



N° d'ordre :



# THÈSE

Présentée à

**L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1**

École doctorale Sciences et Environnements

**Par Amira Mougou Hamdane**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : ÉCOLOGIE ÉVOLUTIVE, FONCTIONNELLE ET DES COMMUNAUTÉS

## **Interaction Chêne-oïdium : Caractérisation moléculaire et adaptation locale du parasite, résistance génétique de l'hôte**

Quercus, ITS, espèces cryptiques, invasion biologique, *Erysiphe*, adaptation locale, résistance, QTL

Soutenue le 3 juillet 2009

Après avis de :

Mme Catherine Bastien  
M. Olivier Verneau

Directrice de recherche, INRA Orléans  
Professeur, Université de Perpignan

Rapporteur  
Rapporteur

Devant la commission d'examen formée de :

Mme Catherine Bastien  
M. Olivier Verneau  
M. Jean-Pierre Renaudin  
M. Benoit Marcais  
Mme Marie-Laure Desprez Loustau

Directrice de recherche, INRA Orléans  
Professeur, Université de Perpignan  
Professeur, Université Bordeaux 1  
Chargé de recherche, INRA Nancy  
Directrice de recherche, INRA Bordeaux

Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Examinatrice



## Dédicaces

A l'âme de Feu Saïd Hamdi,

Il a cru en moi et m'a encouragé tout au long du master et de la première année de thèse ; il a été mon soutien moral à Bordeaux. J'aurais aimé qu'il soit là pour assister à l'aboutissement de ce travail pour lui exprimer ma gratitude et mon affection. Que son âme repose en paix !

تغمده الله بواسع رحمته وأسكنه فراديس جنانه

- A papa Abdelaziz et maman Raoudha, A qui je dois ce que je suis,

Qu'ils trouvent ici, le fruit de leurs sacrifices consentis pour mon éducation, et l'expression de mon amour et de ma gratitude pour la bienveillance avec laquelle ils m'ont toujours entourée. Que Dieu leur préserve longue vie et bonne santé.

- A mon mari Walid, qui a su m'encourager même à plusieurs milliers de kilomètres et me soutenir durant les derniers mois de la rédaction. Qu'il trouve ici l'expression de mon amour et de mon affection.
- A mon frère Amine et ma sœur Nadia, Qu'ils trouvent ici l'expression de mon affection. Tous mes souhaits de réussite et de bonheur.
- A toute la famille Mougou, Azzouz et Hamdane
- A l'âme de mes grands parents

## Remerciements

**La rédaction de la thèse est enfiniiiiiiiiiiiiiiiin finie !!!!**

J'exprime mes profonds remerciements à ma directrice de thèse, Dr MARIE LAURE DESPREZ LOUSTAU pour l'aide continue que'elle m'a apportée, pour sa patience et son encouragement à mener à terme ma thèse. Son oeil critique et sa rigueur scientifique m'ont été très précieux pour structurer et parfaire le travail.

Votre soutien moral et votre encouragement jusqu'au bout de cette thèse, m'a permis de finaliser cette expérience et de me préparer à ma future carrière dans la recherche.

Je remercie aussi Dr CYRIL DUTECH pour avoir codirigé ce travail. Sa contribution scientifique dans ce travail et ses nombreux conseils ont été pour moi un grand apport. Il n'a également épargné aucun effort pour me soutenir tout au long de cette thèse.

Merci aux rapporteurs Catherine Bastien et Olivier Vernau ainsi qu'aux examinateurs Benoit Marçais et Jean-Pierre Renaudin d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Que tous les membres de l'équipe de pathologie forestière se trouvent ici remerciés (ALAIN, BRIGITTE, CECILE, CORINNE, JACQUELINE, JEREMIE, SIMONE, MARTINE, OLIVIER, THIBAUT et XAVIER). La très bonne humeur et l'ambiance au sein du groupe m'ont permis de mener mes travaux de recherche de façon très agréable. Les discussions, commentaires et remarques de mes collègues ont contribué au développement et à l'amélioration de ce travail. Je remercie particulièrement MARTINE MARTIN et XAVIER CAPDEVIELLE pour l'aide technique dans cette thèse et Dr CECILE ROBIN pour l'aide à analyser les résultats QTL. Je tiens également à remercier les techniciens du département de la santé des forêts - Ministère de l'agriculture pour avoir réalisé les échantillonnages des lésions d'oidium.

Merci à JEREMIE, OLIVIER, et XAVIER G. qui m'ont rendu la vie insupportable pendant ces quelques années ☺, j'ai quand même survécu à toute la souffrance qu'ils m'ont fait voir ! Je ne pourrais oublier de remercier également SYLVIE et MARIE CECILE pour les bons moments passés ensemble.

Ces quelques années passées à Bordeaux loin de ma famille n'auraient jamais pu passer aussi vite ni être aussi agréables sans la présence de KARIMA, XAVIER et MARTINE. Je tiens aussi à remercier tous mes ami(e)s de Bordeaux et plus particulièrement ANOUAR et SAFAA qui ont toujours su être là quand j'avais besoin d'eux.

## TABLE DES MATIERES

<b>Chapitre 1:Analyse bibliographique.....</b>	<b>17</b>
1. Introduction générale.....	<b>18</b>
1.1. La relation hôte –parasite.....	18
1.1.1. Niveaux de compatibilité entre plantes et parasites.....	20
1.1.2. Facteurs de pathogénicité du parasite.....	21
1.1.3. Mécanismes et déterminisme génétique de la résistance de l’hôte.....	22
1.2. La relation hôte parasite dans les populations.....	25
1.2.1. Diversité des parasites.....	25
1.2.2. Coévolution des populations hôtes et des populations parasites.....	26
1.2.3. Impact du parasitisme sur la diversité.....	28
2. Le modèle d’étude : Oïdium-Chêne.....	<b>30</b>
2.1. Le chêne parmi les essences forestières.....	30
2.1.1. Rôle des forêts dans les écosystèmes et importance économique de la sylviculture...30	30
2.1.2. Le chêne.....	31
2.1.2.1 Présentation.....	31
2.1.2.2 Utilisation.....	32
2.1.2.3 Facteurs affectant la santé des chênes.....	32
2.2. L’oïdium du chêne.....	34
2.2.1. Position taxonomique.....	34
2.2.2. Agent causal et histoire de la maladie.....	35
2.2.3. Cycle biologique.....	37
2.2.4. Impact de la maladie.....	38
2.2.4.1 Symptômes et dégâts de la maladie.....	38
2.2.4.2 Régulation de la maladie.....	39
3. Objectifs de la thèse.....	42
<b>Chapitre 2 : Caractérisation de(s) l’agent(s) pathogène(s) responsable(s) de l’oïdium du chêne en Europe et distribution des différentes espèces identifiées dans les forêts françaises.....</b>	<b>46</b>
1. Introduction.....	46
2. Article 1: New insights into the identity and origin of the causal agent of oak powdery mildew in Europe.....	<b>51</b>
3. Article 2: Spatial distribution of genetically differentiated groups of oak powdery mildew fungi in France, using quick molecular detection methods.....	<b>65</b>
<b>Chapitre 3: Etude de l’adaptation locale de l’agent causal de l’oïdium du chêne à son hôte <i>Quercus robur</i>.....</b>	<b>74</b>
1. Introduction.....	<b>75</b>
2. Article 1: Cross-generation adaptation of a fungal biotroph pathogen to its tree host.....	<b>78</b>
<b>Chapitre 4: Déterminisme génétique de la résistance du chêne à l’oïdium.....</b>	<b>95</b>
1. Introduction.....	96
2. Matériel et méthodes.....	99
2.1. Matériel végétal.....	99

2.2. Evaluation de la sensibilité à l'oïdium en conditions naturelles.....	99
2.3. Inoculations contrôlées.....	100
2.4. Dispositif expérimental.....	101
2.5. Méthodes statistiques.....	102
2.6. Détection de QTL.....	102
2.7. Co-localisation avec d'autres QTL identifiés sur le même croisement.....	103
3. Résultats.....	104
3.1. Croisement intra spécifique <i>Q. robur</i> .....	104
3.2. Croisement inter spécifique <i>Q. robur</i> x <i>Q. petraea</i> .....	112
4. Discussion.....	113
5. Références bibliographiques.....	117
<b>Chapitre 5 : Discussion générale.....</b>	<b>122</b>
1. Principaux résultats acquis sur l'interaction oïdium-chêne et nouvelles pistes de recherches.....	125
1.1. Etiologie de l'oïdium du chêne et histoire de l'invasion en France.....	125
1.2. Adaptation locale des populations d'oïdium.....	129
1.3. Résistance du chêne à l'oïdium.....	132
2. Perspectives de recherche.....	134
Références bibliographiques.....	139



## Liste des tableaux

### Chapitre 1

<b>Tableau 1.1 : Coûts et bénéfices des différentes interactions biotiques.....</b>	<b>19</b>
<b>Figure 1.1 : Différents types de réactions suite à une rencontre hôte-parasite .....</b>	<b>20</b>
<b>Tableau 1.2 : Illustration de la base génétique d'une interaction simple entre un hôte diploïde et un pathogène haploïde.....</b>	<b>22</b>
<b>Figure 1.2 : Représentation schématique de la résistance liée à la reconnaissance précoce et l'interaction entre le produit du gène R et le produit du gène d'avirulence (modèle éliciteur / récepteur) (d'après CANDRESSE Cours Master2, Bordeaux 2).....</b>	<b>22</b>
<b>Figure 1.3 : Représentation des quatre classes de gènes de résistance et des domaines conservés (d'après BAKER <i>et al.</i> 1997).....</b>	<b>24</b>
<b>Figure 1.4 : Les facteurs de dépérissement du chêne (D'après MANION 1981) .....</b>	<b>33</b>
<b>Figure 1.5 : Cycle biologique de l'oïdium du chêne .....</b>	<b>38</b>
<b>Figure 1.6 : Premières manifestations de la maladie (a) pousse drapeau.....</b>	<b>41</b>
<b>(b) premières taches.....</b>	<b>41</b>
<b>Figure 1.7 : Dégâts de l'oïdium de chêne (a) nécroses sur la face inférieure des feuilles (b) feutrage blanc sur la face supérieure (c) et (d) nécrose et flétrissement des feuilles atteintes en fin de saison.....</b>	<b>41</b>
<b>Figure 1.8 : (a) Chasmothèces à différents stades de développement (b) Chasmothèces matures de type Erysiphe (c) Chasmothèce matures de type Phyllactinia .....</b>	<b>41</b>

## Liste des figures

<b>Chapitre 1</b>	
<b>Tableau 1.1 : Coûts et bénéfices des différentes interactions biotiques.....</b>	<b>19</b>
<b>Figure 1.1 : Différents types de réactions suite à une rencontre hôte-parasite .....</b>	<b>20</b>
<b>Tableau 1.2 : Illustration de la base génétique d'une interaction simple entre un hôte diploïde et un pathogène haploïde.....</b>	<b>22</b>
<b>Figure 1.2 : Représentation schématique de la résistance liée à la reconnaissance précoce et l'interaction entre le produit du gène R et le produit du gène d'avirulence (modèle éliciteur / récepteur) (d'après CANDRESSE Cours Master2, Bordeaux 2).....</b>	<b>22</b>
<b>Figure 1.3 : Représentation des quatre classes de gènes de résistance et des domaines conservés (d'après BAKER <i>et al.</i> 1997).....</b>	<b>24</b>
<b>Figure 1.4 : Les facteurs de dépérissement du chêne (D'après MANION 1981) .....</b>	<b>33</b>
<b>Figure 1.5 : Cycle biologique de l'oïdium du chêne .....</b>	<b>38</b>
<b>Figure 1.6 : Premières manifestations de la maladie (a) pousse drapeau.....</b>	<b>41</b>
<b>(b) premières taches.....</b>	<b>41</b>
<b>Figure 1.7 : Dégâts de l'oïdium de chêne (a) nécroses sur la face inférieure des feuilles (b) feutrage blanc sur la face supérieure (c) et (d) nécrose et flétrissement des feuilles atteintes en fin de saison.....</b>	<b>41</b>
<b>Figure 1.8 : (a) Chasmothèces à différents stades de développement (b) Chasmothèces matures de type Erysiphe (c) Chasmothèce matures de type Phyllactinia .....</b>	<b>41</b>

## Résumé

L'oïdium est une des maladies les plus communes sur chêne en Europe. Cette maladie a été signalée à partir du début du 20<sup>ème</sup> siècle. Toutefois, peu de données sont disponibles sur l'identité de l'agent causal et de son interaction avec l'hôte. L'objectif de cette étude est d'améliorer les connaissances sur ce pathosystème : (1) caractériser son agent causal avec un marqueur moléculaire (ADN ribosomal) et étudier la distribution spatiale des différentes lignées ; (2) étudier l'adaptation locale du parasite à son hôte ; (3) explorer le déterminisme génétique de la résistance de l'hôte.

L'étude de l'ADN ribosomal (ITS=Internal transcribed region et IGS= Intergenic spacer) a mis en évidence l'existence de quatre haplotypes, dont trois seulement avaient été associés à des agents d'oïdium sur chêne en Europe. *Erysiphe alphitoïdes*, classiquement considéré comme responsable de l'épidémie du XX<sup>ème</sup> siècle est bien l'espèce prépondérante (environ 80% des détections), *E. hypophylla* et *Phyllactinia* sp étant détectés à fréquence beaucoup plus faible. Un résultat inattendu est la détection d'une quatrième séquence, présentant 100% d'homologie avec celle de plusieurs agents d'oïdium d'arbres tropicaux et avec *Erysiphe quercicola*, très récemment décrit sur chêne en Asie et Australie mais jusqu'alors inconnu en Europe. L'ITS de *E. quercicola* est détecté dans toutes les régions de France, à une fréquence non négligeable (de l'ordre de 15% en moyenne). On le trouve dans les mêmes parcelles et parfois sur les mêmes arbres, voire dans les mêmes lésions que *E. alphitoïdes*.

La mise au point d'une méthode d'inoculation artificielle a permis d'étudier de façon quantitative l'interaction chêne-oïdium. Une expérimentation d'inoculations réciproques montre que les souches d'oïdium sont plus performantes sur les descendants des arbres dont elles ont été isolées que sur ceux d'autres arbres, suggérant une adaptation trans-générationnelle. Des inoculations artificielles, complétées par des observations en conditions naturelles, ont également permis de démontrer un déterminisme génétique de la résistance des chênes, avec l'identification de plusieurs QTL. Certains de ces QTL co-localisent avec des QTL de phénologie, en accord avec l'importance de la résistance ontogénique des chênes à l'oïdium.

L'ensemble de l'étude amène à reconsidérer l'oïdium du chêne comme un probable complexe d'espèces cryptiques, dont l'histoire de l'invasion et la co-existence en Europe restent à préciser. Les résultats acquis sur l'héritabilité de la résistance et l'adaptation locale du parasite constituent une première étape dans la compréhension des interactions démographiques entre hôte et parasite dans ce pathosystème.

**Mots clés:**

Oïdium, chêne, ITS, espèces cryptiques, invasion biologique, *Erysiphe*, adaptation locale, résistance, QTL

## **Abstract**

Powdery mildew is the most common disease on oaks in Europe where it was first recorded at the beginning of the 20<sup>th</sup> century. Yet, little is known about the identity of the causal agent and his interaction with its host. The objective of this study was: (1) to characterize the species responsible of oak powdery mildew with a molecular marker (ribosomal DNA); to study the spatial distribution of these different lineages and (2) to study local adaptation of the parasite to its host (3) to explore the genetic determinism of host resistance.

The study of the ITS (internal transcribed region) and IGS (intergenic spacer) diversity revealed the existence of four haplotypes, only three had been already associated with oak powdery mildew in Europe. *Erysiphe alphitoides*, for a long time considered as sole responsible for the epidemic of the XX<sup>th</sup> century, was the predominant species (~ 80% of detections), *E. hypophylla* and *Phyllactinia sp.* were detected at lower frequencies. An unexpected result is the detection of a fourth sequence which show 100% homology with ITS sequences of several powdery mildew agents of tropical trees and *Erysiphe quercicola*, recently described on oak in Asia and Australia but previously unknown in Europe. *E. quercicola* ITS was detected in all French regions, at a significant frequency (~ 15%). The study showed that *E. alphitoides* was often found in association with different ITS types in the same region, the same tree, and even in the same lesion.

The development of an artificial inoculation method allowed the quantitative evaluation of the oak-powdery mildew interaction. A reciprocal inoculation experiment showed that powdery mildew strains were more efficient on their mother tress and their descendants than on the other trees, suggesting a trans-generational adaptation. Artificial inoculations, supplemented by observations in natural conditions, have also demonstrated a genetic determination of resistance of oak trees, with the identification of several QTL. Some of these QTL co-localize with QTL controlling phenology, in agreement with the importance of oaks ontogenic resistance to powdery mildew.

The entire study leads to reconsider oak powdery mildew as a probable complex of cryptic species; the invasion history and the co-existence in Europe are still to be determined. The

results achieved on the heritability of resistance and localization of the parasite are a first step in understanding the demo-genetic interactions between host and parasite in this pathosystem.

**Key words**

Powdery mildew, oak, ITS, cryptic species, biological invasion, *Erysiphe*, local adaptation, resistance, QTL

## Préambule

Les chênaies, à chêne pédonculé (*Quercus petraea*) et/ou chêne sessile (*Quercus robur*), constituent un écosystème forestier de première importance en Europe, et en France en particulier, par leur étendue, la diversité qu'elles représentent et leurs fonctions environnementale et économique. La conservation des ressources génétiques apparaît comme un enjeu essentiel dans la gestion sylvicole des chênaies. L'UMR BIOGECO a développé un programme de recherche orienté vers l'analyse des mécanismes régissant l'évolution de la diversité à différents niveaux hiérarchiques (communautés, espèces, populations et gènes) dans une perspective de gestion durable des forêts. Les recherches développées au sein de l'UMR ont pour vocation de promouvoir une analyse plus intégrée de la diversité biologique, en considérant les interactions entre diversité des populations hôtes et parasites comme moteurs de son évolution.

L'émergence brutale de l'oïdium en Europe au début du siècle dernier a fait l'objet d'observations alarmistes, de fortes mortalités étant attribuées à la maladie. Après cette période explosive, l'oïdium est resté très fréquemment observé sur chênes pédonculés, sessiles et tauzins mais l'impact actuel de la maladie semble plus modéré, à l'exception de problèmes en régénérations et jeunes plantations et la contribution à certains dépérissements. L'impact de l'oïdium sur la dynamique et la génétique des populations de chênes n'ont jamais été abordés. D'une façon générale, l'interaction chêne – oïdium a été très peu étudiée. Le travail de thèse a pour objectif de caractériser cette interaction au plan phénotypique et génétique, dans une perspective de compréhension du rôle de l'interaction dans la dynamique de la biodiversité des espèces hôte et parasite.

Ce manuscrit présente les résultats du travail de thèse portant sur l'interaction oïdium-chêne, sur deux aspects : la résistance de l'hôte et l'adaptation du parasite. Les deux chapitres concernant l'identification de l'agent causal et sa distribution ont déjà fait l'objet de publications dans des journaux à comité de lecture, les deux autres parties seront également publiées prochainement.

Le manuscrit de thèse est articulé en 5 grands chapitres. Le premier chapitre introduit le sujet et reprend toutes les données bibliographiques en rapport avec le couple oïdium-chêne et leur interaction. Chaque chapitre est structuré comme un article indépendant ; il peut donc être lu individuellement. Un article est déjà publié et un autre soumis dans des journaux

internationaux à comité de lecture. Deux autres sont prévus. Le premier chapitre concerne la caractérisation moléculaire de l'agent pathogène et sa structuration spatiale en France.

Le deuxième chapitre est composé de deux parties ; la première portant sur la détermination moléculaire des agents responsables de l'oïdium du chêne en Europe et la deuxième partie décrivant la distribution de ces différentes « espèces » et leurs proportions relatives en France.

Le troisième chapitre concerne l'adaptation locale de l'oïdium du chêne à son hôte. Le quatrième chapitre porte sur l'étude de la résistance du chêne à l'oïdium et notamment sur la recherche de QTL régissant cette résistance.

Enfin, la conclusion générale synthétisant les résultats de ce travail de thèse et leurs perspectives seront présentées dans la 5<sup>ème</sup> partie.



# **Chapitre 1**

## **Analyse bibliographique**

# Chapitre 1 : Analyse bibliographique

## 1. Introduction générale

Ce travail a pour objectif de caractériser l'interaction chêne-oïdium sur les plans phénotypique et génétique dans une perspective de compréhension du rôle de cette interaction dans la biodiversité des espèces hôtes et parasites. Malgré le caractère très commun de la maladie de l'oïdium des chênes cette interaction a été très peu étudiée. Dans cette partie bibliographique, nous donnerons dans un premier temps un aperçu général sur les différents aspects des interactions hôtes (en particulier plantes)-parasites, tant au plan génétique et moléculaire qu'au niveau des populations et communautés. Nous présenterons ensuite notre modèle d'étude « le couple chêne-oïdium » ainsi que l'intérêt du choix de ce modèle. Nous finirons par définir les différents objectifs et outils de cette étude.

### 1.1. La relation hôte –parasite

Une interaction biotique désigne un processus impliquant des échanges ou relations réciproques entre deux ou plusieurs éléments (espèces, groupes..) dans un écosystème (relations interspécifiques), ou entre deux ou plusieurs individus d'une même population (relations intraspécifiques). Il existe plusieurs types de relations rendant les individus plus ou moins interdépendants, dont les principales sont (RICKLEFS & MILLER 2000 ; MITCHELL *et al.* 2006 ; SARGENT & ACKERLY 2008):

- Neutralisme : absence d'interaction concurrentielle ou mutualiste entre deux espèces ; ni le bénéfice, ni le détriment d'une espèce sur l'autre ne sont mesurables.
- Concurrence : interaction indirecte, de type compétition pour une ressource insuffisante pour deux espèces occupant une même niche écologique ;
- Facilitation : interaction entre deux individus bénéficiant au moins pour l'un d'entre eux sans causer de dommages à l'autre (STACHOWIZ 2001).
- Amensalisme : interaction biologique entre deux espèces dans laquelle une espèce inhibe le développement de l'autre.

- Mutualisme : association entre deux espèces vivantes, à bénéfices réciproques ; dans le cas d'une association obligatoire, la relation est appelée symbiose (PIDWIRNY 2006).

- Commensalisme : association entre deux espèces dont une seule tire profit sans pour autant nuire à l'autre.

Les limites sont parfois peu distinctes entre ces types d'interactions biotiques. Pour résumer, on parle de concurrence lorsque que la présence d'un organisme A a un effet négatif sur les performances d'un organisme B. Cet effet peut être réciproque (compétition) ou unilatéral (amensalisme). D'autre part, on appelle facilitation la situation entre deux organismes qui présente un effet positif, qu'il soit réciproque (mutualisme) ou unilatéral (commensalisme).

- Parasitisme : Interaction durable entre deux organismes d'espèces différentes dont l'un tire bénéfice (le parasite) au détriment de l'autre (l'hôte).

La définition du parasitisme requiert que :

(1) Le parasite soit incapable de vivre par lui-même au moins pour une partie de son cycle. Il vit, se nourrit, s'abrite et se reproduit aux dépens de l'hôte ; sa « fitness » ou valeur sélective moyenne dépend de l'interaction avec son hôte;

(2) L'hôte souffre de la présence du parasite (affaiblissement, maladie) de façon à ce que sa valeur sélective moyenne soit plus faible lorsqu'il est en interaction avec le parasite que lorsqu'il ne l'est pas.

(3) La notion d'interaction durable différencie le parasitisme de la prédation (Combes 2001).

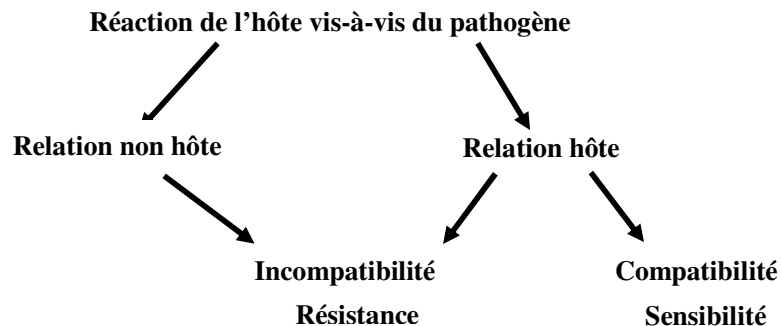
Les bénéfices et les coûts de chacune de ces interactions biotiques sont rapportés dans le tableau 1.1.

**Tableau 1.1 : Coûts et bénéfices des différentes interactions biotiques**

	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>Interaction</i>
<b><u>Bénéfices</u></b>			
<b>réciproques</b>	+	+	Mutualisme
<b>uniques</b>	+	0	Commensalisme
	+	-	Parasitisme, Prédation, Broutage
<b><u>Coûts</u></b>			
<b>réciproques</b>	-	-	Compétition
<b>uniques</b>	-	0	Amensalisme, Facilitation

### 1.1.1 Niveaux de compatibilité entre plantes et parasites

Les plantes, productrices de composés carbonés à partir de molécules inorganiques grâce à la photosynthèse, sont une cible privilégiée pour de nombreux organismes hétérotrophes, herbivores ou pathogènes, champignons, virus, bactéries, insectes et nématodes. La rencontre entre un organisme parasite potentiel et une plante peut avoir différents résultats dépendant du niveau de compatibilité entre les deux acteurs de cette relation. La figure 1.1 présente une arborescence dichotomique des résultats possibles de cette rencontre.



**Figure 1.1 : Différents types de réactions suite à une rencontre hôte-parasite**

Les principaux concepts liés à cette interaction sont (DURAND-TARDIF & PELLETIER 2003 ; LEPOIVRE 2003) :

\* Réaction non hôte : Incompatibilité entre tous les génotypes d'une espèce végétale et tous les génotypes d'un parasite déterminé. Elle se manifeste par une incapacité de l'espèce de pathogène à infecter cette espèce de plante (ex : agent de l'oïdium du chêne sur blé)

\* Réaction hôte incompatible : Au sein d'une espèce de plante sensible à une espèce de pathogène, elle décrit l'interaction hôte-parasite où se produit un arrêt précoce de la croissance du parasite et de la colonisation de l'hôte. Elle a lieu quand un génotype pathogène non virulent attaque un génotype hôte résistant (ex : races non virulentes d'oïdium du Blé sur certaines variétés de Blé). La plante est résistante : Il y a peu ou pas de développement du pathogène; peu ou pas de symptômes sur l'hôte ni de dommages agronomiques. Cette résistance se caractérise souvent par une réaction nécrotique localisée, dite hypersensibilité.

\* Réaction hôte compatible : Au sein d'une espèce de plante sensible à une espèce de pathogène, elle décrit l'interaction hôte-parasite qui aboutit à une multiplication plus ou moins active du pathogène et à une colonisation de tout ou partie de l'hôte par ce dernier. La plante

hôte est sensible ; elle présente des symptômes de maladie et éventuellement des dégâts agronomiques.

### 1.1.2 Facteurs de pathogénicité du parasite

En pathologie végétale, la virulence représente la capacité d'une souche/ pathotype à infecter une plante hôte dite sensible et à se reproduire dessus. L'agressivité est un caractère quantitatif, il concerne l'intensité des symptômes chez un hôte sensible suite à une attaque d'un pathogène virulent. Ce caractère varie en fonction de l'hôte, du parasite et de l'environnement. Ce trait diffère de la valeur sélective moyenne du parasite (ANDRIVON 1993).

Les toxines sont les composés qui sont produits par le pathogène et qui causent une partie ou tous les symptômes d'une maladie. Des études génétiques et biochimiques ont révélé, que les toxines sont en partie les déterminants de spécificité des interactions hôte-pathogène. Dans de tels cas, la résistance ou la sensibilité au champignon corrélerent avec l'insensibilité ou la sensibilité à la toxine. Deux catégories de toxines peuvent être définies sur base de leur rôle dans la pathogénèse (LEPOIVRE 2003).

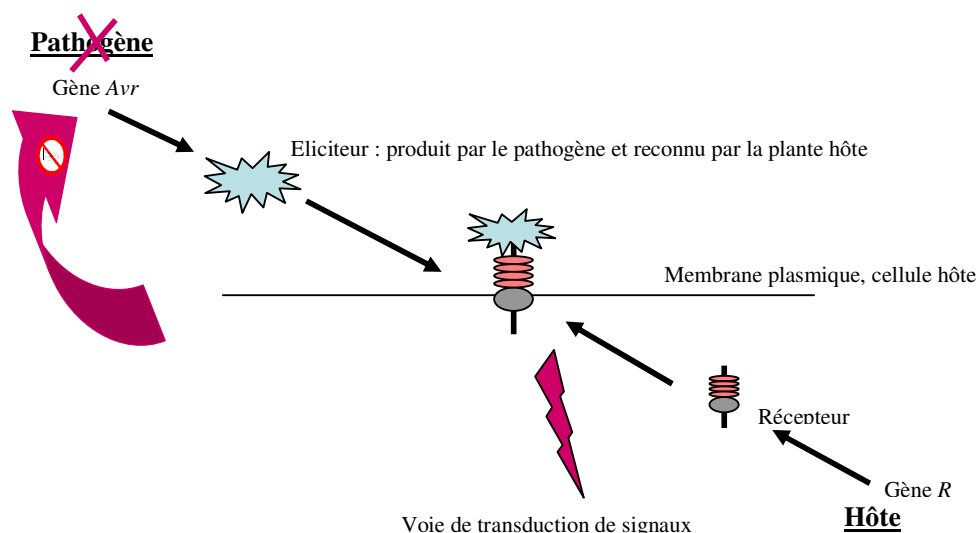
- les déterminants primaires du pouvoir infectieux qui interviennent lors de l'initiation de l'infection et du développement des symptômes
- les déterminants secondaires du pouvoir pathogène qui modifient l'intensité des symptômes (sans être liés à la compatibilité ou à l'incompatibilité de la relation parasitaire)

L'interprétation des données génétiques amène à considérer la relation incompatible entre un hôte et un parasite comme un événement spécifique qui nécessite l'interaction des produits de deux gènes : un gène d'avirulence du parasite et un gène de résistance de la plante (Figure 2). C'est cette reconnaissance qui aboutit à la cascade de signaux entraînant la mise en place du processus de résistance. Avant d'être confirmé au niveau moléculaire, le modèle « gène pour gène » avait été établi par FLOR (1955) en analysant le pathosystème de la rouille du Lin (causée par *Melampsora lini*). Ce modèle s'est vérifié pour de nombreuses autres interactions (exemple : tomate/*Fulvia fulva* (JONES *et al.* 1994), *Nicotiana sylvestris*/virus de la mosaïque du tabac (CULVER *et al.* 1994) (Tableau 1.2).

**Tableau 1.2 : Illustration de la base génétique d'une interaction simple entre un hôte diploïde et un pathogène haploïde**

Génotype de l'hôte	Génotype de l'agent pathogène	
	Avr	avr
	R/R ou R/r	Incompatible
r/r	Compatible	Compatible

La relation compatible entre une plante hôte et un agent pathogène virulent résulterait au contraire de l'absence d'induction des mécanismes de défense, de leur suppression, de leur contournement ou de leur ralentissement par les biotypes virulents.



**Figure 1.2 : Représentation schématique de la résistance liée à la reconnaissance précoce et l'interaction entre le produit du gène R et le produit du gène d'avirulence (modèle éliciteur / récepteur) (d'après CANDRESSE Cours Master2, Bordeaux 2)**

### 1.1.3 Mécanismes et déterminisme génétique de la résistance de l'hôte

Deux grands types de résistance des plantes aux maladies ont été classiquement distingués. La première forme de résistance est régie par des gènes dominants avec des effets majeurs, aussi appelés gènes majeurs, avec une ségrégation discontinue pour les génotypes de la résistance (1 ou 0) et la seconde gouvernée par plusieurs gènes, aussi appelés gènes mineurs, avec des petits effets cumulatifs et une distribution continue de génotypes résistants. La résistance associée à des gènes majeurs a été aussi décrite par plusieurs auteurs comme la résistance verticale, la résistance qualitative, la résistance race spécifique, la résistance instable, la résistance totale. La résistance à gène mineur a été aussi décrite comme la résistance horizontale, la résistance polygénique, la résistance quantitative, la résistance non-

race spécifique, la résistance stable, la résistance partielle, la résistance générale, la résistance en champ (BLACK *et al.* 1953; MALCOLMSON & BLACK 1966 ; VAN DER PLANK 1968).

Pour la résistance qualitative, environ 30 gènes de résistance dominants ont été clonés à ce jour à partir de plantes modèles ou de plantes cultivées (MARATHE *et al.* 2002 ; BAKKER *et al.* 2006 ; SOLOMON-BLACKBURN & BARKER 2006). Les gènes identifiés dans la résistance des plantes aux pathogènes sont regroupés en quatre grandes classes selon leur structure, la plus importante étant celle des gènes de type NBS-LRR (Figure 1.3). Les cinq principaux domaines structuraux déjà identifiés sont (NOIR & LASHERMES 2000 ; YOUNG 2000):

\* Le domaine LRR (Leucine Rich Repeats): Répétition d'un motif de taille variable qui intervient dans les mécanismes d'interactions protéine – protéine et qui est lié à l'interaction éliciteur - récepteur

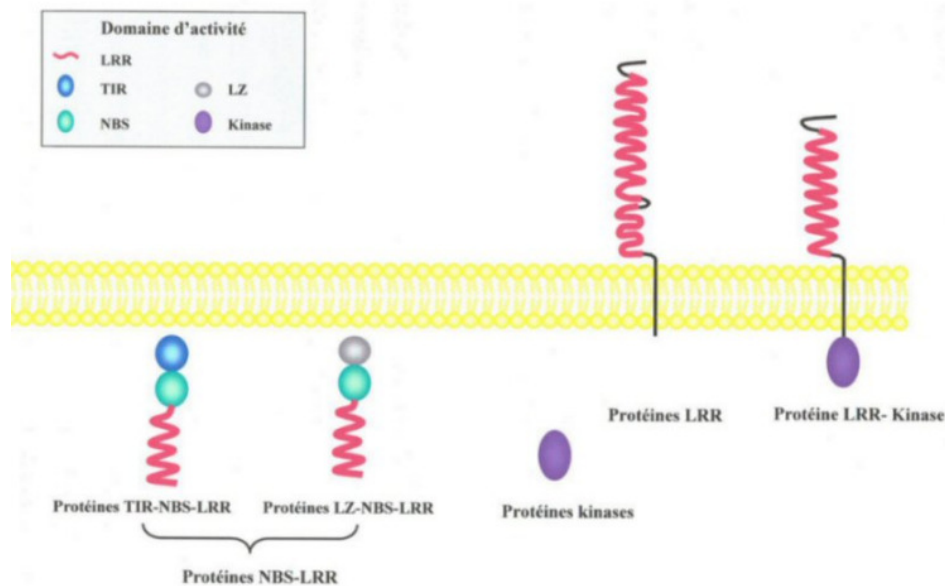
\* Le domaine NBS (Nucleotide Binding Site) : Site de fixation et d'hydrolyse des nucléotides ATP et GTP.

\* Le domaine TIR (Toll Interleukin Receptor): impliqué dans la signalisation cellulaire de la résistance.

\* Le domaine LZ (Leucine Zipper): joue un rôle dans l'homo ou l'hétérodimérisation des protéines.

\* Le domaine Sérine/thréonine kinase: seul ou en association avec le domaine LRR, associé dans les réactions de phosphorylation lors de la transduction du signal.

Il ne semble pas exister, dans ces classes de gènes de lien entre structure du gène et type de pathogène reconnu mais quelques spécificités selon le groupe taxonomique de l'hôte. Toutefois, des homologies très fortes se retrouvent entre des gènes de spécificités différentes (DANGL & JONES 2001 ; DURAND-TARDIF & PELLETIER 2003). Plusieurs études ont été réalisées sur des gènes de résistance en familles multigéniques largement distribuées dans le génome des plantes. Plus de 200 gènes associés en clusters et représentant ~1% des gènes ont été identifiés chez *Arabidopsis* (BAKKER *et al.* 2006 ; RICHLIY *et al.* 2002).



