

DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE DES POPULATIONS DE PARASITES DES PLANTES : STRUCTURE DES POPULATIONS ET ANALYSE DE LA DIVERSITÉ

Maurice LOURD

ORSTOM, laboratoire de phytopathologie tropicale, Montpellier

Résumé

La diversité génétique des microorganismes phytopathogènes est le résultat d'une longue coévolution entre les plantes et leurs parasites. La capacité à surmonter les résistances sélectionnées chez les plantes cultivées, la rapidité d'adaptation aux contraintes naturelles (variations climatiques) ou induites dans l'agrosystème (la résistance aux fongicides par exemple) sont, parmi d'autres, des indices de cette importante diversité génétique. Il est clair que la connaissance de la structure des populations d'agents pathogènes conditionne toute stratégie de prévision et de contrôle des maladies.

A partir de quelques exemples, nous essayerons de définir la structure des populations de champignons parasites en fonction de leur mode de reproduction. Cette analyse s'appuiera principalement sur la caractérisation des variations génétiques existant entre les individus d'une même population et l'évolution de ces variations dans l'espace et le temps. Parmi les nombreux marqueurs permettant d'évaluer la diversité génétique, nous évoquerons de façon succincte, les caractères morphologiques, les facteurs de virulence, les marqueurs isozymiques et moléculaires, et la compatibilité végétative.

*L'étude des populations de champignons phytopathogènes à partir de la compatibilité végétative comme mesure de la diversité est relativement récente. Elle a été surtout développée chez *Fusarium*, *Verticillium* et *Colletotrichum* par l'utilisation des mutants Nit (mutations affectant le métabolisme des nitrates) comme indicateurs de l'hétérocaryose. Nous analyserons successivement les méthodes mises en œuvre pour la caractérisation des groupes de compatibilité, la validité et les limites de ce marqueur dans l'étude de la structure des populations.*

Introduction

Les méthodes les plus couramment employées pour lutter contre les champignons parasites des cultures consistent à sélectionner des plantes résistantes ou à appliquer des produits fongicides. Malheureusement, les exemples de résistances génétiques contournées par les parasites ou d'apparition de souches résistantes aux fongicides sont innombrables. Cette faculté d'adaptation des microorganismes aux contraintes imposées par l'homme et par le milieu traduit leur importante flexibilité génétique. La rapidité de réaction des champignons aux pressions de sélection est le reflet d'un important polymorphisme des populations. De fait, la structure des populations et leur dynamique peuvent avoir une grande influence sur le développement des maladies.

Dans une perspective plus large de développement d'une agriculture durable et respectueuse des équilibres naturels, de nouvelles stratégies doivent être élaborées de façon à limiter, autant que possible, la pression de sélection sur les parasites, et développer de nouvelles formes de résistance génétique chez les plantes. Pour que celles-ci soient efficaces, il est indispensable de déterminer dans quelle mesure les populations parasites répondent aux contraintes agronomiques et quels sont les mécanismes qui sont générateurs de polymorphisme. C'est pourquoi, la connaissance de la structure des populations de parasites s'impose aussi bien pour la recherche de nouveaux facteurs de résistance que pour la mise en place de stratégies d'utilisation de ces résistances.

Cet exposé se propose d'analyser successivement les mécanismes qui sont source de variabilité génétique chez les champignons puis de faire un inventaire des principaux outils expérimentaux permettant d'évaluer le polymorphisme et de caractériser les populations.

Structure des populations d'agents pathogènes : les mécanismes générateurs de variabilité

La variabilité existant au sein des populations de champignons parasites peut être générée, maintenue ou modifiée par différents mécanismes. Il s'agit d'une part de mécanismes biologiques propres à ces microorganismes, tels que la reproduction sexuée, la parasexualité et la mutation, qui sont à l'origine de recombinaisons génétiques. Il s'agit, d'autre part, de pressions de sélection extérieures, induites par la plante-hôte, par le milieu, ou résultant de flux de gènes entre populations parasites, qui modifient la structure des populations en sélectionnant les caractères selon leurs aptitudes à se maintenir dans des conditions déterminées.

Quelques aspects de ces différents mécanismes, de leur contribution à la structure et à l'évolution des populations pathogènes seront successivement examinés.

La sexualité

Chez les champignons pathogènes, la sexualité, lorsqu'elle existe, peut présenter des caractéristiques extrêmement variées, c'est-à-dire être sous la dépendance de systèmes géniques plus ou moins complexes, selon qu'il s'agit de champignons homo ou hétérothalliques. Elle n'est donc pas toujours effective, et ses conséquences sur la structure des populations sont difficiles à évaluer, en particulier chez les champignons qui possèdent également une reproduction asexuée.

Les exemples suivants vont montrer qu'il n'est pas aisé de séparer les contributions respectives des deux types de reproduction à la structure des populations.

L'oïdium des céréales *Erysiphe graminis* présente une reproduction sexuée active dans la nature, mais également une phase conidienne importante durant l'épidémie. En prélevant des conidies et des ascospores sur orge de printemps, WELZ et KRANZ (1987) ont montré que la recombinaison sexuelle est responsable pour une part des changements intervenus dans la population de spores qui a initié l'épidémie d'automne. Ceci se traduit par une plus grande diversité des races et une plus faible proportion des races les plus communes dans les descendances sexuelles (figure 1). La prédominance du cycle asexuel pendant l'épidémie associée à la recombinaison sexuelle donne à l'oïdium de l'orge sa grande aptitude à s'adapter aux changements génétiques de l'hôte.

