



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



Collegium des Sciences et Technologies  
Ecole Doctorale Ressources Procédés Produits Environnement  
RP2E

## Thèse

Présentée pour l'obtention du titre de  
Docteur de l'Université de Lorraine  
En Biologie Végétale et Forestière

par

**Jaime Cristián AGUAYO SILVA**

Etude des conditions de l'émergence de *Phytophthora alni* sur  
l'aulne glutineux

Soutenance publique prévue pour le 9 novembre 2012

### Membres du jury

M. Ivan SACHE	Chargé de Recherche, INRA Grignon, France	Rapporteur
Mme Cécile ROBIN	Chargée de Recherche, INRA Bordeaux, France	Rapporteur
M. Simone PROSPERO	Chercheur, WSL. Birmensdorf, Suisse	Examineur
M. Eric GELHAYE	Professeur, Université de Lorraine, France	Examineur
M. Didier ANDRIVON	Directeur de Recherche, INRA Rennes, France	Examineur
M. Benoit MARCAIS	Directeur de Recherche, INRA Nancy, France	Directeur de thèse

### Membre invité

M. Pascal FREY	Chargé de Recherche, INRA Nancy, France	Co-directeur
----------------	---	--------------

## ***Remerciements***

Tout d'abord je voudrais remercier chaleureusement Benoit Marçais, mon directeur de thèse, qui m'a encadré et soutenu depuis mon Master. Merci pour ta grande disponibilité, pour tes précieux conseils et surtout pour la confiance que tu m'as accordée.

Mes plus sincères remerciements vont aussi à mon co-directeur de thèse, Pascal Frey. Je te suis très reconnaissant de m'avoir orienté et conseillé lors de mon travail.

J'adresse mes remerciements à l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté d'examiner et juger mon travail de thèse : Cécile Robin, Ivan Sache, Simone Prospero, Eric Gelhaye et Didier Andrivon.

Je voudrais remercier les collègues d'autres laboratoires qui ont contribué à ce travail dans la collecte d'échantillons et la lecture des articles : Zoltán Nagy, József Bakonyi, Gerry Adams et Everett Hansen. Je souhaite également remercier Cécile Révelli pour sa contribution et sa disponibilité lors des expériences de cytométrie.

Un grand merci à Claude Husson. Ta collaboration sans faille lors des expériences et le travail de terrain ont été fondamentales pour le déroulement de ma thèse. Au-delà de nos relations professionnelles, j'ai beaucoup apprécié ton amitié et ton soutien inconditionnel.

Je tiens à remercier Fabien Halkett pour ses conseils en génétique de populations. Tes commentaires ont constitué une aide très précieuse pour enrichir mon travail.

Je n'oublie pas les autres membres du laboratoire d'Ecologie des Champignons Pathogènes Forestiers : merci Olivier, Axelle, Bénédicte, Stéphane, Thomas, Marie-Claude et Constance pour votre sympathie et vos qualités humaines.

Une pensée particulière pour Nicole Thirion, qui m'a toujours aidé dans toutes les démarches administratives. Merci pour ta grande disponibilité et ta sympathie.

Je souhaite remercier à Josef Janoušek et Leslie Becker pour leur participation à l'élaboration de ma thèse lors de leurs études de Master.

Un grand merci à mes amis pour leur présence à mes côtés : Vincent, Alice, Stéphane, Aurore, Benjamin, Sébastien, Sara, Emeline, Michaël, Antoine, Pierre-Joseph, Bruno et Manu. J'espère que je n'ai oublié personne.

Adeline et Fabrice, merci pour votre amitié et votre soutien dans tous les moments, qu'ils soient bons ou mauvais.

Après avoir passé 4 ans à parler et écrire en français, le moment est enfin venu pour moi de revenir à ma langue maternelle... Je pense qu'au moins pour ça je n'aurai pas besoin de corrections !

Quisiera agradecer a mi familia que me ha apoyado durante todo este tiempo que he estado lejos de Chile. Quisiera dedicar algunas líneas especialmente a mi hermana Lily por haberme acompañado cariñosamente desde la distancia.

Muchas gracias a Eduardo Vial Ruiz-Tagle y Catalina Bau, quienes me brindaron la oportunidad de realizar mis estudios de doctorado. También quisiera agradecer a Aida Baldini y Angelo Sartori por su apoyo incondicional. No quisiera olvidar a Viviana : gracias por tu amistad y tus palabras de ánimo en todo momento.

Finalement mes dernières pensées vont à Marie : merci pour ton soutien et ta patience.

## Table des matières

<b>I.</b>	<b>La problématique des maladies émergentes .....</b>	<b>2</b>
A.	<i>Principales causes de l'émergence de nouvelles maladies .....</i>	3
B.	<i>Evolution de la relation hôte-pathogène.....</i>	5
C.	<i>Quelles approches utiliser pour l'étude des émergences ? .....</i>	8
<b>II.</b>	<b>Le dépérissement de l'aulne glutineux dû à <i>Phytophthora alni</i>.....</b>	<b>10</b>
A.	<i>L'aulne glutineux : une espèce d'importance écologique .....</i>	11
B.	<i>Le dépérissement dû à <i>Phytophthora alni</i> : une épidémie d'apparition récente.....</i>	12
C.	<i>Distribution de la maladie.....</i>	14
D.	<i>Symptomatologie.....</i>	14
E.	<i>Biologie de <i>Phytophthora alni</i> .....</i>	16
F.	<i>Techniques d'isolement et d'identification de <i>Phytophthora alni</i>.....</i>	19
G.	<i>Facteurs de risque de la maladie .....</i>	21
H.	<i>Mesures de lutte et de gestion de la maladie.....</i>	22
<b>III.</b>	<b>Objectifs du travail de thèse.....</b>	<b>24</b>
<b>IV.</b>	<b>Présentation des aspects méthodologiques et des principaux résultats de la thèse .....</b>	<b>24</b>
A.	<i>Génétique des populations de l'agent pathogène.....</i>	24
B.	<i>Caractérisation génétique des populations américaines et européennes de <i>Phytophthora alni</i> subsp. <i>uniformis</i> .....</i>	26
C.	<i>Caractérisation génétique des populations européennes de <i>Phytophthora alni</i> subsp. <i>alni</i> .....</i>	27
D.	<i>Étude des facteurs climatiques favorisant le dépérissement de l'aulne glutineux.....</i>	29
<b>V.</b>	<b>Discussion générale .....</b>	<b>33</b>
A.	<i>Nouveau statut des espèces parentales.....</i>	33
B.	<i>Nouvelles connaissances sur les événements d'hybridation.....</i>	35
C.	<i>Nouvelles connaissances sur la biologie de <i>Paa</i>.....</i>	36
D.	<i>Nouvelles hypothèses sur l'émergence.....</i>	37
E.	<i>Evolution de l'épidémie.....</i>	38
<b>VI.</b>	<b>Références.....</b>	<b>40</b>
	<b>Etude I. Détermination de la ploïdie des trois espèces du complexe <i>Phytophthora alni</i>.....</b>	<b>54</b>
	<b>Etude II. Strong genetic differentiation between North American and European populations of <i>Phytophthora alni</i> subsp. <i>uniformis</i>.....</b>	<b>65</b>
	<b>Etude III. Genetic diversity and origins of European populations of the allopolyploid hybrid <i>Phytophthora alni</i> subsp. <i>alni</i>.....</b>	<b>97</b>
	<b>Etude IV. Modeling climate impact on <i>Phytophthora alni</i> induced decline.....</b>	<b>146</b>

## ***INTRODUCTION GENERALE***

## **I. La problématique des maladies émergentes**

Tout comme les humains ou les animaux, les plantes doivent faire face à l'apparition de nouvelles maladies. Ces émergences de maladies sont actuellement l'une des principales menaces pour la santé publique, l'agriculture durable, l'alimentation et la conservation des écosystèmes (Anderson *et al.* 2004; Sache 2010). Cette problématique n'est pas récente (Fisher *et al.* 2012) : l'apparition de nouvelles maladies chez les plantes a été un axe de recherche très important depuis que la pathologie végétale a été établie comme discipline scientifique (Sache 2010). Néanmoins, le contexte actuel est plus propice que jamais à l'apparition de nouvelles maladies : les changements associés à la mondialisation, en particulier l'augmentation des échanges économiques intercontinentaux et la modification du climat, ont des conséquences importantes sur l'évolution d'agents pathogènes et la dispersion des agents infectieux (Anderson *et al.* 2004; Desprez-Loustau *et al.* 2007). L'émergence d'une maladie peut être définie comme un phénomène nouveau, l'extension de l'aire d'un agent pathogène connu et le soudain développement épidémique d'une maladie (Barnouin 2010). L'agent pathogène responsable peut être un organisme pathogène déjà connu mais autrefois bénin, ou une espèce nouvelle. L'identification des causes de ces émergences peut s'avérer complexe et constitue une question scientifique majeure. La compréhension de la dynamique des maladies émergentes et de leur capacité à évoluer requiert l'étude du problème dans sa dimension globale et doit prendre en compte la complexité des interactions entre trois principaux déterminants : les caractéristiques de l'agent pathogène, la sensibilité de l'hôte et l'environnement. En effet, une maladie résulte de l'adéquation entre un agent pathogène, son hôte et son milieu. Anderson *et al.* (2004) identifient trois grandes causes expliquant l'émergence des nouvelles maladies :

- i. l'introduction, naturelle ou accidentelle, d'un parasite dans une zone géographique où il était absent ;
- ii. le changement climatique, provoquant une modification du milieu qui peut engendrer des conditions favorables au développement de l'agent pathogène ;
- iii. l'évolution de la gestion humaine des ressources naturelles liée aux changements de pratiques en agriculture et en sylviculture.

Ces causes sont très influencées par la mondialisation, le développement économique et les avancées technologiques. Ces facteurs peuvent avoir des conséquences aggravées sur l'évolution des populations parasitaires lorsqu'ils modifient l'interaction hôte-pathogène (Harvell *et al.* 2002). On peut observer des accroissements du pouvoir pathogène grâce à l'apparition de nouveaux génotypes que ce soit par recombinaisons génétiques, mutations ou par de nouvelles introductions (Harvell *et al.* 2002; Pariaud *et al.* 2009). Une autre possibilité est l'apparition de nouvelles espèces par hybridation (Brasier 2000; Frey 2009). Une augmentation de la sensibilité des hôtes liée à l'utilisation de variétés améliorées ou à une mal-adaptation de ces variétés à de nouvelles conditions du milieu est également possible (Harvell *et al.* 2002).

#### ***A. Principales causes de l'émergence de nouvelles maladies***

L'introduction de parasites est considérée comme la principale cause de l'émergence de nouvelles maladies végétales (Anderson *et al.* 2004). En effet, les épidémies les plus spectaculaires sont souvent la conséquence de l'introduction, naturelle ou accidentelle, d'un parasite dans une zone géographique où il était complètement absent (Sache 2010). Une introduction peut être définie comme le mouvement anthropogénique d'agents pathogènes hors de leur distribution géographique ou de leur gamme d'hôtes originaux (Anderson *et al.* 2004). Cependant, l'introduction de l'agent pathogène dans une nouvelle région n'est pas suffisante pour expliquer le développement de l'épidémie : une conjugaison de facteurs allant d'un environnement favorable à une bonne disponibilité en hôtes sensibles va déterminer la capacité des parasites à se développer (Vurro *et al.* 2010). En effet, trois composantes sont en général associées au processus d'invasion : (i) introduction d'une espèce dans une aire de répartition nouvelle ; (ii) établissement et dispersion de l'espèce dans son aire d'introduction ; (iii) développement d'une épidémie d'une ampleur impliquant un impact écologique, économique ou social (Desprez-Loustau 2010). L'introduction d'agents pathogènes ayant des conséquences dévastatrices pour les écosystèmes a été bien documentée (Anderson *et al.* 2004; Gonthier *et al.* 2004; Desprez-Loustau *et al.* 2007, 2010; Moralejo *et al.* 2009; Husson *et al.* 2011; Dutech *et al.* 2012). L'épidémie de mildiou de la pomme de terre causé par l'oomycète *Phytophthora infestans* au milieu du XIX<sup>ème</sup> siècle est une des épidémies

végétales les plus dramatiques connues dans l'histoire moderne (Goodwin *et al.* 1994; Goodwin 1997; Montarry *et al.* 2010). Cette maladie a eu des conséquences socio-économiques désastreuses en Irlande, provoquant la célèbre crise alimentaire qui a causée la mort de plus d'un million de personnes et une migration importante de la population irlandaise vers l'Amérique du Nord (Goodwin *et al.* 1994; Goodwin 1997). Des épidémies majeures ont aussi été documentées en milieu naturel, en particulier celles causées par *Phytophthora cinnamomi* et *Phytophthora ramorum*. *P. cinnamomi* est un oomycète responsable de fortes mortalités pour plusieurs espèces forestières ligneuses dans le sud de l'Australie, suite à son introduction lors de l'établissement de colonies européennes au XVII<sup>ème</sup> et XIX<sup>ème</sup> siècles (Dobrowolski *et al.* 2003). Cet agent pathogène a également été introduit en Europe durant le XIX<sup>ème</sup> siècle (Dobrowolski *et al.* 2003), où il est responsable d'une épidémie causant des dommages importants sur *Quercus* sp. et *Castanea sativa* (Bergot *et al.* 2004). Le parasite est responsable de dommages dans d'autres zones du globe, notamment aux Etats-Unis et au Mexique (Marçais *et al.* 2000). *Phytophthora ramorum* quant à lui est un oomycète d'apparition nettement plus récente, responsable des maladies connues en anglais sous les noms de « sudden oak death » et de « sudden larch death » (Grünwald *et al.* 2012). Jusqu'à présent, cet agent pathogène n'a été observé qu'en Amérique du Nord et en Europe. Il a émergé dans les années 90 et a provoqué des dommages écologiques et économiques dévastateurs dans les écosystèmes forestiers (Grünwald *et al.* 2012). Plus de 100 hôtes différents ont été identifiés comme susceptibles d'être attaqués par *P. ramorum* (Grünwald *et al.* 2008). L'émergence simultanée de *P. ramorum* dans plusieurs zones géographiques serait liée à différents événements d'introduction et migration facilités par les extraordinaires capacités de dispersion et de reproduction que possède cet oomycète (Cushman et Meentemeyer 2008; Grünwald *et al.* 2012; Garbelotto et Pautasso 2012).

L'évolution récente du climat, autre cause d'émergence, est maintenant un fait établi dont il est très probable qu'il soit lié à l'action de l'Homme (IPCC 2007). De nombreux modèles climatiques prévoient un réchauffement et une modification des régimes de pluie sous l'effet de l'intensification des activités humaines qui produisent des gaz à effet de serre. L'évolution du climat est souvent invoquée comme facteur pouvant expliquer l'émergence de maladies ou le succès des invasions (Anderson *et al.* 2004; Desprez-Loustau 2010). Ce rôle du



réchauffement climatique est d'autant plus probable que beaucoup d'agents pathogènes responsables de nouvelles maladies forestières sont thermophiles (Desprez-Loustau *et al.* 2007; Desprez-Loustau 2010). Bergot *et al.* (2004) prévoient ainsi une expansion de *Phytophthora cinnamomi* en France en réponse à une élévation des températures, qui permettrait à l'oomycète de mieux survivre durant l'hiver et de coloniser de nouvelles régions. Woods *et al.* (2005) ont quant à eux démontré que la maladie des bandes rouges du pin, due à *Dothistroma septosporum*, migre peu à peu vers le Nord du Canada, à la faveur d'une augmentation des températures et des précipitations. Toutefois les raisons expliquant l'émergence d'une maladie peuvent être complexes. Ainsi, Fabre *et al.* (2011) ont montré que le climat de ces 15 dernières années est devenu plus favorable à la présence de *Diplodia pinea*, agent de dépérissement des pins. Ils ont également pu mettre en évidence que la poursuite prévue des hausses de température pour l'avenir aurait un impact moins important sur la présence de l'agent pathogène en pinèdes. Toutefois, le dépérissement causé par cet agent pathogène peut être favorisé par d'autres modifications environnementales qui affectent la sensibilité de l'hôte, notamment les sécheresses et les dépôts anthropiques d'azote (van Staden *et al.* 2004; Fabre *et al.* 2011).

Les changements de pratiques, impulsés par la mondialisation, le développement économique et les avancées technologiques, peuvent aussi favoriser l'apparition de maladies nouvelles (Anderson *et al.* 2004). Ces changements sont souvent caractérisés par une forte homogénéisation génétique des cultures (Stukenbrock et McDonald 2008 ; Sache 2010) et une fragmentation des habitats naturels résultant du développement agricole et urbain (Desprez-Loustau 2010). Ainsi, *Phytophthora pinifolia*, responsable d'une maladie récemment apparue, a largement compromis les monocultures de *Pinus radiata* au Chili. Son expansion a été fulgurante, et alors que la maladie n'avait été initialement détectée que sur une surface de 70 ha, elle s'est rapidement étendue à 60.000 ha en seulement 2 ans (Durán *et al.* 2010).

### ***B. Evolution de la relation hôte-pathogène***

Le potentiel évolutif des agents pathogènes influe également fortement sur le développement d'épidémies (Dlugosch et Parker 2008; Desprez-Loustau 2010). Il a un rôle

primordial dans l'adaptation à de nouvelles conditions rencontrées par le parasite, qu'elles soient liées à l'environnement ou à l'hôte (Pariaud *et al.* 2009).

En premier lieu la capacité des agents pathogènes à s'adapter à de nouveaux hôtes (sauts d'hôtes) explique fréquemment ces émergences. Ces sauts d'hôtes ont été responsables d'épidémies désastreuses chez l'Homme et les animaux (Woolhouse *et al.* 2005). La capacité des espèces à infecter de nouveaux hôtes dépend alors souvent de la distance génétique entre l'hôte d'origine et le nouvel hôte (Woolhouse *et al.* 2005). Une évolution par contournement de gènes de résistance est également possible. Ce phénomène intervient lors de la sélection effectuée dans le but de créer des variétés de plantes résistantes aux agents pathogènes. L'amélioration variétale a en effet souvent conduit à la création de cultivars porteurs de résistance à déterminisme simple. Dans un tel système, un gène unique au sein de la variété permet de reconnaître le parasite et d'y résister (Sache 2010). Cependant, le parasite peut évoluer et contourner cette résistance, la rendant ainsi inefficace. A la suite d'un contournement de résistance, certaines souches virulentes sont capables de se développer sur la variété et deviennent par la suite dominantes par des processus génétiques et démographiques (McDonald et Linde 2002; Stukenbrock et McDonald 2008). L'adaptation des agents pathogènes et leur évolution correspondent à un trade-off constant des traits de vie du cycle de vie des organismes tels que l'efficacité d'infection, la période de latence, le taux de sporulation ou la période d'infection (Pariaud *et al.* 2009).

L'hybridation interspécifique entre deux espèces génétiquement proches constitue également un facteur d'émergence (Brasier 1995, 2000; Frey 2009), sur lequel nous nous sommes plus particulièrement penchés pour cette thèse. Auparavant peu décrite chez les champignons et les oomycètes, l'hybridation interspécifique est aujourd'hui reconnue comme un mécanisme rapide d'évolution et d'adaptation des nouvelles maladies (Brasier 2000; Olson et Stenlid 2002; Schardl et Craven 2003). En effet, l'hybridation introduit de la diversité génétique qui a déjà été « testée par la sélection » chez les progéniteurs de l'hybride (Rieseberg *et al.* 2003), augmentant les possibilités de l'organisme de s'adapter.

Pour comprendre les mécanismes en jeu, il faut rappeler que l'hybridation peut parfois être accompagnée d'une duplication du génome, amenant à la création des organismes polyploïdes. En effet, les hybrides sont classés d'après leur niveau de ploïdie : lorsqu'un hybride possède un nombre de chromosomes égal à la somme de celui de ses progéniteurs on parle d'un allopolyploïde, alors qu'un hybride qui possède un niveau de ploïdie identique à celui de ses parents est appelé homoploïde ou allodiploïde (Giraud et al. 2008). Un allopolyploïde aura généralement un niveau de ploïdie supérieur à celui de ses parents, mais son caryotype correspond rarement à l'addition exacte des génomes de ses progéniteurs, en raison de pertes chromosomiques qui interviennent au moment de l'hybridation ou au cours de l'évolution de l'espèce (Leitch et Bennett 2004; Giraud *et al.* 2008).

D'après Frey (2009), deux espèces phylogénétiquement proches et vivant en sympatrie ont en général élaboré au cours de leur évolution des barrières reproductives qui empêchent leur hybridation interspécifique. En revanche, deux espèces proches mais allopatriques peuvent avoir perdu ces barrières. En conséquence, la rencontre de ces deux espèces peut conduire, selon l'intensité des contacts et l'isolement reproducteur, à des échanges génétiques (i.e. transfert horizontal ou introgression) qui peuvent aller jusqu'à l'hybridation interspécifique. L'hybridation serait donc largement favorisée par l'introduction d'organismes dans des zones où ils n'existaient pas auparavant (Brasier 2000). De nouvelles espèces pathogènes hybrides sont ainsi décrites comme par exemple la rouille du peuplier, *Melampsora x columbiana* (Newcombe et al. 2000), l'agent pathogène de crucifères, *Verticillium longisporum* (Inderbitzin et al. 2011), l'agent pathogène de l'oignon, *Botrytis alii* (Nielsen et Yohalem 2001) et des espèces du genre *Heterobasidion* (Gonthier et al. 2007).

L'émergence de nouvelles espèces hybrides commence aussi à être documentée chez *Phytophthora* spp., objet de notre étude. Des hybrides ont été créés en laboratoire mais également identifiés en milieux naturels (Man In 't Veld et al. 2007; Goss et al. 2011 ; Kroon et al. 2012; Martin et al. 2012; Man In 't Veld et al. 2012). Tous ces hybrides d'origine naturelle sembleraient être le résultat d'une hybridation de type sexuée, impliquant deux espèces phylogénétiquement proches. L'hybridation par fusion de zoospores ou d'hyphes (hybridation dite asexuée) semble improbable (Brasier 1992), même si des hybrides artificiels

ont été créés après application de traitements chimiques destinés à favoriser la fusion de protoplastes (Érsek et al. 1995). Néanmoins, un mécanisme d'hybridation par fusion de zoospores ne peut pas être rejeté : les systèmes d'irrigation utilisés dans les pépinières ainsi que les systèmes de culture hydroponique pourraient favoriser la rencontre et la fusion de zoospores provenant de deux espèces différentes (Bonants et al. 2000). Cependant, chez les oomycètes, les mécanismes conduisant à des événements d'hybridation restent peu connus (Kroon et al. 2012).

Le déclenchement d'un processus de spéciation par un hybride est dépendant de ses capacités de survie et de reproduction (Chapman et Burke 2007). En effet, dans certains cas les hybrides peuvent avoir un avantage sélectif par rapport à leurs progéniteurs (i.e. hétérosis) en combinant des traits qui permettent l'apparition de nouveaux phénotypes mieux adaptés à l'exploitation de niches écologiques disponibles, et qui peuvent même parvenir à exclure totalement les espèces parentales (Olson et Stenlid 2002; Schardl et Craven 2003). Par conséquent, les hybrides peuvent évoluer de façons très différentes, selon les processus génétiques mis en œuvre : des croisements entre individus fertiles, des rétrocroisements avec un ou deux progéniteurs, des réarrangements chromosomiques pendant la mitose, des pertes chromosomiques ou encore des altérations épigénétiques qui peuvent entraîner des changements dans l'expression de certains gènes (Adams et al. 2003).

Les hybrides de *Phytophthora* décrits à l'heure actuelle semblent présenter des caractéristiques communes : une production d'oospores peu ou pas viables, impliquant l'absence de spores de survie dans le cas où les chlamydospores sont absentes et un mode de reproduction et de dispersion clonal à partir de zoospores (Delcán and Brasier 2001; Man in't Veld *et al.* 2007; Man in't Veld *et al.* 2012).

### ***C. Quelles approches utiliser pour l'étude des émergences ?***

Les invasions biologiques et les émergences sont des phénomènes complexes. Il est bien souvent difficile de déterminer l'importance respective des différents facteurs impliqués dans les nouvelles émergences. Les questions soulevées nécessitent une forte approche multidisciplinaire et holistique intégrant des dimensions biologiques, physiques et sociales

(Desprez-Loustau 2010). Historiquement, l'étude des maladies des plantes a concerné principalement l'étiologie des maladies et leur épidémiologie. Ainsi, les pathologistes ont développé des outils pour détecter, diagnostiquer et caractériser la dynamique des nouvelles émergences. Aujourd'hui, les différentes techniques moléculaires, en particulier à partir de l'étude de l'ADN, permettent des détections simples, rapides et flexibles.

Plus récemment, grâce au développement de la biologie moléculaire, la phytopathologie a intégré des approches de génétique des populations. De manière complémentaire à l'épidémiologie, la génétique des populations permet de déterminer l'origine des épidémies et de distinguer les structures génétiques spatiales des populations d'agents pathogènes. Bien que la génétique des populations puisse être intéressante pour étudier les invasions biologiques, le caractère souvent récent des introductions constitue un problème. En effet, l'historique des invasions ne peut pas être reconstruite de la même façon que des changements produits au cours d'échelles de temps plus longues (Fitzpatrick *et al.* 2012). Ainsi, l'étude des invasions biologiques se focalise principalement sur des questions telles que l'origine des espèces introduites, la détermination des effets de fondation, la structure génétique des populations invasives, la détection de flux de gènes avec d'autres populations. L'étude des événements d'hybridation récents se développe également.

Le principe de la génétique des populations réside dans l'étude des fréquences alléliques portées par les individus et de ses fluctuations au sein et entre populations d'individus collectés et puis caractérisés à l'aide de marqueurs génétiques. Une population peut être définie comme un groupe d'individus appartenant à la même espèce, situés au même endroit et à la même période et ayant la capacité de se reproduire entre eux (Xhaard 2011). L'utilisation de méthodes de génétique des populations permet de mettre en évidence les processus évolutifs qui façonnent la structure génétique des populations d'une espèce, c'est-à-dire : la mutation, la dérive génétique, la migration, la recombinaison et la sélection. L'étude des fréquences alléliques apporte donc des informations importantes sur la biologie des organismes et leur dynamique (Sunnucks 2000). Elle peut par exemple permettre de déterminer la zone d'origine d'un organisme invasif. Ceci n'est pas une question simple à résoudre, en particulier parce que peu de données existent sur la diversité et l'écologie des espèces endémiques : celles-ci posent en effet souvent peu de problèmes de phytosanitaires

(Desprez-Loustau *et al.* 2007; Garbelotto 2008; Hansen 2008). Par ailleurs l'origine de nombreuses espèces invasives comme *P. ramorum* est inconnue (Goss *et al.* 2009; Grünwald *et al.* 2012). L'origine d'autres espèces fait l'objet d'hypothèse : *P. cinnamomi* proviendrait de la Papouasie-Nouvelle Guinée (Dobrowolski *et al.* 2003), mais cela n'a pas encore été confirmé. Pour *P. infestans*, deux régions d'origine ont été proposées : Goodwin *et al.* (1994a, b) ont suggéré que sa population source serait au Mexique, mais récemment Gómez-Alpizar *et al.* (2007) ont proposé une origine andine en Amérique du Sud. Par ailleurs, chez les Phytophthoras le type de reproduction a de fortes implications sur la diversité et par conséquent sur la structure des populations. L'homothallisme et l'autofécondation peuvent impacter les caractéristiques génétiques des populations par une diminution de la diversité génétique et une augmentation du déséquilibre de liaison (Garbelotto 2008; Hansen 2008). Ainsi, une population endémique de *Phytophthora* peut aussi présenter des niveaux de diversité génétique faibles ne représentant pas un goulot d'étranglement produit par un effet de fondation (Garbelotto 2008; Hansen 2008). Par ailleurs, certaines populations invasives peuvent présenter des niveaux de diversité élevés grâce à des événements d'introduction multiples qui peuvent enrichir le pool génétique de ces populations (Delmotte *et al.* 2008; Dlugosch *et al.* 2008). Par conséquent, la diversité génétique au sein d'une population invasive est très liée à l'historique des événements d'introduction et représente dans la plupart des cas un processus dynamique (Fitzpatrick *et al.* 2012).

## **II. Le dépérissement de l'aulne glutineux dû à *Phytophthora alni***

Le dépérissement de l'aulne causé par *Phytophthora alni* est une maladie d'apparition récente dont l'analyse fournit des apports instructifs pour étudier le phénomène des émergences. Néanmoins, les conditions qui ont pu favoriser son émergence restent peu connues. Les causes pourraient impliquer des phénomènes d'introduction de l'un ou des deux parents suivant un processus d'hybridation. La dispersion de la maladie en Europe semble être fortement liée à l'introduction de l'agent pathogène dans des zones saines suite à la plantation de matériel infecté. Cependant, sa genèse par hybridation et son introduction dans des zones où il n'existait pas auparavant ne semblent pas suffisantes pour expliquer le déclenchement de l'épidémie. En effet, un agent pathogène causant une épidémie doit franchir les barrières

imposées par l'environnement et son hôte. Il a été démontré que le *Phytophthora* de l'aulne est une espèce thermophile et que la température est un facteur de risque important pour le développement annuel de la maladie. Ainsi, il semble pertinent de s'interroger sur l'effet de la température dans l'évolution historique de l'épidémie. Cette thèse a visé à répondre à ces questions en utilisant une approche de génétique des populations et une approche de modélisation.

### ***A. L'aulne glutineux : une espèce d'importance écologique***

Appartenant à la famille botanique des Bétulacées, le genre *Alnus* est très répandu dans l'hémisphère Nord et présente environ 30 espèces (Claessens 2003). Quelques espèces sont aussi présentes en Amérique du Sud (Tedersoo *et al.* 2009). Même si l'origine du genre reste un sujet controversé, Navarro *et al.* (2003) ont suggéré, d'après le résultat des analyses phylogénétiques, une origine eurasienne. Le genre *Alnus* présente deux sous-genres : *Alnaster* et *Gymnothryrsus*, division basée sur des données morphologiques et confirmée par des études moléculaires (Navarro *et al.* 2003). Les espèces d'aulne sont généralement pionnières et ont une forte capacité à coloniser des espaces ouverts grâce à leur pollinisation anémophile, la dissémination des graines par le vent et par l'eau et leur croissance initiale rapide. En accord avec cette stratégie pionnière, les aulnes présentent une intolérance à l'ombre et un cycle de vie relativement court (Claessens 2003).

En Europe, les quatre espèces endémiques les plus communes sont l'aulne à feuille de cœur ou aulne de Corse (*Alnus cordata* Loisel.), arbre méditerranéen préférant les sols calcaires, l'aulne vert (*Alnus viridis* D.C.), espèce d'altitude préférant les sols acides, l'aulne blanc ou aulne de montagne (*Alnus incana* L. Moench), et le plus répandu, l'aulne glutineux ou aulne noir (*Alnus glutinosa* L. Gaertn.) (Rameau *et al.* 1989). Une caractéristique importante des aulnes, et en particulier de l'aulne glutineux, est leur capacité à coloniser les ripisylves et les forêts humides qui présentent des épisodes d'inondation fréquents (Claessens 2003). *Alnus glutinosa* est particulièrement important sur le bord des cours d'eau où il joue un rôle déterminant dans la tenue des berges et dans la purification de l'eau. Ses racines abondantes et denses servent d'abris aux poissons et à la petite faune. Son feuillage léger permet le développement des arbustes et plantes herbacées. Ses semences, qui sont

progressivement libérées pendant l'hiver, constituent une source d'alimentation pour des oiseaux (Claessens 2003). Il est aussi une espèce fixatrice d'azote atmosphérique grâce à sa relation symbiotique, avec la bactérie filamenteuse *Frankia alni* (Claessens 2003; Navarro *et al.* 2003). Cette caractéristique ainsi que sa tolérance à l'hydromorphie le rendent particulièrement efficace pour coloniser les sols pauvres et engorgés et pour favoriser l'implantation d'autres essences. Toutefois, dans les zones sèches du continent comme la région méditerranéenne, l'aulne glutineux n'est présent qu'en bordure de cours d'eau. Il peut se développer jusqu'à 1800 m d'altitude dans les Alpes, 1500 m dans l'Est de l'Europe et 1200 m dans le Sud du continent (Pyénées) (Claessens 2003). L'importance économique de l'aulne glutineux est plus modérée. Toutefois son bois peut être utilisé de nombreuses façons : bois de placage, bois de chauffage, ébénisterie, contreplaqué, panneau de particules ou production de pâte à papier (Rameau *et al.* 1989; Claessens 2003).

### ***B. Le dépérissement dû à *Phytophthora alni* : une épidémie d'apparition récente***

Alors que l'aulne était considéré comme une espèce sans problème sanitaire majeur, de nombreux dépérissements ont été recensés à travers le continent européen dans les années 1990 (Cech et Hendry 2003). Des cas ont été observés pour la première fois en 1993 le long de cours d'eau dans le sud-est et l'ouest du Royaume-Uni (Brasier *et al.* 1995). Les aulnes dépérissants présentaient des symptômes identiques à ceux causés par des *Phytophthora* infectant les arbres au niveau du système racinaire (Brasier *et al.* 1995). L'agent pathogène en cause a été isolé en 1993 au Royaume-Uni par Brasier *et al.* (1995), qui l'ont dénommé «Phytophthora de l'aulne». Des symptômes de dépérissement des aulnes ont été observés plus tard ailleurs en Europe, ce qui a conduit à développer en 1998 des recherches sur cette maladie (Gibbs 2003a). Les premières études ont signalé la similitude de cet agent pathogène avec *P. cambivora* d'un point de vue morphologique. Toutefois, les deux espèces ont des caractéristiques qui permettent de les distinguer : une morphologie spécifique en culture *in vitro* et des différences de températures optimales et maximales de croissance. Le *Phytophthora* de l'aulne est homothallique alors que *P. cambivora* est hétérothallique (Brasier *et al.* 1995). De plus, contrairement à *P. cambivora* qui a un spectre d'hôtes plus large, le *Phytophthora* de l'aulne n'est pathogène que sur le genre *Alnus* (Brasier et Kirk 2001; Santini



*et al.* 2003). Des études ultérieures menées par Brasier *et al.* (1999) ont suggéré que l'agent du dépérissement de l'aulne était un hybride naturel hétéropleïde dont les parents étaient probablement *P. cambivora* et une espèce proche de *P. fragariae*. Ces études ont aussi montré que les souches de *Phytophthora* de l'aulne pouvaient diverger fortement. Celles-ci ont été séparées en trois groupes en fonction de leurs caractéristiques phénotypiques, cytologiques et génétiques, ces groupes étant par la suite élevés au rang de sous-espèces : *P. alni* subsp. *alni* (*Paa*), *P. alni* subsp. *uniformis* (*Pau*) et *P. alni* subsp. *multiformis* (*Pam*) Brasier *et al.* (2004). Ioos *et al.* (2006) ont confirmé l'existence de ces trois entités différentes, mais proposent l'utilisation du terme « taxon » qui serait plus approprié pour les qualifier. En effet, suite aux études menées sur des gènes nucléaires et mitochondriaux, Ioos *et al.* (2006) ont montré que *Pam* et *Pau* sont les espèces parentales de l'hybride *Paa*. Ces résultats ont été confirmés par l'étude de la famille de gènes des élicitines chez les trois taxons (Ioos *et al.* 2007b). L'ensemble de ces résultats infirme l'hypothèse d'une implication de *P. cambivora* et de *P. fragariae* dans le processus d'hybridation ayant conduit à la genèse de *P. alni*.

*Pau* est morphologiquement différent de *Paa* et de *Pam*. Son agressivité sur l'aulne est décrite comme moindre (Brasier et Kirk 2001). Sa ploïdie a été estimée comme proche de la diploïdie ( $2n+2$  ; Brasier *et al.* 1999). Sa séquence ITS est homogène et relativement proche de *P. cambivora*, présumé dans un premier temps être l'un des parents de *Paa* (Brasier *et al.* 1999). La présence de *Pau* a été rapportée dans plusieurs pays Européens (Nagy *et al.* 2003; Santini *et al.* 2003; Brasier *et al.* 2004; Ioos *et al.* 2006) et plus récemment dans l'ouest des Etats-Unis (Adams *et al.* 2009). Cette dernière découverte a ouvert la question de son origine : *Pau* pourrait-il être originaire d'Amérique du Nord ?

Lors des études de Brasier *et al.* (1999), certains isolats du complexe *P. alni* au sens large présentaient des séquences ITS homogènes et se sont montrés proches de *P. fragariae*, un autre parent présumé de *Paa*. Par ailleurs, leur agressivité vis-à-vis de l'aulne variait également (Brasier et Kirk 2001). Malgré des différences de morphologie marquées, des analyses isoenzymatiques et génétiques ont montré que ces isolats étaient très proches. Brasier *et al.* (2004) ont donc choisi de les regrouper au sein d'une même sous-espèce : *Phytophthora alni* subsp. *multiformis* (*Pam*). A partir de l'étude de quatre gènes nucléaires Ioos *et al.* (2006)

ont démontré l'existence systématique de deux allèles divergents, mais proches phylogénétiquement. Ces résultats suggèrent que *Pam* serait lui aussi issu d'un événement d'hybridation interspécifique. Cependant, aucun taxon de *Phytophthora* susceptible d'être un des parents putatifs de *Pam* n'a été trouvé à ce jour. La présence de *Pam* est aujourd'hui rapportée dans plusieurs pays Européens (Brasier *et al.* 2004; De Merlier *et al.* 2005; Ioos *et al.* 2005). Son origine comme celle de *Paa* reste encore inconnue. Il n'a pas été trouvé hors d'Europe.

### **C. Distribution de la maladie**

La maladie est largement répandue en Europe. L'épidémie a été signalée au Royaume-Uni, en Belgique, en France, en Irlande, en Allemagne, en Suède, aux Pays-Bas, en République Tchèque, en Autriche, en Hongrie, en Pologne, en Italie, en Lituanie, en Slovénie, en Estonie, au Danemark, en Slovaquie, en Espagne et en Russie (Brasier *et al.* 1995; Streito 2003; Jung et Blaschke 2004; De Merlier *et al.* 2005; Downing *et al.* 2010; Gninenko *et al.* 2010; Solla *et al.* 2010; Stochlova *et al.* 2012). En France, l'agent pathogène a été isolé pour la première fois en 1996 (Streito *et al.* 2002). Actuellement le *Phytophthora* de l'aulne est amplement dispersé sur le territoire, avec une présence forte dans le nord-est et l'ouest de la France (Streito *et al.* 2002; Thoirain *et al.* 2007; Elegbede *et al.* 2010). Des enquêtes sur les rivières du Nord-Est de la France ont permis de constater qu'environ 20% des aulnes étaient touchés par la maladie (Streito *et al.* 2002 ; Thoirain *et al.* 2007). Dans le Sud-Ouest de la France, en Charente, une enquête du Département de Santé des Forêts montrée qu'environ 50% des aulnes sont dépérissants le long des cours d'eau (résultats non publiés).

### **D. Symptomatologie**

Toutes les espèces d'aulne européen sont susceptibles d'être affectées par le *Phytophthora* de l'aulne (Gibbs 2003a; Santini *et al.* 2003; Downing *et al.* 2010). En revanche, la susceptibilité des espèces d'aulnes d'Amérique du Nord, du Sud ou d'Asie est actuellement inconnue (Downing *et al.* 2010). Des prospections menées en Alaska par Adams *et al.* (2009) en forêts d'*Alnus incana* subsp. *tenuifolia* atteintes d'un dépérissement n'ont pas permis d'établir une implication de *Pau* malgré la présence de l'agent pathogène.

Les symptômes observés sont de deux types : des chancres sur le tronc, liés à une infection du liber, et un dépérissement du houppier, liés vraisemblablement à la destruction du système racinaire fin (Brasier *et al.* 1995; Streito *et al.* 1999; Lonsdale 2003; Jung et Blaschke 2004; Elegbede *et al.* 2010). Des taches nécrotiques noirâtres avec parfois des écoulements goudronneux sont observables sur le tronc (Streito *et al.* 1999). Le *Phytophthora* de l'aulne infecte l'arbre à la base du tronc parfois jusqu'à un ou deux mètres du collet, et plus rarement au niveau des racines (Figures 1A et 1B). Il pénètre par les racines ou les lenticelles au collet de l'arbre (Streito *et al.* 1999; Lonsdale 2003). Il détruit les tissus conducteurs, ce qui perturbe la circulation de la sève (Streito *et al.* 1999; Clemenz *et al.* 2008). Des nécroses brunes, dues au développement du parasite, apparaissent dans l'écorce interne (Streito *et al.* 2002; Streito 2003). Au printemps, l'aulne infecté par l'agent pathogène présente un débourrement tardif (Figures 1D et 1E). Les feuilles sont en général plus petites, décolorées, voire jaunissantes, puis brunissent par l'apex avant de tomber prématurément (Brasier *et al.* 1995; Streito *et al.* 1999; Jung et Blaschke 2004). L'arbre infecté ne présente pas dans un premier temps une descente de cime. En fin de processus, toute son architecture est visible avec seulement quelques feuilles aux extrémités des branches (Streito *et al.* 1999; Streito 2003). Les symptômes au niveau du houppier conduisent à une forte réduction du taux de photosynthèse et de la transpiration des aulnes infectés (Clemenz *et al.* 2008). L'infection des parties distales de l'appareil racinaire ne semble pas impliquer un dépérissement sévère de l'aulne, à l'inverse des infections à la base du tronc ou des racines superficielles lignifiées. Ces dernières se traduisent souvent par une nécrose ceinturante qui affecte le flux de sève, pouvant mener à la mort de l'arbre.

Toutes les classes d'âge d'aulnes sont susceptibles d'être atteintes par la maladie, mais le délai entre l'infection et la mort de l'arbre est très variable selon l'âge du sujet (Jung et Blaschke 2004; Schumacher *et al.* 2006; Elegbede *et al.* 2010). Toutefois, il est apparu que 50% des jeunes plants meurent moins de trois ans après l'apparition des premiers symptômes (Husson *et al.* 2006) (Figure 1C).



Figure 1. Symptômes du dépérissement de l’aulne glutineux. (A) Taches nécrotiques noirâtres sur le tronc. (B) Lésion sous-corticale visible après écorçage de l’arbre de la figure A. (C) Mortalité de jeunes individus d’aulne. Toutes les classes d’âges sont susceptibles d’être affectées par la maladie. (D) Aspect général d’un aulne dépérisant présentant un éclaircissement caractéristique du houppier. (E) Feuilles nanifiées et jaunissantes (à gauche) en comparaison avec des feuilles d’aspect sain (à droite). Photos Claude Husson, INRA Nancy.

### ***E. Biologie de Phytophthora alni***

Autrefois classé parmi les champignons, le genre *Phytophthora* doit son nom au grec et signifie « destructeur des plantes ». Il appartient au règne des Straménopiles, phylum des Oomycota (Blair *et al.* 2008). Les *Phytophthora* sont essentiellement considérés comme des agents pathogènes, et peuvent attaquer un grand nombre d’espèces végétales en milieu

agricoles et naturels (Erwin et Ribeiro 1996). A l'heure actuelle plus d'une centaine d'espèces ont été identifiées (Kroon *et al.* 2011). Cependant entre 200 et 600 espèces pourraient exister (Brasier 2009). Durant la dernière décennie, de nombreuses nouvelles espèces de *Phytophthora* ont été décrites. Ces résultats sont à mettre en relation avec le développement des méthodes moléculaires et de phylogénie permettant une meilleure délimitation des espèces, mais aussi à l'amélioration des méthodes de détection et à la mise en place de prospections à grande échelle dans les milieux naturels (Kroon *et al.* 2012; Martin *et al.* 2012). Actuellement le genre *Phytophthora* compte dix clades, définis sur la base de la phylogénie de sept gènes nucléaires (Blair *et al.* 2008). Ces clades réunissent des espèces ayant un ancêtre commun (Kroon *et al.* 2012).

Le complexe d'espèces *Phytophthora alni sensu lato* a été classé dans le clade 7 (Blair *et al.* 2008). Ce clade regroupe actuellement 13 espèces généralement pathogènes de racines qui présentent toutes des sporanges non-papillés (Kroon *et al.* 2012). Le clade présente deux sous-groupes : le clade 7a inclut des espèces majoritairement homothalliques et dont fait partie *P. alni*, et le clade 7b inclut des espèces homothalliques et hétérothalliques (Blair *et al.* 2008; Kroon *et al.* 2012). En effet, certaines espèces de *Phytophthora*, dites homothalliques, sont capables de s'autoféconder et former des spores sexuées, les oospores, alors que d'autres, dites hétérothalliques ont besoin de deux types sexuels (mating types) pour la formation des oospores (Goodwin 1997). En outre, le cycle de vie des *Phytophthora* compte classiquement une phase sexuée, ainsi qu'une phase asexuée qui comporte deux types de spores : les chlamydospores et les sporanges. Les trois espèces *Paa*, *Pau* et *Pam* sont homothalliques (Brasier *et al.* 2004), et sont donc potentiellement capables de s'autoféconder.

Bien que certains paramètres sur la biologie de *P. alni* restent encore inconnus, il est possible d'imaginer un cycle biologique relativement simple (Figure 2). En conditions favorables, le *Phytophthora* de l'aulne produit des sporanges qui libèrent des zoospores biflagellés dans les sols humides ou dans l'eau libre. Ces zoospores peuvent s'accumuler à la surface de tissus sensibles de l'hôte grâce à des mécanismes de chimiotactisme. Il semblerait que la production de zoospores, leur libération et leur survie soient dépendantes de la température et des caractéristiques biologiques et physico-chimiques de l'eau (Chandelier *et al.* 2006; Kong *et al.* 2011, 2012a). Par ailleurs, la formation de chlamydospores, propagules

de survie issues de la reproduction végétative, observables dans le mycélium de certaines espèces de *Phytophthora*, n'a jamais été décrite chez *P. alni* (Lonsdale 2003). En revanche, l'agent pathogène peut parfois produire en culture des cellules à parois épaisses qui pourraient simuler le rôle des chlamydospores (Lonsdale 2003). Les études menées jusqu'à présent ont montré que la viabilité des oospores, issues de la reproduction sexuée, est quasi nulle en conditions expérimentales (Delcán et Brasier 2001). Le *Phytophthora* de l'aulne ne paraît donc pas disposer de propagules de survie hivernale, ce qui a des conséquences sur sa capacité à subsister dans les sols (Jung et Blaschke 2004; Elegbede *et al.* 2010). En effet, les études menées par Elegbede *et al.* (2010) ont démontré que la quantité d'inoculum au pied des arbres diminue très rapidement après leur mort. De plus, Jung et Blaschke (2004) ont mis en évidence que cet agent pathogène ne persiste pas deux ans dans le sol de planches de pépinières infectées en l'absence d'hôtes potentiels, quand l'aulne est remplacé par des épicéas et des chênes.

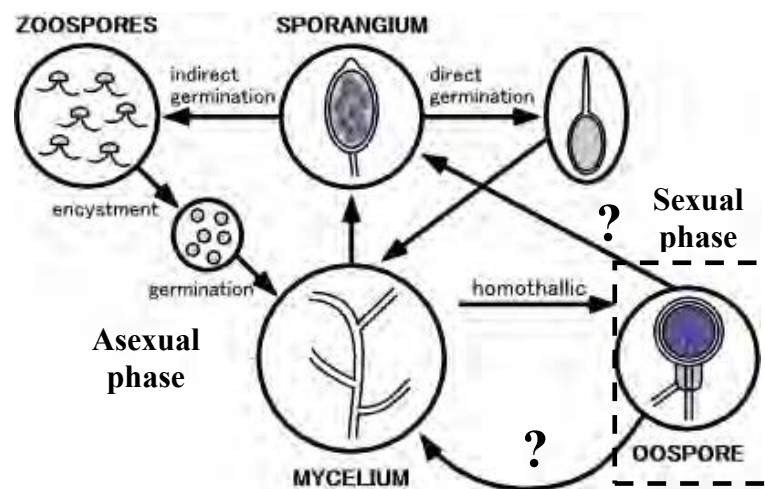


Figure 2. Schéma du cycle biologique de *P. alni*. *P. alni* se dissémine principalement par ses zoospores, propagules issues de la reproduction asexuée. Le mycélium infectant les différents tissus de l'aulne produit des sporanges en présence d'eau. Les sporanges libèrent des zoospores biflagellées motiles dans l'eau libre qui s'accumulent sur l'hôte. Les zoospores germent et le mycélium formé va ainsi progressivement coloniser les tissus sains de l'aulne. *P. alni* est un organisme homothallic, c'est-à-dire capable de produire des oospores (œuf issu de la reproduction sexuée) par autofécondation. Néanmoins, en conditions contrôlées, les oospores ne germent pas et leur viabilité est très faible. Schéma modifié de <http://en.wikipedia.org/wiki/Phytophthora>

Les principales sources d'inoculum sont les tissus nécrotiques sous-corticaux du tronc, les tissus racinaires lignifiés infectés et les fines racines (Lonsdale 2003). La quantité d'inoculum produite par un arbre (via les racines) est fortement liée à la phase d'évolution de la maladie. Elegbede *et al.* (2010) ont pu montrer que les arbres infectés ne présentant pas encore de symptômes de dépérissement étaient les principaux producteurs d'inoculum. En revanche, les arbres très dépérissants en produisent assez peu.

Les zoospores biflagellées constituent le principal moyen de dissémination de l'inoculum des *Phytophthora* via l'eau (Erwin et Ribeiro 1996). Cette forme de dispersion explique la forte incidence de la maladie le long des cours d'eau (Jung and Blaschke 2004; Schumacher *et al.* 2006). Cependant *P. alni* a également été identifié dans des endroits éloignés de la zone ripicole comme les plantations et les pépinières (Jung et Blaschke 2004; Schumacher *et al.* 2006). En effet, il semblerait que les périodes d'inondation permettent aussi de stimuler la production de sporanges et l'émission de zoospores infectieuses (Jung et Blaschke 2004; Strnadová *et al.* 2010). De plus, Jung et Blaschke (2004) ont montré que la dissémination de l'agent pathogène par l'intermédiaire de plants de pépinière explique souvent l'introduction du *Phytophthora* de l'aulne dans des zones indemnes. Il existe toutefois d'autres modes de dissémination très importants pour les *Phytophthoras* comme le transport de sol contaminé par les animaux sauvages et domestiques, les hommes et les engins de terrassement (Erwin et Ribeiro 1996; Ristaino et Gumpertz 2000; Hausbeck et Lamour 2004; Chadfield et Pautasso 2012).

#### ***F. Techniques d'isolement et d'identification de *Phytophthora alni****

La principale difficulté des études sur l'épidémiologie de *P. alni* est de mettre en évidence sa présence dans les différents substrats. Dans son habitat naturel *P. alni* est présent dans trois types de substrats : dans du matériel végétal (l'aulne), dans le sol et dans l'eau.

Actuellement, les outils moléculaires basés sur l'étude de l'ADN sont devenus des techniques très courantes pour la détection et l'identification de différents *Phytophthoras* (Martin *et al.* 2012). Celles-ci présentent de nombreux avantages en termes de rapidité, de sensibilité et de spécificité par rapport aux techniques basées sur l'isolement microbiologique

ou aux tests immuno-enzymatiques. Les méthodes moléculaires ont donné des résultats satisfaisants concernant la détection des oomycètes par PCR (Polymerase Chain Reaction). C'est notamment le cas de *P. fragariae* (Bonants *et al.* 1997), *P. medicaginis* (Liew *et al.* 1998), *P. nicotianae* (Ippolito *et al.* 2002; Kong *et al.* 2003), *P. citrophthora* (Ippolito *et al.* 2002), *P. cinnamomi* (Kong *et al.* 2003), *P. ramorum* (Martin *et al.* 2004; Bilodeau *et al.* 2007), *P. capsici* (Zhang *et al.* 2006).

Le *Phytophthora* de l'aulne est relativement difficile à isoler sur milieu de culture à partir de nécroses sous-corticales (Streito *et al.* 2002; Ios 2006). Néanmoins, des couples d'amorces définis à partir de régions SCAR (sequence-characterized amplified regions) de l'ADN génomique (De Merlier *et al.* 2005; Ios *et al.* 2005; Bakonyi *et al.* 2006) ou de gènes nucléaires (Ios *et al.* 2006) ont été développés et permettent d'identifier l'agent pathogène à partir de cultures pures ou bien de l'identifier directement sur les tissus infectés.

La méthode la plus utilisée pour sa détection dans le sol est le piégeage biologique. Le principe de cette technique consiste à faire flotter un organe (feuille, fruit, graine) d'un hôte végétal dans un récipient contenant un échantillon de sol et de l'eau stérile. Les zoospores libérées par les *Phytophthora* attaquent le piège végétal et forment des nécroses typiques des oomycètes. Ces nécroses sont ensuite analysées soit par isolement sur milieu sélectif et observation des caractéristiques morphologiques, soit par PCR après extraction de l'ADN à l'aide d'amorces espèce-spécifiques. Différents pièges peuvent être utilisés : des pommes, des poires, des graines de lupin, des aiguilles de pin, des feuilles de différentes espèces forestières ou encore des pièges synthétiques (Hargreaves et Duncan 1978; Streito *et al.* 2002; Streito 2003; Gerlach *et al.* 2004). Les travaux menés au sein de l'équipe d'Ecologie des Champignons Pathogènes Forestiers ont montré que les feuilles de rhododendron (*Rhododendron* x cv. 'Cunningham's White') semblent être le matériel biologique le plus efficace pour piéger les propagules actives de *P. alni*. Cependant, *P. alni* semble peu compétitif vis-à-vis d'autres espèces d'oomycètes et sa détection dans les lésions des feuilles de rhododendron doit se faire par PCR espèce-spécifique. Le piégeage biologique peut être adapté pour des études épidémiologiques en permettant une quantification indirecte de l'inoculum dans le sol (Elegbede *et al.* 2010; Shearer *et al.* 2010).



Bien que des techniques d'extraction directe de l'ADN du sol aient été développées pour la détection et la quantification des Phytophthoras (Lievens *et al.* 2006; Schena *et al.* 2008; Williams *et al.* 2009; Meng et Wang 2010; Scibetta *et al.* 2012), très peu d'applications en épidémiologie existent. En effet, l'efficacité de l'extraction de l'ADN du sol (quantité et qualité des ADN extraits) est très liée aux caractéristiques physico-chimiques du substrat comme la texture du sol. De plus, certains composés du sol inhibent la réaction d'amplification, ce qui rend la détection et la quantification peu fiable. Par ailleurs, les quantités de sol à extraire par échantillon sont souvent trop faibles pour ce genre d'étude (environ 500 mg par échantillon de sol).

Les premiers essais de piégeage biologique dans l'eau de rivière ont été effectués dans le Nord de la France par Streito *et al.* (2002) en utilisant des baguettes d'aulne attachées ensembles pour former un radeau. Au bout d'environ une semaine, les pièges ont été retirés de l'eau et des essais d'isolement ont été réalisés à partir des nécroses présentes sur l'écorce. La technique a permis de détecter le parasite dans les rivières Moselle et Sarre, mais son manque de sensibilité et la concurrence d'autres oomycètes limitent fortement son utilisation. Une autre technique est la filtration de l'eau de rivière sur membrane afin de capturer les zoospores présentes dans l'eau. Cette technique a été mise en œuvre pour la détection des oomycètes des genres *Phytophthora* et *Pythium* (Pettitt *et al.* 2002; Thernann *et al.* 2002; Kong *et al.* 2003; Bush *et al.* 2003; Zhang *et al.* 2006). Cependant, pour *P. alni* des expériences menées au sein de l'équipe d'Ecologie des Champignons Pathogènes Forestiers ont montré une inefficacité de la technique pour le diagnostic et la quantification de l'inoculum de *P. alni* dans l'eau. En effet la turbidité de l'eau des rivières du nord-est de la France limite la quantité d'eau filtrable et rend la technique inopérante.

### ***G. Facteurs de risque de la maladie***

La température de l'eau joue un rôle sur la prévalence de la maladie, avec un nombre d'arbres malades plus élevé quand la température de l'eau des rivières augmente (Thoirain *et al.* 2007). Ceci pourrait être expliqué par le fait que l'efficacité de sporulation du *Phytophthora* de l'aulne est plus forte lorsque la température de l'eau des rivières est plus

haute (optimum  $\approx 15^{\circ}\text{C}$ ) (Chandelier *et al.* 2006). L'ensemble de ces résultats suggère que *P. alni* est une espèce thermophile et il paraît donc pertinent de s'interroger sur le rôle qu'aurait pu avoir le réchauffement climatique dans l'émergence de la maladie.

Thoirain *et al.* (2007) ont aussi montré que la prévalence de la maladie est inversement corrélée à la vitesse du cours d'eau. La proximité entre l'aulne et le cours d'eau ainsi qu'un faible courant semblent augmenter la probabilité qu'un arbre soit infecté par les zoospores. En complément, Gibbs *et al.* (1999) suggèrent que la prévalence de la maladie est plus forte pour les arbres qui poussent le plus près de la rive.

Chandelier *et al.* (2006) ont démontré que la qualité bactériologique des eaux peut aussi être un facteur important qui interfère avec la production de sporanges. En ce qui concerne les sols, les berges à texture fine, en particulier les sols argilo-limoneux, sont favorables pour le développement de la maladie (Thoirain *et al.* 2007). D'autres facteurs de risque mis en évidence sont la présence de ponts sur les rivières, qui peuvent provoquer des inondations en amont du pont et le faible recouvrement de la strate arborée qui engendre probablement le réchauffement local de l'eau (Thoirain *et al.* 2007). Enfin, alors que Gibbs *et al.* 1999 ont mis en évidence une corrélation entre la teneur en oxydes d'azote dans l'eau et la prévalence de la maladie dans le sud de la Grande Bretagne, Thoirain *et al.* (2007) n'ont pas pu confirmer ce résultat pour le Nord-Est de la France.