**Figure 1.3 : Représentation des quatre classes de gènes de résistance et des domaines conservés (d'après BAKER *et al.* 1997)**

En plus des gènes majeurs de résistance impliqués dans la relation incompatible, de nombreux autres gènes peuvent être impliqués dans la résistance dite générale. Cette résistance implique une résistance partielle mais efficace contre toutes les races d'une espèce de pathogène donné. Elle affecte diverses caractéristiques phénotypiques du pathogène en faisant appel à divers mécanismes pour limiter l'infection tels que la lignification, la production de molécules antibiotiques (phytoalexines). Les études sur la résistance quantitative ont montré que quelques caractéristiques phénotypiques peuvent changer selon l'âge de la plante, le stade de développement, ou le type de tissu ; ce type de résistance est appelé résistance ontogénique. Dans certains cas, les plantes développent une résistance accrue à des infections ultérieures. Des stimuli spécifiques (éliciteurs) entraînent une cascade de signaux, qui permet l'activation d'une résistance générale et non spécifique (à large spectre, « broad-spectrum), systémique, c'est-à-dire dans l'ensemble de la plante (RYSALS *et al.* 1996). La SAR (pour Systemic Acquired Resistance) s'accompagne de l'accumulation d'acide salicylique et de l'apparition de protéines PR (Pathogenesis Related) impliquées dans cette résistance (KLARZYNSKI & FRITIG 2001). Le deuxième type de résistance générale induite est la résistance systémique induite (ISR). Le mécanisme est similaire à celui de la SAR. Cependant, l'ISR n'est pas accompagnée de la synthèse des PR protéines. Les régulateurs de croissance végétale, synthétisés suite à une blessure sont impliqués dans la mise en place de l'ISR (MAUCH-MANI & METRAUX 1998). Il a été montré que chez



*Arabidopsis thaliana*, l'activation simultanée de la SAR et de l'ISR conduisait à une résistance plus importante que chacune d'elle prise séparément (WEES *et al.* 2000).

L'existence de processus voire de gènes communs aux différents types de résistance, non-hôte, spécifique et générale est un domaine actif de recherche (MYSORE & RYU 2004, DOWKIW & BASTIEN 2004). L'étude des résistances polygéniques a récemment profité de l'approche dite quantitative trait loci (QTL) (QI *et al.* 1998; YULING *et al.* 2003), fondée sur l'utilisation de marqueurs d'ADN (TANKSLEY *et al.* 1995), qui sera développée dans le Chapitre 3.

## **1.2. La relation hôte parasite dans les populations et les communautés**

### **1.1.4 Diversité des parasites**

ROHDE (1982) a évalué l'importance du parasitisme en estimant le nombre d'espèces parasites dans chacun des taxa importants dans plusieurs groupes taxonomiques et a montré que 40 % des espèces connues sont parasites. Le parasitisme est très fréquent dans certains groupes et absent ou rare dans d'autres. Toutefois, les espèces parasites, souvent de très petite taille, sont encore mal connues. Le concept même d'espèce, en particulier chez les champignons, est parfois difficile à appréhender dans ces groupes.

Le concept d'espèce chez les champignons a évolué depuis des descriptions strictement morphologiques à des définitions basées sur la phylogénie (HIBBETT *et al.* 1995; VILGALYS 1991). Plusieurs auteurs ont proposé des délimitations d'espèces basées sur l'utilisation de plusieurs critères. BRASIER (1997) a défini l'espèce comme étant l'ensemble des unités de population principales partageant un patrimoine héréditaire commun et des caractères physiologiques, écologiques et morphologiques semblables. Les caractères les plus importants seraient ceux associés à la niche écologique, quoique des différences morphologiques mineures, souvent quantitatives, soient plus généralement utilisées pour délimiter les espèces de champignons (HARRINGTON & RIZZO 2002). Dans le concept de HARRINGTON & RIZZO (2002), les individus d'une même espèce sont non seulement les descendants d'un ancêtre commun, isolés des espèces proches pour la reproduction, mais ils possèdent également des caractères phénotypiques uniques. Des marqueurs moléculaires sont souvent corrélés aux caractères phénotypiques pour la délimitation des espèces, fournissant ainsi d'excellents outils d'identification, mais ne pouvant pas affirmer à eux seuls l'existence d'une espèce nouvelle.

L'analyse des séquences d'ADN a permis d'établir avec succès des apparentements dans les champignons au niveau famille, ordre et classe, mais les relations au niveau de

l'espèce exigent des régions d'ADN fortement variables (TAYLOR *et al.* 2000 ; NILSSON 2008). La séquence la plus utilisée chez les champignons au niveau du genre et pour l'identification des espèces, est l'Internal Transcribed Region (ITS) de l'ADN ribosomal (HORTON & BRUNS 2001; BRIDGE *et al.* 2005, Nilsson *et al.* 2008). Un des avantages des gènes du rDNA, de l'ITS et de l'IGS (Intergenic Spacer Region) est leur présence en un nombre élevé de copies, en tandem ainsi que l'uniformité de ces copies dans l'évolution.

Même avec les régions fortement variables d'ADN, les descendants d'espèces ayant divergé relativement récemment peuvent ne pas montrer de différences de séquence. En effet, des espèces morphologiquement ou écologiquement différentes peuvent avoir la même séquence d'ITS (exemple de différentes espèces du genre *Armillaria*) (HARRINGTON & POTIER 1997). Réciproquement, différents niveaux de variabilité infra-spécifique de l'ITS ont été mis en évidence chez les champignons (NILSSON *et al.* 2008).

D'autres régions ont donc été utilisées pour l'identification des espèces tels que l'ADN mitochondrial (HEBERT *et al.* 2003; LITTLE & STEVENSON 2007; SEIFERT *et al.* 2007) ou l'histone et la  $\beta$ -tubuline (GLASS & DONALDSON 1995). La difficulté associée avec le design des amorces et l'amplification de faibles quantités d'ADN suggèrent que l'ADN ribosomal restera le plus fréquemment utilisé dans le futur proche (TAUTZ *et al.* 2003; BRUNS & SHEFFERSON 2004; BLAXTER *et al.* 2005). L'ITS et la grande sous unité ribosomale 28S ont été notamment utilisés pour proposer des phylogénies chez les Erysiphales, ordre regroupant les champignons associés aux oïdiums (TAKAMATSU *et al.* 1998 ; TAKAMATSU *et al.* 1999 ; TAKAMATSU & MATSUDA 2004 ; TAKAMATSU *et al.* 2007).

### **1.1.5 Coévolution des populations hôtes et des populations parasites**

La compréhension de la coévolution dans les interactions hôte-parasite dans les populations structurées est un domaine important de recherche de la biologie évolutive (DYBDAHL & STORFER 2003). L'hypothèse fondatrice est celle de « la Reine rouge » ou « Red Queen », émise par (VAN VALEN 1973) qui suggère que les interactions entre espèces sont le principal moteur de l'évolution. En effet la théorie de Van Valen suggère que toute espèce hôte est confrontée à un environnement biotique (espèces prédatrices, pathogènes) changeant, qui nécessite en permanence de nouvelles co-adaptations pour éviter l'extinction. La théorie de la Reine Rouge pourrait ainsi expliquer l'avantage évolutif du maintien de la reproduction sexuée qui permet de développer rapidement un nouveau potentiel génétique de défense contre les parasites. L'avantage de la reproduction sexuée provient de la production de phénotypes rares, qui échappent plus probablement à l'infection ou à la prédation par des

ennemis biologiques en coévolution. Comme beaucoup d'hypothèses de biologie évolutive, l'hypothèse de la « Red Queen » est difficile à tester, mais ses prédictions peuvent être évaluées. Une prédiction critique est que les ennemis biologiques seront préférentiellement adaptés au phénotype d'hôte le plus commun ; plusieurs études ont réussi à le démontrer (LIVELY *et al.* 1990).

La variation spatiale dans les interactions hôte-parasite est une force majeure dans les processus de coévolution et dans le maintien de la biodiversité. Une conséquence de la coévolution hôte-parasite est la mise en place d'une adaptation locale du parasite à son hôte local. Ce phénomène est défini comme une meilleure performance des parasites sur leurs hôtes d'origine que sur une plante hôte appartenant à une population distante (KALTZ & SHYKOFF 1998 ; KAWECKI & EBERT 2004). GANDON *et al.* (1996) et GANDON & MICHALAKIS (2002) ont montré que ce phénomène est rendu plus complexe par la dynamique de métapopulation : celui de l'hôte ou du parasite qui a le flux de gènes le plus important est adapté localement. Cependant, des facteurs tels que la distribution, la dispersion ou la dépendance à l'hôte ont une forte influence sur la dynamique de la coévolution des interactions parasite-hôte (THOMPSON 1999) et peuvent donc influencer l'adaptation locale. La mise en place d'une adaptation locale n'a pas pu être démontrée pour tous les couples hôte-parasite étudiés (LAJEUNESSE & FORBES 2002).

La coévolution hôte-parasite conduit au polymorphisme de la virulence du parasite et des gènes de résistance de l'hôte (FRANK 2002). En effet, un polymorphisme phénotypique pour la résistance de l'hôte et l'agressivité/la virulence du parasite a été mis en évidence dans les populations naturelles en comparant la réaction des plantes hôtes suite à l'infection par différentes souches de parasites. Plusieurs études de la coévolution hôte-parasite ont porté sur le couple *Linum marginale*/*Melampsora lini* et ont montré l'existence de différents phénotypes de résistance de *L. marginale* en fonction de leurs réponses aux pathotypes de *M. lini*. Cette étude a également montré que les changements dans la relation hôte-parasite peuvent être très rapides (BURDON & THOMSON 1995). Une diversité dans la résistance a été mise en évidence dans les populations sauvages (BURDON *et al.* 1996) mais également entre populations d'une métapopulation (BURDON *et al.* 1999).

Il a longtemps été prédit que la résistance avait un coût sur la valeur sélective moyenne de l'hôte, toutefois l'importance de ce coût sur la maintenance du polymorphisme des gènes de résistance reste controversé (BURDON & THRALL 2003). Une méta-analyse entreprise par BERGELSON & PURRINGTON (1996) sur 88 pathosystèmes a montré peu d'arguments pour l'existence d'un coût sur la valeur sélective moyenne de l'hôte associée à la résistance. La

question de coûts sur la « fitness » associés à la virulence et la résistance n'est donc pas encore résolue avec certitude.

### **1.1.6 Impact du parasitisme sur la diversité**

Par définition, les parasites réduisent la valeur sélective moyenne de leurs hôtes ; ils peuvent ainsi conduire certaines populations voire espèces à l'extinction et menacer des espèces en voie de disparition (HUDSON *et al.* 2006). Une démonstration *a contrario* de l'effet négatif du parasitisme est fournie par le succès des espèces invasives, « débarrassées » de leurs parasites d'origine, selon l'hypothèse d' « enemy release ». Ainsi les espèces invasives de plantes échappent aux parasites existant dans leur milieu d'origine, ce qui explique une partie de leur avantage sélectif (TORCHIN *et al.* 2001 ; MITCHELL & POWER 2003). Les extinctions liées au parasitisme ne sont pas le cas général. Selon la théorie de la Reine Rouge, les interactions hôte-parasite, incluant plantes-pathogènes, se caractérisent par des cycles basés sur la sélection fréquence-dépendante (THOMPSON & BURDON 1992; BERGELSON *et al.* 2001), entraînant une diversité génétique dans le temps et dans l'espace.

Les pathogènes peuvent aussi avoir des effets indirects sur les communautés quand ils influencent le comportement de l'hôte en augmentant la sensibilité aux prédateurs. En effet, une étude entreprise par HUDSON *et al.* (1992) sur les lagopèdes d'Écosse (*Lagopus lagopus scoticus*) a montré que les prédateurs chassent sélectivement les individus lourdement parasités. PACKER *et al.* (2003) a aussi démontré que la suppression des prédateurs est plus susceptible d'être préjudiciable lorsque le parasite est très virulent.

D'une façon plus générale, le rôle des parasites dans l'organisation et le fonctionnement des écosystèmes est de plus en plus reconnu (Cattadori et al 2004). Étant donné que beaucoup de parasites sont hôtes-spécifiques, une communauté riche en espèces de plantes hôtes devrait aussi être riche en espèces de parasites et vice versa. Ainsi, est née l'hypothèse qu'un écosystème diversifié et sain devrait aussi être un écosystème avec beaucoup de parasites (LAFFERTY 2003). Les études moléculaires de coévolution ont démontré que la pression parasitaire aboutit à la diversité chez l'hôte. Toutefois, les résultats de quelques études écologiques comparant la diversité parasitaire et celle de l'hôte n'ont pas réussi à mettre en évidence une relation significative entre la richesse de l'écosystème en espèces de parasites et la diversité génétique de l'hôte (THOMPSON 1994 ; POULIN *et al.* 2000).

: A l'instar de l'hypothèse de la Reine Rouge, Janzen (1970) et Connell (1978) ont avancé l'hypothèse (dite ultérieurement de Janzen-Connell) que les interactions biotiques sont un moteur de la dynamique des communautés, expliquant notamment le maintien de la diversité spatiale. Ainsi, la forte biodiversité spatiale s'expliquerait par l'action densité-dépendante de la prédation qui réduit la probabilité que des plants de la même espèce s'établissent aux alentours de l'arbre mère (JANZEN 1970; CONNELL 1978). Bien que l'hypothèse de JANZEN-CONNELL ait été mise en évidence en premier dans les forêts tropicales (AUGSPURGER 1983) elle a été vérifiée ultérieurement dans les forêts tempérées (PACKER & CLAY 2000) aussi bien que dans d'autres habitats (MILLS & BEVER 1998).

## **2. Le modèle d'étude : Oïdium-Chêne**

L'analyse et la compréhension des interactions entre populations hôtes et populations parasites doit être faite en couplant l'épidémiologie et la génétique des populations. Deux grandes questions se dégagent alors pour l'étude de cette interaction :

- Connaître la maladie : quels sont les agents pathogènes responsables et quelle est leur importance respective?
- Etudier l'interaction entre ces deux populations du côté de l'hôte en essayant d'étudier sa résistance et du côté du parasite en regardant sa spécificité à son hôte.

Le choix du modèle d'étude Oïdium-chêne s'inscrit dans le projet de recherches de l'UMR BioGeCo (Biodiversité, Gènes et Communautés). L'importance des chênaies en France et dans la région Aquitaine en particulier justifie les études entreprises par les chercheurs de l'UMR sur la dynamique démo-génétique des populations de chênes. La problématique de l'interaction du chêne et de son cortège d'ennemis naturels s'est alors posée. L'oïdium étant une maladie très répandue sur chêne en Europe et en France, l'hypothèse de l'intervention de cet agent pathogène dans la distribution spatiale et temporelle de la variabilité génétique des populations de chêne a ainsi été formulée.

### **2.1. Le chêne parmi les essences forestières**

#### **2.1.1. Rôle des forêts dans les écosystèmes et importance économique de la sylviculture**

Les forêts ont une grande importance aussi bien au niveau environnemental que socio-économique. La superficie du couvert forestier, comprenant les forêts naturelles et les plantations, a été estimée à 3 454 millions d'hectares en 1995, soit environ un quart des terres émergées de la planète. Près de 55 pour cent des forêts du monde se situent dans les pays en voie de développement, 45 pour cent dans les pays développés (Source : FAO 1999).

Les forêts naturelles sont les plus grands dépositaires de la diversité biologique terrestre (diversité des écosystèmes, des espèces et des ressources génétiques) et la diversité est un facteur essentiel au maintien des fonctions de la forêt. Les forêts ont de nombreux effets favorables parmi lesquels nous pouvons citer la séquestration du carbone et par conséquent la lutte contre les changements climatiques.

La surface des forêts françaises s'accroît fortement depuis la deuxième moitié du 19<sup>e</sup> siècle. On estime que la surface boisée de la France était comprise entre 8,9 et 9,5 millions d'hectares en 1830. Elle est actuellement de 14,9 millions d'hectares soit une progression de l'ordre de 6 millions d'hectares en 170 ans (65 % environ) (CINOTTI 1996). Le volume de bois sur pied dans les forêts françaises est estimé actuellement à 2,13 milliards de m<sup>3</sup>. Il a augmenté de 15 % en 10 ans (Source : IFN 2005).

La filière de la sylviculture occupe une position importante sur le plan national par le nombre d'emplois salariés pour les activités d'exploitation forestière, de fabrication de pâtes à papier, de papier et carton et notamment pour la région Aquitaine. L'impact de la filière sur le tissu économique régional est majeur, avec environ 10 % de l'emploi industriel (environ 25 000 emplois directs) (Source : PFEC Aquitaine 2006).

Du fait de sa diversité climatique, géologique et topographique, la France possède des forêts riches et variées. Le nombre d'essences par peuplement, varie beaucoup et se situe en moyenne autour de 2,3. En effet, 32 % des forêts sont constituées d'une seule essence, 30 % de deux essences. Les forêts les plus riches (5 essences et plus) se trouvent à l'Est de la France. Dans ces peuplements, les essences les plus importantes sont des feuillus à savoir le chêne pédonculé, le hêtre, le chêne sessile, le châtaignier et le pin sylvestre. D'une manière générale, les forêts de feuillus, et plus particulièrement les futaies, sont plus riches en essences que les forêts de conifères alors que le massif landais (84 % de pin maritime) et le pourtour méditerranéen sont caractérisés par des peuplements pauvres en essences forestières (taillis de chêne pubescent et de chêne vert et de futaies de pin sylvestre ou de pin d'Alep).

## **2.1.2. Le chêne**

### **2.1.2.1. Présentation**

Le Chêne (*Quercus*) appartient à la famille *Fagaceae* avec plusieurs centaines d'espèces dans le monde, dont une vingtaine en Europe, certaines à feuilles caduques, d'autres à feuilles persistantes (chênes méditerranéens). Les chênes poussent généralement dans les régions où les précipitations sont modérées, ils affectionnent les flancs de collines où ils trouvent des conditions d'éclairage optimum et des sols bien drainés mais ils peuvent aussi pousser sur des sols calcaires ou acides (BARY-LENGER & NEBOUT 1993).

L'étude des gènes chloroplastiques, à transmission maternelle, des chênes et de pollens fossiles a montré que les populations de chênes ont survécu aux glaciations du Quaternaire en se maintenant dans plusieurs refuges du sud de l'Europe, en Espagne, Italie et dans les Balkans (MAGNI *et al.* 2005). Ces populations ont servi à reconstituer les populations actuelles

de chêne en Europe (KREMER *et al.* 2002b). L'étude des marqueurs d'ADN chloroplastique a montré l'absence de différenciation entre les deux chênes européens *Q. robur* et *Q. petraea*. PETIT *et al.* (2003) ont alors proposé un modèle stipulant que l'invasion par une espèce des régions déjà occupées par d'autres espèces de chêne se fait par flux de pollen.

La France est par excellence le pays des chênes. Ils y occupent pratiquement un tiers du vaste territoire forestier national (BARY-LENGER & NEBOUT 1993).

Les principales espèces de chêne en France sont :

- Chênes rouvre (ou sessile) et pédonculé : partout sauf dans le midi.
- Chêne pubescent : Sud de la France (zones chaudes et sèches)
- Chêne tauzin : Sud-Ouest de la France
- Chêne vert et liège : zone méditerranéenne

En 2004, la chênaie (pédonculé et sessile, souvent mélangés à d'autres essences) couvrait environ 5,1 millions d'hectares. Trente à quarante pour cent des chênes sessiles et pédonculés européens poussent aujourd'hui en France, ce qui en fait le second producteur mondial de bois de chêne, après les États-Unis.

### **1.2.1.1 Utilisation**

Le bois de Chêne est particulièrement recherché en ébénisterie et en parqueterie. Le bois du chêne pédonculé *Quercus robur* et du chêne sessile *Quercus petraea* représente la plus grande partie de la production de chêne en Europe, mais les espèces persistantes, tel que le chêne vert *Quercus ilex*, et le chêne-liège *Quercus suber* produisent aussi un bois de valeur. Le bois de chêne est un matériau très résistant et très dur. Sa résistance aux insectes et aux champignons est très importante grâce à sa forte teneur en tanin et est utilisée par les tanneurs pour le tannage du cuir (PARMENTIER 1977). Les copeaux de bois de chênes sont utilisés pour le fumage du poisson, de la viande, du fromage et d'autres produits alimentaires. L'écorce de *Quercus suber*, ou chêne-liège, donne le liège qui sert traditionnellement à fabriquer les bouchons en liège.

### **1.2.1.2 Facteurs affectant la santé des chênes**

Des dépérissements du chêne ont été signalés en Europe depuis le début du XXème siècle, affectant principalement le chêne pédonculé (DELATOUR 1983). Les causes de ce phénomène sont complexes (Figure 1.4) impliquant à la fois des facteurs biotiques et abiotiques (DELATOUR 1990)



• **Facteurs abiotiques**

Plusieurs facteurs climatiques sont à l'origine de dommages pour le chêne. Les plus importants sont le froid hivernal, l'hypoxie, les gelées automnales précoces, la foudre, le vent et surtout la sécheresse et les gelées printanières tardives (BARY & NEBERT 1913).

- La sécheresse : les espèces de chêne montrent des adaptations morphologiques qui leur permettent d'augmenter la tolérance à la déshydratation (THOMAS *et al.* 2002). Parmi ces adaptations, on peut citer l'augmentation du ratio des racines secondaires (THOMAS 2000) ou la réduction de la surface de transpiration par la perte de feuilles (KLUGMANN & ROLOFF 1999). La régulation de la conductance des stomates (COCHARD *et al.* 1992) et le stress dû à la sécheresse peuvent rendre les chênes plus sensibles à d'autres facteurs de stress causés par une diminution des réserves en hydrates de carbone. Une plus grande sensibilité à la sécheresse a été notée pour *Q. robur* relativement à *Q. petraea* (COCHARD *et al.* 1992 ; VIVIN *et al.* 1993). La sécheresse n'est pas considérée comme le seul facteur impliqué dans le dépérissement du chêne mais plutôt comme facteur qui diminue la vigueur de l'arbre et en combinaison avec des facteurs édaphiques défavorables les rend plus sensibles à d'autres facteurs comme les champignons ou les insectes.

- L'hiver et les gelées printanières : Les gelées printanières sont considérées comme l'un des facteurs causant le dépérissement du chêne en Europe de l'Est et en Europe centrale. *Q. robur* est considéré moins sensible aux gelées des mi et fin de printemps que *Q. petraea* (THOMAS *et al.* 2002).

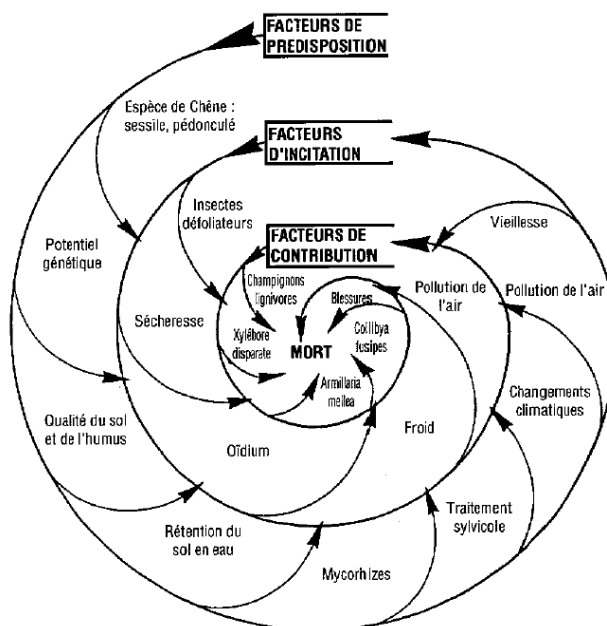


Figure 1.4 : Les facteurs de dépérissement du chêne (D'après MANION 1981)

## • Facteurs biotiques

Les facteurs biotiques discutés dans le contexte du déclin des chênes comprennent différentes espèces de parasites (THOMAS *et al.* 2002).

Différents champignons du sol nécessitent un affaiblissement préalable de l'arbre tel qu'*Armillaria mellea*, champignon très commun en Europe (GUILLAUMIN *et al.* 1985). La collybie à pied en fuseau, provoquée par *Collybia fusipes* est aussi une cause commune du dépérissement du système racinaire dans le Nord Est de la France particulièrement sur *Q. robur* et *Q. rubra* (MARÇAIS *et al.* 2000). Il a été démontré également que d'autres champignons pathogènes des racines appartenant au genre *Phytophthora* peuvent être associés à des dépérissements de chênes en Europe, par exemple *Phytophthora cinnamomi* sur chênes verts (ROBIN *et al.* 1998). Le flétrissement du chêne, provoqué par le champignon *Ceratocystis fagacearum*, est une maladie létale décrite, pour le moment, seulement aux Etats-Unis (JUZWIK & FRENCH 1983). Bien que les chênes européens y soient sensibles (PINON *et al.* 1988), la contribution de ce champignon dans le déclin des chênes en Europe est à l'heure actuelle exclue (THOMAS *et al.* 2002). Les insectes foreurs et les insectes fouisseurs attaquent aussi les chênes, mais les symptômes peuvent être moins visibles que ceux des maladies fongiques. Les chênes servent aussi de plantes nourricières pour les larves de nombreuses espèces de lépidoptères (GIBBS & GREIG 1997). La maladie la plus commune sur chênes reste l'oïdium, qui se traduit par un feutrage poudreux blanchâtre apparaissant sur (et parfois sous) les feuilles, puis un brunissement et pour finir un affaiblissement de la couronne (DUCOMET 1913). Cette pathologie, objet de notre travail, sera présentée dans le paragraphe suivant.

## 2.2. L'oïdium du chêne

### 2.2.1. Position taxonomique

Les Erysiphales (Classe : Leotiomycètes), avec la seule famille des Erysiphaceae, est l'ordre regroupant les champignons généralement connus sous le nom d'oïdiums (parasites obligatoires de plantes), appartenant au phylum des Ascomycota (Règne des champignons). Les oïdiums infectent un très grand nombre de plantes hôtes (AMANO 1986). Les genres et espèces d'oïdiums sont classiquement distingués par quelques caractères morphologiques majeurs : type de fulcres, nombre d'ascospores par chasmothèce et type de conidiophores. SAENZ & TAYLOR (1999) ont étudié la phylogénie de 47 taxa d'oïdiums en intégrant les données moléculaires aux données morphologiques et ont montré l'existence de six clades. Le clade 1 réunit les genres *Erysiphe*, *Microsphaera* et *Uncinula*; le clade 2 regroupe l'*Erysiphe galeopsidis* et l'*Erysiphe cumminsiana* ; le clade 3 regroupe les espèces d'*Erysiphe* ayant un

stade mitosporal oïdium du sous-genre *Reticuloidium* ; le clade 4 est constitué des genres *Leveillula* et *Phyllactinia* ; le clade 5 comporte les genres *Sphaerotheca*, *Podosphaera* et *Cystotheca* et le clade 6 est constitué du *Blumeria graminis* avec son stade oïdium mitosporal du sous-genre *Oidium*.

TAKAMATSU (2004) et TAKAMATSU *et al.* (2007) ont analysé la variabilité des séquences de l'ADN ribosomal et ont clarifié la taxonomie de plusieurs oïdiums se développant sur *Quercus*. Le champignon le plus souvent décrit comme responsable de la nouvelle épidémie d'oïdium en Europe est *Microsphaera alphitoides* Griffon & Maubl. (Current name: *Erysiphe alphitoides* (Griffon & Maubl.) U. Braun & S. Takam.). Une deuxième espèce associée à l'oïdium du chêne *Microsphaera hypophylla* ((Nevod). U. Braun et Cunningt.) a été décrite dans plusieurs pays d'Europe, toutefois son identification est restée largement discutée (SPEER 1975 ; ZAHOROSVSKA 1988 ; BRAUN 1995) et sa position taxonomique n'a pu à ce jour être déterminée avec précision. TAKAMATSU *et al.* (2006) ont étudié les séquences du rDNA de deux *E. hypophylla* collectés sur *Q. robur* et un *E. alphitoides* collecté sur *Quercus petraea*. Ces trois séquences d'ADN d'échantillons récoltés sur *Quercus* montraient une homologie parfaite avec les trois séquences d'échantillons identifiés comme *E. hypophylla* sur la base de la morphologie et récoltés sur *Paeonia lutea*. Au contraire, les séquences d'ITS d'*E. hypophylla* (AF298544-Cunnington (2002)) récoltés au Japon (VPRI 22120) appartenaient à une lignée phylogénétique différente et divergeaient de 10 nucléotides des autres séquences d'*E. hypophylla*.

Une nouvelle espèce a été récemment décrite en Asie *Erysiphe quercicola* (S. Takam. et U. Braun) ; celle-ci a été séparée d'*E. alphitoides* par la diversité de l'ITS ainsi que par la longueur des fulcres des chasmothèces.

D'autre part, une espèce de *Phyllactinia*, *P. guttata* (Wallr.) Lév.) ou *P. roboris* selon les auteurs, a également été décrite sur chênes en Europe (VIENNOT-BOURGIN 1949). La séquence d'ITS des *Phyllactinia* est fortement divergente de celle des *Erysiphe* (MMBAGA *et al.* 2004).

### **2.2.2. Agent causal et histoire de la maladie en Europe**

L'oïdium a fait sa première apparition sur chêne en Europe et notamment en France au début du siècle dernier, en 1907, sous forme de plusieurs foyers disséminés (HARIOT 1907). L'oïdium a été reporté cette année-là dans plusieurs endroits en Europe à savoir à Paris et quelques régions françaises, ainsi qu'en Espagne, au Luxembourg et aux Pays-Bas (FOEX 1941).

A peine un an plus tard, la maladie s'était propagée pour gagner presque toute l'Europe (DESPREZ-LOUSTAU 2002). BUREAU (1908) a mentionné que l'oïdium a causé la disparition de *Q. toza* dans la région de la Loire. Cette espèce de chêne s'est avérée être très sensible à la maladie et les chênaies du piémont pyrénéen ont également subi des taux de mortalité très importants (FOEX 1941). Des dégâts sévères ont été aussi observés sur *Q. robur* causant des retards de croissance et pouvant aller à la mortalité (GRIFFON & MAUBLANC 1911; FOEX 1941). L'apparition brutale de l'oïdium du chêne a intrigué les scientifiques quand à l'origine de cette maladie (RAYMOND 1927) dont seule la forme asexuée a été décrite pendant les premières années. Deux hypothèses principales ont été formulées pour expliquer cette nouvelle épidémie, à savoir une augmentation importante de l'agressivité d'espèces indigènes ou l'introduction d'une espèce exotique.

Par analogie avec d'autres maladies d'apparition récente avec une origine Nord-Américaine, notamment l'oïdium de la vigne, l'idée de l'introduction d'une nouvelle espèce ou d'une forme spéciale a plutôt été favorisée (GRIFFON & MAUBLANC 1908). Puisque l'oïdium était déjà observé sur des chênes en Amérique du Nord, l'hypothèse proposée comme la plus probable était l'introduction d'une espèce américaine d'Erysiphe même si les chênes américains sont très peu sensibles voire résistants à l'oïdium européen (BUREAU 1908).

L'observation de la forme sexuée quelques années après le début de l'épidémie a permis à GRIFFON & MAUBLANC (1912) de différencier l'espèce européenne des espèces américaines et de décrire la nouvelle espèce *M. alphitoides*. Contrastant avec les propos alarmistes des forestiers juste après l'apparition de cette maladie, il y a eu un désintérêt progressif de la part des forestiers et des mycologues pour l'oïdium des chênes, probablement du à l'importante régression des niveaux d'infection (DUCOMET 1913). Plusieurs hypothèses ont été émises concernant la diminution de la maladie, en particulier l'implication d'un hyperparasite *Ampelomyces quisqualis* Ces. (1852) (synonyme : *Cicinnobolus cesatii*.) ou l'effet d'une sélection naturelle et d'une adaptation réciproque (RAYMOND 1927). Un changement de la sylviculture pourrait aussi être invoqué. L'oïdium aurait été une des causes de l'abandon des taillis sous futaie (VINEY 1970).

Depuis la régression de cette pathologie, l'oïdium des chênes n'a plus été considéré comme une menace pour les chênaies mais plutôt comme un facteur contribuant aux problèmes de régénération des peuplements, et aux dépérissements de chênes, souvent en association avec l'action des défoliateurs et de la sécheresse (WOODWARD *et al.* 1929 ; DELATOUR 1983).

### 2.2.3. Cycle biologique

La forme sexuée du champignon a été rencontrée en France pour la première fois en 1911 (ARNAUD & FOEX 1912). Elle est maintenant communément observée en France sous deux formes (Figure 1.8).

Le champignon peut se présenter sous 2 formes :

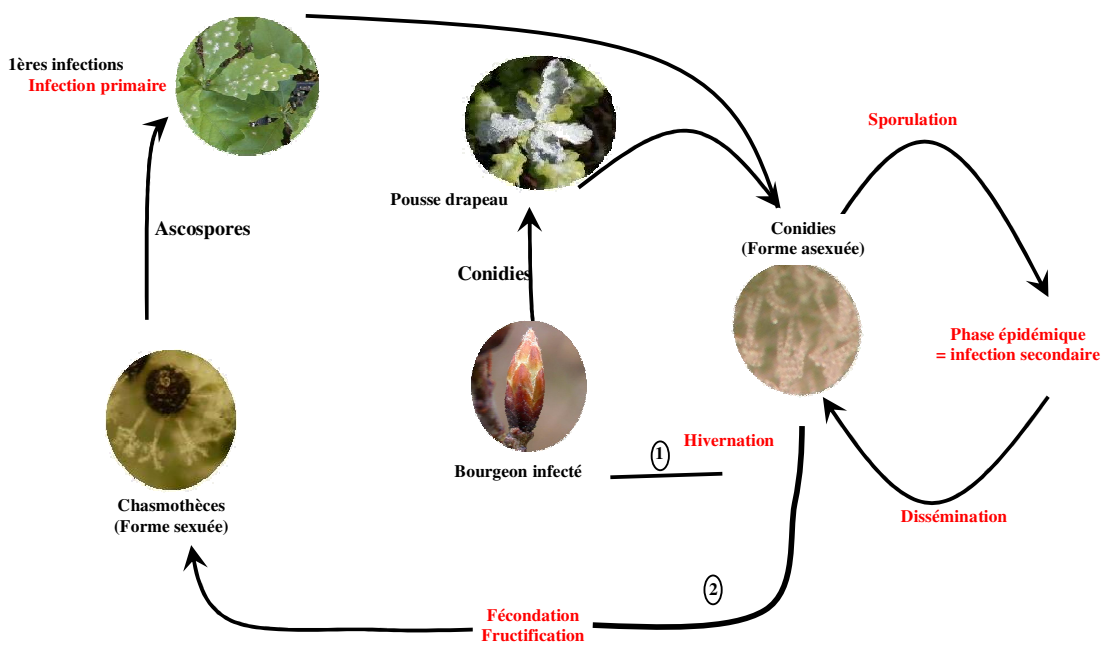
- La forme sexuée ou téléomorphe. Les organes reproducteurs sphériques et fermés, d'abord de couleur jaunâtre et brunissant à maturité sont les chasmothèces. Ils contiennent les ascques renfermant en général huit ascospores. Ces organes sont garnis d'appendices appelés fulcres qui sont utilisés dans l'identification spécifique par leurs formes (figure 1.8 b et c).

- La forme asexuée ou anamorphe est constituée de mycélium à partir duquel sont formées les conidies ou oïdiospores.

La maladie est polycyclique et chaque cycle comporte 3 phases principales : infection – sporulation - dissémination. L'hivernation est un processus critique pour les oïdiums. En effet, les oïdiums sont des parasites obligatoires et ils doivent donc être capables de survivre en dehors de la saison de végétation quand la plante hôte sensible est indisponible pour l'infection. Deux formes de conservation sont possibles chez les oïdiums: le champignon peut se conserver l'hiver sous forme de chasmothèces ou sous forme de mycélium dormant dans les bourgeons (BRAUN 2002 ; GLAWE 2008). Au printemps, lors du débourrement, ces bourgeons infectés donneront naissance à ce que l'on nomme des « pousses drapeaux » (Figure 1.8a), jeunes pousses qui se développent en étant déjà totalement infectées (SHUMANN 1991). Ces pousses drapeaux fournissent un inoculum très précoce au printemps permettant le redémarrage des épidémies. La part de cet inoculum primaire par rapport à celui constitué par les ascospores produites par les chasmothèces après levée de la dormance reste à évaluer.

Lors de l'infection, les spores germent à la surface de l'hôte et produisent des appresoria leur permettant de pénétrer dans les cellules épidermiques. Le développement du champignon est essentiellement épiphyllé, sa nutrition étant assurée par des structures intra cellulaires, les haustoria (suçoirs). Les conidies, issues de la reproduction asexuée du champignon (Figure 1.5), sont formées sur le mycélium externe et sont à l'origine des contaminations secondaires. La sporulation et la dissémination ont lieu pendant toute la période végétative. Les conidies sont dispersées par le vent. La dispersion du parasite est généralement considérée comme

intervenant sur de grandes distances, en se basant en particulier sur la vitesse de l'épidémie au début du XXème siècle. Les données factuelles sont toutefois inexistantes.



**Figure 1.5 : Cycle biologique de l'oïdium du chêne**

La gamme optimale de températures favorisant la germination des conidies se situe entre 20 et 23°C alors que l'élongation du tube germinatif est optimale à une température de 25°C (HEWITT 1974). Le taux d'humidité optimum pour la germination des conidies se situe entre 76 et 96%, en absence d'eau libre (HEWITT 1974; SIVAPALAN 1993). D'autres expériences sur les facteurs influençant le développement de cette pathologie ont montré que le rayonnement Ultra-Violet augmentait les infections par *E. alphitoides*, notamment sur la face adaxiale (NEWSHAM *et al.* 1997; NEWSHAM *et al.* 2000). D'autre part, la pollution fluorée affecte négativement la distribution de l'oïdium dans les chênaies (GRZEBYTA *et al.* 2005).

