

# BIOLOGIE MOLÉCULAIRE DU POUVOIR PATHOGÈNE DES CHAMPIGNONS

Marc-Henri LEBRUN

CNRS URA1354, Institut de génétique et microbiologie,  
Université Paris-11, 91405, Orsay, France

## Résumé

*L'analyse moléculaire du pouvoir pathogène des champignons est en plein essor. En effet, il est actuellement possible de caractériser les gènes de pathogénie par mutagenèse insertionnelle, remplacement de gènes ou marche chromosomique. L'étape du cycle infectieux la mieux connue est la phase de pénétration. En premier lieu, les spores fongiques adhèrent à la surface de la plante à l'aide de glycoprotéines collantes. Puis, les hyphes issus de la germination des spores modifient la surface de la plante à l'aide d'enzymes de dégradation des parois végétales. La plupart des champignons pénètrent à l'aide d'un appressorium. Cette structure mycélienne particulière se différencie lorsque les hyphes sont en contact avec des surfaces hydrophobes. Le niveau d'AMP cyclique intervient aussi dans cette différenciation. Plusieurs fonctions importantes dans le fonctionnement de l'appressorium ont été mises en évidence : la mélanisation des parois, la production de protéines hydrophobes et la mise en place d'une forte pression osmotique. Le rôle des enzymes de dégradation des parois dans le pouvoir pathogène est plus complexe. En effet les enzymes étudiés jusqu'à présent ne jouent pas de rôle prépondérant possédant des appressoria (cutinases, endoPG et xylanases). Par contre, les cutinases permettent à certains pathogènes qui n'attaquent que les fruits blessés de pénétrer dans la plante sans blessure préalable. L'importance des toxines sélectives produites dès le début de l'infection, mise en évidence par des méthodes génétiques classiques, a été confirmée par le clonage de leurs gènes de biosynthèse (toxine HCT et HMT de Cochliobolus). Le gène de résistance Hml du maïs déttoxifiant l'HCT ou le gène URF13 de l'ADNmt du maïs conférant une sensibilité à l'HMT ont aussi été identifiés. Ainsi, la spécificité d'hôte de ces champignons dépend de leur capacité à produire une*

de ces toxines et de la capacité de la plante-hôte à résister à ces toxines. C'est aussi au début de l'infection qu'a lieu la reconnaissance entre le champignon avirulent et le cultivar résistant. Plusieurs gènes d'avirulence fongiques ont été clonés (*avr4* et *avr9* de *Cladosporium*; *pw12* et *avr2-Yamo* de *Magnaporthe*). Les produits des gènes *avr 4* et *avr9* correspondent à des peptides éliciteurs spécifiques des réactions de défense des cultivars résistants, alors que ceux des gènes *pw12* et *avr2-Yamo* sont encore inconnus. L'étape de colonisation de la plante est moins bien connue, malgré de nombreuses études (enzymes de dégradation, toxines). Au cours de cette phase, le champignon est en condition de déficience nutritionnelle (carence en azote). Le champignon doit aussi faire face aux réactions de défense qu'il a déclenchées. Il peut, par exemple, détoxifier les phytoalexines produites par la plante. Le modèle le mieux connu dans ce domaine, la métabolisation de la pisatine du pois par un cytochrome P450 de *Nectria* (gène *pda*), s'est révélé plus complexe qu'attendu. En effet la disruption du gène *pda* a montré que sa fonction n'était pas indispensable au pouvoir pathogène, bien que tous les isolats ou descendants de *Nectria* pathogènes du pois possèdent cette fonction.

Seule une réduction du niveau de sporulation semble liée à l'incapacité à métaboliser la pisatine. D'autres enzymes de détoxification de phytoalexines pourraient intervenir dans le pouvoir pathogène (avecinease de *Gaeumanomyces*). Enfin, l'étape finale du cycle infectieux, la sporulation, commence à être étudiée à l'aide de mutants ou en analysant les gènes exprimés spécifiquement à ce stade de développement du champignon.

Le polymorphisme des gènes impliqués dans le pouvoir pathogène est encore très peu étudié. Les données les plus récentes concernent les gènes d'avirulence, dont les allèles virulents correspondent soit à des délétions, soit à des mutations ponctuelles. Enfin, certains gènes d'avirulence sont instables, particulièrement ceux qui sont situés aux extrémités chromosomiques. D'autre part, les gènes de biosynthèse de la toxine HCT n'existent que chez certains isolats de *Cochliobolus carbonum*, les isolats non producteurs ne possédant aucun allèle délétif (délétion). Ces gènes sont bordés par des éléments transposables, et il est postulé qu'ils soient mobilisables comme des transposons bactériens ayant intégré des gènes de résistance aux antibiotiques. Ces quelques résultats montrent qu'il peut être relativement facile d'acquérir une nouvelle pathogénie soit par mutation (avirulence vers virulence), soit par transfert d'information génétique (gènes de biosynthèse d'HCT).

