souches à l'aide de 80 marqueurs AFLP et 11 locus microsatellites. L'hypothèse de flux génétique neutre a été testée par la recherche d'une corrélation entre l'apparentement des individus et la distance les séparant. En effet, la disposition des arbres dans le verger, comparable à un modèle en pas japonais à deux dimensions, permet de prédire une corrélation négative entre apparentement des souches et leurs distances par paires pour un flux de gènes neutres. L'hypothèse de spécialisation permet quand à elle de prédire une différenciation génétique en fonction de l'hôte, détectable par différentes méthodes d'assignation. En premier lieu, la principale SGS correspond à un isolement par la distance, et non à la répartition spatiale des espèces hôte. La dispersion de *V. inaequalis* a été estimée à 40-50 mètres au maximum. Ces résultats empiriques, confirmés par simulations démo-génétiques de locus neutres, semblent indiquer la prépondérance des processus stochastiques dans la variation génétique de *Venturia* au sein de ce verger. Enfin, une minorité de locus analysés met en évidence une structure génétique liée à *M. sylvestris*, le pommier sauvage endémique européen et à deux types de *M. floribunda* porteur du gène de résistance majeur (*Vj*). Globalement, le signal génétique de la spécialisation des pathogènes observée s'est révélée moins répandue sur le génome qu'attendu ; étant donné l'importance de la diversité des hôtes présents, des hypothèses seront avancées pour expliquer ce résultat.

Mots-clés : isolement par la distance, spécialisation liée à l'hôte, structure génétique spatiale

Méthodes d'échantillonnage du mildiou de la laitue en vue d'analyser les populations françaises de cet oomycète

B. Maisonneuve, L. Jean

INRA - UR1052, Unité de Génétique et d'Amélioration des Fruits et Légumes, Domaine Saint Maurice, BP94, 84143 Montfavet cedex

Le mildiou provoqué par *Bremia lactucae* constitue un grave problème dans les cultures de laitues (*Lactuca sativa* L.) de toutes les régions tempérées. La lutte chimique n'a qu'une efficacité préventive. La lutte génétique est donc la voie privilégiée pour lutter contre cette maladie. Cependant, cette méthode de lutte a aussi montré des limites avec un contournement des résistances utilisées dans les variétés commerciales. Les connaissances sur ce mildiou sont insuffisantes pour prédire les évolutions de spectres de virulence et ainsi raisonner les cumuls de gènes de résistances à utiliser dans les variétés cultivées. Afin de mieux connaître le mode d'évolution des populations de mildiou, nous avons entrepris, en collaboration avec l'équipe de C. Neema (Bioger-CPP, Grignon) une étude des génotypes des populations françaises de *Bremia*. Pour disposer d'un bon échantillonnage de ces populations, deux techniques d'isolement de souches ont été adaptées au *Bremia*. L'échantillonnage des populations de *Bremia* par un prélèvement de feuilles contaminées chez les agriculteurs peut être biaisé par le fait que les variétés cultivées comportent un ou souvent plusieurs gènes de résistance et que l'apparition des symptômes est liée aux conditions environnementales. Il était donc important de mettre au point une méthode de piégeage de spores aériennes. Depuis 4 ans, nous déposons dans des cultures des boîtes de plantules au stade cotylédons étalés. Après 28 heures, ces boîtes sont ramenées dans une enceinte avec un climat favorable au développement du *Bremia*. L'apparition de spores sur les cotylédons est surveillée pendant 2 semaines. Chaque plantule contaminée est à l'origine d'une souche. Cette technique nous a déjà permis d'isoler du *Bremia* dans des cultures indemnes de symptômes. Pour disposer de souches pures, nous avons adapté à cet oomycète une méthode d'obtention de souches monospores. Des prélèvements de spores isolées sont effectués avec un cil sous loupe ; ces spores sont cultivées en atmosphère humide sur cotylédons détachés. Après 8 à 12 jours de cultures, une sporulation apparaît sur certains cotylédons. Les spores produites sur un cotylédon sont inoculées à des plantules afin d'obtenir une souche monospore. Cette méthode a été utilisée avec succès au laboratoire avec deux objectifs : obtenir une souche monospore à partir de 20 cotylédons inoculés par des spores isolées, identifier plusieurs souches à partir d'un isolat correspondant à un mélange de souches.

