

**AFPP – 6^e CONFÉRENCE SUR LES MOYENS ALTERNATIFS DE PROTECTION
POUR UNE PRODUCTION INTÉGRÉE
LILLE – 21, 22 ET 23 MARS 2017**

**CARACTERISATION DE LA POPULATION DE *ZYMOSEPTORIA TRITICI*, L'AGENT RESPONSABLE DE LA
SEPTORIOSE DU BLE, DANS LE NORD DE LA FRANCE**

A. SIAH⁽¹⁾, M. BOMBLE⁽¹⁾, Ph. REIGNAULT⁽²⁾ et P. HALAMA⁽¹⁾

(1) 1 Institut Charles Viollette (EA 7394), Institut Supérieur d'Agriculture,
48, boulevard Vauban, F-59130, Lille cedex, France
(ali.siah@yncrea.fr, myriam.bomble@yncrea.fr, patrice.halama@yncrea.fr)

(2) Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant (EA 4492), Université du Littoral
Côte d'Opale, CS 80699, F-62228 Calais cedex, France
(philippe.reignault@univ-littoral.fr)

RÉSUMÉ

Une bonne connaissance des agents phytopathogènes est requise pour mieux adapter les méthodes de lutte. Dans cette étude, nous avons caractérisé une population de *Zymoseptoria tritici*, isolée dans la région Hauts-de-France, à l'aide de divers marqueurs (microsatellites et types sexuels). Les analyses ont mis en évidence des niveaux de diversité génétique (génique et génotypique) très élevés, une reproduction sexuée active, ainsi qu'une structuration de la population régionale en trois groupes génétiques répartis sur des zones géographiques distinctes. Cette diversité élevée due aux brassages génétiques réguliers confère au champignon une bonne capacité d'adaptation aux conditions agro-environnementales locales. La prise en compte de ce paramètre est nécessaire pour mieux adapter les stratégies de lutte, en particulier les méthodes alternatives.

Mots-clés : Septoriose du blé, diversité génétique, reproduction sexuée, adaptation locale.

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF THE POPULATION OF *ZYMOSEPTORIA TRITICI*, THE CAUSAL AGENT OF SEPTORIA TRITICI BLOTCH OF WHEAT, IN NORTHERN FRANCE

A good understanding of phytopathogen agents is required to better adapt disease control strategies. In this study, we characterized a population of *Zymoseptoria tritici* from the Hauts-de-France region using several markers (microsatellites and mating types). The analyzes revealed very high levels of genetic (genetic and genotypic) diversity, an active sexual reproduction, and population structuration into three genetic groups distributed according to geographical areas. This diversity due to sexual recombination confers to the fungus the ability of adaptation to local agro-environmental conditions. The consideration of these parameters is necessary to better adapt pathogen-control strategies, especially alternative methods.

Keywords: *Septoria tritici* blotch, genetic diversity, sexual reproduction, local adaptation.

INTRODUCTION

La septoriose causée par *Zymoseptoria tritici* est la maladie foliaire la plus fréquente et la plus nuisible sur les cultures de blé. En France, les pertes engendrées par ce pathogène sont estimées à environ 17 q/ha à l'échelle du territoire sur les dix dernières années, avec des nuisibilités pouvant s'élever jusqu'à 50 % dans les situations les plus extrêmes (Arvalis-Institut du Végétal, 2013). Par sa forte incidence économique et l'intérêt particulier qu'il suscite auprès des agronomes et des scientifiques, *Z. tritici* a été classé parmi les dix premières espèces modèles des champignons phytopathogènes (Dean *et al.*, 2012). La lutte contre *Z. tritici* repose essentiellement sur l'utilisation des fongicides conventionnels et l'exploitation des ressources variétales. Toutefois, la durabilité de ces stratégies de lutte est compromise par le développement régulier de résistances aux fongicides et le contournement fréquent des résistances variétales par le champignon.