## 2.2.4. Impact de la maladie

### 2.2.4.1. Symptômes et dégâts de la maladie

L'oïdium est la maladie la plus courante des chênes en France (Source : Département Santé des Forêts). Elle est facilement identifiable grâce aux symptômes de « blanc ». En effet, le mycélium de ce champignon forme en été un feutrage blanc sur les jeunes feuilles de chêne en cours de croissance (Figure 1.6). L'évolution de la maladie peut être plus ou moins rapide, dans les cas de forte infestation, les feuilles se flétrissent et brunissent, puis tombent

prématurément (Figure 1.7). L'oïdium du chêne est l'affection foliaire la plus dommageable sur jeunes sujets, la maladie pose un important problème en pépinière ainsi qu'en régénérations naturelles et jeunes plantations, notamment sur les chênes pédonculés et sessiles (DESPREZ-LOUSTAU 2002). L'oïdium peut également être un des facteurs impliqués dans les dépérissements de chênes.

L'impact de l'infection par l'oïdium au niveau de la physiologie de la plante a été étudié par Hewitt & Ayres (1976, 1977). Comme tous les parasites biotrophes, le champignon responsable de l'oïdium du chêne détourne le métabolisme de l'hôte à son profit. En effet, le champignon est à l'origine de la baisse du niveau des hydrates de carbone dans les plants de chêne. Dans les feuilles de chêne oïdiées, le déclin de l'activité de la glycolate oxydase pourrait expliquer la diminution du taux de photorespiration (HEWITT & AYRES 1977).

Les parasites obligatoires et plus particulièrement les oïdiums sont souvent à l'origine de la baisse du niveau de photosynthèse dans les feuilles infectées (MAGYAROSY *et al.* 1976). Les feuilles infectées exportent moins et importent plus les produits de la photosynthèse que les feuilles saines. L'infection entraîne une diminution des quantités de saccharose, glucose insoluble et une augmentation des quantités de glucose et de fructose dans les tissus foliaires. Le glucose et le fructose sont donc transférés au champignon, où ils sont convertis en polyalcools et en tréhalose (HEWITT & AYRES 1976). REPKA (2002) a aussi démontré que les mutants déficients en chlorophylle de *Q. petraea* présentent une plus importante résistance à l'oïdium du chêne.

#### **2.2.4.2. Régulation de la maladie**

##### **• Résistance du chêne à l'oïdium**

Les plants de chênes peuvent être infectés dès les premiers stades de développement jusqu'à la sénescence. Par contre, on observe l'existence d'une résistance ontogénique à l'oïdium chez les feuilles ; en effet, seules les jeunes feuilles non totalement développées sont très sensibles et la résistance à l'infection devient plus élevée avec la maturité, particulièrement pour les feuilles qui poussent sur des arbres âgés (EDWARDS & AYRES 1982). La résistance à l'oïdium varie aussi selon l'espèce de chêne. Les espèces Nord-Américaines de *Quercus* montrent une résistance à cette maladie (BUTIN 1995; NEF & PERRIN 1999) tandis que *Quercus pyrenaica*, *Q. robur*, *Q. petraea* et *Q. pubescens* y sont très sensibles (AYRES 1976; DESPREZ LOUSTAU 2002).

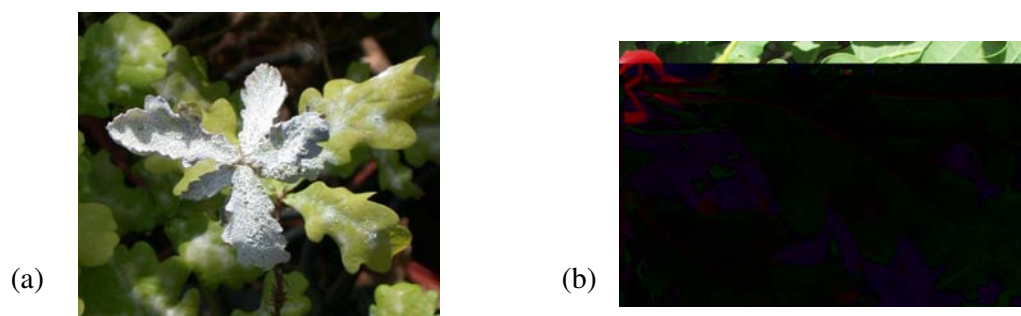
Malgré le caractère commun de la maladie, l'interaction chêne-oïdium a été très peu étudiée, en dehors d'observations en conditions naturelles. Les seuls travaux sont ceux d'AYRES *et al.* (HEWITT & AYRES 1975; AYRES 1976a ; AYRES 1976b ; HEWITT & AYRES 1976; EDWARDS & AYRES 1981, EDWARDS & AYRES 1982) qui se sont intéressés aux mécanismes cellulaires de résistance. EDWARDS & AYRES (1981) ont étudié la résistance à l'oïdium pour trois espèces de chêne présentant des niveaux de résistance différents (*Q. robur*, *Q. borealis*, *Q. cerris*). La résistance a alors été associée à des mécanismes naturels tels que la mort cellulaire et la formation de papilles (EDWARDS & AYRES 1981). Le déterminisme génétique de la résistance des chênes à l'oïdium, entre espèces et entre individus d'espèces sensibles, n'a pas été décrit.

#### • Impact de l'hyperparasitisme

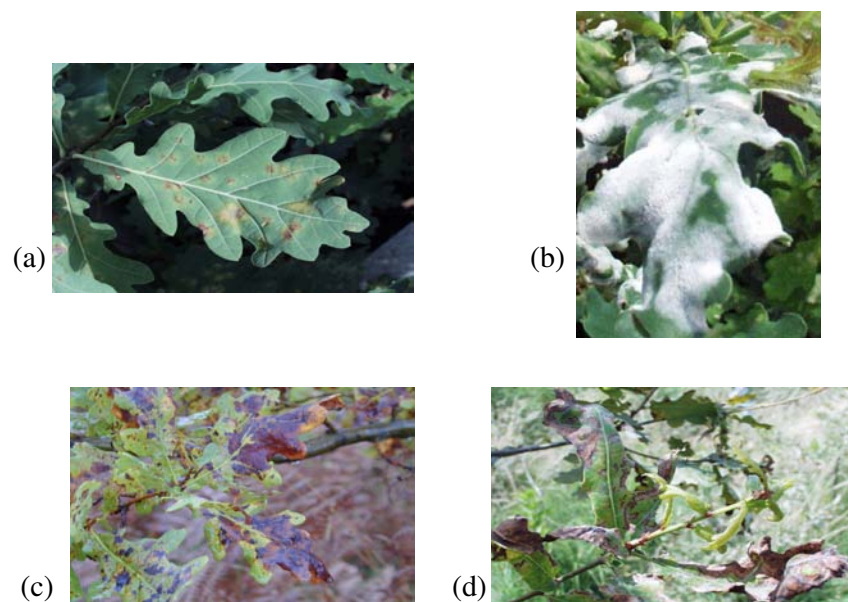
L'interaction entre les oïdiums et le genre *Ampelomyces* est l'une des relations interfongiques les plus observées dans la nature. *Ampelomyces* spp. ont été décrits dans 65 espèces (8 genres) d'Erysiphacées. Une seule espèce, *Ampelomyces quisqualis*, est souvent mentionnée dans le genre (SUTTON 1980) mais l'avènement des études moléculaires a montré l'existence de plusieurs espèces (KISS & NAKASON 1998, KISS 1997).

Les fragments d'hyphes d'*Ampelomyces* sont transportés à longues distances par le vent dans les conidies du champignon parasité. Ces fragments peuvent initier le mycoparasitisme des colonies d'oïdium (SPEER 1978). Des conidies d'*Ampelomyces* sont également libérées à partir des pycnides intracellulaires produits dans le champignon déjà parasité et relâchées dans la phyllosphère. Après germination, les conidies pénètrent l'hyphé du champignon, continuent leur croissance intérieurement et produisent des pycnides dans les hyphes, conidiophores, conidies et chasmothèces immatures de l'hôte. KISS (1998) a montré que *E. alphitoides* (sur *Quercus*) et *Ph. guttata* (sur *Betula pendula*) sont parasités par *Ampelomyces* spp. Sur un petit nombre d'échantillons, l'hyperparasitisme était quantitativement plus important sur *Q. petraea* que sur *Q. robur*.

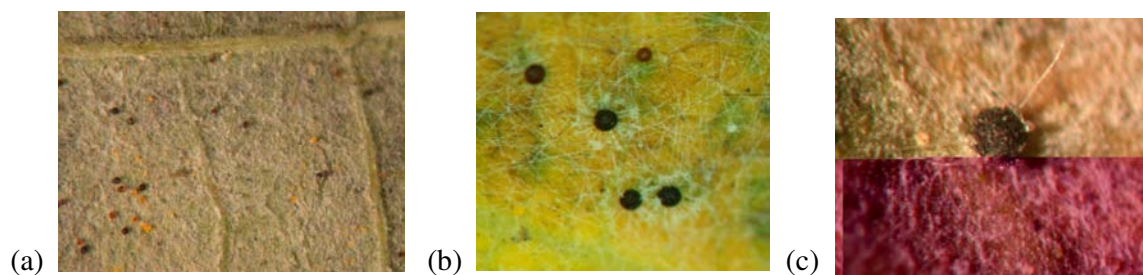




**Figure 1.6 : Premières manifestations de la maladie (a) pousse drapeau  
(b) premières taches**



**Figure 1.7 : Dégâts de l'oïdium de chêne (a) nécroses sur la face inférieure des feuilles  
(b) feutrage blanc sur la face supérieure (c) et (d) nécrose et flétrissement des feuilles atteintes en fin de saison**



**Figure 1.8 : (a) Chasmothèces à différents stades de développement (b) Chasmothèces matures de type Erysiphe (c) Chasmothèce matures de type Phyllactinia**

### 3. Objectifs de la thèse

La première problématique à résoudre est celle de la caractérisation spécifique de l'agent (ou des agents) responsable(s) de l'oïdium des chênes. Suite aux premières infections massives d'oïdium des chênes en Europe au début du XXème siècle, un questionnement et des polémiques importants ont été rapportés dans les publications de mycologie (cf RAYMOND 1927, DESPREZ-LOUSTAU 2002). Curieusement, cette question n'a pas été ré-abordée avec l'aide d'outils moléculaires. *Erysiphe alphitoides*, décrit au moment de l'émergence en Europe est généralement considéré comme l'agent de l'oïdium. L'implication prépondérante de ce champignon reste à démontrer. En effet, d'autres espèces agents d'oïdium ont été décrites sur chênes en Europe, y compris dans le genre *Erysiphe* (*Microsphaera*) mais également une espèce de *Phyllactinia*. L'utilisation de techniques de biologie moléculaire devrait permettre de distinguer les différentes espèces, y compris au stade anamorphe, sur la base de séquences spécifiques d'ITS (TAKAMATSU *et al.* 1998 ; TAKAMATSU *et al.* 1999).

Cette étude sera réalisée sur la base de comparaison de séquences d'ITS pour différentes souches d'oïdium (forme sexuée et asexuée) isolées essentiellement sur *Q. robur*. La diversité génétique et la distribution spatiale du (ou des) champignon(s) responsable(s) de l'oïdium sera caractérisée dans deux dispositifs mis en place par l'INRA (un gradient altitudinal dans les Pyrénées et dans la forêt de Campet dans le Sud Ouest de la France) mais également dans une étude étendue à toute la France.

Les résultats d'analyse de séquences, avec les perspectives phylogéniques qui en découlent, constitueront une première étape dans la compréhension de la brutale émergence de la maladie dont les causes ne sont pas actuellement clairement connues (introductions multiples, changement d'hôtes...).

Le deuxième volet du travail de thèse sera consacré à l'étude des composantes de la compatibilité hôte-parasite sur deux plans :

- Etude de l'adaptation locale du parasite (*E. alphitoides*) à son hôte (chêne pédonculé).
- Etude des bases génétiques de la résistance de l'hôte

A ce jour, les seules données existantes dans la littérature sur l'interaction chêne-oïdium sont issues d'observations en conditions naturelles. Une méthodologie d'inoculation en conditions contrôlées devait donc être développée (précision des conditions d'utilisation, maîtrise des

facteurs de variation), afin de pouvoir caractériser de façon quantitative la compatibilité d'une interaction (la résistance d'un hôte et le pouvoir pathogène d'une souche).

#### ***Etude de l'adaptation locale du parasite à son hôte***

L'adaptation d'un parasite à ses hôtes est un facteur clé dans les dynamiques conjointes des populations hôtes et parasites. La spécialisation parasitaire de l'oïdium à son hôte sera étudiée en comparant la performance (après inoculations contrôlées) de souches isolées de différents hôtes sur leur hôte d'origine par rapport à d'autres hôtes. Le matériel végétal et fongique provient de la forêt de Campet utilisée par l'équipe de pathologie et de génétique comme site d'étude de la dynamique démo-génétique des chênes sous l'effet de pressions parasitaires. Le cadre général est de tester l'hypothèse d'un effet sélectif différentiel causé par l'oïdium sur les chênes pédonculés en transférant l'hypothèse de JANZEN-CONNELL (1970, 1971) au niveau infra spécifique pour expliquer la forte variabilité génétique spatiale des peuplements de chênes (STREIFF *et al.* 1999). L'hypothèse de JANZEN-CONNELL prédit que les maladies favorisent la diversité des hôtes par des interactions négatives : les semis d'un arbre-mère, dispersés préférentiellement à proximité de cet arbre, se trouveraient exposés à une forte pression des parasites spécifiquement adaptés à cet arbre (au niveau de l'espèce ou du génotype) et donc en désavantage compétitif par rapport à des semis d'un autre arbre ou aux semis du même arbre dispersés à plus forte distance.

#### ***Etude de la résistance génétique de l'hôte***

Notre travail a d'autre part pour objectif de contribuer à une première caractérisation des bases génétiques de la résistance des chênes à l'oïdium. La méthode d'inoculations contrôlées sera utilisée, en complément d'observations sur des dispositifs de terrain, pour la recherche et l'identification de QTL (Quantitative Trait Loci) associés à la résistance à l'oïdium. Un croisement intra spécifique de chênes pédonculés est disponible (plus de 200 descendants cartographiés) (BARRENECHE *et al.* 1998) et différents QTL associés à des caractères de croissance et physiologie des chênes ont déjà été identifiés (SCOTTI *et al.* 2004 ; SCOTTI-SANITAGNE *et al.* 2004 ; SCOTTI-SANITAGNE *et al.* 2005 ; PARELLE *et al.* 2007 ; GAILING *et al.* 2008 ; BRENDÉL *et al.* 2008). Une étude préliminaire sera également réalisée sur un croisement interspécifique disponible (pédonculé X sessile) en comparant les descendances intra spécifiques et hybrides.

Les bénéfices attendus de l'ensemble de notre étude sont :

- (1) Une clarification de la composition spécifique des agents de l'oïdium sur chênes, avec confirmation ou non du rôle prépondérant d'*E. alphitoides* ;
- (2) Une mise au point de l'étude phénotypique quantitative de l'interaction hôte-parasite ;
- (3) Une contribution à l'analyse des interactions hôte-pathogène au niveau local, en testant l'hypothèse d'une adaptation de l'oïdium au niveau arbre (et descendants);
- (4) Une contribution à l'étude du déterminisme de la résistance génétique du chêne de l'oïdium.

## **Chapitre 2**

**Caractérisation de(s) l'agent(s) pathogène(s)  
responsable(s) de l'oidium du chêne en Europe et  
distribution des différentes espèces identifiées dans  
les forêts françaises**

## **Chapitre 2 : Caractérisation de(s) l'agent(s) pathogène(s) responsable(s) de l'oïdium du chêne en Europe et distribution des différentes espèces identifiées dans les forêts françaises**

### **Introduction**

La taxonomie des champignons phytopathogènes et notamment ceux impliqués dans les oïdiums a longtemps été basée sur des critères morphologiques ou sur l'espèce-hôte (HIRATA & TAKAMATSU 1996).

Après son apparition brutale en France au début du siècle dernier (1907) et sa rapide propagation dans toute l'Europe, l'oïdium du chêne a intrigué les scientifiques quant à son origine (RAYMOND 1927). Plusieurs hypothèses ont été formulées et notamment une augmentation importante d'espèces indigènes ou l'introduction d'une espèce exotique. L'espèce causant la nouvelle épidémie a facilement été distinguée de *Phyllactinia corylea* (Pers.) Karst. (Nom actuel : *Phyllactinia guttata* (Wallr.) Lév.) (HARIOT 1907, FOEX 1919) dont la présence avait été rapportée par Merat en 1843 près de Paris, sous le nom d'*Erysiphe quercus* (VIENNOT-BOURGIN 1949). Par contre, elle s'apparente à plusieurs espèces de *Microsphaera* précédemment décrites, notamment en Amérique du Nord (*M. alni*, *M. quercina*) en se basant sur les caractères morphologiques des formes anamorphes. L'apparition de la forme sexuée (chasmothèces) en 1911 en France (ARNAUD & FOEX 1912) a été la base d'études morphologiques plus détaillées. Ces études ont suggéré que l'espèce était différente de toutes les autres espèces déjà décrites ; GRIFFON & MAUBLANC proposent le nom de *Microsphaera alphitoides* (Griffon & Maubl) en allusion à la sporulation blanche d'aspect farineux de l'oïdium.

Bien que longtemps sujet de controverses, *Microsphaera alphitoides* a été admis par la majorité des scientifiques comme la principale espèce responsable de l'oïdium du chêne en Europe (FOEX 1941). Toutefois, l'origine de cette maladie restait encore mal connue. RAYMOND (1927) et BOESWINCKLE (1980) avaient émis l'hypothèse que cette maladie soit causée par un champignon initialement non pathogène sur chêne introduit en Europe sur des plants exotiques. En effet, des inoculations croisées suggèrent que le même champignon est responsable de l'oïdium sur chêne et sur manguier (BOESWINCKLE 1980). Le délai entre l'apparition de la forme asexuée et de la forme sexuée du champignon en Europe a été interprétée par RAYMOND (1924, 1927) comme un résultat de l'adaptation à un nouvel hôte.

La description d'une deuxième espèce associée à l'oïdium du chêne (*Microsphaera hypophylla*) a rendu encore plus complexe l'étude de l'étiologie de cette maladie. Bien que observée dans plusieurs pays d'Europe, la taxonomie de cette espèce a été largement discutée (BRAUN 1995) puisque certains auteurs la considéraient comme synonyme de *M. alphitoides* (SPEER 1975) alors que d'autres stipulaient que ce sont deux espèces distinctes (ZAHOROSVSKA 1988).

L'avènement des méthodes moléculaires a contribué à clarifier la systématique de ces parasites (GLASS & DONALDSON 1995) et à proposer des phylogénies. En particulier, les gènes de l'opéron ribosomal évoluent relativement lentement et sont de ce fait utiles pour l'étude d'organismes relativement proches (WHITE *et al.* 1990). Des révisions taxonomiques et des phylogénies ont récemment été proposées pour les Erysiphales et ont montré la présence d'un nouveau taxon responsable de la maladie de l'oïdium du chêne en Asie *Erysiphe quercicola* (S. Takam. & U. Brau) (TAKAMATSU *et al.* 2007).

Toutefois, la question de l'identité et de l'origine de l'oïdium du chêne en Europe n'avait pas été revisitée jusqu'à présent avec des études moléculaires. Nous nous sommes donc proposé de clarifier cette question avec de nouveaux outils.

L'étude de la diversité dans l'ADN ribosomique du (ou des) agent(s) pathogènes permettra de répondre aux questions suivantes:

- *Erysiphe alphitoides* (nom actuel), caractérisé par sa signature moléculaire, est-il seul responsable de la maladie de l'oïdium du chêne ou bien observe-t-on une diversité moléculaire suggérant différentes espèces?
- Est-ce que l' (les) espèce(s) européenne(s) sont apparentées à des espèces décrites dans d'autres continents ?
- Comment se distribuent ces différentes espèces en France et quelle est l'importance relative de chacune d'entre elles ?

Pour une première étude de ces agents pathogènes, l'échantillonnage a été fait sur *Quercus robur* dans quelques régions de la France et d'Europe. Au vu des premiers résultats, un second échantillonnage, beaucoup plus intensif, a concerné plusieurs espèces de chêne et a couvert l'essentiel des régions forestières françaises.

Le premier article de ce chapitre porte sur la caractérisation de(s) agents pathogène(s) responsable(s) de l'oïdium de chêne et intitulé : « **New insights into the identity and origin**

**of the causal agent of oak powdery mildew in Europe** » (publié dans Forest Pathology). Dans cette étude, nous avons analysé la variabilité de l'ADN ribosomique du champignon. Les régions de l'ITS (Internal Transcribed Spacer), du gène codant pour l'ARNr 5.8S et de l'IGS (Intergenic Spacer) de 33 échantillons européens (principalement français) d'oïdium de chêne ont été amplifiées et séquencées. Quatre haplotypes différents ont été identifiés parmi les 33 échantillons amplifiés (ITS<sub>A</sub>, ITS<sub>B</sub>, ITS<sub>C</sub> et ITS<sub>D</sub>). Chaque séquence d'ITS correspond à une séquence différente d'IGS. La comparaison des séquences d'ITS obtenues avec celles accessibles dans GenBank a révélé de fortes homologies avec différents taxons. Parmi ceux-ci, trois avaient déjà été décrits sur chêne en Europe : *Erysiphe alphitoides* (ITS<sub>A</sub>), *Erysiphe hypophylla* (ITS<sub>C</sub>) et *Phyllactinia guttata* (ITS<sub>D</sub>). Nos résultats confirment également l'homologie à 100% de ITS<sub>A</sub> avec la séquence décrite pour l'agent de l'oïdium du manguier, *Oidium mangiferae*. Le quatrième haplotype, ITS<sub>B</sub>, représenté par presque 25% des échantillons, montre une homologie de 100% avec l'espèce nouvellement décrite, *Erysiphe quercicola*, observée sur divers chênes en Asie et diverses espèces d'Erysiphales tropicales et sub-tropicales, notamment *Oidium heveae*, agent de l'oïdium de l'hévéa. Nos résultats suggèrent que l'oïdium du chêne pourrait résulter d'un changement d'hôte depuis des chênes asiatiques ou des espèces tropicales d'*Erysiphe* introduites en Europe sur des plantes exotiques infectées.

Le second article intitulé: « **Spatial distribution of genetically differentiated groups of oak powdery mildew fungi in France, using quick molecular detection methods**» (soumis à Annals of Forest Science a concerné la détection des différentes lignées associées à l'oïdium du chêne et l'étude de leur distribution à 3 échelles géographiques: différentes régions de la France, un gradient altitudinal dans les Pyrénées et dans une forêt domaniale dans le sud ouest de la France (Lot et Garonne 47). Les principaux résultats sont :

- La mise au point d'une méthode d'identification des 4 taxa à partir d'échantillons de terrain, sans isolement préalable. Deux méthodes de détection ont été utilisées : (1) une amplification non spécifique suivie d'une analyse par *Single Strand Conformation Polymorphism* (SSCP) pour différencier les différents taxa en présence et (2) une amplification spécifique suivie d'une digestion enzymatique pour séparer *E. alphitoides* et *E. quercicola*. Chacune des méthodes se révèle avoir des avantages et des inconvénients. En effet, la première méthode semble surestimer la proportion d'*E.hypophylla*, due à l'amplification croisée entre *E.alphitoides* et *E.hypophylla*. La méthode non spécifique, basée sur la SSCP, est rapide et permet de gérer un grand nombre d'échantillons à la fois. Toutefois, les amorces non



spécifiques sont susceptibles d'échouer dans l'amplification des séquences minoritaires dans les mélanges, ce qui conduit à une sous-estimation de ces séquences.

- L'étude a confirmé l'existence des quatre lignées précédemment mentionnées dans les 3 niveaux géographiques, avec une forte prépondérance d'*E. alphitoides*. En l'état actuel, nos résultats ne mettent pas en évidence une différenciation spatiale entre les différentes espèces responsables de l'oïdium du chêne. Plusieurs lignées (souvent *E. alphitoides* associé à une des trois autres lignées) peuvent coexister dans la même région, le même arbre, voire même dans la même lésion. Il n'apparaît pas non plus de spécialisation en fonction des lignées de chêne. La question de la différenciation de niche écologique et d'interaction entre *E. alphitoides* et les autres lignées très proches associées à l'oïdium du chêne reste donc posée.

## **Article 1**

**New insights into the identity and origin of the causal agent of oak powdery mildew in Europe**

## New insights into the identity and origin of the causal agent of oak powdery mildew in Europe

By A. MOUGOU, C. DUTECH and M.-L. DESPREZ-LOUSTAU<sup>1</sup>

INRA, UMR1202 BIOGECO, Equipe de Pathologie forestière, 71 avenue Edouard Bourleaux  
BP81 F33883 Villenave d'Ornon Cedex, France.

<sup>1</sup>E-mail: loustau@bordeaux.inra.fr (for correspondence)

### Summary

Powdery mildew is the most common disease on oaks in Europe where it was first recorded at the beginning of the 20th century. Yet, little is known about the origin of the causal agent. In this study, we analysed the variability of the ribosomal DNA (rDNA) of the pathogen. The internal transcribed spacer (ITS) region, the 5.8S rRNA coding gene and the intergenic spacer (IGS) of the rDNA of 33 European (mostly French) samples of oak powdery mildew were amplified using polymerase chain reaction (PCR) and PCR products were subsequently sequenced. Four different haplotypes were obtained for ITS among the various samples (ITS<sub>A</sub>, ITS<sub>B</sub>, ITS<sub>C</sub> and ITS<sub>D</sub>). Each ITS sequence corresponded to a different IGS sequence. The comparison of ITS sequences obtained with sequences accessible in the GenBank database revealed very high homologies with different taxa. Of these, three taxa had already been described on oaks in Europe, i.e. *Erysiphe alphitoides* (100% homology with ITS<sub>A</sub>), *Erysiphe hypophylla* (99.4% homology with ITS<sub>C</sub>) and *Phyllactinia guttata* (97.64% homology with ITS<sub>D</sub>). Our data also confirmed the 100% homology between ITS<sub>A</sub> and the sequence described for *Oidium mangiferae*, the agent of mango powdery mildew. The fourth haplotype, i.e. ITS<sub>B</sub>, represented by nearly 25% samples, showed 100% homology with the recently described *Erysiphe quercicola* from *Quercus* spp. in Asia, and several tropical and sub-tropical powdery mildew species, including *Oidium heveae*, a major pathogen of rubber trees worldwide. Our results suggest that oak powdery mildew might originate from host shifts of tropical *Erysiphe* species introduced to Europe through infected exotic host plants.

### 1 Introduction

Oak powdery mildew is nowadays one of the most common diseases in European forests but this has not always been the case. Indeed, first observations of an oak powdery mildew epidemic were made in 1907 (HARIOT 1907). In that year, a few disease foci were observed at the end of summer near Paris and in a few other French locations, as well as in the neighbouring countries of Spain, Luxemburg and the Netherlands (FOEX 1941). By the following year, the disease epidemic, which had started much earlier in spring, was observed all over France (BOUDIER 1908; GRIFFON and MAUBLANC 1908), in many other European countries (e.g. England, Germany, Austria, Belgium, Portugal, Italy, Scandinavia, Switzerland) and even in Corsica and Algeria. The eastward invasion of the epidemic went on in 1909, with Russia and Turkey being affected (WOODWARD et al. 1929; FOEX 1941). The occurrence of oak powdery mildew was reported in Brazil in 1912 (PUTTEMANS 1920) and it soon presented a worldwide distribution (FOEX 1941).

The epidemic spread of the disease caused great concern to foresters who were afraid that powdery mildew could seriously affect indigenous (deciduous) oaks, a major component of European forests (DOÉ 1923; VINEY 1970). For example, BUREAU (1908) mentioned that in a survey he could not find a single healthy tree of *Quercus toza* in the Loire region, all

being severely affected by powdery mildew. This oak species proved to be highly susceptible and stands in the Pyrenean Piedmont suffered high rates of mortality (FOEX 1941). Severe damage was also observed on *Quercus robur*, especially on coppice shoots and shoots produced after pruning, leading to growth loss and even mortality (GRIFFON and MAUBLANC 1911; FOEX 1941).

The sudden outbreak of the disease puzzled mycologists about the possible origin of the pathogen (RAYMOND 1927). During the initial years, only the anamorph of the fungus could be observed and therefore a precise identification (mostly based on teleomorphs for Erysiphales) was not possible. Symptoms of oak powdery mildew had previously been reported at low intensity in a few locations in Europe, and were attributed to various fungal species. On grounds of conidial morphology, the fungus causing the new epidemic could easily be distinguished from *Phyllactinia corylea* (Pers.) Karst. [current name: *Phyllactinia guttata* (Wallr.) Lév.] (HARIOT 1907; FOEX 1919), probably mentioned by Merat in 1843 near Paris, under the name *Erysiphe quercus* (VIENNOT-BOURGIN 1949). By contrast, other previously reported species showed morphological similarities to the fungus involved in the new outbreak: *Oidium quercinum* v. Thümen described by Thümen on *Quercus racemosa* (= *Quercus robur*) in 1877 in Portugal, *Calocladia penicillata* f. *Quercus* Passerini described by Passerini in 1875 in Italy and *Microsphaera alni* (DC. ex Wallr.) G. Winter [current name *Microsphaera penicillata* (Wallr.) Lév.] reported by Mayor in 1899 in Switzerland (in ROLL-HANSEN 1961).

However, it seemed unlikely that the sudden occurrence and high incidence of the disease could be explained by the outbreak of an indigenous species. Some authors therefore hypothesized that there had been an introduction of a new species or subspecies from outside Europe, as with other powdery mildews such as those on *Vitis* and *Euonymus* (GRIFFON and MAUBLANC 1908). As powdery mildew had already been reported on oaks in North America, a natural hypothesis was the introduction of an American species, although it was noted that American red oaks growing in France were almost unaffected by the disease (BUREAU 1908). Several taxa had been described on oaks in North America: *Microsphaera alni*, *Microsphaera quercina* (Schwein.) Burrill, *Microsphaera densissima* (Schwein.) Peck, *Microsphaera abbreviata* Peck, *Microsphaera penicillata* (Wallr.) Lév., *Microsphaera calocladophora* G.F. Atk. and *Microsphaera extensa* Cooke & Peck, although the true status of some of them was unclear. While Salmon (1900) included *M. quercina*, *M. densissima*, *M. abbreviata* and *M. calocladophora* in *M. alni* (with several varieties), GRIFFON and MAUBLANC (1912a) recognized two American species of oak mildew: *M. abbreviata* (including a variety *calocladophora*), closely related to *M. alni* (*sensu stricto*, not infecting oaks), and *M. extensa*. *M. alni* had also been described in Europe, but only on alders and a few other host species, and inoculations into oaks were unsuccessful (GRIFFON and MAUBLANC 1908). Four years after the outbreak of oak mildew in Europe (1911), teleomorphs were finally found in south-east France (Gard), by ARNAUD and FOEX (1912a), who identified the species as the American *M. quercina* included in *M. alni* *sensu* Salmon. However, after a detailed morphological study, Griffon and Maublanc suggested that the species was different from all previously described species, including the American species, and proposed the new species *Microsphaera alphitoides* Griffon & Maubl. [current name: *Erysiphe alphitoides* (Griffon & Maubl.) U. Braun & S. Takam.], from a greek etymology meaning 'flour', referring to the abundant white sporulation (GRIFFON and MAUBLANC 1912b; BRAUN and TAKAMATSU 2000). This identification remained controversial for many years and was especially disputed by ARNAUD and FOEX (1912b). *M. alphitoides* was finally agreed upon by most mycologists, including FOEX (1941), and became commonly used from the 1940s. However, the origin of the pathogen was still debated. RAYMOND (1927) had suggested that the powdery mildew epidemic on oak of the early 20th century might have been caused by the fungus already described on oak in Portugal in 1877, which would have been introduced by exotic plants from overseas

Portuguese colonies. BOESEWINKEL (1980) supported this host shift hypothesis by demonstrating by cross-inoculation that the same fungus was responsible for powdery mildew on oak (*Q. robur*) and a tropical tree, mango, in New Zealand. The fact that ascomata were observed only several years after the first occurrence of the fungus in Europe, as also mentioned for other introduced agents of powdery mildew, was often interpreted as a result of an adaptation to a new host (RAYMOND 1924, 1927). However, these studies did not reach any definite conclusions and AYRES (1976) did not rule out the possibility that the fungus was indigenous and had undergone a genetic change affecting its virulence on oaks.

The history of oak powdery mildew in Europe is further complicated by the description of another species, *Microsphaera hypophylla* Nevodovskii [= *M. silvatica* Vlasov, current name: *Erysiphe hypophylla* (Nevod.) U. Braun & Cunningt.], after the 1950s. This species was first reported in Russia, then in Norway (ROLL-HANSEN 1961) and several countries of eastern and central Europe, e.g. Slovenia (MACEK 1975), with a seemingly westward expansion (VIENNOT-BOURGIN 1968). However, the taxonomy of *M. hypophylla* has been disputed (BRAUN 1995), with some authors considering it as a synonym of *M. alphitoides* (SPEER 1975) and others as a distinct species (ZAHOROVSKA 1988).

It is notable that within a relatively short period after the outbreak of the disease, the concern of foresters and the interest of mycologists greatly decreased. This was related to a decline in disease intensity. Indeed as early as 1911, it was reported that symptoms had dramatically decreased (DUCOMET 1913). The possible involvement of natural regulation of the causal agent by a hyperparasite, such as *Cicinnobolus cesatii* de Bary (current name: *Ampelomyces quisqualis* Ces.) was hypothesized (DUCOMET 1913). Several authors also suggested the effects of natural selection and reciprocal adaptation (RAYMOND 1927). Probably, changes in silvicultural practices also played a role, with a decrease in pollarded trees, pruned trees in hedgerows and forest coppice, all of which were abundant in the early 20th century and were severely affected by powdery mildew (VINEY 1970; AYRES 1976). Since then, oak powdery mildew has not been considered as a major threat to oak forests, but rather as a contributing factor either to regeneration failure or mature tree decline, often associated with defoliators and drought (WOODWARD et al. 1929; DELATOUR 1983).

Recent progress in molecular biology has provided new tools for species identification and phylogenetic studies. The ribosomal DNA (rDNA) is of special interest because of its presence in numerous copies in the genome, making it usable with very small amounts of material, something which is highly desirable for biotrophic fungi such as members of Erysiphales. Additionally, this marker can be amplified in a large number of species thanks to the high conservation of the ribosomal genes (18S, 28S) in which primers are designed, flanking the polymorphic internal transcribed spacer (ITS) and intergenic spacer (IGS) regions (WHITE et al. 1990).

The nucleotide diversity of the ITS region of rDNA has proved to be very useful for species identification within the powdery mildews with a better resolution than morphological characteristics (CUNNINGTON et al. 2003; BRAUN et al. 2006; FRANCIS et al. 2007). Several recent studies have focused on the phylogeny of Erysiphales, including a few strains of *E. alphitoides* and *E. hypophylla*, using rDNA. Results from these studies, together with morphological features including scanning electron microscopy (SEM) analyses, led to the rearrangement in the classification of this group (HIRATA and TAKAMATSU 1996; TAKAMATSU et al. 1998, 1999, 2006; SAENZ and TAYLOR 1999; BRAUN and TAKAMATSU 2000; TAKAMATSU 2004; LIMKAISANG et al. 2005; TAKAMATSU et al. 2007).

Surprisingly, molecular data were not used so far in studies of oak powdery mildew in Europe. In view of the taxonomic confusions and controversies in the last century, they would be very useful to provide an unambiguous identification of the fungus involved, which is a prerequisite for any study in invasion ecology (DESPREZ-LOUSTAU et al. 2007).

This was the first aim of our study, based on the analysis of the ITS1, ITS2 and IGS regions of the rDNA, which further provided new insights into the origin of the causal agent of oak powdery mildew in Europe.