#### ***H. Mesures de lutte et de gestion de la maladie***

En général, seules des mesures de prophylaxie pour ralentir la dissémination de l'agent pathogène peuvent être mises en œuvre. Il n'existe pas de mesures permettant d'éradiquer *P. alni* d'un site infecté. Il est primordial d'éviter l'introduction de l'agent pathogène dans les zones saines. Comme signalé plus haut, Jung et Blaschke (2004) ont montré que la plantation de matériel infecté issu de pépinières était l'un des principaux facteurs qui explique l'introduction de *P. alni* dans les zones indemnes. L'état sanitaire de plants de pépinières doit donc être surveillé avant utilisation. De plus, le matériel utilisé lors d'un chantier doit être soigneusement nettoyé et désinfecté pour éviter de transporter de la terre contaminée.

Une fois la maladie installée, le dessouchage d'arbres malades n'est pas une solution viable. Cette pratique pose des problèmes car elle détruit les berges et favorise l'érosion. Des traitements phytosanitaires ne sont pas recommandés en milieu naturel, puisqu'ils peuvent engendrer une pollution de milieux sensibles comme les ripisylves. D'autre part, l'abattage préventif d'arbres ne supprime pas les parties infectées situées au niveau des racines et du collet. Il est d'ailleurs assez difficile d'identifier à quel stade de la maladie il convient de couper ou de receper les individus infectés. Toutefois, Gibbs (2003b) a montré que cette méthode permet aux arbres de rejeter vigoureusement et qu'ils ne montrent pas ultérieurement de signes de dépérissement. Cette technique permet donc de maintenir un peuplement d'aulnes pouvant exercer ses fonctions écosystémiques. Le recepage permet aussi de diversifier la ripisylve en favorisant d'autres espèces.

***OBJECTIFS, STRATEGIE SCIENTIFIQUE ET PRINCIPAUX  
RESULTATS DE LA THESE***

### III. Objectifs du travail de thèse

L'objectif général de ma thèse est d'explorer et de comprendre les facteurs qui expliquent l'émergence du *Phytophthora* de l'aulne. En particulier, je me suis intéressé au rôle respectif dans l'émergence de la maladie de l'augmentation de la température et de l'évolution des populations de l'agent pathogène en Europe. Pour y répondre, ce travail aborde deux volets :

- i. l'étude de la structure des populations de l'agent pathogène à l'aide de marqueurs moléculaires de type microsatellites. L'investigation de la structure spatiale et temporelle des caractéristiques génétiques des trois taxons constituant *P. alni sensu lato* est en effet fondamentale pour comprendre leur histoire récente.
- ii. L'identification et la compréhension de l'influence des facteurs environnementaux, en particulier de la température, qui ont pu agir sur l'émergence et le développement de l'épidémie. Pour cela, j'ai étudié en détail l'impact du climat sur l'évolution et la dynamique de la maladie.

### IV. Présentation des aspects méthodologiques et des principaux résultats de la thèse

#### A. Génétique des populations de l'agent pathogène

La première étape de ce travail a été le développement de marqueurs microsatellites pour étudier la génétique de populations des espèces du complexe *P. alni*. Les microsatellites représentent actuellement l'un des outils les plus puissants en matière d'étude de génétique des populations. Ces marqueurs possèdent trois caractéristiques importantes : ils sont codominants, généralement très polymorphes et souvent neutres. Grâce à ces qualités ils ont largement utilisés pour étudier la structure, la diversité génétique et l'histoire des populations, analyser les flux de gènes et déterminer des liens de parenté, ou encore explorer une phylogénie ou une phylogéographie (Selkoe et Toonen 2006). En effet, les microsatellites intègrent de façon générale les histoires passées et présentes des espèces. Ainsi, ils sont couramment utilisés pour répondre aux questions de biologie évolutive chez les champignons et les oomycètes (Dobrowolski *et al.* 2003; Dutech *et al.* 2007, 2012; Ordoñez et Kolmer

2007; Prospero *et al.* 2007; Raboin *et al.* 2007; Mascheretti *et al.* 2008; Goss *et al.* 2009; Montarry *et al.* 2010).

Bien que Ioos *et al.* (2007a) aient isolé des marqueurs microsatellites à partir de *Paa* en utilisant une banque enrichie en motifs microsatellites, ces loci n'ont globalement pas permis de caractériser le polymorphisme au sein des trois taxons du complexe. Ainsi, le premier objectif de ce travail a été d'enrichir le panel de marqueurs microsatellites déjà existant afin de disposer d'un nombre de marqueurs suffisamment polymorphes et discriminants. Pendant ma thèse j'ai eu l'opportunité de participer au projet EcoMicro (AIP Bioressources 2009) consistant à développer un grand nombre de loci microsatellites par pyroséquençage de banques enrichies à partir des extraits d'ADN génomique des espèces parentales *Pau* et *Pam* (pour des aspects méthodologiques et techniques voir Malausa *et al.* 2011). Ce travail a permis de développer un panel de onze marqueurs. Ceux-ci ont été utilisés en complément de deux marqueurs parmi les dix développés par Ioos *et al.* (2007a).

Dans un deuxième temps, des prospections et des collectes d'échantillons ont été réalisées en France et en Belgique, afin de localiser des portions de rivières infectées par *Paa* et/ou les espèces parentales. Tous ces isolats sont venus enrichir la mycothèque de *Phytophthora* déjà constituée au sein du laboratoire. Des contacts ont également été pris avec des laboratoires européens pour obtenir des isolats de différents pays d'Europe, ainsi qu'avec l'équipe américaine qui avait récemment identifié *Pau* en Amérique du Nord.

Néanmoins, au début de ma thèse la question de la ploïdie exacte des différentes entités du complexe *P. alni* restait un sujet de débat. La détermination de la ploïdie permet de rassembler de nouvelles connaissances sur le mécanisme d'hybridation. Ces connaissances étaient par ailleurs souhaitables pour la réalisation des études de génétique des populations que j'ai menées, notamment dans le cas de *Paa*. Les premières estimations de la ploïdie des trois espèces ont été réalisées par Brasier *et al.* (1999) par des observations microscopiques de caryotypes. Dans cette étude *Pau* a été décrit comme un taxon proche de la diploïdie (nombre de chromosomes entre 11 et 13 et une ploïdie de  $2n+2$ ) et *Pam* a présenté des niveaux estimés de ploïdie intermédiaires (nombre de chromosomes entre 13 et 18 et une ploïdie estimée entre  $2n+4$  et  $2n+7$ ). La ploïdie de *Paa* a été définie comme quasi-tétraploïde (nombre de

chromosome entre 18 et 22,  $4n+2$ ). Cependant, les travaux de Ioos *et al.* (2006) sur quatre gènes nucléaires et deux gènes mitochondriaux laissent à penser que *Paa* serait hexaploïde, issu d'une hybridation entre *Pau* (diploïde) et *Pam* (tétraploïde). D'après cette hypothèse le contenu en ADN de *Paa* serait donc la somme de celui de *Pau* et de celui de *Pam*. Des expériences menées au sein du laboratoire d'Ecologie des Champignons Pathogènes Forestiers ont tenté de répondre à cette question (Husson *et al.* résultats non publiés). Deux approches ont été utilisées (i) la quantification par PCR quantitative et la comparaison du nombre de copie d'allèles des gènes nucléaires en simple copie étudiés par Ioos *et al.* (2006) chez *Paa*, *Pau* et *Pam* et (ii) l'estimation comparative de la taille du génome des trois espèces par cytométrie en flux. Les résultats de ces expériences ont montré en premier lieu que le nombre de copies de chaque allèle parental était à peu près 2 fois plus élevé pour les espèces parentales que pour l'hybride *Paa*. Ces résultats ont été confirmés par l'estimation de la taille du génome par cytométrie en flux : la quantité totale d'ADN nucléaire chez *Paa* est en effet la moitié de l'addition des deux génomes des espèces parentales. La confrontation de ces nouveaux résultats avec les informations déjà existantes (Ioos *et al.* 2006) a permis de vérifier que *Pau* est une espèce diploïde et *Pam* tétraploïde. En revanche, les différences observées entre les trois espèces pour la taille du génome et le nombre de copies de chaque allèle parental suggèrent que *Paa* serait non pas hexaploïde, mais triploïde. *Paa* (triploïde) résulterait donc d'une hybridation entre *Pau* (diploïde) et *Pam* (tétraploïde), avec une réduction du nombre de chromosomes, similaire à un mécanisme d'homoploïdisation entre deux espèces diploïdes.

Ces résultats sont présentés dans l'étude I « **Détermination de la ploïdie des trois espèces du complexe *Phytophthora alni*** » qui fera l'objet d'une publication ultérieurement.

### ***B. Caractérisation génétique des populations américaines et européennes de *Phytophthora alni* subsp. uniformis***

Suite à l'isolement de *Pau* en Amérique du Nord, je me suis intéressé à sa caractérisation en comparant des collections américaines et européennes. En utilisant des outils de génétique des populations j'ai réalisé une comparaison intercontinentale de la diversité qui pourrait guider sur l'origine de *Pau* en Europe : endémique ou introduite. Les principes de la génétique des populations ont été utilisés pour mettre en évidence certains aspects du mode de

reproduction associé à chacune des populations. Au total 71 isolats (44 Européens et 27 Nord Américains) ont été génotypés à l'aide de 5 marqueurs microsatellites montrant du polymorphisme au sein de l'espèce *Pau*.

Les résultats obtenus lors de cette investigation sont présentés dans l'étude II : «**Strong genetic differentiation between North American and European populations of *Phytophthora alni* subsp. *uniformis***», acceptée sous réserve de corrections mineures dans la revue *Phytopathology*.

Le principal résultat de cette étude a été d'identifier deux populations très divergentes ( $F_{st}=0,88$  ;  $R_{st}=0,76$ ) entre l'Europe et l'Amérique du Nord. L'étude a mis en évidence l'absence de flux de gènes entre les deux populations continentales. En effet, des allèles privés ont été retrouvés au sein de chaque population. La population européenne s'est révélée très peu polymorphe. Un génotype dominant a été retrouvé partout en Europe (représenté par plus de 90% des isolats). En revanche, la population américaine présente une diversité génotypique plus élevée. L'autofécondation (*selfing*) semble être le système d'accouplement (*mating system*) prédominant dans les deux populations. Cependant, nos données ont montré que des événements d'allofécondation (*outcrossing*) au sein de la population américaine étaient aussi possibles. En revanche, le mode de reproduction de la population européenne est moins clair. Toute la variabilité présente chez les *Pau* européens était déterminée par un seul locus. Les données ne nous permettent donc pas de trancher entre un mode de reproduction sexuée avec autofécondation stricte et un mode de reproduction clonal. Cette étude nous a permis de suggérer que la population américaine est possiblement endémique et que la population européenne est probablement le résultat de l'invasion de quelques individus. L'introduction de *Pau* en Europe serait par conséquent une des causes principales de la genèse de l'hybride *Paa*.

### ***C. Caractérisation génétique des populations européennes de *Phytophthora alni* subsp. *alni****

L'utilisation des outils de génétique des populations pour l'étude d'organismes polyploïdes comme *Paa* et *Pam* a posé un défi supplémentaire. L'observation de plus de deux allèles au même locus rend difficile l'utilisation des outils classiques de la génétique des



populations des organismes diploïdes. Ceci tient à la difficulté de déterminer les fréquences alléliques et génotypiques chez les organismes polyploïdes. Cette problématique a cependant été abordée par des chercheurs travaillant sur la génétique des populations de plantes et d'animaux polyploïdes. L'observation et la mesure des ratios entre les hauteurs des différents pics détectés sur des chromatogrammes alléliques (correspondant chacun à un allèle), permet de définir le génotype d'espèces polyploïdes et de ploïdie connue (Esselink *et al.* 2004). En utilisant cette méthode, nous avons étudié les populations de *Paa* en Europe à l'aide de 12 marqueurs microsatellites. Pour cela nous avons génotypé 271 isolats de *Paa* provenant de 10 pays. Par ailleurs, nous avons caractérisé génétiquement une collection de *Pam* (39 isolats). Dans un deuxième temps, nous avons essayé d'assigner des progéniteurs potentiels de *Paa* dans le but de repérer si différents événements d'hybridation ont pu être impliqués dans la genèse de l'hybride. En complément, nous avons utilisé les données de mitotypage obtenues par Ioos *et al.* (2006). En effet, l'ADN mitochondrial est transmis de manière uniparentale lors de la reproduction sexuée chez les *Phytophthora*, y compris dans les cas d'hybridations interspécifiques. Nous avons cherché à confirmer l'hypothèse d'une hybridation sexuelle ou somatique par l'analyse de la distribution dichotomique des types mitochondriaux chez *Paa*. De plus, cette approche vise à apporter des données en matière d'orientation des événements d'hybridation, c'est-à-dire à déterminer le rôle parental de *Pau* et *Pam* dans la contribution de l'ADN mitochondrial chez *Paa*.

Les résultats obtenus lors de cette investigation sont présentés dans l'étude III : « **Genetic diversity and origins of European populations of the allopolyploid hybrid *Phytophthora alni* subsp. *alni*** », actuellement en préparation.

Dans cette étude, nous avons validé une méthodologie tenant compte des ratios entre les hauteurs des différents pics de chromatogrammes détectés, afin de définir le génotype des individus de la collection européenne de *Paa*. De plus, nous avons pu déterminer les contributions alléliques de chacun des parents putatifs de l'hybride. En effet, les génotypes observés chez *Paa* correspondent à une combinaison des génotypes observés chez *Pam* et *Pau*, preuve supplémentaire de l'implication de ces deux espèces dans la genèse de l'hybride. Les marqueurs microsatellites ont montré une diversité génétique faible. Mais malgré ce

faible polymorphisme, nous avons pu détecter 28 génotypes multilocus différents au sein de *Paa*. La présence de différents génotypes conforte l'hypothèse de plusieurs événements d'hybridation entre *Pau* et *Pam*. Cette faible diversité résulte très probablement du polymorphisme limité présenté également par ses progéniteurs. Néanmoins, nos données nous ne permettent pas de rejeter d'autres sources potentielles de variation chez *Paa* tels que des mutations ou des dérives génétiques. Un résultat inattendu a été la détection de deux types mitochondriaux (mitotypes) au sein d'un même génotype multilocus. Ce résultat nous permet de suggérer que les individus classés au sein d'un même génotype multilocus ne correspondent pas à des vraies copies clonales, mais plutôt à des individus de *Paa* générés par des événements d'hybridations multiples impliquant de manière récurrente les mêmes génotypes multilocus de *Pau* et de *Pam*. L'hybridation se serait donc produite dans deux directions : *Pam* et *Pau* ayant chacun joué le rôle de donneur oogonial et anthéridial. Un génotype multilocus dominant (80 % des isolats) a été retrouvé partout en Europe. Sa présence très répandue sur le continent est probablement due à une dispersion clonale de l'agent pathogène par les cours d'eau. L'assignation de progéniteurs putatifs aux génotypes multilocus de *Paa* nous a permis de mettre en évidence que la structure géographique de ses populations semble être influencée par les différents événements d'hybridation ayant généré l'hybride. Cette structure est notamment liée à la contribution génomique du parent *Pau*, espèce invasive en Europe. En effet, une structure géographique sépare les isolats du nord-est de ceux du sud-ouest de l'Europe. Enfin, la fréquence du génotype majoritaire de *Paa* a augmenté au cours des années : une diminution de la richesse clonale a pu être observée. Ceci pourrait s'expliquer par des processus de sélection favorisant le génotype dominant, alors mieux adapté aux conditions environnantes.

#### ***D. Étude des facteurs climatiques favorisant le dépérissement de l'aulne glutineux***

L'effet de la température des rivières sur la prévalence de la maladie a été mis en évidence lors d'études antérieures. En effet, Thoirain *et al.* (2007) ont montré que la prévalence de la maladie était plus importante dans les sites plus chauds. Néanmoins, un biais de cette étude était que les sites les plus chauds correspondaient à des sites situés principalement en aval des rivières. Du fait de la dissémination de l'agent pathogène par les cours d'eau, la probabilité d'introduire la maladie dans les zones en aval des rivières est plus forte qu'en amont. Ainsi,

les sites en aval des rivières devraient, en moyenne, avoir été contaminés avant les sites localisés plus en amont. Il est toutefois important de remarquer que ce biais serait plus fort dans les étapes initiales de l'installation de la maladie. Elegbede *et al.* (2010) ont ainsi démontré qu'une fois que la maladie est installée sur un site, l'infection la plus importante se fait sur des distances courtes. Pour palier ce biais, nous avons décidé d'orienter la recherche en étudiant la dynamique de la maladie sur une échelle temporelle. L'étude de l'incidence de la maladie, c'est-à-dire le nombre de nouveaux cas d'arbres malades par an, est une mesure mieux adaptée que la prévalence pour investiguer l'évolution d'une épidémie. Pour cela, nous avons mis en place un dispositif de 16 parcelles sélectionnées selon un gradient de température de l'air dans le nord-est de la France. L'un des critères de sélection des placettes était qu'elles possèdent des taux d'infection médians et comparables pour que les arbres soient placés dans des conditions de pression d'inoculum homogènes. Pour étudier l'influence des facteurs climatiques sur l'incidence, tous les arbres d'une hauteur supérieure à 1,30 m ont été recensés et cartographiés dans chaque parcelle. Un suivi pluriannuel de l'état phytosanitaire des aulnes a été réalisé selon la méthode d'Elegbede *et al.* (2010) : nous avons donc noté l'état sanitaire du houppier et la présence ou l'absence de chancres sur le tronc. De plus, certaines caractéristiques édaphiques et hydrométriques pouvant influencer la dynamique de la maladie ont été mesurées (pH, texture, ratio Carbone/Azote, quantité de matière organique et vitesse du courant). Une approche stochastique en utilisant un modèle en compartiments (modèle SIR) a été choisie pour étudier l'impact de la maladie sur la dynamique de la population d'aulnes. Cette approche permet de formaliser les différentes interactions entre les hôtes aux divers stades de la maladie. Le modèle a été confronté à des données disponibles pour le sud-ouest de France pour la période 1998-2003. De plus, nous avons modélisé l'évolution historique de la prévalence de la maladie afin de tester si les conditions climatiques des 40 dernières années étaient favorables à l'installation de l'agent pathogène.

Un deuxième volet de cette étude a été l'analyse de la dynamique saisonnière de l'inoculum dans le sol. Des échantillons de sol ont été prélevés 3 fois par an sur chaque parcelle au pied de 6 arbres par site. Les arbres choisis présentaient des hauts niveaux infectieux d'après Elegbede *et al.* (2010). L'estimation de la quantité d'inoculum dans le sol a

été réalisée par piégeage biologique, selon le protocole mis en place par Elegbede *et al.* (2010).

Les résultats obtenus lors de cette investigation sont présentés dans l'étude IV : «**Modeling climate impact on *Phytophthora alni* induced alder decline**», actuellement en préparation.

Cette étude nous a permis de mettre en évidence une corrélation significative entre l'incidence du dépérissement de l'aulne dû au *Phytophthora* de l'aulne et les températures hivernales et estivales. L'incidence de la maladie semble répondre à ces températures avec un décalage dans le temps : l'incidence du dépérissement est inversement corrélée aux températures hivernales de l'année n-1. La température hivernale constituerait ainsi un facteur limitant pour la survie du *Phytophthora* de l'aulne. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la survie hivernale de *P. alni* est restreinte en raison de l'absence de spores de survie. Si les températures hivernales moyennes sont faibles, l'inoculum présent dans les tissus infectés ne parviendra pas à subsister. De ce fait, l'inoculum présent dans le sol a besoin d'une période de reconstitution dès que les conditions redeviennent favorables. En revanche, l'augmentation de la température estivale de l'année n-1 a un impact négatif sur le dépérissement. Des températures estivales moyennes plus hautes permettraient une guérison des arbres malades. Cet effet semble plus complexe à expliquer. La sécheresse du sol découlant d'une faible pluviométrie n'explique pas la diminution de l'incidence de la maladie. Il est possible que des facteurs relatifs à l'état physiologique des arbres ou aux conditions des sols (changements de communautés microbiologiques créant des conditions défavorables pour le développement de l'inoculum) puissent expliquer cet effet. L'impact différé de la température sur l'état sanitaire des arbres peut s'expliquer par le fait que les relevés de symptômes sur les placettes ont été réalisés tôt dans la saison, période où la quantité d'inoculum du sol commence seulement à augmenter. A cette période la maladie est encore peu active. Ainsi, les symptômes relevés à l'année n correspondent donc plutôt à l'activité de l'inoculum l'année n-1. Ceci s'explique par le fait que les symptômes détectés sur le houppier sont le résultat d'un effet tardif de la maladie.

La modélisation de données de prévalence par rapport au climat a révélé que les conditions des 40 dernières années ont été favorables à l'installation de la maladie. Ceci indique que le déclenchement de la maladie est plutôt lié à l'introduction de l'agent pathogène dans des zones où il n'existait pas auparavant et que les conditions climatiques étaient déjà réunies pour son établissement. En revanche, l'évolution future des épidémies du *Phytophthora* de l'aulne pourrait suivre des cours différents selon la zone géographique. En effet, une augmentation des températures hivernales dans le Nord-est de la France pourrait avoir des conséquences majeures sur la dynamique de l'épidémie, permettant la survie de l'agent pathogène.

## ***DISCUSSION GENERALE***

## V. Discussion générale

En combinant des approches de génétique des populations et de modélisation de l'impact du climat, ce travail nous a permis de clarifier certains aspects importants de l'émergence du *Phytophthora* de l'aulne. Cette étude est d'autant plus riche en enseignements que l'agent pathogène rassemble plusieurs caractéristiques fréquentes parmi les maladies dont la sévérité s'accroît : caractère invasif du pathogène, agent causal qui est un hybride interspécifique et importance du climat pour le développement de l'épidémie. Elle permet ainsi de construire des outils mobilisables pour l'étude d'autres maladies émergentes.

### A. Nouveau statut des espèces parentales

La connaissance rassemblée lors de ce travail permet de proposer une nouvelle nomenclature taxonomique pour les espèces parentales de l'hybride. En particulier, le statut d'espèce à part entière apparaît justifié pour *Pau*. Lors de ma thèse j'ai pu montrer que *Pau* est une espèce invasive en Europe. Les isollements effectués en Amérique du Nord ont mis en évidence sa présence alors que *Pam* et *Paa* n'ont pas été retrouvés. De plus, il présente des caractéristiques culturelles, génétiques et cytologiques relativement stables (Brasier *et al.* 1999, 2004; Ioos 2006). Nous proposons *Phytophthora uniformis* en remplacement de *Phytophthora alni* subsp. *uniformis* proposée par Brasier *et al.* (2004).

La détection récente de *Pau* en Amérique du Nord suite aux prospections menées par Adams *et al.* (2009) nous a permis de comparer deux populations de *Pau*, américaine et européenne. Cependant, cette étude n'a pas été exempte de difficultés : l'isolement de *Pau* en milieu naturel demande beaucoup d'efforts : la constitution d'un échantillonnage suffisant pour réaliser des études de génétique des populations est difficile. L'étude a donc été menée en comparant les deux populations continentales. Les résultats ont mis en évidence que les deux populations sont très divergentes et qu'il n'existe pas de flux de gènes entre elles. Bien que les données recueillies ne nous aient pas permis de déterminer avec certitude si l'Amérique du Nord est la zone d'origine de *Pau*, certaines caractéristiques de cette population tendent à soutenir cette hypothèse. Tout d'abord, la population américaine s'est révélée plus diversifiée que la population européenne : la diversité génotypique est distribuée en 10 génotypes. Ce constat est d'autant plus significatif que l'échantillonnage était plus

faible qu'en Europe. Toutefois, celui-ci a couvert une vaste zone de l'Alaska ainsi que deux sites dans l'Oregon. Par ailleurs, il semblerait que les *Pau* ne soit pas ou peu pathogène sur les aulnes en Alaska. Les prospections menées en Alaska ont eu pour but d'identifier les causes des dépérissements détectés sur *Alnus incana* subsp. *tenuifolia*. Néanmoins, elles n'ont pas permis de comprendre les causes de ce dépérissement (Adams *et al.* 2009). Des études complémentaires doivent être menées dans le but d'investiguer la pathogénicité des *Pau* américains sur les aulnes. La prospection, l'isolement et la caractérisation de nouvelles souches de *Pau* d'autres régions pourraient donner de nouvelles connaissances sur ce taxon. Par exemple en Europe deux souches isolées en Suède et en Italie se sont révélées différentes par rapport au génotype multilocus majoritaire. Le cas de la Suède est particulièrement intéressant : sur ce territoire les conditions de température peuvent être comparées à celles trouvées en Alaska. Une étude envisageable serait de comparer la diversité génétique d'une population plus large de *Pau* en Suède afin de vérifier si *Pau* serait mieux adapté aux conditions froides. Par ailleurs, la détection de *Pau* dans l'Oregon sera aussi source d'enseignements. Les isollements de *Pau* en Oregon ont été réalisés sur des nécroses racinaires sur *Alnus rubra*, une espèce d'aulne qui a été utilisée pour des plantations en France. Il semble pertinent de se demander si l'introduction de *Pau* en Europe est liée à l'introduction d'*Alnus rubra*.

La situation de *Pam* est moins claire. Le génotypage avec des marqueurs microsatellites et l'étude de la ploïdie de cette espèce semble confirmer l'hypothèse que *Pam* est tétraploïde. En effet, la cytométrie en flux et l'étude du nombre de copies d'allèles des gènes nucléaires montrent que la quantité d'ADN chez *Pam* est supérieure à celle trouvée chez *Pau* et chez *Paa*. Nos données de génotypage vont aussi dans ce sens, avec un nombre d'allèles chez *Pam* compris entre 1 et 4. Cependant, nos résultats ne permettent pas de tirer des conclusions quant à l'origine de *Pam* : l'échantillonnage qui est concentré sur trois régions (deux régions en France et une en Allemagne) n'est pas suffisant pour permettre de décrire la structure génétique de *Pam* en Europe. *Pam* pourrait constituer une ancienne espèce polyploïde établie depuis longtemps sur le continent européen. Il est intéressant de noter que lors des prospections menées en France pour la collecte d'échantillons, le site de la Durance a présenté des caractéristiques particulières. Les nombreux isollements réalisés sur plusieurs individus d'*Alnus incana* ont mis en évidence la présence unique de *Pam*. Le génotypage de ces



souches a montré en effet des niveaux de polymorphisme plus élevés que dans les autres zones étudiées. Ce site pourrait représenter une zone endémique de *Pam*, mais des collectes d'isolats supplémentaires doivent être effectuées pour clarifier ces hypothèses. Ainsi, l'origine géographique de *Pam* reste encore indéterminée. Ioos *et al.* (2006) ont suggéré que *Pam* pourrait constituer un allotétraploïde issu d'une hybridation interspécifique ancienne. Cependant, les espèces parentales putatives ayant pu contribuer aux allèles observés chez *Pam* n'ont pas été décrits à ce jour. Il est possible que ces taxons (i) n'aient pas été isolés suite à un biais d'échantillonnage, (ii) présentent une écologie différente, avec un spectre d'hôtes différents (iii) possèdent une origine géographique différente ou, (iv) ne soient plus existants (Ioos 2006). Il est important de signaler que tous les échantillons européens de *Pam*, ainsi que la plupart des *Pau* en Europe, proviennent d'isollements à partir de chancres sur l'aulne. Ce fait est important car *Pau* et *Pam* montrent une agressivité plus faible sur l'aulne glutineux que l'hybride *Paa* (Brasier et Kirk 2001; Santini *et al.* 2003). Une recherche des taxons parentaux dans le sol pourrait révéler l'existence de nouveaux génotypes ou même l'isolement des parents putatifs de *Pam*. Toutefois, une telle recherche exhaustive nécessite un investissement considérable. L'isolement de *Pau* par piégeage biologique des sols en Alaska en est un exemple : le taux d'isolement atteint en Alaska était d'une colonie de *Pau* isolé pour environ 100 *Phytophthora* spp. isolés. Cependant, les connaissances actuelles indiquent que *Pam* est un taxon complètement indépendant de *Pau* et *Paa*. Nous proposons qu'il soit élevé au rang d'espèce hybride en le renommant *Phytophthora x multiformis*.

### ***B. Nouvelles connaissances sur les événements d'hybridation***

Cette thèse nous a permis d'éclairer certains points sur les événements d'hybridation. Les génotypes observés chez *Paa* correspondent bien à la combinaison des génotypes observés chez *Pau* et chez *Pam*. Mes résultats montrent que la contribution de *Pau*, espèce diploïde, au génome de *Paa* serait du type haploïde et que la contribution de *Pam*, taxon présumé tétraploïde, au génome de *Paa* serait du type diploïde. J'ai en effet montré que *Paa* a subi une réduction chromosomique lors de l'événement d'hybridation, de manière similaire au cas des hybrides homoploïdes. Tout d'abord, l'étude des trois gènes nucléaires a révélé que le nombre de copies des allèles *Pau*-spécifiques ou *Pam*-spécifiques est environ deux fois plus faible chez *Paa* par rapport aux espèces parentales *Pau* et *Pam*. De plus, la cytométrie en flux a

montré que la quantité d'ADN totale chez *Paa* est à peu près égale à la moitié de la somme de la quantité d'ADN des espèces parentales. Ces données ont été également confortées par le génotypage de *Paa* : entre 1 et 3 allèles ont été identifiés pour ce taxon. La réduction chromosomique lors d'un événement d'hybridation est un mécanisme déjà décrit chez les plantes et les champignons (Leitch and Bennett 2004; Comai 2005; Giraud *et al.* 2008). De plus, la présence des deux types mitochondriaux chez *Paa* (mitotype M et U) suggère que l'hybridation s'est produite dans les deux directions (Ioos 2006), *Pam* et *Pau* ayant chacun joué le rôle de donneur oogonial et anthéridial.

J'ai pu mettre en évidence que l'hybridation s'est probablement produite de nombreuses fois. En effet, l'étude de parentalité montre que différentes combinaisons des parents peuvent expliquer la formation d'une majorité des génotypes multilocus. Puisqu'au sein d'un même génotype multilocus nous avons pu trouver les deux mitotypes, les génotypes multilocus observés ne sont pas des vraies lignées clonales et nous sous-estimons probablement la fréquence des événements d'hybridation.

### ***C. Nouvelles connaissances sur la biologie de Paa***

*Paa* a probablement une dispersion clonale via les cours d'eau ou les plants de pépinière infectés. Il a été montré que les oospores de *Paa* ont une faible viabilité en conditions expérimentales (Delcán et Brasier 2001) suggérant que cette espèce ne peut pas se reproduire par voie sexuée. Ceci est tout à fait cohérent avec le fait que *Paa* est une espèce triploïde. L'addition de plusieurs jeux de chromosomes chez un hybride allopolyploïde entraîne des anomalies notamment dans la méiose, ce qui peut empêcher l'appariement de chromosomes homologues et leur recombinaison (Albertin et Marullo 2012). De plus, la présence d'un faible niveau de polymorphisme malgré les 28 génotypes multilocus observés, avec un génotype dominant représentant plus de 80% des isolats, est un indice supplémentaire de la clonalité de l'espèce (Halkett *et al.* 2005; Arnaud-Haond *et al.* 2007). La reproduction végétative semble être une condition importante pour que les hybrides d'apparition récente puissent émerger en tant qu'espèce indépendante de ses progéniteurs (Chapman et Burke 2007; Lo 2010; Robertson *et al.* 2010; Man in't Veld *et al.* 2012). Cette condition leur permettra dans un premier temps de diverger de leurs progéniteurs après l'acquisition de nouveaux traits génétiques et phénotypiques hérités.

La diversité génotypique de *Paa* a diminué au cours des années, aboutissant à l'augmentation progressive de la fréquence d'un génotype multilocus devenu largement dominant. Cet accroissement de la fréquence d'un génotype par rapport aux autres est souvent lié à des processus de sélection qui favorisent les génotypes présentant des caractéristiques phénotypiques plus avantageuses (Pan et Price 2001). Une des pressions de sélection potentielles est la capacité à survivre durant des hivers froids où à infecter efficacement les aulnes durant les étés chauds. En effet, j'ai montré que ces conditions climatiques étaient défavorables à la maladie. D'autres pressions possibles sont celles qui jouent sur l'agressivité telles que l'efficacité d'infection, le taux de sporulation ou la durée de latence (Pariaud *et al.* 2009).

Les résultats de ma thèse confirment que *Paa* est un hybride autonome de ses parents. Un hybride qui a développé la capacité de se reproduire indépendamment de ses parents est considéré comme « stable » (Chapman and Burke 2007; Paun *et al.* 2009). Cette condition va lui permettre d'éviter la compétition avec ses progéniteurs. Nous avons vu que *Paa* présente une agressivité renforcée par rapport à *Pau* et *Pam* : dans la majorité de sites visités lors des collectes d'échantillons, *Paa* est isolé plus fréquemment. Par conséquent, il semble pertinent d'élever *Paa* au rang d'espèce hybride en le renommant *Phytophthora x alni*.

#### ***D. Nouvelles hypothèses sur l'émergence***

En premier lieu nos résultats ont permis de mettre en évidence que l'espèce parentale *Pau* a été introduite en Europe. Cet événement pourrait constituer un phénomène clé dans la genèse de l'hybride *Paa*. La rencontre entre *Pau* et *Pam* aurait permis la genèse de l'hybride en Europe. D'après nos données l'hybridation est un événement qui se serait produit plusieurs fois, avec différentes combinaisons de progéniteurs *Pam* et *Pau*, comme déjà suggéré par Ioos *et al.* (2006). Le niveau de polymorphisme trouvé chez *Paa* reflète la variabilité rencontrée chez les espèces parentales, qui est finalement très faible. En effet, les populations de *Paa* montrent une structure géographique significative liée à la contribution génomique de ses parents. Cette structuration provient notamment d'une contribution génomique du parent exotique *Pau*. L'hybridation pourrait s'être produite principalement dans les pépinières (Jung and Blaschke 2004; Schumacher *et al.* 2006). Ainsi, nous pouvons en déduire que l'introduction de *Paa* dans des zones saines à partir de matériel contaminé a été déterminante

pour le déclenchement de l'épidémie. En effet, la modélisation des données historiques du climat et son impact sur la prévalence de la maladie a montré que les conditions pour l'établissement de la maladie en France étaient réunies depuis au moins 40 ans.

### ***E. Evolution de l'épidémie***

Bien que l'émergence de *Paa* ne semble pas pouvoir s'expliquer par l'évolution du climat, la maladie reste très liée aux conditions environnementales et particulièrement aux températures estivales et hivernales. J'ai montré que la sévérité du dépérissement de l'aulne à *P. alni* est significativement dépendante de températures estivales modérées et d'hivers doux. L'effet de la température hivernale peut s'expliquer par le fait que la survie de *P. alni* est limitée en raison de l'absence de spores de résistance (Delcán et Brasier 2001; Brasier *et al.* 2004; Jung et Blaschke 2004; Elegbede *et al.* 2010). Ainsi, les hivers doux sont favorables au développement des épidémies annuelles de l'oomycete. En effet, il était connu que *P. alni* survivait mal dans les tissus infectés en cas de températures hivernales faibles pendant une longue période (Schumacher *et al.* 2006; Cerny et Strnadova 2012). Nous avons démontré au cours de ce travail que l'agent pathogène peut voir sa population fortement réduite dans le sol lorsque les conditions sont défavorables. Ceci est conforté par l'étude de la dynamique de l'inoculum dans le sol, qui montre un fort effet saisonnier. En effet, la quantité de l'inoculum du sol tend à augmenter pendant le printemps, alors qu'elle reste à des niveaux stables durant l'été et l'automne. En revanche, l'effet défavorable des températures estivales élevées semble moins facile à expliquer. Toutefois, cet effet apparaît robuste car il a été observé pour les mêmes gammes de température dans le bassin Rhin-Meuse et dans la Charente. Des températures estivales moyennes plus hautes entraînent surtout une diminution du taux de dépérissement. Plusieurs causes peuvent expliquer cet effet : état physiologique des arbres ou conditions des sols. En particulier la température peut induire un changement des communautés microbiologiques susceptible de créer des conditions défavorables pour le développement de l'inoculum. Les facteurs ayant un rôle sur le développement de la maladie sont nombreux, et leur influence est parfois difficile à comprendre. Il serait intéressant d'analyser par exemple l'effet du taux atmosphérique de CO<sub>2</sub> sur l'état de santé des aulnes, la température n'est, en effet, pas la seule composante qui varie avec le réchauffement climatique.

Le modèle développé pendant ma thèse a révélé que la dynamique de la maladie est dépendante des conditions climatiques locales. En effet, la température hivernale ne constitue pas un facteur limitant dans les sites plus chauds. Ainsi, l'évolution future des épidémies du *Phytophthora* de l'aulne pourrait suivre des cours différents selon la zone géographique. En effet, une augmentation des températures hivernales dans le Nord-Est de la France pourrait avoir des conséquences favorables majeures sur la survie de l'agent pathogène. Il serait intéressant de modéliser l'évolution de l'épidémie en testant différents scénarios de changements climatiques.

## ***REFERENCES***

## VI. Références

- Adams GC, Catal M, Trummer LM, 2009. Distribution and severity of alder *Phytophthora* in Alaska. In: Gen. Tech. Rep. PSW-GTR-229. Department of Agriculture FS (Ed.), Proceedings of the sudden oak death fourth science symposium, Albany, CA. USA, pp. 29–49.
- Adams KL, Cronn R, Percifield R, Wendel JF, 2003. Genes duplicated by polyploidy show unequal contributions to the transcriptome and organ-specific reciprocal silencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 4649–4654.
- Ahmed S, Labrouhe DT de, Delmotte F, 2012. Emerging virulence arising from hybridisation facilitated by multiple introductions of the sunflower downy mildew pathogen *Plasmopara halstedii*. *Fungal Genetics and Biology*. Online publication no.doi.org/10.1016/j.fgb.2012.06.012.
- Anderson PK, Cunningham AA, Patel NG, Morales FJ, Epstein PR, Daszak P, 2004. Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends in Ecology & Evolution* 19: 535–544.
- Arnaud-Haond S, Duarte CM, Alberto F, Serrão EA, 2007. Standardizing methods to address clonality in population studies. *Molecular Ecology* 16: 5115–5139.
- Bakonyi J, Nagy ZÁ, Érsek T, 2006. PCR-based DNA markers for identifying hybrids within *Phytophthora alni*. *Journal of Phytopathology* 154: 168–177.
- Bergot M, Cloppet E, Pérarnaud V, Déqué M, Marçais B, Desprez-Loustau M-L, 2004. Simulation of potential range expansion of oak disease caused by *Phytophthora cinnamomi* under climate change. *Global Change Biology* 10: 1539–1552.
- Bilodeau GJ, Lévesque CA, Cock AWAM de, Duchaine C, Brière S, Uribe P, Martin FN, Hamelin RC, 2007. Molecular detection of *Phytophthora ramorum* by real-time polymerase chain reaction using TaqMan, SYBR green and molecular beacons. *Phytopathology* 97: 632–642.

- Blair JE, Coffey MD, Park S-Y, Geiser DM, Kang S, 2008. A multi-locus phylogeny for *Phytophthora* utilizing markers derived from complete genome sequences. *Fungal Genetics and Biology* 45: 266–277.
- Bonants PJM, Hagenaar-de Weerd M, Man In't Veld WA, Baayen RP, 2000. Molecular characterization of natural hybrids of *Phytophthora nicotianae* and *P. cactorum*. *Phytopathology* 90: 867–874.
- Bonants P, Weerd MH, Gent-Pelzer M van, Lacourt I, Cooke D, Duncan J, 1997. Detection and identification of *Phytophthora fragariae* Hickman by the polymerase chain reaction. *European Journal of Plant Pathology* 103: 345–355.
- Brasier CM, 2009. *Phytophthora* biodiversity: how many *Phytophthora* species are there? (EM Goheen and SJ Frankel, Eds.). General Technical Report - Pacific Southwest Research Station, USDA Forest Service.
- Brasier CM, 2001. Rapid evolution of introduced plant pathogens via interspecific hybridization. *BioScience* 51: 123–133.
- Brasier CM, 2000. Plant pathology: The rise of the hybrid fungi. *Nature* 405: 134–135.
- Brasier CM, 1995. Episodic selection as a force in fungal microevolution, with special reference to clonal speciation and hybrid introgression. *Canadian Journal of Botany* 73: 1213–1221.
- Brasier CM, 1992. Evolutionary biology of *Phytophthora*. *Annual Review of Phytopathology*. 30: 153–170.
- Brasier CM, Cooke DEL, Duncan JM, 1999. Origin of a new *Phytophthora* pathogen through interspecific hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96: 5878–5883.
- Brasier CM, Kirk SA, 2001. Comparative aggressiveness of standard and variant hybrid alder *Phytophthoras*, *Phytophthora cambivora* and other *Phytophthora* species on bark of *Alnus*, *Quercus* and other woody hosts. *Plant Pathology* 50: 218–229.



- Brasier CM, Kirk SA, Delcán J, Cooke DEL, Jung T, Man In't Veld WA, 2004. *Phytophthora alni* sp. nov. and its variants: designation of emerging heteroploid hybrid pathogens spreading on *Alnus* trees. *Mycological Research* 108: 1172–1184.
- Brasier CM, Rose J, Gibbs JN, 1995. An unusual *Phytophthora* associated with widespread alder mortality in Britain. *Plant Pathology* 44: 999–1007.
- Bush EA, Hong C, Stromberg EL, 2003. Fluctuations of *Phytophthora* and *Pythium* spp. in components of a recycling irrigation system. *Plant Disease* 87: 1500–1506.
- Catalán P, Segarra-Moragues JG, Palop-Esteban M, Moreno C, González-Candelas F, 2006. A Bayesian approach for discriminating among alternative inheritance hypotheses in plant polyploids: The allotetraploid origin of genus *Borderea* (Dioscoreaceae). *Genetics* 172: 1939–1953.
- Cech T, Hendry S, 2003. A review of diebacks and declines of alder (*Alnus* spp.) in Europe. In: *Phytophthora* disease of Alder in Europe, Forest Research Bulletin 126, Edinburgh, p. 126.
- Chandelier A, Abras S, Laurent F, Debruxelles N, Cavelier M, 2006. Effect of temperature and bacteria on sporulation of *Phytophthora alni* in river water. *Communications in agricultural and applied biological sciences* 71: 873–880.
- Chadfield V, Pautasso M, 2012. *Phytophthora ramorum* in England and Wales: which environmental variables predict county disease incidence? *Forest Pathology* 42: 150–159.
- Chapman MA, Burke JM, 2007. Genetic divergence and hybrid speciation. *Evolution* 61: 1773–1780.
- Claessens H, 2003. The alder populations of Europe. In: *Phytophthora* disease of Alder in Europe, Gibbs, J., Van Dijk, C., and Webber, J., Edinburgh, p. 82.
- Clemenz C, Fleischmann F, Häberle K-H, Matyssek R, Oßwald W, 2008. Photosynthetic and leaf water potential responses of *Alnus glutinosa* saplings to stem-base inoculation with *Phytophthora alni* subsp. *alni*. *Tree Physiology* 28: 1703–1711.
- Cushman JH, Meentemeyer RK, 2008. Multi-scale patterns of human activity and the incidence of an exotic forest pathogen. *Journal of Ecology* 96: 766–776.

Delcán, Brasier, 2001. Oospore viability and variation in zoospore and hyphal tip derivatives of the hybrid alder *Phytophthora*. *Forest Pathology* 31: 65–83.

Delmotte F, Giresse X, Richard-Cervera S, M'Baya J, Vear F, Tourvieille J, Walser P, Labrouhe DT de, 2008. Single nucleotide polymorphisms reveal multiple introductions into France of *Plasmopara halstedii*, the plant pathogen causing sunflower downy mildew. *Infection, Genetics and Evolution* 8: 534–540.

Desprez-Loustau M-L, 2010. Invasions biologiques et émergences de maladies. In: Les maladies émergentes. Épidémiologie chez le végétal, l'animal et l'homme, Synthèses. Quae, Versailles, p. 444.

Desprez-Loustau M-L, Courtecuisse R, Robin C, Husson C, Moreau P-A, Blancard D, Selosse M-A, Lung-Escarmant B, Piou D, Sache I, 2010. Species diversity and drivers of spread of alien fungi (*sensu lato*) in Europe with a particular focus on France. *Biological Invasions* 12: 157–172.

Desprez-Loustau M-L, Robin C, Buée M, Courtecuisse R, Garbaye J, Suffert F, Sache I, Rizzo DM, 2007. The fungal dimension of biological invasions. *Trends in Ecology & Evolution* 22: 472–480.

Dlugosch KM, Parker IM, 2008. Founding events in species invasions: genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. *Molecular Ecology* 17: 431–449.

Dobrowolski MP, Tommerup IC, Shearer BL, O'Brien PA, 2003. Three clonal lineages of *Phytophthora cinnamomi* in Australia revealed by microsatellites. *Phytopathology* 93: 695–704.

Downing MC, Jung T, Thomas V, Blaschke M, Tuffly MF, Reich R, 2010. Estimating the susceptibility to *Phytophthora alni* globally using both statistical analyses and expert knowledge. (JM Pye, HM Rauscher, Y Sands, DC Lee, and JS Beatty, Eds.). General Technical Report - Pacific Northwest Research Station, USDA Forest Service.

Durán A, Gryzenhout M, Drenth A, Slippers B, Ahumada R, Wingfield BD, Wingfield MJ, 2010. AFLP analysis reveals a clonal population of *Phytophthora pinifolia* in Chile. *Fungal Biology* 114: 746–752.

- Dutech C, Barrès B, Bridier J, Robin C, Milgroom MG, Ravigné V, 2012. The chestnut blight fungus world tour: successive introduction events from diverse origins in an invasive plant fungal pathogen. *Molecular Ecology* 21 (16):3931-3946.
- Dutech C, Enjalbert J, Fournier E, Delmotte F, Barrès B, Carlier J, Tharreau D, Giraud T, 2007. Challenges of microsatellite isolation in fungi. *Fungal Genetics and Biology* 44: 933–949.
- Elegbede CF, Pierrat J-C, Aguayo J, Husson C, Halkett F, Marçais B, 2010. A statistical model to detect asymptomatic infectious individuals with an application in the *Phytophthora alni*-induced Alder decline. *Phytopathology* 100: 1262–1269.
- Érsek T, English J, Schoelz J, 1995. Creation of species hybrids of *Phytophthora* with modified host ranges by zoospore fusion. *Phytopathology* 85: 1343–1347.
- Erwin DC, Ribeiro OK, 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. Department of Plant Pathology, University of California, Riverside, USA. American Phytopathological Society (APS Press) American Phytopathological Society (APS Press).
- Esselink GD, Nybom H, Vosman B, 2004. Assignment of allelic configuration in polyploids using the MAC-PR (microsatellite DNA allele counting—peak ratios) method. *Theoretical and Applied Genetics* 109: 402–408.
- Fabre B, Piou D, Desprez-Loustau M-L, Marçais B, 2011. Can the emergence of pine *Diplodia* shoot blight in France be explained by changes in pathogen pressure linked to climate change? *Global Change Biology* 17: 3218–3227.
- Fitzpatrick B, Fordyce J, Niemiller M, Reynolds R, 2012. What can DNA tell us about biological invasions? *Biological Invasions* 14: 245–253.
- Frey P, 2009. L'hybridation interspécifique chez les champignons phytopathogènes à l'origine de nouvelles maladies. *BioFutur* 28: 36–39.
- Garbelotto M, Pautasso M, 2012. Impacts of exotic forest pathogens on Mediterranean ecosystems: four case studies. *European Journal of Plant Pathology* 133: 101–116.
- Garbelotto M, 2008. Molecular analysis to study invasions by forest pathogens: examples from Mediterranean ecosystems. *Phytopathologia Mediterranea* 47: 183–203.

- Gerlach WWP, Mueller-Starck G, Schubert R, 2004. Rapid PCR-based detection of *Phytophthora citricola* in naturally infested soil samples using synthetic bait. *Zeitschrift Fur Pflanzenkrankheiten Und Pflanzenschutz-Journal of Plant Diseases and Protection* 111: 209–217.
- Gibbs JN, 2003a. Introducing *Phytophthora* disease of alder. In: *Phytophthora disease of Alder in Europe*, Forest Research Bulletin 126, Edinburgh, p. 126.
- Gibbs JN, 2003b. Management and control of *Phytophthora* disease of alder. In: *Phytophthora disease of Alder in Europe*, Forest Research Bulletin 126, Edinburgh, p. 126.
- Gibbs JN, Lipscombe MA, Peace AJ, 1999. The impact of *Phytophthora* disease on riparian populations of common alder (*Alnus glutinosa*) in southern Britain. *European Journal of Forest Pathology* 29: 39–50.
- Giraud T, Enjalbert J, Fournier E, Delmotte F, Dutech C, 2008. Population genetics of fungal diseases of plants. *Parasite* 15: 449–454.
- Giraud T, Refrégier G, Gac M Le, Vienne DM de, Hood ME, 2008. Speciation in fungi. *Fungal Genetics and Biology* 45: 791–802.
- Gninenko YI, Zhukov AM, Komarova IA, 2010. A new dangerous disease of alder in Russia. *Zashchita i Karantin Rastenii* 2: 45.
- Gómez-Alpizar L, Carbone I, Ristaino JB, 2007. An Andean origin of *Phytophthora infestans* inferred from mitochondrial and nuclear gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 3306–3311.
- Gonthier P, Nicolotti G, Linzer R, Guglielmo F, Garbelotto M, 2007. Invasion of European pine stands by a North American forest pathogen and its hybridization with a native interfertile taxon. *Molecular Ecology* 16: 1389–1400.
- Gonthier P, Warner R, Nicolotti G, Mazzaglia A, Garbelotto MM, 2004. Pathogen introduction as a collateral effect of military activity. *Mycological Research* 108: 468–470.
- Goodwin SB, 1997. The population genetics of *Phytophthora*. *Phytopathology* 87: 462–473.

- Goodwin SB, Cohen BA, Deahl KL, Fry WE, 1994a. Migration from northern Mexico as the probable cause of recent genetic changes in populations of *Phytophthora infestans* in the United States and Canada. *Phytopathology* 84: 553–558.
- Goodwin SB, Cohen BA, Fry WE, 1994b. Panglobal distribution of a single clonal lineage of the Irish potato famine fungus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91: 11591–11595.
- Goss EM, Cardenas ME, Myers K, Forbes GA, Fry WE, Restrepo S, Grünwald NJ, 2011. The plant pathogen *Phytophthora andina* emerged via hybridization of an unknown *Phytophthora* species and the Irish potato famine pathogen, *P. infestans*. *PLoS ONE* 6(9): e24543. doi:10.1371/journal.pone.0024543
- Goss EM, Carbone I, Grünwald NJ, 2009. Ancient isolation and independent evolution of the three clonal lineages of the exotic sudden oak death pathogen *Phytophthora ramorum*. *Molecular Ecology* 18: 1161–1174.
- Grünwald NJ, Garbelotto M, Goss EM, Heungens K, Prospero S, 2012. Emergence of the sudden oak death pathogen *Phytophthora ramorum*. *Trends in Microbiology* 20: 131–138.
- Grünwald NJ, Goss EM, Press CM, 2008. *Phytophthora ramorum*: a pathogen with a remarkably wide host range causing sudden oak death on oaks and blight on woody ornamentals. *Molecular Plant Pathology* 9: 729–740.
- Halkett F, Simon J-C, Balloux F, 2005. Tackling the population genetics of clonal and partially clonal organisms. *Trends in Ecology & Evolution* 20: 194–201.
- Hansen EM, 2008. Alien forest pathogens: *Phytophthora* species are changing world forests. *Boreal Environment Research* 13: 33–41.
- Hargreaves A, Duncan J, 1978. Detection of *Phytophthora* species in field soils by simple baiting procedures. *Soil Biology & Biochemistry* 10: 343–345.
- Harvell CD, Mitchell CE, Ward JR, Altizer S, Dobson AP, Ostfeld RS, Samuel MD, 2002. Climate warming and disease risks for terrestrial and marine biota. *Science* 296: 2158–2162.
- Hausbeck MK, Lamour KH, 2004. *Phytophthora capsici* on vegetable crops: Research progress and management challenges. *Plant Disease* 88: 1292–1303.

Husson C, Scala B, Caël O, Frey P, Feau N, Ioos R, Marçais B, 2011. *Chalara fraxinea* is an invasive pathogen in France. *European Journal of Plant Pathology* 130: 311–324.

Husson C, Thoirain B, Ioos R, Frey P, Marçais B, 2006. L'eau, vecteur d'agents pathogènes: cas du *Phytophthora* de l'aulne. *Revue forestière française*: 351–360.

Inderbitzin P, Davis RM, Bostock RM, Subbarao KV, 2011. The Ascomycete *Verticillium longisporum* is a hybrid and a plant pathogen with an expanded host range. *PLoS ONE* 6: e18260.

Ioos R, Barrès B, Andrieux A, Frey P, 2007a. Characterization of microsatellite markers in the interspecific hybrid *Phytophthora alni* ssp. *alni*, and cross-amplification with related taxa. *Molecular Ecology Notes* 7: 133–137.

Ioos R, Panabières F, Industri B, Andrieux A, Frey P, 2007b. Distribution and expression of elicitor genes in the interspecific hybrid oomycete *Phytophthora alni*. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 5587–5597.

Ioos R, 2006. Caractérisation génétique de *Phytophthora alni* Brasier & S.A Kirk, hybride interspécifique agent du dépérissement de l'aulne en Europe. Thèse de doctorat. Université Henri Poincaré, Nancy I. France

Ioos R, Andrieux A, Marçais B, Frey P, 2006. Genetic characterization of the natural hybrid species *Phytophthora alni* as inferred from nuclear and mitochondrial DNA analyses. *Fungal Genetics and Biology* 43: 511–529.

Ioos R, Husson C, Andrieux A, Frey P, 2005. SCAR-based PCR primers to detect the hybrid pathogen *Phytophthora alni* and its subspecies causing alder disease in Europe. *European Journal of Plant Pathology* 112: 323–335.

IPCC, 2007. Climate Change 2007 - Impacts, adaptation and vulnerability. In: Contribution of working group II to the fourth assessment report of the IPCC, Cambridge University Press Cambridge, UK.

Ippolito A, Schena L, Nigro F, 2002. Detection of *Phytophthora nicotianae* and *P. citrophthora* in citrus roots and soils by nested PCR. *European Journal of Plant Pathology* 108: 855–868.

- Jung T, Blaschke M, 2004. *Phytophthora* root and collar rot of alders in Bavaria: distribution, modes of spread and possible management strategies. *Plant Pathology* 53: 197–208.
- Kong P, Lea-Cox JD, Hong CX, 2012. Effect of electrical conductivity on survival of *Phytophthora alni*, *P. kernoviae* and *P. ramorum* in a simulated aquatic environment. *Plant Pathology*. Online publication. doi: 10.1111/j.1365-3059.2012.02614.x.
- Kong P, Moorman GW, Lea-Cox JD, Hong CX, 2011. Survival of *Phytophthora alni*, *P. kernoviae* and *P. ramorum* in a simulated aquatic environment at different levels of pH. *Phytopathology* 101: S93.
- Kong P, Hong C, Jeffers SN, Richardson PA, 2003. A species-specific polymerase chain reaction assay for rapid detection of *Phytophthora nicotianae* in irrigation water. *Phytopathology* 93: 822–831.
- Kroon LPNM, Brouwer H, Cock AWAM de, Govers F, 2012. The genus *Phytophthora* anno 2012. *Phytopathology* 102: 348–364.
- Lievens B, Brouwer M, Vanachter ACRC, Cammue BPA, Thomma BPHJ, 2006. Real-time PCR for detection and quantification of fungal and oomycete tomato pathogens in plant and soil samples. *Plant Science* 171: 155–165.
- Liew ECY, Maclean DJ, Irwin JAG, 1998. Specific PCR based detection of *Phytophthora medicaginis* using the intergenic spacer region of the ribosomal DNA. *Mycological Research* 102: 73–80.
- Lo EYY, 2010. Testing hybridization hypotheses and evaluating the evolutionary potential of hybrids in mangrove plant species. *Journal of Evolutionary Biology* 23: 2249–2261.
- Lonsdale D, 2003. *Phytophthora* disease of alder: sources of inoculum, infection and host colonisation. In: *Phytophthora disease of Alder in Europe*, Forest Research Bulletin 126, Edinburgh, p. 126.
- Malausa T, Gilles A, Megléc E, Blanquart H, Duthoy S, Costedoat C, Dubut V, Pech N, Castagnone-Sereno P, Délye C, Feau N, Frey P, Gauthier P, Guillemaud T, Hazard L, Corre V Le, Lung-Escarmant B, Malé P-JG, Ferreira S, Martin J-F, 2011. High-throughput

microsatellite isolation through 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing of enriched DNA libraries. *Molecular Ecology Resources* 11: 638–644.

Man in't Veld WA, Cock A de, Summerbell R, 2007. Natural hybrids of resident and introduced *Phytophthora* species proliferating on multiple new hosts. *European Journal of Plant Pathology* 117: 25–33.

Man in't Veld WA, Rosendahl K, Hong C, 2012. *Phytophthora Xserendipita* sp. nov. and *P. Xpelgrandis*, two destructive pathogens generated by natural hybridization. *Mycologia*. Online publication ndoi: 10.3852/11-272

Marçais B, Bouhot-Delduc L, Tacon F Le, 2000. Effets possibles des changements globaux sur les micro-organismes symbiotiques et pathogènes et les insectes ravageurs des forêts. *Revue forestière française*: 99–118.