L'étude des populations de *Z. tritici* permet de mieux comprendre son épidémiologie et son potentiel d'évolution, facteurs importants dans la lutte contre ce champignon. En effet, les espèces avec un fort potentiel d'évolution présentent un *fitness* (capacité d'adaptation) plus élevé comparativement aux espèces possédant un faible potentiel d'évolution. Les populations de *Z. tritici* présentent un niveau de diversité génétique globalement élevé et un niveau de structuration (différenciation des populations) qui semble varier en fonction des marqueurs et des zones géographiques examinées. Un typage de collections mondiales du pathogène à l'aide de marqueurs RFLP a révélé un manque de structuration et un flux de gènes très élevé entre les populations testées (Zhan *et al.*, 2003). En revanche, des études réalisées plus récemment avec des marqueurs microsatellites ou AFLP ont mis en évidence des niveaux de structuration significatifs au sein de populations de certains pays comme l'Iran (Abrinbana *et al.*, 2010), la France (El Chartouni *et al.*, 2011) et les États-Unis (Gurung *et al.*, 2011).

Les populations de *Z. tritici* ont été étudiées dans plusieurs pays dont la France. En revanche, aucune étude à une échelle réduite n'a jusqu'ici été réalisée sur le territoire français. Cette étude vise donc à caractériser pour la première fois la population de *Z. tritici* dans le nord de la France, avec un focus sur la région Hauts-de-France (ex. Nord Pas-de-Calais). Les travaux consistent à évaluer la diversité et la structure génétique du pathogène à l'aide de marqueurs microsatellites et à déterminer la fréquence de sa reproduction sexuée en étudiant la distribution des *mating types* (types sexuels). Cette caractérisation est réalisée à l'échelle régionale et à une échelle plus fine (champ).

MATERIELS ET MÉTHODES

ISOLEMENT DES SOUCHES ET EXTRACTION DE L'ADN

Au total, 542 souches monospores de *Z. tritici* ont été isolées dans la région Hauts-de-France (282 souches en 2009 et 260 souches en 2012). Les souches de 2009 ont été isolées à partir de 12 sites couvrant l'ensemble de la partie nord de la région, alors que les souches de 2012 ont été isolées à partir de deux sites expérimentaux régionaux, situés à Lorgies et Tilloy-lès-Mofflaines (Tableau I, Figure 2). L'isolement des souches a été réalisé à partir de feuilles de blé non traitées avec les fongicides et naturellement infectées par le pathogène, selon le protocole décrit par Siah *et al.* (2010). Après extraction de l'ADN selon la méthode proposée par Siah *et al.* (2010), les souches sont conservées à - 80 °C dans une mycothèque.

Tableau I : Nombre et origine des souches de *Z. tritici* utilisées dans cette étude.
(Number and origin of the *Z. tritici* strains used in this study).

Site prélevé	Année	Lettre correspondante	Nombre d'isolats
Teteghem	2009	A	24
Vieille Eglise	2009	B	24
Carly	2009	C	24
Campinieule-les-Grandes	2009	D	24
Campagne-les-Wardrecques	2009	E	24
Troisveaux	2009	F	20
Warlincourt-les-Pas	2009	G	24
Izel-les-Hameaux	2009	H	24
Carvin	2009	I	24
Bapaume	2009	J	22
Marcq-en-Ostrevent	2009	K	24
Sautain	2009	L	24
Lorgies	2012	-	120
Tilloy-lès-Mofflaines	2012	-	140

DETERMINATION DES TYPES SEXUELS

Afin d'estimer le potentiel de la reproduction sexuée du champignon, le type sexuel de chaque souche a été identifié par PCR multiplex selon le protocole décrit par Siah *et al.* (2010). Pour rappel, *Z. tritici* est un champignon hétérothallique qui se présente sous deux formes : MAT1-1 ou MAT1-2. La reproduction sexuée se réalise exclusivement entre des souches MAT1-1 et MAT1-2.