## 2 Material and methods

### 2.1 Fungal material

The study focused on *Q. robur* which is the most frequent and widely distributed oak species in Europe and one of the most susceptible to powdery mildew (HARIOT 1907). A geographic hierarchical sampling was performed, centred on south-western France where the most severe outbreaks of powdery mildew were observed in France during the last decade (NAGELEISEN 2006) (Table 1). In three locations near Bordeaux (Campet, Cestas and Villenave d'Ornon), 15 samples were collected from two to nine trees per population. Sampling was subsequently extended to neighbouring departments, including two

Table 1. List of samples, their geographic origin and collection year

Sample name	Fungal material <sup>1</sup>	Geographic origin	Locality (department)	Collection year
Fbl1	Chasmothecia (E)	France (centre)	Fontainebleau (77)	2004
Rhe1	Chasmothecia (E)	France (north-west)	Le Rheu (22)	2002
Col1	Chasmothecia (E)	France (south-east)	Collobrières (83)	2001
Pul1	Chasmothecia (E)	France (south-east)	Pulnoy (54)	2001
Gat1	Chasmothecia (E)	France (south-east)	Gard (30)	2001
Gon1	Chasmothecia (E)	France (south-east)	Gonfaron (83)	2001
Gon2	Chasmothecia (E)	France (south-east)	Gonfaron (83)	2001
Gon3	Chasmothecia (E)	France (south-east)	Gonfaron (83)	2001
Gon4	Chasmothecia (E)	France (south-east)	Gonfaron (83)	2001
Tar1	Chasmothecia (E)	France (south-east)	Viala du Tarn (12)	2001
Ged1	Chasmothecia (E)	France (south-west)	Gèdre (65)	2004
Pyr1	Chasmothecia (P)	France (south-west)	Pyrénées (65)	2005
Czr2	Chasmothecia (E)	Czech Republic	České Budějovice	2005
Czr3	Chasmothecia (E)	Czech Republic	České Budějovice	2005
Jur4	Mycelium	France (north-east)	Jura (39)	2003
Cam1	Mycelium	France (south-west)	Campet (47)	2006
Cam2	Mycelium	France (south-west)	Campet (47)	2006
Cam3	Mycelium	France (south-west)	Campet (47)	2006
Cam4	Mycelium	France (south-west)	Campet (47)	2006
Cam5	Mycelium	France (south-west)	Campet (47)	2006
Cam6	Mycelium	France (south-west)	Campet (47)	2005
Cam7	Mycelium	France (south-west)	Campet (47)	2006
Cam8	Mycelium	France (south-west)	Campet (47)	2005
Cam9	Mycelium	France (south-west)	Campet (47)	2005
Ces1	Mycelium	France (south-west)	Cestas (33)	2003
Ces2	Mycelium	France (south-west)	Cestas (33)	2003
Ces3	Mycelium	France (south-west)	Cestas (33)	2003
Ces4	Mycelium	France (south-west)	Cestas (33)	2006
Gfr1	Mycelium	France (south-west)	Villenave d'Ornon (33)	2001
Gfr2	Mycelium	France (south-west)	Villenave d'Ornon (33)	2001
Pon1	Mycelium	France (south-west)	Pontenx (40)	2001
Aut1	Mycelium	Austria	Vienna	2003
Czr1	Mycelium	Czech Republic	České Budějovice	2005

<sup>1</sup>(E): Chasmothecia of *Erysiphe* morphology; (P): chasmothecia of *Phyllactinia* morphology.

samples from Pyrénées (64 and 65) and one from Landes (40). Finally, 11 samples were collected from other French regions (Brittany, south-east, north-east and centre) and four others from two European countries (Austria and Czech republic). The 33 samples consisted of 33 leaves with either mycelium and conidia (anamorph stage) or ascomata (chasmothecia, teleomorph stage). When present, chasmothecia were most predominantly of the *Microsphaera* type (i.e. with flexuous, dichotomously branched appendages). Chasmothecia of the *Phyllactinia* type (i.e. of bigger size, with straight appendages, having a bulb-like base) were observed among *Microsphaera*-like chasmothecia on some leaves of a few samples in France [Fontainebleau (centre), Gonfaron (south-east), Pyrénées (south-west)].

Chasmothecia were detached from the surface of oak leaves using a scalpel soaked in dichloromethane to maximize harvesting and reduce electrostatic forces (DÉLYE 1997). At least 10 morphologically identical chasmothecia were taken from a single sample, as preliminary studies showed that this was the minimum amount required for ITS amplification. Because of the low occurrence of the *Phyllactinia* morphotype, only a single sample could be included in the study (Table 1). For the anamorph stage, a 0.5 × 0.5 cm leaf fragment was cut out of a sporulating lesion. Samples were named according to their geographic origins and stored in Eppendorf tubes at -80°C before DNA extraction.

## 2.2 DNA extraction and PCR amplification

Initially, fungal DNA of a few samples was extracted with the Chelex method (Chelex 100; Bio-rad, Hercules, CA, USA) (WALSH et al. 1991). Considering the bad storage property of the DNA extracted with this method, the DNA of all other samples was extracted using a protocol previously described by ZOLAN and PUKKILA (1986). The mechanical lysis of cells was achieved by a gentle grinding in 800 µl of CTAB buffer using a micropestle for chasmothecia extraction. For mycelium and conidia extraction, the leaf sample was vigorously shaken in 800 µl of CTAB buffer followed by incubation for at least 1 h in a 57°C water bath. Then, 200 µl of chloroform was added, Eppendorf tubes were vortexed shortly and centrifuged for 10 min at 20817 g (14000 r.p.m.). After transferring the supernatant to a new Eppendorf tube, 800 µl of isopropanol at -20°C was added and mixed gently. The DNA was precipitated at -20°C for at least 1 h. The pellet, obtained by centrifugation for 10 min at 14000 r.p.m., was washed twice with 1 ml of 70% ethanol, and then centrifuged for 5 min at 14000 r.p.m. The DNA pellet was finally dried at room temperature, suspended in 50 µl of ultra pure water, and stored at -20°C.

First, the ribosomal DNA was amplified with the non-specific primers ITS1/ITS4 (WHITE et al. 1990). Because of PCR failure for several samples, we finally used the primer pair o-asco for./o-asco rev. (HEUSER and ZIMMER 2002) that gives better polymerase chain reaction (PCR) success. This pair of primers is more specific for ascomycete species and gives a shorter fragment than that amplified with ITS1/ITS4 (Fig. 1). Additionally, 10 oak powdery mildew samples showing different ITS sequences were amplified for the intergenic spacer region (IGS) by primer set IGS-12a/NS1R (CARBONE and KOHN 1999).

Polymerase chain reactions were carried out in a 15-µl reaction volume with final concentrations of: 0.2 µM forward and reverse primer, 0.2 µM dNTPs, 1X PCR buffer, 3 µM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 U Silverstar DNA polymerase (Eurogentec, Seraing, Belgium) and 3 µl of extracted DNA. The PCR parameters were set as follows: initial denaturation at 94°C for 5 min, followed by (i) 30 cycles of 94°C for 1 min, 55°C for 1 min and 72°C for 1 min (ITS1/ITS4), 36 cycles of (ii) 94°C for 1 min, 48°C for 30 s, and 72°C for 1 min (o-asco for./ o-asco rev.), or 30 cycles of (iii) 94°C for 1 min, 61°C for 1 min and 72°C for 1 min (IGS-12a /NS1R) with a final extension at 72°C for 10 min for all three primer sets. Negative (deionized water) and positive controls were included in each PCR reaction. PCR

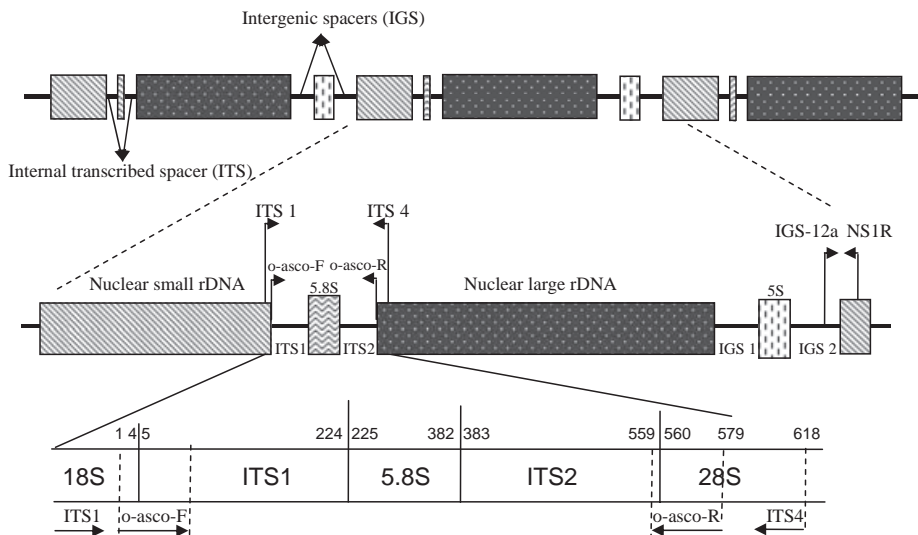


Fig. 1. Locations of PCR primers used in this study and numeration of nucleotide positions in the ribosomal DNA

products were scored for successful amplification on 1% agarose gels and then purified with QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany) before sequencing.

### 2.3 Sequencing and data analysis

The purified PCR products were sequenced in one strand by Genome Express services (Neylan, France). Sequences were edited with Bioedit software (HALL 1999) and were aligned using ClustalX 1.83 package (THOMPSON et al. 1997). Although fragments of expected lengths were obtained with both pairs of ITS primers, the sequences of the ends of amplicons were not of sufficient quality to be used in alignments. The alignment of sequences was therefore performed on a fragment of 515–608 bp among samples (except for two slightly smaller sequences, Fb1 and Czr3; Table 4, Fig. 1). The sequences obtained were compared with those available in the GenBank database using BLAST search (ALTSCHUL et al. 1997).

## 3 Results

### 3.1 ITS sequence variation

The coding region (5.8S rRNA) in the amplified rDNA fragment was conserved among the 33 sequences but polymorphism was observed in the spacer regions ITS1, ITS2 and IGS (Tables 2 and 4). No intra-sample variation was observed. Chromatograms showed a unique sequence pattern, suggesting the presence of a single rDNA sequence for each sample even for those consisting of 10 chasmothecia.

As expected, the *Phyllactinia* morphotype yielded a different ITS sequence (less than 70% homology) from all other samples (GenBank accession number EF693894). It showed a high homology (97.64%) with a previously sequenced *Phyllactinia* species, *Phyllactinia guttata* isolated on *Cornus florida*. No IGS sequence could be obtained for this sample.



Table 2. Locations of mutations in the ITS1 and ITS2 regions between ITS<sub>A</sub>, ITS<sub>B</sub> and ITS<sub>C</sub> (the maximum alignment was performed on 608, 600 and 539 bp for ITS<sub>A</sub>, ITS<sub>B</sub> and ITS<sub>C</sub> respectively)

GenBank accession number	Nucleotide position															
	10	30	35	112	122	124	173	175	193	202	395	397	430	434	515	528
ITS <sub>A</sub> EF672350	T	T	T	T	C	T	A	C	T	T	C	G	C	G	T	C
ITS <sub>B</sub> EF679204	C	.	.	C	.	A	C	T	A	.	T	A	T	A	C	.
ITS <sub>C</sub> EF679205	C	A	C	.	T	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	T

For the 32 remaining samples, consisting of *Microsphaera* chasmothecia or mycelium and conidia, three different ITS haplotypes were obtained, which were named ITS<sub>A</sub>, ITS<sub>B</sub> and ITS<sub>C</sub>. ITS<sub>A</sub> was obtained from 23 samples, both anamorphs and teleomorphs, from all the different geographic regions. ITS<sub>B</sub> was obtained from six anamorph and two teleomorph samples, from north-east, south-east and south-west France, and Austria. Finally, the ITS<sub>C</sub> sequence was represented by only one teleomorph sample from the French Pyrénées. The nucleotidic divergence over the three ITS sequences was on the maximum of the alignment: 1.83% (11 mutations in 600 bp), 1.3% (seven mutations in 539 bp) and 2.78% (15 mutations in 539 bp) between ITS<sub>A</sub> and ITS<sub>B</sub>, ITS<sub>A</sub> and ITS<sub>C</sub>, and ITS<sub>B</sub> and ITS<sub>C</sub>, respectively. Mutations were almost equally distributed among the ITS1 and ITS2 regions (Table 2). Six of the 10 samples chosen for the study of the IGS diversity were successfully amplified. Three different IGS haplotypes were obtained, strictly associated with the three ITS haplotypes, i.e. IGS<sub>A</sub> with ITS<sub>A</sub>, IGS<sub>B</sub> with ITS<sub>B</sub>, and IGS<sub>C</sub> with ITS<sub>C</sub>. The divergence between the three IGS sequences was 3% (10 mutations in 332 bp), 3% (10 mutations in 332 bp) and 2.59% (10 mutations in 338 bp) between IGS<sub>A</sub> and IGS<sub>B</sub>, IGS<sub>A</sub> and IGS<sub>C</sub>, and IGS<sub>B</sub> and IGS<sub>C</sub>, respectively (Table 3).

### 3.2 Nucleotide sequence homology analysis

BLAST analysis of ITS<sub>A</sub>, ITS<sub>B</sub> and ITS<sub>C</sub> against sequences included in the GenBank nucleotide database revealed that each of the three sequences had a very high homology with deposited *Erysiphe* or *Oidium* spp. sequences (Table 4).

ITS<sub>A</sub> was identical to most (seven of 10; the three others differing by only one base) of the ITS sequences of *E. albitoides* deposited in GenBank, e.g. collected on *Quercus petraea* in Switzerland (TAKAMATSU et al. 2006) and on *Q. robur* in Germany (HEUSER and ZIMMER 2002). The same sequence was also described for a number of other species: *E. hypophylla* isolated from *Q. robur* and *Paeonia lutea* in Switzerland (TAKAMATSU et al. 2006), *Oidium mangiferae* from *Mangifera indica* in Australia (LIMKAISANG et al. 2006), *Erysiphe walrothii* from *Vaccinium hirtum* (TAKAMATSU et al. 1999), *Erysiphe* sp. collected on *Wisteria sinensis* in the United Kingdom (HENRICOT and COOK 2007). ITS<sub>B</sub> was

Table 3. Locations of mutations in the IGS region between IGS<sub>A</sub>, IGS<sub>B</sub> and IGS<sub>C</sub>

GenBank accession number	Nucleotide position															
	42	55	56	57	67	95	98	115	124	139	180	211	240	260	310	321
IGS <sub>A</sub> EF679206	G	A	C	T	T	G	T	T	C	T	G	A	C	T	-	T
IGS <sub>B</sub> EF679207	A	.	T	.	C	.	.	C	.	C	T	G	T	C	T	C
IGS <sub>C</sub> EF679208	.	G	T	C	C	A	C	.	A	.	T	G	.	C	-	C

identical to the sequence deposited for the recently described *E. quercicola* observed from *Quercus phillyraeoides* in Japan, and found in other *Quercus* spp. in Asia and Australasia, including *Q. robur* in Australia (TAKAMATSU et al. 2007); the same sequence had also been attributed to several tropical and sub-tropical powdery mildew species on other hosts: *Oidium heveae* on *Hevea brasiliensis* in Brazil; *O. mangiferae* on *M. indica* in Australia and in Argentina; *Oidium bixae* on *Bixa orellana* in Argentina; *Oidium anacardii* on *Anacardium occidentale* in Tanzania; *Oidium* sp. collected on different species of *Acacia* in Japan, Austria, Thailand and Malaysia (LIMKAISANG et al. 2005, 2006). Finally, ITS<sub>C</sub> was very close (99.4% homology) to that of a *M. hypophylla* sample isolated from *Q. robur* by CUNNINGTON et al. (2003) in Japan.

#### 4 Discussion

The major and unexpected result of this study was the determination of four different rDNA sequences among the 33 samples of oak powdery mildew. The nucleotidic divergence of the ITS sequences (not considering the *Phyllactinia* sample) was 1–2.7%, in the lower range (0.2–11%) of among species divergence within the *Microsphaera* and *Erysiphe* genera (TAKAMATSU et al. 1999). The fact that these ITS sequences showed more than 99% homology with sequences available in GenBank assigned to various species of *Erysiphe* or *Oidium*, is suggestive of the existence of three distinct *Erysiphe* taxa associated with oak powdery mildew disease. The hypothesis of intraspecific diversity cannot be totally ruled out as the level of genetic divergence at a single locus is an insufficient criterion of species definition. TAKAMATSU et al. (1999) demonstrated a high intraspecific diversity in the ITS region between two varieties of *Erysiphe glycines* (reaching 12.6%). Intraspecific genetic variation in the ITS was also reported for *Podosphaera* (*Sphaerotheca*) *spiraceae* and *Podosphaera clandestine*, although at a lower level, 0.4–1.5% (CUNNINGTON et al. 2003). The fact that all our samples yielded either ITS<sub>A</sub>, ITS<sub>B</sub> or ITS<sub>C</sub>, and that these three ITS sequences were strictly associated with three different IGS sequences, when determined, is an additional clue supporting the existence of three *Erysiphe* species. However, additional evidence from the study of other independent DNA loci, such as  $\beta$ -tubulin, elongation factor or chitin synthase genes (GLASS and DONALDSON 1995) is still needed. The use of the phylogenetic species concept based on congruence between multiple gene genealogies (TAYLOR et al. 2000) would be of particular importance for resolving oak powdery mildew fungi taxonomy.

*Phyllactinia* species had already been described on oaks. *P. guttata* has generally been reported from *Corylus* and *Fraxinus* but severe infection of *Quercus* in Spain was reported in 1918 (VIENNOT-BOURGIN 1949). Some authors considered that oak *Phyllactinia* is a distinct species: *Phyllactinia roboris* (Gachet) Blumer. The ITS sequence obtained in this study is close to that of *P. guttata* (97.80%). As divergent sequences (up to 8%) have been deposited in GenBank for samples assigned to *P. guttata* on different hosts (none on oak) and no ITS sequence is available in GenBank for *P. roboris*, the identity of the *Phyllactinia* sp. on oak remains unresolved.

The second fungal taxon, obtained from the majority of samples in our study, confirms the presence of the species classically considered as responsible for oak powdery mildew disease in Europe since the last century: *E. alphitoides*. The third taxon found in our study showed a high homology to a sample from *Q. robur* in Japan assigned to *E. hypophylla* (CUNNINGTON et al. 2003). *E. hypophylla* has also been described as an agent of oak powdery mildew in Europe, although not in France to our knowledge. The taxonomic position of this species, which had been restricted to the Fagaceae family until recently (Braun 1987), is still debated. Indeed, morphological identification is mainly based on the hypophyllous habit of *E. hypophylla* and minor differences in the shape of conidia compared with *E. alphitoides*. Yet, conidial morphology has been shown to depend on

Table 4. List of samples, primer pairs used, blast (GenBank accession number) and percentages of homology

Sample name	Fungal material	Primer pair	ITS group	Blast <sup>1</sup>	Homology <sup>2</sup> (%)	IGS group
Fbl1	Chasmothecia	o-asco-F./o-asco-R.	ITS <sub>A</sub>	<i>E. alphitoides</i>	476/476 (100%)	IGS <sub>A</sub>
Rhe 1	Chasmothecia	o-asco-F./o-asco-R.	ITS <sub>A</sub>	(AB257435),	542/542 (100%)	
Col 1	Chasmothecia	o-asco-F./o-asco-R.	ITS <sub>A</sub>	<i>E. walrothii</i>	520/520 (100%)	IGS <sub>A</sub>
Pul1	Chasmothecia	ITS1/ITS4	ITS <sub>A</sub>	(AB015930),	500/500 (100%)	
Gon 2	Chasmothecia	o-asco-F./o-asco-R.	ITS <sub>A</sub>	<i>M. hypophylla</i>	523/523 (100%)	IGS <sub>A</sub>
Gon 3	Chasmothecia	o-asco-F./o-asco-R.	ITS <sub>A</sub>	(AB257434),	542/542 (100%)	
Gon 4	Chasmothecia	ITS1/ITS4	ITS <sub>A</sub>	<i>Oidium</i>	595/595 (100%)	IGS <sub>A</sub>
Tar 1	Chasmothecia	o-asco-F./o-asco-R.	ITS <sub>A</sub>	<i>mangiferae</i>	517/517 (100%)	
Czr 2	Chasmothecia	ITS1/ITS4	ITS <sub>A</sub>	(AB237795),	595/595 (100%)	IGS <sub>A</sub>
Czr 3	Chasmothecia	o-asco-F./o-asco-R.	ITS <sub>A</sub>	<i>Erysiphe</i> sp.	483/483 (100%)	
Cam 2	Mycelium	ITS1/ITS4	ITS <sub>A</sub>	Wisley-2007	594/594 (100%)	IGS <sub>A</sub>
Cam 3	Mycelium	ITS1/ITS4	ITS <sub>A</sub>	(EF183498)	605/605 (100%)	
Cam 4	Mycelium	ITS1/ITS4	ITS <sub>A</sub>		586/586 (100%)	IGS <sub>A</sub>
Cam 5	Mycelium	ITS1/ITS4	ITS <sub>A</sub>		602/602 (100%)	
Cam 6	Mycelium	ITS1/ITS4	ITS <sub>A</sub>		600/600 (100%)	IGS <sub>A</sub>
Cam 7	Mycelium	o-asco-F./o-asco-R.	ITS <sub>A</sub>		534/534 (100%)	
Cam 8	Mycelium	ITS1/ITS4	ITS <sub>A</sub>		608/608 (100%)	IGS <sub>A</sub>
Cam 9	Mycelium	ITS1/ITS4	ITS <sub>A</sub>		597/597 (100%)	
Ces 2	Mycelium	o-asco-F./o-asco-R.	ITS <sub>A</sub>		522/522 (100%)	IGS <sub>A</sub>
Ces4	Mycelium	o-asco-F./o-asco-R.	ITS <sub>A</sub>		526/526 (100%)	
Gfr 2	Mycelium	ITS1/ITS4	ITS <sub>A</sub>		600/600 (100%)	IGS <sub>A</sub>
Pon 1	Mycelium	o-asco-F./o-asco-R.	ITS <sub>A</sub>		536/536 (100%)	
Czr 1	Mycelium	o-asco-F./o-asco-R.	ITS <sub>A</sub>		540/540 (100%)	IGS <sub>B</sub>
Gat 1	Chasmothecia	o-asco-F./o-asco-R.	ITS <sub>B</sub>	<i>Erysiphe</i>	530/530 (100%)	
Gon 1	Chasmothecia	o-asco-F./o-asco-R.	ITS <sub>B</sub>	<i>quercicola</i>	538/538 (100%)	IGS <sub>B</sub>
Jur 4	Mycelium	ITS1/ITS4	ITS <sub>B</sub>	(AB292690)	600/600 (100%)	
Cam 1	Mycelium	o-asco-F./o-asco-R.	ITS <sub>B</sub>	<i>Oidium</i> sp.	538/538 (100%)	IGS <sub>B</sub>
Ces 1	Mycelium	o-asco-F./o-asco-R.	ITS <sub>B</sub>	<i>MUMH1183</i>	540/540 (100%)	
Ces 3	Mycelium	o-asco-F./o-asco-R.	ITS <sub>B</sub>	(AB237809)	543/543 (100%)	IGS <sub>B</sub>
Gfr 1	Mycelium	o-asco-F./o-asco-R.	ITS <sub>B</sub>	<i>O. bixae</i>	515/515 (100%)	
Aut 1	Mycelium	o-asco-F./o-asco-R.	ITS <sub>B</sub>	(AB237787), <i>O. anacardii</i> (AB237786), <i>O. heveae</i> (AB193607), <i>E. bremeri</i> (AB104463) <i>O. mangiferae</i> (AB237794)	523/523 (100%)	IGS <sub>C</sub>
Ged 1	Chasmothecia	o-asco-F./o-asco-R.	ITS <sub>C</sub>	<i>M. hypophylla</i> (AF298544)	536/539 (99.44%)	
Pyr 1	Chasmothecia	ITS1/ITS4	ITS <sub>D</sub>	<i>Ph. guttata</i> (AY870865)	580/594 (97.64%)	IGS <sub>D</sub>

<sup>1</sup>Species showing the highest match (100%) are given.

Only the first GenBank accession number for each species was indicated.

<sup>2</sup>The full length of amplified fragment could not be sequenced in all cases.

characteristics of the host leaf (YARWOOD and GARDNER 1970). Two types of sequences (~2% of divergence) have been deposited in GenBank corresponding to samples described as *E. hypophylla*. The first one was obtained from Swiss samples collected not only on oak but also peony. It showed 100% homology with sequences attributed to *E. alphitoides* and

TAKAMATSU et al. (2006) did not rule out that it could be a single species. The second ITS sequence for *E. hypophylla* was obtained from a single sample from *Q. robur* in Japan (AF298544) and no morphological description is available (CUNNINGTON et al. 2003). The high homology (99.4%) of our ITS<sub>C</sub> to this sequence might corroborate the existence of two distinct species *E. alphitoides* and *E. hypophylla* infecting oak. Unfortunately, the sequence we obtained could not be confirmed as it was derived from a sample extracted with the Chelex method.

Finally, the fourth ITS sequence obtained in our study was totally unexpected but was obtained from nearly 25% of samples, from various regions. Interestingly, this sequence showed complete homology to that of *Erysiphe quercicola*, recently described from *Q. phillyraeoides* by TAKAMATSU et al. (2007), as a new species genetically and morphologically distinct from *E. alphitoides* and *E. hypophylla*. It then seems likely that the oak powdery mildew samples collected in our study belong to this new taxon, previously known only from Asia and Australia (TAKAMATSU et al. 2007).

What do these results tell us about the invasion history of oak powdery mildew in Europe, one century ago? First, our study suggests that the question of the origin of oak powdery mildew in Europe is probably even more complex than it was thought. Among the four taxa found in this study, *Phyllactinia* sp. has been known the longest. This species might be indigenous and have been unnoticed in many cases, especially before the 20th century epidemic, because of its low frequency and inconspicuous symptoms. It remains to determine which *Phyllactinia* species infects oaks.

The three other taxa are more probably of recent appearance on oak in Europe. As expected, *E. alphitoides* was the most commonly found species in our study in agreement with the literature (GRIFFON and MAUBLANC 1912b). But a significant number of samples from different geographic origins yielded another taxon, *E. quercicola* recently described from *Quercus* spp. in Asia. For both fungi, it is remarkable that the ITS sequence was identical to that of other powdery mildew fungi isolated from host plants in distant families and geographic regions, especially *O. mangiferae* and *O. heveae*, for *E. alphitoides* and *E. quercicola*, respectively (CUNNINGTON et al. 2003; LIMKAISANG et al. 2006). *O. mangiferae* is a major disease of mango in several tropical regions (NOFAL and HAGGAG 2005). Similarly, *O. heveae* has been reported as an economically important pathogen of *H. brasiliensis* (para rubber tree) (LIMKAISANG et al. 2006). These findings further support the hypothesis of BOESEWINKEL (1980), based on cross-inoculations between oak and mango, that *E. alphitoides* and *O. mangiferae* could be conspecific. More generally, it might be a clue that other species identified as distinct, primarily because they have been described on unrelated hosts, could be put in synonymy, calling into question ideas about the high specificity of powdery mildew fungi. Evidence accumulates that host range is not always highly restricted, as shown for the *Erysiphe* species (*E. hypophylla* or *E. alphitoides*) which probably expanded its host range from *Quercus* to *Paeonia lutea* in Switzerland (TAKAMATSU et al. 2006). Recent evidence also points to *E. alphitoides* as the agent of powdery mildew of *Wisteria* since 1999 in the UK (HENRICOT and COOK 2007). Some authors suggested that high host specificity might be correlated with evolutionary lability (PARKER and GILBERT 2004). Further biological observations, including cross-inoculations are needed to elucidate this question.

Coming back to the European oak powdery mildew, it might be hypothesized that one or several tropical (possibly Asian) *Erysiphe* species were imported to Europe through exotic hosts, in one or multiple introductions, e.g. by early European explorers as suggested by RAYMOND (1927) and/or more recently with international ornamental plant trade (we found *Q. phillyraeoides* in several French seed and nursery catalogues). The genus *Quercus* is parasitized by more species of Erysiphales than any other plant genus (BURCHILL 1978; BRAUN 1995). This might indicate a general pre-adaptation of *Quercus* spp. to this type of parasites, facilitating host jump from other species, either in the genus *Quercus* or in other

genera. It is noteworthy that LIMKAISANG et al. (2005) proposed the reverse hypothesis, i.e. that it was more likely that *E. alphitoides* expanded its range from *Quercus* to tropical trees than in the opposite direction. However, the sudden burst of *E. alphitoides* on European oaks is not consistent with a coevolutionary history. A phylogeographic study of *E. alphitoides* and the other taxa found in this study could provide clues on their origin(s), as has been shown for other invasive fungal species (MILGROOM et al. 1992). Molecular data on American isolates of oak powdery mildew are also needed to assess their relatedness to European isolates. From an epidemiological point of view, it will be important to assess the spatial and temporal distribution of the different taxa causing powdery mildew on oak in Europe as well as their biological characteristics, such as pathogenicity towards different oak species and temperature requirements (HARRINGTON and RIZZO 1999).

More generally, our results underscore the importance of investigating the fungal species diversity hidden beneath similar morphological and pathogenicity features. Mounting evidence indicates that many plant diseases formerly believed to be caused by a single species are indeed associated with a complex of several cryptic species, with potentially important epidemiological implications (KISS et al. 2006; BICKFORD et al. 2007).

### Acknowledgements

This study is a part of A. Mougou's PhD thesis granted by the Tunisian government and INRA, France. This research was also supported by the Ministry of Agriculture, France (DGFAR). We are very grateful to B. Marçais and M. Kavkova for providing isolates, to X. Capdevielle for collecting samples and X. Gresse for helpful advice in molecular work. We express our gratitude to F. Delmotte, S. Prospero and two anonymous reviewers for reviewing earlier drafts and improving the manuscript.

### References

- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J., 1997: Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389–3402.
- ARNAUD, G.; FOEX, E., 1912a: Sur la forme parfaite de l'Oidium du chêne. *Compt. rendus Acad. Sci.* **154**, 124.
- ARNAUD, G.; FOEX, E., 1912b: Sur l'Oidium des chênes (*Microsphaera quercina*). *Compt. rendus Acad. Sci.* **154**, 1302–1305.
- AYRES, P.G., 1976: Natural resistance to oak mildew. *Arb. J.* **3**, 23–29.
- BICKFORD, D.; LOHMAN, D.J.; SODHI, N.S.; NG, P.K.L.; MEIER, R.; WINKER, K.; INGRAM, K.K.; DAS, I., 2007: Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends Ecol. Evol.* **22**, 148–155.
- BOESEWINKEL, H.J., 1980: The identity of mango mildew, *Oidium mangiferae*. *Phytopathol. Z.* **99**, 126–130.
- BOUDIER, E., 1908: Le blanc du chêne et l'Erysiphe *Quercus* Mérat. *Compt. rendus Acad. Sci.* **147**, 461–462.
- BRAUN, U., 1987: A monograph of the Erysiphales (powdery mildews). *Beih. Nova Hedwigia* **89**, 1–700.
- BRAUN, U., 1995: *The Powdery Mildews (Erysiphales) of Europe*. Jena, Germany: Gustav Fisher Verlag.
- BRAUN, U.; TAKAMATSU, S., 2000: Phylogeny of *Erysiphe*, *Microsphaera*, *Uncinula* (Erysiphaceae) and *Cystotheca*, *Podosphaera*, *Sphaerotheca* (Cystothecaceae) inferred from rDNA ITS sequences – some taxonomic consequences. *Schlechtendalia* **4**, 1–33.
- BRAUN, U.; TAKAMATSU, S.; HELUTA, V.; LIMKAISANG, S.; DIVARANGKON, R.; COOK, R.; BOYLE, H., 2006: Phylogeny and taxonomy of powdery mildew fungi of *Erysiphe* sect. *Uncinula* on *Carpinus* species. *Mycol. Prog.* **5**, 139–153.
- BURCHILL, R.T., 1978: Powdery mildews of tree crops. In: *The Powdery Mildews*. Ed. by SPENCER, D.M., London, UK: Academic Press, pp. 473–493.
- BUREAU, E., 1908: Effets de l'Oidium quercinum sur différentes espèces de chênes. *Compt. rendus Acad. Sci.* **147**, 571–574.

- CARBONE, I.; KOHN, L.M., 1999: A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* **91**, 553–556.
- CUNNINGTON, J. H.; TAKAMATSU, S.; LAWRIE, A.C.; PASCOE, I.G., 2003: Molecular identification of anamorphic powdery mildews (Erysiphales). *Austr. Plant Pathol.* **32**, 421–428.
- DELATOUR, C., 1983: Oak dieback in Europe. *Rev. For. Franç.* **35**, 265–282.
- DÉLYE, C., 1997: Variabilité de l'agent de l'oïdium de la vigne (*Uncinula necator*) et résistance aux fongicides inhibiteurs de la biosynthèse des stéroïdes. PhD thesis, INA-PG Université de Paris VI et XI.
- DESPREZ-LOUSTAU, M.L.; ROBIN, C.; BUÉE, M.; COURTECUISSIE, R.; GARBAYE, J.; SUFFERT, F.; SACHE, I.; RIZZO, D., 2007: The fungal dimension of biological invasions. *Trends Ecol. Evol.* **22**, 472–480.
- DOÉ, F., 1923: L'oïdium et les forêts feuillues du Nord-Est de la France. *Rev. Eaux Forêts* **61**, 429–436.
- DUCOMET, V., 1913: Recherches sur les maladies du chêne et du chataignier en Bretagne. *Ann. Epiphyt.* **1**, 87–105.
- FOEX, M. E., 1919: Quelques remarques au sujet de la présence de périthèces de *Phyllactinia corylea* sur des feuilles de Chêne atteintes de « Blanc ». *Bull. Soc. Pathol. Vég. France.* **6**, 161–166.
- FOEX, M.E., 1941: L'invasion des chênes d'Europe par le blanc ou oïdium. *Rev. Eaux Forêts* **79**, 338–349.
- FRANCIS, S.A.; RODEN, B.C.; ADAMS, M.J.; WEILAND, J.; ASHER, M.J.C., 2007: Comparison of ITS sequences from UK and North American sugar-beet powdery mildews and the designation of *Erysiphe betae*. *Mycol. Res.* **111**, 204–212.
- GLASS, N.L.; DONALDSON, G., 1995: Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1323–1330.
- GRIFFON, E.; MAUBLANC, A., 1908: Sur le blanc du Chêne. *Compt. rendus Acad. Sci.* **147**, 437–439.
- GRIFFON, E.; MAUBLANC, A., 1911: Le blanc du chêne en 1910. *Bull. Soc. Mycol. F.* **27**, 60–67.
- GRIFFON, E.; MAUBLANC, A., 1912a: Les *Microsphaera* des Chênes et les périthèces du blanc du Chêne. *Compt. rendus Acad. Sci.* **154**, 935–938.
- GRIFFON, E.; MAUBLANC, A., 1912b: Les *Microsphaera* des Chênes. *Bull. Soc. Mycol. F.* **28**, 88–104.
- HALL, T. A., 1999: BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98 NT. *Nucl. Acids.Symp. Ser.* **41**, 95–98.
- HARIOT, P., 1907: Note sur un oïdium du chêne. *Bull. Soc. Mycol. F.* **23**, 157–159.
- HARRINGTON, T.C.; RIZZO, D.M., 1999: Defining species in the fungi. In: *Structure and Dynamics of Fungal Populations*. Ed by WORRALL, J.J. Amsterdam: Kluwer Publishers, pp. 41–73.
- HENRICOT, B.; COOK, R.T.A., 2007: New report of powdery mildew on Wisteria in the UK. *New Dis. Rep.*(<http://www.bspp.org.uk/ndr/>) **15**.
- HEUSER, T.; ZIMMER, W., 2002: Quantitative analysis of phytopathogenic ascomycota on leaves of pedunculate oaks (*Quercus robur* L.) by real-time PCR. *FEMS Microbiol. Lett.* **209**, 295–299.
- HIRATA, T.; TAKAMATSU, S., 1996: Nucleotide sequence diversity of rDNA internal transcribed spacers extracted from conidia and cleistothecia of several powdery mildew fungi. *Mycoscience* **37**, 283–288.
- KISS, L.; KHOSLA, K.; JANKOVICS, T.; NIINOMI, S.; BRAUN, U.; TAKAMATSU, S., 2006: A morphologically ill-founded powdery mildew species, *Pleochaeta indica*, is recognized as a phylogenetic species based on the analysis of the nuclear ribosomal DNA sequences. *Mycol. Res.* **110**, 1301–1308.
- LIMKAISSANG, S.; KOM-UN, S.; LUIZ FURTADO, E.; LIEW, W. K.; SALLEH, B.; SATO, Y.; TAKAMATSU, S., 2005: Molecular phylogenetic and morphological analyses of *Oidium beveae*, a powdery mildew of rubber tree. *Mycoscience* **46**, 220–226.
- LIMKAISSANG, S.; CUNNINGTON, J.H.; LIEW, K.W.; SALLEH, B.; SATO, Y.; DIVARANGKON, R.; FANGFUK, W.; TO-ANUN, C.; TAKAMATSU, S., 2006: Molecular phylogenetic analyses reveal a close relationship between powdery mildew fungi on some tropical trees and *Erysiphe albitoides*, an oak powdery mildew. *Mycoscience* **47**, 327–335.
- MACEK, J., 1975: Three species of oak powdery mildews in Slovenia. *Gozdarski Vestnik* **33**, 299–304.
- MILGROOM, M.G.; LIPARI, S.E.; WANG, K., 1992: Comparison of genetic diversity in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria (Endothia) parasitica*, from China and the U.S. *Mycol. Res.* **96**, 1114–1120.
- NAGELEISEN, M., 2006: Quelques indicateurs de la santé des forêts françaises. Paris: Les Cahiers du DSF, 1-2006 (La santé des forêts [France] en 2003-2004), Min. Agri. Pêche (DERF), pp 16–17.
- NOFAL, M.A.; HAGGAG, W.M., 2005: Integrated management of powdery mildew mango in Egypt. *Crop Prot.* **25**, 480–486.
- PARKER, I.M.; GILBERT, G.S., 2004: The evolutionary ecology of novel plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **35**, 675–700.
- PUTTEMANS, A., 1920: Sur l'oïdium du chêne au Brésil. *Bull. Soc. Pathol. Vég. France* **7**, 37–40.