Les mécanismes biochimiques permettant aux champignons d'attaquer les plantes sont encore très mal connus<sup>1, 2</sup>. Mais l'étude de ces mécanismes est en plein développement grâce aux techniques de biologie moléculaire. En effet, il est maintenant possible de cloner et d'analyser au niveau fonctionnel les gènes impliqués dans le pouvoir pathogène. Après une présentation rapide des principales stratégies de clonage de gènes de pathogénie, nous détaillerons les connaissances déjà acquises sur ces gènes et sur les mécanismes biochimiques impliqués dans le pouvoir pathogène.

### Stratégies d'identification de gènes impliqués dans le pouvoir pathogène des champignons

Les méthodes permettant de cloner les gènes de pathogénie, peuvent être regroupées en quatre stratégies (fig. 1). La première stratégie, la plus prometteuse, consiste à obtenir des mutants non pathogènes par mutagenèse insertionnelle (intégration d'un plasmide ou d'un transposon). Les gènes ainsi identifiés sont indispensables à la pathogénie. Leur étiquetage par un plasmide ou un transposon permet leur clonage. La comparaison de leurs séquences avec celles de gènes présents dans les banques nucléotidiques conduit, le plus souvent, à identifier leurs fonctions cellulaires (trois gènes de pathogénie ont été caractérisés par cette méthode chez *Magnaporthe grisea*<sup>3</sup>).

La deuxième stratégie, la plus utilisée actuellement, suppose qu'une fonction biochimique connue intervient dans le pouvoir pathogène (par exemple, la dégradation de polymères ou la biosynthèse d'une toxine). La première étape consiste à cloner un gène contrôlant cette fonction. Puis, ce gène est interrompu par un plasmide conférant une résistance à un antibiotique. Ce type de construction permet de sélectionner facilement des transformants ayant intégré le gène interrompu dans le génome du champignon, en général au niveau du gène-cible. Il est ainsi possible de créer à volonté des mutants dans un gène connu. Ces mutants permettent de déterminer le rôle de ce gène dans le pouvoir pathogène. Cette stratégie a été utilisée pour étudier le rôle dans la pathogénie d'enzymes de dégradation des polymères végétaux<sup>26</sup> ou de toxines<sup>32</sup>.

La troisième stratégie repose sur l'hypothèse suivante : les gènes impliqués dans le pouvoir pathogène doivent être fortement exprimés au cours de l'infection et faiblement exprimés lors de la phase saprophytique. L'identification de ce type de gènes devient possible en clonant des ADN complémentaires des ARNm extraits des tissus infectés (ADNci). Ces ADNci sont triés par hybridation ou par séquençage partiel, afin d'identifier les clones correspondant aux gènes fongiques exprimés spécifiquement au cours de l'infection. Puis, ces ADNci sont utilisés pour obtenir des mutants par remplacement de gène (voir stratégie 2), qui serviront à évaluer leur rôle dans le pouvoir pathogène. Cette stratégie a déjà permis d'identifier une nouvelle protéine (hydrophobine) impliquée dans le pouvoir pathogène de *Magnaporthe grisea*<sup>18</sup>. Elle conduira aussi à mieux comprendre les réseaux de régulation mis en place par le champignon lors d'une infection.

### Stratégie 1 Mutagenèse aléatoire

à l'aide de  
- **transposons**  
- plasmides  
(transformation)



Recherche de mutants  
non pathogènes



Clonage du gène étiqueté  
et recherche de sa  
fonction

### Stratégie 2 Hypothèses biochimiques

**Métabolites fongiques**  
isolés et caractérisés  
Enzymes  
Toxines



Clonage des gènes de  
biosynthèse par  
Banque d'expression  
PCR



Mutants: Inactivation par  
remplacement de gène

Mesure de leur pouvoir  
pathogène

### Stratégie 3 Expression de gènes

**ARN messager**  
fongique spécifique  
de l'infection:  
clonage ADNc



Mutants: inactivation par  
remplacement de gène

Mesure de leur pouvoir  
pathogène



Séquence ADNc et  
recherche de la fonction  
du gène

### Stratégie 4 Phénotypes

Isolats différant par  
- leur spécificité  
- leur pathogénie  
**Déterminisme  
génétique**



Clonage des gènes par  
Marche chromosomique  
Complémentation



Mutants: Inactivation par  
remplacement de gène

Séquence du gène et  
recherche de sa fonction

Figure 1

Stratégies d'identification de gènes impliqués dans le pouvoir pathogène des champignons

La dernière stratégie consiste à cloner par marche chromosomique, un gène positionné sur une carte génétique. Cette stratégie nécessite de connaître le déterminisme génétique d'un caractère de pathogénie. Lorsque de tels gènes sont en ségrégation dans un croisement, il est nécessaire d'identifier des marqueurs moléculaires liés à ces gènes. Ces marqueurs constituent les points de départ de marches chromosomiques. Cette marche aboutit au clonage du gène étudié, qui peut être séquencé et comparé aux gènes déjà identifiés chez d'autres champignons. Cette stratégie, délicate, a déjà permis de caractériser deux gènes d'avirulence chez *Magnaporthe grisea*<sup>37</sup>.