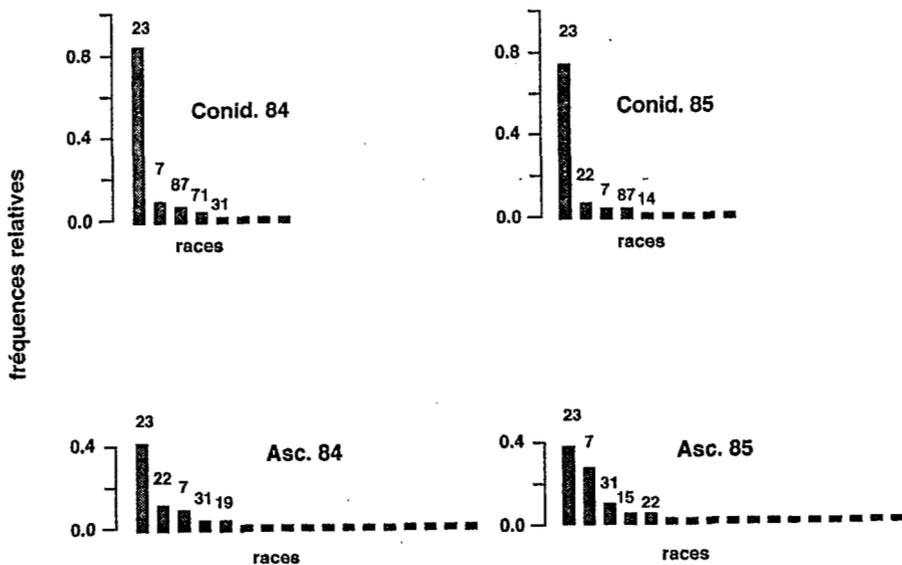


Figure 1

Fréquence des races de *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* dans un champ d'orge expérimental en Allemagne sur le cultivar Golden Promise :- à partir des conidies (Conid. 84 et Conid. 85); - à partir des ascospores (Asc. 84 et Asc. 85). (d'après WELZ & KRANZ, 1987).

Chez les rouilles hétérocycliques où le cycle sexuel et le cycle végétatif se déroulent sur des hôtes différents, donc au sein de populations différentes, il est plus aisé de séparer les effets de chacun des types de reproduction.

Chez *Puccinia graminis* f.sp. *tritici*, ROELFS et GROTH (1980) ont montré qu'une population sexuelle était plus polymorphe qu'une population exclusivement maintenue par urédospores. La première se caractérise par 23,5 % de diversité pour les facteurs de virulence alors que la seconde ne présente que 0,07 % de diversité pour les mêmes facteurs.

Les résultats sont à l'opposé dans le cas du *Braemia lactucae*, agent du mildiou de la laitue. Bien que les deux types de compatibilité sexuelle coexistent en Californie, le nombre de races identifiées dans les cultures de cette région est beaucoup plus limité qu'en Europe. La très faible diversité des facteurs de virulence suggère que la reproduction sexuelle ne joue pas de rôle significatif dans l'évolution des épidémies de cette région (LOTT *et al.*, 1987).

La reproduction sexuée peut donc intervenir de façon extrêmement variable selon les microorganismes et les conditions dans lesquelles se développe la maladie.

La parasexualité

Si le mécanisme de la parasexualité est bien connu, et depuis longtemps chez des champignons comme *Aspergillus*, *Penicillium* ou *Podospora* (PONTECORVO, 1956), son rôle effectif dans la recombinaison génétique des caractères de pathogénie a été plus difficile à mettre en évidence chez les champignons parasites.

Dès 1969, TINLNE et MCNEILL évoquent l'existence de l'hétérocaryose et de recombinaisons mitotiques pour les facteurs de virulence chez *Cochliobolus sativus*, *Glomerella cingulata*, *Leptosphaeria maculans*, etc. Cependant, tous les recombinants obtenus résultent de manipulations de laboratoire passant par la fabrication de mutants auxotrophes et la formation d'hétérocaryons forcés. En conditions naturelles, il est beaucoup plus difficile d'identifier les recombinants issus de parasexualité, faute de marquage spécifique et il n'existe pratiquement pas d'exemple où le rôle de celle-ci ait été clairement démontré.

SHAW (1991) admet cependant que la parasexualité reste l'hypothèse la plus satisfaisante pour expliquer l'importante variation des facteurs de virulence observée dans les populations de *Phytophthora infestans* du type A1. Elle constitue très certainement un mécanisme de recombinaison privilégié chez les champignons pathogènes dépourvus de reproduction sexuelle connue.

Les mutations

Le taux de mutation chez les champignons pathogènes, dans les conditions naturelles, n'est pas connu de façon très précise car rares sont les études conduites sur ce sujet. Les mutations aux loci de virulence, évaluées en laboratoire, peuvent varier de 10^{-3} chez *Puccinia coronata* à 10^{-6} chez *Melampsora lini* (FLOR, 1958). D'une manière

générale, on admet que le taux de mutation moyen chez les eucaryotes est de l'ordre de 10^{-6} . Cette valeur est loin d'être négligeable, considérée sur l'ensemble des loci. L'accumulation des mutations chez un champignon parasite est donc considérable à l'échelle de temps d'un cycle cultural de la plante-hôte. La mutation constitue certainement une importante source de variabilité génétique dans les populations de microorganismes parasites. C'est d'ailleurs l'hypothèse retenue par BURDON *et al.* (1983) pour expliquer les variations de pouvoir pathogène chez les rouilles du blé en Australie.