- RAYMOND, J., 1924: Périthèces de *Microsphaera quercina* (Schw.) Burr observés dans le sud-ouest de la France. Rev. Pathol. Vég. Entomol. Agric. **11**, 254–258.
- RAYMOND, J., 1927: Le “blanc” du chêne. Ann. Epiphyties **13**, 94–129.
- ROLL-HANSEN, F., 1961: *Microsphaera hypophylla* Nevodovskij (*M. silvatica* Vlasov), an oak powdery mildew fungus. Medd. Norsk. Skogfor. **59**, 41–61.
- SAENZ, G.S.; TAYLOR, J.W., 1999: Phylogeny of the Erysiphales (powdery mildews) inferred from internal transcribed spacer ribosomal sequences. Can. J. Bot. **77**, 150–168.
- SALMON, E.S., 1900: A monograph of the Erysiphaceae. Mem. Torrey Bot. Club **9**, 1–292.
- SPEER, E. O., 1975: Investigations of the morphology and systematics of the Erysiphaceae II. Oak mildew *Microsphaera albitoides* Griff. & Maubl. Sydowia **27**, 112–126.
- TAKAMATSU, S., 2004: Phylogeny and evolution of the powdery mildew fungi (Erysiphales, Ascomycota) inferred from nuclear ribosomal DNA sequences. Mycoscience **45**, 147–157.
- TAKAMATSU, S.; HIRATA, T.; SATO, Y., 1998: Phylogenetic analysis and predicted secondary structures of the rDNA internal transcribed spacers of the powdery mildew fungi (Erysiphaceae). Mycoscience **39**, 441–453.
- TAKAMATSU, S.; HIRATA, T.; SATO, Y.; NOMURA, Y., 1999: Phylogenetic relationships of *Microsphaera* and *Erysiphe* section *Erysiphe* (powdery mildews) inferred from the rDNA ITS sequences. Mycoscience **40**, 259–268.
- TAKAMATSU, S.; BOLAY, A.; LIMKAISANG, S.; KOM-UN, S.; TO-ANUN, C., 2006: Identity of a powdery mildew fungus occurring on *Paeonia* and its relationship with *Erysiphe hypophylla* on oak. Mycoscience **47**, 367–373.
- TAKAMATSU, S.; BRAUN, U.; LIMKAISANG, S.; KOM-UN, S.; SATO, Y.; CUNNINGTON, J.H., 2007: Phylogeny and taxonomy of the oak powdery mildew *Erysiphe albitoides sensu lato*. Mycol. Res. **111**, 809–826.
- TAYLOR, J.W.; JACOBSON, D.J.; KROKEN, S.; KASUGA, T.; GEISER, D.M.; HIBBETT, D.S.; FISHER, M.C., 2000: Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. Fungal Genet. Biol. **31**, 21–32.
- THOMPSON, D.A.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G., 1997: The clustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. **25**, 4876–4882.
- VIENNOT-BOURGIN, G., 1949: Les champignons parasites des plantes cultivées. Paris: Masson, pp. 755.
- VIENNOT-BOURGIN, G., 1968: Note sur les Erysiphacées. Bull. Soc. Mycol. F. **84**, 117–118.
- VINEY, R., 1970: L'oïdium du chêne, incident léger ou désastre? Rev. For. France. **23**, 365–369.
- WALSH, P.S.; METZGER, D.A.; HIGUCHI, R., 1991: Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. BioTechniques **10**, 506–513.
- WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J., 1990: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenies. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Ed. by INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. San Diego, USA: Academic Press, pp. 315–322.
- WOODWARD, R. C.; WALDIE, J. S. L.; STEVEN, H. M., 1929: Oak mildew and its control in forest nurseries. Forestry **3**, 38–56.
- YARWOOD, C.E.; GARDNER, M.W., 1970: Leaf surface and leaf hairs affect length of conidiophores of Erysiphaceae. Mycologia **62**, 707–713.
- ZAHOROVSKA, E., 1988: Parasitic *Microsphaera* and its ascocarp state on Slovakian oaks. Ceska Mykol. **42**, 149–157.
- ZOLAN, M. E.; PUKKILA, P. J., 1986: Inheritance of DNA methylation in *Coprinus cinereus*. Mol. Cell. Biol. **6**, 195–200.

## **Article 2**

**Spatial distribution of genetically differentiated groups of oak powdery mildew fungi in France, using quick molecular detection methods**



# Spatial distribution of lineages of oak powdery mildew fungi in France, using quick molecular detection methods

Amira MOUGOU-HAMDANE<sup>1</sup>, Xavier GIRESSÉ<sup>2</sup>, Cyril DUTECH<sup>1</sup>, Marie-Laure DESPREZ-LOUSTAU<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> INRA, UMR1202 BIOGECO, Équipe de Pathologie Forestière, 71 avenue Édouard Bourleaux, 33140 Villenave d'Ornon, France

<sup>2</sup> INRA, UMR1065 Santé Végétale, Équipe Diversité et Adaptation des Populations de Bioagresseurs, 71 avenue Édouard Bourleaux, 33140 Villenave d'Ornon, France

(Received 24 February 2009; accepted 25 June 2009)

## Keywords:

*Erysiphe alphitoides* /  
*Erysiphe quercicola* /  
cryptic species /  
Erysiphales /  
ITS /  
biological invasion

## Mots-clés :

*Erysiphe alphitoides* /  
*Erysiphe quercicola* /  
espèces sryptiques /  
Erysiphales /  
ITS /  
invasion biologique

## Abstract

- Powdery mildew is a major fungal disease of oaks in Europe. Recent studies using internal transcribed spacer (ITS) sequences suggested the presence of four different lineages (putative species). The objective of the study was to investigate the spatial distribution of these lineages/species and, in particular, to test the hypothesis of a spatial differentiation, at various scales: regional (France), altitudinal (a Pyrenean transect) and local (within a forest plot).
- Detection methods for the four ITS types were developed: (1) single strand conformation polymorphism analysis (SSCP); (2) PCR amplifications, for which specific primers were designed. SSCP proved to be efficient for the detection of *Erysiphe alphitoides* and *E. quercicola* types. In contrast, the rarer ITS types corresponding to *E. hypophylla* and *Phyllactinia guttata* (*sensu lato*) were only detected by specific amplification.
- The study confirmed the strong predominance of the ITS sequence associated with *E. alphitoides* at all spatial scales (with a frequency higher than 80%). Isolates presumably belonging to *E. quercicola* (i.e. with same ITS type), a recently described species not yet recorded in Europe, were also found in all French regions at a significant frequency (15% at national level).
- No pattern of spatial differentiation between the putative species could be demonstrated: *E. alphitoides* was often found in association with different ITS types in the same region, the same tree, and even in the same lesion.

## Résumé – Distribution spatiale de lignées d'oïdium des chênes en France analysée à l'aide d'outils rapides de caractérisation moléculaire.

- L'oïdium est l'une des maladies fongiques les plus importantes sur chênes en Europe. Des études récentes basées sur l'internal transcribed spacer (ITS) ont suggéré l'implication de quatre lignées (espèces putatives) différentes. L'objectif de l'étude était de caractériser la distribution spatiale de ces lignées/espèces et en particulier de tester l'hypothèse d'une différenciation spatiale à plusieurs échelles : régionale (France), altitudinale (transect pyrénéen) et locale (au sein d'une parcelle forestière).
- Des méthodes de détection des quatre types d'ITS ont été développées : (1) analyse SSCP ; (2) amplification par PCR de l'ITS par des amorces spécifiques. La SSCP a permis de détecter facilement les ITS correspondant à *E. alphitoides* et *E. quercicola*. Par contre, les ITS plus rares correspondant à *E. hypophylla* et *Phyllactinia guttata* (*sensu lato*) n'ont été détectés que par amplification spécifique.
- L'étude a confirmé la forte prédominance (avec une fréquence supérieure à 80 %) de la séquence d'ITS associée à *E. alphitoides*. Les isolats présentant la même séquence d'ITS qu'*E. quercicola*, espèce récemment décrite et encore non mentionnée en Europe, ont également été retrouvés dans toutes les régions françaises à une fréquence importante (15 % en moyenne pour l'échantillonnage national).
- Aucune différenciation spatiale entre les espèces putatives n'a pu être mise en évidence : *E. alphitoides* a souvent été détectée en association avec des isolats de différents types d'ITS dans la même région, le même arbre, voire la même lésion.

\* Corresponding author: [loustau@bordeaux.inra.fr](mailto:loustau@bordeaux.inra.fr)

## 1. INTRODUCTION

Powdery mildew is among the most important diseases of oak in European forests (Butin, 1995). The disease appeared suddenly and propagated to almost all Europe in the early 20th century. It was particularly severe on *Quercus robur* and foresters were afraid that powdery mildew could decimate indigenous oaks (see Mougou et al. 2008, for history of the disease and early references). The sudden apparition (i.e. disease records were absent prior 1907), as well as the spread of the disease and its severity on oaks, supported the exotic invader hypothesis (Raymond, 1927). Although some mycologists suggested the introduction of an American species, a new species, *Microsphaera alphitoides* Griffon and Maubl. (current name: *Erysiphe alphitoides* (Griffon and Maubl.) U. Braun and S. Takam.) was described by Griffon and Maublanc (1912) on the basis of morphological differences with previously described oak powdery mildew species.

We recently revisited the question of the identity of the fungi that cause oak powdery mildew in Europe, especially France, by using analyses of nuclear ribosomal internal transcribed spacers (ITS) sequences (Mougou et al., 2008). The analyses of ribosomal DNA have supplemented the classical morphological criteria used in fungal taxonomy and helped to establish new fungal phylogenies (White et al., 1990), including for Erysiphales (Saenz and Taylor 1999, Takamatsu, 2004). Specifically, based on the finding that polymorphisms found in the ITS generally differentiate between species (White et al., 1990), this region has been assigned a primary role in molecular identification of fungal species. This role is especially valued with the barcoding approach (Hebert et al., 2003), although no single unifying threshold in sequence divergence could be defined for species delimitation among fungi (Nilsson et al., 2008).

Our previous work confirmed the presence of three species already reported in Europe as causal agents of powdery mildew on oaks: *E. alphitoides* and, far less frequently, *E. hypophylla* (Nevod.) U. Braun & Cunningt. and *Phyllactinia guttata* (Wallr.) Lév. (sensu lato, including *P. roboris* (Gachet) S. Blumer), on the basis of their ITS signature (Mougou et al., 2008). An unexpected additional finding was the detection of a fourth ITS type, which exactly matched the sequence of a new species recently described on Asian oaks, *Erysiphe quercicola* S. Takam. & U. Braun and not yet recorded in Europe (Limkaisang et al., 2005; 2006; Takamatsu et al., 2006). The occurrence of several species, or at least genetically differentiated groups, could have important epidemiological implications, with the severity of the disease possibly linked to the behaviour of each group. For example, recent studies with grapevine powdery mildew confirmed the presence of two genetically differentiated biotypes which could lead to two different forms of the disease (Delye and Corio-Costet, 1998; Montarry et al., 2008). The different frequencies of the two biotypes during epidemic progress in a season is consistent with putative different ecological requirements between the two biotypes (Montarry et al., 2009). There is mounting evidence of the existence of cryptic species or genetically differentiated groups within fungi (Taylor et al., 2006), especially

pathogenic fungal species (e.g. Crous et al., 2004; Fournier and Giraud 2008). In some cases, cryptic species were shown to exhibit different geographical ranges (Taylor et al., 2006). In other cases, such as grapevine pathogens, the coexistence of competing groups of organisms sharing common food needs raises the question of niche differentiation (Montarry et al., 2008; 2009). Similar questions need to be addressed on oak powdery mildew, but a prerequisite is an accurate description of the spatial distribution of the four lineages (putative species) in European forests.

The aim of the present study was to investigate the spatial distribution of the four lineages/species of fungi causing oak powdery mildew in France, and, in particular, to test the hypothesis of a spatial differentiation, at various scales. This required the development of molecular methods for the rapid identification of the four ITS types in large samplings. Single-strand conformational polymorphism analysis (SSCP) was used as an inexpensive, convenient, and sensitive method for determining genetic variation (Orita et al., 1989; Sunnucks et al., 2000). This analysis was completed by specific amplifications developed for the four ITS types.

## 2. MATERIAL AND METHODS

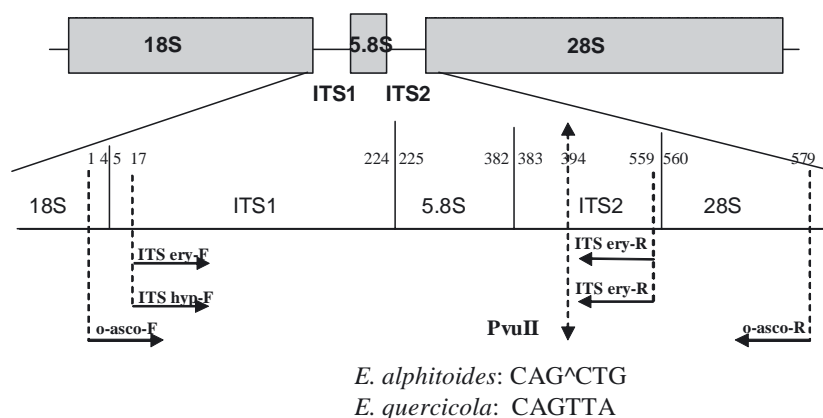
### 2.1. Population sampling

Three samplings performed at various spatial levels were analysed.

A regional sampling covering most of France was performed by the DSF technicians (Département de la Santé des Forêts – Ministry of Agriculture, France) from June to October 2007 (with the majority of samples in July), on the 16 km × 16 km grid of the European International Co-operative Programme Forests network (<http://www.icp-forests.org/>), in oaks-containing plots. This gave 108 plots in different areas of the country. The sampling was mainly focused on *Q. robur* which is the most widely distributed oak species and one of the most susceptible species to powdery mildew (Ayres, 1976). However, additional samples were taken on other oak species (see below). For each plot, five leaves sampled on five different oak trees were collected, wrapped in paper and sent by postal mail to the laboratory for processing. Leaves with inconspicuous infection or in bad condition were discarded at reception, giving a final number of 470 samples.

The second sampling was achieved on an altitudinal gradient in the western Pyrenees region. *Quercus robur* seedlings were initially grown from acorns in a greenhouse, until they had 5–10 leaves in a susceptible stage (i.e. soft, not fully expanded, Edwards and Ayres 1982). These seedlings were then placed at five altitudes in the Luz valley (latitude from 42° 47' N to 43° 45' N; longitude from 00° 25' W to 00° 01' E) in May-June 2006 and 2007 and exposed during ten days allowing powdery mildew infections to take place. Seedlings were then taken back to the laboratory and incubated during ten days in a growth chamber (16 h light, 26 °C/8 h dark, 19 °C) to enable sporulation. One white circular spot corresponding to a sporulating lesion was sampled per seedling, resulting in 83 samples in 2006 and 150 in 2007.

The third sampling was achieved in June 2006, within a plot in the state forest of Campet (latitude 44° 12' 14" N; longitude 00° 10' 11" W). Samples were taken from 16 *Q. robur* and one



**Figure 1.** Locations of PCR primers and of PvuII restriction site in the ITS sequence for *Erysiphe* species.

**Table I.** Sequences of primer pairs used for specific amplifications.

Species	Sequence
<i>E. alphitoides</i> + <i>E. quercicola</i>	ITS-ery F 5'-CTCAGTCGTGGCATCTGCT-3' ITS-ery R 5'-ATGTGACTGGAGCAAGTGG-3'
<i>E. hypophylla</i>	ITS-hyp F 5'-CTCAGTCGTGGCATCTGCC-3' ITS-ery R 5'-ATGTGACTGGAGCAAGTGG-3'
<i>P. guttata</i> (Mmbaga <i>et al.</i> , 2004)	PG <sub>1</sub> 5'-CTGAGCGTGAAGACTCTC-3' PG <sub>2</sub> 5'-GGTATCCCTACCTGATTC-3'

*Q. pyrenaica* trees, distant from 15 to 500 m (with 1 to 6 leaves per tree), giving a total of 96 samples.

## 2.2. Fungal material

All the samples consisted of leaves bearing sporulating lesions (mycelium and conidia, i.e. anamorph stage) of oak powdery mildew. Sporulating lesions were mainly observed on the upper side of leaves. When present, sporulating lesions on the lower side were sampled. One leaf fragment of ~0.5 cm<sup>2</sup> was cut out with a scalpel in a sporulating lesion in each leaf. These fragments were transferred into 2 mL microtubes, labelled according to their origins and stored at -80 °C before DNA extraction.

## 2.3. Detection of oak powdery mildew ITS types

Fungal DNA was extracted using a slightly modified protocol previously described by Zolan and Pukkila (1986), without grinding of leaf fragments (see Mougou *et al.*, 2008).

For SSCP analysis, the non specific amplification of the ITS region was achieved using the o-asco for/o-asco rev primer pair which had been designed to amplify ascomycota fungi (Heuser and Zimmer, 2002). For each individual reaction, 5–10 µL of the PCR product was mixed with 5 µL of a solution containing 95% formamide, 20 mM EDTA, 0.05% bromophenol blue and 0.05% xylene cyanol. Sequence polymorphism was revealed by loading 3.5 µL of the previous mixture on a 6% non-denaturing polyacrylamide gel with a migration at 4 °C at 10 W overnight. The gel was silver-stained as described by

Benbouza *et al.* (2006). DNA templates of the different ITS types already sequenced in Mougou *et al.* (2008) were used as reference samples.

In addition to SSCP, we tried to design oligonucleotide primer pairs for the four ITS types in order to perform specific PCR-based detection. For the *Phyllactinia* species, the PG<sub>1</sub>/PG<sub>2</sub> primers already described in the literature (Mmbaga *et al.*, 2004) for the amplification of *P. guttata* from *Cornus* were used, since we checked from sequence alignments that they could amplify the sequence of *Phyllactinia* obtained in our previous study (Mougou *et al.*, 2008). For the *Erysiphe* species, the three ITS sequences corresponding to *E. alphitoides*, *E. hypophylla* and *E. quercicola* were aligned, and the PRIMER 3 software (Rozen and Skaletsky, 2000) was used to design primer sets in the variable regions. Given the different parameters required for the choice of oligonucleotides (e.g. length of the primer, GC content, hybridizing temperature) and the low diversity of sequences, only two primer pairs could be designed: one common to *E. alphitoides* and *E. quercicola* (ITS-ery F/ITS-ery R), the other for *E. hypophylla* (ITS-hyp F/ITS-ery R) (Fig. 1; Tab. I). The two primer pairs only differed by one base (CT vs. CC at the 3' end) in the forward primer. Although a CC dinucleotide at the 3' end is generally assumed to ensure correct binding specificity (Lowe *et al.* 1990), sequencing of the amplicon was used to ascertain the results when positive amplification was obtained with *E. hypophylla* primers. Polymerase chain reactions were carried out in a 15 µL reaction volume with final concentrations of: 0.2 µM forward and reverse primer, 0.2 µM dNTPs, 1X PCR buffer, 3 µM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 U Silverstar DNA polymerase (Eurogentec, Seraing, Belgium) and 3 µL of extracted DNA. The PCR parameters were set as follows: initial denaturation at 94 °C for 5 min, followed by 30 cycles of 94 °C for 1 min, 58 °C for 1 min and 72 °C for 1 min with a final extension at 72 °C for 10 min.

**Table II.** Comparative test of the two detection methods (non specific amplification and SSCP vs. specific amplifications and CAPS) on 274 samples.

SA-CAPS SSCP	<i>E. alphitoides</i>	<i>E. quercicola</i>	<i>E. hypophylla</i>	<i>P. guttata</i>	<i>E. alphitoides</i> + <i>E. quercicola</i>	<i>E. alphitoides</i> + <i>E. hypophylla</i>	TOTAL SSCP
<i>E. alphitoides</i>	239	0	1	0	2	13	255
<i>E. quercicola</i>	0	13	0	0	0	0	13
<i>E. alphitoides</i> + <i>E. quercicola</i>	0	0	0	0	3	0	3
No detection	0	0	0	1	0	2	3
<b>TOTAL SA-CAPS</b>	<b>239</b>	<b>13</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>15</b>	<b>274</b>

To further discriminate the two ITS types associated with *E. alphitoides* and *E. quercicola*, the cleaved amplified polymorphism (CAPS) technique was used. DNA amplification with ITS-ery F/ITS-ery R was followed by an enzymatic digestion of the PCR products using the *PvuII* enzyme. The amplified ITS sequence associated with *E. alphitoides* has a restriction site present at the position of the 377th nucleotide which is not present in *E. quercicola* ITS sequence. *E. alphitoides* ITS sequence is therefore expected to give two fragments of 165 bp and 377 bp after digestion with *PvuII* whereas the sequence of *E. quercicola* is expected to show the original 542 bp fragment after digestion. Two microlitres of each PCR product was digested in a 10 µL reaction containing 1 U of *PvuII*. To rule out the possibility of partial digestions, PCR products were digested over night. Digested PCR products were electrophoresed on 1.2% TBE agarose gels. The gels were stained with ethidium bromide, visualized, and photographed under UV light.

#### 2.4. Validation of the methods

The validity of SSCP to discriminate the ITS types was checked with DNA templates from sequenced samples (Mougou et al., 2008). We verified that each type could indeed be differentiated by a specific band (data not shown). Similarly, to test the specificity of the specific designed primers for their corresponding species, each primer pair was used in a PCR reaction containing DNA template (already sequenced) encoding each ITS type. This test was performed on 15 DNA samples: four assigned to *E. quercicola*, three assigned to *P. guttata*, one assigned to *E. hypophylla* (since only one was available for this species) and seven assigned to *E. alphitoides*. The 15 DNA samples were amplified separately with the three different primer pairs. A lack of a PCR product after 30 cycles (using the corresponding PCR program) was deemed to demonstrate lack of cross-reactivity between primers specific of a given ITS type and DNA from other ITS types. The PCR parameters were set as follows: initial denaturation at 94 °C for 5 min, followed by 30 cycles of 94 °C for 1 min, 58 °C for 1 min and 72 °C for 1 min with a final extension at 72 °C for 10 min for the two designed primer sets. PCR products were scored for successful amplification on 1% agarose gels. On the 15 DNA samples, the primer pairs ITS-ery F/ITS-ery R, ITS-hyp F/ITS-ery R and PG<sub>1</sub>/PG<sub>2</sub> successfully amplified the target species and failed to amplify the non target ones. The DNA reference samples were also used to check that ITS sequences associated with *E. alphitoides* and *E. quercicola* showed two fragments of 165 and 377 bp and the original 542 bp fragment respectively after digestion with *PvuII*.

Finally, the SSCP and the specific amplifications-CAPS (SA-CAPS) methods were compared on 274 samples from the three samplings (28 samples from Campet, 208 from the Pyrenean transect and

38 from the French regions), i.e. all 274 samples were analysed both in SSCP and with the three primer pairs and CAPS.

### 3. RESULTS

#### 3.1. Comparison of the SSCP and specific amplification-CAPS methods

Very similar results were obtained by the two methods for *E. alphitoides* and *E. quercicola*: among the 258 positive samples for *E. alphitoides* in SSCP (255 alone and 3 with *E. quercicola*), 257 were also positive for *E. alphitoides* with SA-CAPS (Tab. II). Similarly, the 16 positive samples in SSCP for *E. quercicola* (13 alone and 3 with *E. alphitoides*) were also positive with SA-CAPS. SA-CAPS further allowed the detection of *E. hypophylla* (confirmed by sequencing) and *P. guttata* in some samples, especially *E. hypophylla* in addition to *E. alphitoides* in 13 samples where only *E. alphitoides* had previously been detected in SSCP.

#### 3.2. Detection success in the field samplings

The overall success of detection was estimated by the number of lesions from which ITS was successfully amplified and characterized, over the total number of lesions. A high rate was obtained for the altitudinal gradient, 88.4% (206/233) with SSCP, slightly increased when adding SA-CAPS (208/233). Much lower rates were obtained for the other two samplings: 50% (48/96) for Campet with SA-CAPS and 35.3% (166/470) for the regional sampling with SSCP. For the latter, we observed a decreasing trend of amplification success over time with values of 43%, 36%, 28% and 16% for samples collected in June, July, August and September-October, respectively.

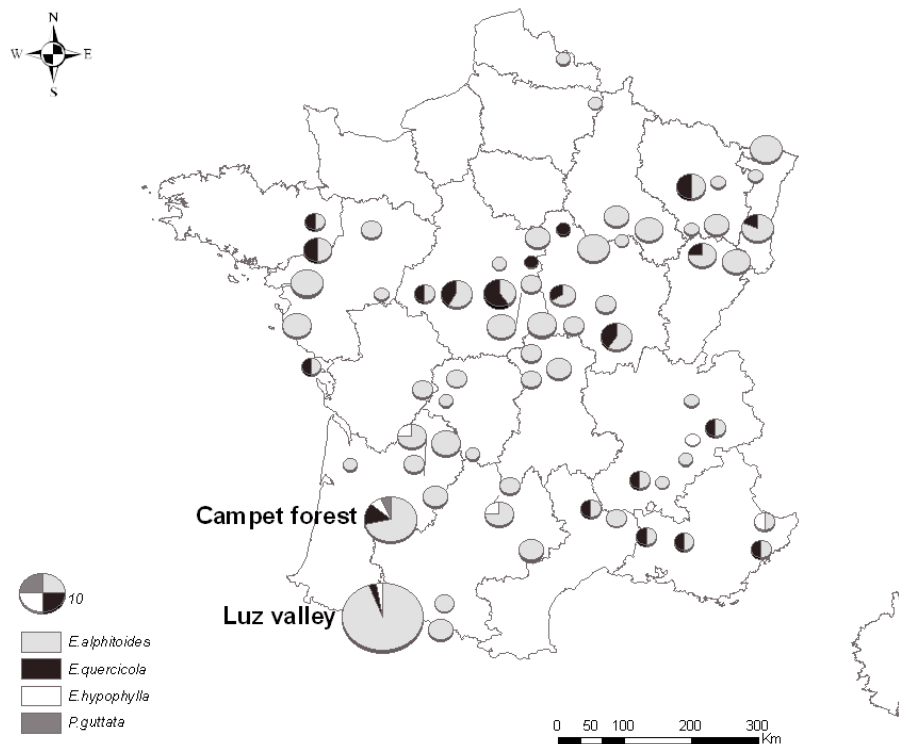
#### 3.3. Regional diversity

*E. alphitoides* was the most frequently detected ITS type present in more than 80% lesions (Tab. III). ITS types corresponding to *E. quercicola* and *E. hypophylla* were also detected at low frequency (15% and 2%, respectively). Only one ITS type was detected from a single lesion. Out of the 16 lesions located on the lower side of leaves, a PCR amplification was obtained for only nine and only the ITS type corresponding to *E. alphitoides* was detected.

**Table III.** Detection of the different putative species (ITS types) for the three spatial levels of the study (in % of samples were ITS types could be detected).

	Total number of samples	Number of samples with positive detection	<i>E. alphitoides</i> (%)	<i>E. quercicola</i> (%)	<i>E. hypophylla</i> (%)	<i>P. guttata</i> (%)	Multiple detections (%)
Regional sampling	470	166	82.5	15.1	2.4	0	0
Altitudinal gradient	233	208	97.1	2.4	3.8	0	3.4
Campet forest	96	48	85.4	20.8	8.3	12.5	27.1

The total in each row can exceed 100% due to multiple detections, i.e. when two ITS types are detected in the same sample. For the regional and altitudinal samplings, data for *E. alphitoides* and *E. quercicola* were first obtained with SSCP; all samples were then amplified with specific primers of *P. guttata* and *E. hypophylla*. For the Campet sampling, the results are those of specific PCR-CAPS performed to detect the four ITS types. The PCR detection of the *E. hypophylla* ITS type was confirmed by sequencing.

**Figure 2.** Distribution of the oak powdery mildew ITS types in France (regional DSF survey 2007, altitudinal sampling in Luz valley 2006–2007 (208 samples) and local sampling in Campet Forest 2006 (48 samples); see text for details).

The geographical distribution of taxa showed that *E. alphitoides* ITS type was ubiquitous. The ITS type corresponding to *E. quercicola* was also found in almost all French regions. On the other hand, ITS corresponding to *E. hypophylla* was only found in southern regions, but in only seven stands (Fig. 2).

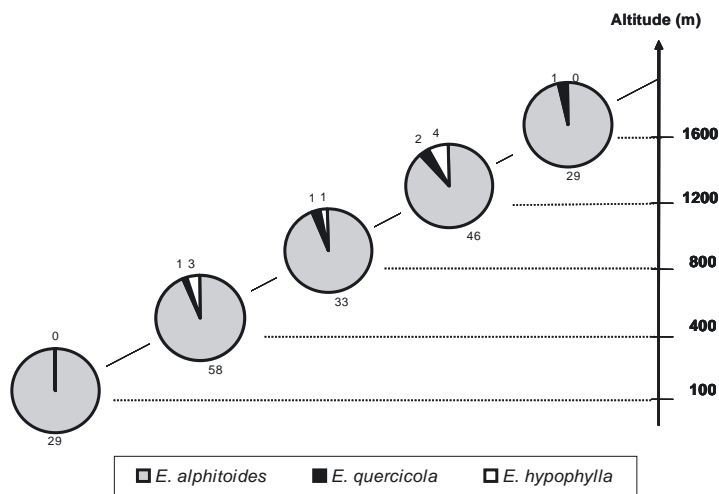
### 3.4. Diversity across an altitudinal gradient

The Pyrenean region showed a low diversity in ITS types: 97.1% (202 out of 208 samples) of lesions yielded the type related to *E. alphitoides* (Tab. III). ITS types related to *E. quercicola* and *E. hypophylla* were also present but at much lower frequencies, 2.4 and 3.8%, respectively. In spite of these low frequencies, the two types were detected at almost all the altitudes from 400 to 1200 m for *E. hypophylla* and 400 to 1600 m

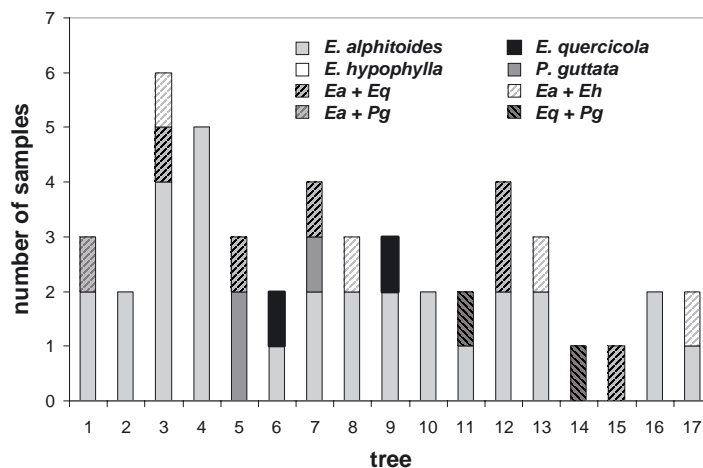
for *E. quercicola* (Fig. 3). The *E. hypophylla* type was almost always detected in conjunction with that of *E. alphitoides*. All the *E. hypophylla* ITS types were detected in lesions collected in 2007, whereas the *E. quercicola* ITS type were equally detected in the two annual samplings (three in 2006 and two in 2007).

### 3.5. Intra plot diversity: Campet Forest

*E. alphitoides* was detected from most samples in the Campet forest (85% of lesions) in all but one sampled trees (Tab. III, Fig. 4). Nine out of the 17 oak trees were also positive for *E. quercicola* ITS type. *E. hypophylla* and *P. guttata* ITS types were rarer. Three different ITS types were found on four trees i.e. trees 3, 5, 7 and 11 (Fig. 4).



**Figure 3.** Distribution of the *Erysiphe* ITS types across the Pyrenean gradient (2006 and 2007 samplings). *E. hypophylla* ITS type was mostly detected in conjunction with *E. alphitoides*.



**Figure 4.** Distribution of the different ITS types in oak trees in Campet (all trees are *Q. robur* except #16 which is *Q. pyrenaica*). Stripes indicate multiple detections.

A significant effect of the leaf side on the distribution of ITS types was found. The *E. quercicola* ITS type was relatively more frequent when lesions were sampled on the lower side than on the upper side of leaves (7 samples vs. 3, respectively), contrary to the *E. alphitoides* (11 vs. 30), *E. hypophylla* (0 vs. 4) and *P. guttata* (1 vs. 5) types which were more frequent on the upper side (Chi-2 = 14.72, df = 3, P = 0.002).

At lesion level, a relatively high proportion of mixed infections (27%), i.e. when more than one ITS type was detected, was found (Tab. III). Actually, the *E. hypophylla* ITS type was only found in association with the *E. alphitoides* ITS type. *E. quercicola* and *P. guttata* ITS types were also mostly found in mixtures (results not shown).

### 3.6. Host specificity

The distribution of powdery mildew ITS types over the different oak species was analyzed only in the regional sampling,

since sampling performed on the altitudinal gradient and in the Campet forest targeted *Q. robur*. The *E. alphitoides* ITS type was detected on the five oak species sampled (Tab. IV). *E. quercicola* and *E. hypophylla* ITS types were also found on several host species. A differential association between the oak species and the ITS types was tested for *Q. robur*, *Q. pubescens* and *Q. petraea*/*E. alphitoides* and *E. quercicola*, for which enough data were available. No such association could be found (Chi-2 = 1.33, df = 2, P = 0.68).

## 4. DISCUSSION

A strong limitation in the study of powdery mildew lies in the biotrophic lifestyle of these fungi, which cannot be cultured on artificial media. The use of molecular tools has greatly improved our knowledge in recent years, in particular on oak powdery mildew (Mougou et al., 2008; Takamatsu

**Table IV.** Distribution of powdery mildew species ITS (number of samples) across oak species in the French regions sampling.

	<i>Q. robur</i>	<i>Q. pubescens</i>	<i>Q. petraea</i>	<i>Q. pyrenaica</i>	<i>Q. cerris</i>	Unidentified <i>Quercus</i> sp.	Total
<i>E. alphitoides</i>	69	10	26	2	1	29	137
<i>E. quercicola</i>	13	4	6	0	0	2	25
<i>E. hypophylla</i>	2	1	0	0	0	1	4

et al., 2007). However, so far, only a limited number of samples had been examined. A first achievement of the present study was the development of quick molecular detection methods that can be applied on large samplings, especially for the two most frequent ITS types associated with *E. alphitoides* and *E. quercicola*, respectively.

A very high detection yield was only achieved in the altitudinal gradient sampling, with fresh, highly sporulating lesions, directly processed in the laboratory less than 20 d after infection and incubation under favourable conditions. Conversely, older lesions (in the sampling from the Campet forest) or desiccated samples (powdery mildew lesions sent by DSF technicians from different French regions) showed a lower success of detection suggesting DNA degradation or production of secondary metabolites limiting PCR amplification. The decreasing trend of amplification success from June to October in the regional sampling might also reflect a decreasing activity of the fungus resulting in lower DNA yields. Obtaining a high good-quality DNA yield has been reported to be problematic in Ascomycota fungi, and is even more critical in the biotrophic Erysiphales where small amounts of fungal material are available (Cunnington et al., 2003; Dutech et al., 2007). Our results strongly suggest that the success of amplification for oak powdery mildew from natural lesions is dependent on the lesion stage.

The SSCP method developed in this study proved to be a convenient method to detect the ITS sequences associated with *E. alphitoides* and *E. quercicola*. SSCP results for *E. alphitoides* and *E. quercicola* were highly consistent with those obtained by specific detection-CAPS. Previous studies had already shown that PCR-SSCP is a reliable tool for the taxonomy and identification of pathogenic fungi within a genus (Kong et al., 2003; Sunnucks et al., 2000). In contrast, we were unable to detect the rarer ITS of *P. guttata* and *E. hypophylla* by the SSCP method. Such SSCP detection failure might be explained by a dominance bias, since these ITS were mostly detected in association with *E. alphitoides* by using specific primers. PCR products for SSCP are amplified with non specific primers, therefore the most abundant ITS sequence is more likely to be amplified in mixtures, leading to an underestimation of non dominant ITS sequences. A further difficulty in the detection of *E. hypophylla* was a lack of specificity of the designed primers, in spite of the results obtained in the validation study (but with only one reference DNA). For the whole sampling study, 38% of positive amplifications with ITS hypF/ITS eryR yielded *E. alphitoides* ITS sequences, i.e. were probably false positives (results not shown). The situation of *E. hypophylla* will require clarification in many aspects. Its taxonomic position, especially whether it is conspecific to *E. alphitoides* or a distinct species, is still debated.