DETERMINATION DU NIVEAU DE DIVERSITE ET DE STRUCTURE GENETIQUE

L'ensemble des souches isolées sont typées avec huit marqueurs microsatellites (ST1A4, ST2C10, ST1D7, ST1E3, ST2E4, ST1E7, ST1G7 (Razavi et Hughes, 2004) et AC0007 (Goodwin *et al.*, 2007)) pour estimer la diversité et la structure génétique du champignon. Une fois amplifiés par PCR, les fragments obtenus sont séparés par électrophorèse verticale sur gel d'acrylamide puis révélés avec une coloration au nitrate d'argent. Les indices de la diversité et de la structure génétique sont calculés à l'aide des logiciels Excel-Stat et Popgen32. Le niveau de la diversité génique (allélique) a été évalué à l'aide de l'indice de Nei (1973), qui repose sur le calcul de la probabilité d'avoir deux allèles différents à un locus donné parmi deux individus tirés au hasard au sein d'une population ou d'une sous-population. Une valeur élevée de cet indice indique un nombre élevé d'allèles. L'indice de Nei, noté H, se calcule selon la formule suivante : $H = 1 - \sum Xi^2$ où Xi est la fréquence de l'allèle i à un locus particulier. La structuration des populations (différenciation des populations) a été évaluée à l'aide de l'indice de G_{ST} qui représente la répartition de la diversité au sein des populations. Des valeurs de $G_{ST} < 0,05$ indiquent une différenciation génétique négligeable tandis que des valeurs de $G_{ST} > 0,25$ démontrent une importante différenciation génétique avec des populations structurées. La différenciation des populations se calcule grâce à la formule $G_{ST} = (Ht - Hs) / Ht$ où Ht est la diversité génétique de la population et Hs est la diversité génétique moyenne parmi les sous-populations.

RESULTATS ET DISCUSSION

CARACTERISATION DE LA POPULATION A L'ECHELLE REGIONALE

Distribution des types sexuels

Sur les 282 souches de *Z. tritici* analysées à l'échelle de la région, 133 (47 %) sont MAT1-1 et 149 (53 %) sont MAT1-2. Les deux types sexuels sont distribués de façon équilibrée dans chaque site et sur l'ensemble du territoire étudié selon le test de χ^2 à $P = 0,05$.

Cette distribution équilibrée témoigne d'une reproduction sexuée active pour le pathogène dans la région Hauts-de-France. En effet, *Z. tritici*, comme pour tous les champignons ascomycètes présentant un hétérothallisme bipolaire, forme huit ascospores au sein d'un même asque lors de la ségrégation des ascospores, avec un ratio identique des deux types sexuels (4:4) (Kema *et al.*, 1996). Il est donc évident que si plusieurs cycles sexuels se succèdent dans la même année, la dissémination des ascospores par le vent tend à homogénéiser les fréquences des deux types sexuels au sein des populations du champignon. Nos résultats concordent avec cette théorie et suggèrent, comme pour les autres populations du pathogène à travers le monde (Zhan *et al.*, 2002), la réalisation de cycles réguliers de recombinaisons sexuées pour *Z. tritici* dans la région Hauts-de-France.

Diversité et structure génétique

Au total, 282 souches sont caractérisées avec huit marqueurs microsatellites. Tous les marqueurs étudiés ont présenté un polymorphisme. Le nombre d'allèles par marqueur varie entre 6 (ST2C10) et 17 (ST1A4), avec une moyenne de 10,4 allèles/marqueur (Tableau II). La population exprime également une diversité génique importante, indiquée par une valeur élevée de l'indice de Nei (Tableau II).

Tableau II : Indices de diversité génique de *Z. tritici* en Hauts-de-France.
(Indices of genic diversity of *Z. tritici* in Hauts-de-France).