Martin FN, Abad ZG, Balci Y, Ivors K, 2012. Identification and detection of *Phytophthora*: Reviewing our progress, identifying our needs. *Plant Disease* 96: 1080–1103.

Martin FN, Tooley PW, Blomquist C, 2004. Molecular detection of *Phytophthora ramorum*, the causal agent of sudden oak death in California, and two additional species commonly recovered from diseased plant material. *Phytopathology* 94: 621–631.

Mascheretti S, Croucher PJP, Vettraino A, Prospero S, Garbelotto M, 2008. Reconstruction of the sudden oak death epidemic in California through microsatellite analysis of the pathogen *Phytophthora ramorum*. *Molecular Ecology* 17: 2755–2768.

McDonald BA, Linde C, 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* 40: 349–379.

Meng J, Wang Y, 2010. Rapid detection of *Phytophthora nicotianae* in infected tobacco tissues and soil samples based on its *Ypt1* gene. *Journal of Phytopathology* 158: 1–7.

Merlier D De, Chandelier A, Debruxelles N, Noldus M, Laurent F, Dufays E, Claessens H, Cavelier M, 2005. Characterization of alder *Phytophthora* isolates from Wallonia and development of SCAR primers for their specific detection. *Journal of Phytopathology* 153: 99–107.



- Montarry J, Andrivon D, Glais I, Corbiere R, Mialdea G, Delmotte F, 2010. Microsatellite markers reveal two admixed genetic groups and an ongoing displacement within the French population of the invasive plant pathogen *Phytophthora infestans*. *Molecular Ecology* 19: 1965–1977.
- Moralejo E, Pérez-Sierra AM, Álvarez LA, Belbahri L, Lefort F, Descals E, 2009. Multiple alien *Phytophthora* taxa discovered on diseased ornamental plants in Spain. *Plant Pathology* 58: 100–110.
- Nagy ZÁ, Bakonyi J, Érsek T, 2003. Standard and Swedish variant types of the hybrid alder *Phytophthora* attacking alder in Hungary. *Pest Management Science* 59: 484–492.
- Navarro E, Bousquet J, Moiroud A, Munive A, Piou D, Normand P, 2003. Molecular phylogeny of *Alnus* (Betulaceae), inferred from nuclear ribosomal DNA ITS sequences. *Plant and Soil* 254: 207–217.
- Newcombe G, Stirling B, McDonald S, Bradshaw Jr HD, 2000. *Melampsora* × *columbiana*, a natural hybrid of *M. medusae* and *M. occidentalis*. *Mycological Research* 104: 261–274.
- Nielsen K, Yohalem D, 2001. Origin of a polyploid *Botrytis* pathogen through interspecific hybridization between *Botrytis aclada* and *B. byssoidea*. *Mycologia* 93: 1064–1071.
- Olson Å, Stenlid J, 2002. Pathogenic fungal species hybrids infecting plants. *Microbes and Infection* 4: 1353–1359.
- Ordoñez ME, Kolmer JA, 2007. Simple sequence repeat diversity of a worldwide collection of *Puccinia triticina* from durum wheat. *Phytopathology* 97: 574–583.
- Pariaud B, Ravigné V, Halkett F, Goyeau H, Carlier J, Lannou C, 2009. Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens. *Plant Pathology* 58: 409–424.
- Pettitt TR, Wakeham AJ, Wainwright MF, White JG, 2002. Comparison of serological, culture, and bait methods for detection of *Pythium* and *Phytophthora* zoospores in water. *Plant Pathology* 51: 720–727.
- Prospero S, Hansen EM, Grünwald NJ, Winton LM, 2007. Population dynamics of the sudden oak death pathogen *Phytophthora ramorum* in Oregon from 2001 to 2004. *Molecular Ecology* 16: 2958–2973.

- Raboin LM, Selvi A, Oliveira KM, Paulet F, Calatayud C, Zapater MF, Brottier P, Luzaran R, Garsmeur O, Carlier J, D'Hont A, 2007. Evidence for the dispersal of a unique lineage from Asia to America and Africa in the sugarcane fungal pathogen *Ustilago scitaminea*. *Fungal Genetics and Biology* 44: 64–76.
- Rieseberg LH, Raymond O, Rosenthal DM, Lai Z, Livingstone K, Nakazato T, Durphy JL, Schwarzbach AE, Donovan LA, Lexer C, 2003. Major ecological transitions in wild sunflowers facilitated by hybridization. *Science* 301: 1211–1216.
- Ristaino JB, Gumpertz ML, 2000. New frontiers in the study of dispersal and spatial analysis of epidemics caused by species in the Genus *Phytophthora*. *Annual Review of Phytopathology* 38: 541–576.
- Robertson A, Rich TCG, Allen AM, Houston L, Roberts C, Bridle JR, Harris SA, Hiscock SJ, 2010. Hybridization and polyploidy as drivers of continuing evolution and speciation in *Sorbus*. *Molecular Ecology* 19: 1675–1690.
- Sache I, 2010. Les maladies émergentes affectant les végétaux. In: Les maladies émergentes. Epidémiologie chez le végétal, l'animal et l'homme, Synthèses. Quae, Versailles, pp. 21–31.
- Santini A, Barzanti GP, Capretti P, 2003. Susceptibility of some mesophilic hardwoods to Alder *Phytophthora*. *Journal of Phytopathology* 151: 406–410.
- Schardl CL, Craven KD, 2003. Interspecific hybridization in plant-associated fungi and oomycetes: a review. *Molecular Ecology* 12: 2861–2873.
- Shearer B, Dillon M, Kinal J, Buehrig R, 2010. Temporal and spatial soil inoculum dynamics following *Phytophthora cinnamomi* invasion of *Banksia* woodland and *Eucalyptus marginata* forest biomes of south-western Australia. *Australasian Plant Pathology* 39: 293–311.
- Schena L, Duncan JM, Cooke DEL, 2008. Development and application of a PCR-based 'molecular tool box' for the identification of *Phytophthora* species damaging forests and natural ecosystems. *Plant Pathology* 57: 64–75.

- Scibetta S, Schena L, Chimento A, Cacciola SO, Cooke DEL, 2012. A molecular method to assess *Phytophthora* diversity in environmental samples. *Journal of Microbiological Methods* 88: 356–368.
- Shriver MD, Jin L, Boerwinkle E, Deka R, Ferrell RE, Chakraborty R, 1995. A novel measure of genetic distance for highly polymorphic tandem repeat loci. *Molecular Biology and Evolution* 12: 914–920.
- Schumacher J, Leonhard S, Grundmann BM, Roloff A, 2006. New Alder disease in Spreewald biosphere reserve-causes and incidental factors of an epidemic. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* 58 (6):S 141-147.
- Selkoe KA, Toonen RJ, 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* 9: 615–629.
- Solla A, Pérez-Sierra A, Corcobado T, Haque MM, Diez JJ, Jung T, 2010. *Phytophthora alni* on *Alnus glutinosa* reported for the first time in Spain. *Plant Pathology* 59: 798.
- Staden V van, Erasmus BF., Roux J, Wingfield MJ, Jaarsveld AS van, 2004. Modelling the spatial distribution of two important South African plantation forestry pathogens. *Forest Ecology and Management* 187: 61–73.
- Stochlova P, Novotna K, Cerny K, 2012. Factors affecting the development of *Phytophthora alni* ssp. *alni* infections in *Alnus glutinosa* L. *Journal of Forest Science* 58 (3): 123-130.
- Streito JC, 2003. *Phytophthora* disease of alder: Identification and distribution. In: Gibbs JN, Dijk C van, Webber J (Eds.), *Phytophthora disease of Alder in Europe*, Forest Research Bulletin, p. 126.
- Streito JC, Jarnouen de Villartay G, Tabary F, 1999. Une nouvelle espèce de *Phytophthora* s'attaque à l'aulne. *Phytoma - La Défense des Végétaux* 518: 38–41.
- Streito JC, Legrand P, Tabary F, Villartay GJD, 2002. *Phytophthora* disease of alder (*Alnus glutinosa*) in France: investigations between 1995 and 1999. *Forest Pathology* 32: 179–191.
- Streito JC, Villartay GJ De, Tabary F, 2002. Methods for isolating the alder *Phytophthora*. *Forest Pathology* 32: 193–196.

Strnadová V, Černý K, Holub V, Gregorová B, 2010. The effects of flooding and *Phytophthora alni* infection on black alder. *Journal of Forest Science* 56: 41–46.

Stukenbrock EH, McDonald BA, 2008. The origins of plant pathogens in agro-ecosystems. *Annual Review of Phytopathology* 46: 75–100.

Sunnucks P, 2000. Efficient genetic markers for population biology. *Trends in ecology & evolution* 15: 199–203.

Tedersoo L, Suvi T, Jairus T, Ostonen I, Põlme S, 2009. Revisiting ectomycorrhizal fungi of the genus *Alnus*: differential host specificity, diversity and determinants of the fungal community. *New Phytologist* 182: 727–735.

Thernann K, Werres S, Diener HA, Luttmann R, 2002. Comparison of different methods to detect *Phytophthora* spp. in recycling water from nurseries. *Journal of Plant Pathology* 84: 41–51.

Thoirain B, Husson C, Marçais B, 2007. Risk factors for the *Phytophthora*-induced decline of Alder in Northeastern France. *Phytopathology* 97: 99–105.

Xhaard C, 2011. Influence des processus démographiques sur la structure et les caractéristiques génétiques des champignons phytopathogènes, cas de l'agent de la rouille du peuplier *Melampsora larici-populina*. Thèse de doctorat. Université Henri Poincaré, Nancy I. France.

Williams N, Hardy GESJ, O'Brien PA, 2009. Analysis of the distribution of *Phytophthora cinnamomi* in soil at a disease site in Western Australia using nested PCR. *Forest Pathology* 39: 95–109.

Woods A, Coates KD, Hamann A, 2005. Is an unprecedented *Dothistroma* needle blight epidemic related to climate change? *BioScience* 55: 761–769.

Woolhouse MEJ, Haydon DT, Antia R, 2005. Emerging pathogens: the epidemiology and evolution of species jumps. *Trends in Ecology & Evolution* 20: 238–244.

Zhang ZG, Li YQ, Fan H, Wang YC, Zheng XB, 2006. Molecular detection of *Phytophthora capsici* in infected plant tissues, soil and water. *Plant Pathology* 55: 770–775.

# ETUDE I

## DETERMINATION DE LA PLOÏDIE DES TROIS ESPECES DU COMPLEXE

### *Phytophthora alni*

Claude Husson<sup>1</sup>, Jaime Aguayo<sup>1</sup>, Cécile Revellin<sup>2</sup>, Benoît Marçais<sup>1†</sup> et Pascal Frey<sup>1†</sup>

<sup>1</sup>INRA, UMR1136 INRA Université de Lorraine, Interactions Arbres/Micro-organismes, IFR110 EFABA, Centre INRA de Nancy, 54280 Champenoux, France

<sup>2</sup>INRA, UMR1147 INRA Université de Bourgogne, Agroécologie. Centre INRA de Dijon, 2100 Dijon, France

*Article en préparation*

## Détermination de la ploïdie des trois espèces du complexe *Phytophthora alni*

Claude Husson, Jaime Aguayo, Cécile Revellin, Benoit Marçais et Pascal Frey

La polyplœdie ou l'assortiment de plusieurs jeux de chromosomes dans un noyau est un facteur important dans l'évolution des eucaryotes. En effet, elle est décrite comme fréquente chez les plantes, particulièrement chez les angiospermes, mais aussi chez certains animaux (Soltis et Soltis 1999; Christiansen 2005; Chapman et Burke 2007). Peu décrite chez les champignons et les oomycètes, la polyplœdie est également reconnue comme un mécanisme rapide d'évolution pouvant conduire à l'émergence de nouvelles maladies (Brasier 2000; Olson et Stenlid 2002; Schardl et Craven 2003; Giraud *et al.* 2008). En effet, l'émergence de nouvelles espèces polyplœides commence aussi à être documentée chez les *Phytophthora* spp. (Bonants *et al.* 2000; Brasier 2001; Ioos *et al.* 2006; Man in' t Veld *et al.* 2007; Man in' t Veld *et al.* 2012). Certains événements de polyplœidisation détectés chez *Phytophthora* spp. sont anciens et ils seraient donc communs à toutes les espèces du genre (Martens et Van de Peer 2010; Seidl *et al.* 2012). D'autres événements sont plus récents et souvent liés à des événements d'hybridation (Brasier 1995, 2001; Ioos 2006; Ioos *et al.* 2006). Ainsi, deux mécanismes principaux ont été décrits pour la formation de polyplœides : la duplication intraspécifique du génome (autopolyplœdie) ou la fusion des génomes de deux espèces différentes par hybridation (allopolyplœdie) (Olson et Stenlid 2002; Comai 2005; te Beest *et al.* 2011). La multiplication du génome n'est pas sans effet sur les organismes. Celle-ci peut offrir une réserve de gènes accrue, augmentant les possibilités de spéciation. Ainsi, les polyplœides peuvent acquérir certaines caractéristiques génétiques et phénotypiques de leur progéniteurs leur permettant de mieux s'adapter aux conditions imposées par l'environnement. Cependant, la polyplœidisation provoque aussi des inconvénients au niveau génomique et les espèces polyplœides doivent donc surmonter rapidement ces effets pour survivre. Par exemple, la polyplœdie peut provoquer des difficultés pendant la méiose et la mitose, des changements de l'architecture cellulaire dus à l'augmentation du contenu génomique et des modifications fonctionnelles causés par l'augmentation du nombre de copies des gènes, ce qui implique une reprogrammation de leur expression (Comai 2005).

Dans notre modèle d'étude, *Phytophthora alni* subsp. *alni* (*Paa*) a été décrit comme un allopolyplœide issu de l'hybridation des deux espèces parentales : *Phytophthora alni* subsp. *uniformis* (*Pau*) et *Phytophthora alni* subsp. *multiformis* (*Pam*) (Ioos *et al.* 2006, 2007). Néanmoins la question de la ploïdie exacte des différentes entités du complexe *P. alni* reste

jusqu'à présent un sujet de débat. Les premières estimations de la ploïdie des trois taxons ont été réalisées par Brasier *et al.* (1999) par des observations microscopiques de caryotypes. Dans cette étude, *Pau* a été décrit comme un taxon proche de la diploïdie (nombre de chromosomes entre 11 et 13 et une ploïdie de  $2n+2$ ) et *Pam* a présenté des niveaux estimés de ploïdie intermédiaires (nombre de chromosomes entre 13 et 18 et une ploïdie estimée entre  $2n+4$  et  $2n+7$ ). Quant à la ploïdie de *Paa*, elle a été estimée comme quasi-tétraploïde (nombre de chromosome entre 18 et 22,  $4n+2$ ). Cependant, les travaux de Ioos *et al.* (2006) sur quatre gènes nucléaires et deux gènes mitochondriaux ont montré que *Paa* serait issu d'une hybridation entre *Pau* (diploïde) et *Pam* (tétraploïde). En effet, les auteurs ont montré que la distribution allélique de 4 gènes nucléaires simple copie *ASF*-like (*ASF*), *GPA1* (*GPA*), *RAS-Ypt* (*RAS*) et *Trp1* avait la configuration suivante : d'une part un allèle nommé PAU présent chez *Pau* et *Paa* et d'autre part un allèle nommé PAM1 et un allèle nommé PAM2, présents chez *Pam* et *Paa* pour chacun des gènes étudiés. *Paa* contient donc en son génome les trois allèles de *Pau* et de *Pam*. Ioos (2006) émet l'hypothèse que *Paa* serait hexaploïde et contiendrait la somme des génomes de *Pau* et de *Pam*.

La détermination de la ploïdie peut apporter des nouvelles connaissances sur le mécanisme d'hybridation, la relation entre les trois taxons et sur la biologie de *Paa*. De plus, dans le cadre de ma thèse, ces connaissances étaient souhaitables pour la réalisation d'études de génétique des populations, et en particulier de *Paa*. La reconstitution des haplotypes permettrait ainsi l'utilisation des outils classiques de génétique des populations.

Ainsi, le but de cette étude a été de déterminer clairement la ploïdie des trois taxons constituant le complexe *P. alni* par deux approches : (i) la quantification par PCR quantitative et la comparaison du nombre de copies de chaque allèle des gènes simple copie étudiés par Ioos *et al.* (2006) chez *Paa*, *Pau* et *Pam* et (ii) l'estimation comparative de la taille du génome des trois taxons par cytométrie en flux.

## **Matériel et méthodes**

### ***Production de zoospores***

La production de zoospores a été réalisée selon le protocole établie par Ioos *et al.* (2005). Des isolats de *Paa*, *Pau* et *Pam* ont été multipliés par repiquage en boîte de Petri, sur un milieu gélosé nutritif à base de jus de légumes (milieu V8 rifampicine). Les boîtes ont été placées à l'étuve à une température de 21°C. Trois jours plus tard, des fragments de gélose prélevés à la marge de croissance de l'agent pathogène ont été découpés.

Ils ont ensuite été introduits dans une boîte de Petri contenant de l'eau de rivière filtrée avec une membrane de porosité 10  $\mu\text{m}$ , afin de stimuler la production de sporanges. Une vingtaine de fragments ont été mis en suspension par boîte. L'eau a été renouvelée chaque jour jusqu'à l'apparition de sporanges. A ce stade, les isolats ont été mis dans de l'eau ultra-pure à 4°C pour libérer les zoospores contenues dans les sporanges. Les suspensions de spores ont été placées dans un tube de 50 mL et vortexées 1 min pour les enkyster et puis placées 1 heure à 4°C. Les suspensions ont ensuite été filtrées sur une membrane de porosité 10  $\mu\text{m}$  (Millipore, JCWP 04700). Puis les membranes ont été mises dans des tubes Falcon de 14 mL contenant 3 à 4 mL de tampon Tris-HCL-EDTA (Anderson *et al.* 2010) puis vortexées pendant 1 minute pour libérer les zoospores dans le tampon.

### ***Extraction d'ADN***

Une production de zoospores de 6 isolats par espèce a été réalisée selon le protocole décrit ci-dessus. La concentration en spores a été estimée avec hématimètre de Malassez puis une série de microtubes de 2 mL contenant 200  $\mu\text{L}$  de tampon et 10 000, 20 000, 40 000, 80 000 et 120 000 spores a été réalisée pour chaque isolat. Les suspensions de spores ont été broyées pendant 30 secondes à une fréquence de 30 Hz (TissueLyser, Qiagen) dans un tube de 2 ml contenant une bille de tungstène et 20 billes de verre. Après ajout de 400  $\mu\text{L}$  de tampon AP1 fourni avec le kit DNeasy plant mini-kit (Qiagen), les tubes ont de nouveau été soumis à un broyage pendant 30 secondes. L'ADN de chaque suspension a ensuite été extrait selon les instructions du fournisseur.

### ***Développement de paires d'amorces et de sondes spécifiques de gènes simple copie et PCR en temps réel***

Les séquences des gènes ASF, GPA et RAS étudiées par Ioos *et al.* (2006) chez les 3 espèces ont été alignées dans le logiciel Sequencher 4.0. Des couples d'amorces et des sondes à chimie TaqMan® spécifiques des allèles PAU, PAM1 et PAM2 pour ces trois gènes nucléaires ont été définis à l'aide de Primer 3 et Beacon Designer (Primer Biosoft) (Tableau 1). Afin de comparer le nombre de copies de chaque allèle, une série de PCR en temps réel a été effectuée avec le thermocycleur Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies). Le mélange réactionnel de chaque PCR contenait 1x Brilliant III Ultra-Fast QPCR Master Mix (Agilent, France), 0,3  $\mu\text{M}$  de chaque amorce sens et anti-sens, 0.1  $\mu\text{M}$  de sonde, 0.15 U d'Uracyl-N-Glycosilase (UNG), 2  $\mu\text{L}$  d'extrait d'ADN et de l'eau ultra-pure a été ajoutée pour obtenir un volume final de 20  $\mu\text{L}$ . Les PCR ont été effectuées selon le programme suivant : activation de



l'UNG à 50°C pendant 2 minutes, puis de la Taq polymérase à 95°C pendant 3 minutes et enfin 45 cycles contenant une phase de dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 15 secondes et une phase d'hybridation/élongation à 65°C durant 50 secondes.

### ***Estimation de la taille du génome des trois taxons par cytométrie en flux***

La cytométrie en flux est une méthode analytique qui permet de mesurer la fluorescence de particules en suspension (des zoospores dans notre cas) lorsqu'elles passent individuellement à travers un rayon lumineux, entraînées par un flux de liquide. Pour chaque particule, la dispersion de la lumière et la fluorescence émise sont mesurées. Les résultats présentés sont la somme des caractéristiques de chaque individu de la population. Les paramètres mesurés sont de deux types : la dispersion de la lumière (due aux propriétés intrinsèques des particules) et la fluorescence émise après coloration par un fluorochrome des échantillons.

Des suspensions calibrées à 200 000 zoospores ont été préparées à partir de 8 isolats de *Paa*, 11 de *Pau* et 4 de *Pam*. Par ailleurs, des suspensions ont été produites à partir de 2 isolats de *P. ramorum* d'origine européenne. Les noyaux des zoospores ont été marqués à l'iodure de Propidium (4,8 µl mL<sup>-1</sup>, kit Cystain, Partec) et 2 µl de RNase (à une concentration de 100 mg/ml) ont été ajoutés à 1 mL de suspension. Les suspensions ont été conservées à 4°C pendant 12 heures avant passage au cytomètre (Cyflow blue, Partec).

### ***Analyse de données***

Pour chaque PCR en temps réel réalisée, la valeur du cycle seuil (Ct) a été fixée à l'aide du logiciel MxPro 4.10. Le nombre de copies de chaque allèle a été comparé entre chaque espèce à concentrations de zoospores équivalentes à l'aide des valeurs des Ct obtenues lors des PCR. L'écart moyen de Ct entre deux espèces indique la différence en concentration en ADN initial dans le tube, c'est-à-dire dans notre expérimentation la différence en nombre de copies d'allèles ciblés. Pour chaque allèle, le ratio du nombre de copies d'allèles entre une des espèces parentales, *Pau* ou *Pam*, et l'hybride *Paa* a été calculé. Il se définit par la relation :  $\log(\text{ratio } Pam \text{ ou } Pau : Paa) / \log(2) = \text{valeur de Ct de } Paa - \text{valeur de Ct de } Pam \text{ ou } Pau$ . Ce ratio est de 2 lorsque l'écart moyen de Ct est de 1.

L'analyse de données a été réalisée par analyse de variance (ANOVA). Deux analyses ont été réalisées indépendamment pour vérifier les rapports de Ct entre *Paa* : *Pam* et *Paa*:*Pau*. Les facteurs testés ont été les concentrations en zoospores, les couples d'amorces,

les espèces, les interactions amorce x espèce, concentration en zoospores x espèce, concentration de zoospores x amorce et l'effet isolat par espèce.

L'estimation de la taille du génome des espèces par cytométrie en flux est basée sur la lecture du pic de fluorescence émise par les noyaux des zoospores colorés par l'iodure de propidium. L'analyse des données a été réalisée par une analyse Bayésienne en comparant la position des pics de fluorescence de *Paa*, *Pau*, *Pam* et *P. ramorum*. Le modèle est une analyse de variance qui prend en compte les effets espèce, réglage du cymomètre pour l'estimation de la fluorescence et un effet isolat pris en compte comme variable aléatoire. Des priors non informatifs ont été pris pour tous les paramètres (moyenne générale, effets isolats et effets réglage) en les échantillonnant par une loi normale  $N(0, 1.e-04)$ . Le rapport de la quantité d'ADN dans *Paa* sur la somme des quantités d'ADN dans *Pau* et dans *Pam* a été monitoré pour estimer l'intervalle de confiance à 5 % encadrant la moyenne.

## **Résultats**

### ***PCR en temps réel pour la détermination du nombre de copies de chaque allèle***

L'analyse statistique comparant la valeur des Ct entre les espèces *Paa* et *Pam* a montrée une différence très significative entre ces deux espèces ( $p < 0,001$ ) pour l'allèle PAM1 et l'allèle PAM2 chez les 3 gènes étudiés. Par ailleurs, l'analyse a montré un effet significatif de l'espèce ( $p < 0,001$ ), de la concentration en zoospores ( $p < 0,001$ ), du couple d'amorces ( $p < 0,025$ ) et de l'isolat par espèce ( $p < 0,001$ ). Par contre, les effets interaction amorce x espèce, concentration en zoospores x espèce, concentration de zoospores x amorce ne sont pas significatif ( $p = 0,654$ ,  $p = 0,846$  et  $p = 0,321$ , respectivement).

Par ailleurs, la différence de Ct global pour tous les allèles n'est pas significativement différente de 1 ( $p = 0,518$ ). L'ensemble des ratios *Paa* :*Pam* en nombre de copies des allèles sont proches de 2 pour chaque allèle PAM1 et PAM2. Le ratio moyen de 1,93 est compris dans l'intervalle de confiance de 1,80-2,08 (Tableau 2). Cela signifie que le nombre de copies d'allèles PAM1 et PAM2 chez *Paa* est deux fois plus faible que chez *Pam* pour chacun des gènes étudiés. L'absence d'effet significatif dans les interactions montrent que ce ratio est robuste quels que soient la concentration en zoospores ou l'allèle cible.

Parallèlement, une différence très significative des valeurs de Ct entre les espèces *Paa* et *Pau* pour les trois gènes étudiés ( $p < 0,001$ ). Il existe aussi un effet significatif espèce ( $p < 0,001$ ), concentration en zoospores ( $p < 0,001$ ), du couple d'amorces ( $p = 0,001$ ) et de

l'isolat par espèce ( $p < 0,001$ ) et de l'interaction concentration de zoospores x amorce ( $p = 0,001$ ). Enfin, les effets interaction amorce x espèce ( $p = 0,055$ ) et concentration en zoospores x espèce ( $p = 0,964$ ) ne sont pas significatif.

Comme pour les allèles PAM1 et PAM2, la différence de Ct global pour les allèles PAU des trois gènes n'est pas significativement différente de 1 ( $p = 0,149$ ) et les ratios *Pau* :*Paa* en nombre de copies d'allèle sont proches de 2 (2,29, intervalle de confiance 1,84 – 2,85) indiquant que le nombre de copies d'allèles PAU chez *Paa* est deux fois plus faible que chez *Pau* pour les 3 gènes (tableau 2).

### *Cytométrie en flux*

Les populations de zoospores dont l'ADN des noyaux a été marqué à l'iodure de propidium ont été délimitées en taille et structure et la position du pic de fluorescence a été calculée pour chaque isolat à l'aide du logiciel fourni avec le cytomètre Cyflow blue (figure 1A et 1B). La position des pics est linéairement proportionnelle à la taille du génome (d'Hondt *et al.* 2011, Dolezel *et al.* 2005, Vercauteren *et al.* 2011). Ainsi, en comparant les pics de fluorescences des espèces *Paa*, *Pau* et *Pam* et de l'espèce de référence *P. ramorum*, il est possible de comparer la taille relative des génomes des chacune des espèces. Les résultats montrent que la position des pics des isolats de *Paa* est intermédiaire entre celle des isolats de *Pau* et de *Pam*. Plus précisément, les valeurs des pics de *Paa* est équivalente à 0,5 fois la somme des valeurs de *Pau* et *Pam* (intervalle de confiance 95% 0,49 – 0,52).

Par ailleurs, les ratios de taille de génome entre d'une part *Paa*, *Pau* et *Pam* et d'autre part *P. ramorum* ont été estimés à 2,64, 2,09 et 3,13, respectivement. La taille du génome de *P. ramorum* a été évaluée à 65 Mpb (Tyler *et al.* 2006). D'après nos résultats, cela signifie que la taille du génome de *Paa* est d'environ 170 Mpb, de *Pau* 135 Mpb et de *Pam* 200 Mpb.

## **Conclusions**

Les résultats de la quantification par PCR quantitative du nombre de copies de chaque allèle montrent clairement que pour chacun des trois gènes nucléaires monocopie étudiés, le nombre de copies des allèles PAU est deux fois plus élevé dans *Pau* que dans *Paa*. De même, nombre de copies des allèles PAM1 et des allèles PAM2 est deux fois plus élevé dans *Pam* que dans *Paa*. Ces résultats suggèrent que lors de l'hybridation ayant généré *Paa*, seule une copie haploïde du génome diploïde de *Pau* aurait contribué au génome de *Paa*. De même,

seule une copie haploïde du “sous-génome PAM1“ et une copie haploïde du “sous-génome PAM2“ de l’espèce parentale tétraploïde *Pam* aurait contribué au génome de *Paa*. Ces résultats ont été confirmés par l’estimation de la taille du génome par cytométrie en flux : la quantité totale d’ADN nucléaire chez *Paa* correspond à la moitié de la somme des quantités d’ADN des espèces parentales. Par conséquent, l’hybride allopolyploïde *Paa* ne résulterait pas de l’addition des génomes complets de *Pau* et de *Pam*, et ne serait donc pas hexaploïde comme initialement supposé (Ioos, 2006). Au contraire, *Paa* résulterait d’une addition de trois génomes haploïdes (PAU, PAM1, PAM2) hérités de *Pau* et de *Pam*, et serait donc triploïde. Cette hypothèse est confortée par nos données de génotypage à l’aide des marqueurs microsatellites, qui suggèrent que *Pau* est diploïde, *Pam* tétraploïde et *Paa* triploïde. Un tel mécanisme d’hybridation s’apparente à une hybridation homoploïde, dans laquelle l’hybride possède le même nombre de chromosomes que les espèces parentales (en général  $2n$ ). L’hybridation homoploïde est courante chez les animaux et les plantes. Il existe quelques rares cas décrits chez les champignons, comme dans le cas de l’hybride *Melampsora x columbiana*, responsable d’une rouille du peuplier en Amérique du Nord (Newcombe *et al.* 2000). Par ailleurs, il est intéressant de noter que chez les plantes, l’hybridation d’une espèce diploïde avec une espèce tétraploïde résulte en général en un hybride triploïde stérile (Ramsey et Schemske, 1998).

## Références

- Beest M te, Roux JJ Le, Richardson DM, Brysting AK, Suda J, Kubešová M, Pyšek P, 2011. The more the better? The role of polyploidy in facilitating plant invasions. *Annals of Botany*.
- Brasier CM, Cooke DEL, Duncan JM, 1999. Origin of a new Phytophthora pathogen through interspecific hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**: 5878–5883.
- Comai L, 2005. The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nat Rev Genet* **6**: 836–846.
- Doležel J, Bartos J, 2005. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany* **95**: 99–110.
- D'Hondt L, Höfte M, Van Bockstaele E, Leus L, 2011. Applications of flow cytometry in plant pathology for genome size determination, detection and physiological status. *Molecular Plant Pathology*, **12**: 815–828
- Ioos R, 2006. Caractérisation génétique de *Phytophthora alni* Brasier & S.A Kirk, hybride interspécifique agent du dépérissement de l'aulne en Europe.
- Ioos R, Andrieux A, Marçais B, Frey P, 2006. Genetic characterization of the natural hybrid species *Phytophthora alni* as inferred from nuclear and mitochondrial DNA analyses. *Fungal Genetics and Biology* **43**: 511–529.
- Ioos R, Husson C, Andrieux A, Frey P, 2005. SCAR-based PCR primers to detect the hybrid pathogen *Phytophthora alni* and its subspecies causing alder disease in Europe. *European Journal of Plant Pathology* **112**: 323–335.

- Ioos R, Panabières F, Industri B, Andrieux A, Frey P, 2007. Distribution and expression of elicitor genes in the interspecific hybrid oomycete *Phytophthora alni*. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 5587–5597.
- Olson Å, Stenlid J, 2002. Pathogenic fungal species hybrids infecting plants. *Microbes and Infection* **4**: 1353–1359.
- Ramsey J, Schemske DW, 1998. Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **29**, 467-501.
- Tyler BM, Tripathy S, Zhang X, Dehal P, Jiang RHY, *et al.*, 2006. *Phytophthora* Genome Sequences Uncover Evolutionary Origins and Mechanisms of Pathogenesis. *Science* **313**: 1261–1266.
- Vercauteren A, Boutet X, D'hondt L, Van Bockstaele E, Maes M, Leus L, Chandelier A, Heungens K, 2011. Aberrant genome size and instability of *Phytophthora ramorum* oospore progenies. *Fungal Genetics and Biology* **48**, 537–543

Tableau 1. Caractéristiques des amorces sens (F) et anti-sens (R) et des sondes (P) utilisées pour l'étude des allèles de gènes nucléaires par PCR quantitative.

Nom	Séquence 5' - 3'	Gène cible	Allèle cible
AL-ASF-PAU-F	ACCGCCACAACATCCACT	ASF	ASF-PAU
AL-ASF-PAU-R	GCACGGGACCTACGAGGA	ASF	ASF-PAU
AL-ASF-PAM1-F	CACCACCACCACAATATCTCC	ASF	ASF-PAM1
AL-ASF-PAM1-R	ACAAGCACTTCCTCCAGCA	ASF	ASF-PAM1
AL-ASF-PAM2-F	ACCGCCATCACCACCATA	ASF	ASF-PAM2
AL-ASF-PAM2-R	CACGAGAACTTCCTCCAGCA	ASF	ASF-PAM2
AL-GPA-PAU-R	GTCTCGCAACTCCCCTAT	GPA	GPA-PAU
AL-GPA-PAM1-R	ACTGCGAGCAAGTCTACGG	GPA	GPA-PAM1
AL-GPA-PAM2-R	CACCGCGAACAAGTCAAC	GPA	GPA-PAM2
AL-GPA-F	AAGAACGAGGAGGCTCACC	GPA	GPA-PAU/-PAM1/-PAM2
AL-RAS-PAU-F	TTACGGTGTGTTGTTGTTGTC	RAS	RAS-PAU
AL-RAS-PAU-R	TACGCCAGTTAGCTCCATGA	RAS	RAS-PAU
AL-RAS-PAM1-F	GCTGACATTATCGTGCTCGT	RAS	RAS-PAM1
AL-RAS-PAM1-R	GAAAGCGGACACCAGTAAGC	RAS	RAS-PAM1
AL-RAS-PAM2-F	ACTCCGATTGCTGACGTTGT	RAS	RAS-PAM2
AL-RAS-PAM2-R	GCGTACGTCAGTAAGCTCCA	RAS	RAS-PAM2
AL-ASF-P	FAM- AGGACGAGAGCCGCGACCAG-BHQ1	ASF	ASF-PAU/-PAM1/-PAM2
AL-GPA-P	FAM-CTGCTGCTGCTGGGAGCTGG-BHQ1	GPA	GPA-PAU/-PAM1/-PAM2
AL-RAS-P	FAM-ACGATCGAGCTGGACGGCA-BHQ1	RAS	RAS-PAU/-PAM1/-PAM2

Tableau 2 : ratio moyen de contenu en nombre de copies d'allèles pour les espèces *Paa*, *Pam* et *Pau*

gènes	Ratio <i>Pau:Paa</i>	Ratio <i>Pam:Paa</i>	Ratio <i>Pam:Paa</i>
	allèle PAU	allèle PAM1	allèle PAM2
<i>ASF-like</i>	1,9	2,0	1,9
<i>GPA1</i>	2,6	2,0	2,2
<i>RAS-Ypt</i>	2,5	2,1	1,9
moyenne (95% CI)	2.29 (1,8-2,8)	1,93 (1,8-2,1)	

Figure 1 : structure et taille des populations de zoospores, en rouge et jaune, parmi les populations de bactéries, en bleu (A) et position du pic de fluorescence (B) des noyaux des zoospores de l'isolat Pau300 en cytométrie en flux.

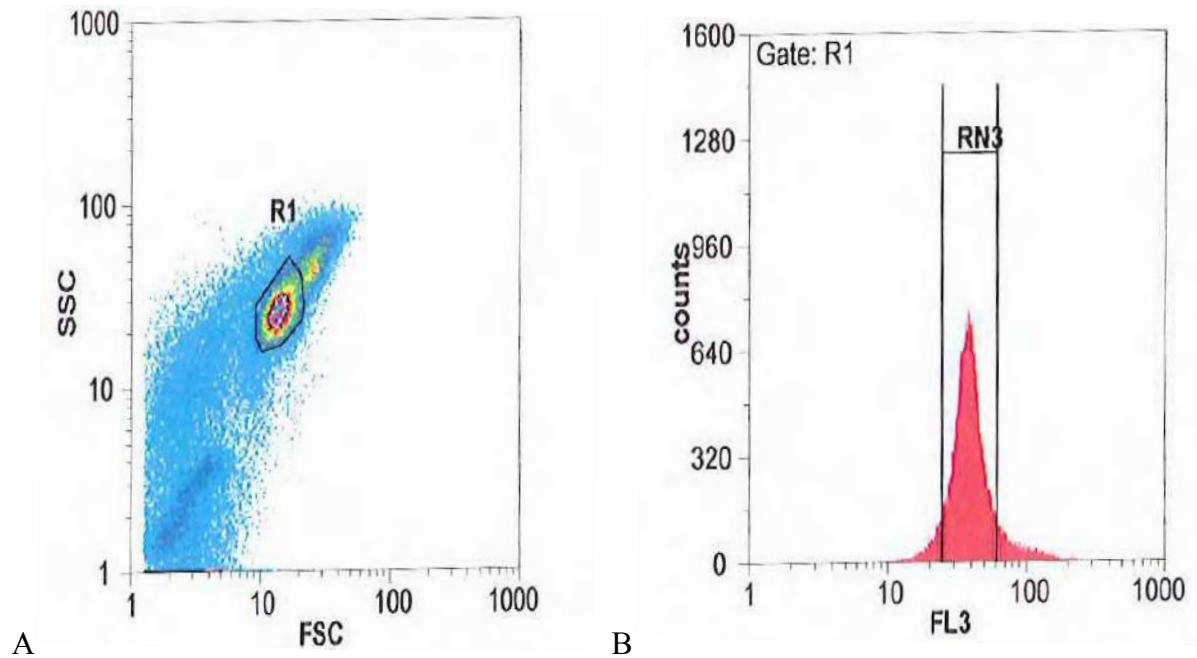
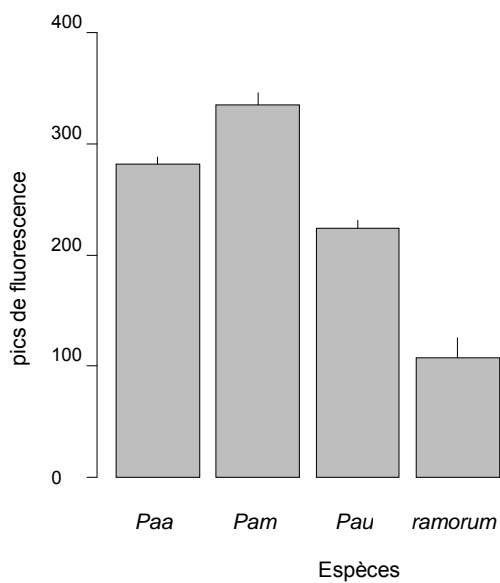


Figure 2 : positions des pics de fluorescence en cytométrie en flux des espèces *Paa*, *Pau*, *Pam* et *P. ramorum* (les barres représentent la variance).





## ETUDE II

### **STRONG GENETIC DIFFERENTIATION BETWEEN NORTH AMERICAN AND EUROPEAN POPULATIONS OF *Phytophthora alni* subsp. *uniformis***

Jaime Aguayo<sup>1</sup>, Gerard C. Adams<sup>2</sup>, Fabien Halkett<sup>1</sup>, Mursel Catal<sup>3</sup>, Claude Husson<sup>1</sup>, Zoltán Á. Nagy<sup>4</sup>, Everett M. Hansen<sup>5</sup>, Benoît Marçais<sup>1†</sup> and Pascal Frey<sup>1†</sup>

<sup>1</sup>INRA, UMR1136 INRA Université de Lorraine, Interactions Arbres/Micro-organismes, IFR110 EFABA, Centre INRA de Nancy, 54280 Champenoux, France

<sup>2</sup>University of Nebraska, Department of Plant Pathology. Lincoln, Nebraska, USA

<sup>3</sup>Akdeniz University, Department of Plant Protection. Antalya, Turkey

<sup>4</sup>Plant Protection Institute, Centre for Agricultural Research. Hungarian Academy of Sciences. Budapest, Hungary

<sup>5</sup>Oregon State University, Department of Botany and Plant Pathology. Corvallis, Oregon, USA

† These authors co-directed this work

*Article accepté pour publication sous réserve de corrections mineures dans Phytopathology*

## **Title:**

**Strong genetic differentiation between North American and European populations of *Phytophthora alni* subsp. *uniformis***

## **Authors**

Jaime Aguayo<sup>1</sup>, Gerard C. Adams<sup>2</sup>, Fabien Halkett<sup>1</sup>, Mursel Catal<sup>3</sup>, Claude Husson<sup>1</sup>, Zoltán Á. Nagy<sup>4</sup>, Everett M. Hansen<sup>5</sup>, Benoît Marçais<sup>1†</sup> and Pascal Frey<sup>1\*†</sup>

## **Affiliations**

<sup>1</sup>INRA, UMR1136 INRA Université de Lorraine, Interactions Arbres/Micro-organismes, IFR110 EFABA, Centre INRA de Nancy, 54280 Champenoux, France

<sup>2</sup>University of Nebraska, Department of Plant Pathology. Lincoln, Nebraska, USA

<sup>3</sup>Akdeniz University, Department of Plant Protection. Antalya, Turkey

<sup>4</sup>Plant Protection Institute, Centre for Agricultural Research. Hungarian Academy of Sciences. Budapest, Hungary

<sup>5</sup>Oregon State University, Department of Botany and Plant Pathology. Corvallis, Oregon, USA

† These authors co-directed this work

## **Corresponding author:**

\*Pascal Frey

[frey@nancy.inra.fr](mailto:frey@nancy.inra.fr)

Tel: [00 33] 3 83 39 40 56

Fax: [00 33] 3 83 39 40 69

## Abstract

Aguayo, J., Adams, G. C., Halkett, F., Catal, M., Husson, C., Nagy, Z. Á., Hansen, E. M., Marçais, B. and Frey, P. 2012. Strong genetic differentiation between North American and European populations of *Phytophthora alni* subsp. *uniformis*

Alder decline caused by *Phytophthora alni* has been one of the most important diseases of natural ecosystems in Europe during the last 20 years. The emergence of *Phytophthora alni* subsp. *alni* (*Paa*)—the pathogen responsible for the epidemic—is linked to an interspecific hybridization event between two parental species: *Phytophthora alni* subsp. *multiformis* (*Pam*) and *Phytophthora alni* subsp. *uniformis* (*Pau*). One of the parental species, *Pau*, has been isolated in several European countries and recently in North America. The objective of this work was to assess the level of genetic diversity, the population genetic structure, and the putative reproduction mode and mating system of *Pau*. Five new polymorphic microsatellite markers were used to contrast both geographical populations. The study comprised 71 isolates of *Pau* collected from 8 European countries and 10 locations in North America. Our results revealed strong differences between continental populations ( $F_{st}=0.88$ ;  $R_{st}=0.74$ ), with no evidence for gene flow. European isolates showed extremely low genetic diversity compared to the North American collection. Selfing appears to be the predominant mating system in both continental collections. The results suggest that the European *Pau* population is most likely alien and derives from the introduction of a few individuals, while the North American population probably is an indigenous population.

## Keywords

Oomycetes, emerging diseases, interspecific hybridization, homothallism, *Alnus*

## Introduction

Diseases that increase in severity or expand their range pose important threats to natural ecosystems (4,17,45). While the emergence of disease can be the result of changes in host and/or environmental conditions, or evolution in pathogen populations (4), the introduction of exotic pathogens has been shown to be a major cause (4,16,17,46). However, assessing whether the causal organism of an emerging disease is alien is not always straightforward (43,56). This results mostly from a lack of knowledge and data on the biodiversity and ecology of endemic species (17,43). For example, in the genus *Phytophthora*, low genetic variability has often been taken as an indication that specific populations are exotic [see *P. quercina* (13), *P. nemorosa*, *P. pseudosyringae* (56) and *P. pinifolia* (22)]. Indeed, introduction into a new geographical area often results in a population with low variability (36,72) as founder effects caused by the migration of a limited number of individuals result in reduced gene diversity and number of alleles in introduced populations (55). However, low variability cannot be taken as definite proof of the exotic nature of a population as long as the diversity center has not been identified (33,43). Low genetic variability may occur in a native population, especially when selfing is suspected. It is noteworthy that many *Phytophthora* species are homothallic and reproduce mainly by selfing (33,43). Self-fertilization will impact population genetic characteristics by increasing linkage disequilibrium and reducing genetic diversity (33,43). Conversely, some alien populations display high levels of genetic diversity (30,54) as a result of multiple introductions (15,18). Indeed, to study the genetic changes that may have occurred during and after an introduction event, it is important to identify the source of the introduction with as much precision as possible. Moreover, knowledge of the mode of reproduction (sexual vs. asexual) and the mating system (selfing vs. outcrossing) is of fundamental importance to the evolutionary biology of pathogens (6,34). The reproduction mode and the mating system will affect how diversity is distributed within and among individuals in a population (60), and supply insights into the potential of pathogens to spread and on their ability to evolve (33). Indeed, in *Phytophthora* spp., asexual (zoospores) and sexual (oospores) propagules exhibit contrasted dispersal and survival abilities, with strong epidemiological consequences. The source region will provide the benchmark against which genetic and evolutionary changes can be assessed, representing the variation from which the introduction was actually derived (18). For example, for *Phytophthora cinnamomi*, Papua New Guinea has been proposed as the center of origin (19,36). Indeed, this population

presented a higher allelic diversity compared to other populations (19,36). However, determining the center of origin of a species is not always obvious. In the case of *Phytophthora infestans* two possible centers of origin have been proposed: either Central Mexico (37) or the Andean region of South America (35).

Alder decline caused by the *Phytophthora alni* species complex is a good example of poorly understood pathogen emergence in a natural ecosystem (24,76). This disease has posed a major threat to natural ecosystems in Europe during the last 20 years (74). For example, in Eastern France, disease prevalence has reached 17% of riparian alder (*Alnus glutinosa*) trees (76). The emergence of this disease is linked to an interspecific hybridization event (9,47). Recent studies have clarified the genesis of the interspecific hybrid, *Phytophthora alni* subsp. *alni* (*Paa*). *Phytophthora alni* subsp. *uniformis* (*Pau*) and *Phytophthora alni* subsp. *multiformis* (*Pam*), initially identified as genetic variants of *Paa* (9), were shown to be the parental species of the hybrid (47). The hybrid *Paa* is more aggressive than its progenitors, and is responsible for disease outbreak (73). However, it is not known when and where hybridization took place. Moreover, the origin of the parental species, *Pau* and *Pam*, remains unknown. *Paa* is widespread in Europe and has not been identified elsewhere. While *Pam* has been isolated exclusively in Europe, *Pau* has been isolated both in Europe and recently in North America.

The present work constitutes the first population genetics study of one of the parental species of the hybrid *Paa*. The objectives of this work were to assess the level of genetic diversity, the population genetic structure, and the putative reproduction mode of North American and European populations of *Pau*. To this end, we characterized the population structure of two continental collections using new polymorphic microsatellite markers developed for this study.

## Materials and methods

### Isolate collection and DNA extraction

*Pau* isolates used in this study are listed in Table 1. European *Pau* isolates were obtained after several field campaigns during the years 1999, 2005, 2008 and 2009. Surveys were carried out in 111 sites across Northern France, the Wallonia region of Belgium and in Hungary. Additional *Pau* isolates were obtained from colleagues elsewhere in Europe (Table 1 and Fig. 1). North American isolates were collected between the years 2008 and 2011 after a survey of 81 sites across south-central and interior Alaska (1), and Oregon (Fig. 1). Isolates

were obtained from collar bark tissue of infected alders, and from *in situ* baiting. Samples were collected from different diseased trees to minimize the risk of sampling the same individual twice. Alder bark pieces were placed on V8 juice agar selective medium for *Phytophthora* species (27), and growing mycelium was transferred to fresh V8 juice agar medium containing rifampicin (10 mg/L) as soon as detected. For *in situ* baiting, rhododendron (*Azalea* spp.) and bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi*) leaves, and thinleaf alder twigs (*Alnus incana* subsp. *tenuifolia*) were used. As lesions appeared, isolates were transferred to V8 juice agar selective medium. Colonies were subcultured and maintained as above.

DNA was extracted from 4-day-old pure fresh mycelia grown on V8 juice agar medium using a BioSprint 96 DNA plant kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France) in combination with a BioSprint 96 automated workstation (QIAGEN) following the BS-96DNA-plant protocol, or using a QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit according to the supplier's instructions. Species identification was based on the DNA sequence homology of ITS, and using species-specific primers designed against the nuclear genes *RAS-Ypt* and *TRP1*, following the protocol of Ioos et al. (47).

For microsatellite development, DNA was extracted from 5-day-old colonies of isolates PAU60, PAU320 and PA340 grown in liquid V8 medium containing rifampicin (10 mg/L) at 20°C using the QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit as described above.

### **Microsatellite development**

Microsatellite markers were developed using an enriched library generated with a ROCHE GS-FLX Titanium pyrosequencing platform. The three lots of DNA extracted from PAU60, PAU320 and PA340 were mixed, and DNA quantity was estimated with a NANODROP 1000 Spectrophotometer (NANODROP Technologies, Wilmington, DE). The enrichment step, data analysis and automated primer design were described previously by Malausa et al. (58). The enriched microsatellite library generated a total of 34,483 microsatellite sequences, with 550 putative microsatellite loci identified. Choice of microsatellite loci for further tests was constrained to motifs of length  $\geq 2$  bp and a minimum repeat number of 5. Using these criteria, 110 loci were further retained. These 110 primer pairs were tested for amplification on a panel of 10 *Pau*, 10 *Pam* and 5 *Paa* European isolates. No North American *Pau* isolates were available when loci were tested. Microsatellite loci were amplified in a GENEAMP PCR System 9700 Thermal Cycler (Applied Biosystems,

Foster City, CA) under the following conditions: an initial denaturing step of 5 min at 95°C; 35 cycles including 30 s initial denaturing at 94°C, 90 s annealing at 60°C and 60 s extension at 72°C; and a 30 min final extension step at 60°C. A PCR mix was prepared using the Type-it™ Microsatellite PCR kit in a 12- $\mu$ l final reaction volume containing 2  $\mu$ l of DNA, 5  $\mu$ l of 2x Type-it™ mix, 1  $\mu$ l of 5x Q-solution, 0.2 mM reverse primer, 0.02 mM M13-tailed forward primer and 0.2 mM fluorescence-labeled M13 primer (5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3'). Amplified PCR products were loaded on an ABI 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Fragments were sized with a LIZ-1200 size standard. Alleles were scored using GENEMAPPER 4.0 (Applied Biosystems). Loci that showed allelic polymorphism, expected peak size, and correct peak amplification were kept for subsequent tests. Forward primers for the selected five perfect microsatellite loci were labeled with a fluorescent tag (FAM, NED, VIC or PET). PCR conditions for genotyping the 71 *Pau* isolates were as described above. PCR was conducted using the Type-it Microsatellite PCR kit in a 12- $\mu$ l final reaction volume containing 2  $\mu$ l of DNA, 5  $\mu$ l of 2x Type-it mix, 1  $\mu$ l of 5x Q-solution and 0.2  $\mu$ M of each reverse and forward primers. Six multiplex PCR were run comprising 1-3 loci each. PCR products from these multiplex reactions were pooled into two mixes according to their fluorescent tag color and size, and analyzed as described above. Genotyping was replicated for a subset of isolates with independent PCR reactions and sizing of fragments. Reproducibility of molecular data was confirmed.

## Data analysis

### Global Analysis

To examine the relationships among isolates, a matrix of genotype distances was constructed with the POLYSAT R-package (12) using the genetic distance of Bruvo (10). This distance is similar to band-sharing indices used with dominant data, but takes into account mutational distances between alleles. The result is a distance ranging from 0 to 1, with 0 indicating identical genotypes, and 1 being a theoretical maximum distance if all alleles from one genotype differed by an infinite number of repeats from all alleles in another genotype. A nonmetric multidimensional scaling (MDS) for two axes was then performed (59). In MDS, a small number of axes are chosen explicitly prior to the analysis, and the data are fitted to those dimensions, so there are no hidden axes of variation. Alternatively, we computed the shared allele distance ( $D_{AS}$ , 51) using the POPULATIONS 1.2.31 program (O. Langella, <http://bioinformatics.org/~tryphon/populations/>). These kind of clustering have the important

advantage over other clustering methods, such as Bayesian clustering algorithms, that no underlying assumptions such as Hardy-Weinberg (HW) equilibrium or absence of linkage disequilibrium between loci are required (52,61). The concordance between the Bruvo and the  $D_{AS}$  distances was tested by Mantel tests ( $H_0$  = matrices are not correlated) with 10,000 permutations. Estimation of global and across-loci  $F_{st}$  (based on allele identity under infinite allele model; IAM) and  $R_{st}$  (based on microsatellite allele size under stepwise-mutation model; SMM) between the European and North American collections were computed according to Weir and Cockerham (78) and Rousset (70), for  $F_{st}$  and  $R_{st}$  estimates respectively, using SPAGEDI (44). The GENECLASS 2 program (65) was used to detect first-generation migrants. The test uses a Monte-Carlo resampling method that identifies statistical thresholds beyond which individuals are likely to be  $F_0$  immigrants (64). The goal of this test is to distinguish between residents that have a genotype that is most likely to occur in a population other than the one in which the individual was sampled by chance, and  $F_0$  immigrants that are misassigned because they originated somewhere other than where they were sampled (64). Additionally, to study the relationship among genotypes, a minimum spanning network (MSN) was constructed using the Bruvo's distance. MINSPNET (26) was used to create the network, which was visualized using the NEATO program in the GRAPHVIZ package (32).

### **Within-continent characterization**

Identification of multilocus genotypes (MLGs) was performed using a Visual Basic module developed by Goyeau et al. (40). This procedure, designed specially to deal with clonal organisms, allows the identification of MLGs scoring the number of variant alleles. Clonal richness,  $R = G-1/N-1$  (20) was computed (with  $G$  being the number of MLGs found and  $N$ , the sample size). Clonal evenness ( $V$ )—an index that reflects equitability in the distribution of clonal membership among samples—was computed using GENCLONE 1.0 (5). Clonal richness and clonal evenness indices reflect the extent of clonal reproduction in populations (5,42). Genotypic diversity ( $D_g$ ) was computed with MULTILOCUS 1.3 (2). This index is independent of clonal richness and can be defined as the probability that two individuals taken at random have different MLGs. The allelic richness ( $A_r$ )—an index that represents the number of alleles corrected for sample size (25)—and the expected and observed heterozygosities were computed with FSTAT 2.9.3.2 (39). Fisher's exact tests were run to test the significance of genetic differentiation and allelic richness. Fisher's exact tests



were used because they are robust when the number of individuals is low (40,68). Because clonal amplification of genotypes could influence data interpretation, analyses of genetic structure should be performed with and without repeated identical MLGs (42,75). Indeed, when duplicate MLGs are removed, rare alleles that distinguish MLGs have increased weight in the analysis. This may also underrepresent common alleles, since identical MLGs, composed of identical common alleles, can be expected to occur by chance following recombination. On the other hand, if duplicate MLGs are not removed, a single individual may be represented several times in the dataset if asexual reproduction occurs (49). Thus, all the following indices were computed considering both all individuals and one representative isolate of each MLG per sampling site (referred to as the “MLG dataset”). Departure from HW equilibrium was studied by two methods. First, global tests using the complete enumeration method (57), well adapted for low numbers of alleles by locus, were performed using GENEPOP (68). As an exact  $P$  value is computed by complete enumeration, no standard value is calculated. The null hypothesis tested was a random union of gametes. Secondly, unbiased estimates of  $F_{is}$  (78) and  $R_{is}$  (70) were computed with SPAGED1.

Linkage disequilibrium (LD) was assessed by two approaches. First, we studied the significance of non-random association or gametic disequilibrium among pairs of loci for each population. This test looks for the association between diploid genotypes at both loci. For a pair of diploid loci, no assumption is made about the gametic phase in double heterozygotes (particularly in HW equilibrium). The test was performed with GENEPOP, considering as null hypothesis that genotypes at one locus are independent of genotypes at the other locus. The default test statistic is the log likelihood ratio statistic (G test). Contingency tables are created for all pairs of loci in each sample, and then a G test is computed for each table using a Markov chain algorithm (68). Secondly, using MULTILOCUS 1.3, we computed the measure of multilocus LD,  $\bar{r}_s$ —an alternative measure of multilocus linkage disequilibrium that analyzes the allelic values directly and sums over all individuals. The analysis is similar to a 2-way ANOVA on allelic values, which tests for a significant between-individual effect. Because  $P$  values are obtained from randomizations, no assumption of normality is associated generally with ANOVA tests. This index was computed by bootstrapping alleles 1,000 times among individuals, independently for each locus.

Mantel tests were performed to test the significance of the correlation between geographical/temporal and genetic distances. First, a matrix of Euclidean pairwise geographical distances was built for both European and North American collections. Second,

in order to check the temporal genetic structure, a pairwise matrix of the differences between sampling years was computed. A normalized Mantel statistic was obtained by combining the binary matrix describing the geographical/temporal relationships and the corresponding Bruvo's genetic distances. All tests were performed for all the isolates and the MLG dataset with 10,000 permutations.

## Results

### Sample collection and species identification

Surveys in alder stands in France, Belgium and Hungary allowed us to isolate 34 *Pau* from a total of 516 *P. alni s.l* isolates (6.6%). Among these *Pau* isolates, 50% were collected from one single site (Métairies-Saint-Quirin) in North-Eastern France. Ten other isolates were obtained from colleagues in other European locations (Table 1 and Fig. 1). In North America, the yield was approximately one *Pau* isolate per 100 *Phytophthora* colonies. Neither *Paa* nor *Pam* were isolated from North American sites. PCR amplification with species-specific primers for nuclear genes *RAS-Ypt* and *TRP1* confirmed the *Pau* status of all isolates (data not shown). A total of 71 isolates (44 from Europe and 27 from North America) were analyzed in this study.