La pression de sélection due à l'hôte

Les changements induits dans les populations parasites par la plante-hôte seront analysés de façon détaillée dans l'exposé de C. POPE de VALLAVIEILLE qui traitera des « effets épidémiologiques de la structure génétique des populations-hôtes ».

Les flux géniques liés aux migrations

Les flux géniques sont extrêmement importants chez les champignons pathogènes, soit du fait de la migration des propagules emportées par le vent, ou par tout autre véhicule naturel, soit du fait de migrations provoquées par l'homme. Ces flux conditionnent la dispersion de nouveaux facteurs de virulence ou de caractères de résistance aux fongicides entre les populations parasites. Il est indispensable d'en connaître les mécanismes et la portée avant d'entreprendre un programme de sélection des plantes pour la résistance.

Les migrations naturelles constituent un phénomène courant chez les champignons parasites des parties aériennes des plantes. Lorsque des spores sont produites, leur dispersion s'effectue par le vent, l'eau, ou les insectes dans les cas les plus fréquents. Les flux géniques sont donc permanents et concernent des populations plus ou moins éloignées selon le mode de dissémination. Les exemples les plus représentatifs de migrations sur grandes distances sont ceux des rouilles des céréales en Amérique du Nord où l'on assiste à de grands mouvements épidémiques du sud vers le nord avec la réinstallation de la maladie, chaque année au printemps, sur le blé canadien à partir d'inoculum venant de la prairie américaine. Des flux géniques importants et permanents s'établissent ainsi entre les différentes populations du champignon distribué sur un vaste territoire.

La graphiose de l'orme est un exemple caractéristique de pandémie dans laquelle l'homme a joué un rôle de vecteur. La maladie a connu deux phases bien distinctes : la première entre 1920 et 1940 qui correspond au passage de la maladie de l'Europe vers l'Amérique du Nord, caractérisée par des souches peu agressives de *Ophiostoma ulmi*; la seconde, récente, correspond à la diffusion en Amérique, Europe et Asie de deux nouvelles races plus agressives du parasite qui semblent prendre progressivement la place des anciennes.

Les données analysées par BRASIER (1988) sur la progression de l'épidémie au Portugal montrent clairement le changement de structure des populations entre deux localités, l'une Tomar étant au front de l'épidémie tandis que l'autre, Mafra, représente le front de la vague épidémique antérieure (tableau 1). Les résultats montrent l'uniformité du front de l'épidémie constitué essentiellement de souches très agressives qui appartiennent à un super groupe de compatibilité végétative (SVCG). Ils montrent, d'autre part, la diversification de la population en arrière du front (Mafra) caractérisée par l'apparition de nouveaux groupes de compatibilité végétative, associés au type A de compatibilité sexuelle. On assiste à un passage progressif de populations à structure clonale prédominante au front de l'épidémie, à des populations hétérogènes, issues de reproduction sexuée, en arrière des épidémies.

Tableau 1. Comparaison entre deux populations de *Ophiostoma ulmi* correspondant à des épidémies successives de graphiose de l'orme dans la région de Lisbonne (d'après BRASIER, 1988)

Origine des isolats (1)	Population Tomar Epidémie 1986		Population Mafra Epidémie 1985	
	Rameaux (parasite)	Écorce (saprophyte)	Rameaux (parasite)	Écorce (saprophyte)
Nombre de souches	59	150	57	102
SVCG	93 %	64 %	37 %	9 %
VCG autres	3	9	21	52
Type sexuel A	4	5	0	33

(1) Tous les échantillons ont été prélevés en octobre 1986.

Chez le mildiou de la pomme de terre, on observe, comme dans le cas précédent, deux vagues de migration très espacées dans le temps. La plus récente concerne la propagation, à travers le monde, du type A2 de compatibilité sexuelle du *Phytophthora infestans* qui était jusqu'alors confiné à quelques vallées isolées du Mexique central (tableau 2). L'analyse de la structure des populations européennes de *Phytophthora* par les marqueurs isozymiques (tableau 3) ou les facteurs de virulence (tableau 4) montre que cette migration s'accompagne d'une substitution progressive des populations anciennes par de nouvelles.

Il apparaît donc que les flux de gènes jouent un rôle très important dans la structure et l'évolution des populations, bien que les échanges de matériel génétique ne soient pas une règle entre individus des anciennes et des nouvelles populations.

Analyse de la diversité

Un grand nombre de marqueurs phénotypiques et génotypiques permettent de caractériser les champignons pathogènes et d'évaluer la diversité génétique au sein des populations. Pour la plupart, il s'agit de caractères descriptifs qui conduisent à évaluer le polymorphisme. Les méthodes nouvelles qui portent sur l'étude du génome permettent, quant à elles, de procéder à une analyse génétique des populations.

Les marqueurs morphologiques

Les caractères morphologiques ont été longtemps utilisés pour identifier les champignons pathogènes et pour comparer des isolats de différentes origines. Leur analyse présente plusieurs inconvénients majeurs dont le premier est qu'elle est limitée aux microorganismes qui peuvent être cultivés sur milieu synthétique. D'autre part, ces caractères sont extrêmement variables chez de nombreux champignons (*Colletotrichum*, *Fusarium*, etc.), ce qui limite la portée de leur signification dans la détermination des structures de populations. Enfin et d'une manière générale, ces caractères ne peuvent pas faire l'objet d'une analyse génétique précise, les gènes impliqués dans leur expression étant beaucoup trop nombreux. Quelques exceptions toutefois : certains de ces caractères sont sous la dépendance de systèmes géniques simples, comme des mutants colorés chez les rouilles ou les oïdium, et peuvent faire l'objet d'une analyse génétique. Ils ne présentent cependant qu'un intérêt limité compte tenu de leur faible fréquence d'apparition.