Marqueur	Nombre d'allèles	Indice de Nei
ST1A4	17	0.61
ST1E7	8	0.55
ST1E3	9	0.52
ST1D7	15	0.80
ST2E4	8	0.78
ST2C10	6	0.68
ST1G7	7	0.67
AC0007	13	0.37
Moyenne	10,4	0,62

Parmi les 282 souches testées, 280 (99,3 %) sont des haplotypes, c'est-à-dire des génotypes (individus) différents (Figure 1). Ce résultat montre une diversité génotypique extrêmement élevée au sein de la population du pathogène dans le nord de la France (fraction clonale seulement de 0,7 %). Ce résultat est très proche de celui obtenu à l'échelle nationale, correspondant à une proportion d'haplotypes de 84 % (El Chartouni *et al.*, 2011).

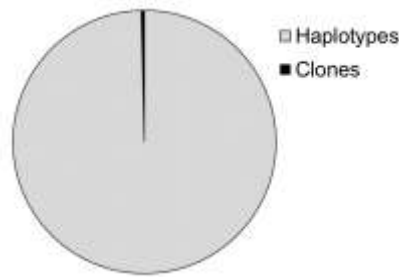


Figure 1 : Proportion d'haplotypes de *Z. tritici* en Hauts-de-France.
(Proportion of *Z. tritici* haplotypes in Hauts-de-France).

L'analyse des résultats avec le logiciel Popgen32 a révélé une structuration de la population régionale ($G_{ST} = 0,27$) en trois groupes génétiques, distribués globalement sur des zones géographiques distinctes (excepté le site G) et qui semblent dépendre de la distance par rapport à la mer de la Manche (Figure 2).

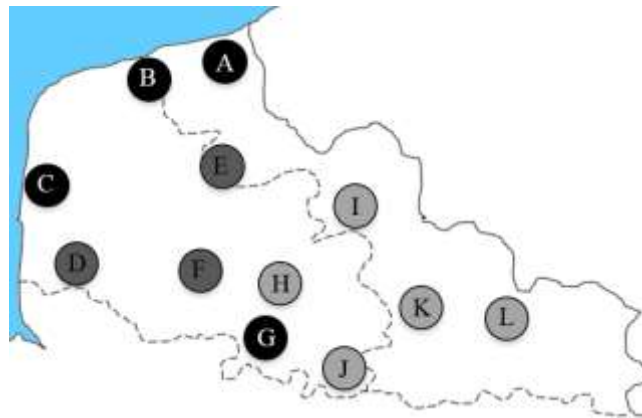


Figure 2 : Structuration de la population de *Z. tritici* en Hauts-de-France en trois groupes génétiques (indiqués par les trois nuances de gris).
(Structuration of *Z. tritici* population in Hauts-de-France into three genetic clusters (indicated by the three shades of gray)).

Cette structuration selon la distance par rapport à la Manche pourrait être expliquée par l'humidité relative et/ou les écarts de température qui peuvent fortement varier entre la côte et l'intérieur des terres. L'effet de la température sur les souches de *Z. tritici* a été démontré (Zhan et McDonald, 2011). Par ailleurs, la structuration obtenue pourrait également être due à la localisation géographique de la région Hauts-de-France, soumise aux vents dominants d'ouest provenant d'Angleterre et qui peuvent introduire des ascospores du champignon à partir de ce pays. En effet, le flux de gènes de *Z. tritici* en Europe suit un gradient ouest-est, en fonction des vents dominants (Torriani *et al.*, 2009). Un tel flux de gènes pourrait provoquer une structuration de la population régionale du pathogène en fonction de la distance à la mer, comme celle observée. Des structurations des populations de *Z. tritici* ont également été rapportées à l'échelle de certains pays comme l'Iran (Abrinbana *et al.*, 2010), la France (El Chartouni *et al.*, 2011) et les États-Unis (Gurung *et al.*, 2011). Ces structurations ont été expliquées par la dérive génétique, l'adaptation du champignon aux conditions agro-climatiques locales et à la présence de barrières géographiques limitant la dissémination des ascospores sur de longues et moyennes distances.