### Microsatellite development

Among the 110 microsatellite loci tested, 37 (33.6%) amplified as expected. Among these loci, 32 (86%) were monomorphic and 5 (14%) were polymorphic in *Pau* with 2 to 3 alleles per locus and an average of 1.5 alleles per locus (Table 2). Only one locus was informative among European isolates (M-PAU3), while 3 loci exhibited some polymorphism within North American isolates (M-PAU3, M-PAU9, and M-PAU55). All five loci were highly informative to discriminate between continental collections (Table 3).

### Between-continent genetic analysis

Genotyping of the 71 *Pau* isolates permitted their assignment into 10 MLGs, including 7 from North America and 3 from Europe (Table 3). No MLGs were shared between the North American and European collections. The European collection exhibited one major MLG (*Pau-E1*, 91% of the isolates) and 2 minor MLGs (*Pau-E2* and *Pau-E3*). The 27 North American isolates were distributed into 7 MLGs (Table 3). MLG *Pau-A1* was dominant in

North America accounting for 50% of the isolates. Private alleles were observed between continental collections (Table 4). Four alleles were shared by isolates from the two collections, 4 alleles were unique to the North American isolates and 3 alleles were unique to the European isolates.

The MDS performed using Bruvo's distance between isolates clearly differentiated the European and North American collections (Fig. 2). A similar pattern was obtained when  $D_{AS}$  distance was used (data not shown). This was confirmed by a Mantel test which indicated that both distances were significantly correlated ( $r = 0.90$ ,  $P < 0.001$ ). Consistently, high global  $F_{st}$  ( $F_{st} = 0.88$ ;  $P < 0.001$ ) and  $R_{st}$  ( $R_{st} = 0.74$ ;  $P < 0.001$ ) values were found between both collections. Significant  $F_{st}$  and  $R_{st}$  values were obtained for all loci (Table 5). Indices computed for the MLG dataset showed the same pattern, with high and significant global and across loci  $F_{st}$  ( $F_{st} = 0.82$ ;  $P < 0.001$ ) and  $R_{st}$  ( $R_{st} = 0.63$ ;  $P < 0.001$ ) values (Table 5). Tests performed with GENECLASS did not detect any first generation migrants in either population. The MSN (Fig. 3) showed that the European cluster was linked to the North American cluster by a Bruvo distance of 0.125 between the MLGs *Pau-E1* and *Pau-A5*. This distance was larger than the range of distances among MLGs within both North America (0.034-0.045) and Europe (0.045-0.068), possibly indicating lack of sampling of missing intermediate genotypes.

### **Within-continent genetic analysis**

The gene diversity ( $H_e$ ) per locus for all isolates ranged from  $H_e = 0$  to  $H_e = 0.37$  with an average gene diversity value of  $H_e = 0.16 \pm 0.16$  and  $H_e = 0.03 \pm 0.07$  for the North American and European isolates, respectively (mean  $\pm$  S.D., Table 6). Observed heterozygosity ( $H_o$ ) for all isolates ranged from  $H_o = 0$  to  $H_o = 0.1$  with an average value of  $H_o = 0.04 \pm 0.04$  for the North American collection and  $H_o = 0.004 \pm 0.01$  for the European collection (mean  $\pm$  S.D., Table 6). Clonal richness ( $R$ ), genotypic diversity ( $D_g$ ) and evenness ( $V$ ) were low for the European collection ( $R = 0.05$ ,  $D_g = 0.17$ ,  $V = 0.14$ ) compared to the North American collection ( $R = 0.37$ ,  $D_g = 0.74$ ,  $V = 0.62$ ) (Table 6). Both collections exhibited significant deviation from HW proportions ( $P < 0.001$  for both collections.). Similar results were obtained for the MLG dataset ( $P = 0.003$  and  $P < 0.001$  for the European and the North American MLG datasets, respectively). Consistently, global  $F_{is}$  and  $R_{is}$  estimates computed for all individuals and for the MLG dataset were positive and significant (Table 6). The allelic richness ( $A_r$ ) corrected for 27 isolates was higher for the North American

collection compared to the European collection ( $P < 0.001$ ). This difference was lower and not significant when computed for the MLG dataset ( $P > 0.05$ ).

Examination of LD by correlation between pairs of loci revealed complete dependence among all pairs of loci for the European collection. For the North American collection, when tests could be performed, 0/3 pairs of loci exhibited no pairwise LD when all individuals were considered. The same results were obtained for both collections when the MLG dataset was considered (Table 6). The  $\bar{r}_s$  multilocus estimate of linkage disequilibrium computed for the North American collection was negative and not significant ( $\bar{r}_s = -0.04$ ;  $P = 0.82$ ). Similar results were obtained for the North American MLG dataset ( $\bar{r}_s = -0.01$ ;  $P = 0.90$ ). For the European isolates  $\bar{r}_s$  could not be computed, since polymorphism was extremely low and determined only by one locus, suggesting complete linkage across loci.

The geographical distribution of the MLGs for European and North American isolates are shown in Fig. 1. Mantel tests showed no evidence for spatial structure in either collections ( $r = 0.09$ ,  $P = 0.19$  for the European collection and  $r = -0.11$ ,  $P = 0.99$  for the North American collection). The MLG dataset exhibited similar results ( $r = -0.15$ ,  $P = 0.39$  for the European collection and  $r = -0.19$ ,  $P = 0.84$  for the North American collection). No evidence for temporal structure in the genetic diversity was found in either collections ( $r = 0.040$ ,  $P = 0.27$  for the European collection and  $r = -0.26$ ,  $P = 0.99$  for the North American collection). Same pattern was found when tests were performed for the MLG dataset ( $r = 0.013$ ,  $P = 0.35$  and  $r = -0.24$ ,  $P = 0.87$  for the European and for the North American MLG datasets, respectively).

## Discussion

### Isolate sampling and microsatellite development

Isolate collection for this study accounted for more than ten years of field work in Europe and North America. The low recovery rate of *Pau* is in accordance with the published literature (53). The low number of polymorphic loci found and the low number of alleles per locus are consistent with results obtained for other oomycetes (19,66,71,77). Thus, the use of a high throughput methodology involving pyrosequencing of a microsatellite-enriched library yielded results comparable to those found by Ioos et al. (48) on *Paa* using the classical method of cloning and sequencing of a microsatellite-enriched DNA library. This low number of polymorphic microsatellites in *Pau* is in accordance with results of Dutech et al. (23), who

showed that obtaining microsatellite markers with an acceptable level of polymorphism is generally more difficult from fungi and oomycetes than from other organisms.

### **Genetic characterization of North American and European *Pau***

North American *Pau* exhibited a moderate genotypic diversity and evenness. Our data suggest that selfing is probably the predominant mating system of North American *Pau*. Indeed, the population exhibited significant deviation from HW proportions and high global  $F_{is}$  and  $R_{is}$  values, as expected for a homothallic organism (3,21,29,36). Self-fertilization has frequently been considered important in homothallic oomycetes (36). However, strict selfing cannot explain the diversity exhibited by the North American population. Self-fertilization reduces the amount of heterozygosity by one half in every generation, so there should be almost no heterozygosity in homothallic *Phytophthora* that have been established for more than a few generations (36). This was not the case for North American *Pau*, which exhibited a gene diversity similar to heterothallic, outcrossing oomycetes (36,41). Moreover, our results did not show complete linkage disequilibrium, suggesting that the genetic structure of North American populations of *Pau* can be explained by a mixed mating system including selfing and probably rare outcrosses. Indeed, it has been shown that outcrossing is important in generating and maintaining variation in homothallic oomycetes (28,29,41). The balance between selfing and outcrosses is, however, not easy to establish, and may be dynamic and highly dependent on spatio-temporal conditions (34).

The genetic characteristics of the European collection of *Pau* were different from the North American population. Although North-Eastern France is over-represented in our sampling, we have studied *Pau* isolates from eight different countries scattered throughout Europe, and the extremely low genotypic diversity and evenness across large areas and different environmental conditions is significant. All the variation observed in Europe was attributed to a single locus (M-PAU3). However, the reproductive mode and the mating system of European *Pau* are less clear than that of North American *Pau*. Low genotypic diversity and gene diversity, coupled with high and significant  $F_{is}$  and  $R_{is}$  values, and the strong LD detected for all loci tested suggest that the European *Pau* are selfing. However, strict clonality after a strong bottleneck resulting from an introduction of *Pau* in Europe cannot be rejected. This has been described for other pandemics of plant pathogens that were subjected to strong founder effects after introduction (37,38,50,67). The possibility of sexual reproduction in Europe would have some important epidemiological consequences, such as

the production of resistant spores (24,53). Delcán and Brasier (14) showed that European *Pau* were able to produce viable oospores in controlled laboratory conditions, although germination was not observed. However, *in vitro* observations do not allow strong inferences regarding the reproductive mode in natural conditions (6).

Neither population exhibited any spatial or temporal structure. This can be explained by the existence of an efficient long-distance dispersal means through rivers. Moreover, in Europe, planting of seedlings from infected nurseries has been shown to be an important mechanism of long-distance spread (53). This may explain the widespread occurrence of *Pau* in Europe.

### **Genetic differences between North American and European populations of *Pau***

Our study revealed strong differences between the American and European collections of *Pau* (global  $F_{st} = 0.89$  and  $R_{st} = 0.74$ ). The genetic differentiation between collections was caused by the presence of private alleles within each population. No evidence of gene flow could be detected between populations. Such high levels of genetic differentiation within one species have already been reported (63,69), and could be caused by genetic drift through founder effects accompanying the spread of the disease, which may result in strongly differentiated populations (69). Furthermore, the mating system (predominantly selfing) of *Pau* is likely to reinforce the genetic structure between continental populations, since selfing will tend to decrease the effective population size (11).

We hypothesize that *Pau* is likely to be alien in Europe, and may have derived from the introduction of only few individuals, while the American population of *Pau* is probably indigenous. The differentiation between collections is large and does not point to a North American origin of the European *Pau* (large  $F_{st}$  and  $R_{st}$ , presence of private alleles, and no evidence of first generation migrants in either collection). However, a North American origin of European *Pau* remains possible. A single connection between both collections visualized with the computed MSN suggests a single and not a multiple introduction of *Pau* in Europe from a putative North American source population. However, the MSN indicates that some intermediate genotypes were missing. Indeed, sampling in North America was not exhaustive and thus private alleles observed in Europe could well have been missed in this limited sample.

## Concluding remarks

This study provides new insights into the origin of the interspecific hybrid *Paa*, which is primarily for the outbreak of alder decline in Europe. The origin of *Paa* could be explained by three non-exclusive scenarios (i) a recent hybridization event directly following the introduction of one (or two) of the parental species, *Pau* and *Pam*, (ii) long time coexistence of both parental species, which after the apparition of favorable environmental conditions (e.g. climatic conditions) would have succeeded in mating in nature, or (iii) an ancient hybridization event giving raise to *Paa*, followed by a long coexistence of *Paa*, *Pau* and *Pam*, and a recent emergence of the *Paa*-induced alder decline triggered by more favorable environmental conditions. Our results suggest that the introduction of *Pau* would have enabled hybridization with *Pam* and, consequently, may be a major cause of the emergence of alder decline in Europe. However, when and where the *Pau* invasion and subsequent hybridization took place, and its recurrence, remain unknown. Moreover, whether *Pam* is exotic or indigenous to Europe is also an open question. It seems that *Paa* may have arisen after multiple hybridizations of the parental species in alder nurseries used for riparian restoration projects in Europe (33,47,53). Further studies in population genetics and epidemiology of *Paa*, *Pau* and *Pam* are needed to address these hypotheses.

Species involved in interspecific hybridization need to meet some genetic criteria and to share the same environment for successful hybridization to occur (62). The genetic barriers to hybridization are weaker in phylogenetically close species that have evolved in allopatry (7). Therefore, the chances of interspecific hybridization increase when two allopatric species accidentally come into secondary contact (7,8,62), as probably occurred for *Paa*. The risk of hybridization between previously allopatric pathogen species is likely to increase as the international trade of plant material intensifies, and their associated pathogens are introduced into new geographical areas (8,31).

## Acknowledgements

We thank Olivier Caël, Béranger Bertin, and Anne Chandelier for their help in collecting French and Belgian samples and Axelle Andrieux for her technical support in microsatellite development and isolate genotyping. We appreciate the field assistance of Lori Trummer, Loretta Winton, Ph.D., and crew members Joelle Chille and Greg Black (U.S.D.A. Forest Service region 10 Anchorage, Alaska) in obtaining Alaskan isolates of *Pau*. Laura Sims (Oregon State University) assisted in checking field disease characteristics, and isolate collection and identification. We also thank our European colleagues (see Table 1) for sharing *Pau* isolates with us. We gratefully acknowledge Thibaut Malausa (INRA, Sophia-Antipolis) for having included *Pau* in his project of high-throughput microsatellite isolation through pyrosequencing. We also thank two anonymous reviewers for their helpful comments on an earlier version of this paper. This research was funded by a grant of the Région Lorraine (France), the Agence Nationale de la Recherche (ANR 07-BDIV-003, EMERFUNDIS program), and the European Union (INTERREG IV A ECOLIRIMED program and Cost action FP0801 “PhytoThreat”) and the Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica de Chile (CONICYT, Chile).



## References

1. Adams, G. C., Catal, M., and Trummer, L. M. 2009. Distribution and severity of Alder *Phytophthora* in Alaska. In Proceedings of the sudden oak death fourth science symposium, ed. Forest Service Gen. Tech. Rep. PSW-GTR-229. Department of Agriculture. Albany, CA. USA. p. 29–49.
2. Agapow, P.-M., and Burt, A. 2001. Indices of multilocus linkage disequilibrium. *Mol. Ecol. Notes*. 1:101–102
3. Ahmed, S., de Labrouhe, D. T., and Delmotte, F. 2012. Emerging virulence arising from hybridisation facilitated by multiple introductions of the sunflower downy mildew pathogen *Plasmopara halstedii*. *Fungal Genet. Biol.* Online publication no. doi.org/10.1016/j.fgb.2012.06.012. In press
4. Anderson, P. K., Cunningham, A. A., Patel, N. G., Morales, F. J., Epstein, P. R., and Daszak, P. 2004. Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends Ecol. Evol.* 19:535–544
5. Arnaud-Haond, S., and Belkhir, K. 2007. GENCLONE: a computer program to analyse genotypic data, test for clonality and describe spatial clonal organization. *Mol. Ecol. Notes*. 7:15–17
6. Billiard, S., López-Villavicencio, M., Hood, M. E., and Giraud, T. 2012. Sex, outcrossing and mating types: unsolved questions in fungi and beyond. *J. Evol. Biol.* 25:1020–1038
7. Brasier, C. M. 1995. Episodic selection as a force in fungal microevolution, with special reference to clonal speciation and hybrid introgression. *Can. J. Bot.* 73:1213–1221
8. Brasier, C. M. 2001. Rapid evolution of introduced plant pathogens via interspecific hybridization. *BioScience*. 51:123–133
9. Brasier, C. M., Kirk, S. A., Delcán, J., Cooke, D. E. L., Jung, T., and Man In't Veld, W. A. 2004. *Phytophthora alni* sp. nov. and its variants: designation of emerging heteroploid hybrid pathogens spreading on *Alnus* trees. *Mycol. Res.* 108:1172–1184
10. Bruvo, R., Michiels, N. K., D'Souza, T. G., and Schulenburg, H. 2004. A simple method for the calculation of microsatellite genotype distances irrespective of ploidy level. *Mol. Ecol.* 13:2101–2106
11. Charlesworth, D. 2003. Effects of inbreeding on the genetic diversity of populations. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. , Ser. B.* 358:1051 –1070

12. Clark, L. V., and Jasieniuk, M. 2011. POLYSAT: an R package for polyploid microsatellite analysis. *Mol. Ecol. Resour.* 11:562–566
13. Cooke, D. E. L., Jung, T., Williams, N. A., Schubert, R., Obwald, W., and Duncan, J. M. 2005. Genetic diversity of European populations of the oak fine-root pathogen *Phytophthora quercina*. *Forest Pathol.* 35:57–70
14. Delcán, and Brasier. 2001. Oospore viability and variation in zoospore and hyphal tip derivatives of the hybrid alder *Phytophthoras*. *Forest Pathol.* 31:65–83
15. Delmotte, F., Giresse, X., Richard-Cervera, S., M'Baya, J., Vear, F., Tourvieille, J., Walser, P., and de Labrouhe, D. T. 2008. Single nucleotide polymorphisms reveal multiple introductions into France of *Plasmopara halstedii*, the plant pathogen causing sunflower downy mildew. *Infect. Genet. Evol.* 8:534–540
16. Desprez-Loustau, M.-L., Courtecuisse, R., Robin, C., Husson, C., Moreau, P.-A., Blancard, D., Selosse, M.-A., Lung-Escarmant, B., Piou, D., and Sacle, I. 2010. Species diversity and drivers of spread of alien fungi (*sensu lato*) in Europe with a particular focus on France. *Biol. Invasions.* 12:157–172
17. Desprez-Loustau, M.-L., Robin, C., Buée, M., Courtecuisse, R., Garbaye, J., Suffert, F., Sacle, I., and Rizzo, D. M et al. 2007. The fungal dimension of biological invasions. *Trends Ecol. Evol.* 22:472–480
18. Dlugosch, K. M., and Parker, I. M. 2008. Founding events in species invasions: genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. *Mol. Ecol.* 17:431–449
19. Dobrowolski, M. P., Tommerup, I. C., Shearer, B. L., and O'Brien, P. A. 2003. Three clonal lineages of *Phytophthora cinnamomi* in Australia revealed by microsatellites. *Phytopathology.* 93:695–704
20. Dorken, M. E., and Eckert, C. G. 2001. Severely reduced sexual reproduction in northern populations of a clonal plant, *Decodonverticillatus* (Lythraceae). *J. Ecol.* 89:339–350
21. Dorrance, A., and Grünwald, N. J. 2008. *Phytophthora sojae*: diversity among and within populations. In *Oomycete Genetics and Genomics: Diversity, Interactions, and Research Tools*, Lamour, K. and Kamoun, S., p. 197–212.
22. Durán, A., Gryzenhout, M., Drenth, A., Slippers, B., Ahumada, R., Wingfield, B. D., and Wingfield, M. J. 2010. AFLP analysis reveals a clonal population of *Phytophthora pinifolia* in Chile. *Fungal Biol.* 114:746–752

23. Dutech, C., Enjalbert, J., Fournier, E., Delmotte, F., Barrès, B., Carlier, J., Tharreau, D., and Giraud, T. 2007. Challenges of microsatellite isolation in fungi. *Fungal Genet. Biol.* 44:933–949
24. Elegbede, C. F., Pierrat, J.-C., Aguayo, J., Husson, C., Halkett, F., and Marçais, B. 2010. A statistical model to detect asymptomatic infectious individuals with an application in the *Phytophthora alni*-induced Alder decline. *Phytopathology*. 100:1262–1269
25. Excoffier, L., and Heckel, G. 2006. Computer programs for population genetics data analysis: a survival guide. *Nat. Rev. Genet.* 7:745–758
26. Excoffier, L., and Smouse, P. E. 1994. Using allele frequencies and geographic subdivision to reconstruct gene trees within a species: molecular variance parsimony. *Genetics*. 136:343–359
27. Ferguson, A. J., and Jeffers, S. N. 1999. Detecting multiple species of *Phytophthora* in container mixes from ornamental crop nurseries. *Plant Dis.* 83:1129–1136
28. Forster, H., Tyler, B. M., and Coffey, M. D. 1994. *Phytophthora sojae* races have arisen by clonal evolution and by rare outcrosses. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7:780–791
29. Francis, D. M., and Clair, D. A. S. 1997. Population genetics of *Pythium ultimum*. *Phytopathology*. 87:454–461
30. Frankham, R. 2004. Resolving the genetic paradox in invasive species. *Heredity*. 94:385–385
31. Frey, P. 2009. L'hybridation interspécifique chez les champignons phytopathogènes à l'origine de nouvelles maladies. *BioFutur*. 28:36–39
32. Gansner, E. R., and North, S. C. 2000. An open graph visualization system and its applications to software engineering. *Softw: Pract. Exper.* 30:1203–1233
33. Garbelotto, M. 2008. Molecular analysis to study invasions by forest pathogens: examples from Mediterranean ecosystems. *Phytopathol. Mediterr.* 47:183–203
34. Giraud, T., Enjalbert, J., Fournier, E., Delmotte, F., and Dutech, C. 2008. Population genetics of fungal diseases of plants. *Parasite*. 15:449–454
35. Gómez-Alpizar, L., Carbone, I., and Ristaino, J. B. 2007. An Andean origin of *Phytophthora infestans* inferred from mitochondrial and nuclear gene genealogies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 104:3306–3311
36. Goodwin, S. B. 1997. The Population Genetics of *Phytophthora*. *Phytopathology*. 87:462–473

37. Goodwin, S. B., Cohen, B. A., and Fry, W. E. 1994. Panglobal distribution of a single clonal lineage of the Irish potato famine fungus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:11591–11595
38. Goss, E. M., Carbone, I., and Grünwald, N. J. 2009. Ancient isolation and independent evolution of the three clonal lineages of the exotic sudden oak death pathogen *Phytophthora ramorum*. *Mol. Ecol.* 18:1161–1174
39. Goudet, J. 1995. FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. *J. Hered.* 86:485–486
40. Goyeau, H., Halkett, F., Zapater, M.-F., Carlier, J., and Lannou, C. 2007. Clonality and host selection in the wheat pathogenic fungus *Puccinia triticina*. *Fungal Genet. Biol.* 44:474–483
41. Grünwald, N. J., and Hoheisel, G. A. 2006. Hierarchical analysis of diversity, selfing, and genetic differentiation in populations of the oomycete *Aphanomyces euteiches*. *Phytopathology.* 96:1134–1141
42. Halkett, F., Simon, J.-C., and Balloux, F. 2005. Tackling the population genetics of clonal and partially clonal organisms. *Trends Ecol. Evol.* 20:194–201
43. Hansen, E. M. 2008. Alien forest pathogens: *Phytophthora* species are changing world forests. *Boreal Environ. Res.* 13:33–41
44. Hardy, O. J., and Vekemans, X. 2002. SPAGEDI: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Mol. Ecol. Notes.* 2:618–620
45. Harvell, C. D., Mitchell, C. E., Ward, J. R., Altizer, S., Dobson, A. P., Ostfeld, R. S., and Samuel, M.D. 2002. Climate warming and disease risks for terrestrial and marine biota. *Science.* 296:2158–2162
46. Husson, C., Scala, B., Caël, O., Frey, P., Feau, N., Ioos, R., and Marçais, B. 2011. *Chalara fraxinea* is an invasive pathogen in France. *Eur. J. Plant Pathol.* 130:311–324
47. Ioos, R., Andrieux, A., Marçais, B., and Frey, P. 2006. Genetic characterization of the natural hybrid species *Phytophthora alni* as inferred from nuclear and mitochondrial DNA analyses. *Fungal Genet. Biol.* 43:511–529
48. Ioos, R., Barrès, B., Andrieux, A., and Frey, P. 2007. Characterization of microsatellite markers in the interspecific hybrid *Phytophthora alni* ssp. *alni*, and cross-amplification with related taxa. *Mol. Ecol. Notes.* 7:133–137
49. Ivey, C. T., and Richards, J. T. 2001. Genetic diversity of everglades sawgrass, *Cladium jamaicense* (Cyperaceae). *Int. J. Plant Sci.* 4:817–825

50. Ivors, K., Garbelotto, M., Vries, I. D. E., Ruyter-Spira, C., Hekkert, B. T., Rosenzweig, N., and Bonants, P. 2006. Microsatellite markers identify three lineages of *Phytophthora ramorum* in US nurseries, yet single lineages in US forest and European nursery populations. *Mol. Ecol.* 15:1493–1505
51. Jin, L., and Chakraborty, R. 1994. Estimation of genetic distance and coefficient of gene diversity from single-probe multilocus DNA fingerprinting data. *Mol. Biol. Evol.* 11:120–127
52. Jombart, T., Pontier, D., and Dufour, A. B. 2009. Genetic markers in the playground of multivariate analysis. *Heredity.* 102:330–341
53. Jung, T., and Blaschke, M. 2004. Phytophthora root and collar rot of alders in Bavaria: distribution, modes of spread and possible management strategies. *Plant Pathol.* 53:197–208
54. Kolbe, J. J., Glor, R. E., Rodriguez Schettino, L., Lara, A. C., Larson, A., and Losos, J. B. 2004. Genetic variation increases during biological invasion by a Cuban lizard. *Nature.* 431:177–181
55. Linde, C. C., Liles, J. A., and Thrall, P. H. 2010. Expansion of genetic diversity in randomly mating founder populations of *Alternaria brassicicola* infecting *Cakile maritima* in Australia. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:1946–1954
56. Linzer, R. E., Rizzo, D. M., Cacciola, S. O., and Garbelotto, M. 2009. AFLPs detect low genetic diversity for *Phytophthora nemorosa* and *P. pseudosyringae* in the US and Europe. *Mycol. Res.* 113:298–307
57. Louis, E. J., and Dempster, E. 1987. An exact test for Hardy-Weinberg and multiple alleles. *Biometrics.* 43:805–811
58. Malausa, T., Gilles, A., Megléc, E., Blanquart, H., Duthoy, S., Costedoat, C., Dubut, V., Pech, N., Castagnone-Sereno, P., Délye, C., Feau, N., Frey, P., Gauthier, P., Guillemaud, T., Hazard, L., Le Corre, V., Lung-Escarmant, B., Malé, P. -J., Ferreira, S., and Martin, J. -F. 2011. High-throughput microsatellite isolation through 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing of enriched DNA libraries. *Mol. Ecol. Resour.* 11:638–644
59. Mascheretti, S., Croucher, P. J. P., Kozanitas, M., Baker, L., and Garbelotto, M. 2009. Genetic epidemiology of the Sudden Oak Death pathogen *Phytophthora ramorum* in California. *Mol. Ecol.* 18:4577–4590
60. McDonald, B. A., and Linde, C. 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40:349–379

61. Montarry, J., Andrivon, D., Glais, I., Corbiere, R., Mialdea, G., and Delmotte, F. 2010. Microsatellite markers reveal two admixed genetic groups and an ongoing displacement within the French population of the invasive plant pathogen *Phytophthora infestans*. *Mol. Ecol.* 19:1965–1977
62. Olson, Å., and Stenlid, J. 2002. Pathogenic fungal species hybrids infecting plants. *Microbes Infect.* 4:1353–1359
63. Ordoñez, M. E., and Kolmer, J. A. 2007. Simple sequence repeat diversity of a worldwide collection of *Puccinia triticina* from Durum Wheat. *Phytopathology.* 97:574–583
64. Paetkau, D., Slade, R., Burden, M., and Estoup, A. 2004. Genetic assignment methods for the direct, real-time estimation of migration rate: a simulation-based exploration of accuracy and power. *Mol. Ecol.* 13:55–65
65. Piry, S., Alapetite, A., Cornuet, J. M., Paetkau, D., Baudouin, L., and Estoup, A. 2004. GENECLASS2: A Software for Genetic Assignment and First-Generation Migrant Detection. *J. Hered.* 95:536–539
66. Prospero, S., Black, J. A., and Winton, L. M. 2004. Isolation and characterization of microsatellite markers in *Phytophthora ramorum*, the causal agent of sudden oak death. *Mol. Ecol. Notes.* 4:672–674
67. Raboin, L. M., Selvi, A., Oliveira, K. M., Paulet, F., Calatayud, C., Zapater, M. F., Brottier, P., Luzaran, R., Garsmeur, O., Carlier, J., and D'Hont, A. 2007. Evidence for the dispersal of a unique lineage from Asia to America and Africa in the sugarcane fungal pathogen *Ustilago scitaminea*. *Fungal Genet. Biol.* 44:64–76
68. Raymond, M., and Rousset, F. 1995. GENEPOP (Version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.* :248–249
69. Rivas, G.-G., Zapater, M.-F., Abadie, C., and Carlier, J. 2004. Founder effects and stochastic dispersal at the continental scale of the fungal pathogen of bananas *Mycosphaerella fijiensis*. *Mol. Ecol.* 13:471–482
70. Rousset, F. 1996. Equilibrium values of measures of population subdivision for stepwise mutation processes. *Genetics.* 142:1357 –1362
71. Rouxel, M., Papura, D., Nogueira, M., Machefer, V., Dezette, D., Richard-Cervera, S., et al. 2012. Microsatellite markers for the characterization of native and introduced populations of *Plasmopara viticola*, the causal agent of grapevine downy mildew. *Appl. Environ. Microbiol.* Online publication no. doi:10.1128/AEM.01255-12. In press

72. Sakai, A. K., Allendorf, F. W., Holt, J. S., Lodge, D. M., Molofsky, J., With, K. A., Baughman, S., Cabin, R. J., Cohen, J. E., Ellstrand, N. C., McCauley, D. E., O'Neil, P., Parker, I. M., Thompson, J. N., and Weller, S. G. 2001. The population biology of invasive species. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 32:305–332
73. Santini, A., Barzanti, G. P., and Capretti, P. 2003. Susceptibility of some mesophilic hardwoods to Alder *Phytophthora*. *J. Phytopathol.* 151:406–410
74. Streito, J. C. 2003. *Phytophthora* disease of alder: Identification and distribution. In *Phytophthora disease of Alder in Europe*, eds. J.N. Gibbs, C. van Dijk, and J Webber. *Forest Research Bulletin*, p. 126.
75. Sunnucks, P., De Barro, P. J., Lushai, G., MacLean, N., and Hales, D. 1997. Genetic structure of an aphid studied using microsatellites: cyclic parthenogenesis, differentiated lineages and host specialization. *Mol. Ecol.* 6:1059–1073
76. Thoirain, B., Husson, C., and Marçais, B. 2007. Risk factors for the *Phytophthora*-induced decline of Alder in Northeastern France. *Phytopathology.* 97:99–105
77. Trigiano, R. N., Wadl, P. A., Dean, D., Hadziabdic, D., Scheffler, B. E., Runge, F., Telle, S., Thines, M., Ristaino, J., and Spring, Otmar. 2012. Ten polymorphic microsatellite loci identified from a small insert genomic library for *Peronospora tabacina*. *Mycologia.* 104:633 –640
78. Weir, B. S., and Cockerham, C. C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution.* 38:1358–1370

# Figures

Fig. 1. Location of the sampling sites in North America and Europe, and spatial distribution of *Pau* multilocus genotypes (MLG). Numbers inside the pie charts indicate the sample size for each location.

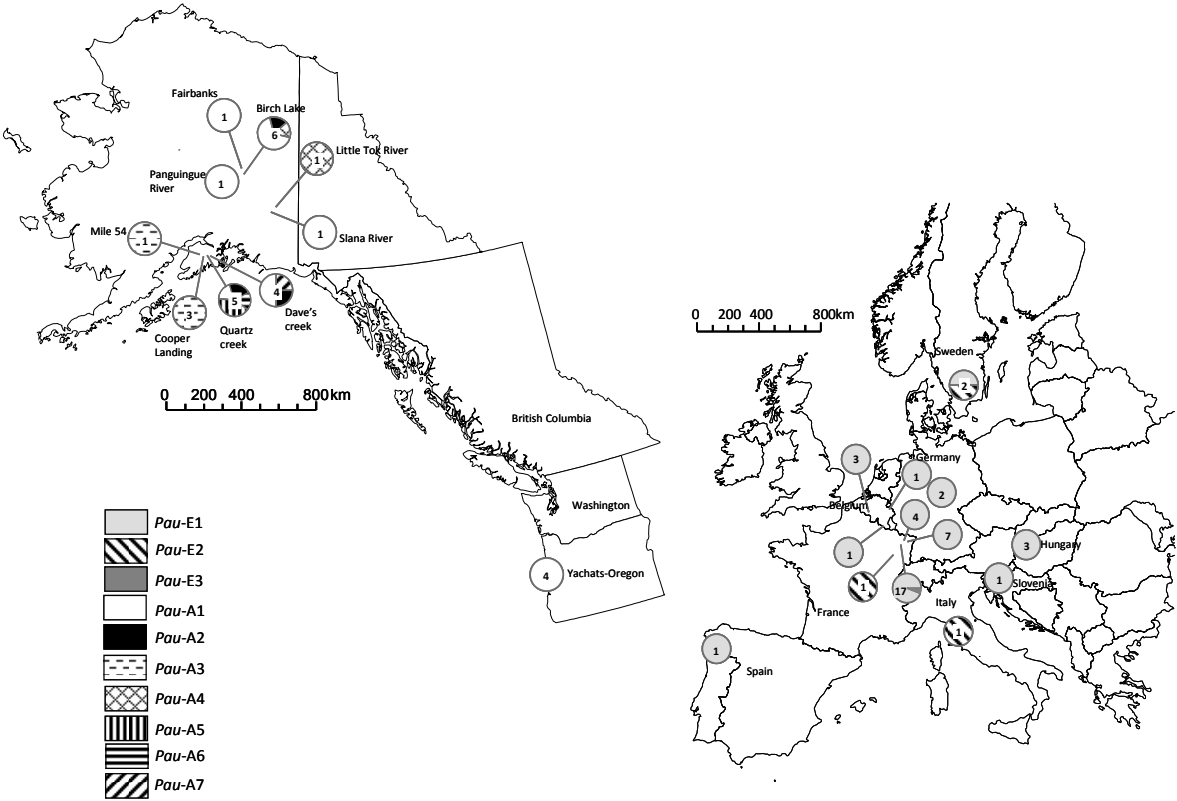




Fig. 2. Nonmetric multidimensional scaling (MDS) for two axes of *Pau* multilocus genotypes (MLG) on the basis of the Bruvo's distance. Circle areas are proportional to the number of individuals, except for MLGs *Pau*-E1 and *Pau*-A1.

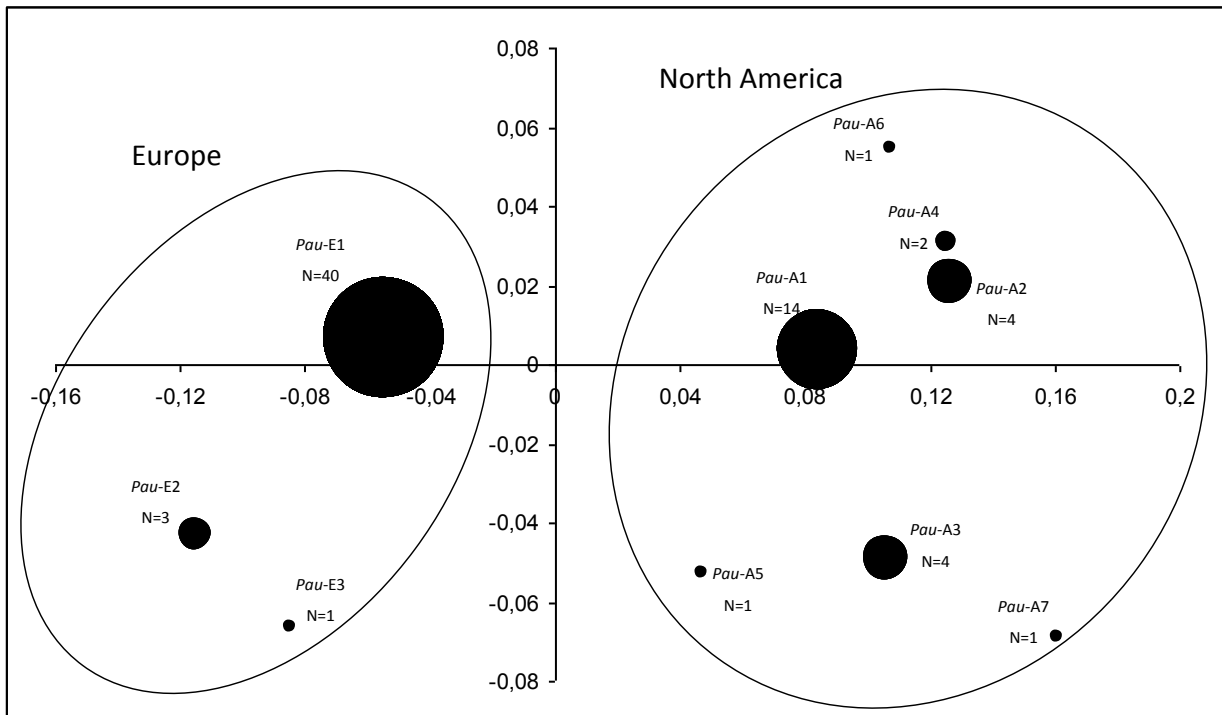
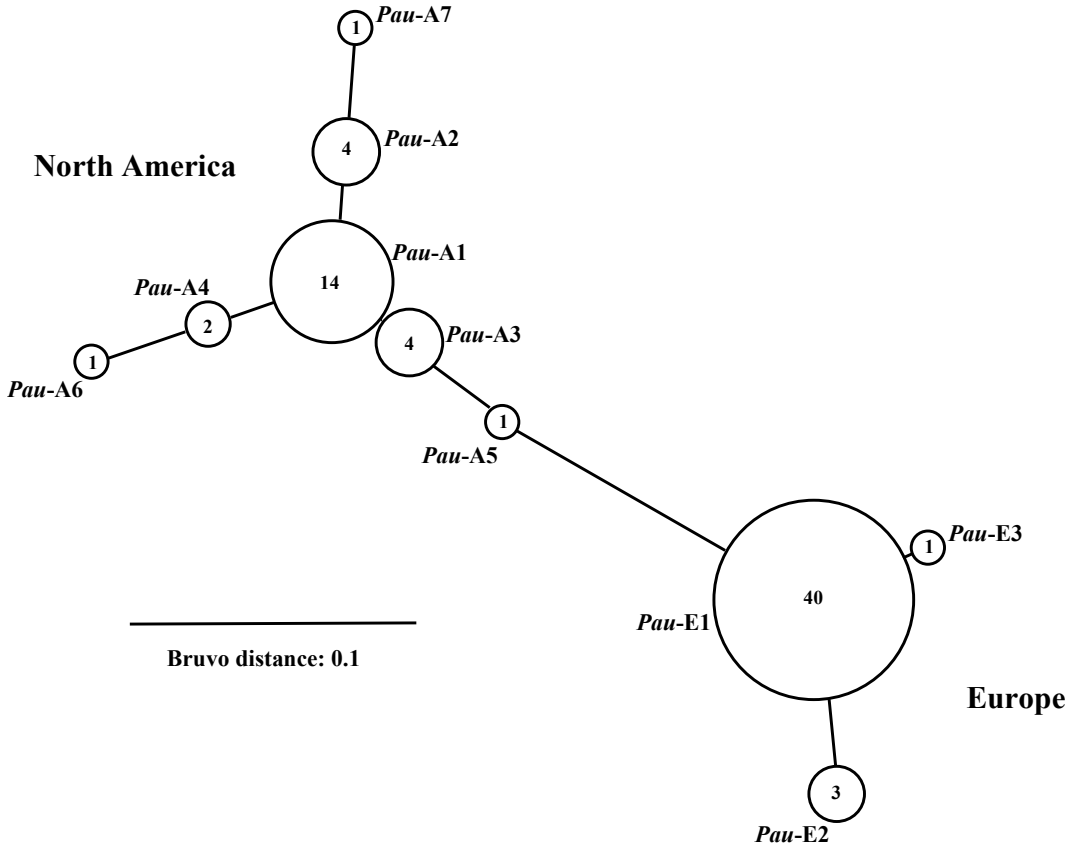


Fig. 3. Minimum spanning network (MSN) showing the relationships among the ten multilocus genotypes (MLGs) found in Europe and North America. Branch sizes are proportional to Bruvo's genetic distance, and surface areas of the circles are proportional to the numbers of isolates in each MLG (indicated inside the circles). The names of the MLGs are indicated (see Table 3).



## Tables

Table 1. List of the *Pau* isolates used in this study and MLG assignation for each isolate.

Isolate	Supplier	Reference	Country	Location	Isolation year	MLG
PAU768	G. Adams	QC Bowl 8A	USA (Alaska)	Quartz Creek	2010	<i>Pau</i> -A5
PAU769	G. Adams	QC Bowl 10	USA (Alaska)	Quartz Creek	2010	<i>Pau</i> -A6
PAU770	G. Adams	QC Bowl 12	USA (Alaska)	Quartz Creek	2010	<i>Pau</i> -A1
PAU771	G. Adams	QCb10	USA (Alaska)	Quartz Creek	2010	<i>Pau</i> -A5
PAU846	G. Adams	PAU420 / Gen-7 Bowl-2 1-2	USA (Alaska)	Quartz Creek	2009	<i>Pau</i> -A2
PAU772	G. Adams	CLBowl9B	USA (Alaska)	Cooper Landing	2010	<i>Pau</i> -A3
PAU773	G. Adams	CLb8	USA (Alaska)	Cooper Landing	2010	<i>Pau</i> -A3
PAU845	G. Adams	PAU330 / Gen-9 Bowl-4 1-1	USA (Alaska)	Cooper Landing	2009	<i>Pau</i> -A3
PAU774	G. Adams	BLb8atwigs	USA (Alaska)	Birch Lake	2010	<i>Pau</i> -A4
PAU775	G. Adams	BLb8twigs	USA (Alaska)	Birch Lake	2010	<i>Pau</i> -A2
PAU776	G. Adams	BLb9	USA (Alaska)	Birch Lake	2010	<i>Pau</i> -A1
PAU825	G. Adams	BLR15-3	USA (Alaska)	Birch Lake	2011	<i>Pau</i> -A1
PAU826	G. Adams	DC30T1-2	USA (Alaska)	Birch Lake	2011	<i>Pau</i> -A1
PAU836	G. Adams	BLR30-3	USA (Alaska)	Birch Lake	2011	<i>Pau</i> -A1
PAU837	G. Adams	DC30T3	USA (Alaska)	Dave's Creek	2011	<i>Pau</i> -A1
PAU843	G. Adams	PAU290 / Gen 3-B2- 2-1	USA (Alaska)	Dave's Creek	2009	<i>Pau</i> -A2
PAU844	G. Adams	PAU291 / Gen 3-B2- 3-4	USA (Alaska)	Dave's Creek	2009	<i>Pau</i> -A7
PAU851	G. Adams	PAU491 / Gen 4-B2- 1-1	USA (Alaska)	Dave's Creek	2009	<i>Pau</i> -A1
PAU777	G. Adams	M54b2	USA (Alaska)	Mile 54	2010	<i>Pau</i> -A3
PAU778	G. Adams	SRb3twigs	USA (Alaska)	Slana River	2010	<i>Pau</i> -A1
PAU779	G. Adams	LTR b9	USA (Alaska)	Little Tok River	2010	<i>Pau</i> -A4
PAU847	G. Adams	PAU53 / PAM-M-2sc	USA (Alaska)	Panguingue River	2008	<i>Pau</i> -A1
PAU848	G. Adams	PAU95 / stem 60-60- 7/9-3-1	USA (Alaska)	Fairbanks	2009	<i>Pau</i> -A1
PAU815	E. Hansen	118-R-IK.1	USA (Oregon)	Yachats	2011	<i>Pau</i> -A1
PAU816	E. Hansen	118-R-IJ.3	USA (Oregon)	Yachats	2011	<i>Pau</i> -A1
PAU817	E. Hansen	118-R-IJ.4	USA (Oregon)	Yachats	2011	<i>Pau</i> -A1
PAU849	E. Hansen	110-R-IN-1	USA (Oregon)	Yachats	2011	<i>Pau</i> -A1
PAU187	D. de Merlier	2276	Belgium	Mons	2001	<i>Pau</i> -E1
PAU188	D. de Merlier	2277	Belgium	Habay-la-Neuve	2001	<i>Pau</i> -E1
PAU558	J. Aguayo	-	Belgium	Harmignies	2009	<i>Pau</i> -E1
PAU561	J. Aguayo	-	Belgium	Harmignies	2009	<i>Pau</i> -E1
PAU87	D. de Merlier	2271	Belgium	Ligneuville	2001	<i>Pau</i> -E1
PAU302	C. Husson	-	France	Baerendorf	2008	<i>Pau</i> -E1
PAU320	O. Caël	-	France	Baerendorf	2008	<i>Pau</i> -E1
PAU368	O. Caël	-	France	Baerendorf	2009	<i>Pau</i> -E1
PAU540	J. Aguayo	-	France	Bischoholtz	2009	<i>Pau</i> -E1
PAU541	J. Aguayo	-	France	Bischoholtz	2009	<i>Pau</i> -E1
PAU542	J. Aguayo	-	France	Bischoholtz	2009	<i>Pau</i> -E1
PAU338	O. Caël	-	France	Bischoffsheim	2008	<i>Pau</i> -E1
PAU60	J.C. Streito	AUL028	France	Girmont	1999	<i>Pau</i> -E2
PAU496	R. Ios	-	France	Métairies-Saint-Quirin	2005	<i>Pau</i> -E1
PAU497	R. Ios	-	France	Métairies-Saint-Quirin	2005	<i>Pau</i> -E1
PAU498	R. Ios	-	France	Métairies-Saint-Quirin	2005	<i>Pau</i> -E1
PAU526	R. Ios	-	France	Métairies-Saint-Quirin	2005	<i>Pau</i> -E1
PAU528	R. Ios	-	France	Métairies-Saint-Quirin	2005	<i>Pau</i> -E1
PAU529	R. Ios	-	France	Métairies-Saint-Quirin	2005	<i>Pau</i> -E1
PAU530	R. Ios	-	France	Métairies-Saint-Quirin	2005	<i>Pau</i> -E1
PAU531	R. Ios	-	France	Métairies-Saint-Quirin	2005	<i>Pau</i> -E1

<b>Isolate</b>	<b>Supplier</b>	<b>Reference</b>	<b>Country</b>	<b>Location</b>	<b>Isolation year</b>	<b>MLG</b>
PAU624	J. Aguayo	-	France	Métairies-Saint-Quirin	2009	<i>Pau-E3</i>
PAU625	J. Aguayo	-	France	Métairies-Saint-Quirin	2009	<i>Pau-E1</i>
PAU626	J. Aguayo	-	France	Métairies-Saint-Quirin	2009	<i>Pau-E1</i>
PAU627	J. Aguayo	-	France	Métairies-Saint-Quirin	2009	<i>Pau-E1</i>
PAU628	J. Aguayo	-	France	Métairies-Saint-Quirin	2009	<i>Pau-E1</i>
PAU629	J. Aguayo	-	France	Métairies-Saint-Quirin	2009	<i>Pau-E1</i>
PAU630	J. Aguayo	-	France	Métairies-Saint-Quirin	2009	<i>Pau-E1</i>
PAU632	J. Aguayo	-	France	Métairies-Saint-Quirin	2009	<i>Pau-E1</i>
PAU633	J. Aguayo	-	France	Métairies-Saint-Quirin	2009	<i>Pau-E1</i>
PAU333	O. Caël	-	France	Wingen-sur-Moder	2008	<i>Pau-E1</i>
PAU538	J. Aguayo	-	France	Wingen-sur-Moder	2009	<i>Pau-E1</i>
PAU539	J. Aguayo	-	France	Wingen-sur-Moder	2009	<i>Pau-E1</i>
PAU300	C. Husson	-	France	Wolfskirchen	2008	<i>Pau-E1</i>
PAU808	S. Werres	BBA 7/03	Germany	-	2002	<i>Pau-E1</i>
PAU811	S. Werres	BBA70434	Germany	-	1997	<i>Pau-E1</i>
PAU668	Z. Nagy	155-a	Hungary	Hansag	1999	<i>Pau-E1</i>
PAU669	Z. Nagy	155-b, CBS117377	Hungary	Hansag	1999	<i>Pau-E1</i>
PAU670	Z. Nagy	155-c	Hungary	Hansag	1999	<i>Pau-E1</i>
PAU89	P. Capretti	Ph 68, CBS109280, P1234*	Italy	Northern Tuscany	2000	<i>Pau-E2</i>
PAU142	A. Munda	Phy-A-Slo	Slovenia	Ljubljana	2003	<i>Pau-E1</i>
PAU780	C. Pintos-Varela	685A	Spain	Ribadavia	2009	<i>Pau-E1</i>
PAU84	C. Olsson	CH161/P875*	Sweden	Gothenburg	1996	<i>Pau-E2</i>
PAU807	C. Olsson	CH162	Sweden	Gothenburg	1996	<i>Pau-E1</i>

Reference: original code for the isolates, MLG: multilocus genotype assignation for each isolate, \* reference isolates in Brasier et al. (9)

Table 2. Characteristics of the microsatellite markers used in this study.

Locus	Primer sequences (5'-3')	GenBank Accession nos	Repeat motif	Alleles	Europe (n=44)				North America (n=27)			
					No. alleles	Ar	H <sub>e</sub>	H <sub>o</sub>	No. alleles	Ar	He	Ho
<b>M-PAU3</b>	F1: TAAGAGACCTCCGGCAGAGA R1: AAAGCGAACACGAAGTCCAC	JX462795	(GA) <sub>10</sub>	105/107/113	3	2.6	0.15	0.02	2	2.0	0.33	0.04
<b>M-PAU9</b>	F1: TCATGGCGCTGATCAAGTAG R1: TAGTGGAGACTTACGGGGTT	JX462796	(AC) <sub>9</sub>	93/95	1	-	-	-	2	2.0	0.11	0.04
<b>M-PAU32</b>	F1: TCAGCTCCTGTATCATCAATCG R1: AAGTTGCCGGTGAGTTGG	JX462797	(CA) <sub>10</sub>	90-92	1	-	-	-	1	-	-	-
<b>M-PAU53</b>	F1: TCTGACGAAGACCTCGACCT R1: CTCGAGATTGCCTTGCTGTC	JX462798	(CT) <sub>8</sub>	183-185	1	-	-	-	1	-	-	-
<b>M-PAU55</b>	F1: ACATTGCTCATTGAGATGCG R1: GTGGAGGAGCACTTCATGGT	JX462799	(GT) <sub>8</sub>	224-226	1	-	-	-	2	2.0	0.37	0.11

N: number of individuals per collection, Alleles: Alleles observed per locus, No. alleles: number of alleles observed by collection, Ar: Allelic richness per locus, H<sub>e</sub>: mean expected heterozygosity per locus, H<sub>o</sub>: mean observed heterozygosity per locus.

Table 3. Multilocus genotypes identified for the European and North American collections of *Pau*

MLG	N	% of isolates	M-PAU3	M-PAU9	M-PAU32	M-PAU53	M-PAU55
<i>Pau-E1</i>	40	90.9%	107/107	93/93	92/92	185/185	226/226
<i>Pau-E2</i>	3	6.8%	113/113	93/93	92/92	185/185	226/226
<i>Pau-E3</i>	1	2.3%	105/107	93/93	92/92	185/185	226/226
<b>Total Europe</b>	44						
<i>Pau-A1</i>	14	51.9%	107/107	95/95	90/90	183/183	226/226
<i>Pau-A2</i>	4	14.8%	107/107	95/95	90/90	183/183	224/224
<i>Pau-A3</i>	4	14.8%	105/105	95/95	90/90	183/183	226/226
<i>Pau-A4</i>	2	7.4%	107/107	95/95	90/90	183/183	224/226
<i>Pau-A5</i>	1	3.7%	105/105	93/93	90/90	183/183	226/226
<i>Pau-A6</i>	1	3.7%	107/107	93/95	90/90	183/183	224/226
<i>Pau-A7</i>	1	3.7%	105/107	95/95	90/90	183/183	224/224
<b>Total North America</b>	27						

MLG: multilocus genotype, N: number of individuals per MLG

Table 4. Private alleles and allele frequency detected for European and North American collections

Locus	Europe		North America	
	Allele	Frequency	Allele	Frequency
M-PAU3	113	0.068	-	-
M-PAU9	-	-	95	0.944
M-PAU32	92	1.000	90	1.000
M-PAU53	185	1.000	183	1.000
M-PAU55	-	-	224	0.240

Table 5. Global and per locus *Fst* and *Rst* between European and North American populations of *Pau*.

<b>Locus</b>	<b>All individuals (N=71)</b>	<b>MLG (N=37)</b>		<b>All individuals (N=71)</b>	<b>MLG (N=37)</b>
<b><i>Fst</i> per locus</b>			<b><i>Rst</i> per locus</b>		
M-PAU3	0.09*	0.03*		0.13*	0.18*
M-PAU9	0.95*	0.91*		0.95*	0.91*
M-PAU32	1.00*	1.00*		1.00*	1.00*
M-PAU53	1.00*	1.00*		1.00*	1.00*
M-PAU55	0.27*	0.30*		0.27*	0.30*
<b><i>Fst</i> multilocus</b>	0.88*	0.82*	<b><i>Rst</i> multilocus</b>	0.74*	0.63*

\* Statistically significant ( $P < 0.05$ )



Table 6. Comparison of the genetic structure of North American and European populations of *Pau* revealed by microsatellite markers. When possible, statistics were computed considering all individuals, or MLG dataset only.

Statistics	Locus	North America		Europe	
		All ind. (N=27)	MLG (N=17)	All ind. (N=44)	MLG (N=20)
<i>R</i>		0.37	nc	0.05	nc
<i>V</i>		0.74	nc	0.14	nc
<i>D<sub>g</sub></i>		0.62	nc	0.17	nc
<i>H<sub>e</sub></i>		0.16 (± 0.16)	0.19 (± 0.19)	0.03 (± 0.07)	0.10 (± 0.23)
<i>H<sub>o</sub></i>		0.04 (± 0.04)	0.06 (± 0.10)	0.004 (± 0.01)	0.02 (± 0.04)
<i>Ar</i>		1.60 (± 0.55)	1.60 (± 0.55)	1.32 (± 0.72)	1.38 (± 0.85)
<b>Pairwise LD</b>		0/3	0/3	nc	nc
$\bar{r}_s$		-0.04	-0.01	nc	nc
<b>Fis per locus</b>					
	M-PAU3	0.73	1.00*	0.85*	0.81*
	M-PAU9	0.67	0.64	nc	nc
	M-PAU32	nc	nc	nc	nc
	M-PAU53	nc	nc	nc	nc
	M-PAU55	0.72*	0.26	nc	nc
<b>Fismultilocus</b>		0.71*	0.62*	0.85*	0.81*
<b>Ris per locus</b>					
	M-PAU3	0.73	0.83*	0.85*	0.84*
	M-PAU9	0.67	0.65	nc	nc
	M-PAU32	nc	nc	nc	nc
	M-PAU53	nc	nc	nc	nc
	M-PAU55	0.71	0.62	nc	nc
<b>Rismultilocus</b>		0.78*	0.67*	0.85*	0.84*

*R*: clonal richness, *V*: clonal evenness, *D<sub>g</sub>*: genotypic diversity, *H<sub>e</sub>*: unbiased expected heterozygosity (mean ± S.D), *H<sub>o</sub>*: observed heterozygosity (mean ± S.D), *Ar*: allelic richness (mean ± S.D), LD: pairwise linkage disequilibrium,  $\bar{r}_s$ : multilocus linkage disequilibrium, nc: cannot be computed, \*: Statistically significant ( $P < 0.05$ )

## ETUDE III

### GENETIC DIVERSITY AND ORIGINS OF EUROPEAN POPULATIONS OF THE ALLOPOLYPLOID HYBRID *Phytophthora alni* subsp. *alni*

Jaime Aguayo<sup>1</sup>, Claude Husson<sup>1</sup>, Fabien Halkett<sup>1</sup>, Zoltán Á. Nagy<sup>2</sup>, József Bakonyi<sup>2</sup>, Andras Szigethy<sup>2</sup>, Pascal Frey<sup>1†</sup> and Benoît Marçais<sup>1†</sup>

<sup>1</sup>INRA, UMR1136 INRA Université de Lorraine "Interactions Arbres/Micro-organismes", IFR110 EFABA, Centre INRA de Nancy, 54280 Champenoux, France.

<sup>2</sup>Plant Protection Institute, Centre for Agricultural Research. Hungarian Academy of Sciences. Budapest, Hungary

† These authors co-directed this work

*Article en préparation*

**Title: Genetic diversity and origins of European populations of the allopolyploid hybrid *Phytophthora alni* subsp. *alni***

**Authors**

Jaime Aguayo<sup>1</sup>, Claude Husson<sup>1</sup>, Fabien Halkett<sup>1</sup>, Zoltán Á. Nagy<sup>2</sup>, József Bakonyi<sup>2</sup>, Andras Szigethy<sup>2</sup>, Pascal Frey<sup>1\*†</sup> and Benoît Marçais<sup>1†</sup>

**Affiliations**

<sup>1</sup>INRA, UMR1136 INRA Université de Lorraine "Interactions Arbres/Micro-organismes", IFR110 EFABA, Centre INRA de Nancy, 54280 Champenoux, France.