Based on morphological features, some authors considered *E. hypophylla* as a synonym of *E. alphitoides* and others as a distinct species (Braun, 1995). Some ITS sequences obtained from samples isolated on *Paeonia lutea* and described as *E. hypophylla* corresponded to *E. alphitoides* ITS sequence (Takamatsu et al., 2006). Sequences of additional genes and multigene phylogeny analyses could be useful to investigate the status of these species

The main contribution of the current study was the confirmation on a large sampling of the occurrence in France of four ITS sequences corresponding to different species described as causal agents of oak powdery mildew (Mougou et al., 2008).

The ITS type associated with *E. alphitoides* was the most represented with a frequency higher than 80% in the three levels of the study (Campet, Pyrenees and French regions). *Erysiphe alphitoides* has been considered as the main if not sole causal agent of powdery mildew since the apparition of this disease on oak (Viennot-Bourgin, 1949). This species is currently present in all the French regions.

A major finding was the detection of the ITS sequence associated with *E. quercicola* in almost all the French regions. The frequency (15%) observed in the regional sampling is consistent with that obtained during a first survey in France (Mougou et al., 2008). The lower occurrence of *E. quercicola* ITS as compared to *E. alphitoides* could be due to a more recent introduction of this species in Europe. However, its large geographic distribution does not support this hypothesis. An alternative hypothesis to explain the predominance of isolates of *E. alphitoides* type over *E. quercicola* type is that some climatic requirements might favour the earlier arrival of *E. alphitoides* onto the host; this earlier setting up giving the fungus a competitive advantage. The advantage from earlier arrival onto a host has already been suggested for the two wheat pathogenic fungi *Puccinia triticina* and *Pyrenophora tritici-repentis* (Al-Naimi et al., 2005). Temporal succession has also been described for the two genetic groups of *Erysiphe necator* (Montarry et al., 2009). Such hypothesis requires to be tested for oak powdery mildew with an appropriate temporal sampling. In the present study, there was no indication of a time effect on the relative detection of the *E. alphitoides* and *E. quercicola* ITS types in the regional sampling, but the low number of later samples precluded any conclusion (results not shown). It has to be noticed that a rather low frequency of *E. quercicola* ITS type was detected in the Pyrenees, where sampling was rather early, compared to the country-level frequency. However, the difference in host status (seedlings versus adult trees) and climatic conditions cannot be discarded to explain these differences.

The ITS sequence associated with *E. hypophylla* was detected (and confirmed by sequencing) in 2 to 8% of the

sampled powdery mildew lesions. Up to now, records of this species, based on morphology, were mainly from Eastern and Northern Europe (Roll-Hansen, 1961) and Viennot-Bourgin (1968) hypothesized a westward expansion. Conversely, we found the *E. hypophylla* ITS type only in the South of France, from East to the Atlantic coast. Another unexpected result was the association of *E. hypophylla* ITS with lesions on the upper side of leaves. However, this finding could be an artefact, due to the joint occurrence of *E. alphitoides* in all samples where *E. hypophylla* was detected. In these cases, the visible sporulating lesion, on the upper side, was probably caused by *E. alphitoides*, while *E. hypophylla* could be present in an inconspicuous lesion on the lower side of the leaves. As mentioned before, results about this species are to be taken with caution until appropriate genetic markers can allow better identification and detection.

Finally, an ITS sequence corresponding to *P. guttata* (sensu lato) was detected at a low frequency (<15%). *P. guttata* has been reported from many species, especially *Corylus* and *Fraxinus* but also *Quercus* in Europe, with some authors referring to the latter as *P. roboris* (Viennot-Bourgin, 1949). *P. guttata* actually corresponds to a complex of cryptic species, as recently shown by Takamatsu et al. (2008). The different species which can infect *Quercus* need to be further characterized. The primer sequences used in our study are probably not adequate to detect them all. Indeed, the PG1 primer sequence does not match the sequence described for *P. roboris* from *Castanea* in Takamatsu et al. (2008). A second *Phyllactinia* complex of cryptic species causing oak powdery mildew, besides the *Erysiphe* complex, cannot therefore be ruled out. Another limitation of our method when dealing with *Phyllactinia* species relies in the DNA extraction without leaf grinding. Since *Phyllactinia*, contrary to *Erysiphe*, have a semi endophytic habit (Viennot-Bourgin, 1949), this may lead to a reduced detection and therefore an underestimation of their occurrence. The more frequent detection of *Phyllactinia* in samples with visible lesions on the upper-leaf-side was unexpected since *Phyllactinia* are usually described as mainly sporulating on the lower side of leaves (Viennot-Bourgin, 1949). The explanation presented for *E. hypophylla* may also hold for *P. guttata*.

A striking result of the study was the co-occurrence of several species (or at least ITS) at all spatial scales considered. The only suggestion of a spatial differentiation was a higher relative occurrence of *E. quercicola* ITS types in samples taken from the lower side of leaves as compared to *E. alphitoides*. Ultraviolet-B was shown to influence the abundance and distribution of *E. alphitoides* on *Q. robur* (Newsham et al., 1997; 2000). It would be interesting to test experimentally a differential effect of UV radiations on the four species which might explain an association between the leaf side and the prevalence of species. The coexistence of various ITS types was shown not only on the same tree but even in the same lesion. Mixed lesions were the most frequent in the Campet sampling which might be explained by a slightly larger size of samples or by an older stage of development of the disease. Whereas sampled lesions in the altitudinal study might be hypothesized to result mostly from single infection events, older

lesions, such as those sampled in Campet, might correspond to the coalescence of several colonies.

The maintenance of polymorphism in natural populations, either between species or between genotypes, such as in multiple infections, is an important question in ecology, suggesting the existence of mechanisms balancing competitive exclusion (Brose, 2008). Parasite mediation has been considered as a factor altering direct competition between species (Price et al., 1986). Powdery mildew fungi, including *E. alphitoides*, are parasitized by *Ampelomyces quisqualis* Ces. (synonym *Cicinobolus cesatii*) (Kiss, 1998). The potential role of this or other fungal antagonists in maintaining a diversity of oak powdery mildew fungi in relation to differential host specificity remains to be investigated.

In conclusion, this study mainly raises the question of the occurrence of *E. quercicola* in France. Although samples having an ITS sequence matching that of *E. quercicola* were found throughout the country, the formal identification of this species in France remains to be done, based on morphological features and additional genetic data. If confirmed, the origin of this species, its biological, including pathogenicity features, especially as compared to *E. alphitoides*, will need further investigation.

**Acknowledgements:** The authors sincerely thank officers and technicians of the Département Santé des Forêts, French Ministry of Agriculture, for the country-wide sampling, and Xavier Capdevielle for help in the Pyrenean and Campet samplings. Financial support was obtained from the French ANR (Agence Nationale de la Recherche), in the DRYADE project. We are very grateful to Corinne Vacher, François Delmotte, Nicolas Feau and two anonymous reviewers for helpful comments on a previous version of this manuscript.

## REFERENCES

- Al-Naimi F.A., Garrett K.A., and Bockus W.W., 2005. Competition, facilitation, and niche differentiation in two foliar pathogens. *Oecologia* 143: 449–457.
- Ayres P.G., 1976. Natural resistance to oak mildew. *Arboric. J.* 3: 23–29.
- Benbouza H., Jacquemin J.-M., Baudoin J.-P., and Mergeai G., 2006. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 10: 77–81.
- Braun U., 1995. The powdery mildews (Erysiphales) of Europe. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.
- Brose U., 2008. Complex food webs prevent competitive exclusion among producer species. *Proc. R. Soc. B.* 275(1650): 2507–2514.
- Butin H. H., 1995. Tree diseases and disorders: causes, biology, and control in forest and amenity trees, Oxford University Press, Oxford, 252 p.
- Crous P.W., Groenewald J.Z., Pongpanich K., Himaman W., Arzanlou M., and Wingfield M.J., 2004. Cryptic speciation and host specificity among *Mycosphaerella* spp. occurring on Australian Acacia species grown as exotics in the tropics. *Studies Mycol.* 50 Special Issue, Part 2: 457–469.
- Cunnington J.H., Takamatsu S., Lawrie A.C., and Pascoe I.G., 2003. Molecular identification of anamorphic powdery mildews (Erysiphales). *Aust. Plant Pathol.* 32: 421–428.



- Delye C. and Corio-Costet M.-F., 1998. Origin of primary infections of grape by *Uncinula necator*. RAPD analysis discriminates two biotypes. *Mycol. Res.* 102: 283–288.
- Dutech C., Enjalbert J., Fournier E., Delmotte F., Barrès B., Carlier J., Tharreau D., and Giraud T., 2007. Challenges of microsatellite isolation in fungi. *Fungal. Genet. Biol.* 44: 933–949.
- Edwards M.C. and Ayres P.G., 1982. Seasonal changes in resistance of *Quercus petraea* (sessile oak) leaves to *Microsphaera alphitoides*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 78: 569–571.
- Fournier E. and Giraud T., 2008. Sympatric genetic differentiation of a generalist pathogenic fungus, *Botrytis cinerea*, on two different host plants, grapevine and bramble. *J. Evol. Biol.* 21: 122–132.
- Griffon E. and Maublanc A., 1912. Les *Microsphaera* des chênes. *Bull. Soc. Mycol. F.* 28: 88–104.
- Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L., and deWaard J.R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 270: 313–321.
- Heuser T. and Zimmer W., 2002. Quantitative analysis of phytopathogenic ascomycota on leaves of pedunculate oaks (*Quercus robur* L.) by real-time PCR. *FEMS Microbiol. Lett.* 209: 295–299.
- Kiss L., 1998. Natural occurrence of *Ampelomyces* mycoparasites in mycelia of powdery mildew fungi. *New Phytol.* 140: 709–714.
- Kong P., Hong C., Richardson P.A., and Gallegly M.E., 2003. Single-strand-conformation polymorphism of ribosomal DNA for rapid species differentiation in genus *Phytophthora*. *Fungal. Genet. Biol.* 39: 238–249.
- Limkaisang S., Kom-un S., Luiz Furtado E., Liew W.K., Salleh B., Sato Y., and Takamatsu S., 2005. Molecular phylogenetic and morphological analyses of *Oidium heveae*, a powdery mildew of rubber tree. *Mycoscience* 46: 220–226.
- Limkaisang S., Cunnington J.H., Liew K.W., Salleh B., Sato Y., Divarangkoon R., Fangfuk W., To-anun C., and Takamatsu S., 2006. Molecular phylogenetic analyses reveal a close relationship between powdery mildew fungi on some tropical trees and *Erysiphe alphitoides*, an oak powdery mildew. *Mycoscience* 47: 327–335.
- Lowe T., Shareifkin J., Yang S.Q., and Dieffenbach C.W., 1990. A computer program for selection of oligonucleotide primers for polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* 18: 1757–1761.
- Mmbaga M.T., Klopfenstein N.B., Kim M.-S., and Mmbaga N.C., 2004. PCR-based identification of *Erysiphe pulchra* and *Phyllactinia guttata* from *Cornus florida* using ITS-specific primers. *Eur. J. For. Pathol.* 34: 321–328.
- Montarry J., Cartolaro P., Delmotte F., Jolivet J., and Willocquet L., 2008. Genetic structure and aggressiveness of *Erysiphe necator* populations during grapevine powdery mildew epidemics. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 6327–6332.
- Montarry J., Cartolaro P., Richard-Cervera S., and Delmotte F., 2009. Spatio-temporal distribution of *Erysiphe necator* genetic groups and their relationship with disease levels in vineyards. *Eur. J. Plant Pathol.* 123: 61–70.
- Mougou A., Dutech C., and Desprez-Loustau M.-L., 2008. New insights into the identity and origin of the causal agent of oak powdery mildew in Europe. *For. Pathol.* 38: 275–287.
- Newsham K.K., Low M.N.R., Mcleod A.R., Greenslade P.D., and Emmett B.A., 1997. Ultraviolet-B radiation influences the abundance and distribution of phylloplane fungi on pedunculate oak (*Quercus robur*). *New Phytol.* 136: 287–297.
- Newsham K.K., Oxborough K., White R., Greenslade P.D., and Mcleod A.R., 2000. UV-B radiation constrains the photosynthesis of *Quercus robur* through impacts on the abundance of *Microsphaera alphitoides*. *For. Pathol.* 30: 265–275.
- Nilsson R.H., Kristiansson E., Ryberg M., Hallenberg N., and Larsson K.H., 2008. Intraspecific ITS variability in the Kingdom *Fungi* as expressed in the International Sequence Databases and its implications for molecular species identification. *Evol. Bioinf.* 4: 193–201.
- Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., Hayashi K., and Sekiya T., 1989. Detection of Polymorphisms of Human DNA by Gel Electrophoresis as SSCPs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2766–70.
- Price P.W., Westoby M., Rice B., Atsatt P.R., Fritz R.S., Thompson J.N., and Mobley K., 1986. Parasite mediation in ecological interactions. *Ann. Rev. Ecol. System.* 17: 487–505.
- Roll-Hansen F., 1961. *Microsphaera hypophylla* Nevodovskij (*M. silvatica* Vlasov), an oak powdery mildew fungus. *Rep. Norw. For. Res. Inst.* 17: 37–61.
- Rozen S. and Skaletsky H.J., 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S. and Misener S. (Eds.), *Bioinformatics methods and protocols: Methods in molecular biology*, Humana Press, Totowa, NJ, pp. 365–386.
- Saenz G.S. and Taylor J.W., 1999. Phylogeny of the Erysiphales (powdery mildews) inferred from internal transcribed spacer ribosomal DNA sequences. *Can. J. Bot.* 77: 150–168.
- Sunnucks P., Wilson A.C.C., Beheregaray L.B., Zenger K., French J., and Taylor A.C., 2000. SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Mol. Ecol.* 9: 1699–1710.
- Takamatsu S., 2004. Phylogeny and evolution of the powdery mildew fungi (Erysiphales, Ascomycota) inferred from nuclear ribosomal DNA sequences. *Mycoscience* 45: 147–157.
- Takamatsu S., Bolay A., Limkaisang S., Kom-un S., and To-anun C., 2006. Identity of a powdery mildew fungus occurring on *Paonia* and its relationship with *Erysiphe hypophylla* on oak. *Mycoscience* 47: 367–373.
- Takamatsu S., Braun U., Limkaisang S., Kom-un S., Sato Y., and Cunnington J.H., 2007. Phylogeny and taxonomy of the oak powdery mildew *Erysiphe alphitoides* sensu lato. *Mycol. Res.* 111: 809–826.
- Takamatsu S., Inagaki M., Niinomi S., Khodaparast S.A., Shin H.-D., Grigaliunaitė B., and Havrylenko M., 2008. Comprehensive molecular phylogenetic analysis and evolution of the genus *Phyllactinia* (Ascomycota: Erysiphales) and its allied genera. *Mycol. Res.* 112: 299–315.
- Taylor J.W., Turner E., Townsend J.P., Dettman J.R., and Jacobson D., 2006. Eukaryotic microbes, species recognition and the geographic limits of species: examples from the kingdom *Fungi*. *Philo. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 361: 1947–1963.
- Viennot-Bourgin G., 1949. Les champignons parasites des plantes cultivées, Masson, Paris, 755 p.
- Viennot-Bourgin G., 1968. Note sur les Erysiphacées. *Bull. Soc. Mycol. Fr.* 84: 117–118.
- White T.J., Bruns T., Lee S., and Taylor J., 1990. Genetics and evolution in amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenies. In: Innis M., Gelfand D., Sninsky J., and White T. (Eds.), *PCR protocols: a guide to methods and applications*, Academic Press, Orlando, pp. 315–322.
- Zolan M.E. and Pukkila P.J., 1986. Inheritance of DNA methylation in *Coprinus cinereus*. *Mol. Cell. Biol.* 6: 195–200.

## **Chapitre 3**

### **Etude de l'adaptation locale de l'agent causal de l'oidium du chêne à son hôte *Quercus robur***

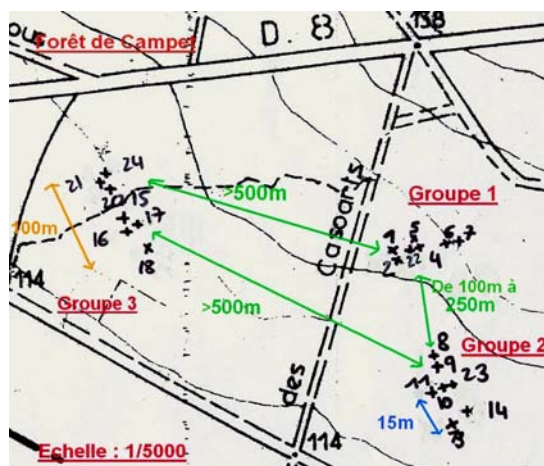
## Chapitre 3: Etude de l'adaptation locale de l'agent causal de l'oïdium du chêne à son hôte *Quercus robur*

### Introduction

Les forêts sont caractérisées par une large diversité locale régie par une grande gamme de mécanismes possibles. Des distributions spatiales agrégées sont attendues pour chaque espèce forestière quand la dispersion des graines se fait localement. Toutefois, lors d'interactions hôtes pathogènes, les ennemis naturels donnent l'avantage aux espèces rares (ADLER & MULLER-LANDAU 2005). Ainsi, l'hypothèse de Janzen-Connell (J-C) prévoit que les ennemis naturels spécifiques, parasites et herbivores, réduiront la densité de la descendance sous les arbres mères de chaque espèce, créant des occasions pour le recrutement hétérospécifique et maintiendront ainsi une haute diversité dans les forêts tropicales (BURKEY 1994). Plusieurs études effectuées dans des systèmes forestiers différents suggèrent l'existence d'effets de J-C, mettant en évidence l'importance de la mortalité post dispersion dans la structure et la dynamique des populations hôtes (GONZALEZ MARTINEZ *et al.* 2006).

En ce qui concerne les chênes, peu d'études ont été menées sur l'effet des pressions parasitaires sur la dynamique démo-génétique des populations. Le flux de pollen à longue distance et l'hétérogénéité de sa dispersion ainsi que la variabilité de succès de pollinisation ont déjà été identifiés comme facteurs contribuant au maintien de hauts niveaux de diversité dans les forêts de chêne (STREIFF *et al.* 1999). Une extension de l'hypothèse de Janzen-Connell prédit que les maladies favorisent la diversité des hôtes par des interactions négatives intra spécifiques : les semis d'un arbre-mère, dispersés préférentiellement à proximité de cet arbre, se trouvent exposés à une forte pression des parasites spécifiquement adaptés à cet arbre (niveau espèce ou génotype) et donc en désavantage compétitif par rapport à des semis d'un autre arbre ou aux semis du même arbre dispersés à plus forte distance. L'oïdium présente plusieurs caractères compatibles avec cette hypothèse : pathogène spécialisé (caractère général des biotrophes), attaquant aussi bien les arbres adultes que les jeunes semis avec un impact plus fort chez les jeunes (HEWITT & AYRES 1976) et une infection probablement dépendante de la densité d'hôte. L'adaptation de ce parasite à ses hôtes pourrait donc être un facteur important dans la distribution génétique des populations de chêne.

Un dispositif a été mis en place dans la forêt domaniale de Campet (Lot et Garonne 47) par l'équipe de Pathologie forestière de BIOGECO pour tester l'impact de l'oïdium sur la régénération d'une cohorte de chênes structurée en descendances. Dans une parcelle dominée par du chêne pédonculé, 21 arbres adultes, appartenant à 3 groupes distincts de 7 individus, ont été sélectionnés sur la base de leur production de glands et de leur houppier relativement isolé (Figure 3.1). Des glands ont été ramassés au pied de chacun de ces arbres afin de constituer 21 descendances ou familles. 10 glands ont été ensuite plantés pour chaque famille dans 21 placeaux disposés au pied des 21 arbres maternels.



**Figure 3.1 : Schéma du dispositif de Campet**

L'infection naturelle des semis est suivie depuis plusieurs années sur le dispositif. J'ai réalisé une étude complémentaire en conditions contrôlées en utilisant une partie du même matériel. La « fitness » ou valeur sélective décrit la capacité d'un individu d'un certain génotype à se reproduire. C'est une mesure de la sélection naturelle, elle peut être quantifiée par son taux de multiplication, son efficacité d'infection ou son agressivité (AGRIOS 2005). Les seules données existantes dans la littérature sur l'interaction chêne-oïdium sont issues d'observations en conditions naturelles. Une méthodologie d'inoculation contrôlée a dû être mise au point pour pouvoir quantifier la compatibilité de l'interaction hôte-parasite. La mise au point de la méthodologie d'inoculations en conditions contrôlées permettra (cf. annexes) :

- (1) une première contribution à l'étude phénotypique quantitative de l'interaction chêne-oïdium ;

- (2) d'appuyer ou de rejeter l'hypothèse du rôle potentiel de l'oïdium comme facteur impliqué dans la dynamique de la diversité intra- spécifique des chênes.

Le principal résultat de cette étude est la détection d'une adaptation locale transgénérationnelle de l'oïdium au chêne. En effet, les inoculations croisées ont montré que les souches d'oïdium sont plus performantes sur les descendants de leurs arbres d'origine que sur les descendants d'arbres différents. Réciproquement, les descendants d'un arbre donné sont en moyenne plus infectés par la souche d'oïdium isolée de cet arbre que par des souches isolées d'autres arbres. Nos résultats, à confirmer, sont donc compatibles avec l'hypothèse de Janzen-Connell appliquée à un niveau infra-spécifique pour les chênes, avec l'oïdium comme facteur de régulation.

Une répétition de l'expérience est prévue pour pouvoir publier ces résultats.

# **Article 1: Cross-generation adaptation of a fungal biotroph pathogen to its tree host**

## **Introduction**

Plant-pathogen interactions offer important model systems for studies on local adaptation. Local adaptation relates to genetic changes that occur in a population in response to a geographically localized selection pressure; it takes place when the mean fitness of a population is higher in its own habitat than in a remote habitat (GANDON & MICHALAKIS 2002). For pathogens, especially obligate parasites, the host can be viewed as the habitat. Local adaptation therefore reflects a better performance of the pathogen in its local host population than in distant populations. If a local adaptation is reported, two adaptative patterns can be expected: (1) A general adaptation to a common host or (2) a specific local adaptation. This specific local adaptation can either lead to the selection of the most adapted pathogen or to the less adapted one (maladaptation: average fungal infection success was significantly lower on sympatric hosts than on allopatric hosts) (ALSTAD 1998; MEMONOTT *et al.* 1995) but these two specific patterns lead to a highly fragmented pathogen population.

Local adaptation of pathogens to their hosts is generally expected because the parasites have larger population size and shorter generation time than their hosts leading to a greater evolutionary potential (HAMILTON *et al.* 1990; EBERT 1994). Local adaptation is also expected in isolated populations that allow a localized evolution (NIEMI *et al.* 2006); in fact the delay of evolution between host and pathogen genotypes may explain the better adaptation of parasites to local hosts (MORAND *et al.* 1996). However, different factors linked to the parasite life history (distribution, dispersion, host dependence) have a strong influence on the coevolutionary dynamics of host-parasite interactions (THOMPSON 1999) and can therefore modulate the outcome of local adaptation. This explains mixed results in the literature, with some studies demonstrating local adaptation of parasites (e.g. DYBDAHL & STORFER 2003; KAWECKI & EBERT 2004) while others failed to show any (e.g. KALTZ *et al.* 1999). Indeed, a meta-analysis achieved by LAJEUNESSE & FORBES (2002) on 32 independent tests from papers published on local adaptation, showed that there were nearly as many null (no effect) as positive results (parasite locally adapted). The host range of a pathogen can be a predictor of local adaptation. Parasites with several documented hosts are less likely to exhibit local adaptation than parasites with one documented host (GOMULKIEWICZ *et al.* 2000; LAJEUNESSE & FORBES 2002). The relative dispersion of host vs. pathogen is another important factor

explaining which of the two interaction's actors will adapt to the other. Pathogens are predicted to be locally adapted if they migrate more than their hosts, at least if migration rates are not so high as to totally homogenize populations (GANDON *et al.* 1996). Conversely, in the complete absence of migration, parasites tend to be locally maladapted (MORGAN *et al.* 2005). On the other hand, local adaptation can be discriminated by gene flow which has two effects on the differentiation of local parasite populations: (1) Accelerating the evolution by importing new genes or restoring alleles which were lost by the genetic drift or (2) homogenizing parasite populations and thus preventing the adaptation to local conditions (BURDON & THRALL 1999; THRALL *et al.* 2002).

Geographic scale is another factor to be considered, since parasite adaptation may only occur at particular geographic scale (HANKS & DENNO 1994). Parasites may adapt to local hosts at the scale of the individual, population or region, depending on the properties of a given system (KALTZ & SHYKOFF 1998). Most of the studies focused on the population (KOSKELA *et al.* 2000; KALTZ & SHYKOFF 2002; ZHAN *et al.* 2002; MONTARRY *et al.* 2006; NIEMI *et al.* 2006) or the meta-population levels (DELMOTTE *et al.* 1999; GANDON 2002; GANDON & MICHALAKIS 2002; LAINE 2005; ROSLIN *et al.* 2007). Recently, a few studies confirmed the occurrence of local adaptation at very fine scales, e.g. at a micro geographic scale, with progenies of *Phaseolus vulgaris* plants CAPELLE & NEEMA (2005) or at a genotype scale (MOPPER *et al.* 2000; SALVAUDON *et al.* 2005).

Powdery mildew is one of the most common diseases on oak particularly *Quercus robur* in Europe (DESPREZ-LOUSTAU 2002). The oak–powdery mildew model has several characteristics which plead for the existence of local adaptation of the pathogen to its host. Powdery mildew fungi are characterised by a strictly biotrophic life cycle and generally have restricted host ranges. *Erysiphe alphitoides*, a causal agent of oak powdery mildew is assumed to be highly specialized on oaks, with only a few records on other species (*Fagus* and *Castanea*) also belonging to the Fagaceae family (VIENNOT BOURGIN 1949). Contrary to the very long generation time of the host (hundreds of years), a powdery mildew spore can produce a sporulating lesion in 10-12 days. Moreover, the mildew population sizes are considerably larger than population sizes of their host (EBERT & HAMILTON 1996; KALTZ & SHYKOFF 1998). On the other hand, local adaptation might be counterbalanced by the important dissemination distances of powdery mildew and important gene flow (SCHNATHORST 1959). Even if direct evidence for oak powdery mildew fungi is lacking, the rapid extension of the

disease in Europe in the 20<sup>th</sup> century suggests a high dispersal potential of the parasite (DUCOMET 1913). .

Contrary to powdery mildews on herbaceous vegetation, each oak tree could be envisaged as a local host population for the pathogen. Local adaptation at tree level has already been demonstrated for several insects feeding on oaks, e.g. *Stilbosis quadricustatella* leafminers (MOPPER *et al.* 2000), and has more recently been suggested for oak-powdery mildew (ROSLIN *et al.* 2007).

The aim of our study was to test the adaptation of oak powdery mildew to its local host not only at the individual level but at a cross-generation scale. We addressed the following question: are oak powdery mildew strains more virulent and aggressive (*sensu* ANDRIVON 1993) on the progeny of their original tree than on progenies of distant trees? Or, reciprocally, are progenies of oak trees more susceptible to powdery mildew strains isolated on their mother tree than to those isolated on distant trees?

## Materials and methods

### Plant material

The plant material was collected in an oak stand dominated by *Q. robur*, located in the state owned forest of Campet (X44,1224, Y0,1019). Our essay was performed on progenies of four trees identified by the tags # 6, 10, 21 and 22. These progenies were obtained by harvesting acorns under the mother trees in 2003. The distances between pairs of mother trees ranged from 50.6 to 603.2m (Table 3.1). Acorns were stored at 4°C, and sown in greenhouse in September 2005.

For powdery mildew cultures (see below), leaves were collected from greenhouse grown six-week old seedlings from a local *Q. robur* provenance. Leaves were selected before they had reached the maturity stage to ensure high susceptibility (AYRES 1976).

**Table 3.1: Distances between mother trees (m)**

	<b>A6</b>	<b>A10</b>	<b>A21</b>	<b>A22</b>
<b>A6</b>	0			
<b>A10</b>	197.5	0		
<b>A21</b>	498.2	566.0	0	
<b>A22</b>	50.6	195.8	450.7	0



## **Powdery mildew strain isolation**

Leaves with sporulating lesions of powdery mildew were collected on the same mother trees (6, 10, 21 and 22) in June 2005. Since powdery mildew is a biotroph pathogen, the fungus was isolated by gently rubbing infected leaves onto sterile detached oak leaves maintained in Petri dishes in an illuminated incubator at 22°C with a 12h photoperiod. The preparation of leaves was as follows. Leaf sterilization was achieved by a bath in 50g/L of calcium hypochloride (65%) followed by rinsing in a sterile water bath. Leaves were subsequently dried in sterile filter paper, then each leaf was placed abaxial face up on agar medium (20g/l Bacto Agar, 1ml/l Benzimidazole) in a Petri dish. From the secondary sporulating lesions on sterile leaves, single spore isolations were made by using an eyelash (NICOT *et al.* 2002). Single spore cultures were maintained as before and sub-cultured at regular intervals on new sterile detached leaves. Only three sub-cultures were made before inoculum preparation. Under such conditions it was assumed that no important directional selection on life history traits affected the different parasite strains.

## **Inoculum preparation**

Spore suspensions of each oak powdery mildew strain were prepared from 15 day-old sub-cultures, by gently washing the sporulating area with a small quantity of sterile water, using a micropipette. The suspension was subsequently adjusted to  $6 \times 10^4$  spores/mL using a haemocytometer. Along all the experiment the spore suspensions were kept on ice.

Inoculations were performed on detached and sterilized oak leaves from approximately 6 week-old-plants. Inoculation consisted in depositing one 2.5 µL drop of the spore suspension (~150 spores). Each leaf was inoculated with a strain isolated from its own mother tree and with a strain isolated from a different tree. Dishes containing the inoculated leaves were kept with lids open in the air-flow cabinet during one hour, in order to let water drops dry out, since free water inhibits spore germination in powdery mildew fungi (YARWOOD 1950). Leaves were then incubated in an illuminated incubator for 12 days at 22°C with a 12h photoperiod.

## **Experimental design**

Each seedling was inoculated on three leaves, i.e. one leaf for each pair of strains local vs. distant. Three seedlings were used for each family. This experiment design was

repeated on three different days. A total of 108 leaves (27 for each tree family) were therefore inoculated (216 inoculations) with the four different oak powdery mildew strains (Table 3.2).

**Table 3.2: Schematic representation of the cross inoculation experiment design showing the different inoculation combinations between strains of powdery mildew and *Q. robur* progenies. The number of inoculations is specified between brackets.**

Tree progeny /Powdery mildew strain	S6	S10	S21	S22
6	Local [27]	Distant [9]	Distant [9]	Distant [9]
10	Distant [9]	Local [27]	Distant [9]	Distant [9]
21	Distant [9]	Distant [9]	Local [27]	Distant [9]
22	Distant [9]	Distant [9]	Distant [9]	Local [27]

### Infection quantification

After the 12 days incubation period, each inoculation site was examined with a stereo microscope and scored for the presence or absence of a powdery mildew colony, i.e. the presence of at least mycelium (0 or 1). When present, mycelium development was measured as the diameter of the colony on two perpendicular directions (L, l). Mycelium radial growth (MRG) was then calculated as  $MRG = [(L+l)/2]/12$  in  $\mu\text{m}/\text{day}$ . Then, the whole lesion area was cut using a cork borer and washed in 20 mL Isoton II (saline buffer) for quantitative sporulation assessment. For each lesion, the spore concentration of the suspension was determined twice with a Z2 Coulter counter (Beckman Coulter France, Villepinte, France), giving an estimate of total spore production per lesion (SP).

### Statistical analysis

The relative “benefit” of local vs. distant interactions was estimated as follows:  $(Y_{\text{Local}} - Y_{\text{Distant}})/Y_{\text{Distant}}$  (with Y the studied variable). Analyses of variance for Mycelium Radial Growth and Spore Production were performed with General Linear Model procedure in the Statistical Analysis System Software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

### Molecular identification

Since a recent study showed that four taxa are responsible for oak powdery mildew in France (MOUGOU *et al* 2008), the fungal DNA of the four powdery mildew strains used in this study was extracted using a slightly modified protocol previously described by ZOLAN & PUKKILA

(1986). The internal transcribed spacer (ITS) of the ribosomal DNA was amplified with the primer pair o-asco for/ o-asco rev (HEUSER & ZIMMER 2002) as described by MOUGOU *et al.* (2008).

The purified PCR products were sequenced in one strand by Genome Express services (France). The sequences obtained were edited with Bioedit software (HALL 1999) and then compared to that available in Genbank database using BLAST search (ALTSCHUL *et al.* 1997).

## Results

### Infection success

For three out of the four strains, higher success of infection was observed on local hosts compared to the mean value on distant hosts. Similarly, the four oak progenies were more successfully infected by local strains (Table 3.3). The infection success was 82.4% and 74.1% in local and distant interactions, respectively, but the difference was not statistically significant (Table 3.4). Infection efficiency was also not statistically different between the different strains or the different oak progenies.

**Table 3.3: Percentage of successful inoculations for local and distant interactions**

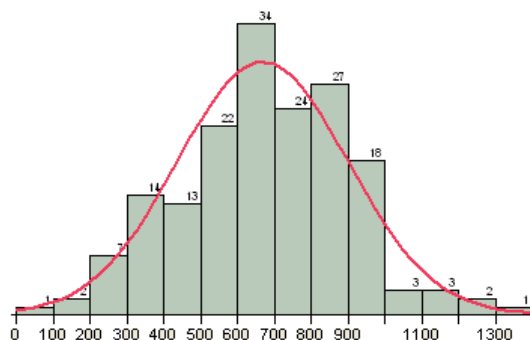
Oak progenies/ Powdery mildew strains	Successful inoculations (%)				
	S6	S10	S21	S22	Benefit (Local vs. Distant)
<b>6</b>	<b>85,18</b>	66,66	100	77,77	10.27%
<b>10</b>	88,88	<b>85,18</b>	77,77	66,66	9.52%
<b>21</b>	88,88	77,77	<b>85,18</b>	77,77	4.5%
<b>22</b>	44,44	88,88	55,55	<b>74,07</b>	17.6%
<b>Benefit (Local vs. Distant)</b>	15%	21.05%	9.5%	0	

**Table 3.4: Chi2 test for the infection success**

Source	DF	Chi2	Pr>Chi2
<b>Progeny</b>	3	4.22	0.24
<b>Powdery mildew strains</b>	3	0.95	0.81
<b>Interaction type (local vs. distant)</b>	1	2.20	0.14

### Mycelium radial growth

The distribution of mycelium radial growth was close to a normal distribution. MRG varied from 67.2 µm/day to 1324.9 µm/day, with a mean of 668.6µm/day (Figure 3.2).



**Figure 3.2: Distribution of mycelium radial growth ( $\mu\text{m}/\text{day}$ )**

For three out of four powdery mildew strains, higher MRG were observed on progenies of their host tree than on distant ones, on average (Table 3.4). However, the best performance of one strain on the progeny of its original host was only observed for S22 (Table 3.5).

**Table 3.5: Means of mycelium radial growth ( $\mu\text{m}/\text{day}$ ).**

<i>Oak progenies/ Powdery mildew strains</i>	<i>Mycelium radial growth (<math>\mu\text{m}/\text{day}</math>)</i>				
	<b>S6</b>	<b>S10</b>	<b>S21</b>	<b>S22</b>	<b>Benefit (Local/distant)</b>
<b>6</b>	<b>774.1</b>	786,45	742,16	672,62	5.5%
<b>10</b>	618,08	<b>639.37</b>	595,92	523,05	10.4%
<b>21</b>	661,89	725,32	<b>675.3</b>	551,08	4.5%
<b>22</b>	801,19	512,89	576,03	<b>675.86</b>	7.2%
<b>Benefit (Local/distant)</b>	11.6%	-5.3%	5.8%	16.1%	

On average for all four oak progenies, MRG were also greater when they were inoculated with the strain from their mother tree than with strains from distant trees (Table 3.5). In fact only the oak 10 progeny showed the highest susceptibility when inoculated with the S10 strain isolated from its mother tree.

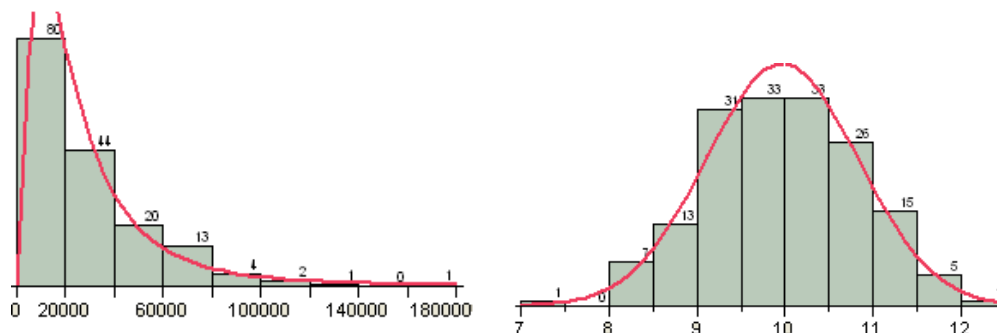
Analysis of variance for MRG showed a significant difference between local and distant interactions, with an overall benefit of local interactions of approximately 7%. Oak progenies and seedlings within progenies also caused a significant effect on MRG. Conversely, the powdery mildew strains did not show a significant effect (Table 3.6).