Tableau 2. Liste de pays dans lesquels la présence du type sexué A2 de *Phytophthora infestans* a été détecté, avec la date de détection (tiré de DRENTH *et al.*, 1993)

Pays	Année	Référence
Mexique	1956	NIEDERHAUSER, 1956
Allemagne de l'Est	1980	DAGGET <i>et al.</i> , 1993
Suisse	1981	HOHL & ISELIN, 1984
Angleterre/Pays de Galles	1981	TANTIUS <i>et al.</i> , 1986
Pays-Bas	1981	FRINKING <i>et al.</i> , 1987
Ecosse	1983	MALCOMSON, 1985
Israël	1983	GRINBERGER <i>et al.</i> , 1989
Egypte	1984	SHAW <i>et al.</i> , 1985
Suède	1985	KADIR & UMAERUS, 1987
URSS	1985	VOROB'EVA <i>et al.</i> , 1991
Japon	1985	MOSA <i>et al.</i> , 1989
Allemagne de l'Ouest	1985	SCHÖBER & RULICH, 1986
Brésil	1986	BROMMONSCHENKEL, 1988
USA	1987	DEALH <i>et al.</i> , 1991
Pologne	1988	SPELMAN <i>et al.</i> , 1991
Irlande	1988	O'SULLIVAN & DOWLEY, 1991
Canada	1989	DEALH <i>et al.</i> , 1991
Equateur	1989	FRY <i>et al.</i> , 1993
Colombie	1990	FRY <i>et al.</i> , 1993
Bolivie	1990	S.B. GOODWIN, non publié
Corée	1991	Y.J. KOH, non publié
Chine	?	FRY <i>et al.</i> , 1993

Tableau 3. « Ancien » et « nouveaux » ⁽¹⁾ génotypes de *Phytophthora infestans* en Europe Occidentale (tiré de SPIELMAN *et al.*, 1991)

	Gpi - 1	Pep - 1	Type sexué
Ancienne population	86/100	92/100	A1
	86/100	100/100	A1
	100/100	92/92	A1
	100/100	92/100	A1
Nouvelle population	90/100	83/100	A1 ou A2
	90/100	100/100	A1 ou A2
	100/100	83/100	A1 ou A2
	100/100	100/100	A1 ou A2

Les « anciens » génotypes sont ceux détectables avant la dissémination du type sexué A2 hors du Mexique.

Les « nouveaux » génotypes sont ceux qui ont apparemment déplacé les anciens génotypes en Europe.

Tableau 4. Complexité des virulences d'isolats de *Phytophthora infestans* aux Pays-Bas en 1970, 1971, et en 1989 (tiré de SPIELMAN *et al.*, 1991).

Année d'isolement	Nombre d'échantillons	Nombre de pathotypes	Nombre maximal de facteurs de virulence	Source
1989	39	20	7	A. Drenth, non publié
1971	20	4	3	Mooi, 1971
1970	13	4	3	Mooi, 1971
1970 + 1971	33	4	3	Mooi, 1971

Les caractères de virulence

La virulence est le marqueur le plus largement utilisé pour caractériser les champignons pathogènes, la méthode la plus simple étant l'inoculation sur une gamme d'hôtes portant différents facteurs de résistance. Plus le nombre de gènes de résistance identifiés est important, plus le potentiel de caractérisation des facteurs de virulence est grand et plus l'analyse de la structure pathogénique de la population étudiée sera précise. Chez la rouille du lin *Melampsora lini*, on connaît actuellement 24 loci d'aviorulence, soit la capacité potentielle de détecter 16×10^6 génotypes différents pour les caractères de virulence.

Toutefois, un des inconvénients majeurs de ce marqueur est qu'il ne peut être utilisé que dans le cas de relations hôte/parasite de type gène-pour-gène, connues et identifiées (tableau 5). Et même dans ces cas, il n'est pas toujours possible de disposer d'hôtes différentiels permettant de caractériser tous les facteurs d'aviorulence. L'analyse se trouve donc être restreinte à quelques gènes qui ne donneront pas nécessairement une bonne évaluation du niveau de polymorphisme au sein de la population étudiée.

Tableau 5. Couples plantes/parasites avec interaction gènes pour gènes.