<sup>2</sup>Plant Protection Institute, Centre for Agricultural Research. Hungarian Academy of Sciences. Budapest, Hungary

† These authors co-directed this work

**Keywords**

Oomycetes, hybridization, microsatellites, emerging diseases

**Corresponding author:**

\*Pascal Frey

[frey@nancy.inra.fr](mailto:frey@nancy.inra.fr)

Tel: [00 33] 3 83 39 40 56

Fax: [00 33] 3 83 39 40 69

**Short title:** Genetic structure of an allopolyploid pathogen

## Abstract

Hybridization is currently recognized as a major evolutionary force on the emergence of new diseases. Understanding the processes that give rise to polyploid hybrid pathogens is central in the comprehension of the evolution of new emerging diseases. *Phytophthora alni* subsp. *alni* (*Paa*) is a hybrid polyploid pathogen that jeopardizes alder river ecosystems since the early 1990's. It has been proposed that *Paa* emerged by hybridization between two related species, *Phytophthora alni* subsp. *uniformis* (*Pau*) and *Phytophthora alni* subsp. *multiformis* (*Pam*). The genetic structure of populations of *Paa* and the relationship with its parental species was investigated using microsatellite markers. Microsatellite amplification patterns were used to detect the contribution of the two parental subgenomes in the hybrid and to assign putative parents to *Paa*. Our results suggest that more than one hybridization event is implicated on the origin of *Paa*. Twenty eight *Paa* multilocus genotypes were observed, with 80% of the isolates belonging to a dominant genotype. The frequency of the major genotype increased over years with a consequential loss in the clonal richness of *Paa*. This suggests that a selection mechanism might have favoured this genotype over others. Genetic differentiation based on multilocus genotypes revealed substantial differences between European populations of the pathogen ( $\Phi_{st} = 0.43$ ). Most of the genetic diversity found in *Paa* was attributed to the parental *Pau* subgenome contribution which is likely to have structured European populations of *Paa*.

## Introduction

Long considered rare or nonexistent in nature, hybridization and polyploidy (genome duplication) are nowadays recognized to be a rapid track in the evolution of new species in many phylogenetic groups, including fungi and oomycetes (Brasier 2001; Olson and Stenlid 2002; Schardl and Craven 2003). Indeed, nowadays hybridization is widely accepted to be a major factor driving the rise of emerging infectious diseases in plants (Anderson *et al.* 2004; Desprez-Loustau *et al.* 2007). The existence of fungal hybrids has been confirmed and described (see Brasier 2001; Olson and Stenlid 2002; Schardl and Craven 2003; Desprez-Loustau *et al.* 2007 and Giraud *et al.* 2008 for examples of hybridization in genus *Melampsora*, *Tilletia*, *Puccinia*, *Fusarium*) demonstrating that hybridization can occur in most fungal and fungal-like (Stramenopiles) phyla, and that newly formed hybrids may begin new evolutionary trajectories and episodic selection (Schardl and Craven 2003). In the genus *Phytophthora* there is increasing evidence that interspecific hybridization is not uncommon: hybrids have been successfully created in the laboratory, and more importantly, naturally generated hybrids have been discovered (Érsek *et al.* 1995; Kroon *et al.* 2011; Goss *et al.* 2011; Martin *et al.* 2012; Man in't Veld *et al.* 2012). Understanding the processes that give rise to polyploid taxa is a consequential question in evolutionary biology of emerging pathogens. Investigating the identity of parental species, the directionality and the recurrence of the hybridization events, and the genetic variability is basic to understand pathogen evolution and spread. This becomes more challenging when species are suspected to reproduce asexually (Mascheretti *et al.* 2008). Despite their low genetic diversity, asexual hybrid taxa may acquire genetic diversity through somatic mutations, backcrosses with parental taxa and occasional episodes of sexual reproduction (Robertson *et al.* 2010). Additional processes leading to genetic differentiation and/or to the increase of the within-population genetic diversity are migration between clonal populations or the input of individuals produced by recurrent hybridization events between the progenitors (Robertson *et al.* 2010).

One remarkable example of an interspecific hybrid in natural ecosystems is *Phytophthora alni* subsp. *alni* (Paa). The pathogen is associated to alder population decline in Europe since the early 1990's. Paa was initially described as a hybrid between *Phytophthora cambivora* and a species close to *Phytophthora fragariae* (Brasier *et al.* 1999, 2004). Moreover, *P. alni* was described to be a complex which comprises two other taxa –*P. alni* subsp. *uniformis* (Pau)

and *P. alni* subsp. *multiformis* (*Pam*)— initially hypothesized to be genetic breakdown products of *Paa* (Brasier *et al.* 2004). A few years later, *Pau* and *Pam* were identified as the putative parental species of *Paa* (Ioos *et al.* 2006, 2007b). The hybrid *Paa* has a wide distribution in Europe, is more aggressive than its parental species and is considered as the responsible of the disease outbreak (Brasier and Kirk 2001; Santini *et al.* 2003). *Paa* has been described as a nearly tetraploid organism (Brasier *et al.* 1999). However, recent work coupling flow cytometry and quantitative PCR approaches in order to compare the genomes of the three species of the *P. alni* complex indicated that *Paa* probably is a triploid organism, suggesting chromosome loss during the hybridization process (Husson *et al.*, unpublished). The hybrid is homothallic and shows marked developmental instabilities, large morphological variability, and displays an unusual internal transcribed spacer (ITS) polymorphism typical of hybrid species (Brasier *et al.* 1999). Furthermore, it has been shown that *Paa* is unable to complete meiosis beyond metaphase I (Brasier *et al.* 1999). This is consistent with a low level of oospore viability, and the fact that oospore germination has never been observed (Delcán and Brasier 2001). It has been suggested that the spread of *Paa* within Europe is the product of a clonal dispersion (Brasier *et al.* 1995; Nagy *et al.* 2003). However, Ioos *et al.* (2006) demonstrated that *Paa* presents different mitochondrial DNA (mtDNA) patterns that are shared either with *Pau* or *Pam*, suggesting that several sexual hybridization events might have occurred in the genesis of the hybrid, and that these events may have occurred in both directions. The different mtDNA patterns observed, combined with intraspecific variation in four nuclear genes suggested that the spread of *Paa* throughout Europe might not be attributable to a single clone (Ioos *et al.* 2006).

The parental species *Pau* has been isolated in several countries scattered within Europe, and more recently in North America (Adams *et al.* 2009; Aguayo *et al.* 2012). A recent study of the population genetic structure of *Pau* showed that the European population had a low variability and was probably alien and clonal, while the North American population was more diverse and presented signs of outcrossing. These results suggested that North America could be the centre of origin of *Pau* (Aguayo *et al.* 2012). The introduction of *Pau* in Europe would have enabled the hybridization with the other parental species —*Pam*— and could thus be a major cause in the emergence of the hybrid *Paa* (Aguayo *et al.*, 2012). However, when and where the *Pau* invasion took place still remains unknown. Less is known about the origin of the other parental species, *Pam*. Brasier *et al.* (1999) determined by chromosome counting that the ploidy level of *Pam* was between  $2n + 4$  and  $2n + 7$ . However, Ioos *et al.* (2006) analyzing the sequence of nuclear and mitochondrial genes, suggested that *Pam* would be

rather a near-tetraploid species. Indeed, these authors found systematically two divergent alleles, designated as PAM1 and PAM2, in all *Pam* isolates for each of the four nuclear genes studied. Recent work comparing the DNA content by flow cytometry and assessment of the copy number of the nuclear gene alleles by quantitative PCR of the three species confirmed that *Pam* was tetraploid (Husson *et al.*, unpublished). This species could be a homothallic cryptic allotetraploid species that was the result of an ancient hybridization event (Ioos *et al.* 2006). Nevertheless, whether *Pam* is exotic or indigenous to Europe still remains an unknown.

Few studies have described the genetic diversity of polyploid fungi or oomycetes. This is mostly because the allele copy numbers are ambiguous in polyploid, which poses problems for computing allele frequencies and identifying multilocus genotypes. This limits the use of classical population genetics tools for analysis and description of polyploid populations. To tackle these problems different approaches have been used: (i) the analysis of co-dominant markers -such as microsatellites- as dominant markers (see Scheepens *et al.* 2007; Pfeiffer *et al.* 2011 for applications in plant population genetics); (ii) the study of allopolyploid allelic phenotypes instead of allelic frequencies to calculate summary statistics (Obbard *et al.* 2006); (iii) the estimation of the allele copy numbers from microsatellite peak profiles in order to use statistics developed for diploid organisms (Esselink *et al.* 2004; Christiansen 2005; Palop-Esteban *et al.* 2007); (iv) the development of primers specific of one of the contributing progenitor genomes to enable the analysis of allopolyploids with classical population genetics tools (Pairol *et al.* 2008; Korbecka *et al.* 2010).

Microsatellites are codominant markers frequently used to investigate the genetic structure of populations because they usually display a high level of variability. The identification of polymorphic microsatellite loci may be difficult for asexual organisms. However, population genetic studies have enabled to infer important evolutionary and demographic parameters for several clonal oomycetes (Dobrowolski *et al.* 2003; Ivors *et al.* 2006; Prospero *et al.* 2007; Hurtado-Gonzales *et al.* 2008; Mascheretti *et al.* 2008; Goss *et al.* 2009; Vercauteren *et al.* 2010).

The present study constitutes the first continental scale European study of the population genetic structure of the natural interspecific polyploid hybrid *Paa*. Twelve microsatellites markers –including five newly developed markers for this work– were used to investigate the genetic diversity and the reproduction mode of *Paa* on a large isolate collection scattered throughout Europe. We also studied the relationships between the hybrid and its parental species, which can provide additional clues about the hybridization process and its origin.

Finally, we characterized a small collection of one of the putative parents of the hybrid *-Pam-* to investigate the levels of diversity and structure of this poorly known species.

## **Materials and methods**

### ***Isolate collection and DNA extraction***

For suspected clonal organisms the choice of the sampling strategy is highly dependent on the objectives of the study. Arnaud-Haond *et al.* (2007) suggested that when the objective is to assess the clonal diversity in a population, the recommended sampling strategy should be performed along the whole distribution area of the entire target population, to attempt collecting more distinct and rare MLGs. This will minimize bias in the estimation of the diversity indices and deliver better approximations of the real population values. For this study, surveys of *Alnus glutinosa* and *Alnus incana* stands were done across France, Belgium and Hungary between years 1999 and 2009 in order to isolate the three species of the *P. alni* complex. It is noteworthy that *Paa* is more common and more frequently isolated than the parental species (Brasier and Kirk 2001; Santini *et al.* 2003; Ioos *et al.* 2006, Aguayo *et al.* 2012), therefore sampling was conducted from all infected alder trees that presented collar bark tissue showing typical *Phytophthora* canker symptoms in order to increase the chances of obtaining isolates from the three species. Samples were collected from different diseased trees to minimize the risk of sampling the same individual twice. Alder bark pieces were placed on V8 juice agar selective medium for *Phytophthora* species (Ferguson and Jeffers 1999) and growing mycelium was transferred to fresh V8 juice agar medium containing rifampicin (10 mg/L) as soon as detected. In order to increase the sample collection of the three species in Europe, additional isolates from Austria, Belgium, England, Germany, Italy, the Netherlands, Poland, Scotland, Slovenia, Spain and Sweden were obtained from European colleagues (see Supplementary data 1). Geographical location of the sampled sites is shown in Figure 1.

For *Pau*, the European and North American isolates studied by Aguayo *et al.* (2012) were also used in this study [see Adams *et al.* (2009) and Aguayo *et al.* (2012) for details].

All DNA extractions in this study were performed from pure fresh or lyophilized mycelium with the BioSprint 96 DNA plant kit used in combination with BioSprint 96 automated workstation (QIAGEN, Courtaboeuf, France) following the BS-96DNA-plant protocol or by using the QIAGEN DNEASY Plant Mini Kit following the supplier instructions. All isolates



were identified using the set of species-specific PCR primers for the nuclear genes *RAS*-Ypt and *TRP1* developed by Ioos *et al.* (2006).

### ***Microsatellite development***

Five microsatellite markers previously developed by Aguayo *et al.* (2012) were used to genotype the isolate collection of the three species. Five supplementary loci developed following the same protocol were also used [see methodological details in Malausa *et al.* (2011) and Aguayo *et al.* (2012)]. The original aim of this study was to find species-specific microsatellite markers for the two parental species of the hybrid. For these purposes, microsatellite markers were developed independently from *Pau* and *Pam*. Thus, the methodology described below was performed for both described parental species. Briefly, extracted DNA from three isolates of *Pau* (PAU60, PAU 320 and PA340) and three isolates of *Pam* (PAM54, PAM71 and 08dur8) were mixed independently in two pools, used to generate an enriched library for each species, and sequenced on a Roche GS-FLX Titanium pyrosequencing platform. Enrichment step, data analysis and automated primer design were performed as described by Malausa *et al.* (2011). The enriched microsatellite library generated a total of 34,483 and 15,090 microsatellite sequences for *Pau* and *Pam*, respectively. Choice of microsatellite loci for further tests was constrained to motifs of length  $\geq 2$  bp and a minimum repeat number of 5. Using these criteria, 110 loci were retained (81 and 29 loci for *Pau* and *Pam*, respectively). The total set of primers was tested for amplification on a panel of 10 *Pau*, 10 *Pam* and 5 *Paa* isolates. Polymerase chain reactions (PCR) mixtures (12  $\mu$ l final reaction volume) were carried out using the Type-it™ Microsatellite PCR kit, containing 2  $\mu$ l DNA, 5  $\mu$ l of 2x Type-it™ mix, 1  $\mu$ l of 5x Q-solution, 0.2 mM reverse primer, 0.02 mM M13-tailed forward primer and 0.2 mM fluorescence-labelled M13 primer (5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3'). PCR reactions were performed in a GeneAmp PCR System 9700 Thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with the following conditions: an initial denaturing step of 5 min at 95°C; 35 cycles including 30 s initial denaturing at 94°C, 90 s annealing at 60°C and 60 s extension at 72°C; and a 30 min final extension step at 60°C. Amplified PCR products were loaded on an ABI 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Fragments were sized with a LIZ-1200 size standard. Allele scoring was performed using GENEMAPPER 4.0 (Applied Biosystems). Loci that showed allelic polymorphism, expected peak size, and correct peak amplification were retained for the following tests. Microsatellite loci designed from the *Pam* enriched library did not show any polymorphism among the three species, so they were discarded for further tests.

Additionally, the microsatellite primers PA17 and PA23 described by Ioos *et al.* (2007a) were also used for genotyping. Characteristics of the 12 microsatellite loci are presented in Table 1. Selected microsatellite loci were labeled with a fluorescent tag (FAM, NED, VIC or PET). PCR conditions for genotyping the total collection of *Paa*, *Pam* and *Pau* isolates were the same as described above. PCR were performed using the Type-it™ Microsatellite PCR kit in a 12 µl final reaction volume containing 2 µl DNA, 5 µl of 2x Type-it™ mix, 1 µl of 5x Q-solution and 0.2 µM of each reverse and forward primers. Six multiplex PCR were run comprising 1-3 loci. Finally, PCR products from these multiplex reactions were pooled into two independent mixes according to their fluorescent tag color and size, and analyzed as described above.

## Data analysis

### *Assignment of microsatellite alleles to polyploid taxa*

Recent work comparing the DNA content by flow cytometry and assessment of the copy number of the nuclear gene alleles by quantitative PCR of the three species suggested that *Paa* is a triploid organism which suffered a chromosomal loss following the hybridization process (Husson *et al.*, unpublished). Under this hypothesis, *Pau* –the diploid parent–, is expected to contribute a haploid genome, whereas *Pam* –suspected to be tetraploid– is expected to contribute two haploid genomes [referred to as PAM1 and PAM2 in Ioos *et al.* (2006)]. Under this hypothesis, different allele amplification patterns may be found in *Paa* depending on the microsatellite markers analyzed. Some primers were species-specific, amplifying only one of the parental species and *Paa*. Loci amplified in *Pau*, and not in *Pam*, were considered to represent the *Pau* haploid contribution and will hereafter be referred to as the subgenome *Pau*. Loci amplified in *Pam* and not in *Pau* were considered to represent the *Pam* contribution (referred to as the subgenome *Pam*). By contrast, for loci that were present in both parental subgenomes, *Paa* individuals with two or three alleles are expected. Individuals with three alleles should show similar peak height for the three alleles, since each allele should be present in one copy. Individuals with two alleles can correspond to two different cases. If each allele can be attributed to each parental species, individuals are expected to be homozygous for the diploid parental *Pam* subgenome. In this case, a two-fold peak height ratio is expected for alleles corresponding to the *Pam* subgenome, compared to those from the *Pau* subgenome, as these are supposed to be present in two copies. Another case occurs when *Pau* and *Pam* share one allele. In such a case we would expect that the shared allele could be a contribution of both subgenomes in *Paa* and the expected peak height

ratio for this allele should be two-fold compared to the remaining allele. Allele dosage was checked for consistency using the microsatellite DNA allele counting-peak ratios method MAC-PR (Esselink *et al.* 2004) using quantitative values for microsatellite allele amplification peak height. We made the assumption that the genome of *Pam* was comprised of two subgenomes -PAM1 and PAM2- which should correspond to the contribution of the unknown putative parents of *Pam* (Ioos *et al.* 2006). According to this hypothesis, *Pam* should be a tetraploid species. Therefore, if only one allele was observed, we assumed that the allele was present in four copies. Whenever two alleles were present, we assumed that each allele was present in two copies. If three alleles could be observed, the peak height ratio was used to distinguish which of the alleles was present in two copies, considering that its height should be two-fold the height of the other two alleles present. The allele dosage was verified by genotyping twice a subset of 221 isolates from the three species (171 *Paa*, 12 *Pau* and 38 *Pam* isolates) in independent PCR assays to confirm reproducibility of the allele peak height ratios.

#### ***Assignment of Paa and Pam isolates to geographical populations***

The number of isolates per site was limited because of low isolations rates. We thus grouped isolates at a larger scale (minimum group size of 4) for geographical analyzes. As *Paa* is dispersed at long-distance by river water (Jung and Blaschke 2004), we decided to test the genetic structure of *Paa* at this level and thus grouped isolates by watershed whenever the exact sampling locations were known. Seventeen different watershed populations could be defined: 8 in France, 4 in Germany, 3 in Hungary, 1 in Spain and 1 in France-Belgium. Three additional populations were defined for collections where geographical coordinates were incomplete or unknown (England, Scotland and Poland). These populations were grouped by country and were arbitrary located at the country barycenter. For *Pam*, two populations were defined corresponding to 2 different watersheds. One supplementary *Pam* population was located in the barycenter of Germany.

#### ***Genetic characterization of Paa***

Genetic characterization of *Paa* was performed for all the genotyped isolates (270 isolates). Multilocus genotypes (MLG) were identified by scoring the number of variant alleles as described by Goyeau *et al.* (2007). Global clonal richness ( $R$ ) was computed as  $\frac{G-1}{N-1}$  where  $G$  is the number of MLG detected in the sample and  $N$  is the total sample size. The F-DASH program (Obbard *et al.* 2006) was used to estimate a simple measure of allele diversity: the

mean number of different alleles between pairs of individuals across all samples ( $H'_i$ ). Linkage disequilibrium (**LD**) was analyzed separately for subgenomes that constitute *Paa* (subgenomes *Pau* and *Pam*). **LD** was tested with Fisher's exact tests ( $H_0$ =genotypes at one locus are independent from genotypes at the other locus) for each pair of loci using GENEPOP (Raymond and Rousset 1995), using the Markov chain method with 100 batches and 10 000 iterations per batch.

The mitochondrial type, i.e. either of the U or M mitotype (Ioos *et al.* 2006), was available for a subsample of 36 of the studied *Paa* isolates. This information was compared to the MLG revealed by the 12 studied microsatellites markers.

### ***Geographical and temporal analyzes of the Paa collection***

Clonal richness ( $R$ ) was computed for the 20 watershed/country populations (254 isolates).

Population multilocus genotypic diversity ( $D_g$ ) was computed as  $D_g = \frac{N}{N-1} \times \left( 1 - \sum_i p_i^2 \right)$ ,

where  $p_i$  is the frequency of the  $i$ th genotype and  $N$  is the number of individuals sampled, was estimated using GenoDive (Meirmans and Van Tienderen 2004). Genotypic diversity ranges from 0, when every individual is the same and 1 when every individual is different. Pairwise  $F$ -statistics were computed using SPAGeDI 1.2, following a genotype-based approach (Hardy and Vekemans 2002). SPAGeDI computes genetic parameters based on polysomic inheritance as in autopolyploids. However, polyploids with disomic inheritance (i.e. allopolyploids) can be treated if alleles from the different homologous genomes can be distinguished so that genotypes are treated as diploid data. Owing to disomic inheritance, the  $F_{st}$  values of polyploids may be overestimated because of an excess of heterozygotes (Lo *et al.* 2009). This may lead to an overestimation of the within-population diversity (Obbard *et al.* 2006), even when the alleles present in the polyploid individuals are completely known. Hence,  $F_{st}$  values were also estimated scoring microsatellites as dominant markers, *i.e.* using a phenotype-based approach. This approach is suggested to be less affected by ploidy levels (Obbard *et al.* 2006). Alleles were scored as either present or absent, and  $\Phi_{st}$  was estimated using GENALEX v.6.5b3 (Peakall and Smouse 2012) by an analysis of molecular variance (AMOVA; Excoffier *et al.* 1992) with 10000 permutations to determine how genetic diversity is partitioned within and between populations.

For temporal analyzes of the genetic structure of *Paa*, all the isolates were grouped by year of collection. The evolution of the clonal richness was compared across years by Poisson

regression. To account for the strong sampling unbalance between years and locations, we simulated samples by randomly selecting one isolate per year for each location. This was repeated 10 times and the mean clonal richness per year was computed. We also assessed the genetic structure as described above comparing pairwise  $F_{st}$  and  $\Phi_{st}$  statistics computed with SPAGEDI 1.2 and GENALEX v.6.5b3.

A non metric multidimensional scaling (NMDS) was constructed using the genetic distance of Bruvo (Bruvo *et al.* 2004) running the R-package POLYSAT (Clark and Jasieniuk 2011). This genetic distance is adapted to polyploid organisms and is similar to band sharing indices used with dominant data, but takes into account the mutational distance between microsatellite alleles. The distance ranges from 0 to 1, with 0 indicating identical genotypes, and 1 indicating maximum dissimilarity. This analyze was performed on the whole *Paa* collection.

### ***Origin of Paa MLGs***

To determine the origin of the *Paa* MLGs, we adapted the method proposed by Robertson *et al.* (2010). Parental MLGs were identified as described above (Goyeau *et al.* 2007). Simulated crosses between the parental MLGs were performed under the hypothesis of a sexual origin of the hybrid (Ioos *et al.* 2006) to determine whether some of the possible mating combinations could generate a specific *Paa* MLG. Whenever the number of allele mutations to form a *Paa* MLG was zero, the parental *Pau* and *Pam* MLGs were considered as potential progenitor of the hybrid MLG.

### ***Genetic characteristics of Pam***

The parental species *Pam* was studied for their population genetic characteristics. Indeed, *Pau* has been already described by Aguayo *et al.* (2012). Global clonal richness and genotypic diversity were computed as above. Pairwise  $F_{st}$  statistics were computed for the 3 watershed/country populations following a genotype approach and a phenotype approach.

## **Results**

### ***Sample collection***

A total of 516 isolates of *Phytophthora alni sensu lato* were recovered from the surveys in alder stands in France, Belgium and Hungary (Supplementary data 1). From these isolates, 6.6% were *Pau* (mostly isolated in Eastern France), 6.0% were *Pam* (isolated from two French watersheds, the Durance and the Sèvre Niortaise) and 87.4% were identified as *Paa*. Additional isolates, i.e. 47 *Paa*, 36 *Pau* and 8 *Pam*, were provided by European colleagues

(Supplementary data 1). PCR amplification with species-specific primers for nuclear genes *RAS-Ypt* and *TRP1* confirmed the species status (*Paa*, *Pau* or *Pam*) of all isolates (data not shown).

### ***Microsatellite analyzes across species***

A total of 380 *Paa*, *Pam* and *Pau* individuals were genotyped (270 *Paa*, 39 *Pam* and 71 *Pau*). In total, 34 alleles were amplified across the three species at the 12 microsatellite loci. The number of alleles amplified at each locus across all species ranged from 1 to 4. Consistent with the hypothesis used about ploidy level, 1-2, 1-3 and 1-4 alleles by locus were amplified in *Pau*, *Paa* and *Pam*, respectively. Four alleles were observed only for the locus M-PAU14. The total number of alleles displayed by each species was 30 for *Paa*, 15 for *Pam* and 17 for *Pau*. Only one allele was shared among the three species (allele 68 at locus M-PAU14). Fourteen alleles were shared between *Paa* and *Pam*, 12 between *Paa* and *Pau* while three and four were observed exclusively in *Paa* and *Pau* respectively. Among the four alleles specific to *Pau*, three were observed only in North American isolates. No allele was specific to *Pam*. Locus M-PAU55 presented a particular case: allele 243 which was observed exclusively in North American populations of *Pau*, was also observed in one Hungarian *Paa* isolate. Polymorphism of the microsatellite markers was low, although all microsatellite loci showed polymorphism in *Paa*. The most informative loci were M-PAU11 and M-PAU14, with four alleles observed. Within *Pam*, only three loci exhibited some informative polymorphism (M-PAU11, M-PAU14 and M-PAU72).

### ***Allele assignment to polyploid genomes***

The assignment of alleles to the polyploid genomes was mostly straightforward (see Figure 2 for examples of loci M-PAU14 and M-PAU72). Four loci were *Pau*-specific (M-PAU3, PA17, M-PAU53 and M-PAU55) and one was *Pam*-specific (PA23) while the seven others cross-amplified in the two parental species. The assignment of alleles to *Pam* or *Pau* subgenomes was unambiguous for five other loci since no alleles were shared between *Pam* and *Pau* (M-PAU9, M-PAU11, M-PAU15, M-PAU32, M-PAU56 and M-PAU72). When only one allele was present at a locus for the *Pam* subgenome, the peak height was twice the average peak height of other alleles at this locus, indicating that the isolate was homozygous. Repeatability of the allele peak height ratios was consistent between isolate replicates ( $r^2=0.76$ ;  $P < 0.001$ ; Figure 3). This permitted an allele dosage by loci for all the individuals genotyped. Only one allele was shared by *Pau* and *Pam* (allele 68, locus M-PAU14). This

locus presented 2-3 alleles for *Paa* isolates. For the few *Paa* isolates that exhibited two alleles at this locus, peak height ratios enabled us to determine that this allele 68 was present in two copies, *i.e.* contributed by both the *Pau* and *Pam* subgenomes.

### ***Global genetic characteristics of Paa***

The total number of MLGs as revealed by the 12 microsatellites was 28. However, the information on mitochondrial DNA available for a subsample of the isolates (Ioos *et al.* 2006) showed that the MLGs were not true clones. Indeed, the only MLG for which the mtDNA information was available for more than one isolate contained isolates with either U or M mitotypes. One major MLG (*Paa-1*) gathered 80.1% of the isolates. Other MLGs gathered between one and ten isolates. Global clonal richness was low ( $R=0.10$ ). Global genotypic diversity was moderate ( $D_g = 0.39$ ) and significant ( $P < 0.01$ ). The global genetic diversity, represented by the average number of unshared alleles between pairs of individuals within samples was low and not significant ( $H'_i=0.073$ ;  $P>0.05$ ). When tests could be performed, 6/6 pairs of loci exhibited no pairwise LD for the subgenome *Pau* (55 pairwise comparisons between loci). For the subgenome *Pam*, 9/10 pairs of loci showed no pairwise LD (28 pairwise comparisons between loci).

### ***Genetic structure of Paa populations at the geographical and temporal scale***

A total of 254 *Paa* samples could be assigned in a watershed/country population. Diversity indexes for each population are listed in Table 2. Five populations (Freising, Loir, Sèvre Niortaise, Meuse and Salamanca) exhibited a complete clonal structure: all the isolates were assigned to the dominant MLG, *Paa-1*. The Zala and the Saône populations were dominated by *Paa-1* and exhibited low values of clonal richness and genotypic diversity indexes. Although limited in size, the English, Rhine and Braunschweig populations exhibited relatively high diversity, with levels of clonal richness and genotypic diversity close to 1. These populations correspond to relatively ancient isolates, in particular in the English and Rhine population with sampling years in the late nineties. The other populations exhibited moderate diversity indexes. Most of the populations were strongly dominated by the presence of *Paa-1*, excepting the Oder and the Ognon populations, which were dominated by MLGs absent in the other populations and exhibited private alleles. The Oder population was the only one where *Paa-1* was not observed. Global  $F_{st}$  computed following the genotype-based approach was low and not significant (average  $F_{st}=0.02$ ; 95% CI: -0.001-0.002). By contrast,  $\Phi_{st}$  estimates computed following the phenotype-based approach was high and significant  $\Phi_{st}$

=0.43;  $P < 0.001$ ). According to AMOVA, up to 57% of the variation was found within populations. Indeed, the non metric multidimensional scaling (NMDS) revealed a strong genetic structure within the *Paa* population, with 2 major clusters (Figure 4). The distribution of these 2 clusters in Europe showed a clear pattern: isolates of cluster 1 were located significantly more north (Student  $t = 4.3$ ;  $P < 0.001$ ) and east (Student  $t = 4.66$ ,  $P < 0.001$ ) compared to isolates of cluster 2 (Figure 5).

Logistic regression analyzes showed a significant decrease of the clonal richness from 1996 to 2009 (likelihood chisq of 17.6,  $P < 0.001$ , Figure 6a). Indeed, if *Paa-1* was present since the beginning of the period, it was not as dominant in the early collection years (1996-1997) where minor MLGs were more frequent (Figure 6b). Global  $F_{st}$  across years computed following the genotypic approach was low and not significant ( $F_{st} = 0.0025$ ; 95% CI: -0.001-0.0028). Similar results were obtained for  $\Phi_{st}$  estimates following the phenotype-based approach, with a low and slightly significant genetic differentiation ( $\Phi_{st} = 0.069$ ;  $P$  value = 0.014).

#### ***Putative origin of Paa's MLGs***

Putative parents that could have generated the specific polyploid multilocus phenotypes were identified for 16 out of the 28 observed *Paa* MLGs (Table 3). As expected, no putative parents were found for MLGs that had alleles exclusively detected in the hybrid. None of the North American *Pau* isolates matched as putative parent of *Paa* MLGs. *Paa* isolates with the *Pau-Eu2* as putative *Pau* progenitor were all gathered in the cluster 1 of the NMDS while *Paa* isolates that had either *Pau-Eu 1* or *3* as putative progenitor were all gathered in cluster 2 (Figure 4). By contrast, the putative *Pam* progenitors did not appear to have any influence on the population structure revealed by the NMDS (Figure 4). The year of isolation was not significantly different for isolates with either *Pau-Eu 1-3* or *Pau-Eu 2* as putative *Pau* progenitor ( $t = 0.41$ ;  $P = 0.68$ ).

#### ***Genetic characteristics of the Pam collection***

Five MLGs were identified among the 39 *Pam* isolates studied. *Pam* global clonal richness was low ( $R=0.11$ ). One major MLG (*Pam-1*) gathered 56% of the isolates. A second MLG (*Pam-3*), which gathered 31% of the isolates, was only present in the Durance valley collection. The two Dutch isolates, PAM71 and PAM90, and the French isolate PAM54 were grouped together in MLG *Pam-4*. A single isolate from the Durance valley (07dur14) constituted the last MLG, *Pam-2*. The average number of unshared alleles between pairs of



individuals across all samples was moderate, but not significant ( $H'_i=0.53$ ;  $P>0.05$ ). The global genotypic diversity was moderate but not significant ( $G=0.59$ ;  $P>0.05$ ).

A total of 35 *Pam* isolates were assigned to watershed/country populations. The Sèvre Niortaise population was completely clonal, with all isolates belonging to *Pam*-1. Three MLGs, *Pam*-1, *Pam*-2 and *Pam*-3, were observed in the Durance population (46%, 50% and 4% of the isolates respectively). Two MLGs were observed in the German population (three isolates for *Pam*-1 and one for *Pam*-5). Global  $F_{st}$  computed following the genotypic approach was low and not significant ( $F_{st}=0.07$ ; 95% CI: -0.019-0.051) while the  $\Phi_{st}$  estimates computed under the phenotype-based approach was high and slightly significant ( $\Phi_{st} = 0.306$ ;  $P=0.04$ ). According to AMOVA, 69% of the variation was found within populations.

## Discussion

### *Assignment of microsatellite alleles to Paa and Pam*

In the present study we were able to assign microsatellite alleles of each *Paa* individual to the corresponding parental subgenome by combining the analysis of microsatellite amplification patterns and peak height ratios following the methodology proposed by Esselink *et al.* (2004). As expected, the hybrid *Paa* showed genotypes that combine the genome of its putative parents, *Pau* and *Pam*. The result thus confirms the hypothesis that *Paa* has arisen through the hybridization of these two species. Our results also agree with the hypothesis that *Paa* suffered a chromosomal reduction after hybridization, as up to three alleles were found per loci. We conclude that *Paa* results from the addition of two subgenomes contributions: a haploid subgenome contributed by the diploid parent –*Pau*– and a diploid subgenome contributed by the tetraploid parent *Pam*. These results constitute new evidence that *Paa* is a triploid as suggested by Husson *et al.* (unpublished data).

Differences in the allele amplification patterns were detected. These differences can be attributed to an incomplete complementarity of the designed primers to the target regions (Catalán *et al.* 2006). An explanation to this may be that the primers used in this study were designed for the genomes of the parental species separately, expecting to obtain parental species-specific primers that would amplify only one subgenome in the hybrid. However, seven loci showed cross-amplification among the three species genomes. Repeatability tests confirmed that peak height is reproducible, which validates the methodology used.

### ***Genetic characteristics of Paa and Pam and relationship between the three species***

This constitutes the first large scale study of the genetic structure of European populations of *Paa*. Microsatellite markers revealed a low polymorphism in the European collection of *Paa*, which was largely dominated by one major MLG (80% of the isolates). It can be speculated that this low diversity may be due to the chosen microsatellite markers. However, we tested more than 100 microsatellite loci developed through pyrosequencing and most of the markers were monomorphic. Moreover, similar results were reported for another set of microsatellite markers developed for the *P. alni* complex by Ioos *et al.* (2007a). The low genetic diversity within *Paa* is consistent with that of its parental species. A low genetic diversity has been already shown for European populations of *Pau* (Aguayo *et al.* 2012).

Our results suggest that a large part of the diversity within *Paa* has been inherited from the two parental species throughout multiple and recurrent hybridization events. Indeed, we identified several putative progenitors for *Paa* among the *Pau* and *Pam* isolates. Moreover, whenever the information was available, we could detect both the *Pau* and the *Pam* mitochondrial type within single MLGs, indicating that these MLGs were not true clones but rather the results of several hybridization events. Furthermore, the occurrence of both mitotypes within the same MLG also suggests that the hybridization took place in both directions, as already suspected by Ioos *et al.* (2006). All the variation found within *Paa* could not be attributed to *Pau* and *Pam*, as some alleles found in the hybrid were not detected in the parental species. This could well be the result of an incomplete description of the alleles present in the parents' populations as the sampling was limited, or because some alleles disappeared with time in the parental populations. Indeed, the LD analyses of the two subgenomes showed that linkage disequilibrium was not complete. This could mean that the study of the parental subgenomes within *Paa* may reflect the ancient history of *Pam* and *Pau*. Indeed, Aguayo *et al.* (2012) found a complete LD in the European *Pau* collection. This was not the case for the *Pau* subgenome in *Paa* where some independent loci could be detected. However, our results do not allow us to discard other important sources of variation, such as mutation or genetic drifts, which may be important in creating new polymorphism. Such an effect cannot be ignored, in particular with microsatellite markers which exhibit higher mutation rates than other markers, although, little is known about mutation rates in oomycetes (Goodwin 1997).

Recurrent origins of eukaryotic polyploid species from different populations of their progenitors seems to be the rule in many taxa (Soltis and Soltis 1999, 2000) and has been

observed for other *Phytophthora* hybrids (Bonants *et al.* 2000; Man in 't Veld *et al.* 2007; Hurtado-Gonzales *et al.* 2009). The geographic pattern of the *Paa* population confirmed the importance of multiple hybridizations in shaping the European population of *Paa*. While the major MLG, *Paa1* was widely distributed, other MLGs could have a very limited distribution and dominate some population as seen in the Oder and Ognon populations. The spatial structure detected by the NMDS analysis could be explained by differences in the *Pau* subgenome contribution, i.e. different hybridization events. The *Pau*-E2 MLG was active as *Paa* progenitor only in the North and East of Europe while *Paa* isolates with *Pau*-E1 and *Pau*-E3 progenitor could be found throughout the continent. This *Pau*-E2 MLG is rare although present in several countries as it was found only once in Sweden and once in eastern France (Aguayo *et al.* 2012). Different results were obtained when  $F_{st}$  and  $\Phi_{st}$  were computed following the genotype-based approach and the phenotype-based approach. The genotype-based approach did not reveal significant population structure while the phenotype-based did. The genotype-based approach seems to be inappropriate to study allopolyploid organisms where disomic inheritance is suspected. The apparent excess of heterozygotes due to disomic inheritance will inflate the within-population diversity, even when there are no differences between individuals within populations (Obbard *et al.* 2006; Lo *et al.* 2009). In our study, eight of the twelve loci were heterozygous, which could have biased the  $F_{st}$  estimations using the genotype-approach.

The geographic pattern observed in Europe suggests that both *Pau* and *Pam* have been dispersed in Europe and that they have hybridized in several European regions. *Paa* has very efficient long-distance dispersal through the rivers or through the trade of infested plants from nurseries (Jung and Blaschke 2004; Schumacher *et al.* 2006; Thoirain *et al.* 2007). This could explain the widespread presence of the dominant *Paa*-1 MLG. Our results indeed show that *Paa* is spreading clonally in the environment. Sexual reproduction is unlikely due to the high rate of abortive oospores and the absence of germination (Delcán and Brasier 2001). This appears to be a shared characteristic of other *Phytophthora* natural hybrids described to date (Bonants *et al.* 2000; Man in't Veld *et al.* 2012). This is also consistent with the fact that triploid plants resulting from hybridization between a diploid and a tetraploid species are usually sterile (Ramsey and Schemske, 1998). Asexual reproduction, through apomixes permits a more secure means of perpetuating a successful new hybrid and polyploid genotypes than other reproductive modes (i.e. selfing) and offers immediate, and often total, reproductive isolation from parental taxa (Robertson *et al.* 2010). Hybrids may have selective advantages over their progenitors by heterosis which enables them to exploit new niches or

even exclude their progenitors from a shared niche (Schardl and Craven 2003; Giraud *et al.* 2008). Indeed, *Paa* appears to be more aggressive on alders and more frequent than its progenitors (Santini *et al.* 2003; Ioos *et al.* 2006, Aguayo *et al.* 2012). This is also what we found in this work. Man in 't Veld *et al.* (2007) found similar results on natural hybrids formed between *P. cactorum* and *P. hedraindra*, which seem to have displaced their parental taxa from their host.

We observed a pattern of declining clonal richness with an increased frequency of the dominant *Paal* MLG over time. Shifts in the frequency of genotypes over time has been described as genotypic selection (Pan and Price 2001) and can cause rapid changes in populations when fitness differences are large (Goodwin 1997). Genotypic selection will lead to change the clonal population by increasing the proportion of genotypes with more advantageous values of specific traits (Pan and Price 2001). From an epidemiological point of view, adaptation of plant pathogens to their host and the environmental conditions can be measured in terms of aggressiveness traits (i.e. infection efficiency, latent period, sporulation rate, infectious period or lesion size), which combines notions of pathogen fitness and virulence (Pariaud *et al.* 2009). Even if microsatellites are neutral markers and do not imply diversity in fitness among MLGs, the presence of one dominant MLG may be linked to the ability of some individuals to out-compete other MLGs (Mascheretti *et al.* 2008). Vercauteren *et al.* (2010) suggests that rare genotypes are subject to genetic drift and can disappear from local populations. This may for example follow human-induced bottlenecks due to eradication efforts. However, management of alders in Europe is rare and has been done in only a few isolated experimental trials (Gibbs 2003). Mascheretti *et al.* (2008) indicates that genotypic diversity is highly dependent of weather conditions: during unfavorable climatic seasons, pathogen populations might crash to endemic levels and individual genotypes need to re-colonize infested sites every late winter and spring. Seasonal variations offer an advantage to already established genotypes during the re-colonization process and may cause the extinction of rare genotypes through drift. This last hypothesis may explain the widespread occurrence of one *Paa* MLG in Europe. As other *Phytophthora*, *Paa* is highly sensitive to temperature (Schumacher *et al.* 2006; Thoirain *et al.* 2007; Cooke *et al.* 2007) and has poor survival in the soil principally explained by the absence of overwintering spores (Jung and Blaschke 2004; Schumacher *et al.* 2006; Elegbede *et al.* 2010; Cerny and Strnadova 2012).

Although our sampling was limited in size and area, this study enables us to infer some genetic characteristics of *Pam*: the collection exhibited low allelic diversity and clonal richness indexes and, a moderate genotypic diversity. Our results show that six loci were

heterozygous. This is consistent with studies of Ioos *et al.* (2006) who demonstrated that *Pam* presented two significantly divergent nuclear alleles (PAM1 and PAM2). *Pam* is a homothallic species (Brasier *et al.* 1999) and constant selfing should drive homothallic species to a homozygous state under a sexual reproductive mode (Goodwin 1997). Moreover, germinating oospores have not been observed for *Pam* (Delcán and Brasier 2001). As Ioos *et al.* (2006), we inferred that *Pam* might be reproducing only asexually, which would maintain a high levels of heterozygosity. Using the phenotype-based approach we were able to detect genetic differences between the three *Pam* populations studied. However, our sampling was low and unbalanced with most of the isolates collected from the Durance valley in France and we cannot conclude much about the population structure of *Pam*.

To our knowledge this is the first study describing the genetic structure of a polyploid oomycete. Our study suggests that apomixes, polyploidy and other factors discussed above may play an important role in the success of emerging pathogens that may spread over wide geographical scales. It also appears that human disturbance, by meanings of the introduction of new pathogens into unharmed regions, created further opportunities for the hybrid pathogen to spread. The role of adaptation and speciation processes that could influence the successful establishment of the pathogen remains still to be studied.

## References

- Adams GC, Catal M, Trummer LM, 2009. Distribution and severity of Alder Phytophthora in Alaska. In: Gen. Tech. Rep. PSW-GTR-229. Department of Agriculture FS (Ed.), *Proceedings of the sudden oak death fourth science symposium*, Albany, CA. USA, pp. 29–49.
- Anderson PK, Cunningham AA, Patel NG, Morales FJ, Epstein PR, Daszak P, 2004. Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends in Ecology & Evolution* **19**: 535–544.
- Arnaud-Haond S, Duarte CM, Alberto F, Serrão EA, 2007. Standardizing methods to address clonality in population studies. *Molecular Ecology* **16**: 5115–5139.
- Bonants PJM, Hagenaar-de Weerd M, Man In't Veld WA, Baayen RP, 2000. Molecular Characterization of Natural Hybrids of *Phytophthora nicotianae* and *P. cactorum*. *Phytopathology* **90**: 867–874.
- Brasier CM, 2001. Rapid evolution of introduced plant pathogens via interspecific hybridization. *BioScience* **51**: 123–133.
- Brasier CM, Cooke DEL, Duncan JM, 1999. Origin of a new *Phytophthora* pathogen through interspecific hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**: 5878–5883.
- Brasier CM, Kirk SA, 2001. Comparative aggressiveness of standard and variant hybrid alder phytophthoras, *Phytophthora cambivora* and other *Phytophthora* species on bark of *Alnus*, *Quercus* and other woody hosts. *Plant Pathology* **50**: 218–229.
- Brasier CM, Kirk SA, Delcán J, Cooke DEL, Jung T, Man In't Veld WA, 2004. *Phytophthora alni* sp. nov. and its variants: designation of emerging heteroploid hybrid pathogens spreading on *Alnus* trees. *Mycological Research* **108**: 1172–1184.
- Brasier CM, Rose J, Gibbs JN, 1995. An unusual *Phytophthora* associated with widespread alder mortality in Britain. *Plant Pathology* **44**: 999–1007.

- Bruvo R, Michiels NK, D'Souza TG, Schulenburg H, 2004. A simple method for the calculation of microsatellite genotype distances irrespective of ploidy level. *Molecular Ecology* **13**: 2101–2106.
- Catalán P, Segarra-Moragues JG, Palop-Esteban M, Moreno C, González-Candelas F, 2006. A Bayesian Approach for Discriminating Among Alternative Inheritance Hypotheses in Plant Polyploids: The Allotetraploid Origin of Genus *Borderea* (Dioscoreaceae). *Genetics* **172**: 1939–1953.
- Cerny K, Strnadova V, 2012. Winter survival of *Phytophthora alni* subsp. *alni* in aerial tissues of black alder. *Journal of Forest Science* **58**: 328–336.
- Christiansen DG, 2005. A microsatellite-based method for genotyping diploid and triploid water frogs of the *Rana esculenta* hybrid complex. *Molecular Ecology Notes* **5**: 190–193.
- Clark LV, Jasieniuk M, 2011. POLYSAT: an R package for polyploid microsatellite analysis. *Molecular Ecology Resources* **11**: 562–566.
- Cooke DEL, Schena L, Cacciola SO, 2007. Tools to detect, identify and monitor *Phytophthora* species in natural ecosystems. *Journal of Plant Pathology* **89**: 13–28.
- Delcán, Brasier, 2001. Oospore viability and variation in zoospore and hyphal tip derivatives of the hybrid alder *Phytophthoras*. *Forest Pathology* **31**: 65–83.
- Desprez-Loustau M-L, Robin C, Buée M, Courtecuisse R, Garbaye J, Suffert F, Sache I, Rizzo DM, 2007. The fungal dimension of biological invasions. *Trends in Ecology & Evolution* **22**: 472–480.
- Dobrowolski MP, Tommerup IC, Shearer BL, O'Brien PA, 2003. Three clonal lineages of *Phytophthora cinnamomi* in Australia revealed by microsatellites. *Phytopathology* **93**: 695–704.
- Elegbede CF, Pierrat J-C, Aguayo J, Husson C, Halkett F, Marçais B, 2010. A statistical model to detect asymptomatic infectious individuals with an application in the *Phytophthora alni*-induced Alder decline. *Phytopathology* **100**: 1262–1269.

- Érsek T, English J, Schoelz J, 1995. Creation of species hybrids of *Phytophthora* with modified host ranges by zoospore fusion. *Phytopathology* **85**: 1343–1347.
- Esselink GD, Nybom H, Vosman B, 2004. Assignment of allelic configuration in polyploids using the MAC-PR (microsatellite DNA allele counting—peak ratios) method. *TAG Theoretical and Applied Genetics* **109**: 402–408.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro J, 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **131**: 479–491.
- Ferguson AJ, Jeffers SN, 1999. Detecting multiple species of *Phytophthora* in container mixes from ornamental crop nurseries. *Plant Disease* **83**: 1129–1136.
- Gibbs J, 2003. Management and control of *Phytophthora* disease of alder. *Forestry Commission Bulletin*.
- Giraud T, Enjalbert J, Fournier E, Delmotte F, Dutech C, 2008. Population genetics of fungal diseases of plants. *Parasite* **15**: 449–454.
- Goodwin SB, 1997. The Population Genetics of *Phytophthora*. *Phytopathology* **87**: 462–473.
- Goss EM, Carbone I, Grünwald NJ, 2009. Ancient isolation and independent evolution of the three clonal lineages of the exotic sudden oak death pathogen *Phytophthora ramorum*. *Molecular Ecology* **18**: 1161–1174.
- Goss EM, Cardenas ME, Myers K, Forbes GA, Fry WE, Restrepo S, Grünwald NJ, 2011. The Plant Pathogen *Phytophthora andina* Emerged via Hybridization of an Unknown *Phytophthora* Species and the Irish Potato Famine Pathogen, *P. infestans*. *PLoS ONE* **6**: e24543.
- Goyeau H, Halkett F, Zapater M-F, Carlier J, Lannou C, 2007. Clonality and host selection in the wheat pathogenic fungus *Puccinia triticina*. *Fungal Genetics and Biology* **44**: 474–483.
- Hardy OJ, Vekemans X, 2002. SPAGEDI: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes* **2**: 618–620.



- Hurtado-Gonzales OP, Aragon-Caballero L, Apaza-Tapia W, Donahoo R, Lamour K, 2008. Survival and Spread of *Phytophthora capsici* in Coastal Peru. *Phytopathology* **98**: 688–694.
- Hurtado-Gonzales OP, Aragon-Caballero LM, Flores-Torres JG, Veld WM in 't, Lamour KH, 2009. Molecular comparison of natural hybrids of *Phytophthora nicotianae* and *P. cactorum* infecting loquat trees in Peru and Taiwan. *Mycologia* **101**: 496–502.
- Ioos R, 2006. Caractérisation génétique de *Phytophthora alni* Brasier & S.A Kirk, hybride interspécifique agent du dépérissement de l'aulne en Europe.
- Ioos R, Andrieux A, Marçais B, Frey P, 2006. Genetic characterization of the natural hybrid species *Phytophthora alni* as inferred from nuclear and mitochondrial DNA analyses. *Fungal Genetics and Biology* **43**: 511–529.
- Ioos R, Barrès B, Andrieux A, Frey P, 2007a. Characterization of microsatellite markers in the interspecific hybrid *Phytophthora alni* ssp. *alni*, and cross-amplification with related taxa. *Molecular Ecology Notes* **7**: 133–137.
- Ioos R, Panabières F, Industri B, Andrieux A, Frey P, 2007b. Distribution and expression of elicitor genes in the interspecific hybrid oomycete *Phytophthora alni*. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 5587–5597.
- Ivors K, Garbelotto M, Vries IDE, Ruyter-Spira C, Hekkert BT, Rosenzweig N, Bonants P, 2006. Microsatellite markers identify three lineages of *Phytophthora ramorum* in US nurseries, yet single lineages in US forest and European nursery populations. *Molecular Ecology* **15**: 1493–1505.
- Jung T, Blaschke M, 2004. *Phytophthora* root and collar rot of alders in Bavaria: distribution, modes of spread and possible management strategies. *Plant Pathology* **53**: 197–208.
- Korbecka G, Rymer PD, Harris SA, Pannell JR, 2010. Solving the Problem of Ambiguous Paralogy for Marker Loci: Microsatellite Markers with Diploid Inheritance in Allohexaploid *Mercurialis annua* (Euphorbiaceae). *Journal of Heredity* **101**: 504–511.
- Kroon LPNM, Brouwer H, Cock AWAM de, Govers F, 2011. The Genus *Phytophthora* Anno 2012. *Phytopathology* **102**: 348–364.

- Lo E, Stefanović S, Dickinson TA, 2009. Population genetic structure of diploid sexual and polyploid apomictic hawthorns (Crataegus; Rosaceae) in the Pacific Northwest. *Molecular Ecology* **18**: 1145–1160.
- Malausa T, Gilles A, Megléczy E, Blanquart H, Duthoy S, Costedoat C, Dubut V, Pech N, Castagnone-Sereno P, Délye C, Feau N, Frey P, Gauthier P, Guillemaud T, Hazard L, Corre V Le, Lung-Escarmant B, Malé P-JG, Ferreira S, Martin J-F, 2011. High-throughput microsatellite isolation through 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing of enriched DNA libraries. *Molecular Ecology Resources* **11**: 638–644.
- Man in't Veld WA, Cock A de, Summerbell R, 2007. Natural hybrids of resident and introduced *Phytophthora* species proliferating on multiple new hosts. *European Journal of Plant Pathology* **117**: 25–33.
- Man in't Veld WA, Rosendahl K, Hong C, 2012. *Phytophthora Xserendipita* sp. nov. and *P. Xpelgrandis*, two destructive pathogens generated by natural hybridization. *Mycologia*.
- Martin FN, Abad ZG, Balci Y, Ivors K, 2012. Identification and Detection of *Phytophthora*: Reviewing Our Progress, Identifying Our Needs. *Plant Disease* **96**: 1080–1103.
- Mascheretti S, Croucher PJP, Vettraino A, Prospero S, Garbelotto M, 2008. Reconstruction of the Sudden Oak Death epidemic in California through microsatellite analysis of the pathogen *Phytophthora ramorum*. *Molecular Ecology* **17**: 2755–2768.
- Meirmans PG, Tienderen PH Van, 2004. Genotype and Genodive: two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms. *Molecular Ecology Notes* **4**: 792–794.
- Nagy ZÁ, Bakonyi J, Érsek T, 2003. Standard and Swedish variant types of the hybrid alder *Phytophthora* attacking alder in Hungary. *Pest Management Science* **59**: 484–492.
- Obbard DJ, Harris SA, Pannell JR, 2006. Simple allelic-phenotype diversity and differentiation statistics for allopolyploids. *Heredity* **97**: 296–303.
- Olson Å, Stenlid J, 2002. Pathogenic fungal species hybrids infecting plants. *Microbes and Infection* **4**: 1353–1359.

- Pairon M, Jacquemart A-L, Potter D, 2008. Detection and characterization of genome-specific microsatellite markers in the allotetraploid *Prunus serotina*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **133**: 390–395.
- Palop-Esteban M, Segarra-Moragues JG, González-Candelas F, 2007. Historical and biological determinants of genetic diversity in the highly endemic triploid sea lavender *Limonium dufourii* (Plumbaginaceae). *Molecular Ecology* **16**: 3814–3827.
- Pan JJ, Price JS, 2001. Fitness and evolution in clonal plants: the impact of clonal growth. *Evolutionary Ecology* **15**: 583–600.
- Pariaud B, Ravigné V, Halkett F, Goyeau H, Carlier J, Lannou C, 2009. Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens. *Plant Pathology* **58**: 409–424.
- Peakall R, Smouse P, 2012. GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics*.
- Pfeiffer T, Roschanski AM, Pannell JR, Korbecka G, Schnittler M, 2011. Characterization of Microsatellite Loci and Reliable Genotyping in a Polyploid Plant, *Mercurialis perennis* (Euphorbiaceae). *Journal of Heredity* **102**: 479–488.
- Prospero S, Hansen EM, Grünwald NJ, Winton LM, 2007. Population dynamics of the sudden oak death pathogen *Phytophthora ramorum* in Oregon from 2001 to 2004. *Molecular Ecology* **16**: 2958–2973.
- Ramsey J, Schemske DW, 1998. Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **29**, 467–501.
- Raymond M, Rousset F, 1995. GENEPOP (Version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*: 248–249.
- Robertson A, Rich TCG, Allen AM, Houston L, Roberts C, Bridle JR, Harris SA, Hiscock SJ, 2010. Hybridization and polyploidy as drivers of continuing evolution and speciation in *Sorbus*. *Molecular Ecology* **19**: 1675–1690.
- Santini A, Barzanti GP, Capretti P, 2003. Susceptibility of some mesophilic hardwoods to Alder *Phytophthora*. *Journal of Phytopathology* **151**: 406–410.

- Schardl CL, Craven KD, 2003. Interspecific hybridization in plant-associated fungi and oomycetes: a review. *Molecular Ecology* **12**: 2861–2873.
- Scheepens JF, Veeneklaas RM, Zande L Van de, Bakker JP, 2007. Clonal structure of *Elytrigia atherica* along different successional stages of a salt marsh. *Molecular Ecology* **16**: 1115–1124.
- Schumacher J, Leonhard S, Grundmann BM, Roloff A, 2006. New Alder disease in Spreewald biosphere reserve - causes and incidental factors of an epidemic. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* **58**: 141–147.
- Soltis DE, Soltis PS, 1999. Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. *Trends in Ecology & Evolution* **14**: 348–352.
- Soltis PS, Soltis DE, 2000. The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**: 7051–7057.
- Thoirain B, Husson C, Marçais B, 2007. Risk factors for the Phytophthora-induced decline of Alder in Northeastern France. *Phytopathology* **97**: 99–105.
- Vercauteren A, Dobbelaere I De, Grünwald NJ, Bonants P, Bockstaele E Van, Maes M, Heungens K, 2010. Clonal expansion of the Belgian Phytophthora ramorum populations based on new microsatellite markers. *Molecular Ecology* **19**: 92–107.

## Tables

**Table 1. Characteristics of the microsatellite markers used for this study**

Locus	GenBank accession No.	Primer sequence (5'-3')	Repeat Motif	Size (bp)
M-PAU3	JX462795	F: TAAGAGACCTCCGGCAGAGA R: AAAGCGAACACGAAGTCCAC	(GA) <sub>10</sub>	110
M-PAU9	JX462796	F: TCATGGCGCTGATCAAGTAG R: TAGTGGAGACTTACGGGGTT	(AC) <sub>9</sub>	95
M-PAU11	JX462790	F: AGGTGGAGTGCTAGAGGCAA R: GCGACCTTTGAGTGACCAAT	(CAT) <sub>7</sub> C(TTC) <sub>9</sub>	189
M-PAU14	JX462791	F: GAAGGCTACGTAACCTTGCTTTT R: ATCGAACTTCTCTTCCTTCACG	(GT) <sub>9</sub>	80
M-PAU15	JX462792	F: CCCGTCCTTCATCAACAAAA R: GAGGCTCTGCGATGCAATAG	(CT) <sub>9</sub>	80
M-PAU32	JX462797	F: TCAGCTCCTGTATCATCAATCG R: AAGTTGCCGGTGAGTTGG	(CA) <sub>9</sub>	99
M-PAU53	JX462798	F: TCTGACGAAGACCTCGACCT R: CTCGAGATTGCCTTGCTGTC	(CT) <sub>8</sub>	187
M-PAU55	JX462799	F: ACATTGCTCATTGAGATGCG R: GTGGAGGAGCACTTCATGGT	(GT) <sub>8</sub>	232
M-PAU56	JX462793	F: GCTGGTGGATAATTCGTCGT R: CAAAAGCGATCCTCTTCACC	(GA) <sub>7</sub>	81
M-PAU72	JX462794	F: GTTCTCGAGACTCAGCAGCC R: CAGAGGGATACCCGAGTGAA	(CAA) <sub>7</sub>	146
PA17	DQ665905	F: AGCGACAATGCAGGAAGC R: CTGTCTGGGCATTCATGTCTG	(GTC) <sub>4</sub> (...)(GC) <sub>4</sub>	317
PA23	DQ665906	F: GGAGATAGCCACGAGACACC R: CAAGCATCGCTGTAAACGAC	(GAA) <sub>7</sub>	155

**Table 2. Summary of the genetic diversity of *Paa* by population**

<i>Population</i> <sup>a</sup>	<i>N</i>	<i>Year</i>	<i>MLG</i>	<i>R</i>	<i>G</i>
England (UK)	5	1996-1997	4	0.75	0.90
Scotland (UK)	4	2000	2	0.33	0.50
Balaton (Hungary)	10	2001-2009	2	0.11	0.20
Repce (Hungary)	26	2009	6	0.20	0.65
Zala (Hungary)	36	2002-2009	3	0.06	0.06
Oder (Germany)	9	2005	3	0.25	0.42
Braunschweig (Germany)	4	2000-2006	4	1.00	1.00
Rhine (Germany)	6	1996-2003	4	0.6	0.87
Freising (Germany)	6	2004	1	nc	nc
Poland	9	2005	2	0.13	0.39
Meuse (France-Belgium)	19	1999-2009	1	nc	nc
Rhin (France)	11	1997-2008	2	0.11	0.20
Meurthe and Moselle (France)	8	1999-2008	2	0.14	0.25
Sarre and Nied (France)	37	2001-2009	5	0.11	0.21
Saône (France)	21	1998-2009	2	0.05	0.10
Ognon (France)	5	2003	2	0.25	0.40
Loire (France)	8	2009	2	0.14	0.25
Loir (France)	12	2009	1	nc	nc
Sèvre Niortaise (France)	14	2009	1	nc	nc
Salamanca (Spain)	6	2010	1	nc	nc

<sup>a</sup> For each watershed / country population, isolation years, the number of isolates sampled (*N*) and the number of resulting multilocus genotypes (*MLG*) are given.