### Biologie moléculaire du pouvoir pathogène des champignons

Les champignons sont responsables de maladies très différentes qu'il n'est pas possible de décrire globalement. Nous avons fait le choix de présenter les connaissances acquises sur le pouvoir pathogène des champignons responsables des maladies des feuilles et des tiges, car ce sont les mieux connus. Les différents mécanismes biochimiques impliqués dans le pouvoir pathogène ont été regroupés en fonction de l'étape du cycle infectieux où ils interviennent (adhésion et pénétration, reconnaissance par la plante-hôte, colonisation et sporulation).

#### **Adhésion des spores et pénétration dans la plante**

En premier lieu, les spores fongiques véhiculées par l'eau, la pluie ou le vent, atterrissent à la surface des plantes. Dès leur premier contact, les spores adhèrent fortement à la surface de la plante (fig. 2), sans doute à l'aide de glycoprotéines collantes et de polysaccharides<sup>4</sup> (*Nectria haematococca*<sup>5</sup>, *Colletotrichum musae*<sup>6</sup>, *Magnaporthe grisea*<sup>7</sup>, *Uromyces viciae*<sup>8</sup>). Après leur adhésion, les spores germent et émettent des tubes germinatifs qui parcourent la surface de la plante en la modifiant à l'aide d'enzymes de dégradation des parois végétales (protéases, pectinases, cellulases et cutinases : *Uromyces viciae*<sup>9</sup>, *Colletotrichum graminicola*<sup>10</sup>, *Erysiphe graminis*<sup>11</sup>). Le rôle exact de ces différentes glycoprotéines et enzymes de dégradation dans le processus d'adhésion des spores, n'a pas été encore déterminé, mais le clonage de leurs gènes, qui est en cours, devrait permettre de répondre à ces questions.

Dans la plupart des cas, les hyphes mycéliens issus de la germination des spores, différencient rapidement un organe de pénétration, l'appressorium<sup>12</sup> (fig. 3). Cette différenciation dépend de nombreux stimuli externes<sup>13</sup>, comme la présence de surfaces hydrophobes (*Magnaporthe grisea*<sup>7, 16, 25</sup>) ou des topologies particulières (stomates : *Uromyces viciae*<sup>14</sup>). Ces stimuli physiques induisent chez le champignon des messagers cellulaires, tels que l'AMP cyclique, qui déclenchent les processus cellulaires conduisant à la différenciation de l'appressorium. En effet, une forte concentration intracellulaire en AMP cyclique permet cette différenciation en l'absence de stimuli (*Uromyces viciae*<sup>15</sup>, *Magnaporthe grisea*<sup>16</sup>). De plus, il a été montré par remplacement