Mots-clés : mildiou, monospores, méthodes d'échantillonnage, *Bremia lactucae*

Vers un nouveau critère de Valeur Agronomique et Technologique (VAT) pour l'inscription des nouvelles variétés de luzerne au catalogue officiel

S. Perrot, C. Brochard, V. Grimault

Station Nationale d'Essais de Semences, rue Georges Morel - BP 90024, 49071 Beaucozé Cedex

L'augmentation du nombre de variétés de luzerne en inscription au catalogue officiel et les problèmes pour distinguer ces variétés entre elles nécessitent de disposer de nouveaux critères de Distinction, Homogénéité et Stabilité (DHS) et de Valeur Agronomique et Technologique (VAT) pour décrire les variétés en étude. La résistance à *Colletotrichum trifolii* a été identifiée par les experts fourragères du CTPS comme un critère permettant de progresser dans les études DHS et VAT et a été priorisée. Le laboratoire officiel de la Station Nationale d'Essais de Semence (SNES) a travaillé à la mise au point de l'évaluation de la résistance de la luzerne au *Colletotrichum trifolii*. L'antracnose causée par *Colletotrichum trifolii* affecte de nombreux pays dans le monde. En France, le parasite est décelable partout où la luzerne est cultivée (Raynal, 1989) et les pertes dues à l'antracnose peuvent atteindre 25%. Il existe différentes races de *Colletotrichum trifolii* (O'Neill et Saunders, 1994). Les races 1 et 2 ont été identifiées aux Etats-Unis. En France, seule la race 1 a été identifiée. Une nouvelle race de *Colletotrichum trifolii* nommée race 4 a été découverte en Australie et aux Etats-Unis (Ariis, 2005 ; Ariss et Rhodes, 2007 ; Mackie *et al.*, 2003). Le laboratoire de phytopathologie de la SNES, en partenariat avec des entreprises semencières et le Secteur d'Etude des Variétés du GEVES, a conduit des travaux de recherche pour mettre au point et valider un protocole d'évaluation de la résistance de la luzerne à *Colletotrichum trifolii*. Ce projet a été priorisé pour faire partie d'un des 4 axes de la politique scientifique du GEVES (Front 3) pour l'optimisation de l'évaluation de la résistance des variétés aux bioagresseurs. Les objectifs ont été l'acquisition du matériel végétal, de souches de *Colletotrichum trifolii* et l'identification, suite à l'étude de différents protocoles issus de la bibliographie et du partenariat, de plusieurs paramètres (milieux de culture, conditions environnementales, stade d'inoculation, échelle de notation) à tester sur les témoins. Suite à ces essais, un protocole a été établi en chambre climatique et testé sur un panel comprenant une partie de la collection de référence. Les perspectives de cette étude sont la validation à la SNES d'un test effectué en parallèle des tests d'inscription réalisés en codé chez les obtenteurs et sur un panel plus large de variétés de luzerne. Le critère de résistance de la luzerne à *Colletotrichum trifolii* sera proposé au CTPS en 2010 comme nouveau critère de DHS et VAT. De plus, dans le cadre du Front 3, la SNES prévoit de réaliser une étude épidémiologique des races de *Colletotrichum trifolii* présentes en France et dans le monde.

(1) ARISS J.J. (2005) Pathological factors affecting persistence in Alfafa with emphasis on diseases incited by *Fusarium* and *Colletotrichum* species. Dissertation of the Ohio State University, pp 42-62.

(2) ARISS J.J. and RHODES L.H. (2007) A new race of *Colletotrichum trifolii* identified on Alfafa in Ohio. Plant disease, 91: page 1362.

(3) MACKIE J.M., MUSUIAL J.M., O'NEILL N.R. and IRWIN J.A.G. (2003) Pathogenic specialisation within *Colletotrichum trifolii* in Australia, and Lucerne cultivar reactions to all known Australian pathotypes. Australian journal of Agricultural Research, 54:829-836.

(4) O'NEILL N.R. and SAUNDERS J.A. (1994) Compatible and incompatible responses in Alfafa cotyledons to races 1 and 2 of *Colletotrichum trifolii*. Phytopathology, 84:283-287.

(5) RAYNAL G. (1989) Ennemis et maladies des prairies. In : Anthracnose de la Luzerne (*Colletotrichum trifolii* Bain & Essary), INRA éditions, pp 100-102.

Mots-clés : Critère VAT, Luzerne, *Colletotrichum trifolii*, Résistance

Caractérisation de l'interaction *Vitis/Plasmopara* et évaluation des risques de contournement de la résistance de la vigne au mildiou

M. Rouxel (1), P. Mestre (2), F. Delmotte (1)

(1) UMR 1065 Santé végétale, Institut National de la Recherche Agronomique Bordeaux, Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, 71, Av Edouard Bourlaux, 33883 Villenave d'Ornon, France

(2) UMR 1131 Santé de la Vigne et Qualité du Vin, Institut National de la Recherche Agronomique / Université de Strasbourg, 28, rue de Herrlisheim, BP 507, 68021 Colmar, France