*R*: clonal richness; *G* : genotypic diversity; nc: not computed.

**Table 3. Multilocus genotypes by species and putative origins of *Paa* after computed after mating simulations**

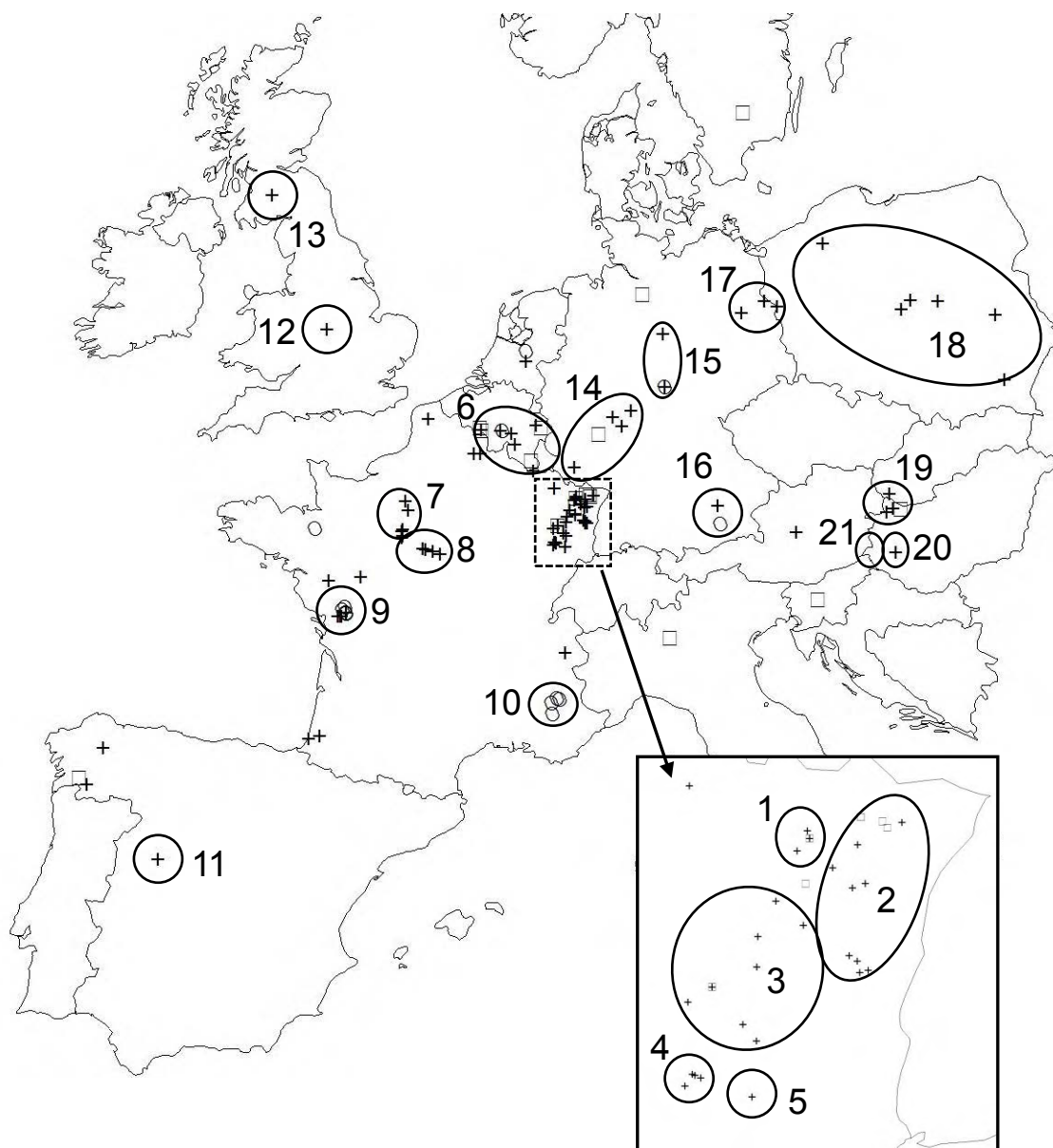
Species	MLG	N	M-PAU11	M-PAU14	M-PAU15	M-PAU3	M-PAU32	M-PAU56	M-PAU72	M-PAU9	PA17	PA23	M-PAU53	M-PAU55	Mating simulation matches
Paa	<i>Paa-1</i>	217	151/188/188	62/68/77	71/71/74	107	86/86/92	71/74/78	140/152/156	83/83/93	317	135/150	204	245	<i>Pam</i> 1,2,5 x <i>Pau</i> 1,3
Paa	<i>Paa-2</i>	3	151/188/188	62/68/68	71/71/74	107	86/86/92	71/74/78	140/152/156	83/83/93	317	135/150	204	245	<i>Pam</i> 1,2,4,5 x <i>Pau</i> 1,3
Paa	<i>Paa-3</i>	2	151/188/188	62/68/75	71/71/74	107	86/86/92	71/74/78	140/152/156	83/83/93	317	135/150	204	245	<i>Pam</i> 2,4 x <i>Pau</i> 1,3
Paa	<i>Paa-4</i>	1	151/188/188	62/68/75	71/71/74	107	86/86/92	71/74/74	140/156/156	83/83/93	317	135/150	204	245	<i>Pam</i> 2,4 x <i>Pau</i> 1,3
Paa	<i>Paa-5</i>	1	151/188/188	62/68/77	71/71/74	107	86/86	71/74/74	140/156/156	83/83/93	322	135/150	204	245	<i>Pam</i> 1,2 x nm
Paa	<i>Paa-6</i>	1	151/188/188	62/68/77	71/71/74	107	86/86/92	71/74/78	140/152/156	83/83/93	322	135/150	204	245	<i>Pam</i> 1,2 x nm
Paa	<i>Paa-7</i>	7	151/188/188	62/68/75	71/71/74	113	86/86/92	71/74/78	140/152/156	83/83/93	317	135/150	204	245	<i>Pam</i> 2,4 x <i>Pau</i> 2
Paa	<i>Paa-8</i>	1	151/188/188	62/68/77	71/71/74	107	86/86/92	71/74/78	140/156/156	83/83/93	317	135/150	204		<i>Pam</i> 1,2 x nm
Paa	<i>Paa-9</i>	1	151/188/188	62/68/77	71/71/74	107	86/86/92	71/74/78	140/152/152	83/83/93	317	135/150	204	245	<i>Pam</i> 1,2,5 x <i>Pau</i> 1,3
Paa	<i>Paa-10</i>	3	151/188/188	62/68/77	71/71/74	107	86/86/92	71/78/78	140/152/152	83/83/93	317	135/150	204	245	<i>Pam</i> 1,2,5 x <i>Pau</i> 1,3
Paa	<i>Paa-11</i>	1	188/188	62/68/77	74	107	86/86/92	71/78/78	140/152/152	83/83/93	317	135/150	204	245	nm
Paa	<i>Paa-12</i>	1	151/188/188	62/68/75	71/71/74	107	86/86/92	71/74/78	140/152/156	83/83/93	317	135/135	204	245	<i>Pam</i> 2,4 x <i>Pau</i> 1,3
Paa	<i>Paa-13</i>	2	151/188/188	62/68/77	71/71/74	107	86/86/92	71/74/78	140/156/156	83/83/93	317	135/150	204	245	<i>Pam</i> 1,2,5 x <i>Pau</i> 1,3
Paa	<i>Paa-14</i>	10	151/188/188	62/68/77	71/71/74	113	86/86/92	71/74/78	140/152/156	83/83/93	317	135/150	204	245	<i>Pam</i> 1,2,5 x <i>Pau</i> 2
Paa	<i>Paa-15</i>	1	151/188/188	62/68/77	71/71/74	107	86/86/92	71/74/78	140/152/156	83/83	317	135/150	204	245	<i>Pam</i> 1,2 x nm
Paa	<i>Paa-16</i>	1	151/188/188	62/68/77	71/71/74	107	86/86/92	71/74/78	140/152/156	83/83/93	317	135/135	204	245	<i>Pam</i> 1,2,5 x <i>Pau</i> 1,3
Paa	<i>Paa-17</i>	1	151/188/188	62/68/75	71/71/74	113	86/86/92	71/74/74	140/156/156	83/83/93	317	135/150	204	245	<i>Pam</i> 2,4 x <i>Pau</i> 2
Paa	<i>Paa-18</i>	1	151/188/188	62/68/77	71/71/74	113	86/86/92	71/74/78	140/152/156	83/83/93	317	135/150	204	245	<i>Pam</i> 1,2,4,5 x <i>Pau</i> 2
Paa	<i>Paa-19</i>	4	151/185/185	62/68/77	71/71/74	107	86/86/92	71/74/78	140/152/156	83/83/93	317	135/150	204	245	nm x <i>Pau</i> 1,3
Paa	<i>Paa-20</i>	3	151/188/188	62/68/77	71/71/74	107	86/86/92	71/74/74	140/156/156	83/83/93	317	135/150	204	245	<i>Pam</i> 1,2,5 x <i>Pau</i> 1,3
Paa	<i>Paa-21</i>	1	151/188/188	62/68/77	71/71/74	107	86/86/92	71/74/78	140/152/156	83/83/93	317	135/150	206	245	<i>Pam</i> 1,2 x nm
Paa	<i>Paa-22</i>	1	151/191/191	62/68/77	71/71/74	113	86/86/92	71/74/78	140/152/156	83/83/93	317	135/150	204	245	<i>Pam</i> 3 x <i>Pau</i> 2
Paa	<i>Paa-23</i>	1	151/188/188	62/68/77	71/71/74	113	92	71/74/78	140/152/156	83/83/93	317	135/150	204	245	nm x <i>Pau</i> 2
Paa	<i>Paa-24</i>	1	151	62/68/77	71/71/74	107	86/86/92	71/74/78	140/152/156	83/83	317	135/150	204	245	nm x <i>Pau</i> 1,3
Paa	<i>Paa-25</i>	1	151	62/68/77	71/71/74	107	86/86/92	71/74/74	140/156/156	83/83/93	317	135/150	204	245	nm
Paa	<i>Paa-26</i>	1	151/188/188	62/68/77	71/71/74	107	86/86/92	71/74/74	140/152/156	83/83/93	317	135/150	204	245	<i>Pam</i> 1,2,5 x <i>Pau</i> 1,3
Paa	<i>Paa-27</i>	2	151/188/188	62/68/77	71/71/74	107	86/86/92	71/74/78	140/152/156	83/83/93	317	135/150	-	245	<i>Pam</i> 1,2 x nm
Paa	<i>Paa-28</i>	1	151/188/188	62/68/77	71/71/74	107	86/86/92	71/74/78	140/152/156	83/83/93	317	135/150	204	243	<i>Pam</i> 1,2 x nm

Species	MLG	N	M-PAU11	M-PAU14	M-PAU15	M-PAU3	M-PAU32	M-PAU56	M-PAU72	M-PAU9	PA17	PA23	M-PAU53	M-PAU55	Mating simulation matches
Pam	<i>Pam-1</i>	22	188/188/188/188	62/68/77/77	71/71/71/71	-	86/86/86/86	74/74/78/78	152/152/156/156	83/83/83/83	-	135/135/150/150	-	-	
Pam	<i>Pam-2</i>	1	188/188/188/188	62/68/75/77	71/71/71/71	-	86/86/86/86	74/74/78/78	152/152/156/156	83/83/83/83	-	135/135/150/150	-	-	
Pam	<i>Pam-3</i>	12	188/188/188/188	62/68/77/77	71/71/71/71	-	86/86/86/86	74/74/78/78	152/152/156/156	83/83/83/83	-	135/135/150/150	-	-	
Pam	<i>Pam-4</i>	3	191/191/191/191	62/68/75/75	71/71/71/71	-	86/86/86/86	74/74/78/78	152/152/156/156	83/83/83/83	-	135/135/150/150	-	-	
Pam	<i>Pam-5</i>	1	188/188/188/188	62/68/77/77	71/71/71/71	-	86/86/86/86	74/74/78/78	152/152/152/152	83/83/83/83	-	135/135/150/150	-	-	
Pau	<i>Pau-E1</i>	41	151/151	68/68	74/74	107/107	92/92	71/71	140/140	93/93	317/317	-	204/204	245/245	
Pau	<i>Pau-E2</i>	3	151/151	68/68	74/74	113/113	92/92	71/71	140/140	93/93	317/317	-	204/204	245/245	
Pau	<i>Pau-E3</i>	1	151/151	68/68	74/74	105/107	92/92	71/71	140/140	93/93	317/317	-	204/204	245/245	
Pau	<i>Pau-A1</i>	14	151/151	68/68	74/74	107/107	90/90	71/71	140/140	95/95	317/317	-	202/202	245/245	
Pau	<i>Pau-A2</i>	4	151/151	68/68	74/74	107/107	90/90	71/71	140/140	95/95	317/317	-	202/202	243/243	
Pau	<i>Pau-A3</i>	4	151/151	68/68	74/74	105/105	90/90	71/71	140/140	95/95	317/317	-	202/202	245/245	
Pau	<i>Pau-A4</i>	2	151/151	68/68	74/74	107/107	90/90	71/71	140/140	95/95	317/317	-	202/202	243/245	
Pau	<i>Pau-A5</i>	1	151/151	68/68	74/74	105/105	90/90	71/71	140/140	93/93	317/317	-	202/202	245/245	
Pau	<i>Pau-A6</i>	1	151/151	68/68	74/74	107/107	90/90	71/71	140/140	93/95	317/317	-	202/202	243/245	
Pau	<i>Pau-A7</i>	1	151/151	68/68	74/74	105/107	90/90	71/71	140/140	95/95	317/317	-	202/202	243/243	

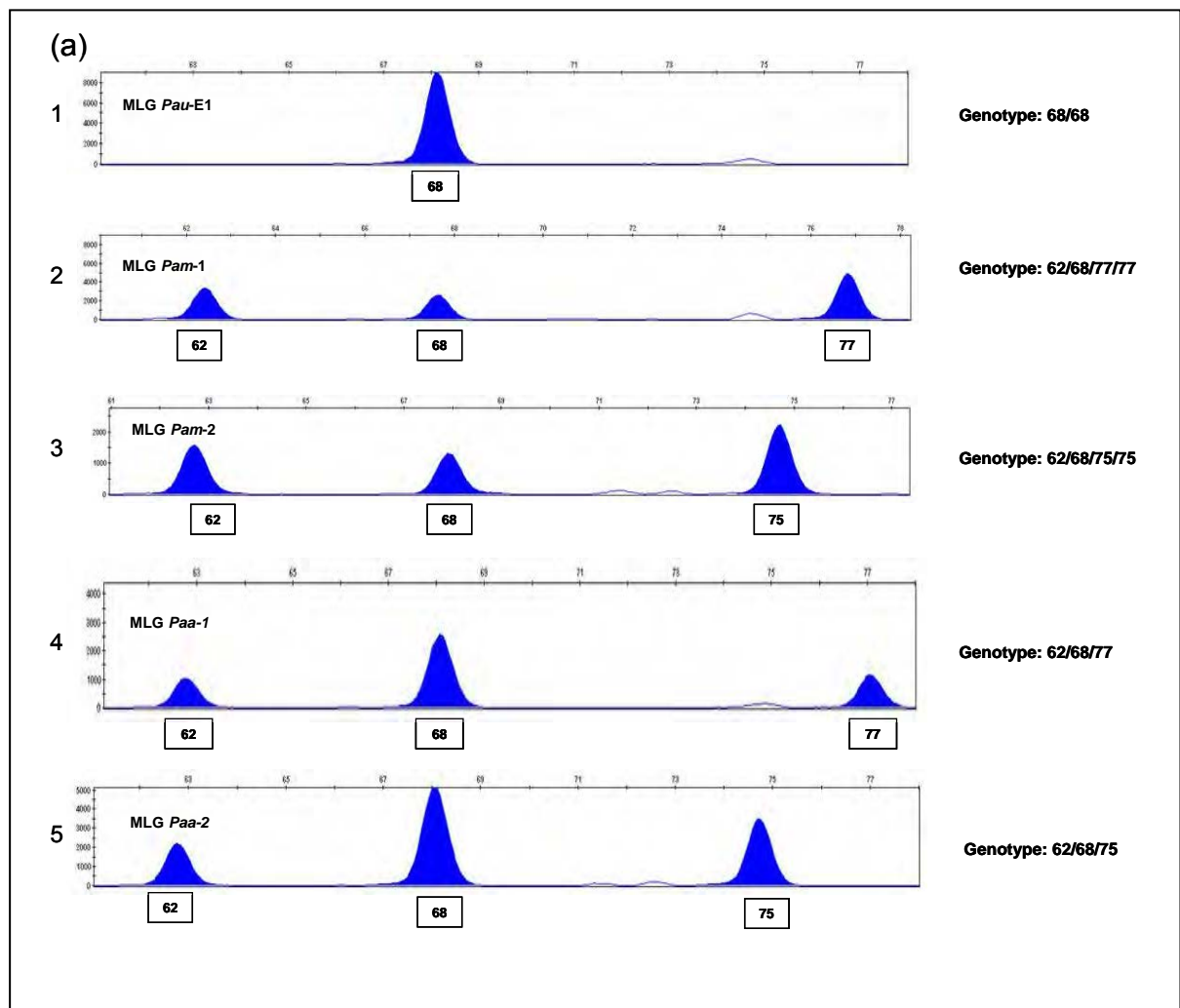


## Figures

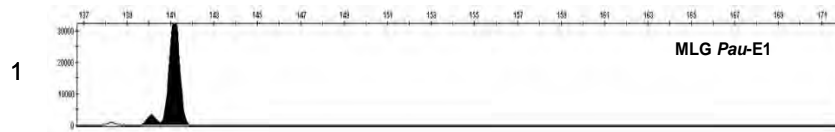
Figure 1. Geographical locations of sampled stands *Paa* (+), *Pau* (□) and *Pam* (O). 1. Sarre and Nied (Fr), 2. Rhine (Fr), 3. Meurthe and Moselle (Fr), 4. Saône (Fr), 5. Ognon (Fr), 6. Meuse (Fr and Be), 7. Loir (Fr), 8. Loire (Fr), 9. Sèvre-Niortaise (Fr), 10. Durance (Fr), 11. Salamanca (Sp), 12. England (UK), 13. Scotland (UK), 14. Rhine (De), 15. Braunschweig (De), 16. Freising (De), 17. Oder (De), 18. Poland, 19. Repçe (Hu), 20. Balaton (Hu), 21. Zala (Hu).



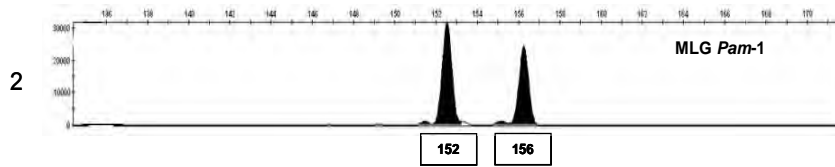
**Figure 2.** Sample chromatograms of amplification patterns from loci M-PAU14 and M-PAU72 for some observed MLGs of *Pau*, *Pam* and *Paa*. (a) MLG *Pau*-E1 amplified a single allele which according to the diploid condition of *Pau* would represent a heterozygote locus. MLGs *Pam*-1 and *Pam*-2 amplified each 3 alleles. According to the recent estimations of its ploidy level (4n) and comparing the allele peak size, we assumed that one of the alleles was in 2 copies (allele 77 for *Pam*-1 and allele 75 for *Pam*-2). MLGs *Paa*-1 and *Paa*-2 amplified both 3 alleles. Alleles 62 and 75/77 were assumed to represent the diploid *Pam* subgenome in *Paa*, as they were not present in *Pau*. Allele 68 was shared by the 3 species. For *Paa* we assumed that this allele represented the haploid *Pau* subgenome. (b) Dosage for locus M-PAU72 was quite straightforward as both parental species did not shared alleles. *Pau*-E1 was homozygote for allele 140. *Pam*-1 was heterozygote for alleles 152/156. *Pam*-5 was homozygote for allele 152. *Paa*-1 exhibited the addition of the haploid *Pau* subgenome (allele 140) and the diploid *Pam* subgenome (alleles 152/156). *Paa*-10 exhibited alleles 140 and 152. Comparing allele peak size and parental patterns this MLG was coded as 140/152/152 for this locus.



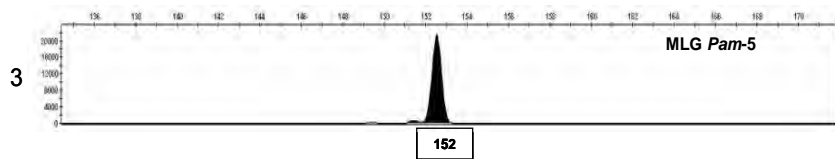
(b)



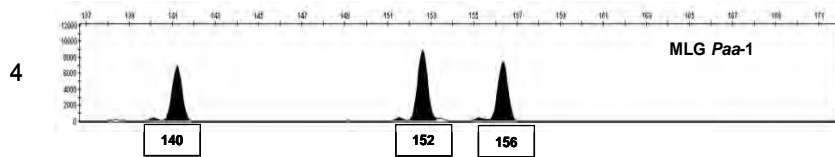
Genotype: 140/140



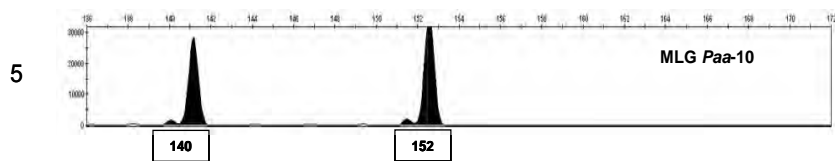
Genotype: 152/152/156/156



Genotype: 152/152/152/152

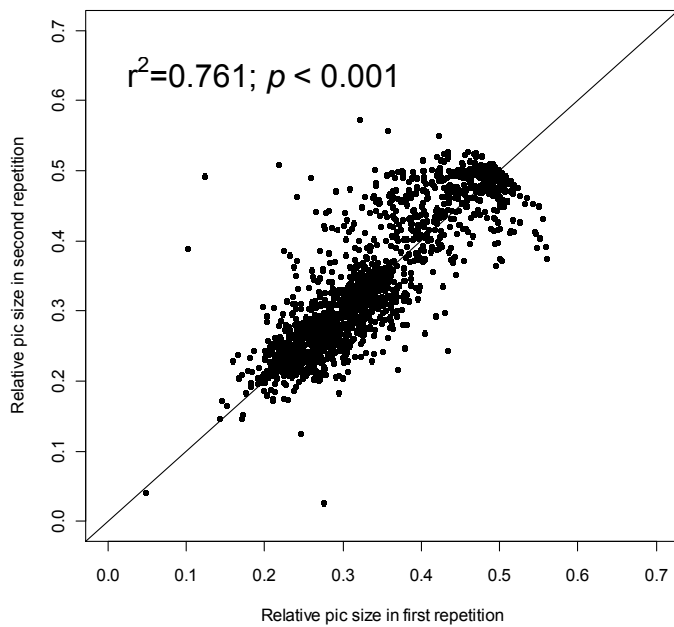


Genotype: 140/152/156

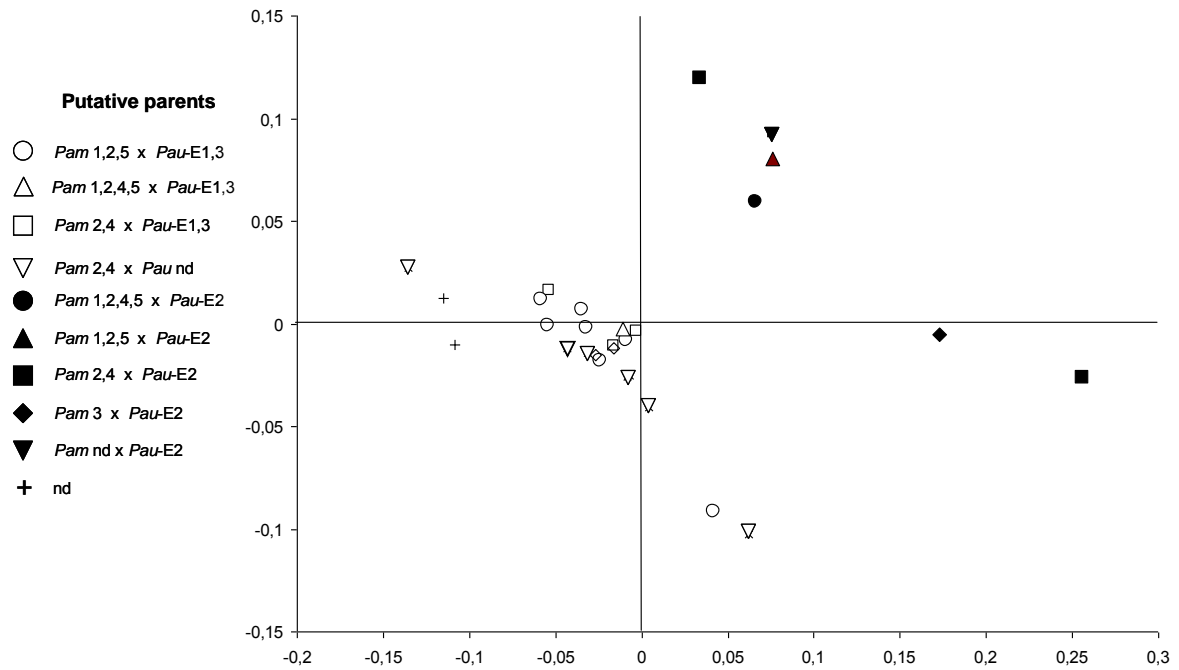


Genotype: 140/152/152

**Figure 3.** Comparison of relative size of *Paa* microsatellite peaks replicates. Comparisons were performed whenever more than 1 allele was found. The figure represents comparisons of allele peak relative size between alleles 1-2, 1-3 and 2-3.

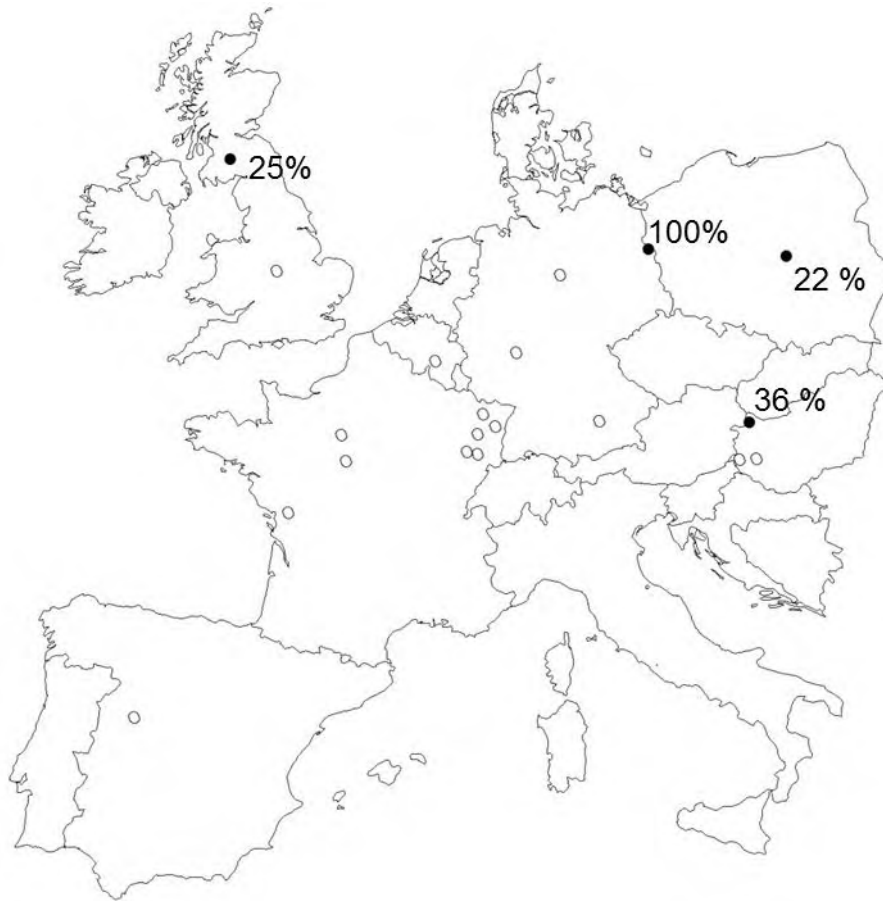


**Figure 4.** NMDS analyses performed on the basis of the Bruvo's distance. Two clusters were observed. Cluster distinction is determined by the parental contribution of the *Pau* subgenome. Full symbols have as putative *Pau* parent the MLG *Pau*-E2 while empty symbols had as putative parents the MLGs *Pau*-E1 and *Pau*-E3.

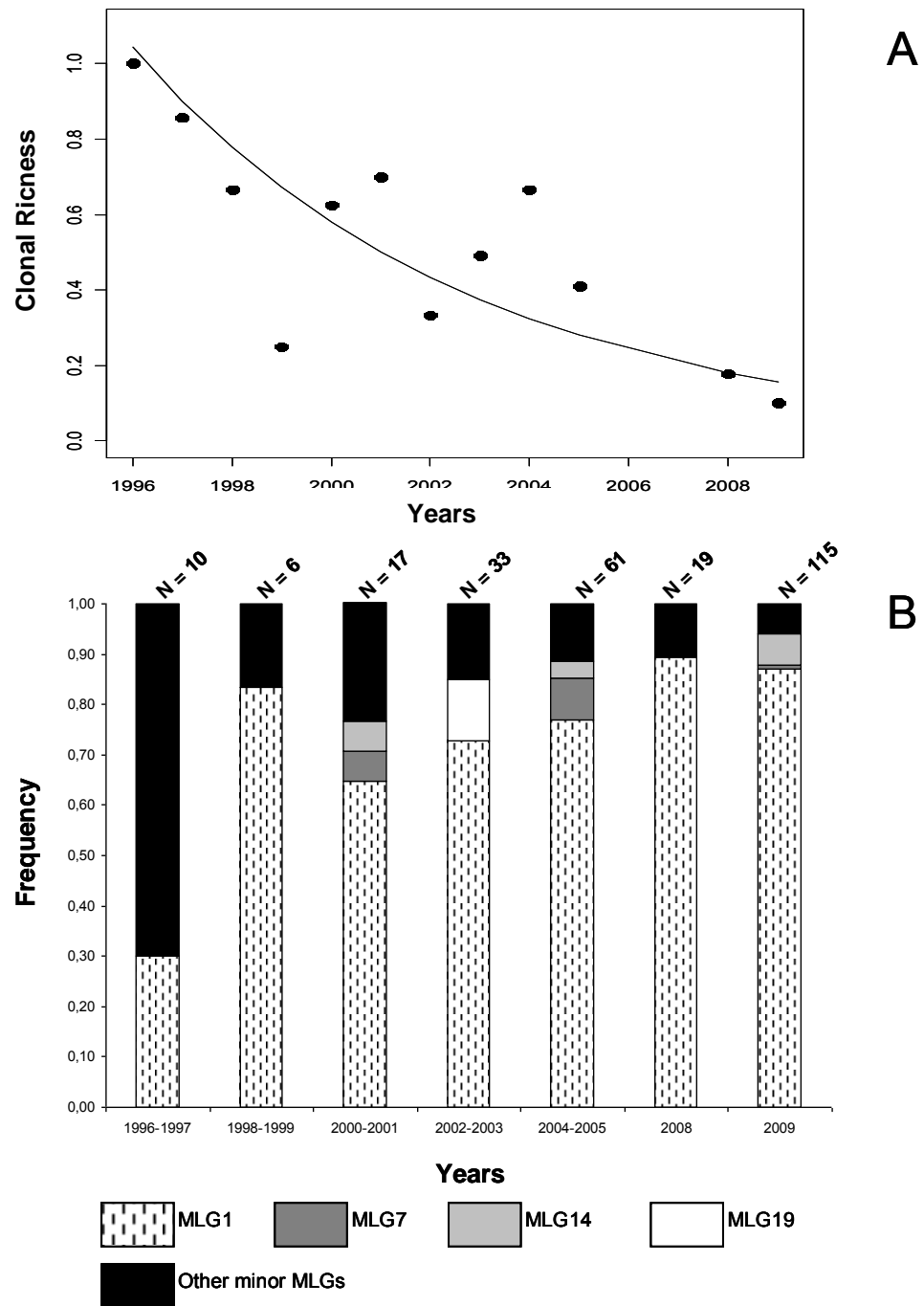


nd: no putative parental MLG match

Figure 5. Geographical distribution of the two *Paa* clusters detected by NMDS analyses. Full circles represent *Paa* populations that have isolates from the cluster 1, while empty circles represent *Paa* populations that have none. The numbers are the frequency of cluster 1 isolates within each population.



**Figure 6.** Evolution of the *Paa* with time. A. Evolution of the clonal richness of *Paa* among years. Clonal Richness decreased with time (Poisson regression,  $P < 0.001$ ). B. Decrease of multilocus genotypic frequencies over years in European population of *Paa* based on microsatellite markers.



## Supplementary data 1

Sample Name	Species	MLG	Country	Isolation site	Watershed pop.	Xwgs84	Ywgs84	Year	Supplier	Reference	mtDNA	Parent_PAM	Parent_PAU
PAA141	<i>Paa</i>	PAA1	Austria	Pucking	-	14,14019	47,5929	NA	T. Cech	Pucking B10	U	1,2	1,3
PAA655	<i>Paa</i>	PAA1	Belgium	Bocholt	-	5,655456	51,184239	2008	K. Schamp	P2008/16/6	-	1,2	1,3
PAA659	<i>Paa</i>	PAA1	Belgium	Bocholt	-	3,915614	50,792047	2008	K. Schamp	P2008/23/2	-	1,2	1,3
PAA653	<i>Paa</i>	PAA16	Belgium	Lichtervelde	-	3,146245	51,001765	2008	K. Schamp	P2008/5/1	-	1,2	1,3
PAA129	<i>Paa</i>	PAA1	France	Tercis les Bains	-	-1,10917	43,67222	2003	G. Capron	703	U	1,2	1,3
PAA38	<i>Paa</i>	PAA1	France	Aa river	-	2,2885	50,49355	2002	J.C. Streito	2N0529	M	1,2	1,3
PAA88	<i>Paa</i>	PAA1	France	Monceau-sur-oise	-	3,70053	49,89925	1997	J.C. Streito	82T1A	M	1,2	1,3
PAA85	<i>Paa</i>	PAA13	France	Léon	-	-1,301944	43,8781	1996	C. Delatour	P834	M	1,2	1,3
PAA2	<i>Paa</i>	PAA15	France	Yrieu lake	-	-1,42556	43,59389	2002	J.C. Streito	2N0685	M	1,2	-
PAA796	<i>Paa</i>	PAA1	Germany	unknown	-	10,39365	51,10656	2002	S. Werres	BBA 29/02-BL5	-	1,2	1,3
PAA795	<i>Paa</i>	PAA1	Germany	unknown	-	10,39365	51,10656	2003	S. Werres	BBA 44/03-4	-	1,2	1,3
PAA800	<i>Paa</i>	PAA1	Germany	unknown	-	10,39365	51,10656	2006	S. Werres	BBA 23/06-1	-	1,2	1,3
PAA789	<i>Paa</i>	PAA2	Germany	unknown	-	10,39365	51,10656	2000	S. Werres	BBA 8/00	-	1,2,4	1,3
PAA790	<i>Paa</i>	PAA3	Germany	unknown	-	10,39365	51,10656	2000	S. Werres	BBA 11/00-1	-	2,4	1,3
PAA793	<i>Paa</i>	PAA3	Germany	unknown	-	10,39365	51,10656	2003	S. Werres	BBA 44/03-1	-	2,4	1,3
PAA794	<i>Paa</i>	PAA4	Germany	unknown	-	10,39365	51,10656	2003	S. Werres	BBA 44/03-2	-	2,4	1,3
PAA798	<i>Paa</i>	PAA5	Germany	unknown	-	10,39365	51,10656	2003	S. Werres	BBA 31/03-2	-	1,2	-
PAA799	<i>Paa</i>	PAA6	Germany	unknown	-	10,39365	51,10656	2003	S. Werres	BBA 31/03-3	-	1,2	-
PAA788	<i>Paa</i>	PAA7	Germany	unknown	-	10,39365	51,10656	2000	S. Werres	BBA 13/98-K1ei.V.8	-	2,4	2
PAA801	<i>Paa</i>	PAA7	Germany	unknown	-	10,39365	51,10656	2009	S. Werres	JKI 045-09-03-01-02-00	-	2,4	2
PAA786	<i>Paa</i>	PAA8	Germany	unknown	-	10,39365	51,10656	1996	S. Werres	BBA 1787/I	-	1,2	-
PAA679	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Királyrét	-	19,02	47,87	2004	Z. Nagy	H95/04	-	1,2	1,3
PAA680	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Királyrét	-	19,02	47,87	2004	Z. Nagy	H97/04	-	1,2	1,3
PAA681	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Királyrét	-	19,02	47,87	2004	Z. Nagy	H98/04	-	1,2	1,3
PAA678	<i>Paa</i>	PAA2	Hungary	-	-	19,41345	47,1665	2004			-	1,2,4	1,3
PAA70	<i>Paa</i>	PAA1	Netherlands	Horst	-	5,60342	52,24926	NA	W. Man in't Veld	PD20010933	M	1,2	1,3
PAA780	<i>Paa</i>	PAA1	Spain	Ribadavia	-	-7,91545	42,152	2009	C. Pintos-Varela	880-133A	-	1,2	1,3
PAA782	<i>Paa</i>	PAA1	Spain	Lugo	-	-7,55585	43,0121	2009	A. Pérez-Sierra	Ps-786	-	1,2	1,3
PAA673	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Hévíz	Balaton	17,19853	46,78662	2001	Z. Nagy	Hévíz 6	-	1,2	1,3
PAA674	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Hévíz	Balaton	17,19853	46,78662	2001	Z. Nagy	Hévíz 8	-	1,2	1,3
PAA671	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Hévíz	Balaton	17,19853	46,78662	2001	Z. Nagy	Hévíz 4/1	-	1,2	1,3
PAA738	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Hévíz	Balaton	17,19853	46,78662	2009	J. Bakonyi	P409	-	1,2	1,3



Sample Name	Species	MLG	Country	Isolation site	Watershed pop.	Xwgs84	Ywgs84	Year	Supplier	Reference	mtDNA	Parent_PAM	Parent_PAU
PAA739	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Hévíz	Balaton	17,19853	46,78662	2009	J. Bakonyi	P410	-	1,2	1,3
PAA92	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Hévíz	Balaton	17,19853	46,78662	2001	Z. Nagy	8d	M	1,2	1,3
PAA93	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Hévíz	Balaton	17,19853	46,78662	2001	Z. Nagy	9d	M	1,2	1,3
PAA94	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Hévíz	Balaton	17,19853	46,78662	2001	Z. Nagy	1ad	M	1,2	1,3
PAA95	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Hévíz	Balaton	17,19853	46,78662	2001	Z. Nagy	4-2d	M	1,2	1,3
PAA675	<i>Paa</i>	PAA13	Hungary	Hévíz	Balaton	17,19853	46,78662	2001			-	1,2	1,3
PAA80	<i>Paa</i>	PAA1	England	unknown	England	-1,47626	52,57158	1997	J. Delcán	P950a	-	1,2	1,3
PAA82	<i>Paa</i>	PAA1	England	unknown	England	-1,47626	52,57158	1996	S. Gregory	P850	M	1,2	1,3
PAA81	<i>Paa</i>	PAA10	England	unknown	England	-1,47626	52,57158	1997		P937	U	1,2,5	1,3
PAA78	<i>Paa</i>	PAA11	England	unknown	England	-1,47626	52,57158	1997		P1960	-	1,2,5	-
PAA79	<i>Paa</i>	PAA12	England	unknown	England	-1,47626	52,57158	1997		P957a	-	2,4	1,3
PAA163	<i>Paa</i>	PAA1	Germany	Freising	Freising	11,448397	48,387997	2004	R. loos	7a	-	1,2	1,3
PAA169	<i>Paa</i>	PAA1	Germany	Freising	Freising	11,448397	48,387997	2004	R. loos	3d	-	1,2	1,3
PAA170	<i>Paa</i>	PAA1	Germany	Freising	Freising	11,448397	48,387997	2004	R. loos	5c	-	1,2	1,3
PAA174	<i>Paa</i>	PAA1	Germany	Freising	Freising	11,448397	48,387997	2004	R. loos	8d	-	1,2	1,3
PAA171	<i>Paa</i>	PAA1	Germany	Freising	Freising	11,448397	48,387997	2004	R. loos	5a	-	1,2	1,3
PAA162	<i>Paa</i>	PAA1	Germany	Freising	Freising	11,448397	48,387997	2004	R. loos	9a	U	1,2	1,3
PAA588	<i>Paa</i>	PAA1	France	Ezy sur Eure	Loir	1,41723	48,86212	2009	J. Aguayo	-	-	1,2	1,3
PAA590	<i>Paa</i>	PAA1	France	Ezy sur Eure	Loir	1,41723	48,86212	2009	J. Aguayo	-	-	1,2	1,3
PAA593	<i>Paa</i>	PAA1	France	Chaudon	Loir	1,49804	48,6681	2009	J. Aguayo	-	-	1,2	1,3
PAA598	<i>Paa</i>	PAA1	France	Saumeray	Loir	1,3143	48,25071	2009	J. Aguayo	-	-	1,2	1,3
PAA599	<i>Paa</i>	PAA1	France	Dangeau	Loir	1,28775	48,20597	2009	J. Aguayo	-	-	1,2	1,3
PAA604	<i>Paa</i>	PAA1	France	Marboué	Loir	1,32745	48,11192	2009	J. Aguayo	-	-	1,2	1,3
PAA606	<i>Paa</i>	PAA1	France	Chauteaudun	Loir	1,30788	48,07147	2009	J. Aguayo	-	-	1,2	1,3
PAA608	<i>Paa</i>	PAA1	France	Chauteaudun	Loir	1,30788	48,07147	2009	J. Aguayo	-	-	1,2	1,3
PAA610	<i>Paa</i>	PAA1	France	Chauteaudun	Loir	1,30788	48,07147	2009	J. Aguayo	-	-	1,2	1,3
PAA612	<i>Paa</i>	PAA1	France	Chauteaudun	Loir	1,30788	48,07147	2009	J. Aguayo	-	-	1,2	1,3
PAA623	<i>Paa</i>	PAA1	France	Chauteaudun	Loir	1,30788	48,07147	2009	J. Aguayo	-	-	1,2	1,3
PAA595	<i>Paa</i>	PAA1	France	Chaudon	Loir	1,49804	48,6681	2009	J. Aguayo	-	-	1,2	1,3
PAA44	<i>Paa</i>	PAA1	France	Thouet	Loire	-0,56416	47,39097	1998	J.C. Streito	DSFO98172	-	1,2	1,3
PAA614	<i>Paa</i>	PAA1	France	Saint Cyr en Val	Loire	1,97454	47,83434	2009	J. Aguayo	-	-	1,2	1,3
PAA615	<i>Paa</i>	PAA1	France	Saint Cyr en Val	Loire	1,97454	47,83434	2009	J. Aguayo	-	-	1,2	1,3
PAA618	<i>Paa</i>	PAA1	France	Vienne en Val	Loire	2,08997	47,80839	2009	J. Aguayo	-	-	1,2	1,3
PAA619	<i>Paa</i>	PAA1	France	Sully sur Loire	Loire	2,3229	47,77742	2009	J. Aguayo	-	-	1,2	1,3
PAA620	<i>Paa</i>	PAA1	France	Saint Gondon	Loire	2,54146	47,70456	2009	J. Aguayo	-	-	1,2	1,3

Sample Name	Species	MLG	Country	Isolation site	Watershed pop.	Xwgs84	Ywgs84	Year	Supplier	Reference	mtDNA	Parent_PAM	Parent_PAU
PAA112	<i>Paa</i>	PAA1	France	Moine	Loire	-0,56416	47,39097	2003	C. Husson	2ALD03	M	1,2	1,3
PAA621	<i>Paa</i>	PAA2	France	Saint Gondon	Loire	2,54146	47,70456	2009	J. Aguayo		-	1,2,4	1,3
PAA52	<i>Paa</i>	PAA1	France	Meurthe river	Meurthe and Moselle	6,73	48,45	1999	J.C. Streito	9900783.4	-	1,2	1,3
PAA306	<i>Paa</i>	PAA1	France	Jeanmenil	Meurthe and Moselle	6,71274	48,32521	2008	C. Husson	-	-	1,2	1,3
PAA314	<i>Paa</i>	PAA1	France	Gorhey	Meurthe and Moselle	6,27838	48,19729	2008	C. Husson	-	-	1,2	1,3
PAA315	<i>Paa</i>	PAA1	France	Allarmont	Meurthe and Moselle	7,01558	48,48547	2008	O. Caël	-	-	1,2	1,3
PAA347	<i>Paa</i>	PAA1	France	Le Syndicat	Meurthe and Moselle	6,68504	48,02226	2008	O. Caël	-	-	1,2	1,3
PAA114	<i>Paa</i>	PAA1	France	Eloyes	Meurthe and Moselle	6,60889	48,09339	2002	J. C. Streito	-	M	1,2	1,3
PAA75	<i>Paa</i>	PAA1	France	Girmont	Meurthe and Moselle	6,43119	48,25282	NA	-	AUL026/1	M	1,2	1,3
PAA23	<i>Paa</i>	PAA10	France	Blamont	Meurthe and Moselle	6,85461	48,59137	2004	B. Fabre	19BT	M	1,2,5	1,3
PAA29	<i>Paa</i>	PAA1	Belgium	Train river	Meuse	4,683333	50,733333	1999	J.C. Streito	9900715.6	-	1,2	1,3
PAA658	<i>Paa</i>	PAA1	Belgium	Herk-de-Stadt	Meuse	5,210581	50,926518	2008	K. Schamp	P2008/17/2	-	1,2	1,3
PAA547	<i>Paa</i>	PAA1	Belgium	Spiennes	Meuse	3,9846	50,4223	2009	J. Aguayo	-	-	1,2	1,3
PAA551	<i>Paa</i>	PAA1	Belgium	Spiennes	Meuse	3,9846	50,4223	2009	J. Aguayo	-	-	1,2	1,3
PAA557	<i>Paa</i>	PAA1	Belgium	Harmignies	Meuse	4,01202	50,40609	2009	J. Aguayo	-	-	1,2	1,3
PAA559	<i>Paa</i>	PAA1	Belgium	Harmignies	Meuse	4,01202	50,40609	2009	J. Aguayo	-	-	1,2	1,3
PAA563	<i>Paa</i>	PAA1	Belgium	Aisemont	Meuse	4,63245	50,39973	2009	J. Aguayo	-	-	1,2	1,3
PAA564	<i>Paa</i>	PAA1	Belgium	Aisemont	Meuse	4,63245	50,39973	2009	J. Aguayo	-	-	1,2	1,3
PAA566	<i>Paa</i>	PAA1	Belgium	Bellevaux	Meuse	6,01153	50,38663	2009	J. Aguayo	-	-	1,2	1,3
PAA567	<i>Paa</i>	PAA1	Belgium	Habay	Meuse	5,64071	49,73361	2009	J. Aguayo	-	-	1,2	1,3
PAA568	<i>Paa</i>	PAA1	Belgium	Houdemont	Meuse	5,58454	49,71962	2009	J. Aguayo	-	-	1,2	1,3
PAA580	<i>Paa</i>	PAA1	Belgium	Mellier	Meuse	5,52606	49,74343	2009	J. Aguayo	-	-	1,2	1,3
PAA585	<i>Paa</i>	PAA1	Belgium	Stavelot	Meuse	5,89582	50,37742	2009	J. Aguayo	-	-	1,2	1,3
PAA586	<i>Paa</i>	PAA1	Belgium	Stavelot	Meuse	5,89582	50,37742	2009	J. Aguayo	-	-	1,2	1,3
PAA565	<i>Paa</i>	PAA1	Belgium	Stavelot	Meuse	5,89582	50,37742	2009	J. Aguayo	-	-	1,2	1,3
PAA86	<i>Paa</i>	PAA1	Belgium	Salm river	Meuse	5,86667	50,48333	1999	D. de Merlier	2198	M	1,2	1,3
PAA149	<i>Paa</i>	PAA1	France	Wellin	Meuse	5,09943	50,08334	2001	B. Fabre	2295	M	1,2	1,3
PAA161	<i>Paa</i>	PAA1	France	Cons-la-grandville	Meuse	5,702	49,48378	2004	B. Fabre	C18	M	1,2	1,3
PAA503	<i>Paa</i>	PAA17	Germany	Waldsiefersdorf	Oder	14,68849	52,54398	2005	R. loos	WaA2	M	2,4	2
PAA504	<i>Paa</i>	PAA18	Germany	Wuschewier	Oder	14,68849	52,54398	2005	R. loos	WU2	M	1,2,4	2
PAA501	<i>Paa</i>	PAA7	Germany	Attlewin	Oder	14,26623	52,70581	2005	R. loos	AL6	M	2,4	2
PAA502	<i>Paa</i>	PAA7	Germany	Attlewin	Oder	14,26623	52,70581	2005	R. loos	AL8	M	2,4	2
PAA505	<i>Paa</i>	PAA7	Germany	Wuschewier	Oder	14,26623	52,70581	2005	R. loos	Wu1	M	2,4	2
PAA506	<i>Paa</i>	PAA7	Germany	Waldsiefersdorf	Oder	14,26623	52,70581	2005	R. loos	WaA6	M	2,4	2
PAA500	<i>Paa</i>	PAA7	Germany	Attlewin	Oder	14,26623	52,70581	2005	R. loos	AL4	M	2,4	2

Sample Name	Species	MLG	Country	Isolation site	Watershed pop.	Xwgs84	Ywgs84	Year	Supplier	Reference	mtDNA	Parent_PAM	Parent_PAU
PAA120	<i>Paa</i>	PAA1	France	Ognon	Ognon	6,63935	47,79285	2003	R. loos	3N10048-3a	-	1,2	1,3
PAA117	<i>Paa</i>	PAA19	France	Ognon	Ognon	6,63935	47,79285	2003	R. loos	3N10094-5b	-	-	1,3
PAA119	<i>Paa</i>	PAA19	France	Ognon	Ognon	6,63935	47,79285	2003	R. loos	3N10094-5d	-	-	1,3
PAA118	<i>Paa</i>	PAA19	France	Ognon	Ognon	6,63935	47,79285	2003	R. loos	3N10094-5c	-	-	1,3
PAA116	<i>Paa</i>	PAA19	France	Ognon	Ognon	6,63935	47,79285	2003	R. loos	3N10094-5a	M	-	1,3
PAA20	<i>Paa</i>	PAA25	France	Monceau-sur-oise	Oise	3,70053	49,89925	1997	J.C. Streito	71T1	-	-	-
PAA660	<i>Paa</i>	PAA1	Poland	unknown	Poland	19,000797	51,989109	2005	L. Orlikowski	Paa24	-	1,2	1,3
PAA661	<i>Paa</i>	PAA1	Poland	Szczecinek	Poland	16,701164	53,717435	2005	L. Orlikowski	Paa8	-	1,2	1,3
PAA662	<i>Paa</i>	PAA1	Poland	Siedliska	Poland	21,946449	49,964031	2005	L. Orlikowski	Paa15	-	1,2	1,3
PAA663	<i>Paa</i>	PAA1	Poland	Szczecinek	Poland	16,701164	53,717435	2005	L. Orlikowski	Paa7	-	1,2	1,3
PAA665	<i>Paa</i>	PAA1	Poland	Kurowka	Poland	22,183342	51,396207	2005	L. Orlikowski	Paa22	-	1,2	1,3
PAA666	<i>Paa</i>	PAA1	Poland	Siedliska	Poland	21,946449	49,964031	2005	L. Orlikowski	Paa16	-	1,2	1,3
PAA47	<i>Paa</i>	PAA1	Poland	Poland	Poland	19,40088	52,12461	NA	L. Orlikowski	PO192	U	1,2	1,3
PAA664	<i>Paa</i>	PAA14	Poland	Kurowka	Poland	22,183342	51,396207	2005	L. Orlikowski	Paa23	-	1,2	2
PAA667	<i>Paa</i>	PAA14	Poland	Korabiewka	Poland	20,344505	51,990377	2005	L. Orlikowski	Paa21	-	1,2	2
PAA686	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Csorna	Repce	17,14429	47,68426	2009	J. Bakonyi	P330	-	1,2	1,3
PAA689	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Csorna	Repce	17,14429	47,68426	2009	J. Bakonyi	P337	-	1,2	1,3
PAA690	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Csorna	Repce	17,14429	47,68426	2009	J. Bakonyi	P338	-	1,2	1,3
PAA692	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Csorna	Repce	17,14429	47,68426	2009	J. Bakonyi	P344	-	1,2	1,3
PAA693	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Csorna	Repce	17,14429	47,68426	2009	J. Bakonyi	P347	-	1,2	1,3
PAA745	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Földsziget	Repce	17,14429	47,68426	2009	J. Bakonyi	64/C	-	1,2	1,3
PAA748	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Földsziget	Repce	17,14429	47,68426	2009	J. Bakonyi	70/1C	-	1,2	1,3
PAA749	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Földsziget	Repce	17,14429	47,68426	2009	J. Bakonyi	72/A	-	1,2	1,3
PAA750	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Földsziget	Repce	17,14429	47,68426	2009	J. Bakonyi	73/B	-	1,2	1,3
PAA751	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Földsziget	Repce	17,14429	47,68426	2009	J. Bakonyi	74/B	-	1,2	1,3
PAA753	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Földsziget	Repce	17,14429	47,68426	2009	J. Bakonyi	78/B	-	1,2	1,3
PAA754	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Földsziget	Repce	17,14429	47,68426	2009	J. Bakonyi	79/2C	-	1,2	1,3
PAA755	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Földsziget	Repce	17,14429	47,68426	2009	J. Bakonyi	80/A	-	1,2	1,3
PAA756	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Földsziget	Repce	17,14429	47,68426	2009	J. Bakonyi	81/1A	-	1,2	1,3
PAA759	<i>Paa</i>	PAA14	Hungary	Károlyháza	Repce	17,34667	48,07667	2009	J. Bakonyi	97/B	-	1,2	2
PAA761	<i>Paa</i>	PAA14	Hungary	Károlyháza	Repce	17,34667	48,07667	2009	J. Bakonyi	99/1C	-	1,2	2
PAA763	<i>Paa</i>	PAA14	Hungary	Károlyháza	Repce	17,34667	48,07667	2009	J. Bakonyi	104/1A	-	1,2	2
PAA764	<i>Paa</i>	PAA14	Hungary	Lébény	Repce	17,38905	47,73889	2009	J. Bakonyi	109/2B	-	1,2	2
PAA765	<i>Paa</i>	PAA14	Hungary	Lébény	Repce	17,38905	47,73889	2009	J. Bakonyi	110/1B	-	1,2	2
PAA766	<i>Paa</i>	PAA14	Hungary	Lébény	Repce	17,38905	47,73889	2009	J. Bakonyi	112/1B	-	1,2	2