**Table 3.6: Analysis of variance for the mycelium radial growth**

Source	DF	Type III SS	F value	Pr>f
Progeny	3	593788.88	7.29	0.0002
Seedling (progeny)	31	4160015.09	4.95	<.0001
Leaf (Seedling)	55	2089301.47	1.40	0.08
Powdery mildew strain	3	46361.19	0.57	0.63
Interaction type (local vs. distant)	1	191866.29	7.07	0.0095
Error	77	2089318.21		
Corrected Total	170	9127334.08		
	R square	Coeff Var	Mean	
	0.77	24.63	668.64	

### Spore production

The number of spores produced per lesion varied from 1133 to a maximum of 176733 i.e an infection yield (spore produced/spore inoculated) of 7.5 to 1175. The analysis of this character was done after Log transformation (Figure 3.3).



**Figure 3.3: (a) Distribution of the Spore Production per lesion  
(b) Distribution of Log (Spore production)**

Only S6 and S22 showed a higher spore production on the progenies of their original tree compared to other progenies (Table 3.7). Similarly, progenies 10 and 22 were more susceptible to the strain isolated from their mother tree. The overall benefit of local vs. distant interactions was only 0.5 % and was not significant in the analysis of variance (Table 3.8).

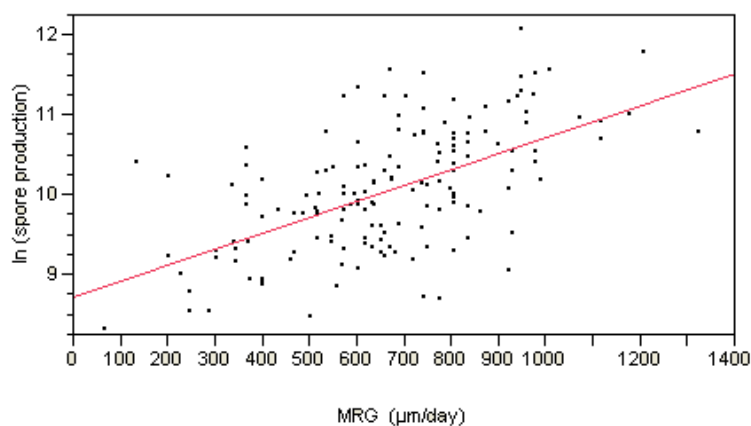
**Table 3.7: Means of ln (spore production).**

Oak progenies/ Powdery mildew strains	Ln (Spore production)				
	S6	S10	S21	S22	Benefit(Local/distant)
<b>6</b>	<b>10,4</b>	10,7	10,6	9,9	0%
<b>10</b>	9,7	<b>9.78</b>	9,7	9,6	1.1%
<b>21</b>	10,1	10,2	<b>9.8</b>	10,1	-3.3
<b>22</b>	9,7	9,5	9,5	<b>10</b>	4.5%
<b>Benefit (Local/distant)</b>	5.7%	-3.5%	-1.3%	1.3%	

**Table 3.8: Analysis of variance for ln (spore production)**

Source	DF	Type III SS	F value	Pr>f
<b>Progeny</b>	3	8.03	6.76	0.0005
<b>seedling (Progeny)</b>	31	46.08	3.76	<.0001
<b>Powdery mildew strain</b>	3	1.92	1.62	0.19
<b>Interaction type (local vs. distant)</b>	1	0.01	0.03	0.87
<b>Leaf (seedling*Progeny)</b>	57	34.64	1.54	0.04
<b>Error</b>	69	27.29		
<b>Corrected Total</b>	164	121.42		
	R square	RMSE	Mean	Coeff Var
	0.77	0.63	9,96	6.31

Spore production was significantly positively correlated with MRG ( $r=0.58$ ) (Figure 3.4).



**Figure 3.4: Correlation between ln (spore production) and mycelium radial growth**

No significant correlation between either Spore Production or MRG and the distance between the powdery mildew donor tree and the mother tree for the inoculated progeny was observed.

## **Molecular identification**

S6, S10 and S21 showed a complete homology with 23 out of the 27 *Erysiphe alphitoides* sequences deposited in the GenBank nucleotide database. The S22 strain showed 1.83 % of divergence (11 mutations in 600 bp) with S6, S10 and S21 and complete homology to *Erysiphe quercicola* (accession number: EF679204, AB292689, AB292690, AB292691, AB292693).

## **Discussion**

Host resistance variation and parasite pathogenicity both determine coevolution dynamics but evolutionary studies are often carried out separately for the parasite or the host (SALVAUDON *et al.* 2005). Two measures can be used in local adaptation studies: (1) pathogens are more virulent/aggressive on the host from their local population than on hosts from distant populations; (2) local parasites are more virulent/aggressive than foreign parasites on their original host population. Few studies combined the comparison of the pathogen performance on different sympatric and allopatric hosts with evaluation of the aggressiveness of different sympatric and allopatric pathogens on a given host (THRALL *et al.* 2002). Our experimental design, i.e cross inoculations, allowed us to test the two definitions. Moreover, transplantation experiments have been commonly used to compare parasite performance on local and non local hosts and therefore to detect local adaptation (KALTZ & SHYKOFF 1998). In this study, the performance of powdery mildew strains was studied by cross inoculations experiments under controlled conditions. The *in vitro* cross inoculation can be more informative than transplant experiments because under natural conditions genetic and environmental effects are associated. Actually, local adaptation under controlled conditions reveals true genetic effects without confusing environmental effects (KAWECKI & EBERT 2004).

Our results suggest that the oak powdery mildew has evolved adaptations to its local host, what is proposed as a common rule in host-parasite interactions (EBERT & HAMILTON 1996). The major result of our study is that the local adaptation of oak powdery mildew to its host occurred at a micro geographic scale, at tree level, or more precisely at a cross generation scale.

The four powdery mildew strains used in our study had higher probabilities of infection and greater mycelium radial growth in local rather than distant oak offsprings. However we

observed that the different powdery mildew strains were not usually the most aggressive on their mother tree progenies. Our results are consistent with previous studies which concluded that parasite local adaptation only occurs on average (KALTZ & SHYKOFF 1998; VAN ZANDT & MOPPER 1998).

Local adaptation of oak powdery mildew to its host could be expected from its specialisation and obligate parasitism. The sexual stage, chasmothecia containing ascospores, might have a restricted dispersal. In the closely related powdery mildew of grapevine, chasmothecia were shown to hibernate in the bark of vines infected in the previous season (CORTESI *et al.* 1995). The initiation of epidemics by ascospores might be a strong determinant of the final severity of powdery mildew disease (GADOURY & PEARSON 1986; DESPREZ-LOUSTAU, unpublished). The weak dispersion of chasmothecia might therefore favour the local adaptation of the parasite to its host. On the other hand, powdery mildew fungi have been assumed to have high dispersal capacities (SCHNATHORST 1959; HERMANSEN 1978). This probably holds true for the asexual stage, i.e. conidia.

Our results showed that distance from mother-tree did not significantly affect lesion diameter and spore production. EBERT (1994) had hypothesized that local adaptation changes are a function of geographical distance so that as the distance between the origins of the host and the parasite increases, the level of local adaptation decreases. In the contrary, KOSKELA *et al.* (2000) could not show a correlation between host-parasite distances and parasite performance. In our study, the absence of a distance effect in local adaptation might result from a combination of two processes: one due to local pollen dispersion and a second due to pollen transport over longer distances. This leads to a limited spatial structure of forest oaks (STREIFF *et al.* 1999).

To our knowledge, a single study had shown a cross generation local adaptation in a host parasite system. Indeed, local adaptation of *Colletotrichum lindemuthianum* to *Phaseolus vulgaris* was analysed at three hierarchical levels: groups of plants, plants within groups and pods within plants (CAPELLE & NEEMA 2005). The progenies of *Phaseolus vulgaris* appeared to be more prone to attacks by *Colletotrichum lindemuthianum* fungi from their mother plant than from other plants. In this host species however, the reproductive system is autogamy which means that seedlings share all their genes with their mother plant, which is different from an allogamic species like oak.



Cross-generation adaptation implies that virulence/aggressive traits selected in the parasite in response to resistant traits in the host mother tree are also effective when the parasite is faced to the tree progeny, suggesting the involvement of both adaptation of the parasite and heritability of resistance traits.

Little is known about the genetic resistance of oak to powdery mildew and its inheritance. Resistance to powdery mildew was shown to vary among oak species; in fact *Q. robur* is highly susceptible, *Quercus cerris* is moderately resistant whereas *Quercus borealis* is highly resistant (AYRES 1976). This resistance was associated with natural mechanisms as cell death and formation of cell wall papillae (EDWARDS & AYRES 1981).

Studies about genetics and inheritance of resistance to powdery mildew mainly concerned crop cultures, especially cereals. Actually, GONÇALVES *et al.* (2002) showed that resistance to powdery mildew is controlled by major genes. In the same way, LIANG *et al.* 2006 showed that the heritability of the *Triticum aestivum* resistance to *Erysiphe graminis* ranged from 0.82 to 0.93.

Until now, we have mainly discussed local adaptation from the pathogen perspective. Our results reciprocally suggest that oak progenies could be more susceptible to powdery mildew strains from their mother tree than to distant strains. If confirmed, this could be a hint of the contribution of the pathogen to the spatial genetic variation observed in oak stands (STREIFF *et al.* 1999), by adapting the Janzen-Connell hypothesis at an infra-specific level. This hypothesis predicts that specific natural enemies will reduce offspring density under trees, creating opportunities for heterospecific recruitment and thus maintain high tree diversity in tropical forests (SCHUPP 1992, BURKEY 1994). PARKER & CLAY (2000) recently demonstrated the existence of Janzen-Connell effects also in temperate forests, at inter-specific level.

When beginning our study, only *E. alphitoides* was assumed to cause oak powdery mildew in France. Later molecular studies showed that four taxa were present in the French regions (MOUGOU *et al.* 2008). Among the four strains used in our study, one (S22) turned out to be *E. quercicola*. This strain did not appear significantly different in aggressiveness from the other strains; however it might show some level of specificity since its performance (MRG) was highest in the oak progeny 22 compared to the three other progenies. It is therefore important in future studies to include more strains of the different causal agents of

the oak powdery mildew to compare their pathogenicity and their respective potential to adapt locally to their host.

## References

ADLER, F.R.; MULLER-LANDAU, H.C., 2005: When do localized natural enemies increase species richness? *Ecology Letters* 8, 438–447.

AGRIOS G.N., 2005: *Plant pathology*. Academic press. 922p.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J., 1997: Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.

ALSTAD, D. 1998: Population structure and the conundrum of local adaptation. In *Genetic structure and local adaptation in natural insect populations* (ed. S. Mopper & S. Y. Strauss), pp. 3–21. New York: Chapman & Hall.

ANDRIVON, D., 1993: Nomenclature for pathogenicity and virulence: the need for precision. *Phytopathology* 83: 889-890

AYRES, P.G., 1976: Natural resistance to oak mildew. *Arb. J.* 3, 23–29.

BURDON, J.J.; THRALL, P.H., 1999: Spatial and temporal patterns in coevolving plant and pathogen associations. *American Naturalist*, 153, S15–S33.

BURKEY, T.V., 1994: Tropical tree species diversity: a test of the Janzen-Connell model. *Oecologia* 97, 533-540

CAPELLE, J.; NEEMA C., 2005: Local adaptation and population structure at a micro-geographical scale of a fungal parasite on its host plant. *J. Evol. Biol.* 18, 1445–1454

CARIUS, H.J.; LITTLE, T.J.; EBERT, D., 2001: Genetic variation in a host-parasite association: Potential for coevolution and frequency-dependent selection. *Evolution*, 55, 1136–1145

CINTRA, R.; HORNA, V., 1997: Seed and seedling survival of the palm *Astrocaryum murumuru* and the legume tree *Dipteryx micrantha* in gaps in Amazonian forest. *Journal of Tropical Ecology* 13, 257-277.

CORTESI, P.; GADOURY, D.M.; SEEM, R. C.; PEARSON, R. C., 1995: Distribution and retention of cleistothecia of *Uncinula necator* on bark of grapevines. *Plant Disease* 79 (1), 15-19.

DELMOTTE, F.; BUCHELI, E.; SHYKOFF, J.A., 1999: Host and parasite population structure in a natural plant–pathogen system, *Heredity*, 82, 300-308

Ducomet, V., 1913: Recherches sur les maladies du che^ne et du chataignier en Bretagne. *Ann. Epiphyt.* 1, 87–105.

- DYBDAHL, M. F.; STORFER, A., 2003: Parasite local adaptation: Red Queen versus Suicide King. *Trends ecol evol* 18 (10), 523-530.
- EBERT, D., 1994: Virulence and local adaptation of a horizontally transmitted parasite. *Science* 265, 1084–1086.
- EBERT, D.; HAMILTON, W.D., 1996: Sex against virulence: the coevolution of parasitic diseases. *Trends Ecol Evol*, 11, 79–81
- EDWARDS, M.C.; AYRES, P.G., 1981: Cell Death and Cell Wall Papillae in the Resistance of Oak Species to Powdery Mildew Disease. *New Phytologist*, 89. 411- 418.
- GADOURY, D.M.; PEARSON, R.C., 1986: A mechanism for ascospore discharge in *Uncinula necator*. *Phytopathology*, 76: 1145.
- GANDON, S.; CAPOWIEZ, Y.; DUBOIS, Y.; MICHALAKIS, Y.; OLIVIERI, I., 1996: Local adaptation and gene-for-gene coevolution in a metapopulation model. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biology Sciences*, 263, 1003–1009.
- GANDON, S., 2002: Local adaptation and the geometry of host–parasite coevolution. *Ecology Letters*, 5, 246–256.
- GANDON, S.; MICHALAKIS, Y., 2002: Local adaptation, evolutionary potential and host–parasite coevolution: interactions between migration, population size and generation time. *Journal of Evolutionary Biology*, 15, 451–462.
- GOMULKIEWICZ, R.; THOMPSON, J. N.; HOLT, R. D.; NUISMER, S. L.; HOCHBERG, E., 2000: Hot spots, cold spots, and the geographic mosaic theory of coevolution. *Am. Nat.* 156, 156–174.
- GONZALEZ-MARTINEZ, S.C.; BURCZYK, J.; NATHAN, R.; NANOS, N.; GIL, L.; ALIA, R., 2006: Effective gene dispersal and female reproductive success in Mediterranean maritime pine (*Pinus pinaster* Aiton). *Molecular Ecology*, 15, 4577-88.
- GRAU, C.R.; LAURENCE, J.A., 1975: Observations on resistance and heritability of resistance to powdery mildew of soybean. *Plant Disease Reporter* 59(6), 458-460.
- HALL, T. A., 1999: BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98 NT. *Nucl. Acids.Symp. Ser.* 41, 95-98.
- HAMILTON, W. D.; AXELROD, R.; TANESE, R., 1990: Sexual reproduction as an adaptation to resist parasites (a review). *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 87, 3566–3573.
- HARIOT, P., 1907 : Note sur un oïdium du chêne. *Bull. Soc. Mycol. F.* 23, 157-159.
- HANKS, L.M.; DENNO, R.F., 1994: Local adaptation in the armored scale insect *Pseudaulacaspis pentagona* (Targioni-Tozzetti) (Homoptera: Diaspididae). *Ecology* 75, 2301-2310.

- HEUSER, T.; ZIMMER, W., 2002: Quantitative analysis of phytopathogenic ascomycota on leaves of pedunculate oaks (*Quercus robur* L.) by real-time PCR. *Microbiology letters* 209, 295-299.
- HEWITT, H.G.; AYRES, P.G., 1976: Effect of infection by *Microsphaera alphitoides* (powdery mildew) on carbohydrate levels and translocation in seedlings of *Quercus robur*. *New phytologist*, 77. 379-390.
- KALTZ, O.; SHYKOFF, J.A., 1998: Local adaptation in host– parasite systems. *Heredity*, 81, 361–370.
- KALTZ, O.; GANDON, S.; MICHALAKIS, Y.; SHYKOFF, J.A., 1999: Local maladaptation of the plant pathogen *Microbotryum violaceum* to its host *Silene latifolia* : Evidence from a cross-inoculation experiment. *Evolution* 53, 395-407.
- KALTZ, O.; SHYKOFF, J., 2002: Within- and among-population variation in infectivity, latency and spore production in a host-pathogen system. *J Evol Biol* 15, 850–860.
- KAWECKI, T.J.; EBERT, D., 2004: Conceptual issues in local adaptation. *Ecology letters* (7), 1225-1241.
- KOSKELA, T.; SALONEN, V.; MUTIKAINEN, P., 2000: Local adaptation of a holoparasitic plant, *Cuscuta europaea*: variation among populations. *J Evol Biol*, 13, 749-755.
- LAINE, A.L., 2005: Spatial scale of local adaptation in a plant-pathogen metapopulation. *Journal of Evolutionary Biology*, 18, 930–938.
- LAJEUNESSE, M.J.; FORBES, M.R., 2002: Host range and local parasite adaptation. *Proc Biol Sci.* 269(1492), 703–710
- LIANG S. S.; SUENAGAK. ; HEZ. H.; WANG Z. L.; LIU H. Y.; WANG D. S.; SINGH R. P.; SOURDILLE P.; XIA X. C., 2006: Quantitative trait loci mapping for adult-plant resistance to powdery mildew in bread wheat. *Phytopathology* 96 (7), 784-789
- LIMKAISANG, S. ; KOM-UN, S. ; LUIZ FURTADO, E. ; LIEW, W. K. ; SALLEH, B. ; SATO, Y. ; TAKAMATSU, S., 2005 : Molecular phylogenetic and morphological analyses of *Oidium heveae*, a powdery mildew of rubber tree. *Mycoscience* 46, 220–226.
- LIMKAISANG, S.; CUNNINGTON JH.; LIEW KW.; SALLEH B., Sato Y.; DIVARANGKON R.; FANGFUK W.; TO-ANUN C.; TAKAMATSU S., 2006: Molecular phylogenetic analyses reveal a close relationship between powdery mildew fungi on some tropical trees and *Erysiphe alphitoides*, an oak powdery mildew. *Mycoscience* 47, 327-335.
- MEMMOTT, J.; DAY, R.K.; GODFRAY, H.C.; 1995: Intraspecific variation in host plant quality: the aphid *Cinara cupressi* on the Mexican cypress *Cupressus lusitanica*. *Ecol. Entomol.* 20, 153–158.
- MIGNUCCI, J.S.; LIM, S.M., 1980: Powdery mildew (*Microsphaera diffusa*) development on soybeans with adult-plant resistance. *Phytopathology* 70(9), 919-921.

- MONTARRY, J. ; CORBIERE, R. ; LESUEUR, S. ; GLAIS, I.; ANDRIVON, D., 2006: Does selection by resistant hosts trigger local adaptation in plant-pathogen systems? *J Evol Biol.* 19(2), 22-31.
- MOPPER, S.; STILING, P.; LANDAU, K.; SIMBERLOFF, D.; VAN ZANDT, P., 2000: Spatiotemporal Variation In Leafminer Population Structure And Adaptation To Individual Oak Trees. *Ecology* 81, 1577-1587.
- MORAND, S.; MANNING, S.D.; WOOLHOUSE, M.E.J., 1996: Parasite-host coevolution and geographic patterns of parasite infectivity and host susceptibility. *Proc. R. Soc. Lond. B* 263, 119–128.
- MORGAN, A.D.; GANDON, S.; BUCKLING, A., 2005: The effect of migration on local adaptation in a coevolving host– parasite system. *Nature*, 437, 253–256.
- MOUGOU, A.; DUTECH, C.; DESPREZ-LOUSTAU, M.L., 2008: New insights into the identity and origin of the causal agent of oak powdery mildew in Europe. *Forest pathology* 38 (4), 275-287.
- NICOT, P.C.; BARDIN, M.; DIK, A.J., 2002: Basic methods for epidemiological studies of powdery mildews: culture and preservation of isolates, production and delivery of inoculum, and disease assessment. *The Powdery Mildews: A Comprehensive Treatise* (eds R.R. Bélanger, R.B. Bushnell).
- NIEMI, L.; WENNSTROM, A.; HJALTEN, J.; WALDMANN, P.; ERICSON, L., 2006: *Journal of Ecology* 94 (5), 915-921.
- PARKER, A.; K. CLAY. 2000: Soil pathogens and temperate tree seedling mortality: a mechanism for the Janzen-Connell hypothesis. *Nature* 404, 278-281.
- ROSLIN, T.; LAINE, A.L.; GRIPENBERG, S., 2007: Spatial population structure in an obligate plant pathogen colonizing oak *Quercus robur*. *Functional Ecology* 21, 1168–1177
- SALVAUDON, L. ; HÉRAULT, V.; SHYKOFF, JA., 2005 : Parasite-host fitness trade-offs change with parasite identity: genotype-specific interaction in a plant-pathogen system. *Evolution* 59 (12), 2518-2524.
- SCHUPP, E.W, 1992: The Janzen-Connell model for tropical tree diversity: population implications and the importance of spatial scale. *Am Nat* 140:526-530.
- STREIFF, R.; DUCOUSSO, A.; LEXER, C.; STEINKELLNER, H.; GLOESSL, J.; KREMER, A., 1999: Pollen dispersal inferred from paternity analysis in a mixed oak stand of *Quercus robur* L . and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. *Molecular Ecology* , 8, 831-841
- TAKAMATSU, S.; BOLAY, A.; LIMKAISANG, S.; KOM-UN, S.; TO-ANUN, C., 2006: Identity of a powdery mildew fungus occurring on *Paeonia* and its relationship with *Erysiphe hypophylla* on oak. *Mycoscience* 47, 367–373.

TAKAMATSU, S.; BRAUN, U.; LIMKAISANG, S.; KOM-UN, S.; SATO, Y.; CUNNINGTON, J.H., 2007: Phylogeny and taxonomy of the oak powdery mildew *Erysiphe alphitoides* sensu lato. *Mycol. Res.* 111, 809–826.

THOMPSON, J.N., 1999: Specific hypothesis on the geographic mosaic of coevolution. *American Naturalist*, 153, S1–S14.

THRALL, P.H.; BURDON, J.J.; BEVER, J.D., 2002: Local adaptation in the *Linum marginale* *Melampsora lini* host pathogen interaction. *Evolution*, 56, 1340–1351.

VAN ZANDT, P.; MOPPER, S., 2004: The effects of maternal salinity and seed environment on germination and growth in *Iris hexagona*. *Evolutionary Ecology Research* 6, 813-832.

VIENNOT-BOURGIN, G., 1949: Les champignons parasites des plantes cultivées. Paris: Masson, pp. 755

YARWOOD, C. E., 1950: *American Journal of Botany*. 37 (8), 636-639

ZHAN, J.; MUNDT, C.C.; HOFFER, M.H.; McDONALD, B.A., 2002: Local adaptation and effect of host genotype on the rate pathogen evolution: an experimental test in a plant pathosystem. *Journal of Evolutionary Biology* 15, 634-647.

ZOLAN, M. E.; PUKKILA, P. J., 1986: Inheritance of DNA methylation in *Coprinus cinereus*. *Mol. Cell. Biol.* 6, 195–200.

**Chapitre 4**  
**Déterminisme génétique de la résistance**  
**du chêne à l'oïdium**

## Chapitre 4: Déterminisme génétique de la résistance du chêne à l'oïdium

### Introduction

Les champignons phytopathogènes présentent différentes stratégies pour attaquer les plantes hôtes, qui à leur tour essayent de résister à ces agressions. L'importance des dégâts provoqués par les agents pathogènes a incité l'étude des mécanismes de résistance chez les végétaux dans le but de développer des variétés non ou peu sensibles. Les premières approches étaient surtout basées sur des méthodes traditionnelles de phytopathologie et de génétique ; à savoir les croisements et les tests sur le terrain (HULBERT *et al.* 1985 ; FLOR 1995). Les résistances utilisées étaient souvent des résistances totales qui se sont avérées peu durables, leur déterminisme monogénique s'avérant facile à contourner par des mutations du parasite conduisant à de nouvelles virulences (MCDONALD & LINDE 2002). Les orientations actuelles des programmes d'amélioration de la résistance accordent une place importante à la durabilité, d'où l'intérêt porté à des résistances partielles, à déterminisme polygénique, supposées avec une probabilité plus faible de contournement.

Les résistances aux maladies à déterminisme génétique complexe ont longtemps été peu expliquées (GEIGER & HEUN 1989). Toutefois, la génétique formelle a fourni les outils pour étudier ce type de résistances présentant une variation continue dans les populations (YOUNG 1993). Dans ce cas, les individus ne sont plus classés Sensible / Résistant mais ils sont évalués sur une échelle de résistance. La variation du caractère « résistance » est due aux variations des loci combinées aux variations causées par le milieu. L'étude de ces résistances polygéniques a récemment profité de l'approche dite quantitative trait loci (QTL) (QI *et al.* 1998; YULING *et al.* 2003) qui est fondée sur l'utilisation de marqueurs d'ADN (TANKSLEY *et al.* 1995). Avec la localisation des QTL, les rôles potentiels de loci spécifiques dans les caractères à déterminisme complexe peuvent être décrits et certaines questions fondamentales sur la résistance des plantes aux pathogènes qui ont intéressé les phytopathologistes pendant des décennies peuvent être résolues.



- **Recherche de QTL de résistance**

La cartographie des QTL consiste à rechercher une relation entre le génotype de chaque locus marqueur et la valeur du caractère quantitatif étudié. Pour cela, il faut (TANKSLEY *et al.* 1993 ; PLOMION *et al.* 1996) :

- 1) Disposer d'une descendance en ségrégation avec plusieurs centaines d'individus pleins-frères (pour avoir une relation entre déséquilibre de liaison et distance génétique)
- 2) « Génotyper » l'ensemble des individus de la descendance pour disposer d'une carte génétique de cette descendance.
- 3) Mesurer la valeur du caractère quantitatif pour tous les individus de la descendance. Cette distribution devrait être normale pour pouvoir faire l'analyse statistique qui requiert le plus souvent la normalité des données phénotypiques.
- 4) Faire une analyse statistique pour rechercher quels marqueurs sont liés statistiquement au caractère et estimer les paramètres génétiques des QTL identifiés.

Plusieurs (> 10) QTLs peuvent être impliqués dans la résistance quantitative mais il est beaucoup plus fréquent de ne trouver que trois à cinq loci avec souvent, un ou deux QTLs prédominants (YOUNG 1996). Cependant, pour quelques plantes hôtes, plus de 10 QTL ont été impliqués dans ce type de résistance (DIRLEWANGER *et al.* 1994). Des études ont démontré que les QTL pourraient co-localiser avec des gènes précédemment clonés impliqués dans la réponse de l'hôte à l'attaque du pathogène (exemple de la pomme de terre *et Alternaria solani* (TAYLOR *et al.* 1990) ou *Xanthomonas phaseoli* et le haricot (NODARI *et al.* 1993). Certains résultats suggèrent que les QTL de résistance peuvent potentiellement être associés à des résistances à plusieurs pathogènes (YOUNG 1996).

D'assez nombreuses études ont été faites pour l'identification de QTL impliqués dans la résistance aux maladies, mais ces études ont essentiellement concerné des plantes cultivées (QI *et al.* 1998; CROUZILLAT *et al.* 2000; KICHERER *et al.* 2000; LESPINASSE *et al.* 2000; BROWN *et al.* 2001), y compris le peuplier (JORGE *et al.* 2005).

La valeur des effets des QTL est un facteur qui influence de façon importante la puissance de détection des QTL (VAN OOIJEN 1992). L'effectif de la descendance utilisée a aussi des conséquences très importantes sur la précision de la localisation des QTL et l'estimation de leurs effets (BEAVIS 1995).

Les intervalles de confiance sur la position du QTL deviennent généralement plus larges avec la diminution des effectifs. Cela vient du fait que les événements rares de recombinaison,

nécessaires pour la détection des effets du QTL, ne sont décelés qu'à effectif élevé. D'autre part, les faibles effectifs sont à l'origine de la surestimation des effets des QTL.

L'héritabilité du caractère influence également la puissance de détection des QTL. Pour les caractères à faible héritabilité si l'effectif est de 100-200 individus, il est indispensable de mener la détection des QTL dans des environnements différents et avoir plusieurs répétitions afin d'obtenir une bonne estimation des effets et du nombre minimal de QTL impliqués.

Les croisements et les stratégies classiquement utilisés en cartographie génétique ne s'adaptent pas aux arbres forestiers. En effet, les arbres forestiers sont des espèces sauvages, allogames, présentant des temps de générations très longs. Les populations des arbres forestiers ont des nombres d'individus élevés avec une très forte dépression de consanguinité. (AHUJA 2001). Toutefois, l'hétérozygotie élevée de ces populations et la possibilité d'obtenir des descendance nombreuses de plein-frères ont permis le développement de la stratégie de double pseudo test-cross. Cette stratégie est basée sur l'utilisation de marqueurs dominants et de croisements F<sub>1</sub>. Les fragments permettant d'établir une carte pour le parent femelle et une carte pour le parent mâle distinctes, sont présents chez un des deux parents et absents chez le deuxième parent. Les marqueurs présents uniquement chez l'un des deux parents et ségrégeant 1:1 dans la descendance sont des marqueurs en configuration « testcross » tandis que ceux amplifiés chez les deux parents et qui ségrégent 3:1 dans la descendance sont en configuration « intercross ». Quand des marqueurs codominants sont utilisés, d'autres types de ségrégation sont possibles (GRATTAPAGLIA & SEDEROFF 1994).

- **Cas de la résistance du chêne à l'oïdium**

La disponibilité de cartes génétiques du chêne sessile et pédonculé (BARRENECHE *et al.* 1998) permet aujourd'hui l'analyse de QTL associés à des caractères phénotypiques. Plusieurs analyses de QTL ont été réalisées sur chêne, pour des caractères morphologiques impliqués dans la différenciation chêne sessile-chêne pédonculé (SAINTAGNE *et al.* 2004a) ou la multiplication végétative (SAINTAGNE *et al.* 2005), des caractères liés à la croissance comme le débourrement et la croissance en hauteur de *Q. robur* (SCOTTI-SAINTAGNE *et al.* 2004b), la densité stomatique (GAILING *et al.* 2008) ou quelques caractères physiologiques en lien avec des contraintes abiotiques, comme la tolérance à l'engorgement ou l'efficacité de l'eau (PARELLE *et al.* 2007, BRENDÉL *et al.* 2008). Toutefois il n'existe à l'heure actuelle aucune étude concernant la résistance à des stress biotiques, parasitisme ou herbivorie.

Nous nous sommes donc proposés de développer une méthode d'évaluation quantitative de la résistance du chêne à l'oïdium en conditions naturelles et en conditions contrôlées permettant la recherche de QTL en utilisant le même croisement intra spécifique entre deux parents de *Q. robur* (BARRENECHE *et al.* 1998) utilisé dans la plupart des études précédentes.

L'étude est basée sur (1) une évaluation quantitative pluri-annuelle de la résistance du chêne à l'oïdium sur la descendance de chêne pédonculé installée sur le terrain (données obtenues par l'équipe), (2) une estimation de la sensibilité par des inoculations en conditions contrôlées (données obtenues dans le cadre de la thèse).

Une étude préliminaire sur un croisement interspécifique (chêne pédonculé X sessile) a été également réalisée afin de comparer les descendance intra-spécifiques et les hybrides.

Les résultats de ce chapitre (hors croisement interspécifique) feront l'objet d'un article (dont la soumission est prévue courant 2009), en intégrant les résultats de QTL associés à la résistance à *Phytophthora cinnamomi* sur la même descendance de chênes (collab C. Robin).

## **Matériel et méthodes**

### **Matériel végétal**

Un croisement intra spécifique de *Q. robur* a été réalisé entre un parent femelle provenant de la station de recherche forestière de Pierroton et un parent mâle originaire d'Arcachon (BARRENECHE *et al.* 1998). La lignée (F1) de *Q. robur* (278 individus) a été génotypée pour la cartographie de QTL (BARRENECHE *et al.* 1998; SAINTAGNE *et al.* 2004). Les 278 individus ont été conservés, puis multipliés par bouturage pour constituer une banque clonale. La propagation végétative a été réalisée comme décrit par SCOTTI-SAINTAGNE *et al.* (2005). La sensibilité à l'oïdium des deux parents n'est pas connue.

Un croisement inter spécifique entre *Q. robur* et *Q. petraea* a d'autre part été utilisé pour une étude préliminaire de la résistance des chênes hybrides à l'oïdium.

### **Evaluation de la sensibilité à l'oïdium en conditions naturelles**

La descendance génotypée du croisement intraspécifique a été plantée à Bourran (latitude 44.20 N, longitude 0.24W) dans le sud-ouest de la France, dans deux dispositifs voisins (plantés respectivement en 1997 et 1999). La quantification de l'infection par l'oïdium a été réalisée sur trois ans consécutifs (juin 2003, septembre 2004 et octobre 2005). Les notations ont été effectuées sur la plantation de 1997 en 2003 et sur la plantation de 1999 en 2004 et 2005, sur 166 génotypes appartenant à 35 blocs en 2003, 208 génotypes

appartenant à 148 blocs en 2004 et 208 génotypes appartenant à 170 blocs en 2005 (cinq à douze répétitions par génotype). L'échelle utilisée pour la notation des feuilles comprend 5 niveaux : **0** = absence d'oïdium ; **1** = 0-10% de la surface foliaire oïdiée; **2** = 10-50% de la surface oïdiée ; **3** = plus de 50% de la surface oïdiée ; **4** = déformation, feuilles présentant des nécroses; **5** : feuille totalement nécrosée (Figure 4.1). Les notations ont été réalisées sur la deuxième et la cinquième feuille en partant de la base de la pousse (premier ou deuxième cycle de croissance) de l'année sur quatre branches par arbre (dans les quatre directions nord, sud, est, ouest). En 2003, les notations ont été effectuées sur le premier (Nat1-03) et le deuxième cycle (Nat-03), tandis que pour 2004 (Nat-04) et 2005 (Nat-05), les notations ont été réalisées uniquement sur le deuxième cycle à cause de l'absence d'oïdium sur le premier. La sensibilité à l'oïdium de chaque individu est estimée en calculant la moyenne des huit notes pour chaque cycle de croissance.



**Figure 4.1 : Evolution de la maladie de l'oïdium sur feuilles de chênes 1 : 0-10% de la surface foliaire oïdiée, 2 : 10-50% de la surface foliaire oïdiée ; 3 : plus de 50% de la surface foliaire oïdiée, 4 : feuilles présentant des nécroses ; 5 : feuille totalement nécrosée**

## Inoculations contrôlées

### • Matériel fongique

La source d'inoculum pour les deux années est la souche MMC1, résultant d'un isolement monospore à partir de feuilles infectées prélevées en 2002 sur un chêne pédonculé à Cestas, France (Coordonnées Lambert X 44,1224 Y 0,1019). La souche est régulièrement repiquée sur feuilles excisées stériles incubées en chambre de culture à une température de 22°C et une photopériode de 12h. La souche a été identifiée comme étant *Erysiphe alphitoides*, après amplification spécifique de l'ITS (MOUGOU *et al.* 2008).

### • Méthode

Les inoculations ont été effectuées sur des feuilles détachées prélevées sur des plants clonés du croisement étudié élevés en serre, à raison d'une feuille par plant. Les feuilles sont prélevées au stade optimal de sensibilité à l'oïdium (feuilles en cours de développement ni trop cireuses ni trop molles (EDWARDS & AYRES 1992). La stérilisation des feuilles se fait

dans un bain d'hypochlorite de calcium à 50g/L suivi par des rinçages avec de l'eau stérile. Les feuilles sont séchées entre des feuilles de papier filtre, chaque feuille est déposée sur sa face inférieure dans une boîte de Pétri, sur du milieu ERGB (20g/l Bacto Agar, 1ml de Benzimidazole par litre de solution). L'inoculation consiste à déposer une goutte de 2,5 µL d'une suspension de spores de la souche MMC1 sur chaque feuille. En 2005, une concentration de 180000 spores/ml, soit environ 450 par goutte a été utilisée. Pour l'expérimentation de 2006, nous avons décidé d'utiliser une concentration plus faible de 60000 spores/ml soit environ 150 spores par point d'inoculation (cf infra). Les boîtes de Pétri contenant les feuilles inoculées sont laissées ouvertes sous la hotte à flux laminaire pendant une heure, pour éliminer l'eau de la suspension. Les boîtes sont ensuite conservées dans la chambre de culture pendant 12 jours à 22°C et 12h de photopériode. Les notations se font sous loupe binoculaire ; chaque site d'inoculation est examiné pour la présence/absence d'une colonie d'oïdium, se manifestant par la présence de mycélium et généralement de spores (conidies) en chainettes. Le développement de la lésion est mesuré sur deux diamètres perpendiculaires (L,l). La croissance mycélienne radiale (CMR) est calculée comme suit :

$$\text{CMR} = [(L+l)/2]/12 \text{ en } \mu\text{m/jour.}$$

## **Dispositif expérimental**

Trois blocs correspondant à différentes séries de bouturage et d'élevage des génotypes ont été utilisés pour les deux années d'expérimentation. Les plants sont élevés en serre. Pour des raisons pratiques, essentiellement de disponibilité en temps, les inoculations ont été réalisées sur plusieurs jours, seuls les plants d'un même bloc présentant des feuilles au stade adéquat étant testés chaque jour (Cinq dates d'inoculations pour 2005 allant du 13/04 au 26/04 et quatre dates pour 2006 allant du 05/04 au 26/04). Des feuilles prélevées sur le premier cycle de croissance de l'année ont été utilisées aux premières dates, ou du deuxième cycle plus tard en saison.