CARACTERISATION DE LA POPULATION A L'ECHELLE DU CHAMP

Parmi les 260 souches issues de deux champs (Lorgies et Tilloy-lès-Mofflaines), 127 (49 %) d'entre elles sont MAT1-1 et 130 (51 %) sont MAT1-2 (trois souches n'ont pas pu être identifiées). Cette distribution équilibrée des deux types sexuels confirme la régularité de la reproduction sexuée du champignon et rapporte une proximité spatiale des deux types sexuels à l'échelle du champ. Cette proximité favorise le contact entre les souches de types hétérothalliques différents, ce qui est nécessaire au processus de la reproduction sexuée.

La caractérisation des souches à l'aide des microsatellites a révélé une diversité génétique relativement élevée à l'échelle du champ (indice de Nei = 0,50), bien que le niveau de cette diversité soit légèrement moins élevé que celui détecté à l'échelle régionale (0,62). Le nombre d'allèles par marqueur varie de 7 (marqueurs ST1E3, ST1E7 et ST2E4) à 17 (marqueur AC0007), avec une moyenne de 10 allèles par marqueur.

Par ailleurs, un total de 217 (83 %) haplotypes (génotypes uniques) et 43 (17 %) clones ont été détectés sur les 260 souches typées (Figure 3). Ce résultat met en évidence une diversité génotypique très élevée pour *Z. tritici* à l'échelle du champ.

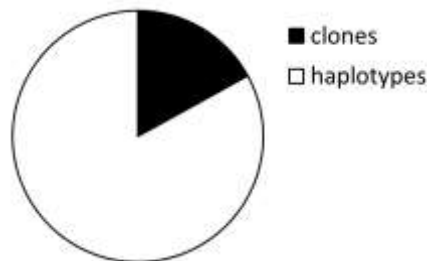


Figure 3 : Proportion d'haplotypes de *Z. tritici* à l'échelle du champ.
(Proportion of *Z. tritici* haplotypes at the field scale).

Pour ce qui concerne le niveau de structuration, un indice relativement faible de G_{ST} (0,08) a été obtenu pour les souches testées. Cette distribution homogène de la diversité génétique à l'échelle du champ serait due aux ascospores disséminées par le vent et qui permettent l'homogénéisation des allèles au niveau du champ. Ce résultat est en accord avec la distribution équilibrée des deux types sexuels obtenue ci-dessus montrant la fréquence des cycles sexués qui sont à l'origine de la formation des ascospores.

CONCLUSION

La distribution équilibrée des deux types sexuels obtenue à l'échelle de la région Hauts-de-France confirme les résultats obtenus précédemment à l'échelle nationale qui ont montré que les deux types sexuels du champignon sont présents en fréquences équilibrées sur l'ensemble du territoire français (Siah *et al.*, 2010). Les résultats ont révélé également une diversité génétique élevée pour la population régionale du pathogène. Celle-ci s'est exprimée à la fois par la fréquence d'haplotypes (99,6 %) et par un indice de Nei très élevé (0,62). Ces données sont en accord avec celles obtenues précédemment pour la population française (El Chartouni *et al.*, 2011) et montrent la présence de brassages sexués réguliers pour *Z. tritici* dans le nord de la France. Une structuration de la population régionale en trois groupes génétiques a été observée. Cette structuration pourrait être due à l'adaptation du pathogène aux conditions climatiques qui varient entre la côte et l'intérieur des terres (humidité relative et/ou écarts de température) ou à l'introduction d'ascospores à partir de l'Angleterre favorisée par les vents d'ouest

dominants. Par ailleurs, les travaux de cette étude ont mis en évidence une diversité génétique très élevée pour *Z. tritici* même à des échelles plus fines comme celle du champ. Ce résultat corrobore la distribution équilibrée des deux types sexuels détectée aux échelles nationale (Siah *et al.*, 2010), régionale et du champ et témoignent du potentiel élevé de diversité génétique résultant de brassages sexuels réguliers du pathogène.