Sample Name	Species	MLG	Country	Isolation site	Watershed pop.	Xwgs84	Ywgs84	Year	Supplier	Reference	mtDNA	Parent_PAM	Parent_PAU
PAA767	<i>Paa</i>	PAA14	Hungary	Lébény	Repce	17,38905	47,73889	2009	J. Bakonyi	113/B	-	1,2	2
PAA683	<i>Paa</i>	PAA20	Hungary	Csorna	Repce	17,14429	47,68426	2009	J. Bakonyi	P323	-	1,2	1,3
PAA684	<i>Paa</i>	PAA20	Hungary	Csorna	Repce	17,14429	47,68426	2009	J. Bakonyi	P324	-	1,2	1,3
PAA747	<i>Paa</i>	PAA21	Hungary	Földsziget	Repce	17,14429	47,68426	2009	J. Bakonyi	68/2B	-	1,2	-
PAA757	<i>Paa</i>	PAA22	Hungary	Károlyháza	Repce	17,34667	48,07667	2009	J. Bakonyi	88/1B	-	3	2
PAA758	<i>Paa</i>	PAA23	Hungary	Károlyháza	Repce	17,34667	48,07667	2009	J. Bakonyi	97/B	-	-	2
PAA325	<i>Paa</i>	PAA1	France	Dossenheim-sur-Zinsel	Rhin	7,38014	48,8027	2008	O. Caël	-	-	1,2	1,3
PAA329	<i>Paa</i>	PAA1	France	Garrebourg	Rhin	7,21815	48,71388	2008	O. Caël	-	-	1,2	1,3
PAA341	<i>Paa</i>	PAA1	France	Mietesheim	Rhin	7,66548	48,88212	2008	O. Caël	-	-	1,2	1,3
PAA357	<i>Paa</i>	PAA1	France	Saint-martin	Rhin	7,28473	48,34978	2008	O. Caël	-	-	1,2	1,3
PAA358	<i>Paa</i>	PAA1	France	Neuve-Eglise	Rhin	7,33384	48,32478	2008	O. Caël	-	-	1,2	1,3
PAA362	<i>Paa</i>	PAA1	France	Chatenois	Rhin	7,39636	48,28535	2008	O. Caël	-	-	1,2	1,3
PAA359	<i>Paa</i>	PAA1	France	Neuve-Eglise	Rhin	7,33384	48,32478	2008	O. Caël	-	-	1,2	1,3
PAA360	<i>Paa</i>	PAA1	France	La Vancelle	Rhin	7,3441	48,27813	2008	O. Caël	-	-	1,2	1,3
PAA363	<i>Paa</i>	PAA1	France	Chatenois	Rhin	7,39636	48,28535	2008	O. Caël	-	-	1,2	1,3
PAA354	<i>Paa</i>	PAA1	France	Romanswiller	Rhin	7,41346	48,64093	2008	O. Caël	-	-	1,2	1,3
PAA24	<i>Paa</i>	PAA9	France	Nied	Rhin	3,70053	49,89925	1997	J.C. Streito	84T2	-	1,2,5	1,3
PAA301	<i>Paa</i>	PAA26	France	Baerendorf	Rhin	7,08532	48,83989	2008			-	1,2	1,3
PAA819	<i>Paa</i>	PAA1	Spain	Salamanca	Salamanca	-5,5927296	40,711259	2010	J. Diez	PFSPA2006	-	1,2	1,3
PAA820	<i>Paa</i>	PAA1	Spain	Salamanca	Salamanca	-5,5927296	40,711259	2010	J. Diez	PFSPA4017	-	1,2	1,3
PAA821	<i>Paa</i>	PAA1	Spain	Salamanca	Salamanca	-5,5927296	40,711259	2010	J. Diez	PFSPA5029	-	1,2	1,3
PAA822	<i>Paa</i>	PAA1	Spain	Salamanca	Salamanca	-5,5927296	40,711259	2010	J. Diez	PFSPA7040	-	1,2	1,3
PAA823	<i>Paa</i>	PAA1	Spain	Salamanca	Salamanca	-5,5927296	40,711259	2010	J. Diez	PFSPA7051	-	1,2	1,3
PAA824	<i>Paa</i>	PAA1	Spain	Salamanca	Salamanca	-5,5927296	40,711259	2010	J. Diez	PFSPA7052	-	1,2	1,3
PAA101	<i>Paa</i>	PAA1	France	Magnoncourt	Saone	6,29834	47,89485	2003	R. loos	P1bisb	-	1,2	1,3
PAA103	<i>Paa</i>	PAA1	France	Magnoncourt	Saone	6,29834	47,89485	2003	R. loos	P3a	-	1,2	1,3
PAA104	<i>Paa</i>	PAA1	France	Magnoncourt	Saone	6,29834	47,89485	2003	R. loos	P3b	-	1,2	1,3
PAA105	<i>Paa</i>	PAA1	France	Magnoncourt	Saone	6,29834	47,89485	2003	R. loos	P3c	-	1,2	1,3
PAA106	<i>Paa</i>	PAA1	France	Magnoncourt	Saone	6,29834	47,89485	2003	R. loos	P6a	-	1,2	1,3
PAA108	<i>Paa</i>	PAA1	France	Magnoncourt	Saone	6,29834	47,89485	2003	R. loos	Privb	-	1,2	1,3
PAA109	<i>Paa</i>	PAA1	France	Magnoncourt	Saone	6,29834	47,89485	2003	R. loos	P6-2	-	1,2	1,3
PAA110	<i>Paa</i>	PAA1	France	Magnoncourt	Saone	6,29834	47,89485	2003	R. loos	P6-1	-	1,2	1,3
PAA638	<i>Paa</i>	PAA1	France	Corre	Saone	5,98752	47,91214	2003	J. Aguayo	-	-	1,2	1,3
PAA640	<i>Paa</i>	PAA1	France	Jussey	Saone	5,91678	47,84035	2009	J. Aguayo	-	-	1,2	1,3
PAA645	<i>Paa</i>	PAA1	France	Port d'Atelier	Saone	6,02652	47,76084	2009	J. Aguayo	-	-	1,2	1,3

Sample Name	Species	MLG	Country	Isolation site	Watershed pop.	Xwgs84	Ywgs84	Year	Supplier	Reference	mtDNA	Parent_PAM	Parent_PAU
PAA648	<i>Paa</i>	PAA1	France	Faverney	Saone	6,10273	47,76086	2009	J. Aguayo	-	-	1,2	1,3
PAA649	<i>Paa</i>	PAA1	France	Port d'Atelier	Saone	6,02652	47,76084	2009	J. Aguayo	-	-	1,2	1,3
PAA34	<i>Paa</i>	PAA1	France	Magnoncourt	Saone	6,28333	47,9	1998	J. C. Streito	98-7-5	M	1,2	1,3
PAA100	<i>Paa</i>	PAA1	France	Magnoncourt	Saone	6,29834	47,89485	2003	R. loos	P1bisa	M	1,2	1,3
PAA102	<i>Paa</i>	PAA1	France	Magnoncourt	Saone	6,29834	47,89485	2003	R. loos	P3d	M	1,2	1,3
PAA107	<i>Paa</i>	PAA1	France	Magnoncourt	Saone	6,29834	47,89485	2003	R. loos	Priva	M	1,2	1,3
PAA111	<i>Paa</i>	PAA1	France	Ainvelle	Saone	6,23488	47,85262	2003	C. Husson	-	M	1,2	1,3
PAA126	<i>Paa</i>	PAA1	France	Ainvelle	Saone	6,23488	47,85262	2003	C. Husson	Ainvelle4-4	M	1,2	1,3
PAA35	<i>Paa</i>	PAA24	France	La Combauté	Saone	6,33333	47,88333	1998	J.C. Streito	98-7-6	-	-	1,3
PAA459	<i>Paa</i>	PAA1	France	Gosselming	Sarre and Nied	7,00338	48,79232	2005	R. loos	-	M	1,2	1,3
PAA460	<i>Paa</i>	PAA1	France	Gosselming	Sarre and Nied	7,00338	48,79232	2005	R. loos	-	M	1,2	1,3
PAA461	<i>Paa</i>	PAA1	France	Gosselming	Sarre and Nied	7,00338	48,79232	2005	R. loos	-	M	1,2	1,3
PAA462	<i>Paa</i>	PAA1	France	Gosselming	Sarre and Nied	7,00338	48,79232	2005	R. loos	-	M	1,2	1,3
PAA463	<i>Paa</i>	PAA1	France	Gosselming	Sarre and Nied	7,00338	48,79232	2005	R. loos	-	M	1,2	1,3
PAA464	<i>Paa</i>	PAA1	France	Gosselming	Sarre and Nied	7,00338	48,79232	2005	R. loos	-	M	1,2	1,3
PAA465	<i>Paa</i>	PAA1	France	Gosselming	Sarre and Nied	7,00338	48,79232	2005	R. loos	-	M	1,2	1,3
PAA466	<i>Paa</i>	PAA1	France	Gosselming	Sarre and Nied	7,00338	48,79232	2005	R. loos	-	M	1,2	1,3
PAA467	<i>Paa</i>	PAA1	France	Gosselming	Sarre and Nied	7,00338	48,79232	2005	R. loos	-	M	1,2	1,3
PAA468	<i>Paa</i>	PAA1	France	Gosselming	Sarre and Nied	7,00338	48,79232	2005	R. loos	-	M	1,2	1,3
PAA469	<i>Paa</i>	PAA1	France	Gosselming	Sarre and Nied	7,00338	48,79232	2005	R. loos	-	M	1,2	1,3
PAA470	<i>Paa</i>	PAA1	France	Gosselming	Sarre and Nied	7,00338	48,79232	2005	R. loos	-	M	1,2	1,3
PAA471	<i>Paa</i>	PAA1	France	Gosselming	Sarre and Nied	7,00338	48,79232	2005	R. loos	-	M	1,2	1,3
PAA472	<i>Paa</i>	PAA1	France	Gosselming	Sarre and Nied	7,00338	48,79232	2005	R. loos	-	M	1,2	1,3
PAA473	<i>Paa</i>	PAA1	France	Gosselming	Sarre and Nied	7,00338	48,79232	2005	R. loos	-	M	1,2	1,3
PAA474	<i>Paa</i>	PAA1	France	Gosselming	Sarre and Nied	7,00338	48,79232	2005	R. loos	-	M	1,2	1,3
PAA475	<i>Paa</i>	PAA1	France	Gosselming	Sarre and Nied	7,00338	48,79232	2005	R. loos	-	M	1,2	1,3
PAA476	<i>Paa</i>	PAA1	France	Gosselming	Sarre and Nied	7,00338	48,79232	2005	R. loos	-	M	1,2	1,3
PAA478	<i>Paa</i>	PAA1	France	Gosselming	Sarre and Nied	7,00338	48,79232	2005	R. loos	-	M	1,2	1,3
PAA479	<i>Paa</i>	PAA1	France	Gosselming	Sarre and Nied	7,00338	48,79232	2005	R. loos	-	M	1,2	1,3
PAA480	<i>Paa</i>	PAA1	France	Gosselming	Sarre and Nied	7,00338	48,79232	2005	R. loos	-	M	1,2	1,3
PAA481	<i>Paa</i>	PAA1	France	Gosselming	Sarre and Nied	7,00338	48,79232	2005	R. loos	-	M	1,2	1,3
PAA482	<i>Paa</i>	PAA1	France	Gosselming	Sarre and Nied	7,00338	48,79232	2005	R. loos	-	M	1,2	1,3
PAA483	<i>Paa</i>	PAA1	France	Gosselming	Sarre and Nied	7,00338	48,79232	2005	R. loos	-	M	1,2	1,3
PAA484	<i>Paa</i>	PAA1	France	Gosselming	Sarre and Nied	7,00338	48,79232	2005	R. loos	-	M	1,2	1,3
PAA485	<i>Paa</i>	PAA1	France	Gosselming	Sarre and Nied	7,00338	48,79232	2005	R. loos	-	M	1,2	1,3

Sample Name	Species	MLG	Country	Isolation site	Watershed pop.	Xwgs84	Ywgs84	Year	Supplier	Reference	mtDNA	Parent_PAM	Parent_PAU
PAA486	<i>Paa</i>	PAA1	France	Gosselming	Sarre and Nied	7,00338	48,79232	2005	R. loos	-	M	1,2	1,3
PAA490	<i>Paa</i>	PAA1	France	Guinguelange	Sarre and Nied	6,52812	49,07379	2005	R. loos	-	M	1,2	1,3
PAA492	<i>Paa</i>	PAA1	France	Guinguelange	Sarre and Nied	6,52812	49,07379	2005	R. loos	-	M	1,2	1,3
PAA493	<i>Paa</i>	PAA1	France	Guinguelange	Sarre and Nied	6,52812	49,07379	2005	R. loos	-	M	1,2	1,3
PAA631	<i>Paa</i>	PAA1	France	Métairies-Saint-Quirin	Sarre and Nied	7,04253	48,65482	2009	J. Aguayo	-	-	1,2	1,3
PAA115	<i>Paa</i>	PAA1	France	Gosselming	Sarre and Nied	7,00338	48,79232	2002	C. Husson	-	M	1,2	1,3
PAA113	<i>Paa</i>	PAA1	France	Gosselming	Sarre and Nied	7,00338	48,79232	2003	C. Husson	-	M	1,2	1,3
PAA491	<i>Paa</i>	PAA10	France	Guinguelange	Sarre and Nied	6,52812	49,07379	2005	R. loos	-	-	1,2,5	1,3
PAA53	<i>Paa</i>	PAA20	France	Pange	Sarre and Nied	6,3565	49,08395	2001	J.C. Streito	-	M	1,2	1,3
PAA477	<i>Paa</i>	PAA27	France	Gosselming	Sarre and Nied	7,00338	48,79232	2005	R. loos	-	M	1,2	-
PAA76	<i>Paa</i>	PAA1	Scotland	unknown	Scotland	-4,16005	56,27107	2000	J. Gibbs	P1271	M	1,2	1,3
PAA77	<i>Paa</i>	PAA1	Scotland	unknown	Scotland	-4,16005	56,27107	2000	J. Delcán	P1270	M	1,2	1,3
PAA74	<i>Paa</i>	PAA1	Scotland	unknown	Scotland	-4,16005	56,27107	2000	G. Mackaskill	-	U	1,2	1,3
PAA143	<i>Paa</i>	PAA14	Scotland	unknown	Scotland	-4,16005	56,27107	2000	-	P1272	M	1,2	2
PAA425	<i>Paa</i>	PAA1	France	Sèvre-Niortaise watershed	Marais Poitevin	-0,61243	46,30906	2009	C. Husson	-	-	1,2	1,3
PAA426	<i>Paa</i>	PAA1	France	Sèvre-Niortaise watershed	Marais Poitevin	-0,60385	46,30762	2009	C. Husson	-	-	1,2	1,3
PAA429	<i>Paa</i>	PAA1	France	Sèvre-Niortaise watershed	Marais Poitevin	-0,60451	46,30814	2009	C. Husson	-	-	1,2	1,3
PAA430	<i>Paa</i>	PAA1	France	Sèvre-Niortaise watershed	Marais Poitevin	-0,69529	46,30662	2009	C. Husson	-	-	1,2	1,3
PAA431	<i>Paa</i>	PAA1	France	Sèvre-Niortaise watershed	Marais Poitevin	-0,59562	46,30623	2009	C. Husson	-	-	1,2	1,3
PAA432	<i>Paa</i>	PAA1	France	Sèvre-Niortaise watershed	Marais Poitevin	-0,60171	46,30756	2009	C. Husson	-	-	1,2	1,3
PAA433	<i>Paa</i>	PAA1	France	Sèvre-Niortaise watershed	Marais Poitevin	-0,60204	46,30998	2009	C. Husson	-	-	1,2	1,3
PAA435	<i>Paa</i>	PAA1	France	Sèvre-Niortaise watershed	Marais Poitevin	-0,60537	46,30889	2009	C. Husson	-	-	1,2	1,3
PAA436	<i>Paa</i>	PAA1	France	Sèvre-Niortaise watershed	Marais Poitevin	-0,59399	46,31225	2009	C. Husson	-	-	1,2	1,3
PAA437	<i>Paa</i>	PAA1	France	Sèvre-Niortaise watershed	Marais Poitevin	-0,45438	46,39395	2009	C. Husson	-	-	1,2	1,3
PAA438	<i>Paa</i>	PAA1	France	Sèvre-Niortaise watershed	Marais Poitevin	-0,60374	46,30545	2009	C. Husson	-	-	1,2	1,3
PAA439	<i>Paa</i>	PAA1	France	Sèvre-Niortaise watershed	Marais Poitevin	-0,60029	46,30923	2009	C. Husson	-	-	1,2	1,3
PAA428	<i>Paa</i>	PAA1	France	Sèvre-Niortaise watershed	Marais Poitevin	-0,60046	46,30978	2009	C. Husson	-	-	1,2	1,3
PAA434	<i>Paa</i>	PAA1	France	Sèvre-Niortaise watershed	Marais Poitevin	-0,60762	46,30717	2009	C. Husson	-	-	1,2	1,3
PAA676	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Teskánd	Zala	16,78105	46,85528	2002	J. Bakonyi	H5/02	-	1,2	1,3
PAA695	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Nagyrákos	Zala	16,48385	46,84245	2009	J. Bakonyi	P354	-	1,2	1,3
PAA696	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Nagyrákos	Zala	16,48385	46,84245	2009	J. Bakonyi	P355	-	1,2	1,3
PAA698	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Nagyrákos	Zala	16,48385	46,84245	2009	J. Bakonyi	P358	-	1,2	1,3
PAA701	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Nagyrákos	Zala	16,48385	46,84245	2009	J. Bakonyi	P362	-	1,2	1,3
PAA702	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Nagyrákos	Zala	16,48385	46,84245	2009	J. Bakonyi	P363	-	1,2	1,3
PAA704	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Nagyrákos	Zala	16,48385	46,84245	2009	J. Bakonyi	P365	-	1,2	1,3

Sample Name	Species	MLG	Country	Isolation site	Watershed pop.	Xwgs84	Ywgs84	Year	Supplier	Reference	mtDNA	Parent_PAM	Parent_PAU
PAA707	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Nagyrákos	Zala	16,48385	46,84245	2009	J. Bakonyi	P370	-	1,2	1,3
PAA709	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Nagyrákos	Zala	16,48385	46,84245	2009	J. Bakonyi	P373	-	1,2	1,3
PAA710	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Nagyrákos	Zala	16,48385	46,84245	2009	J. Bakonyi	P374	-	1,2	1,3
PAA711	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Nagyrákos	Zala	16,48385	46,84245	2009	J. Bakonyi	P375	-	1,2	1,3
PAA712	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Nagyrákos	Zala	16,48385	46,84245	2009	J. Bakonyi	P377	-	1,2	1,3
PAA713	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Nagyrákos	Zala	16,48385	46,84245	2009	J. Bakonyi	P378	-	1,2	1,3
PAA714	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Nagyrákos	Zala	16,48385	46,84245	2009	J. Bakonyi	P379	-	1,2	1,3
PAA715	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Nagyrákos	Zala	16,48385	46,84245	2009	J. Bakonyi	P380	-	1,2	1,3
PAA716	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Nagyrákos	Zala	16,48385	46,84245	2009	J. Bakonyi	P381	-	1,2	1,3
PAA717	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Nagyrákos	Zala	16,48385	46,84245	2009	J. Bakonyi	P382	-	1,2	1,3
PAA718	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Nagyrákos	Zala	16,48385	46,84245	2009	J. Bakonyi	P383	-	1,2	1,3
PAA720	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Nagyrákos	Zala	16,48385	46,84245	2009	J. Bakonyi	P385	-	1,2	1,3
PAA721	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Nagyrákos	Zala	16,48385	46,84245	2009	J. Bakonyi	P386	-	1,2	1,3
PAA722	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Nagyrákos	Zala	16,48385	46,84245	2009	J. Bakonyi	P387	-	1,2	1,3
PAA724	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Nagyrákos	Zala	16,48385	46,84245	2009	J. Bakonyi	P391	-	1,2	1,3
PAA725	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Nagyrákos	Zala	16,48385	46,84245	2009	J. Bakonyi	P392	-	1,2	1,3
PAA727	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Ispánk	Zala	16,46353	46,87478	2009	J. Bakonyi	P394	-	1,2	1,3
PAA728	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Ispánk	Zala	16,46353	46,87478	2009	J. Bakonyi	P395	-	1,2	1,3
PAA729	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Teskánd	Zala	16,78105	46,85528	2009	J. Bakonyi	P397	-	1,2	1,3
PAA730	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Teskánd	Zala	16,78105	46,85528	2009	J. Bakonyi	P398	-	1,2	1,3
PAA731	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Teskánd	Zala	16,78105	46,85528	2009	J. Bakonyi	P399	-	1,2	1,3
PAA732	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Teskánd	Zala	16,78105	46,85528	2009	J. Bakonyi	P401	-	1,2	1,3
PAA733	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Teskánd	Zala	16,78105	46,85528	2009	J. Bakonyi	P403	-	1,2	1,3
PAA734	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Teskánd	Zala	16,78105	46,85528	2009	J. Bakonyi	P404	-	1,2	1,3
PAA735	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Teskánd	Zala	16,78105	46,85528	2009	J. Bakonyi	P405	-	1,2	1,3
PAA736	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Teskánd	Zala	16,78105	46,85528	2009	J. Bakonyi	P406	-	1,2	1,3
PAA737	<i>Paa</i>	PAA1	Hungary	Teskánd	Zala	16,78105	46,85528	2009	J. Bakonyi	P407	-	1,2	1,3
PAA700	<i>Paa</i>	PAA27	Hungary	Nagyrákos	Zala	16,48385	46,84245	2009	J. Bakonyi	P361	-	1,2	-
PAA677	<i>Paa</i>	PAA28	Hungary	Ispánk	Zala	16,46353	46,87478	2004	J. Bakonyi	H88/04	-	1,2	-
PAM186	<i>Pam</i>	PAM1	Belgium	Fosses-la-ville	-	4,6827	50,38325	2001	D. de Merlier	2274	M	-	-
PAM54	<i>Pam</i>	PAM4	France	Sixt sur aff	-	-1,55268	48,208	2000			M	-	-
PAM802	<i>Pam</i>	PAM1	Germany	unknown	-	10,39365	51,10656	1995	S. Werres	BBA Erle 1A	-	-	-
PAM803	<i>Pam</i>	PAM1	Germany	unknown	-	10,39365	51,10656	1995	S. Werres	BBA Erle 1B	-	-	-
PAM805	<i>Pam</i>	PAM1	Germany	unknown	-	10,39365	51,10656	1998	S. Werres	BBA 71109	-	-	-
PAM804	<i>Pam</i>	PAM5	Germany	unknown	-	10,39365	51,10656	1995	S. Werres	BBA Erle 1C	-	-	-

Sample Name	Species	MLG	Country	Isolation site	Watershed pop.	Xwgs84	Ywgs84	Year	Supplier	Reference	mtDNA	Parent_PAM	Parent_PAU
PAM71	<i>Pam</i>	PAM4	Netherlands	unknown	-	5,60342	52,24926	NA		W1139	M	-	-
PAM90	<i>Pam</i>	PAM4	Netherlands	unknown	-	5,60342	52,24926	NA		P972	M	-	-
07dur10	<i>Pam</i>	PAM1	France	Monetier-Allamont	Durance	5,9448695	44,380445	2007	C. Husson	-	-	-	-
07dur12	<i>Pam</i>	PAM1	France	Monetier-Allamont	Durance	5,9448695	44,380445	2007	C. Husson	-	-	-	-
07dur13	<i>Pam</i>	PAM1	France	Monetier-Allamont	Durance	5,9448695	44,380445	2007	C. Husson	-	-	-	-
07dur16	<i>Pam</i>	PAM1	France	Monetier-Allamont	Durance	5,9448695	44,380445	2007	C. Husson	-	-	-	-
07dur25	<i>Pam</i>	PAM1	France	Peipin	Durance	5,9740028	44,140099	2007	C. Husson	-	-	-	-
07dur6	<i>Pam</i>	PAM1	France	Rochebrune	Durance	6,1980484	44,460014	2007	C. Husson	-	-	-	-
07dur7	<i>Pam</i>	PAM1	France	Monetier-Allamont	Durance	5,9448695	44,380445	2007	C. Husson	-	-	-	-
07dur9	<i>Pam</i>	PAM1	France	Monetier-Allamont	Durance	5,9448695	44,380445	2007	C. Husson	-	-	-	-
08dur13	<i>Pam</i>	PAM1	France	Rochebrune	Durance	6,1980484	44,460014	2008	C. Husson	-	-	-	-
08dur14	<i>Pam</i>	PAM1	France	Rochebrune	Durance	6,1980484	44,460014	2008	C. Husson	-	-	-	-
08dur8	<i>Pam</i>	PAM1	France	Archidiacre	Durance	6,1150451	44,474734	2008	C. Husson	-	-	-	-
07dur14	<i>Pam</i>	PAM2	France	Monetier-Allamont	Durance	5,9448695	44,380445	2007	C. Husson	-	-	-	-
07dur19	<i>Pam</i>	PAM3	France	Peipin	Durance	5,9740028	44,140099	2007	C. Husson	-	-	-	-
07dur20	<i>Pam</i>	PAM3	France	Peipin	Durance	5,9740028	44,140099	2007	C. Husson	-	-	-	-
07dur21	<i>Pam</i>	PAM3	France	Peipin	Durance	5,9740028	44,140099	2007	C. Husson	-	-	-	-
07dur23	<i>Pam</i>	PAM3	France	Peipin	Durance	5,9740028	44,140099	2007	C. Husson	-	-	-	-
07dur24	<i>Pam</i>	PAM3	France	Peipin	Durance	5,9740028	44,140099	2007	C. Husson	-	-	-	-
07dur26	<i>Pam</i>	PAM3	France	Peipin	Durance	5,9740028	44,140099	2007	C. Husson	-	-	-	-
07dur27	<i>Pam</i>	PAM3	France	Peipin	Durance	5,9740028	44,140099	2007	C. Husson	-	-	-	-
07dur28	<i>Pam</i>	PAM3	France	Peipin	Durance	5,9740028	44,140099	2007	C. Husson	-	-	-	-
07dur29	<i>Pam</i>	PAM3	France	Peipin	Durance	5,9740028	44,140099	2007	C. Husson	-	-	-	-
07dur30	<i>Pam</i>	PAM3	France	Peipin	Durance	5,9740028	44,140099	2007	C. Husson	-	-	-	-
07dur31	<i>Pam</i>	PAM3	France	Peipin	Durance	5,9740028	44,140099	2007	C. Husson	-	-	-	-
07dur32	<i>Pam</i>	PAM3	France	Peipin	Durance	5,9740028	44,140099	2007	C. Husson	-	-	-	-
PAM392	<i>Pam</i>	PAM1	France	Sèvre-Niortaise watershed	Marais Poitevin	-0,45438	46,39395	2009	C. Husson	C7 / A11 / E2	-	-	-
PAM393	<i>Pam</i>	PAM1	France	Sèvre-Niortaise watershed	Marais Poitevin	-0,45049	46,372	2009	C. Husson	C8 / HP / E2	-	-	-
PAM394	<i>Pam</i>	PAM1	France	Sèvre-Niortaise watershed	Marais Poitevin	-0,45049	46,372	2009	C. Husson	C8 / A2 / E1	-	-	-
PAM395	<i>Pam</i>	PAM1	France	Sèvre-Niortaise watershed	Marais Poitevin	-0,46671	46,51814	2009	C. Husson	B2 / A10 / E1	-	-	-
PAM396	<i>Pam</i>	PAM1	France	Sèvre-Niortaise watershed	Marais Poitevin	-0,56526	46,45334	2009	C. Husson	A4 / A11 / E2	-	-	-
PAM444	<i>Pam</i>	PAM1	France	Sèvre-Niortaise watershed	Marais Poitevin	-0,45438	46,39395	2009	C. Husson	C7	-	-	-
PAM391	<i>Pam</i>	PAM1	France	Sevre	Marais Poitevin	-0,45438	46,39395	2009	C. Husson	C7 / A10 / E2	-	-	-
PAU187	<i>Pau</i>	PAU1	Belgium	Mons	-	3,95282	50,45483	2001	D. de Merlier	2276	U	-	-
PAU188	<i>Pau</i>	PAU1	Belgium	Habay-la-neuve	-	5,63444	49,71584	2001	D. de Merlier	2277	U	-	-



Sample Name	Species	MLG	Country	Isolation site	Watershed pop.	Xwgs84	Ywgs84	Year	Supplier	Reference	mtDNA	Parent_PAM	Parent_PAU
PAU87	<i>Pau</i>	PAU1	Belgium	Ligneuville	-	6,03274	50,41661	2001	D. de Merlier	2271	U	-	-
PAU300	<i>Pau</i>	PAU1	France	Wolfskirchen	-	7,07438	48,87237	2008	C. Husson	-	-	-	-
PAU302	<i>Pau</i>	PAU1	France	Baerendorf	-	7,08532	48,83989	2008	C. Husson	-	-	-	-
PAU320	<i>Pau</i>	PAU1	France	Baerendorf	-	7,08532	48,83989	2008	J. Aguayo	-	-	-	-
PAU333	<i>Pau</i>	PAU1	France	Wingen-sur-moder	-	7,41202	48,91389	2008	O. Caël	-	-	-	-
PAU338	<i>Pau</i>	PAU1	France	Bischoffsheim	-	7,57136	48,86322	2008	O. Caël	-	-	-	-
PAU368	<i>Pau</i>	PAU1	France	Baerendorf	-	7,08532	48,83989	2009	J. Aguayo	-	-	-	-
PAU496	<i>Pau</i>	PAU1	France	Métairies-Saint-Quirin	-	7,04253	48,65482	2005	R. loos	N10	U	-	-
PAU497	<i>Pau</i>	PAU1	France	Métairies-Saint-Quirin	-	7,04253	48,65482	2005	R. loos	N11	U	-	-
PAU498	<i>Pau</i>	PAU1	France	Métairies-Saint-Quirin	-	7,04253	48,65482	2005	R. loos	N9	U	-	-
PAU526	<i>Pau</i>	PAU1	France	Métairies-Saint-Quirin	-	7,04253	48,65482	2005	R. loos	N1	U	-	-
PAU528	<i>Pau</i>	PAU1	France	Métairies-Saint-Quirin	-	7,04253	48,65482	2005	R. loos	N3	U	-	-
PAU529	<i>Pau</i>	PAU1	France	Métairies-Saint-Quirin	-	7,04253	48,65482	2005	R. loos	N6	U	-	-
PAU530	<i>Pau</i>	PAU1	France	Métairies-Saint-Quirin	-	7,04253	48,65482	2005	R. loos	N7	U	-	-
PAU531	<i>Pau</i>	PAU1	France	Métairies-Saint-Quirin	-	7,04253	48,65482	2005	R. loos	N8	U	-	-
PAU538	<i>Pau</i>	PAU1	France	Wingen-sur-moder	-	7,41202	48,91389	2009	J. Aguayo	-	-	-	-
PAU539	<i>Pau</i>	PAU1	France	Wingen-sur-moder	-	7,41202	48,91389	2009	J. Aguayo	-	-	-	-
PAU540	<i>Pau</i>	PAU1	France	Bischholtz	-	7,54508	48,89063	2009	J. Aguayo	-	-	-	-
PAU541	<i>Pau</i>	PAU1	France	Bischholtz	-	7,54508	48,89063	2009	J. Aguayo	-	-	-	-
PAU542	<i>Pau</i>	PAU1	France	Bischholtz	-	7,54508	48,89063	2009	J. Aguayo	-	-	-	-
PAU625	<i>Pau</i>	PAU1	France	Métairies-Saint-Quirin	-	7,04253	48,65482	2009	J. Aguayo	-	-	-	-
PAU626	<i>Pau</i>	PAU1	France	Métairies-Saint-Quirin	-	7,04253	48,65482	2009	J. Aguayo	-	-	-	-
PAU627	<i>Pau</i>	PAU1	France	Métairies-Saint-Quirin	-	7,04253	48,65482	2009	J. Aguayo	-	-	-	-
PAU628	<i>Pau</i>	PAU1	France	Métairies-Saint-Quirin	-	7,04253	48,65482	2009	J. Aguayo	-	-	-	-
PAU629	<i>Pau</i>	PAU1	France	Métairies-Saint-Quirin	-	7,04253	48,65482	2009	J. Aguayo	-	-	-	-
PAU630	<i>Pau</i>	PAU1	France	Métairies-Saint-Quirin	-	7,04253	48,65482	2009	J. Aguayo	-	-	-	-
PAU632	<i>Pau</i>	PAU1	France	Métairies-Saint-Quirin	-	7,04253	48,65482	2009	J. Aguayo	-	-	-	-
PAU633	<i>Pau</i>	PAU1	France	Métairies-Saint-Quirin	-	7,04253	48,65482	2009	J. Aguayo	-	-	-	-
PAU60	<i>Pau</i>	PAU2	France	Girmont	-	6,43119	48,25282	1999	J.C. Streito	AUL028	U	-	-
PAU624	<i>Pau</i>	PAU3	France	Métairies-Saint-Quirin	-	7,04253	48,65482	2009	J. Aguayo	-	-	-	-
PAU811	<i>Pau</i>	PAU1	Germany	unknown	-	10,39365	51,10656	1997	S. Werres	BBA 70434	-	-	-
PAU668	<i>Pau</i>	PAU1	Hungary	Hansag	-	17,64	47,68	1999	Z. Nagy	155-a	U	-	-
PAU669	<i>Pau</i>	PAU1	Hungary	Hansag	-	17,64	47,68	1999	Z. Nagy	155-b	U	-	-
PAU670	<i>Pau</i>	PAU1	Hungary	Hansag	-	17,64	47,68	1999	Z. Nagy	155-c	U	-	-
PAU142	<i>Pau</i>	PAU1	Slovenia	Ljubliana	-	14,82654	46,12356	2003	A. Munda	Phy-A-SLO	U	-	-

Sample Name	Species	MLG	Country	Isolation site	Watershed pop.	Xwgs84	Ywgs84	Year	Supplier	Reference	mtDNA	Parent_PAM	Parent_PAU
PAU781	<i>Pau</i>	PAU1	Spain	A Bola	-	-8,1425	42,287778	2009	C. Pintos-Varela	685A	-	-	-
PAU844	<i>Pau</i>	PAU10	USA	Dave's Creek	-	-149,65588	60,51795	2008	G. Adams	GA-PAU291 / Gen 3-B2- 3-4	-	-	-
PAU776	<i>Pau</i>	PAU6	USA	Birch Lake	-	-146,64414	64,31103	2010	G. Adams	BLb9	-	-	-
PAU815	<i>Pau</i>	PAU6	USA	Yachats	-	-124,10451	44,30653	2010	E. Hansen	118-R-IK.1	-	-	-
PAU816	<i>Pau</i>	PAU6	USA	Yachats	-	-124,10451	44,30653	2010	E. Hansen	118-R-IJ.3	-	-	-
PAU817	<i>Pau</i>	PAU6	USA	Yachats	-	-124,10451	44,30653	2010	E. Hansen	118-R-IJ.4	-	-	-
PAU825	<i>Pau</i>	PAU6	USA	Birch Lake	-	-146,64414	64,31103	2008	G. Adams	BLR15-3	-	-	-
PAU826	<i>Pau</i>	PAU6	USA	Dave's Creek	-	-149,65588	60,51795	2008	G. Adams	DC30T1-2	-	-	-
PAU836	<i>Pau</i>	PAU6	USA	Birch Lake	-	-146,64414	64,31103	2008	G. Adams	BLR30-3	-	-	-
PAU837	<i>Pau</i>	PAU6	USA	Dave's Creek	-	-149,65588	60,51795	2008	G. Adams	DC30T3	-	-	-
PAU848	<i>Pau</i>	PAU6	USA	Fairbanks	-	-147,02752	64,54074	2008	G. Adams	GA-PAU95 / stem 60-60- 7/9-3-1	-	-	-
PAU849	<i>Pau</i>	PAU6	USA	Yachats	-	-124,10451	44,30653	2008	E. Hansen	110-R-IN-1	-	-	-
PAU851	<i>Pau</i>	PAU6	USA	Dave's Creek	-	-149,65588	60,51795	2008	G. Adams	Gen 4-B2- 1-1	-	-	-
PAU775	<i>Pau</i>	PAU7	USA	Birch Lake	-	-146,64414	64,31103	2010	G. Adams	BLb8twigs	-	-	-
PAU843	<i>Pau</i>	PAU7	USA	Dave's Creek	-	-149,65588	60,51795	2008	G. Adams	GA-PAU290 / Gen 3-B2- 2-1	-	-	-
PAU772	<i>Pau</i>	PAU8	USA	Cooper Landing	-	-149,79452	60,49053	2010	G. Adams	CLBowl9B	-	-	-
PAU773	<i>Pau</i>	PAU8	USA	Cooper Landing	-	-149,79452	60,49053	2010	G. Adams	CLB8	-	-	-
PAU777	<i>Pau</i>	PAU8	USA	Mile 54	-	-149,97597	60,48843	2010	G. Adams	M54b2	-	-	-
PAU845	<i>Pau</i>	PAU8	USA	Cooper Landing	-	-149,79452	60,49053	2008	G. Adams	GA-PAU330 / Gan-9 Bowl-4 1-1	-	-	-
PAU774	<i>Pau</i>	PAU9	USA	Birch Lake	-	-146,64414	64,31103	2010	G. Adams	Blbatwigs	-	-	-
PAU779	<i>Pau</i>	PAU9	USA	Little Tok river	-	-143,33233	62,83705	2010	G. Adams	LTRb9	-	-	-
PAU807	<i>Pau</i>	PAU1	Sweden	Gothembourg	Gothembourg	10,39365	51,10656	1996	C. Olsson	CH161	-	-	-
PAU84	<i>Pau</i>	PAU2	Sweden	Gothembourg	Gothembourg	14,56684	56,79429	1996	C. Olsson	CH162	U	-	-
PAU558	<i>Pau</i>	PAU1	Belgium	Harmignies	Meuse	4,01202	50,40609	2009	J. Aguayo	-	-	-	-
PAU561	<i>Pau</i>	PAU1	Belgium	Harmignies	Meuse	4,01202	50,40609	2009	J. Aguayo	-	-	-	-
PAU847	<i>Pau</i>	PAU6	USA	Panguingue's Creek	Panguingue's Creek	-148,98090	63,91423	2008	G. Adams	GA-PAU53 / PAM-M-2sc	-	-	-
PAU768	<i>Pau</i>	PAU4	USA	Quartz Creek	Quartz Creek	-149,65588	60,51795	2010	G. Adams	QCBowl8A	-	-	-
PAU769	<i>Pau</i>	PAU5	USA	Quartz Creek	Quartz Creek	-149,65588	60,51795	2010	G. Adams	QCBowl10	-	-	-
PAU770	<i>Pau</i>	PAU6	USA	Quartz Creek	Quartz Creek	-149,65588	60,51795	2010	G. Adams	QCBowl12	-	-	-
PAU771	<i>Pau</i>	PAU7	USA	Quartz Creek	Quartz Creek	-149,65588	60,51795	2010	G. Adams	QCb10	-	-	-
PAU846	<i>Pau</i>	PAU7	USA	Quartz Creek	Quartz Creek	-149,65588	60,51795	2008	G. Adams	GA-PAU420 / Gen-7 Bowl-2 1-2	-	-	-
PAU778	<i>Pau</i>	PAU6	USA	Slana river	Slana river	-143,82944	62,69750	2010			-	-	-
PAU89	<i>Pau</i>	PAU2	Italy	Toscane	Toscane	9,76902	45,61943	2000			U	-	-

# ETUDE IV

## MODELING CLIMATE IMPACT ON *Phytophthora alni* INDUCED

### ALDER DECLINE

Jaime Aguayo<sup>1</sup>, Fabrice Elegbede<sup>1,2</sup>, Claude Husson<sup>1</sup> and Benoît Marçais<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INRA-Université de Lorraine, UMR1136 "Interactions Arbres/Micro-organismes", IFR110 EFABA, Centre INRA de Nancy, 54280 Champenoux, France.

<sup>2</sup>ANSES, UMERPC "Méthodologie et Etudes relative aux Risques Physico-Chimiques", 94701 Maisons-Alfort, France.

*Article en préparation*

**Title: Modeling climate impact on *Phytophthora alni* induced alder decline**

**Authors:**

Jaime Aguayo<sup>1</sup>, Fabrice Elegbede<sup>1,2</sup>, Claude Husson<sup>1</sup> and Benoît Marçais<sup>1\*</sup>

**Affiliations:**

<sup>1</sup>INRA-Université de Lorraine, UMR1136 "Interactions Arbres/Micro-organismes", IFR110 EFABA, Centre INRA de Nancy, 54280 Champenoux, France.

**Corresponding author:**

\*Benoît Marçais, INRA Université de Lorraine "Interactions Arbres/Micro-organismes", IFR110 EFABA, Centre INRA de Nancy, 54280 Champenoux, France.

[marcais@nancy.inra.fr](mailto:marcais@nancy.inra.fr)

Tel: [00 33] 3 83 39 40 53

Fax: [00 33] 3 83 39 40 69

## Abstract

Alder decline caused by the *Phytophthora alni* complex is one of the most important diseases in natural ecosystems in Europe in the last 20 years. This emerging disease has been jeopardizing European alder forests, threatening riparian ecosystems. It has been shown that environmental factors play an important role in the occurrence of the disease. Several risk factors that favors the development of the disease have been identified including water flow speed, seasonal flooding by infested water courses and soil characteristics. The effect of the temperature has also been evoked to be important as *P. alni* shows low survival after harsh winter conditions. The objective of the present work was to show how a modified SIR model may be used to understand and forecast the effect of environmental characteristics and climate on the behavior of annual alder *Phytophthora* outbreaks. Two alder sites networks in NE and SW France were surveyed for the crown health state of trees and the oomycete's soil inoculum in the soil. The main factors explaining the temporal annual variation of alder crown decline and recovery were the mean temperatures in the previous winter and summer. Low winter temperatures were unfavorable for the disease, promoting tree recovery because of poor survival of the pathogen during cold winters. Hot summer temperature limited the incidence of tree decline, either because of changes in the microbiological communities that hinder the development of the pathogen or because of interactions with the host physiological conditions. The modified SIR model was also used to simulate the evolution in time of the frequency of declining alder with historical climate data. The last 40 years weather conditions have been favorable to the establishment of the disease indicating that others factors may be implicated in its emergence. The model however showed that the two regional climatic conditions studied showed important differences for the disease outcome, with a climate in SW France much more favorable for the disease linked with good overwintering of the pathogen.

## Keywords

Compartmental models, emerging diseases, climate change, *Phytophthora alni*

## Introduction

New emerging diseases in forest ecosystems and managed landscapes have been reported at an increasing rate over the last century. Emerging infectious diseases caused by pathogenic fungi and fungal-like oomycetes severely impact crops, forests, and wild animals (Kupferschmidt 2012). Over the past few decades, a growing number of fungal and oomycete pathogens have invaded a variety of forests communities from landscape to regional scales (Anderson *et al.* 2004; Desprez-Loustau *et al.* 2007) causing rapid population declines or even species extinctions (Harvell *et al.* 2002). Indeed, they are nowadays increasingly recognized as major threats to biodiversity (Fisher *et al.* 2012). Several factors have been reported to influence disease emergence, including increasing disturbance by humans to forests ecosystems, intensified international trade that promotes pathogen long distance transport and changes in climatic conditions (Anderson *et al.* 2004; Desprez-Loustau *et al.* 2007; Stenlid *et al.* 2011). However, assessing which are the causes that promote the emergence of new diseases is often not straightforward (Garrett *et al.* 2011). It is especially difficult to document the long term and progressive effects of climate change on the dynamic of disease epidemics (Jeger and Pautasso 2008a; Shaw *et al.* 2008). To demonstrate the causal role of climate evolution, long-term sets of data have to be available for both the environmental factors and the disease which is seldom the case (Shaw *et al.* 2008). Nevertheless, the role of changes in environmental and in particular in climate starts to be documented (Anderson *et al.* 2004; Bergot *et al.* 2004; Marçais *et al.* 2004; Desprez-Loustau *et al.* 2007; Fabre *et al.* 2011; Pritchard 2011).

Among the methods used to study the outbreaks of epidemics, mathematical models are precious tools (Gilligan and van den Bosch 2008; Mundt *et al.* 2009). Modeling studies provide increasingly realistic scenarios to explain the influence of changes in temperature, precipitation and other climatic variables on plant diseases changes (Jeger and Pautasso 2008a). In particular, compartmental models have become a dominant theoretical approach in mechanistic modeling of plant disease because they offer advantages in terms of analytic tractability, ease of simulation, and extensibility (Cunniffe *et al.* 2011). These models describe the evolution of an epidemics progress by splitting the studied population into compartments reflecting different status during the disease. They model the transition of individuals between the different compartments. For example many diseases characterized by short-distance transmission, i.e. soil-borne infectious plant diseases, are well characterized by

the SIR (susceptible-infected-removed) stochastic model, where an infected host (I) can transmit the pathogen to its susceptible (S) neighbors for some interval of time, after which it is permanently recovered or removed (R) (Neri *et al.* 2011). Various applications of this simple approach have been developed to investigate the influence of environmental conditions on the dynamics of pathogen populations (Mundt *et al.*, 2010).

*Phytophthora alni* is a pathogenic oomycete associated to alder decline in Europe since the early 1990's (Brasier *et al.* 1995). The pathogen is widely spread in Europe (Streito *et al.* 2002), and has produced important losses to riparian ecosystems, where alder has an important ecological value (Claessens 2003; Thoirain *et al.* 2007). The emergence of the pathogen is associated to an hybridization event between two related parental species (Ioos *et al.* 2006). Environmental factors may also play an important role in the occurrence of the disease. Indeed, several risk factors have been identified including low water flow speed, seasonal flooding by contaminated water, fine soil texture and the presence of living hosts (Jung and Blaschke 2004; Thoirain *et al.* 2007; Elegbede *et al.* 2010). Previous studies have also shown that environmental temperature is also a predominant risk factor (Schumacher *et al.* 2006; Thoirain *et al.* 2007). Schumacher *et al.* (2006) showed that *P. alni* has limited survival during severe frosts, in particular in trunk cankers that are more exposed to air temperature variation. This was mostly explained by the absence of survival spores. Thoirain *et al.* (2007) showed that an increase in the temperature of river water favored increased prevalence of the disease. Indeed, the pathogen has a relatively high optimal growth temperatures of 22.5 - 25°C (Brasier *et al.* 1995), which suggests that *P. alni* is a thermophilous organism, characteristic shared by other emerging plant pathogens (Desprez-Loustau *et al.* 2007). Thus, determining which impact climate conditions may have on the dynamics of the *P. alni* induced alder decline on a large temporal and spatial scale is an important question to predict the possible future disease evolution.

The objective of the present work was to show how a SIR like model may be used to understand and forecast the effect of environmental characteristics and climate on the emergence of the *Phytophthora alni* induced alder decline. For that, a survey of alder plots sampled on a temperature gradient in NE France was conducted over 5-6 years. Additionally, we followed the dynamic of the pathogen's soil inoculum on a 3 year period to identify environmental factors favorable to disease development.

## Materials and Methods

### Study sites

Sixteen alder survey plots were established in the Lorraine and Alsace regions in Eastern France (Fig. 1). The plots were selected on a gradient of water temperature and to represent high disease prevalence levels (proportion of diseased trees) in order to minimize the influence of inoculum availability. Characteristics of selected plots are given in Table 1. Presence of the alder *Phytophthora* was confirmed in 14 of the 16 sites by isolation and in all sites by baiting (as describe below). Water temperature data were obtained from measurement stations of the Agence de l'eau Rhin-Meuse located in the vicinity of the survey plots. The plots were set up along the river to be at least 250 m long on the 2 sides of the river when alders were present on both banks. All alders above 1.3 m high present at less than 10 m of the river were selected and marked. The plot was extended until at least 40 alders were selected. Altogether, 1426 alders were monitored. Trees were marked and mapped. One plot was established in 2006, 9 in 2007 and 6 in 2008. Water stream speed was recorded once a year (between July and September) for each survey plot using a current meter. Between 4 and 10 measures were recorded at points distant from each other by at least at 10 m and in order to cover the entire extension of the sites. Additionally, soil properties for each plot site, pH, soil texture, organic carbon (C), total nitrogen (N), were obtained from soils sampled at the base of two randomly chosen alder trees. Between two and four soil samples per tree were taken at 10-50 cm from the stem base using a soil borer. Litter was removed and  $\approx 500\text{g}$  of soil were pooled in a plastic bag and stored at  $4^{\circ}\text{C}$  until processed. Soil analyses were carried out by the Laboratoire d'Analyse des Sols d'Arras (<http://www5.lille.inra.fr/las>) for pH (water method), total carbon (C) and total nitrogen (N) content (NF ISO 10694 and NF ISO 13878). Mean air temperatures and rain per 10-days periods at the closest meteorological stations for the years 2006-12 were purchased from Météo-France. The meteorological stations were 4-25 km from the sites.

### Survey procedure

Between years 2006 and 2012, all alder trees reaching a height of 1.30 were recruited and mapped. For each sampled alder, information was collected on its year of recruitment, distance to the river, and number of stems (for coppiced trees). Tree diameters were measured at 1.30 m (diameter breast height, dbh) at 2-year intervals from 2006 to 2012. The basal area of the trees was computed from the stem diameter measurements. For coppiced trees, the



number of stems above 2 cm dbh was determined, and the dbh of the three biggest stems were measured. The basal area was computed from those data using a relationship established by Elegbede *et al* (2010). Annually, between May and June crown health status of the trees was determined on a 1-to-4 scale, with 1, healthy foliage (leaves with normal size and color and dense crown); 2, defoliation of 10 to 50%, with small and yellowish leaves; 3, defoliation of >50%, with small yellowish leaves and dead branches; and 4 = dead tree (no leaves, bark dead at the trunk level).

### **Soil inoculum estimation**

*Soil sampling.* From 2009 to 2012, six large alder trees with crowns rated as 2 were sampled one to three times (May-June, July-August, and September-October). These trees with relatively healthy crowns represent alders that have the highest level of *P. alni* inoculum in the soil at the trunk base (Elegbede *et al.* 2010). Three to four soil cores, 5 cm in diameter and 15-20 cm depth, were sampled at the base of each tree at 1 m from the collar with a sterilized soil borer. Samples were sealed in plastic bags and kept cool at 4°C until processed in the laboratory.

*Baiting procedure.* Baiting was performed as described by Elegbede *et al.* (2010). A 200 ml subsample of soil was placed in a plastic container covered with 500 ml of distilled water. Baiting was performed using three well-developed similar-sized leaves of rhododendron cv. Cunningham's white which were floated on the surface. The surface area of the rhododendron leaves used as baits was estimated and recorded. Plastic containers were incubated in the dark at 20°C in a temperature-controlled chamber for 3 days. Then, the leaves were removed, dried and kept at 4°C until processing. Necrotic spots induced by *Phytophthora* spp. for each bait leaf were counted. A subsample of up to 15 necrotic spots per soil sample was cut with a sterilized scalpel for *P. alni* detection by PCR.

*Inoculum estimation.* Necrotic spots were individually placed in 96-wells plates for DNA extraction. Negative and positive controls were as well included in each plate. DNA extraction was performed using the Dneasy96 plant kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) following the manufacturer's instructions. Specific *P. alni* primers T-PAU-F (CGG-CCG-TTG-ACA-TGT-TTA), T-PAU-R (GGG-CGC-CAT-ACA-AAA-TC) and a Taqman™ probe, T-PAU-P (TCG-GGT-TTT-GTT-TGG-TGC-TGT) were designed on the basis of the single copy mitochondrial gene *TRP1* (Ioos *et al.* 2006) to amplify a 81 bp fragment from *P. alni*. The fluorogenic probe T-PAU-P was labeled at the 5' end with the fluorescent reporter

dye JOE™ and the 3' end was modified with the quencher dye BHQ-1™. Real-time PCR amplifications were performed using the qPCR™ Core kit No ROX (Eurogentec, Seraing, Belgium), containing 1X reaction buffer, 1U of UNG, 0.3 μM of the respective forward and reverse primer, 0.1 μM of the dual-labeled probe, 2 μl of template DNA and molecular biology grade water was added to 15 μl. The real-time PCR cycle conditions included an initial 50°C step, 5 min step for the UNG activation and a 95°C initial denaturation step for 10 min followed by 40 cycles of denaturation and annealing. PCR reactions were carried out with a Rotor-Gene 6500 (Corbett Research, Mortlake, Australia). *P. alni* mycelium from the target soil samples was estimated by the presence/absence of amplification curves after fixing a threshold established in the exponential part of the amplification curve. Soil inoculum was expressed as the total number of necrotic spots induced by *P. alni*.

## Data analysis

### Crown and the canker disease incidence

Tree decline incidence, i.e. the likelihood that a tree not declining in year  $t$  declines in year  $t+1$ , and tree recovery, i.e. the likelihood that a tree declining in year  $t$  is not rated as declining in year  $t+1$ , were analyzed by logistic regression using as explaining variables the mean temperature in summer of year  $n-1$  (July-August), the mean temperature in winter of year  $n-1$  or  $n-2$  (November-March) and all sites variables (speed of the river stream, soil pH, Carbone / Nitrogen ratio and soil texture estimated by the clay / sand ratio).

A modified SIR model was defined to estimate the dynamic of alder decline on the studied plots. Four compartments were defined: i. Nd, non-declining trees (trees with crown rated 1), ii. De, declining trees (trees with crown rated 2-3), iii. R, removed trees, i.e. trees that disappeared (cut or fallen trees) and iv. D, dead trees. The model estimates the transition between the compartments which are Dec, the number of new decline cases, Rec, the number of declining trees that recover, Mnd and Md, the mortality of respectively non-declining and declining trees, Rnd and Rd, the disappearance of respectively non-declining and declining trees and Sd, the arrival of new seedling on the plot (new recruitments per year) (Fig. 2).  $Dec_{t+1,i}$ , the number of trees in plot  $i$  not declining in year  $t$  that declines in year  $t+1$ , was estimated from the proportion of infectious trees in year  $t$  and from a year dependent decline rate  $p_{t+1,i}$ . Only declining trees were supposed to be infectious. It is known that some non-declining alders are nevertheless infected asymptomatic trees and are infectious (Elegbede *et al.* 2010) but they were not taken into account as we have no data to estimate their frequency.

Dead trees were considered not infectious as *P. alni* survives little in soil in host absence (Jung & Blaschke 2004; Elegbede *et al.* 2010). The decline rate  $p_{t+1,i}$  depended on the mean temperature of the previous winter  $T_{win_{t,i}}$  and Summer  $T_{sum_{t,i}}$  and on a plot random effect  $\varepsilon_i$  that followed a normal law  $N(0, \sigma)$ .  $Dec_{t+1,i}$  was considered to follow a Poisson law of parameter:

$$(1) Dec.m_{t+1,i} = p_{t+1,i} \times (De_t / (De_t + Nd_t)) \times Nd_t$$

$$\text{with Logit}(p_{t+1,i}) = \beta_1 + \beta_2 \times T_{win_{t,i}} + \beta_3 \times T_{sum_{t,i}} + \varepsilon_i$$

Trees recover (when declining in year  $t$  and non-declining in year  $t+1$ ), at a rate  $q_{t+1,i}$  that depend on  $T_{win_t}$  and  $T_{win_{t-1}}$  the mean temperature of the 2 previous winters and on  $T_{sum_{t,i}}$  of previous summer.  $Rec_{t+1,i}$  the number of trees that recover in year  $t+1$  and plot  $i$  was considered to follow a Poisson law of parameter:

$$(2) Rec.m_{t+1,i} = q_{t+1,i} \times De_t$$

$$\text{with Logit}(q_{t+1,i}) = \gamma_1 + \gamma_2 \times T_{win_{t,i}} + \gamma_3 \times T_{win_{t-1,i}} + \gamma_4 \times T_{sum_{t,i}}$$

Because trees were rated early in the growing season (late May to early June), their crown status do not depend on the characteristics of the winter or summer of the current year, but of the previous one.

Trees were considered to die at a rate independent of both the year and the plot for non-declining trees ( $\mu_{nd}$ ) while declining trees died at a rate that depended on the previous winter mean temperature ( $\text{logit}(\mu_d) = \mu_1 + \mu_2 \times T_{win_{t,i}}$ ). Trees were removed at a rate  $\delta$  independent of the year and plot and that was identical for non-declining and declining trees. Finally, new seedlings arrived on the plots at a rate  $\alpha$ . The number of non-declining trees that died ( $Mnd_{t+1,i}$ ) or disappeared ( $Rnd_{t+1,i}$ ), of declining trees that died ( $Md_{t+1,i}$ ) or disappeared ( $Rd_{t+1,i}$ ) and of new seedlings arriving on the plot ( $Sd_{t+1,i}$ ) in year  $t+1$  followed Poisson law of parameter:

$$(3) Mnd.m_{t+1,i} = \mu_{nd} \times Nd_{t,i}, \text{ and } (3') Rnd.m_{t+1,i} = \delta \times Nd_{t,i}$$

$$(4) Md.m_{t+1,i} = \mu_d \times De_{t,i}, \text{ and } (4') Rd.m_{t+1,i} = \delta \times De_{t,i}$$

$$(5) Sd.m_{t+1,i} = \alpha \times (Nd_{t,i} + De_{t,i}),$$

The numbers of trees in the 4 compartments were computed from the numbers in the previous year and from the transitions between compartments:

$$Nd_{t+1,i} = Nd_{t,i} + Sd_{t+1,i} + Rec_{t+1,i} - Dec_{t+1,i} - Mnd_{t+1,i} - Rnd_{t+1,i}$$

$$De_{t+1,i} = De_{t,i} + Dec_{t+1,i} - Rec_{t+1,i} - Md_{t+1,i} - Rd_{t+1,i}$$

$$D_{t+1,i} = D_{t,i} + Mnd_{t+1,i} - Md_{t+1,i}$$

$$R_{t+1,i} = R_{t,i} + Rnd_{t+1,i} - Rd_{t+1,i}$$

The model was fitted in a Bayesian framework under Winbugs 1.4.3. Non informative priors were affected to the model parameters.  $\mu_{nd}$ ,  $\delta$ , and  $\alpha$  were affected a Normal distribution  $N(0, 1e+04)$  while  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ,  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ ,  $\gamma_3$ ,  $\gamma_4$ ,  $\mu_1$  and  $\mu_2$  were affected a Normal distribution  $N(0, 1e+06)$ . The model was fitted with a burning of 60000, for 90000 iterations with a thinning of 100. Three parallels chains with different initial parameter values were run and convergence was checked by verifying that the  $R_{hat}$  were close to 1.