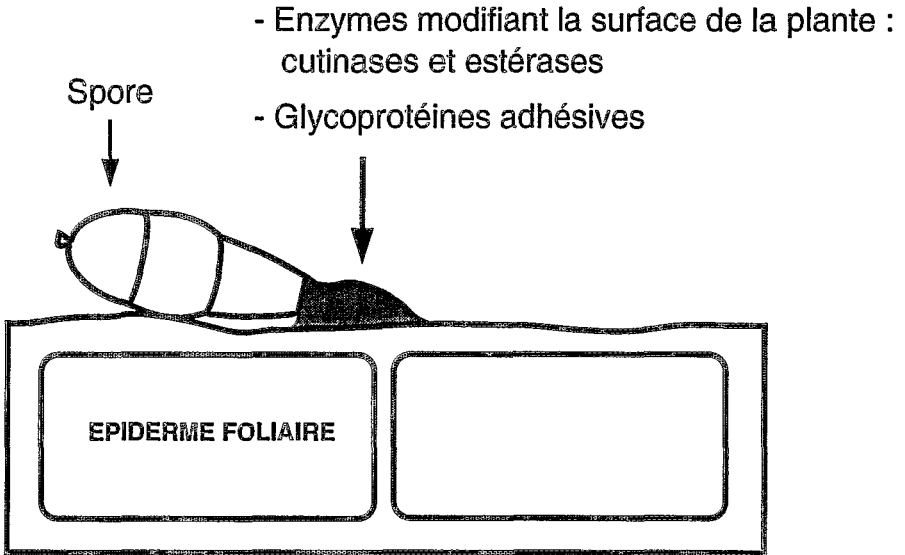


Figure 2

Adhésion des spores sur la surface des feuilles

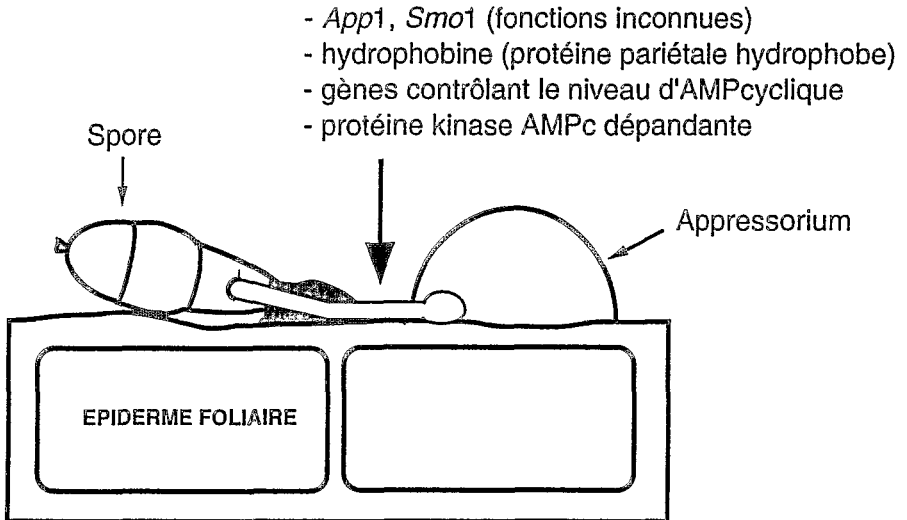


Figure 3

Différenciation de l'appressorium chez le champignon pathogène du riz, *Magnaporthe grisea*. Gènes et protéines impliqués dans la différenciation de l'appressorium<sup>3, 16, 17, 18, 19, 20</sup>.

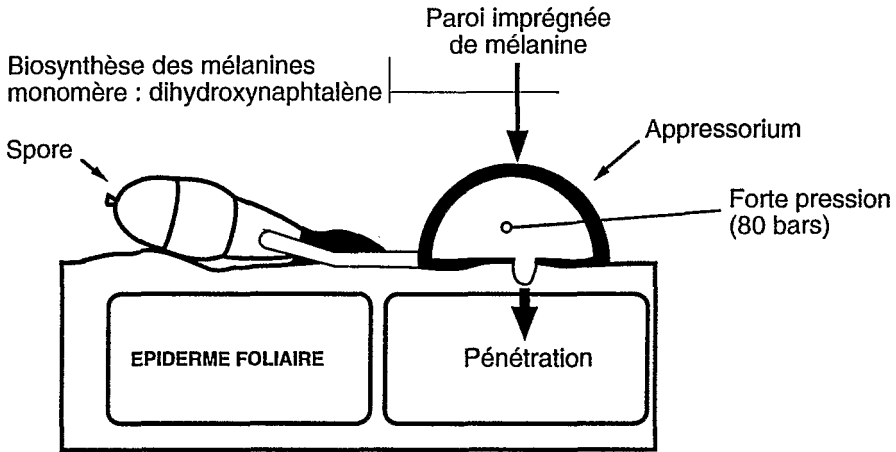


Figure 4

Fonctionnement de l'appressorium du champignon pathogène du riz *Magnaporthe grisea*

de gène et mutagenèse insertionnelle, qu'une protéine kinase contrôlée par le niveau d'AMP cyclique était nécessaire à cette différenciation (*Magnaporthe grisea*<sup>3, 17</sup>). Trois autres gènes contrôlant cette différenciation ont été identifiés chez *Magnaporthe grisea*<sup>18, 19, 20</sup>. Pour l'instant, un seul de ces gènes est caractérisé (*Mpg1*<sup>18</sup>). La protéine correspondant à ce gène, ressemble fortement à des protéines hydrophobes qui recouvrent les spores ou les hyphes aériens d'autres champignons. Il est probable que cette protéine participe à l'interaction avec des surfaces hydrophobes, qui induisent la différenciation de l'appressorium chez *Magnaporthe grisea*.