Plasmopara viticola, agent causal du mildiou de la vigne, est un parasite obligatoire originaire d'Amérique du Nord qui affecte les espèces du genre *Vitis*. En Europe, la stratégie actuelle de lutte contre cette maladie est basée sur l'utilisation de fongicides. Une alternative à ces traitements repose sur l'utilisation de variétés de vigne résistantes au mildiou. Si les cépages de la vigne (*Vitis vinifera sativa*) sont tous sensibles à *P. viticola*, des espèces apparentées du genre *Vitis* présentent des résistances partielles ou totales. Dans ce cadre, l'INRA de Colmar est en charge d'un programme d'amélioration de la vigne pour la résistance au mildiou basée sur l'exploitation de ces sources de résistances. En parallèle, une analyse de la diversité des populations de *P. viticola* et de leur capacité d'adaptation face aux gènes de résistances de la vigne doit être rapidement initiée afin d'anticiper les risques de contournement de ces gènes de résistance. L'objectif du projet de thèse est d'évaluer les risques de contournement des gènes de résistance au mildiou de la vigne par la caractérisation de l'interaction génétique entre *P. viticola* et les *Vitis* spp. Le projet présente deux volets: (i) évaluer la spécialisation de *P. viticola* sur les espèces du genre *Vitis* spp., (ii) analyser l'interaction *P. viticola/Vitis* afin de décrire les interactions gène pour gène dans ce pathosystème. Le premier volet permettra de décrire la structure génétique des populations de *P. viticola* sur les différentes espèces de *Vitis* en Amérique du Nord, le bassin d'origine du pathogène ; de quantifier les flux de gènes entre les populations de *P. viticola* collectés dans deux régions nord-américaines sur différentes plantes hôtes ; et de caractériser la spécificité de l'interaction de *P. viticola* avec les *Vitis* spp. par le biais d'expériences d'inoculations croisées. Grâce au développement récent d'une dizaine de marqueurs nucléaires, nous avons démarré l'étude de la diversité génétique de populations de *P. viticola* collectées en 2009 dans le Michigan sur 4 espèces de *Vitis* différentes. Le second volet visera à rechercher des isolats de *P. viticola* capables de contourner les gènes de résistance connus, d'évaluer le coût de fitness engendré par ce contournement, et d'identifier les régions génomiques impliquées dans le contournement.

Mots-clés : Oomycetes, Flux de gènes, Structure génétique, Spécialisation, Contournement

Structure des populations de *Bremia lactucae*, l'agent du mildiou de la laitue, en France

R. Valade (1), B. Maisonneuve (2), C. Neema (1)

(1) AgroParisTech, UMR BIOGER-CPP, Thiverval Grignon, 78850, France

(2) INRA, GAFL Domaine St Maurice, 84143 Montfavet cedex, France

L'oomycète *Bremia lactucae* (Regel) est le principal pathogène de la laitue, *Lactuca sativa*. Cette espèce, constituée des divers cultigrupes commerciaux (beurre, batavia, feuille de chêne...), est un légume feuille consommé frais; ainsi l'utilisation de fongicides est très limitée. Par conséquent, les sélectionneurs ont utilisé la lutte génétique pour limiter les attaques de *B. lactucae* et en particulier, des résistances totales spécifiques de certaines virulences. Sous cette pression de sélection, les populations de *Bremia* ont montré une rapide adaptation aux résistances hôtes qui se sont avérées peu durables. A l'heure actuelle, les connaissances sur *B. lactucae* sont insuffisantes pour prédire les évolutions des virulences, raisonner les résistances à cumuler dans les génotypes ou proposer une gestion spatio-temporelle des variétés selon leurs résistances au *Bremia*. Ainsi, une étude de la diversité génétique des populations de cet organisme diploïde, biotrophe, capable de réaliser une reproduction à la fois sexuée et asexuée, a été initiée afin de déterminer l'influence des pressions de sélection des gènes de résistance de la plante hôte et de la recombinaison sexuée sur la structure des populations. L'impact du type de culture (biologique ou conventionnelle; abri ou plein champ) sur la diversité génétique et les relations (migration, recombinaison) entre les populations isolées sur l'espèce sauvage *L. serriola* et l'espèce cultivée seront également abordés. Dans cette optique, des marqueurs neutres SSR (Simple Sequence Repeat) ont été mis au point. L'analyse des isolats génotypés montre une variabilité génétique neutre intra-population (à l'échelle de l'exploitation) et inter-population (à l'échelle de la France) très faible, évoquant une reproduction majoritairement asexuée. Par ailleurs, deux génotypes isolés sur l'adventice *L. serriola* sont retrouvés sur des plantes cultivées suggérant la présence d'un réservoir dans le compartiment sauvage. Ces résultats sont discutés dans le cadre de la gestion des résistances variétales chez la laitue.

Mots-clés : Diversité génétique, *Bremia lactucae*, microsatellites, résistance