<i>Avena</i>	C*	<i>Helminthosporium victoriae</i>
<i>Avena</i>	C	<i>Puccinia graminis avenae</i>
<i>Avena</i>	C	<i>Ustilago avenae</i>
<i>Coffea</i>	C	<i>Hemileia vastatrix</i>
<i>Gossypium</i>	B*	<i>Xanthomonas malvacearum</i>
<i>Helianthus</i>	C	<i>Puccinia helianthi</i>
<i>Hordeum</i>	C	<i>Erysiphe graminis hordei</i>
<i>Hordeum</i>	N*	<i>Heterodera avenae</i>
<i>Hordeum</i>	C	<i>Ustilago hordei</i>
<i>Linum</i>	C	<i>Melampsora lini</i>
<i>Lycopersicon</i>	C	<i>Cladosporium fulvum</i>
<i>Malus</i>	C	<i>Venturia inaequalis</i>
<i>Oryza</i>	C	<i>Pyricularia oryzae</i>
<i>Oryza</i>	I*	<i>Orseolia oryzae</i>
<i>Phaseolus</i>	C	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>
<i>Phaseolus</i>	V*	Common Bean Mosaic Virus
<i>Solanum</i>	N	<i>Heterodera rostochiensis</i>
<i>Solanum</i>	C	<i>Phytophthora infestans</i>
<i>Solanum</i>	C	<i>Synchytrium endobioticum</i>
<i>Triticum</i>	C	<i>Erysiphe graminis tritici</i>
<i>Triticum</i>	I	<i>Mayetiola destructor</i>
<i>Triticum</i>	C	<i>Puccinia graminis tritici</i>
<i>Triticum</i>	C	<i>Puccinia recondita</i>
<i>Triticum</i>	C	<i>Puccinia striiformis</i>
<i>Triticum</i>	C	<i>Tilletia caries</i>
<i>Triticum</i>	C	<i>Tilletia controversa</i>
<i>Triticum</i>	C	<i>Ustilago tritici</i>

* C : champignon, B : bactérie, N : nématode, I : insecte, V : virus.

La compatibilité végétative

La compatibilité végétative représente l'aptitude de deux thalles d'origine différente à former un hétérocaryon stable, en dehors de toute compatibilité sexuelle. Chez les champignons dépourvus de reproduction sexuée, c'est la phase initiale à la réalisation de la parasexualité.

Les systèmes géniques qui gouvernent la compatibilité végétative ont été étudiés chez plus de 20 genres de champignons, dont de nombreux parasites de plantes (LESUE, 1993). Les systèmes les plus simples sont ceux chez lesquels la compatibilité est dite allélique. Deux individus sont compatibles s'ils possèdent les mêmes allèles à tous les loci de compatibilité (gènes vic). Ceux-ci peuvent être plus ou moins nombreux, selon les espèces. Par exemple, 8 gènes vic ont été identifiés chez *Aspergillus nidulans* et 7 chez *Cryphonectria parasitica*. Comme ces gènes sont multialléliques, il existe un grand nombre de groupes de compatibilité végétative (GCV) dans les populations naturelles de champignons pathogènes. La compatibilité végétative est donc un marqueur intéressant pour déterminer le niveau de polymorphisme des populations.

Dans la pratique, les progrès réalisés dans l'utilisation de la compatibilité végétative pour l'étude des populations de champignons pathogènes résultent essentiellement de l'emploi des mutants « nit » comme marqueurs de l'hétérocaryose, technique rapide et facile à mettre en œuvre.

● *Les bases méthodologiques pour la caractérisation des groupes de compatibilité végétative*

Le principe de la méthode de caractérisation des hétérocaryons est simple : il consiste à confronter, sur milieu minimum, deux mutants déficients nutritionnels affectés à des loci différents. L'hétérocaryose, quand elle se réalise, permet la complémentation des déficiences; le mycélium hétérocaryotique présente donc un phénotype sauvage sur le milieu minimum.

L'utilisation des mutants déficients dans la chaîne métabolique de l'azote nitrique, ou mutants nit, est la méthode qui a permis de passer à une échelle d'analyse beaucoup plus importante.

A partir de culture sur milieu à base de chlorate, il est aisé d'obtenir des mutants chlorate-résistants dont au moins trois sont parfaitement identifiables. Il s'agit des mutants nit1, nit3 et nitM. Les premiers sont affectés au gène de structure de la nitrate réductase; les mutants nit3 portent une mutation qui affecte un gène de régulation; les mutants nit M sont affectés (plusieurs loci sont en jeu) au niveau de la biosynthèse d'un cofacteur à molybdène qui active la nitrate réductase.

Trois sources d'azote différentes, le nitrate, l'hypoxanthine et le nitrite sont nécessaires pour caractériser les mutants. Il suffit ensuite de les confronter sur milieu minimum pour mettre en évidence l'hétérocaryon. Toutefois, les confrontations doivent toujours mettre en présence un mutant nit M, considéré comme testeur, pour assurer le succès de la complémentation en cas de compatibilité (tableau 6). Tous les isolats capables de former un hétérocaryon en confrontation appartiennent à un seul et même groupe de compatibilité (GCV). Cette caractéristique mise en évidence par Leslie chez *Fusarium* donne évidemment toute sa valeur à la compatibilité végétative comme marqueur de la diversité génétique.

Tableau 6. Réactions de complémentation entre mutants « nit » chez *Fusarium oxysporum* (d'après CORELL *et al.*, 1987)

	nit 1	nit 3	nit M
nit 1	(-) ou (+/-) *	(-) ou (+/-)	(+)
nit 3	(-) ou (+/-)	(-)	(+)
nit M	(+)	(+)	(+) ou (-)

* Réaction intermédiaire, la complémentation n'est pas nettement caractérisée.