Pour pouvoir être fonctionnels, les appressorium ont besoin d'être mélanisés (fig. 4 : *Colletotrichum lindemuthianum*<sup>21</sup>, *Magnaporthe grisea*<sup>22</sup>). Ce pigment est un polyphénol, dont le monomère (dihydroxynaphtalène) est synthétisé à partir de l'acétate par des enzymes très spécifiques qui ont été caractérisés<sup>23, 24</sup> et sont la cible de fongicides dit antipénétrants<sup>23</sup>. Cette mélanisation des parois est nécessaire à la mise en place d'une forte pression à l'intérieur de l'appressorium (80 bars chez *Magnaporthe grisea*<sup>25</sup>), qui permet la pénétration en force d'un hyphe mycélien à travers la paroi de la cellule épidermique. Le rôle des enzymes de dégradation des parois produits par le champignon pendant la pénétration est plus complexe. En effet, la plupart des enzymes étudiés jusqu'à présent ne jouent pas de rôle prépondérant dans la pénétration des champignons ayant un appressorium (cutinase : *Nectria haematococca*<sup>26</sup>, *Magnaporthe grisea*<sup>27</sup>, pectinase et xylanase : *Cochliobolus carbonum*<sup>28, 29</sup>). Par contre, les cutinases permettent à certains champignons sans appressorium qui n'attaquent que des fruits blessés, de pénétrer dans la plante sans blessures (*Mycosphaerella* spp.<sup>30</sup>).

### Spécificité d'hôte et reconnaissance par la plante-hôte

La plupart des champignons ne sont capables d'attaquer qu'un petit nombre de plantes ou de cultivars. Les interactions entre la plante et le champignon intervenant dans cette spécificité ont lieu dans les premières cellules infectées, juste après la pénétration.

La spécificité d'hôte de certains champignons dépend de leur capacité à produire des toxines sélectives<sup>31</sup>. Ces toxines sécrétées pendant et après la pénétration ne sont toxiques que pour la plante-hôte du champignon pathogène. Leur rôle dans la spécificité, mis en évidence par des méthodes génétiques classiques<sup>31</sup>, a été confirmé par le clonage de leurs gènes de biosynthèse (toxine HCT du champignon pathogène du maïs *Cochliobolus carbonum*<sup>32</sup>). Les plantes résistantes à ces champignons sont aussi résistantes à leurs toxines sélectives. Ainsi, le clonage du gène du maïs *Hm1*, conférant une résistance à *Cochliobolus carbonum*, a montré qu'il correspondait à une enzyme capable de détoxifier la toxine sélective HCT produite par ce champignon<sup>33</sup>.

Après sa pénétration dans la plante-hôte, le champignon peut être identifié par les systèmes de reconnaissance de la plante. Cette étape de reconnaissance plante-champignon est primordiale pour le succès de l'infection, car seuls les champignons qui n'auront pas été reconnus par les nombreux gènes de résistance de la plante pourront continuer leur processus infectieux. Cette reconnaissance fait intervenir d'une part un gène d'avirulence du champignon et d'autre part un gène de résistance de la plante (relation gène pour gène<sup>34</sup>). Plusieurs gènes d'avirulence ont été clonés (fig. 5), chez le champignon pathogène de la tomate *Cladosporium fulvum* (*avr4* et *avr9*<sup>35, 36</sup>) et chez le champignon pathogène du riz *Magnaporthe grisea* (*pwl2* et *avr2-Yamo*<sup>37</sup>). Les produits des gènes *avr4* et *avr9* correspondent à des peptides capables de déclencher spécifiquement les réactions de défense du cultivar de tomate possédant le gène de résistance correspondant. Les fonctions des produits des gènes *pwl2* et *avr2-Yamo* sont encore inconnues. Les gènes de résistance de la tomate correspondant aux gènes d'avirulence de *Cladosporium fulvum* *avr4* et *avr9*, ont été clonés récemment<sup>38</sup>.

L'analyse de leurs séquences nucléotidiques montre qu'ils appartiennent à une famille de protéines impliquées dans la reconnaissance de signaux et la production de messagers secondaires capables d'activer spécifiquement des gènes de la plante. Ainsi, il est vraisemblable que les peptides éliciteurs *Avr4* et *Avr9* se fixent sur le produit des gènes de résistance et que ces complexes activent par une cascade de réactions intracellulaires, les gènes des réactions de défense de la plante.

Les champignons qui ne sont pas reconnus par les gènes de résistance de la plante, possèdent des allèles « virulents ». L'analyse moléculaire de ces allèles, montre qu'ils correspondent toujours à des gènes d'avirulence inactifs (mutations ponctuelles, insertion de transposons<sup>36, 37</sup>) ou à des délétions de toute la région chro-



**Cladosporium fulvum**

Purification d'un peptide éliciteur spécifique, puis clonage du gène

**Avr4**, peptide riche en cystéine  
sécrété par le champignon

135 aa (18 aa adressage)

↓ Protéases fongique et/ ou végétale

117 aa (actif)

**Avr9**, peptide riche en cystéine  
sécrété par le champignon

63 aa (dont 23 aa adressage)

↓ Protéase fongique

34 aa (actif)

↓ Protéase de la plante

28 aa (actif)