### **Test of the developed model with a cross-validation dataset**

To test the model described in the previous section, we used data from a network of 26 plots located in the Charente area, in SW France (Fig 1), and monitored by the French health survey system, the Département de la Santé des Forêts from 1998 to 2003. Altogether, about 900 trees were marked and annually rated for crown decline with a rating similar to the one described in the previous section (25 to 45 *Alnus glutinosa* per plots). Half of the plots were not rated in 2001. No new alder was recruited during the study. It has to be pointed out that presence of *P. alni* was not confirmed on most of the sites.

The number of tree declining (crown rating of 2 or 3) or not declining (crown rating lower than 2) in 1998 was computed for each plot as well as mean temperature in winter (November to March) and summer (July to August) in 1998-2003 at the closest Safran grid point. Safran data are meteorological data available on an 8 x8 km grid throughout France on a daily basis. As the trees were rated late in the season on the plot network, no lag was used for the temperature years. The evolution of the number of non-declining, declining, dead and removed alder was simulated from 1999 to 2003 using those data; the simulation was done using the R library DeSolve. The observed and simulated decline prevalence, i.e. frequency of declining alder were then computed and compared.

### **Simulation of past evolution of *P. alni* induce alder decline**

The developed model was used to simulate the evolution in time of the frequency of declining alder. This was done for the 38 Safran points the closest the monitored sites (16 for the Rhin-Meuse area and 22 for the Charente Area). The annual Decline rate  $p_{t,i}$ , recovery

rates  $q_{t,i}$  and mortality rate  $\mu d_{t,i}$  were computed for each safran point for the 1970-2005 period using the parameters fitted in the previous section. The simulation was done annually, with an initialization of the model with 199 none declining alder and one declining one and the use of the computed ( $p_{t,i}$ ,  $q_{t,i}$  and  $\mu d_{t,i}$ ) or fitted ( $\mu_{nd}$ ,  $\delta$  and  $\alpha$ ) rates. The simulation was done using the R library DeSolve. The possibility of the disease to develop was characterized by the frequency of years within a 5-years period with an increase in disease prevalence from low level i.e. final prevalence above 1/200.

In order to compare the situation in the Rhin-Meuse and Charente (respectively NE and SW France), area that have very different climatic conditions, we simulated for each safran grid point the evolution of the disease over the all 1970-2008 period after an initial introduction of the pathogen in 1970 using the annual computed decline, recovery and mortality rates. The simulation was initiated in 1970 with a plot of 200 alder with one declining tree. A small recurrent arrival of declining alder was included to avoid that the disease get extinct in unfavorable conditions. This was done by adding a recruitment of declining alder of 10% of the recruitment of non-declining alders.

### **Estimation of *P. alni* soil inoculum**

The number of necrotic lesions induced by *P. alni* (PaNL) on the rhododendron leaves after baiting was used as a measure of soil inoculum level. PaNL was estimated as the total number of necrotic lesions multiplied by the proportion of PCR analyzed lesions where *P. alni* was detected. When dealing with count data, the Poisson regression model is normally used. However, the data contain an excess of zeros and the best adapted model is zero-inflated Poisson model (ZIP, see Elegbede *et al.* (2010). Indeed, absence of detection of *P. alni* at the base of a tree may indicate a sampling error, linked to inadequate sampling and/or detection by baiting, or a real absence of inoculum. ZIP models assume that the data result from a mixture of two independent data generation process: one represent the detection errors and will generate only zeros, while the second is a Poisson data-generating process. The result of a Bernoulli trial is used to determine which of the two processes will generate an observation. Thus, a logistic regression model was used to fit the probability ( $p$ ) of *P. alni* detection in the soil, and a log-linear model with the rhododendron leaf surface as an offset was used to predict the mean number of necrotic lesions on bait leaves ( $\lambda$ ),

$$\log(\lambda_i) = \log(\text{surf } i) + x_i' \beta$$

$$\text{logit}(p_i) = \log\left[\frac{p_i}{1-p_i}\right] = W_i^t \gamma$$

Where, *surf* represents the area of rhododendron leaves used as baits,  $x_i^t \beta$  and  $W_i^t \gamma$  are linear predictors,  $\beta = (\beta_1, \dots, \beta_q)$  and  $\gamma = (\gamma_1, \dots, \gamma_r)$  are vectors of regression associated with the explicative covariables  $X = (X_{i1}, \dots, X_{iq})$  and  $W_i = (W_{i1}, \dots, W_{ir})$ . As explicative covariables, we included in all models the season (spring, summer or autumn) and then climate variables, i.e. mean temperature and total precipitation in the decade of baiting and mean temperature in the winter preceding the baiting (November to March), or site variables, i.e. soil pH, texture (clay / sand ratio) and Carbon / Nitrogen ratio.

The model was fitted in a Bayesian framework under Winbugs 1.4.3. Non informative priors were affected to the model parameters, according to a Normal distribution  $N(0, 1e+06)$ . The model was fitted with a burning of 30000, for  $2e+05$  iterations with a thinning of 20. Three parallels chains with different initial parameter values were run and convergence was checked by verifying that the  $R_{\text{hat}}$  were close to 1.

## Results

### Estimation of *P. alni* soil inoculum

Soil inoculum, estimated as the number of lesions induced by *P. alni* per unit area of bait leaves was very different in the 4 years. The difference was mostly noticeable in spring (Fig. 3). Indeed, the main factor that impacted the level of soil inoculum were the season (likelihood chisq = 409.4, pvalue < 0.001) and the mean temperature of the previous winter (likelihood chisq = 6890.1, pvalue < 0.001); these 2 factors significantly interact (likelihood chisq = 1027.4, pvalue < 0.001). Indeed, figure 3 shows that the level of *P. alni* inoculum in the soil strongly increased in the spring with the mean temperature of the previous winter while the response was far less important in summer and in autumn, although it remained significant in the 2 seasons (with respective pvalues < 0.001).

Other factors impacted on the level of *P. alni* soil inoculum, although with far less importance. Indeed, the nb of lesions per unit area increased significantly with the mean temperature of the 10-days period preceding sampling (pvalue = 0.010) and was significantly related to the soil pH (pvalue < 0.001). The relation with soil pH was none monotonous as the square of soil pH was also related to the nb of lesion per unit area (pvalue < 0.001). The optimal pH for soil inoculum was  $6.7 \pm 0.1$ . By contrast, total rain during the 10-days period

preceding sampling (pvalue = 0.328), soil clay / sand ratio (pvalue = 0.966) and soil carbone / nitrogen ratio (pvalue = 0.253) were not related to the number of *P.alni* lesions per unit area

### **Incidence of decline in the Rhin-Meuse area**

The evolution of the crown decline prevalence throughout years 2007-2011 showed a clear pattern (Fig. 5). Prevalence increased from years 2007 to 2009 and then decreased from years 2010 to 2012. The decrease in decline prevalence was due to the recovery of many declining alders, i.e. trees with a crown declining in year  $t$  and healthy in year  $t+1$ . Temporal variation of prevalence could be explained mainly by mean temperatures in the previous winter and summer (with a one year lag, linked to the yearly assessment in the growth season). Indeed, mild winter temperatures were positively related to the incidence of crown decline and negatively related to the declining tree recovery (respective Likelihood chi2 of 91.3 and 111.4, both pvalue < 0.001, Fig.6a and 6b). The recovery of declining trees was significantly linked to the mean winter temperature 2 years before the health assessment (Likelihood chi2 = 74.4, pvalue < 0.001). By contrast, the incidence of crown decline significantly decreased with increasing summer temperature (Likelihood chi2 = 267.7, pvalue < 0.001) while recovery of declining alder trees increased after hotter summers (Likelihood chi2 = 53.9, pvalue < 0.001). None of the measured soil properties nor the water stream speed was significantly linked to either tree recovery or decline (results not shown, pvalues in the 0.1-0.4 range). Consequently, the modified SIR model was developed taking into account only the mean winter and summer temperatures and none of the site properties (soil characteristic or water stream speed).

Parameter estimates of the model are given in Table 2. All coefficients were statistically significant.  $R_{\text{hat}}$  values close to 1 (values from 1.00-1.16) indicated that the model converged. As expected, the rate at which trees declined ( $p_{t+1,i}$ ), at which declining trees recovered ( $q_{t+1,i}$ ) or died ( $\mu_{t+1,i}$ ) were significantly linked to the mean temperatures of the previous winter and summer. Indeed, parameters  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ,  $\gamma_2$ ,  $\gamma_3$ ,  $\gamma_4$  and  $\mu_1$  all were significantly different from 0. The random site factor induced significant variability with a variance  $\sigma$  of 0.55-1.64. The decline prevalence predicted by the model was well related to the one observed (Fig. 7a).

### **Cross-validation of the developed model with data from the Charente area**

Model validity was checked by a cross-validation using the data of the Charente area in SW France. The pattern of decline prevalence evolution over the monitored period was very

different in the Charente area and in the Rhin-Meuse area (Fig.6). Indeed, decline prevalence continuously increased over years in the Charente area with very little evidence of tree recovery from decline. As expected, the climatic conditions were hotter in SW France than in the NE, with mean winter and summer temperature of respectively  $7.0 \pm 0.6$  and  $20.1 \pm 1.1$  °C for the 1998-03 period (compared to respectively  $3.5 \pm 1.1$  and  $18.2 \pm 0.7$  °C for the 2006-12 period in the Rhin-Meuse area). The correlation between the decline prevalence observed and the one predicted by the model was good (Fig. 7b). A few plots were not well represented by the model with an over-estimation of the disease prevalence. Those plots showed similar pattern with an observed prevalence of decline that remained low and very stable over the study period, with no trees showed transition from none declining to declining.

### **Simulation of past evolution of *P. alni* alder decline**

The possibility of *P. alni* induced decline to develop in past climatic conditions was studied by simulation. The decline rate showed little long trend evolution from 1970 to 2008 (Fig 8a,  $F = 1.36$ ,  $pvalue = 0.6$ ). Although the decline rate was significantly higher in the Rhin-Meuse area compared to the Charente area ( $F = 6.30$ ,  $pvalue = 0.014$ ) the temporal trend was similar in the 2 areas (time \* area interaction not significant,  $F = 0.99$ ,  $pvalue = 0.38$ ). The difference in recovery rate between the Rhin-Meuse area and the Charente area was much larger ( $F = 105.19$ ,  $pvalue < 0.001$ , see Fig. 8b). The recovery rate also showed a significant decreases from 1970 to 2008 to a degree that depended on the area (significant time \* area interaction,  $F = 4.18$ ,  $pvalue = 0.19$ ). The decrease was mainly apparent in the Rhin-Meuse area (Fig. 8 b) while the recovery rate remained low throughout the period in the Charente area.

The use of the SIR-like model to simulate retrospectively the ability of *P. alni* induced decline to increase annually from low level showed that climatic conditions were suitable for the disease to get established in the 2 areas during most of the years since 1970. Indeed 70-100% of the years enabled the disease to increase from an initial decline prevalence of 0.5% (Fig. 8c). The comparison of the simulated evolution of the *P. alni* induced decline from 1970 to 2008 after an introduction in 1970 showed dramatic differences between the Charente and the Rhin-Meuse areas. Climate appeared to be much more favorable to the disease in the Charente, in SW France, with final decline prevalence of about 80 %. By contrast, after an initial increase the decline prevalence stabilized at around 40 % in NE France, in the Rhin-Meuse area.



## ***Discussion***

The main factors explaining the temporal variation of tree decline were the mean temperatures in winter and summer. Indeed, *P. alni* induced alder decline requires mild temperatures both for overwintering and to persist during the season. However, after cold winters and hot summers the disease shows decreasing levels. The SIR-like model we developed during this work explained adequately the evolution of alder decline prevalence in two different studied areas of France. These two areas presented important differences in both the dynamic of crown decline and the climatic constraints on the disease evolution. Indeed, while overwintering was a limiting factor for disease evolution in NE France, this was not the case for the SW. Reduced winter survival of the pathogen induced frequent tree recovery in NE France, which was not observed in the SW.

The demonstrated importance of *P. alni* overwintering for the disease epidemiology can be related to dynamic of inoculum in the soil. Indeed, our study showed a clear annual pattern of the *P. alni* viable inoculum at the base of infected trees with poor survival in cold winters. It has already been shown that *P. alni* does not survive harsh winter conditions, in particular severe frost (Schumacher *et al.* 2006; Cerny and Strnadova 2012). This is linked to the absence of survival spores as *P. alni* does not produce chlamydospores and has none viable oospores linked to its hybrid status and its triploidy (Delcàn and Brasier, 2001; Husson, unpublished results). As a consequence, *P. alni* was demonstrated to persist in soil less for than 2 years in the absence of living hosts (Jung and Blaschke 2004; Elegbede *et al.* 2010). Indeed, the presence of survival oospores has been shown to be a major means to the survival of oomycetes to winter conditions (Fernández-Pavía *et al.* 2004; Vercesi *et al.* 2010; Zhang *et al.* 2012). This has important epidemiological consequences for the development of soil borne diseases, as inoculum levels are less affected by harsh seasonal climatic conditions. A possibility is that *P. alni* has to induce fine root infections throughout the winter to avoid its population to crash and thus needs mild winter temperature. Another hypothesis is that *P. alni* is eliminated during severe frost. This has been demonstrated for other *Phytophthora* species such as *P. cinnamomi* (Marçais *et al.* 2004). This susceptibility to frost limits the distribution of *P. cinnamomi* in NE American forest (from the pathogen being absent in sites where mean winter temperatures are too low (Balci *et al.*, 2007).

Inoculum in the soil showed also a strong seasonal pattern. The study shows that levels of *P. alni* inoculum is high in spring after mild winters, while it remains stable in summer and

autumn. Spring offers suitable conditions, with warm temperature and moist soils to trigger the development of *P. alni* inoculum that survived the winter conditions. Indeed, *Phytophthora* species can increase and disseminate their inoculum from low, nearly undetectable levels during a relatively short time of favorable environmental conditions (Erwin and Ribeiro 1996). An important factor that affects seasonal patterns of soil borne *Phytophthora* is moisture (Benson *et al.* 2006; Shearer *et al.* 2010). However, in our study seasonal dynamic could not be attributed to the total rain during the 10-days period preceding sampling was not a relevant variable. This could be explained by the fact that precipitation data were obtained from nearby meteorological stations that could not adequately represent rain patterns on the studied sites. It is possible that this parameter was not measured at an appropriate scale to the response of *P. alni* to obtain reliable estimates of its effect.

The unfavorable impact of high summer temperature on *P. alni* decline, with decreased tree decline rate and increased recovery rate is more difficult to interpret. *P. alni* has been described as a thermophilous organism with optimal growth temperatures ranges between 22.5 and 25°C (Brasier *et al.* 1995). The limiting impact of warm summers occurred at a temperature range of 19-20°C, significantly under its optimal growth temperature. This might reflect changes of microbial communities at that temperature range. It has indeed been demonstrated that differences in seasonal fluctuations of *Phytophthora* between sites may reflect differences in levels of antagonistic microflora population (Shearer and Shea 1987; Dirac and Menge 2002; Shearer *et al.* 2010). Sporangia production by *P. alni* is affected by variation in the water microbiota (Chandelier *et al.* 2006), with microbial communities present in rivers at high temperature tending to decrease the sporulation. Microbial communities in soils are important for disease suppression (Garrett *et al.* 2011). This limiting effect of high summer temperature can be also explained by an interaction with host physiology. Temperature may have an important effect on zoospore infection (Jeger and Pautasso 2008b). Indeed, Shishkoff (2011) showed that roots incubated at 25°C producing less *P. ramorum* inoculum than roots incubated at lower temperatures. It seems that *P. alni* inoculum development reacts to extreme temperatures. At extreme temperatures soil inoculum development is negatively affected which would enhance tree recovery.

Soil properties appeared to be less important factors to explain the *P. alni* inoculum levels in soil. Indeed, neither the clay/sand ratio nor the Carbon/Nitrogen soil ratios were correlated to the measured levels of the inoculum. However, soil pH was a factor that explained the quantity of inoculum at the base of the trees. Optimal pH for soil inoculum was near 6.7.

These results are consistent with those of Schumacher *et al.* (2006) and Kong *et al.* (2012) who estimated that optimal values for *P. alni* sporangia formation are close to neutral pH values. This sensibility to extreme pH values seems to be a shared characteristic with other soil borne Phytophthoras: after a survey in the Baviera region in Germany, Jung *et al.* (2000) showed that no species could be isolated from sites where pH was under 3.9.

The developed model fitted correctly the evolution of decline prevalence in the 2 area of France studied, and in particular in sites of SW France that were not used to estimate the parameters. The model proved thus to be robust. Indeed, the 2 areas presented very different climates in particular for winter conditions. While overwintering was a strong constraint on the disease evolution in NE France, with frequent and significant tree recovery after cold winters, this was not the case in SW France. In this area, as predicted by the model, very little tree recovery occurred. As a result, the model predicted that decline prevalence would reach much higher levels in SW France compared to the NE. This is not what is observed on the monitored plots. However, there is a selection bias: while the Charente plots were selected randomly without taking into account the tree decline state, this was not the case in NE France where severely infected plots were selected to minimize the impact of inoculum availability. Data more comparable to the average prevalence 50-60 % observed on the Charente network can be found in the work of Thoirain *et al.* (2006) where a general survey in the Rhin-Meuse area yielded a mean decline prevalence of 16%. The *P. alni* induced alder decline thus appears to be far less severe in NE France compared to the SW. Using the fitted model linking the decline prevalence in the stands to climate showed that the climate in France have been favorable for the establishment of *P. alni* for the last 40 years. There was a trend of decreasing tree recovery rate in the NE and this evolution could have partly explained the emergence of the disease in the 1990's. However, the long term simulation showed a very stable trend of predicted decline prevalence in NE France over the last 30 years and this hypothesis does not appear to hold. It has been proposed that *P. alni* is the product of an interspecific hybridization event that probably took place in nurseries (Jung and Blaschke 2004; Schumacher *et al.* 2006). Thus, the appearance of the pathogen was probably the result of the introduction of contaminated plant material in unharmed sites, which consequently spread means of rivers. We hypothesize that after the hybridization event, conditions were suitable already for the pathogen and that its appearance in the 1990's was detected after a period of establishment and spread. However, the strong difference in the two studied regions linked to the difference in pathogen winter survival clearly question the future

evolution of this disease in a context of warming climate, especially in area such as NE France where overwintering limit the disease severity.

The model must be extrapolated to different climatic conditions such as other European countries with caution. Indeed, one weakness of the model is that we were not able to predict a decrease in the decline rate with low summer temperature, as we did not have the proper conditions in our study area. Care should thus be taking when using it at summer temperature lower than 16-17°C. This is why we did not attempt to predict the disease evolution before 1970. Another weakness of the model is that it does not consider asymptomatic infected trees for *P. alni*. Indeed, Elegbede *et al.* (2010) shown that these trees were among the highest inoculum producers. Asymptomatic root infections offer a hidden pathway of pathogen transmission and persistence (Fichtner *et al.* 2010). This could certainly lead to an underestimation of the levels of infection on the study sites and could bias the estimation of the pathogen ability to persist in adverse conditions. This could be addressed by adding a non-declining infected trees compartment in the model and represent a possible future improvement for it.

## References

- Anderson PK, Cunningham AA, Patel NG, Morales FJ, Epstein PR, Daszak P, 2004. Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends in Ecology & Evolution* **19**: 535–544.
- Benson DM, Grand LF, Vernia CS, Gottwald TR, 2006. Temporal and Spatial Epidemiology of Phytophthora Root Rot in Fraser Fir Plantations. *Plant Disease* **90**: 1171–1180.
- Bergot M, Cloppet E, Pérarnaud V, Déqué M, Marçais B, Desprez-Loustau M-L, 2004. Simulation of potential range expansion of oak disease caused by *Phytophthora cinnamomi* under climate change. *Global Change Biology* **10**: 1539–1552.
- Brasier CM, Rose J, Gibbs JN, 1995. An unusual *Phytophthora* associated with widespread alder mortality in Britain. *Plant Pathology* **44**: 999–1007.
- Cerny K, Strnadova V, 2012. Winter survival of *Phytophthora alni* subsp. *alni* in aerial tissues of black alder. *Journal of Forest Science* **58**: 328–336.
- Chandelier A, Abras S, Laurent F, Debruxelles N, Cavelier M, 2006. Effect of temperature and bacteria on sporulation of *Phytophthora alni* in river water. *Communications in agricultural and applied biological sciences* **71**: 873–880.
- Claessens H, 2003. The alder populations of Europe. In: *Phytophthora disease of Alder in Europe*, Gibbs, J., Van Dijk, C., and Webber, J., Edinburgh, p. 82.
- Cunniffe NJ, Stutt ROJH, Bosch F van den, Gilligan CA, 2011. Time-Dependent Infectivity and Flexible Latent and Infectious Periods in Compartmental Models of Plant Disease. *Phytopathology* **102**: 365–380.
- Desprez-Loustau M-L, Robin C, Buée M, Courtecuisse R, Garbaye J, Suffert F, Sache I, Rizzo DM, 2007. The fungal dimension of biological invasions. *Trends in Ecology & Evolution* **22**: 472–480.
- Dirac MF, Menge JA, 2002. High temperatures are not responsible for lack of infection of citrus roots by *Phytophthora citrophthora* during the summer, but suppressive soil microorganisms may inhibit infection by *P. citrophthora*. *Plant and Soil* **241**: 243–249.
- Elegbede CF, Pierrat J-C, Aguayo J, Husson C, Halkett F, Marçais B, 2010. A statistical model to detect asymptomatic infectious individuals with an application in the *Phytophthora alni*-induced Alder decline. *Phytopathology* **100**: 1262–1269.
- Erwin DC, Ribeiro OK, 1996. *Phytophthora diseases worldwide*. Department of Plant Pathology, University of California, Riverside, USA. American Phytopathological Society (APS Press) American Phytopathological Society (APS Press).
- Fabre B, Piou D, Desprez-Loustau M-L, Marçais B, 2011. Can the emergence of pine *Diplodia* shoot blight in France be explained by changes in pathogen pressure linked to climate change? *Global Change Biology* **17**: 3218–3227.

- Fernández-Pavía SP, Grünwald NJ, Díaz-Valasis M, Cadena-Hinojosa M, Fry WE, 2004. Soilborne Oospores of *Phytophthora infestans* in Central Mexico Survive Winter Fallow and Infect Potato Plants in the Field. *Plant Disease* **88**: 29–33.
- Fichtner EJ, Rizzo DM, Kirk SA, Webber JF, 2010. Root Infections May Challenge Management of Invasive *Phytophthora* spp. in U.K. Woodlands. *Plant Disease* **95**: 13–18.
- Fisher MC, Henk DA, Briggs CJ, Brownstein JS, Madoff LC, McCraw SL, Gurr SJ, 2012. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* **484**: 186–194.
- Garrett KA, Forbes GA, Savary S, Skelsey P, Sparks AH, Valdivia C, Bruggen AHC van, Willocquet L, Djurle A, Duveiller E, Eckersten H, Pande S, Vera Cruz C, Yuen J, 2011. Complexity in climate-change impacts: an analytical framework for effects mediated by plant disease. *Plant Pathology* **60**: 15–30.
- Gilligan CA, Bosch F van den, 2008. Epidemiological Models for Invasion and Persistence of Pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **46**: 385–418.
- Harvell CD, Mitchell CE, Ward JR, Altizer S, Dobson AP, Ostfeld RS, Samuel MD, 2002. Climate warming and disease risks for terrestrial and marine biota. *Science* **296**: 2158–2162.
- Ioos R, Andrieux A, Marçais B, Frey P, 2006. Genetic characterization of the natural hybrid species *Phytophthora alni* as inferred from nuclear and mitochondrial DNA analyses. *Fungal Genetics and Biology* **43**: 511–529.
- Jeger MJ, Pautasso M, 2008a. Plant disease and global change – the importance of long-term data sets. *New Phytologist* **177**: 8–11.
- Jeger MJ, Pautasso M, 2008b. Comparative epidemiology of zoosporic plant pathogens. *European Journal of Plant Pathology* **122**: 111–126.
- Jung T, Blaschke M, 2004. *Phytophthora* root and collar rot of alders in Bavaria: distribution, modes of spread and possible management strategies. *Plant Pathology* **53**: 197–208.
- Jung T, Blaschke H, Oßwald W, 2000. Involvement of soilborne *Phytophthora* species in Central European oak decline and the effect of site factors on the disease. *Plant Pathology* **49**: 706–718.
- Kong P, Lea-Cox JD, Moorman GW, Hong C, 2012. Survival of *Phytophthora alni*, *Phytophthora kernoviae*, and *Phytophthora ramorum* in a simulated aquatic environment at different levels of pH. *FEMS Microbiology Letters* **332**: 54–60.
- Kupferschmidt K, 2012. Attack of the Clones. *Science* **337**: 636–638.
- Marçais B, Bergot M, Pérarnaud V, Levy A, Desprez-Loustau M-L, 2004. Prediction and Mapping of the Impact of Winter Temperature on the Development of *Phytophthora cinnamomi*-Induced Cankers on Red and Pedunculate Oak in France. *Phytopathology* **94**: 826–831.

- Mundt C, Sackett K, Wallace L, Cowger C, Dudley J, 2009. Aerial Dispersal and Multiple-Scale Spread of Epidemic Disease. *EcoHealth* **6**: 546–552.
- Neri FM, Bates A, Füchtbauer WS, Pérez-Reche FJ, Taraskin SN, Otten W, Bailey DJ, Gilligan CA, 2011. The Effect of Heterogeneity on Invasion in Spatial Epidemics: From Theory to Experimental Evidence in a Model System. *PLoS Comput Biol* **7**: e1002174.
- Pritchard SG, 2011. Soil organisms and global climate change. *Plant Pathology* **60**: 82–99.
- Schumacher J, Leonhard S, Grundmann BM, Roloff A, 2006. New Alder disease in Spreewald biosphere reserve - causes and incidental factors of an epidemic. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* **58**: 141–147.
- Shaw MW, Bearchell SJ, Fitt BDL, Fraaije BA, 2008. Long-term relationships between environment and abundance in wheat of *Phaeosphaeria nodorum* and *Mycosphaerella graminicola*. *New Phytologist* **177**: 229–238.
- Shearer B, Dillon M, Kinal J, Buehrig R, 2010. Temporal and spatial soil inoculum dynamics following *Phytophthora cinnamomi* invasion of *Banksia* woodland and *Eucalyptus marginata* forest biomes of south-western Australia. *Australasian Plant Pathology* **39**: 293–311.
- Shearer BL, Shea SR, 1987. Variation in seasonal population fluctuations of *Phytophthora cinnamomi* within and between infected *Eucalyptus marginata* sites of southwestern Australia. *Forest Ecology and Management* **21**: 209–230.
- Shishkoff N, 2011. A Test System to Quantify Inoculum in Runoff from *Phytophthora ramorum*-Infected Plant Roots. *Phytopathology* **101**: 1457–1464.
- Stenlid J, Oliva J, Boberg JB, Hopkins AJM, 2011. Emerging Diseases in European Forest Ecosystems and Responses in Society. *Forests* **2**: 486–504.
- Streito JC, Legrand P, Tabary F, Villartay GJD, 2002. *Phytophthora* disease of alder (*Alnus glutinosa*) in France: investigations between 1995 and 1999. *Forest Pathology* **32**: 179–191.
- Thoirain B, Husson C, Marçais B, 2007. Risk factors for the *Phytophthora*-induced decline of Alder in Northeastern France. *Phytopathology* **97**: 99–105.
- Vercesi A, Toffolatti S, Zocchi G, Guglielmann R, Ironi L, 2010. A new approach to modelling the dynamics of oospore germination in *Plasmopara viticola*. *European Journal of Plant Pathology* **128**: 113–126.
- Zhang Y, Pu Z, Qin Z, Zhou X, Liu D, Dai L, Wang W, 2012. A Study on the Overwintering of Cucumber Downy Mildew Oospores in China. *Journal of Phytopathology* **160**: 469–474.

**Table 1. Characteristics of NE France sites surveyed in this study**

Village (Region)	Geographical coordinates		River	First year of notation	Number of alders sampled	Initial disease prevalence (%)
	North	East				
Blamont (Meurthe-et-Moselle)	48.59141	6.85515	Vesouze	2006	135	21.0
Ars-sur-Moselle (Moselle)	49.06228	6.07359	Moselle	2007	42	41.0
Autrey (Vosges)	48.28275	6.69675	Mortagne	2007	76	45.7
Blies-Guersviller (Moselle)	49.14585	7.08183	Blies	2007	91	75.0
Damelevières (Meurthe-et-Moselle)	48.56322	6.38562	Meurthe	2007	62	56.7
Eloyes (Vosges)	48.0904	6.60883	Moselle	2007	45	58.1
Moulin-de-Hesse (Moselle)	48.69272	7.02598	Sarre	2007	331	58.9
Perrey (Vosges)	48.23383	6.37305	Avière	2007	58	90.2
Pierre-la-Treiche (Meurthe-et-Moselle)	48.6457	5.93439	Moselle	2007	131	43.2
Le Syndicat (Vosges)	48.0223	6.68558	Moselotte	2007	83	72.4
Budange (Moselle)	49.27867	6.34145	Canner	2008	73	30.0
Frapelle (Vosges)	48.28056	7.05271	Fave	2008	97	65.2
Haguenau (Bas-Rhin)	48.79844	7.83169	Moder	2008	101	48.4
Keskastel (Bas-Rhin)	48.96489	7.03529	Sarre	2008	59	86.5
Mignéville (Meurthe-et-Moselle)	48.53708	6.7787	Blette	2008	50	72.3
Niedermodern (Bas-Rhin)	48.84756	7.63157	Moder	2008	110	53.1



**Table 2.** Parameters of the fitted model

<b>Parameter</b>	<b>mean</b>	<b>sd</b>	<b>2.5%</b>	<b>97.5%</b>	<b>Rhat n.</b>
$\beta_1$	24.80	5.29	14.8	35.1	1.096
$\beta_2$	0.43	0.17	0.11	0.32	1.064
$\beta_3$	-1.46	0.26	-1.96	-0.98	1.129
$\gamma_1$	-4.52	1.63	-7.71	-1.33	1.004
$\gamma_2$	-0.46	0.07	-0.59	-0.33	1.014
$\gamma_3$	-0.41	0.05	-0.50	-0.32	1.017
$\gamma_4$	0.31	0.08	0.16	0.47	1.009
$\mu_{nd}$	0.005	0.001	0.003	0.008	1.004
$\mu_1$	-4.76	0.41	-5.80	-4.01	1.091
$\mu_2$	0.23	0.10	0.10	0.41	1.059
$\delta$	0.019	0.002	0.016	0.022	1.000
$\alpha$	0.016	0.002	0.013	0.019	1.002
$\sigma$	0.98	0.27	0.55	1.64	1.124

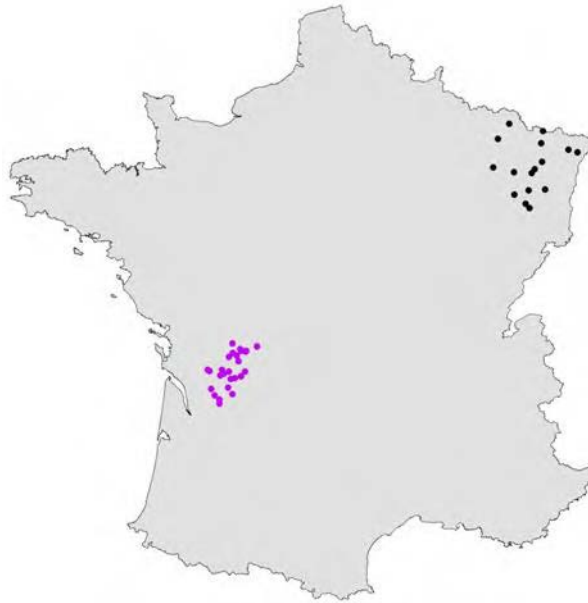
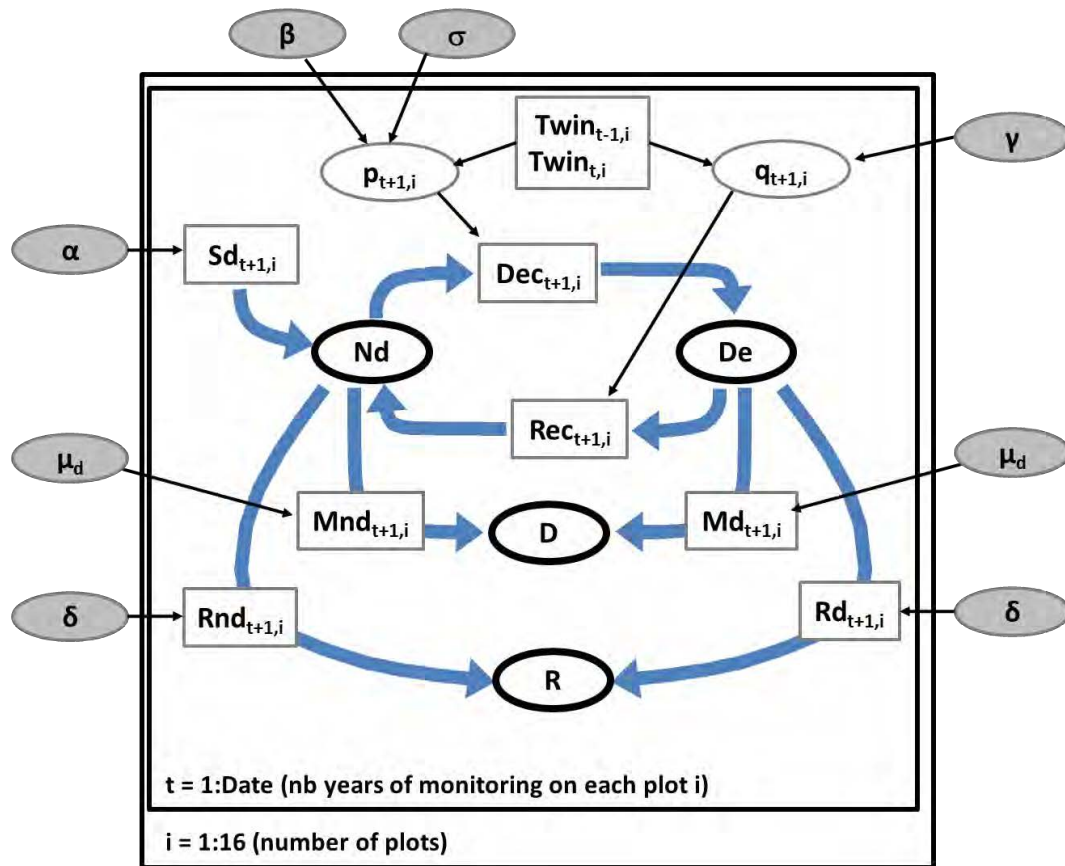
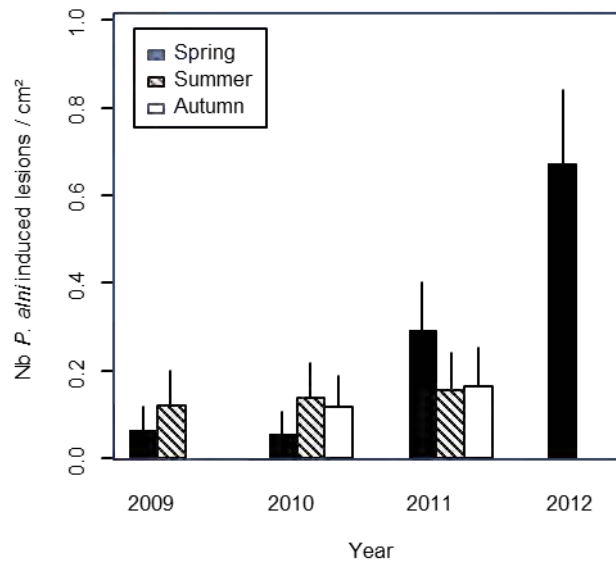


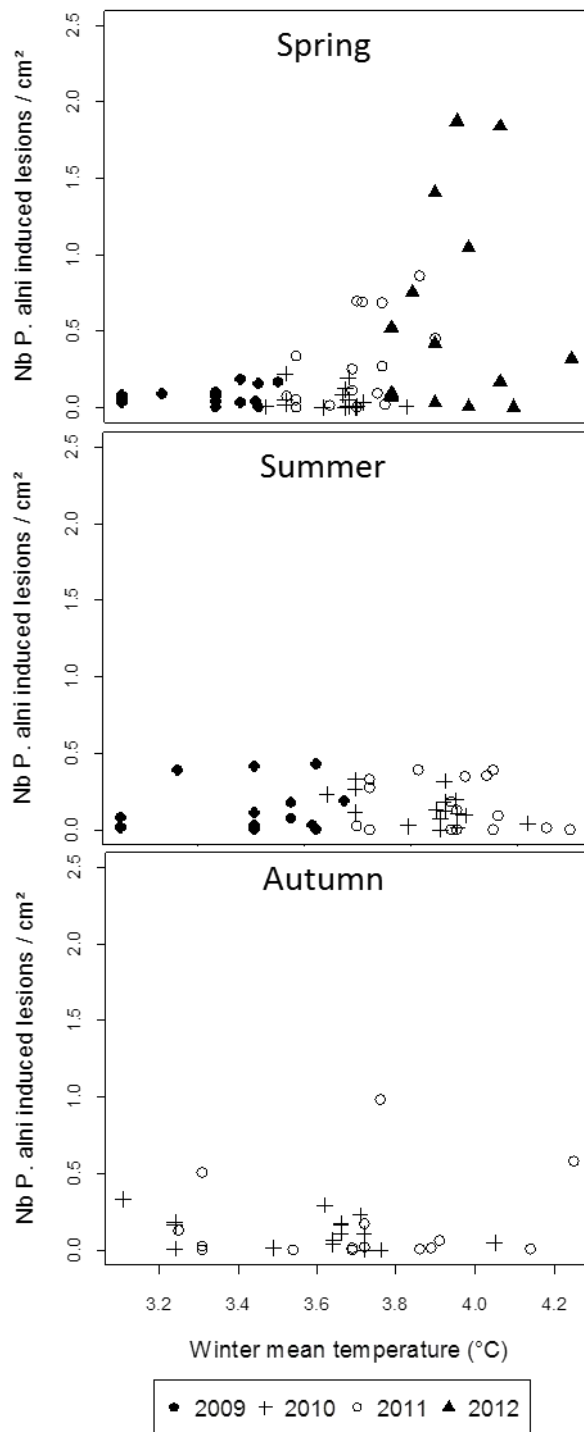
Fig.1. Localisation of studied plots. Black, plots monitored for the 2006-12 period and used to develop the model. Pink, plots monitored by the Département de la Santé des Forêts for the 1998-03 period and used for model testing.



**Fig. 2.** Model used to estimate dynamic of *P. alni* induced alder decline on the monitored plots. The model encompasses 4 compartments i.e. non-declining (Nd), declining (De), dead (D) and removed (R) trees. Transitions between the compartments are  $Dec_{t+1}$ , trees healthy in year  $t$  that decline the following year,  $Rec_{t+1}$ , declining trees that recover in year  $n+1$ ,  $Mnd_{t+1}$  and  $Md_{t+1}$ , respectively non-declining and declining tree that died in year  $t+1$ ,  $Rnd_{t+1}$  and  $Rd_{t+1}$ , respectively non-declining and declining tree that disappeared in year  $t+1$  and  $Sd_{t+1}$ , the number of new seedlings arriving on the plot in year  $t+1$ . Model parameters are  $p_{t+1,i}$  and  $q_{t+1,i}$ , respectively the decline and recovery rate that both depends on mean winter temperature of the 2 previous years ( $Twin_{t-1}$  and  $Twin_{t-2}$ ),  $\alpha$ , the rate of arrival on the plots of new seedlings,  $\mu$ , the mortality rate for declining ( $\mu_d$ ) and non-declining trees ( $\mu_{nd}$ ) and  $\delta$ , the rate at which both declining and non-declining trees disappears. The decline rate,  $p_{t+1,i}$  additionally depends on a site effect.



**Fig. 3.** Evolution of *P. alni* inoculum in the soil at the base of alder trees. Soil inoculum is estimated by baiting on rhododendrons leaves (6 trees per sites at each date)



**Fig. 4.** Relationship between *P. alni* inoculum in the soil at the base of alder trees in the 3 sampling seasons and mean temperature of the previous winter. Soil inoculum is estimated by baiting on rhododendrons leaves (6 trees per sites at each date)

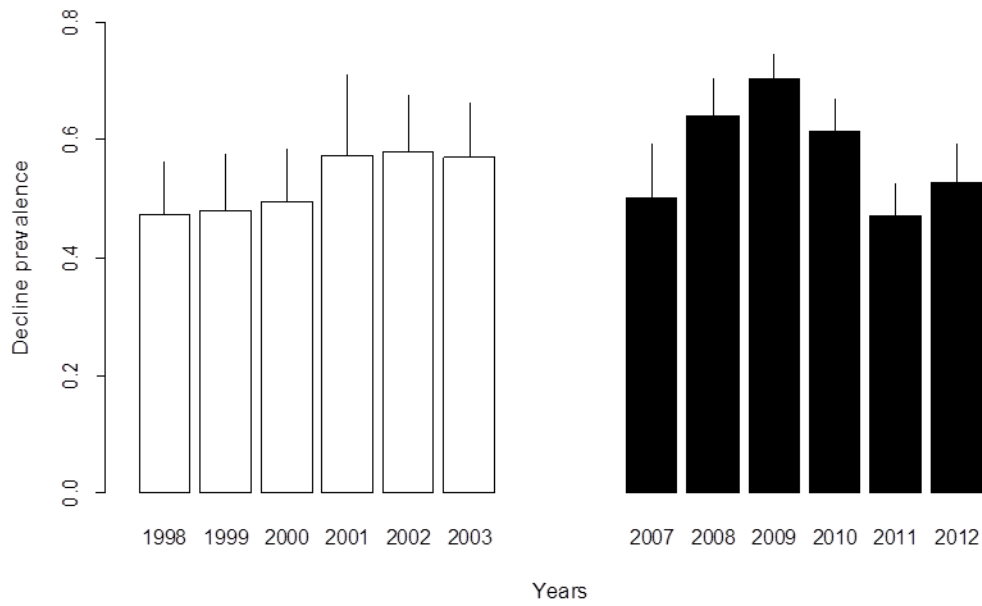


Fig.5. Annual evolution of Alder decline prevalence on the 2 monitored plots networks. Empty bars, network of the Charente area, located in SW France, solid bars, network of the Rhin-Meuse area, located in NE France.

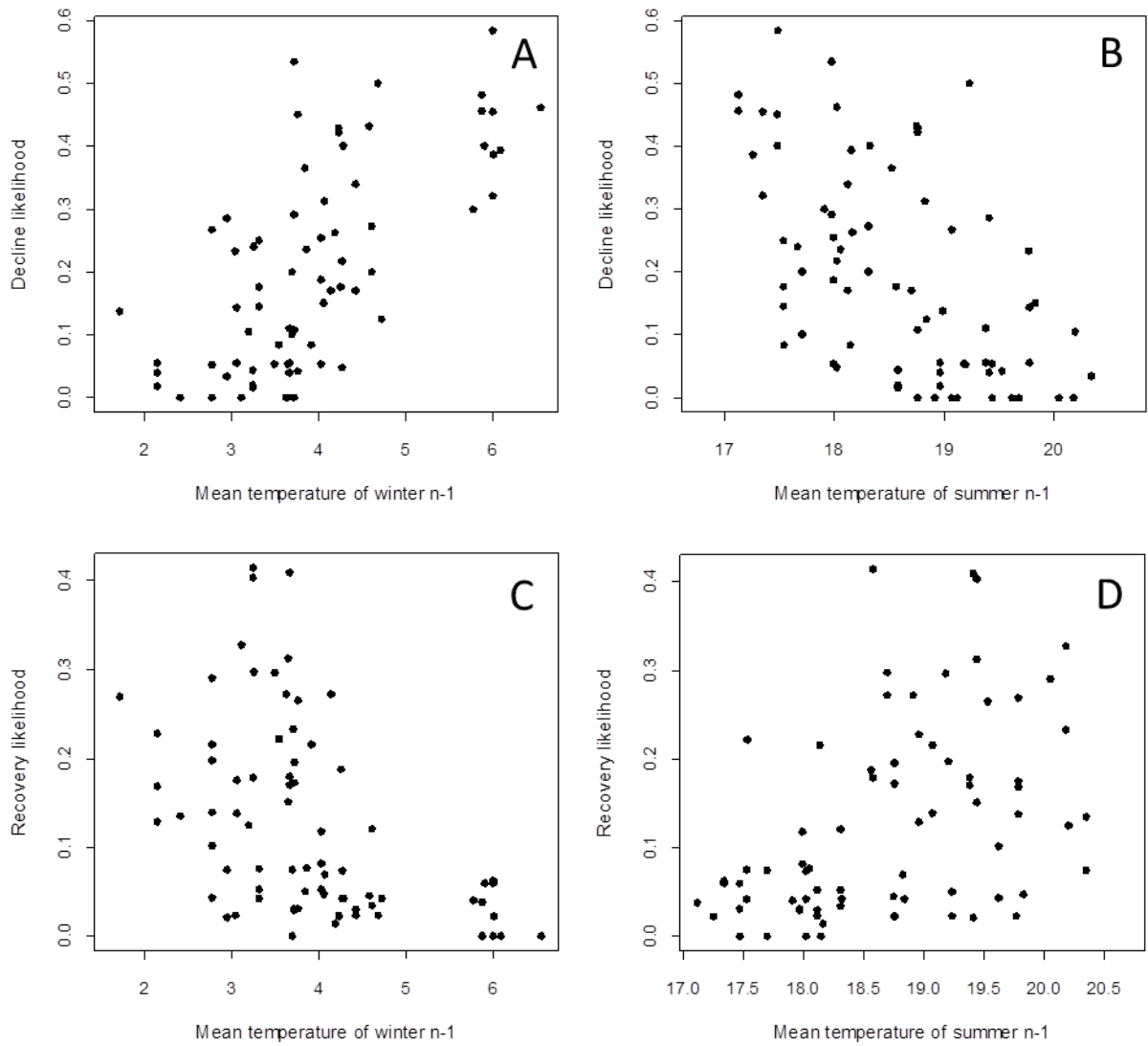


Fig.6. Decline and recovery of alders on the monitored plots in relation with temperature of the previous winter (A and C, November to March) or previous summer (B and D, July to August). Because trees were rated very early in the season, there is a one year-lag in the influence of temperature on tree crown status.

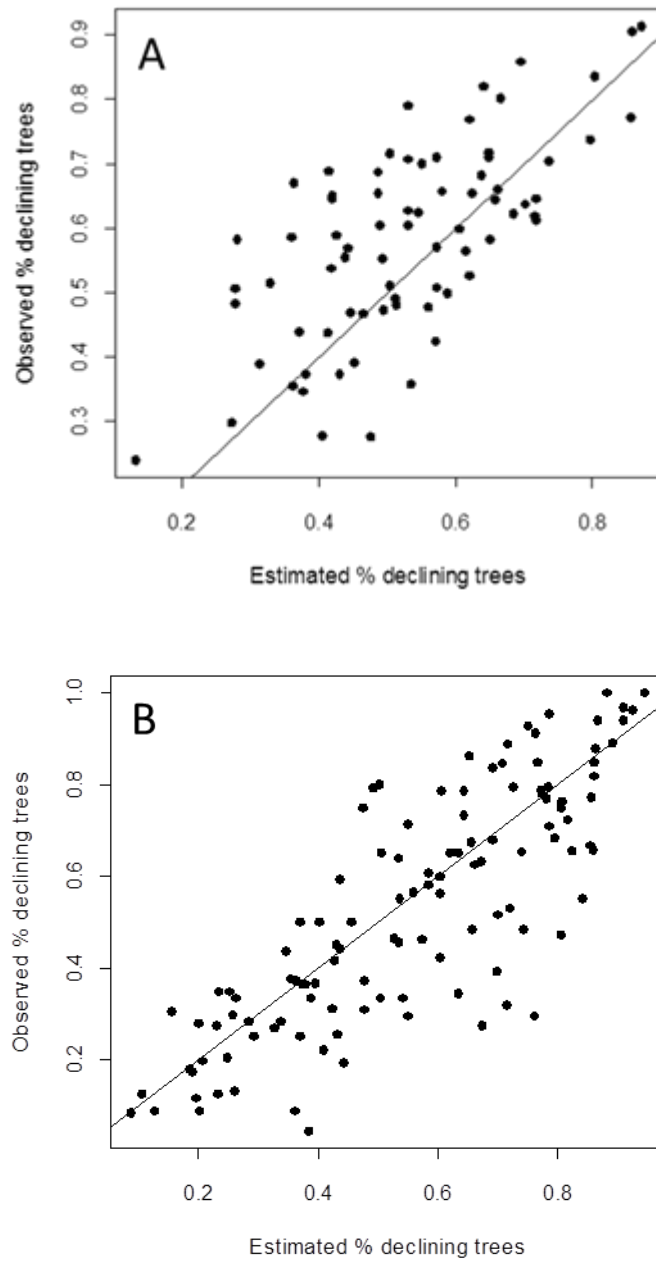


Fig.7. Output of the modified SIR model: predicted and observed annual decline prevalence for the construction data set (A, 16 plots from NE France) and cross-validation data set (B, 26 plots from SW France).



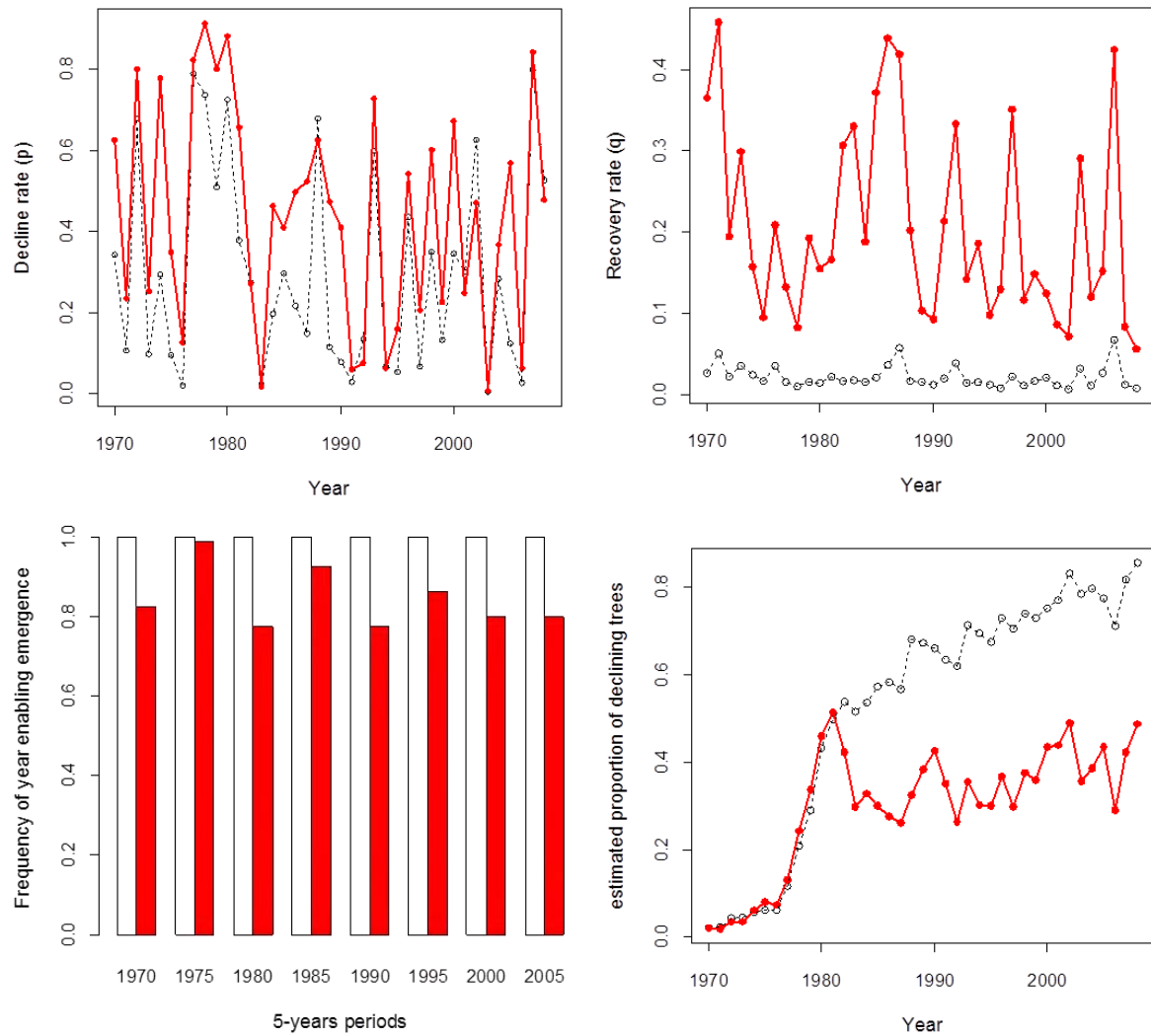


Fig.8. Simulation of the retrospective evolution of alder decline for the 38 monitored sites (16 in NE France and 22 in SW France). Black empty symbols, Charente area, Red filled symbols, Rhin-Meuse area. A. Annual evolution of the decline rate  $p$ . B. Annual evolution of the recovery rate  $q$  (B). C. Frequency of years that enable an increase in the decline prevalence for 5-years period. D. simulated evolution of the decline prevalence for the 1970-08 period. For each simulation period, an alder stand with 200 trees among which one is declining is used as initial conditions and estimates the evolution of decline prevalence from winter means temperatures according to model presented in figure 2.

## **Titre : Étude des conditions de l'émergence de *Phytophthora alni* sur l'aulne glutineux**

Depuis les années 1990, l'aulne glutineux, espèce clé des ripisylves, est affecté par un oomycète qui cause son dépérissement : *Phytophthora alni* subsp. *alni* (*Paa*). La genèse de *Paa* est liée à un événement d'hybridation interspécifique entre deux espèces proches, improprement nommées *P. alni* subsp. *uniformis* (*Pau*) et *P. alni* subsp. *multiformis* (*Pam*), car initialement considérées comme des variants de *Paa*. L'objectif de cette thèse était d'identifier les facteurs ayant pu jouer un rôle dans l'émergence de la maladie en Europe.

Par une approche de génétique des populations, nous avons montré que *Pau* est une espèce invasive en Europe, probablement originaire d'Amérique du Nord. Après son introduction, l'hybridation de *Pau* avec *Pam* serait l'un des facteurs essentiels de l'apparition de *Paa*. Nos résultats confirment que *Paa* aurait été généré suite à des hybridations récurrentes, qui ont structuré géographiquement les populations en Europe. L'analyse de la variabilité génétique de *Paa*, révélée par des marqueurs microsatellites, a toutefois montré un faible polymorphisme, avec un génotype dominant largement répandu en Europe.

Par ailleurs grâce à la modélisation, nos résultats ont établi que le dépérissement du houppier des aulnes est lié à la température. En particulier l'incidence de la maladie augmente lors des hivers doux, qui pourraient favoriser la survie du mycélium de *Paa*, celui-ci ne présentant pas de structure de survie hivernale (chlamydospores ou oospores). La température estivale joue également un rôle, plus complexe à interpréter. On constate en effet que l'incidence de la maladie diminue avec l'augmentation des températures estivales, mais ce phénomène pourrait dépendre d'autres facteurs tels que l'état physiologique des arbres ou le type de communautés microbiologiques présentes dans les sols. Inversement, le phénomène de guérison des arbres est favorisé par des températures hivernales basses et par des températures estivales élevées. L'émergence de la maladie ne peut pas être expliquée par le changement climatique. Cependant, une augmentation des températures hivernales dans le futur dans le cadre du changement climatique aggraverait très probablement l'épidémie.

**Mots clés :** maladies émergentes, changement climatique, hybridation interspécifique, épidémiologie, génétique des populations, *Phytophthora alni*.

## **Title: Study of the emerging conditions of the alder decline pathogen *Phytophthora alni***

Since the early 1990's alder decline caused by the oomycete *Phytophthora alni* subsp. *alni* (*Paa*) is one of the most important threats to riparian ecosystems in Europe. The emergence of *Paa* is related to an interspecific hybridization event between two related species -initially considered as *Paa* variants- misnamed as *Phytophthora alni* subsp. *uniformis* (*Pau*) and *Phytophthora alni* subsp. *multiformis* (*Pam*). The objective of this thesis was to identify the factors that may have contributed to the emergence of the disease in Europe.

Following a population genetics approach we showed that *Pau* is likely to be an invasive species in Europe, probably native to North America. Its introduction would have enabled hybridization with *Pam* and, consequently be a major cause on the emergence of *Paa*. Our results confirm that *Paa* has arisen from several hybridization events, which have geographically structured its European populations. *Paa*'s genetic variability, revealed by microsatellite markers, showed low levels of polymorphism, with a dominant genotype scattered throughout Europe.

In addition, a modelling approach revealed that alders' crown decline is linked to temperature. In particular, the disease incidence increases during mild winters which favours mycelium survival as *Paa* does not produce resistant spores (chlamydospores or oospores). The effect of summer temperatures is more complex to explain. Disease incidence decreases when summer temperatures are higher, but this phenomenon can also be linked to the physiological conditions of trees or changes in soil microbiological communities. Conversely, tree recovery is favoured by lower winter and higher summer temperatures. Climate change does not explain the emergence of the disease. However, increases in winter temperatures due to climate change may strengthen the epidemic.

**Keywords:** emerging diseases, climate change, interspecific hybridization, epidemiology, population genetics, *Phytophthora alni*.