- *Les GCV marqueurs de polymorphisme*

Parmi les principaux genres de champignons phytopathogènes chez lesquels les GCV ont été recherchés, on peut signaler *Colletotrichum*, *Cryphonectria*, *Fusarium*, *Ophiostoma* et *Verticillium*. Chez *Fusarium oxysporum* par exemple, certaines populations peuvent être très polymorphes pour la compatibilité végétative. Dans une étude réalisée sur la fusariose du palmier à huile, DOSSA (1993) identifie plus de 20 GCV dans un échantillon de 61 souches isolées de palmiers fusariés ou de sols de plantations provenant de différentes régions d'Afrique et d'Amérique du Sud. Chez le *F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum* du cotonnier, ASSIGBETSE (1993) détermine 14 GCV parmi 55 souches originaires de différentes régions du monde. Il montre par ailleurs que tous les isolats des races B et C du parasite se regroupent, respectivement, au sein d'un même groupe de compatibilité végétative. La relation entre GCV et pouvoir pathogène peut être extrêmement étroite comme chez *F. oxysporum* f.sp. *albedinis* où toutes les souches pathogènes du dattier isolées au Maroc appartiennent au même groupe de compatibilité (TANTAOUI & BOISSON, 1991). Il s'agit, comme le montre cet exemple, d'un marqueur également utilisable comme outil de diagnostic ou de caractérisation de certains pathotypes.

Les marqueurs moléculaires

Depuis plusieurs années, un certain nombre de techniques ont été développées pour effectuer l'étude génétique des populations à partir de marqueurs moléculaires, plus performants que les marqueurs conventionnels. L'étude du polymorphisme enzymatique a constitué une première étape dans l'analyse des variations affectant le génome. De nouvelles techniques de biologie moléculaire permettent d'étudier de façon plus précise les variations existant au niveau des séquences de l'ADN (MCDONALD & MCDERMOTT, 1993; MICHELMORE & HULBERT, 1987).

- *Le polymorphisme enzymatique*

L'étude du polymorphisme enzymatique par électrophorèse a été très largement employée pour un grand nombre d'organismes vivants, mais ce n'est que depuis les années 70 qu'elle a été généralisée aux champignons phytopathogènes.

La molécule protéique présente une charge globale qui lui permet de migrer dans un champ électrique. C'est cette propriété qui constitue le principe de base de la séparation par électrophorèse. Après extraction, les protéines sont déposées sur un support solide, tel que l'amidon ou le polyacrylamide, et placées dans un champ électrique. La migration conduit à séparer les molécules en fonction de leur charge et de leur taille. Toute modification dans la séquence des acides aminés qui altère l'une de ces deux caractéristiques doit donc être identifiable par électrophorèse. L'analyse du polymorphisme des protéines s'est surtout orientée vers les enzymes plus faciles à identifier du fait de leur activité spécifique.

L'étape suivante consiste à interpréter les zymogrammes obtenus après révélation c'est-à-dire à identifier le support génétique des phénotypes observés (MAY, 1992). Pour une activité enzymatique donnée, il est possible de déterminer le nombre d'allèles présents au locus considéré, donc d'identifier dans une population, les différents individus selon les allèles qu'ils possèdent. De façon courante, une quinzaine d'activités enzymatiques sont étudiées chez les champignons pathogènes, parce qu'elles sont aisées à révéler et qu'elles présentent un bon niveau de polymorphisme.

C'est ainsi que l'analyse du polymorphisme enzymatique a été très largement utilisée, aussi bien dans des études de taxonomie (identification des espèces chez *Phytophthora*, *Pythium*, *Fusarium*, etc.), que pour identifier des pathotypes ou analyser la structure génétique des populations. Les études développées par FRY *et al.* (1992) sur le mildiou de la pomme de terre constituent un excellent exemple de l'utilisation du polymorphisme enzymatique dans l'analyse des populations. Parmi les quinze activités enzymatiques étudiées chez *Phytophthora infestans*, cinq ont montré un niveau de polymorphisme et de résolution suffisant pour une analyse génétique détaillée. La plus étudiée est certainement la Glucose 6 Phosphate Isomérase (Gpi) au locus de laquelle sept allèles ont été caractérisés. La nature et la fréquence des allèles présents à ce locus fournissent de précieuses indications sur la composition des populations et leur évolution (tableau 7).

Tableau 7. Fréquence des allèles les plus communs de la Glucose 6 Phosphate Isomérase (Gpi) selon le lieu et l'année de collecte des souches de *Phytophthora infestans* (d'après FRY *et al.*, 1992)

Origine	Allèles de la Gpi					
	83	86	90	100	122	130
Mexique central 1983-89	0,01	0,23	0,02	0,55	0,17	0,01
Pays-Bas avant 1980	0	0,5	0	0,5	0	0
Pays-Bas après 1980	0	0	0,41	0,59	0	0
Japon 1958-1983	0	0,5	0	0,5	0	0
Japon 1987-1990	0	0,17	0	0,83	0	0
Pérou 1984-1986	0	0,5	0	0,5	0	0
USA - Canada 1979-1989	0	0,4	0	0,6	0	0

* Réaction intermédiaire, la complémentation n'est pas nettement caractérisée.

Malgré une incontestable avancée dans l'analyse génétique des populations, l'utilisation des marqueurs enzymatiques présente un certain nombre de limites liées, en particulier, au fait que moins de 30 % du génome est impliqué dans la synthèse des protéines enzymatiques. Une part importante du polymorphisme génomique est ainsi ignorée. C'est pourquoi, de nouvelles méthodes de biologie moléculaire ont été élaborées afin d'explorer la totalité du génome.