**Magnaporthe grisea**

Clonage par marche chromosomique

**Pwl2**,

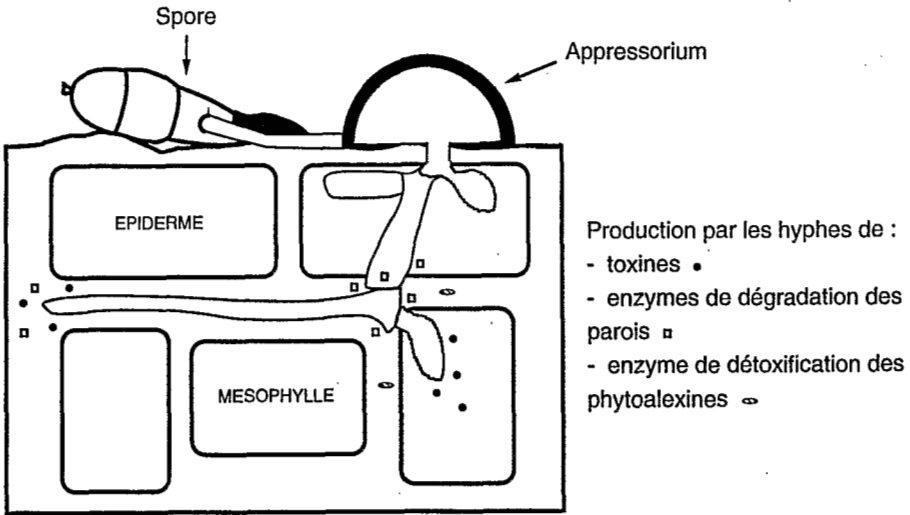
protéine de 145 aa riche en glycine  
fonction inconnue,  
famille de gènes

**Avr2-Yamo**,

protéine de 201 aa  
fonction inconnue,  
famille de gènes

**Figure 5**

Caractéristiques des produits des gènes d'avirulence de champignons  
*Cladosporium fulvum*, pathogène foliaire de la tomate <sup>34, 35, 36</sup>  
*Magnaporthe grisea*, pathogène foliaire du riz<sup>37</sup>



**Figure 6**

Colonisation de la feuille par les hyphes mycéliens

mosomique correspondant au gène d'avirulence<sup>35, 37</sup>. Certains gènes d'avirulence sont instables, particulièrement ceux situés aux extrémités chromosomiques, et il est facile d'obtenir des mutants spontanés virulents pour ces gènes<sup>37</sup>.

### **Colonisation de la plante-hôte**

Lorsque le champignon échappe au système de reconnaissance de la plante, il peut continuer sa progression dans les tissus (fig. 6). Cette étape de colonisation est la moins bien connue, malgré de nombreuses études (identification d'enzymes de dégradation des parois, de toxines). Au cours de cette phase, le champignon est en condition de déficience nutritionnelle. En effet, certains gènes de pathogénie (*Mpg1* de *Magnaporthe grisea*<sup>18</sup>) ou d'avirulence (*avr9* de *Cladosporium fulvum*<sup>39</sup>) qui ne peuvent s'exprimer que dans des milieux carencés en azote, s'expriment fortement au cours de cette phase de l'infection. La même observation a été faite avec des gènes qui ne s'expriment que lors de carences en glucose (*adh* de *Cladosporium fulvum*<sup>40</sup>).

Le champignon doit aussi faire face aux réactions de défense qu'il a lui-même déclenché lors de sa progression dans la plante. Certains champignons sont ainsi capables de détoxifier<sup>41</sup> les composés fongitoxiques produits par la plante (phytoalexines). *Nectria haematococca* métabolise la principale phytoalexine du pois, la pisatine, à l'aide d'un enzyme de type cytochrome à P450 (gène *pda*<sup>42</sup>), mais son rôle dans le processus infectieux s'est révélé plus complexe qu'attendu. En effet, l'obtention d'un mutant par remplacement de gène, a montré que sa fonction n'était pas indispensable au pouvoir pathogène, bien que tous les isolats de *Nectria* pathogènes du pois possèdent cet enzyme fonctionnel<sup>43</sup>. Le champignon pathogène de l'avoine *Gaeumannomyces graminis*, produit un enzyme capable de détoxifier le principal composé fongitoxique de l'avoine, une saponine appelée avanacine, à l'aide d'une glucosidase spécifique dont le gène de structure a été cloné<sup>44</sup>. L'obtention d'un mutant par remplacement de gène, a montré que cette fonction était indispensable à ce champignon pour attaquer l'avoine.

### **Sporulation**

L'étape finale du cycle infectieux correspond au moment où le champignon différencie ses organes de reproduction asexué ou sexué, et libère des spores qui dissémineront la maladie. Cette phase de sporulation, est encore très peu étudiée.

### **Conclusions**

Nos connaissances des bases moléculaires du processus infectieux des champignons phytopathogènes sont encore très limitées. Mais, la combinaison d'approches méthodologiques et les apports de la biologie moléculaire accélèrent le rythme des découvertes. Ces nouvelles connaissances devraient nous permettre de concevoir des fongicides très spécifiques, mais aussi de sélectionner rationnellement des cultivars ayant une résistance durable aux champignons.