Le contrôle et la durabilité des méthodes de lutte contre *Z. tritici* nécessite une bonne connaissance des populations du pathogène. Par exemple, il est recommandé d'utiliser des souches représentatives des populations ou des sous-populations du champignon dans les essais en conditions contrôlées ou semi-contrôlées permettant l'étude de la résistance variétale ou le screening de nouvelles molécules de synthèse ou de biocontrôle. La prise en compte de l'origine des souches est nécessaire pour mieux adapter les stratégies de lutte, en particulier les méthodes alternatives.

REMERCIEMENTS

Cette étude est financée par le Conseil Régional de Hauts-de-France dans le cadre des projets ARCir (Actions de Recherche Concertée d'initiative régionale) et DEPHY EXPE ECOPHYTO.

BIBLIOGRAPHIE

Abrinbana M., Mozafiri J., Shams-bakhsh M., Mehrabi R., 2010. Genetic structure of *Mycosphaerella graminicola* populations in Iran. *Plant Pathology*, 59, 829-838.

Arvalis-Institut du Végétal, 2013. www.arvalis-infos.fr/maladies-des-cereales-a-paille-septoriose-quelle-nuisibilite-et-quelle-strategie-de-protection--@/view-20824-arvarticle.html (consulté le 29 novembre 2016).

Dean R., Van Kan J.A., Pretorius Z.A., Hammond-Kosack K.E., Di Pietro A., Spanu P.D., Rudd J.J., Dickman M., Kahmann R., Ellis J., Foster G.D., 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13, 414-430.

El Chartouni L., Tisserant B., Siah A., Duyme F., Deweer C., Fichter C., Sanssené J., Leducq J.B., Durand R., Halama P., Reignault Ph., 2011. Genetic diversity and population structure in French populations of *Mycosphaerella graminicola*. *Mycologia*, 103, 764-774.

Goodwin S.B., Van Der Lee T.A.J., Cavaletto J.R., Te Lintel Hekkert B., Crane C.F., Kema G.H.J., 2007. Identification and genetic mapping of highly polymorphic microsatellite loci from an EST database of the *Septoria tritici* blotch pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Fungal Genetics and Biology*, 44, 398-414.

Gurung S., Goodwin S.B., Kabbage M., Bockus W.W., Adhikari T.B., 2011. Genetic differentiation at microsatellite *loci* among populations of *Mycosphaerella graminicola* from California, Indiana, Kansas, and North Dakota. *Phytopathology*, 101, 1251-1259.

Kema G.H.J., Verstappen E.C.P., Todorova M., Waalwijk C., 1996. Successful crosses and molecular tetrad and progeny analyses demonstrate heterothallism in *Mycosphaerella graminicola*. *Current Genetics*, 30, 251-258.

Nei M., 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70, 3321-3323.

Razavi M., Hughes GR., 2004. Microsatellite markers provide evidence for sexual reproduction of *Mycosphaerella graminicola* in Saskatchewan. *Genome*, 47, 789-794.

Siah A., Tisserant B., El-Chartouni L., Duyme F., Deweer C., Fichter C., Sanssené J., Durand R., Reignault Ph., Halama P., 2010. Mating type idiomorphs from a French population of the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*: widespread equal distribution and low but distinct levels of molecular polymorphism. *Fungal Biology*, 114, 980-990.

Torriani S.F.F., Brunner P.C., McDonald B.A., Sierotzki H., 2009. QoI resistance emerged independently at least 4 times in European populations of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Management Science*, 65,155-162.

Zhan J., Kema G.H.J., Waalwijk C., McDonald B.A., 2002. Distribution of mating type alleles in the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* over special scales from lesions to continents. *Fungal Genetics and Biology*, 36, 128-136.

Zhan J., Pettway R.E., McDonald B.A., 2003. The global genetic structure of the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* is characterized by high nuclear diversity, low mitochondrial diversity, regular recombination, and gene flow. *Fungal Genetics and Biology*, 38, 286-297.

Zhan J., McDonald BA., 2011. Thermal adaptation in the fungal pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Molecular Ecology*, 20, 1689-1701.