- *Le polymorphisme génomique*

Les RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism = Polymorphisme de Longueur des Fragments de restriction)

Cette méthode permet de détecter des variations de séquence au niveau des sites de restriction. La technique consiste à hybrider des sondes de séquence déterminée sur des fragments d'ADN obtenus par digestion de l'ADN nucléaire ou mitochondrial avec des enzymes de restriction. Celles-ci sont des endonucléases qui reconnaissent spécifiquement des sites de séquence déterminée. Les fragments sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel d'agarose, selon leur taille. Les variations observées portent donc sur la longueur des fragments reconnus par la sonde. En effet, toutes mutations (substitutions de paires de bases, délétions ou additions) modifient la position du site de restriction et modifieront donc la longueur du fragment qui résultera de la digestion.

Le choix des endonucléases (spécifiques de différentes séquences) et le choix des sondes (nature de la séquence, cible d'ADN à étudier) permettent d'explorer une grande étendue du génome, qu'il s'agisse de régions codantes ou non codantes. On choisit cependant des sondes qui correspondent à des séquences uniques dans le génome afin de pouvoir identifier à un locus déterminé, les différents allèles présents dans la population. Chez les champignons pathogènes, de nombreuses études ont été réalisées sur les RFLP d'ADN mitochondrial et nucléaire. Elles permettent de mettre en évidence un polymorphisme génomique entre des individus au niveau intraspécifique.

Des études plus précises peuvent être réalisées en utilisant des sondes particulières qui permettent d'identifier chaque individu. On établit ainsi des « empreintes génétiques » (ou fingerprint) en utilisant comme sonde des séquences répétées en tandem (minisatellites) ou dispersées dans le génome. Le nombre de répétitions de ces séquences et leur localisation étant extrêmement variables d'un génotype à l'autre, les profils d'hybridation se caractérisent par une multitude de bandes (20 à 40) correspondant à des fragments d'ADN de taille différente. Parmi de nombreux travaux, ceux de MILGROOM *et al.* (1992) sur *Cryphonectria parasitica*, agent de la maladie de l'encre du châtaignier, constituent un bel exemple d'analyse de la structure génétique des populations de champignon parasite à l'aide de ces techniques.

La technique de la PCR (Polymerase Chain Reaction = réaction en chaîne de la polymérase) et les marqueurs RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA = ADN polymorphe amplifié au hasard)

La PCR est une technique dont le principe est relativement simple. Elle consiste à synthétiser de très nombreuses copies (amplifier) de séquences d'ADN homologues à partir d'une très faible quantité d'ADN initiale, grâce à l'action de l'ADN polymérase. La synthèse s'effectue à partir de deux amorces oligonucléotidiques qui sont complémentaires de chacune des extrémités de la séquence à amplifier.

Dans la pratique, l'amplification est effectuée au cours de cycles successifs de synthèse et de dénaturation de l'ADN dans un tampon où l'amorce est ajoutée, avec des désoxynucléotides libres, à la Taq polymérase (polymérase thermostable). Lors du premier cycle sont effectuées les copies de la séquence cible, puis les copies des copies et ainsi de suite pendant 30 à 40 cycles en moyenne. Les fragments obtenus peuvent être variables en longueur d'un individu à l'autre et seront séparés par électrophorèse.

La technique RAPD utilise le principe de la PCR pour amplifier au hasard des séquences de l'ADN. L'amplification est réalisée à l'aide d'une seule amorce de séquence très courte, dans des conditions de température qui favorisent un appariement non spécifique. En général, plusieurs fragments d'ADN sont amplifiés, produisant des profils électrophorétiques polymorphes. Compte tenu du nombre considérable d'amorces pouvant être utilisées pour marquer la séquence à amplifier, et la répartition au hasard de celle-ci dans le génome, le nombre de marqueurs RAPD est pratiquement illimité. Ces marqueurs présentent également l'avantage de pouvoir sonder la totalité du génome. Ils ont été largement utilisés pour l'analyse génétique des populations de parasites, car ils permettent d'évaluer le polymorphisme au niveau intraspécifique, comme par exemple pour différencier les races de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* sur le cotonnier (ASSIGBETSE *et al.*, 1994).

Cet ensemble de techniques a apporté un indiscutable progrès dans la génétique des populations de champignons parasites. D'énormes progrès sont encore possibles dans l'établissement des cartes génétiques, l'identification et le clonage des gènes d'avorulence, toutes connaissances capitales pour l'amélioration génétique des plantes et la sélection pour la résistance. D'autre part, l'extrême précision de diagnostic à laquelle les techniques moléculaires permettent d'accéder constitue un outil de première efficacité au service de l'épidémiologiste. Il est désormais possible, grâce à l'utilisation de sondes spécifiques, de repérer des souches particulières au sein des populations, par exemple, d'identifier celles qui portent un gène d'avorulence déterminé, ou un facteur de résistance à un fongicide.

Le champ d'application de ces techniques reste donc largement ouvert en phytopathologie. Elles sont cependant extrêmement coûteuses et souvent délicates à mettre en œuvre, ce qui limite leur accessibilité.

Conclusion

La génétique des populations appliquée aux champignons parasites est une voie de recherche en plein essor, grâce à l'apparition des techniques de génétique moléculaire qui ont permis de faire progresser nos connaissances sur la structure des populations. En parvenant à une meilleure appréciation du polymorphisme, il est possible d'évaluer avec plus de précision l'aptitude de l'agent pathogène à répondre aux changements intervenant dans l'agrosystème. C'est un progrès important qui permettra de gérer les gènes de résistance des plantes en fonction d'une évolution prévisible des populations parasites dans le temps et dans l'espace.