## Références

- 1 - VALENT B., CHUMLEY F. G. 1991. Molecular genetic analysis of the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 29:443-467
- 2 - MENDGEN K., DEISING H. 1993. Infection structures of fungal plant pathogens. *New Phytologist.* 124:193-213
- 3 - VALENT B., 1994, personal communication.
- 4 - NICHOLSON R. L., EPSTEIN L. 1991. *Adhesion of fungi to the plant surface*. In: The fungal spore and disease initiation in plants and animals. Editors, Cole, G. T., and Hoch, H. C. New-York: Plenum Press, 3-23.
- 5 - KWON Y. H., EPSTEIN L. 1993. A 90-kDa glycoprotein associated with adhesion of *Nectria haematococca macroconidia* to substrata. *Mol. Plant-Micr. Interact.* 6: 481-487.
- 6 - SELA-BUURLAGE M. B., EPSTEIN L., RODRIGUEZ R. J. 1991. Adhesion of ungerminated *Colletotrichum musae* conidia. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 39:345-352.
- 7 - HAMER J. E., HOWARD R. J., CHUMLEY F. G., VALENT B. 1988. A mechanism for surface attachment in spores of a plant pathogenic fungus. *Science* 239:288-290.
- 8 - EPSTEIN L., LACETTI L., STAPLES R. C., HOCH H. C. 1987. Cell-substratum adhesive protein involved in surface contact response of the bean rust fungus. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 30:373-388.
- 9 - DEISING H., NICHOLSON R. L., HAUG M., HOWARD R. J., MENDGEN K. 1992. Adhesion pad formation and the involvement of cutinases and esterases in the attachment of urediniospores to the host cuticle. *The Plant Cell* 4:1101-1111.
- 10 - RAMADOS C. S., UHLIG J., CARLSON D. M., BUTLER L. G., NICHOLSON R. L. 1985. Composition of the mucilaginous spore matrix of *Colletotrichum graminicola*, a pathogen of corn, sorghum, and other grasses. *J. Agric. Food Chem.* 33:728-732.
- 11 - PASCHOLATI S. F., YOSHIOKA H., KUNOH H., NICHOLSON R. L. 1992. Preparation of the infection court by *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*: cutinase is a component of the conidial exudate. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 41:53-59.
- 12 - EMMET R. M., PARBERY D. G. 1975. Appressoria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 13: 1147-1167.
- 13 - HOCH H. C., STAPLES R. C. 1991. *Signaling for infection structure formation in fungi*. In: The fungal spore and disease initiation in plants and animals. Editors, COLE G. T., and HOCH H. C. New-York : Plenum Press, 25-46.
- 14 - HOCH H. C., STAPLES R. C., WHITEHEAD B., COMEAU J., WOLF E. D. 1987. Signaling for growth orientation and cell differentiation in *Uromyces*. *Science* 235:1659-1662.
- 15 - HOCH H. C., STAPLES R. C. 1987. Structural and chemical changes among rust fungi during appressorium formation. *Annu. Rev. Phytopathol.* 25:231-247.

- 16 - LEE Y.-H., DEAN R. A. 1993. cAMP regulates infection structure formation in the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. *The Plant Cell* 5: 693-700.
- 17 - DEAN R. A., 1994. 7<sup>th</sup> International Symposium on Molecular Plant Microbe Interactions, Edinburgh, U. K.
- 18 - TALBOT N. A., EBBOLE D. J., HAMER J. E. 1994. Identification and characterization of Mpg1, a gene involved in pathogenicity from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *The Plant Cell* 5: 1575-1590.
- 19 - HAMER J. E., VALENT B., CHUMLEY F. G. 1989. Mutations at the *smo* locus affect the shape of diverse cell types in the rice blast fungus. *Genetics* 122: 351-361.
- 20 - SILUE D., NOTTEGHEM J. L., LEBRUN M.-H. 1994. *Genetic analysis of an appressorium deficient non-pathogenic mutant from Magnaporthe grisea. submitted.*
- 21 - KUBO Y., FURASAWA I. 1991. *Melanine biosynthesis. Prerequisite for the successful invasion of the plant host by appressoria of Colletotrichum and Pyricularia.* In: The fungal spore and disease initiation in plants and animals. Editors, COLE G. T., and HOCH H. C. New-York: Plenum Press, 205-218.
- 22 - CHUMLEY F. G., VALENT B. 1990. Genetic analysis of melanin-deficient, non-pathogenic mutants of *Magnaporthe grisea*. *Mol. Plant-Micr. Interact.* 3: 135-143.
- 23 - BELL A. A., WHEELER M. H., 1986. Biosynthesis and function of fungal melanins. *Annu. Rev. Phytopathol.* 24: 411-451.
- 24 - VIDAL-CROSS A., VIVIANI F., LABESSE G., BOCCARA M., GAUDRY M. 1994. Polyhydroxynaphthalene reductase involved in melanin biosynthesis in *Magnaporthe grisea*. *Eur. J. Biochem.* 219: 985-992.
- 25 - HOWARD R. J., FERRARI M. A., ROACH D. H., MONEY N. P. 1991. *Penetration of hard surfaces by a fungus employing enormous turgor pressures.* Proc. Natl. Acad. Sci., USA. 88: 11281-11284.
- 26 - STAHL D., SCHAFER W. 1992. Cutinase is not required for fungal pathogenicity on pea. *The Plant Cell* 4: 621-629.
- 27 - SWEIGARD J. A., CHUMLEY F. G., VALENT B. 1992. Disruption of a *Magnaporthe grisea* cutinase gene. *Mol. Gen. Gent.* 232: 183-190.
- 28 - SCOTT-CRAIG J.S., PANACCIONE D.G., CERVONE F., WALTON J.D. 1990. Endopolygalacturonase is not required for pathogenicity of *Cochliobolus carbonum* on maize. *The Plant Cell* 2: 1191-1200.
- 29 - APEL P., PANACCIONE D.G., JHOLDEN F. R., WALTON J. D. 1993. Cloning and targeted gene disruption of Xyl1, a  $\beta$ 1,4-Xylanase gene from the maize pathogen *Cochliobolus carbonum*. *Mol. Plant-Micr. Interact.* 6: 467-473.
- 30 - DICKMAN M. B., PODILA G. K., KOLATTUKUDY P. E. 1989. Insertion of a cutinase gene into a wound pathogen enables it to infect intact host. *Nature* 342: 446-448.

- 31 - WALTON J. D., PANACCIONE D. G. 1993. Host-selective toxins and disease specificity: perspectives and progress. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31: 275-299.
- 32 - PANACCIONE D. G., SCOTT-CRAIG J. S., POCARD J. A., WALTON J. D. 1992. A cyclic peptide synthetase gene required for pathogenicity of the fungus *Cochliobolus carbonum* on maize. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6590-6594.
- 33 - JOHAL G. S., BRIGGS S. P. 1992. Reductase activity encoded by the *Hm1* disease resistance gene in maize. *Science*, 258: 985-987.
- 34 - DE WIT P.J.G.M. 1992. Molecular characterization of gene-for-gene systems in plant fungus interactions and the application of avirulence gene in control of plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30: 391-418.
- 35 - VAN DER ACKERVEKEN G.F.J.M., VAN KAN J.A.L., DE WIT P.J.G.M. 1992. Molecular analysis of the avirulence gene *avr9* of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum* fully supports the gene-for-gene hypothesis. *The Plant Journal* 2: 359-366.
- 36 - JOOSTEN M.H.A., COZIJSSEN T.J., DE WIT P.J.G.M. 1994. Host resistance to a fungal tomato pathogen lost by a single base-pair change in an avirulence gene. *Nature* 367: 384-386.
- 37 - VALENT B., CHUMLEY F.G. 1994. Avirulence gene and mechanisms of genetic instability in the rice blast fungus. In: Rice Blast Disease. Editors; LEONG S., ZIEGLER R.S., CAB Press.
- 38 - JONES J.D.G., 1994. 7<sup>th</sup> International Symposium on Molecular Plant Microbe Interactions, Edinburgh, U. K.
- 39 - VAN DER ACKERVEKEN G.F.J.M., DUNN R.M., COZIJSSEN T.J., VOSEN P., VAN DER BROECK H.W.J., DE WIT P.J.G.M. 1994. Nitrogen limitation induces expression of the avirulence gene *avr9* in the tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. *Mol. Gen. Genet.* 243: 277-283.
- 40 - OLIVER R. 1994. 7<sup>th</sup> International Symposium on Molecular Plant Microbe Interactions, Edinburgh, U. K.
- 41 - WELTRING K.-M. 1992. Phytoalexins in the relation between plants and their fungal pathogens. In: Molecular biology of filamentous fungi. Editors Stahl, U., Tudzynski, P. VCH-Press, 112-124.
- 42 - MALONEY A.P., VAN ETEN H.D. 1994. A gene from the fungal plant pathogen *Nectria haematococca* that encodes the phytoalexin-detoxifying enzymes pisatin demethylase, defines a new cytochrome P450 family. *Mol. Gen. Genet.* 243: 506-514.
- 43 - VAN ETEN H.D. 1994. 7<sup>th</sup> International Symposium on Molecular Plant Microbe Interactions, Edinburgh, U. K.
- 44 - OSBOURN A. E., 1994. 7<sup>th</sup> International Symposium on Molecular Plant Microbe Interactions, Edinburgh, U. K.