Références

- ASSIGBETSE K.B. 1993. *Pouvoir pathogène et diversité génétique chez Fusarium oxysporum f.sp. vasinfectum agent de la fusariose du cotonnier*. Thèse doct. univ. Montpellier, 205 p.
- ASSIGBETSE K.B., FERNANDEZ D., DUBOIS M.P. & GEIGER J.P. 1994. Differentiation of *Fusarium oxysporum f.sp. vasinfectum* races on cotton by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Phytopathology* 84: 622-626.
- BRASIER C.M. 1988. Rapid changes in genetic structure of epidemic populations of *Ophiostoma ulmi*. *Nature*, 332: 538-541.
- BROWN J.K.M. & WOLFE M.S. 1990. Structure and evolution of a population of *Erysiphe graminis f.sp. hordei*. *Plant Pathology* 39: 376-390.
- BURDON J.J., LUIG N.H. & MARSHALL D.R. 1983. Isozyme uniformity and virulence variation in *Puccinia graminis f.sp. tritici* and *P. recondita f.sp. tritici* in Australia. *Aust. J. Biol. Sci.* 36: 403-410.
- CORELL J.C., KUTTICH C.J.R. & LESLIE J.F. 1987. Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. *Phytopathology* 77: 1640-1646.
- DOSSA C. 1993. *Variabilité de la morphologie et du pouvoir pathogène, et diversité génétique chez Fusarium oxysporum f.sp. elaeidis, agent de la fusariose du palmier à huile*. Thèse doct. univ. Montpellier, 134 p.
- DRENTH A., TURKENSTEEN L. J. & GOVERS F. 1993. The occurrence of the A2 mating type of *Phytophthora infestans* in The Netherlands: significance and consequences. *Neth. J. Plant Pathol.* 99, supplement 3: 57-67.
- FLOR H.H. 1958. Mutation to wider virulence in *Melampsora lini*. *Phytopathology* 48: 297-301.

- FRY W. E., GOODWIN S.B., MATUSZAK J.M., SPIELMAN J., MILGROOM M.G. & DRENTH A. 1992. Population genetics and intercontinental migrations of *Phytophthora infestans*. *Ann. Rev. Phytopathol.* 30: 107-129.
- FRY W. E., GOODWIN S.B., DYER A.T., MATUSZAK J. M., DRENTH A., TOOLEY P.W., SUJKOWSKI L.S., KOH Y.H., COHEN B.A., SPIELMAN J., DEAHL K.L., INGLIS D.A. & SANDLAN K.P. 1993. Historical and recent migrations of *Phytophthora infestans*: chronology, pathways and implications. *Plant Dis.* 77: 653-661.
- GOODWIN S.B., SPIELMAN J., MATUSZAK J. M., BERGERON S.N. & FRY W.E. 1992. Clonal diversity and genetic differentiation of *Phytophthora infestans* populations in Northern and Central Mexico. *Phytopathology* 82: 955-961.
- LIOTT T.W., DURGAN M.E. & MICHELMORE R.W., 1987. Genetics of virulence in California populations of *Bremia lactucae* (lettuce downy mildew). *Phytopathology*, 77: 1381-1386.
- LESLIE J.F. 1993. Fungal vegetative compatibility. *Ann. Rev. Phytopathol.* 31: 27-50.
- LEUNG H., NELSON R.J. & LEACH J.E. 1993. Population structure of plant pathogenic fungi and bacteria. *Advances in Plant Pathology* 10: 157-205.
- MAY B. 1992. Starch gel electrophoresis of allozymes. In : Hoelzel A.R. (Ed.) " Molecular genetic analysis of populations. A practical approach. " Oxford University Press, pp. 1-27.
- MCDONALD B.A. & MCDERMOTT J.M. 1993. Population genetics of plant pathogenic fungi. Electrophoretic markers give unprecedented precision to analyses of genetic structure of populations. *Bioscience* 43: 311-319.
- MICHELMORE R.W. & HULBERT S.H. 1987. Molecular markers for genetic analysis of phytopathogenic fungi. *Ann. Rev. Phytopathol.* 25: 383-404.
- MILGROOM M.G., LIPARI S.E. & POWELL W.A. 1992. DNA fingerprinting and analysis of population structure in chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Genetics* 131: 297-306.
- PONTECORVO G. 1956. The parasexual cycle in fungi. *Ann. Rev. Microbiol* 10: 192-200.
- ROELFS A.P. & GROTH J.V. 1980. A comparison of virulence phenotypes in wheat stem rust populations reproducing sexually and asexually. *Phytopathology* 70: 855-862.
- SHAW D.S. 1991. Genetics. In " *Phytophthora infestans*, the cause of late blight of tomato ". Ingram, D.S. & Williams, P.H. Eds. *Adv. Plant Pathol.* 7: 131-170.
- SPIELMAN L.J., DRENTH A., DAVIDSE L.C., SUJKOWSKI L.J., GU W.K., TOOLEY P.W. & FRY W.E. 1991. A second world-wide migration and population displacement of *Phytophthora infestans*? *Plant Pathol.* 40: 422-430.
- TANTAOUI A. & BOISSON C. 1991. Compatibilité végétative d'isolats du *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* et de *F. oxysporum* de la rhizosphère du palmier dattier et des sols de palmeraie. *Phytopath. medit.*, 30: 155-163.
- WELZ G. & KRANZ J. 1987. Effects of recombination on races of a barley powdery mildew population. *Plant Pathology* 36: 107-113.