En 2005, 160 génotypes ont pu être testés, dont seulement 59 avec plus d'une répétition. En 2006, 207 clones, dont 118 avec plus d'une répétition ont été évalués.

Treize génotypes provenant d'un croisement interspécifique entre *Q. robur* and *Q. petraea* ont été testés en 2006, provenant de la même campagne de bouturage et élevés dans les mêmes conditions que les plants issus du croisement intra-spécifique. Un total de 94 génotypes du croisement intra spécifique et 13 du croisement inter spécifique (dont 10 avec au moins deux répétitions) ont été inoculés *in vitro* le même jour.

## Méthodes statistiques

Les données phénotypiques sont analysées par régression logistique ou par analyse de la variance, en utilisant les procédures GENMOD et GLM du logiciel SAS (SAS Institute 1989) pour tester les effets génotype, environnement et interaction. Les moyennes par génotype ont été calculées avec l'option LSMEANS de la procédure GLM. Le test de la normalité des données phénotypiques a été réalisé à l'aide du test Shapiro-Wilk.

## Détection de QTL

La carte génétique utilisée dans cette étude est celle établie par BARRENECHE *et al.* (1998), complétée par SCOTTI-SAINTAGNE (2004) et comprend 12 groupes de liaison. Les données sont obtenues à partir de 128 marqueurs uniformément répartis sur les cartes (34 microsatellites, 1 SCAR, 84 AFLP, 9 RAPD). Les deux cartes mâles et femelles partagent 19 microsatellites. La carte femelle présente 75 marqueurs et couvre une distance de 902 cM, avec un espacement moyen entre les marqueurs de 14cM. La carte mâle comprend 72 marqueurs couvrant une distance totale de 933 cM. La recherche de QTL a été réalisée sur les moyennes par génotype des variables citées dans le tableau 4.1. Les données d'inoculations *in vitro* sont ajustées à l'effet bloc.

**Tableau 4.1 : Moyennes par génotype ajustées à l'effet génotype et année pour les inoculations naturelles et à l'effet génotype et bloc pour les inoculations contrôlées étudiées pour la recherche de QTL impliqués dans la résistance du chêne à l'oïdium.**

	Variable	Année d'expérimentation	Min *	Max *	Moyenne*
Inoc-05	Notations sur inoculations contrôlées (Inoculations réussies)	2005	109.32	963.49	480.36
Inoc-06	Notations sur inoculations contrôlées (Inoculations réussies)	2006	117.66	1178.21	617.84
Inoc2-06	Notations sur inoculations contrôlées (Données totales)	2006	0	1178.21	334.24
Nat1-03	Notations en conditions naturelles sur premier cycle de croissance	2003	0.29	2.98	1.73
Nat-03	Notations en conditions naturelles sur deuxième cycle de croissance	2003	0.54	3.16	1.86

Nat04	Notations en conditions naturelles sur deuxième cycle de croissance	2004	0.55	3	2.22
Nat-05	Notations en conditions naturelles sur deuxième cycle de croissance	2005	1.84	4.83	3.03

\* en  $\mu$  pour les notations d'inoculation ; en valeur de note (bornée de 0 à 5) pour les notations d'infection naturelle

La recherche de QTL a été réalisée à l'aide du logiciel Multiqtl (BRITVIN *et al.* 2001). L'analyse par Composite Interval Mapping (CIM) a été utilisée pour l'identification de QTL et pour estimer les effets phénotypiques. Cette méthode évalue la possibilité de l'existence d'un QTL sur chaque intervalle entre deux loci (ZENG 1994; JANSEN & STAM 1994). La déviation standard de la position de chaque QTL a été estimée par bootstrap (VISSCHER *et al.* 1996) avec 1000 ré-échantillonnages. Les seuils statistiques de signification pour déclarer la présence d'un QTL ont été réalisés par 1000 permutations du jeu de données (CHURCHILL & DOERGE 1994). Pour les QTL significatifs (seuil de 5% au niveau chromosome) les paramètres génétiques à estimer sont : 1) la position du QTL sur le chromosome et l'intervalle de confiance de cette position, 2) l'effet de substitution allélique du QTL (= effet sur la valeur phénotypique de la substitution d'un des deux allèles au QTL avec l'autre), et 3) la proportion de variance phénotypique expliquée par le QTL. Le test le plus utilisé pour tester la liaison entre deux loci, est celui du « LOD score » (MORTON 1955), qui est égal au logarithme décimal du rapport des vraisemblances des deux hypothèses : celle de liaison et celle d'indépendance entre les deux locus considérés.

### **Co-localisation avec d'autres QTL identifiés sur le même croisement**

Une recherche de la co-localisation des QTL identifiés pour la sensibilité/résistance à l'oïdium avec des QTL préalablement décrits comme associés à des caractères physiologiques chez le chêne a été entreprise (Tableau 4.2) : critères morphologiques de différenciation des espèces (SCOTTI *et al.* 2004), multiplication végétative (SCOTTI-SANITAGNE *et al.* 2005), débourrement et croissance (SCOTTI-SANITAGNE *et al.* 2004). Il est clair que les intervalles de confiance très larges et la présence de QTL sur un grand nombre de groupes de liaison donnent lieu à des « co-localisations » simplement par chance. Compte-tenu des très larges intervalles de confiance obtenus dans notre étude (cf infra), nous avons basé notre recherche de co-localisation sur les positions de LOD le plus élevée (L) et sur celles obtenue après

bootstrap (Lbs), en considérant que deux QTL co-localisent s'ils sont à +/- 10 cM l'un de l'autre.

**Tableau 4.2 : QTL identifiés pour le chêne pour différents caractères physiologiques et étudiés pour leur co-localisation avec des QTL de sensibilité à l'oïdium**

Type de caractère	Nombre de variables	Nombre de QTL	Méthode utilisée	Référence
Morphologiques	15*2expériences	26	Composite interval Mapping (CIM)	SAINTAGNE <i>et al.</i> 2004
Débourrement	2 * 3 sites	32	Composite interval Mapping (CIM)	SCOTTI-SAINTAGNE <i>et al.</i> 2004
Croissance en hauteur	5 * 3 sites	14	Composite interval Mapping (CIM)	SCOTTI-SAINTAGNE <i>et al.</i> 2005
Aptitude au bouturage	1 * 4 années	10	Composite interval Mapping (CIM)	SCOTTI-SAINTAGNE <i>et al.</i> 2005

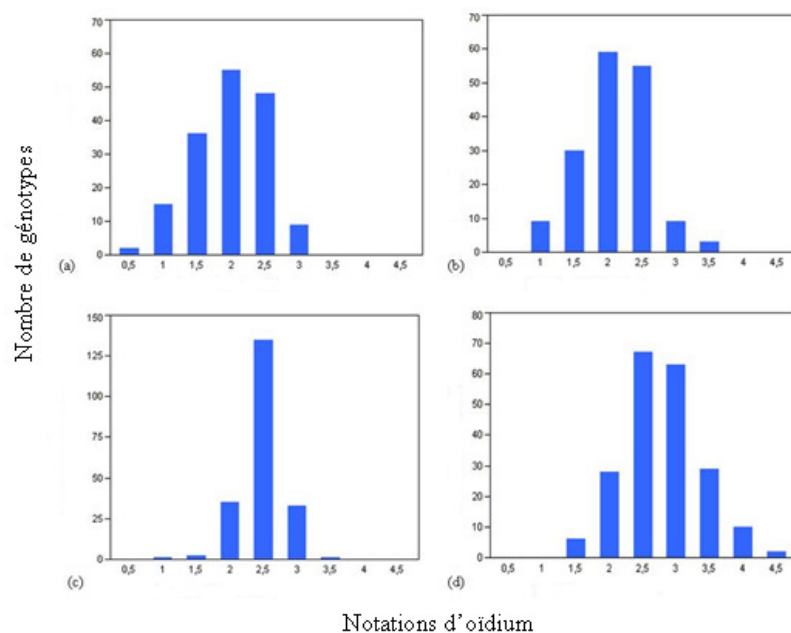
## Résultats

### Croisement intra spécifique *Quercus robur*

#### Analyse des mesures phénotypiques de la sensibilité du chêne à l'oïdium

##### - Sensibilité à l'oïdium en conditions naturelles

La distribution des notations d'oïdium sur les chênes installés à Bourran est présentée sur la figure 4.2. La distribution des degrés d'infection des différents génotypes ne suit pas rigoureusement une loi normale (Test Shapiro-Wilk) mais on remarque que l'allure générale ne s'en éloigne pas fortement.



**Figure 4.2: Distribution des valeurs ajustées des notations d'oïdium (moyenne/génotype) du chêne (a) 1<sup>er</sup> cycle de croissance (2003), (b) 2<sup>ème</sup> cycle de croissance (2003), (c) 2<sup>ème</sup> cycle de croissance (2004) et (d) 2<sup>ème</sup> cycle de croissance (2005)**



L'analyse de variance a montré une différence significative pour la sensibilité à l'oïdium des différents génotypes de chêne (Tableau 4.3). Elle a également révélé un effet significatif de l'année de notations, indiquant un effet significatif de l'environnement sur l'aptitude de l'oïdium à infecter les chênes. L'interaction année\*génotype est également significative, ce qui indique que le classement relatif des génotypes pour la sensibilité à l'oïdium varie entre années. Les corrélations entre les moyennes par clone des mesures phénotypiques sont significatives mais relativement faibles entre les trois années de mesures (Tableau 4.4).

**Tableau 4.3: Analyse de la variance pour l'infection par l'oïdium du chêne en conditions naturelles**

Source	DL	Type III SS	Carré moyen	F	Pr > F
<b>Génotype</b>	222	295.37	1.33	1.87	<.0001
<b>Année</b>	2	555.56	277.78	390.16	<.0001
<b>Génotype*année</b>	354	329.93	0.93	1.31	0.0002
<b>Erreur</b>	2950	2100.31	0.71		
	R <sup>2</sup>	Coeff Var	Moyenne		
	0.40	33.39	2.52		

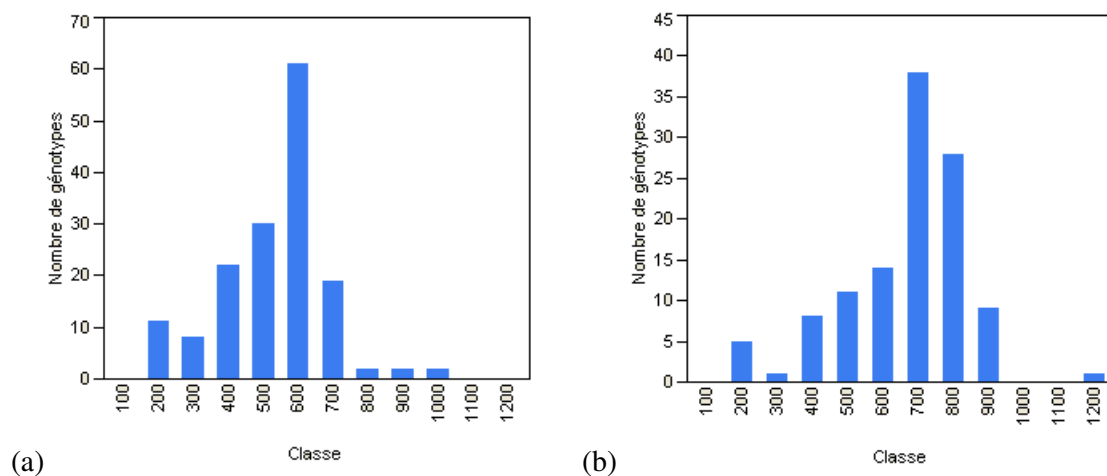
**Tableau 4.4: Coefficients de corrélations entre années pour les notations de sensibilité à l'oïdium du chêne sur 178 génotypes en conditions naturelles**

	2003 (1 <sup>er</sup> cycle)	2003 (2 <sup>ème</sup> cycle)	2004 (2 <sup>ème</sup> cycle)
<b>2003 (2<sup>ème</sup> cycle)</b>	0,82*	.	.
<b>2004 (2<sup>ème</sup> cycle)</b>	0,18*	0,24*	.
<b>2005 (2<sup>ème</sup> cycle)</b>	0,22*	0,21*	0,17

#### **- Inoculations contrôlées**

Nous avons dû faire face à divers problèmes méthodologiques lors des premières séries (dates) d'inoculation en 2005, se traduisant par de nombreux échecs. Après amélioration du protocole, un succès d'inoculation de 97% a été obtenu aux trois dernières

dates. Nous avons donc uniquement retenu les inoculations « réussies » (c'est-à-dire conduisant à la présence d'une colonie plus ou moins développée) pour l'ensemble des dates pour cette année d'expérimentation. Compte tenu du taux de succès très élevé obtenu lors des dernières séries, nous avons décidé de diminuer la pression d'inoculum pour l'année suivante, en considérant que des pressions trop fortes pourraient masquer des différences de sensibilité. Un taux de succès de 52.8 % a été obtenu pour 2006 (204/386), avec des différences importantes selon les génotypes : parmi les 118 testés avec au moins deux répétitions, 47 génotypes n'ont présenté que des échecs, 60 que des succès et seulement 11 des réponses variables selon les répétitions. L'analyse en régression logistique a montré que le succès d'inoculation présente une forte relation de dépendance ( $P < 0.0001$ ) entre la variable à expliquer (succès d'inoculation) et la variable explicative (génotype). La distribution des valeurs de croissance mycélienne observées en 2005 et 2006 pour les inoculations réussies, ne s'éloigne pas fortement d'une distribution normale. Les moyennes sont respectivement de 497,3 et 642,2 $\mu\text{m}/\text{jour}$  (Figure 4.3).



**Figure 4.3: Distribution de la croissance mycélienne (moyenne/génotype en  $\mu\text{m}/\text{j}$ ) pour le croisement intra spécifique (a) 2005 (b) 2006**

Un effet significatif du génotype pour la croissance mycélienne a été observé uniquement pour l'expérimentation réalisée en 2006 (Tableau 4.5 et 4.6).

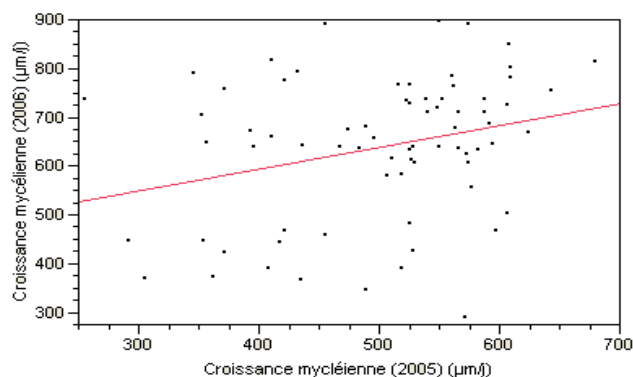
**Tableau 4.5: Analyse de la variance pour la croissance mycélienne (inoculations réussies 2005)**

Source	DL	Type III SS	F	Pr>f
<b>Bloc</b>	2	57176,25	1,16	0,24
<b>Génotype</b>	159	5363190,79	0,66	0,42
<b>Cycle de croissance</b>	1	19032,63	0,98	0,38
<b>Erreur</b>	70	2031711,09		
<b>Total</b>	232	7520631,24		
	R <sup>2</sup>	Coeff Var	Moyenne	
	0,73	34,25	497,33	

**Tableau 4.6: Analyse de la variance pour la croissance mycélienne (inoculations réussies 2006)**

Source	DF	Type III SS	F	Pr>f
<b>Bloc</b>	2	693477,58	22,78	<.0001
<b>Génotype</b>	114	4537402,54	2,61	<.0001
<b>Erreur</b>	87	1324286,22		
<b>Total</b>	203	6691878,04		
	R <sup>2</sup>	Coeff Var	Moyenne	
	0,80	19,21	642,25	

Une corrélation positive faible ( $r = 0,28$ ,  $DL = 72$ ) peut être observée entre la croissance mycélienne (moyenne/clone) de 2005 et celle de 2006 (Figure 4.4). Parmi les 92 génotypes n'ayant pas développé d'oïdium suite aux inoculations en 2006, 50 avaient été infectés en 2005, 38 n'avaient pas été infectés et 4 n'avaient pas été testés. D'autre part les évaluations d'infection entre conditions naturelles et conditions contrôlées ne sont pas corrélées.



**Figure 4.4 : Corrélation entre les valeurs moyennes/clone des croissances mycéliennes en 2005 et 2006 pour les inoculations *in vitro***

## Analyse des QTL

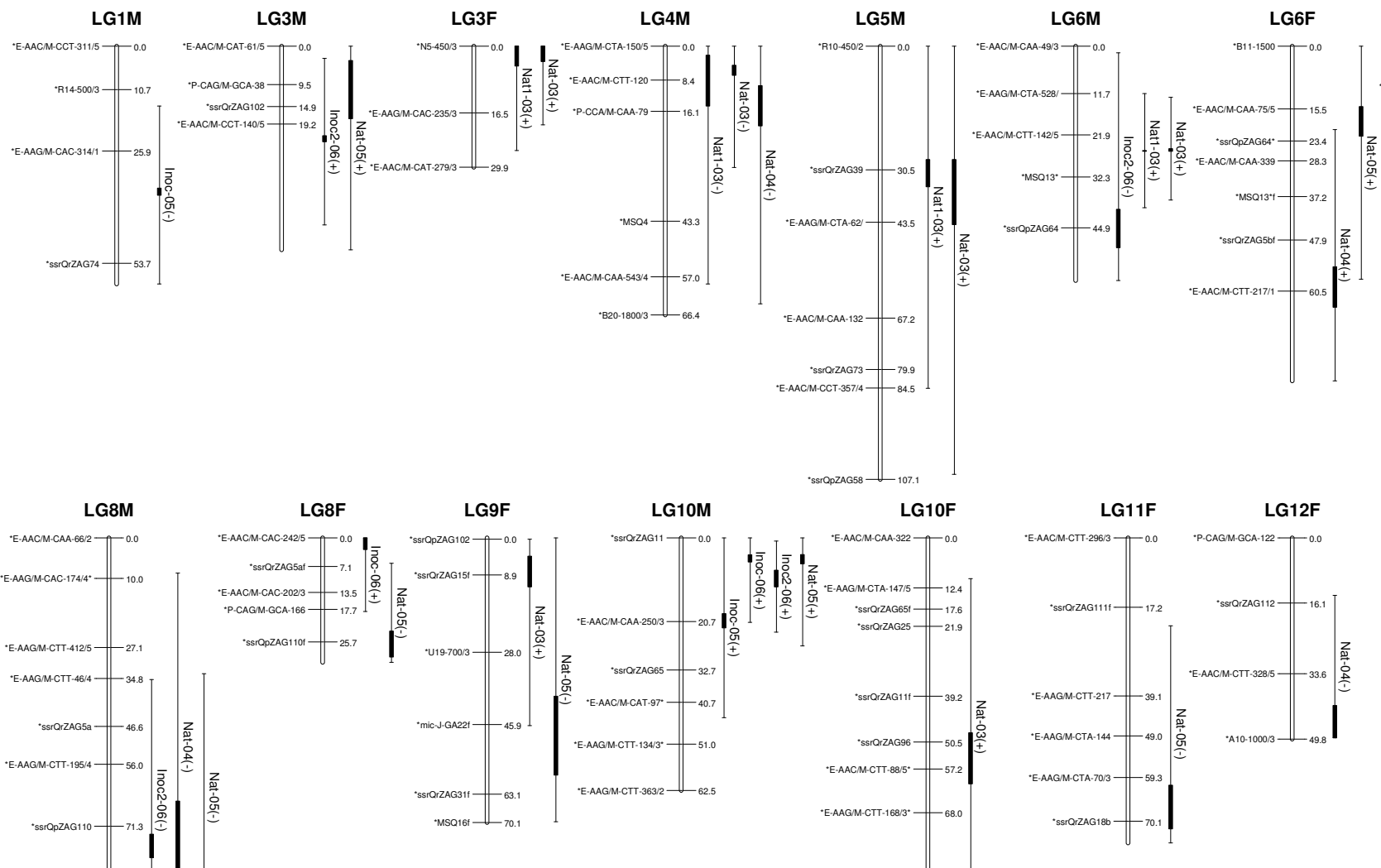
### Détection de QTL

La recherche de QTL a permis l'identification de 29 QTL significatifs à 5% au niveau du génome pour les sept caractères étudiés : 8 QTL en conditions contrôlées et 21 en infections naturelles, avec de 2 à 7 QTL par variable étudiée. Ces QTL sont détectés sur 14 groupes de liaison différents, sept sur la carte mâle et sept sur la carte femelle (Tableau 4.7, Figure 4.5).

Certains QTL sur les mêmes groupes de liaison peuvent sans doute être confondus. En effet, plusieurs QTL, détectés dans des environnements différents (années différentes ou conditions différentes) sont situés dans la même région du groupe de liaison. Il s'agit probablement du même QTL détecté plusieurs fois.

Quatre parmi les 14 groupes de liaison où on a détecté des QTL sont associés à une seule variable (1 variable d'inoculation et 3 de sensibilité en conditions naturelles) tandis que 10 présentent des QTL régissant plusieurs variables. Parmi ces 10 groupes de liaison, cinq portent des QTL associés à au moins deux variables différentes de sensibilité naturelle et cinq sont communs à au moins une variable d'inoculation et une variable de sensibilité naturelle : LG3m, LG6m, LG8m, LG10m et LG8f.

Le pourcentage de variance phénotypique expliquée par chaque QTL est généralement faible, de 2,8 (Inoc2-06, LG3m) à 11,2% (Nat-03, LG3f). Toutefois, des valeurs très élevées sont obtenues pour deux des 29 QTL identifiés, ces QTL sont situés sur LG10m avec 23,2% et 61,5% pour Inoc-06 et Inoc2-06 (Tableau 4.7).



**Tableau 4.7: QTL significatifs détectés en analyse CIM**

LG	m/f	Inoc-05	Inoc-06	Inoc2-06	Nat1-03	Nat-03	Nat04	Nat-05	N	LOD	PEV	L	IC	L <sub>bs</sub>	Effet de substitution
1	m	*							152	2.16	0.085	35.13	[14.8;58.8]	36,81	-88,01
3	m			*					204	1.25	0.028	22.13	[ 3.0;44.2]	23,6	112,12
								*	206	2.08	0.056	3.48	[ 0.0;50.3]	17,88	0,268
4	m				*				164	1.76	0.053	2.23	[ 0.0;58.8]	14,82	-0,0247
						*			164	2.34	0.068	4.68	[0.00;29.95]	7,164	-0,257
							*			206	1.57	0.036	9.73	[ 0.0;63.7]	19,66
5	m				*				164	1.67	0.047	27.97	[ 0.0;84.6]	34,74	0,231
						*			164	1.65	0.046	27.97	[ 0.0;105.8]	44,06	0,211
6	m			*					205	1.54	0.042	49.84	[ 1.6;57.9]	40,25	-136,95
					*				164	1.84	0.052	26	[11.7;39.9]	25,81	0,243
						*			164	2.28	0.063	26	[12.6;38.0]	25,32	0,247
8	m			*					204	1.45	0.043	79.09	[35.0;94.8]	73,34	-138,28
							*		206	1.62	0.043	49.52	[ 8.7;94.8]	65,11	-0,118
								*	206	2.84	0.096	94.82	[33.6;94.8]	83,81	-0,285
10	m	*							152	2.21	0.086	18.66	[ 0.0;44.5]	22,29	89,01
			*						114	4.66	0.232	4.237	[0.00;20.91]	6,035	169,05
				*					204	28.15	0.615	7.96	[ 0.8;23.3]	12,08	523,1
								*	206	3.07	0.096	4.07	[0.00;26.67]	6,387	0,351
3	f				*				161	1.73	0.059	0	[0.00;25.84]	4,893	0,259
						*			161	3.37	0.112	0	[0.00;19.37]	3,82	0,332
6	f						*		207	1.61	0.042	64.48	[20.6;82.7]	54,52	0,116
								*	207	1.78	0.055	14.92	[ 0.0;57.6]	22,21	0,265
8	f		*						114	1.38	0.055	0	[0.00;18.22]	2,933	81,77
								*	206	1.44	0.034	29.48	[ 6.3;30.8]	23,08	-0,209
9	f				*				163	1.54	0.053	4.15	[ 0.0;46.2]	11,78	0,243
								*	207	3.11	0.081	58.44	[38.9;69.9]	-0,328	-0,322
10	f				*			164	1.86	0.053	60.88	[10.1;83.5]	48,2	0,247	
11	f							*	206	1.72	0.043	72.01	[21.7;75.5]	61,15	-0,235
12	f						*		206	1.45	0.036	49.52	[14.2;49.5]	41,49	-0,107
<b>PEV totale</b>		0.171	0.287	0.728	0.317	0.289	0.157	0.461							

Inoc-05: inoculations *in vitro* réussies 2005, Inoc-06 : inoculations *in vitro* réussies 2006, Inoc2-06: Total des inoculations *in vitro* réalisées en 2006, Nat1-03: Infections en conditions naturelles 2003, Nat-03 : Infections en conditions naturelles sur 2ème cycle 2003, Nat04 : Infections en conditions naturelles 2004, Nat-05 : Infections en conditions naturelles 2005, LG: Groupe de liaison (m: carte mâle; f: carte femelle), N: Nombre d'individus, LOD: La valeur la plus élevée du LOD, PEV : Pourcentage de la variance expliquée par le QTL, L: position de la valeur la plus élevée du LOD, IC: Intervalle de confiance (95%) basés sur 1000 rééchantillonnages, L<sub>bs</sub>: Position de la valeur la plus élevée du LOD après analyse bootstrap (1000 rééchantillonnages)

## Co-localisation avec des QTL déjà identifiés

Nous nous sommes limités pour l'étude de co-localisation aux 7 QTL associés à plusieurs variables de sensibilité à l'oïdium (Tableau 4.8). Pour quatre d'entre eux (LG3m, LG5m, LG6m et LG10m), des co-localisations sont observées avec des QTL précédemment détectés pour d'autres caractères. En particulier, on remarque que des QTL régissant des caractères liés à la phénologie du chêne tels que le débourrement (ND) et la croissance (H et LF) et ceux impliqués dans la résistance à l'oïdium sont situés dans la même région sur les quatre groupes de liaison concernés (Tableau 8). On note également que sur deux groupes de liaison, les QTL associés à la résistance co-localisent avec des QTL de différenciation des espèces *Q. robur/Q. petraea* (caractères morphologiques des feuilles).

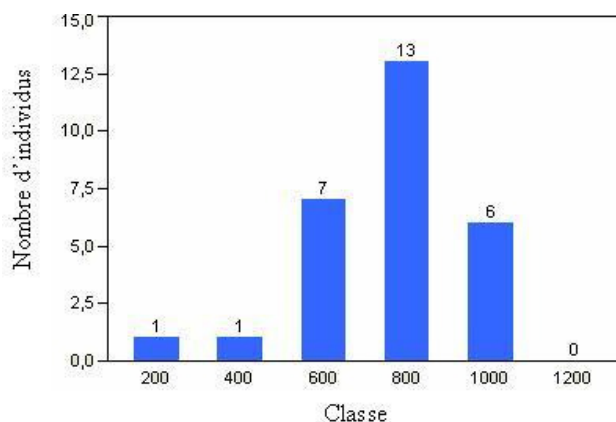
**Tableau 4.8 : Co-localisation des QTL associés à la résistance du chêne à l'oïdium avec des QTL associés à des caractères physiologiques**

LG	Caractère	L	L <sub>bs</sub>	IC
3m	Cutt98	22.1	23.8	16.8
	SW-field	19.3	17.2	9.2
	LDR-field	19.1	18.5	7.9
	ND2	22.1	21.3	10.9
	HI3	22.1	27	19.3
	LF3	21.3	24.6	18.2
5m	ND1	22.4	39	65.5
	LMA <sub>ln</sub>	51.2	51.1	13.4
	NA <sub>ln</sub>	37.5*	38	21.6
6m	LL-nursery	26	25.3	10.3
	H3	28.3	29	13.4
	dH1	24.1		
10m	ND1	13.8	24.8	34.3
	ND2	0	4.1	24.1
	ND3	34.8	28.4	19
	H3	18.4	19.1	12.8
	HI3	15.5	16.5	9.6
	LF3	15.8	17.3	11.3
	NF3	17.9	23.7	22.9
	dH2	24.1		

L: position de la valeur la plus élevée du LOD,  
L<sub>bs</sub>: Position de la valeur la plus élevée du LOD après analyse bootstrap (1000 rééchantillonnages),  
IC: Intervalle de confiance (95%) basés sur 1000 rééchantillonnages,  
LL: Longueur du lamina,  
SW: Largeur de sinus,  
LDR: Proportion de profondeur de lobe,  
Cutt: Pourcentage de coupes capables de s'enraciner ;  
LMA : masse de feuille par unité de surface (g cm<sup>-2</sup>),  
NA: Azote par unité de surface de feuille (mg cm<sup>-2</sup>), ND: Nombre de jours pour atteindre le stade 1, 2 ou 3 du débourrement,  
H: hauteur totale,  
NF nombre de pousses,  
HI Augmentation de hauteur pendant la saison de végétation,  
LF : Longueur moyenne d'une pousse (=HI/NF),  
dH2 : Augmentation de la hauteur.

## Croisement inter spécifique *Q. robur* x *Q.petraea*

Le succès de l'inoculation s'est avéré plus important pour le croisement inter spécifique que pour le croisement intra spécifique. En effet, 17.64 % des feuilles inoculées n'ont pas montré de colonies pour les chênes hybrides contre environ 47% des feuilles inoculées pour le croisement intra spécifique.



**Figure 4.6: Distribution de la croissance mycélienne de l'oïdium ( $\mu\text{m}/\text{j}$ ) pour le croisement inter spécifique**

L'analyse statistique de la croissance mycélienne de l'oïdium pour les inoculations réalisées le même jour et réussies sur les 51 génotypes du croisement intra spécifique et 10 du croisement inter spécifique a montré que la sensibilité est statistiquement différente entre les deux croisements ( $\text{Pr} = 0,0183$ ) avec une moyenne de  $686\mu\text{m}/\text{j}$  pour les hybrides et  $642\mu\text{m}/\text{j}$  pour les chênes pédonculés (Figure 4.6). Toutefois, on remarque qu'on ne peut pas mettre en évidence un effet génotype (dans chacun des deux croisements) (Tableau 4.9).

**Tableau 4.9: Analyse de variance pour la croissance mycélienne (2006)**

Source	DL	Type III SS	F	Pr>f
<b>Croisement</b>	1	158642,01	6,73	<.0001
<b>Génotype (Croisement)</b>	59	1840844,35	1,32	0,2593
<b>Erreur</b>	18	424106,262		
<b>Total</b>	78	2372696,80		
	R <sup>2</sup>	Coeff Var	Moyenne	
	0,82	22,38	685,735	



## Discussion

Le résultat majeur de cette étude est la mise en évidence de l'existence d'une sensibilité différentielle à l'oïdium entre génotypes au sein d'un croisement intra spécifique de chêne pédonculé démontrée à la fois en conditions naturelles et par inoculations contrôlées. A notre connaissance, aucune donnée publiée jusqu'à présent n'apportait la démonstration d'un déterminisme génétique de la résistance à l'oïdium chez le chêne. Bien que certains génotypes n'aient pas été infectés après inoculation en 2006, l'existence d'une résistance totale, de type gène pour gène, reste à démontrer. En effet, la plupart avaient été infectés en 2005, avec une pression d'inoculum plus forte. Les échecs d'inoculation en 2005 ont été attribués à des problèmes méthodologiques (séchage des gouttes, toxicité du Tween) ou un mauvais état physiologique de certaines boutures (chlorosées). Les échecs d'inoculations notés en 2006 pourraient résulter de la pression d'inoculum beaucoup plus faible utilisée (450sp/inoc en 2005 et 150sp/inoc en 2006) ; cette concentration pourrait être insuffisante pour initier une infection chez certains génotypes parmi les moins sensibles. Les notations d'infection sur le terrain de l'oïdium ainsi que les valeurs de croissance mycélienne *in vitro* ont une distribution proche d'une loi normale, ce qui témoigne d'une résistance quantitative à cette maladie.

La variation dans les caractères phénotypiques associés à l'infection par l'oïdium a permis l'identification d'au moins 18 QTL associés à cette sensibilité. L'effectif de la population testée joue un rôle important dans la puissance de détection des QTL, dans la précision de la localisation et l'estimation de l'effet. En effet, un faible effectif peut provoquer une sous-estimation des QTL à effet très faible, l'augmentation de l'intervalle de confiance donc une imprécision de la localisation (VAN OOIJEN 1992 ; CASASOLI 2004). Dans notre étude, l'effectif de la population est de l'ordre de 150 individus. De plus, pour des raisons de disponibilité de matériel et de contraintes de temps, nous avons peu de répétitions par génotype dans les expérimentations en conditions contrôlées. Pour pallier en partie ces problèmes associés à un faible effectif, nous avons réalisé nos expérimentations dans des environnements différents (conditions naturelles et inoculations *in vitro*) et sur plusieurs années.

Les expérimentations entreprises dans cette étude ont permis de mettre en évidence la présence de loci associés à la résistance à l'oïdium chez le chêne en conditions naturelles et contrôlées, en analysant les données séparément pour chaque année. Une perspective est de

confirmer les résultats obtenus en utilisant le modèle de multi-environnement disponible dans le logiciel MultiQTL traitant ainsi toutes les données en une seule analyse pour sensibilité en conditions naturelles d'une part, et inoculations contrôlées d'autre part. Ceci permettrait, en réduisant les effets de l'environnement d'augmenter la puissance de détection des QTL à effet faible et d'améliorer l'évaluation de la variance expliquée et des effets alléliques pour chaque environnement (JANSEN *et al.* 1995 ; CHEN-HUNG *et al.* 1999). On pourra alors différencier parmi les QTL qu'on a identifiés ceux ayant des effets significatifs pour un ou deux environnements et ceux ayant des effets stables, significatifs en ne tenant pas compte des environnements. Le premier cas indique une influence environnementale beaucoup plus forte sur le QTL, tandis que le deuxième cas suggère une forte stabilité du QTL.

Les proportions de variance phénotypique expliquées par les QTL ne sont pas très élevées (2.8 à 11.2%), excepté pour celui détecté sur le groupe de liaison LG10m (> 20% pour deux variables). Cette proportion atteint 61.5% pour la variable inoc2-06, c'est-à-dire que ce QTL explique la plus grande part du succès ou échec des inoculations, en plus d'une part importante dans le niveau de succès (croissance des lésions). Ce QTL semble avoir un effet dominant dans la résistance du chêne à l'oïdium.

Pour une variable donnée, l'ensemble des QTL détectés dans cette étude explique de 15.7 à 72.8% de la variance phénotypique selon la variable considérée (généralement entre 20 et 30%). Cette variance est de 47 à 59% pour l'ensemble des QTL régissant la résistance du pommier à l'oïdium (CALENGE & DUREL 2006). La variance dans la résistance à l'oïdium non expliquée par les QTL pourrait être associée à d'autres QTL non détectés dans notre étude. Une partie du génome des descendants intra spécifiques utilisés n'est pas couverte par la carte utilisée (mâle ou femelle) qui ne couvre que 85 à 90% du génome (BARRENECHE *et al.* 1998). Ainsi la carte doit être étendue pour identifier ces QTL. Les parents du croisement utilisé peuvent également ne pas présenter de polymorphisme pour les aspects de résistance à l'oïdium mesurés dans notre étude, d'où la non détection de quelques QTL.

La recherche de QTL impliqués dans la résistance aux maladies a concerné essentiellement les plantes cultivées. Pour les arbres forestiers, la recherche de QTL a surtout concerné le pin et le peuplier et des caractères physiologiques ayant une incidence sur la production de bois tels que la densité du bois et le diamètre (BROWN *et al.* 2003 ; DEVEY *et al.* 2003 ; DEVEY *et al.* 2004 ; JORGE *et al.* 2005 ; POT *et al.* 2006 ; SHEPHERD *et al.* 2006 ; ZHANG *et al.* 2006).

L'instabilité des QTL de résistance du chêne à l'oïdium observée dans notre travail est aussi mentionnée dans le cas de l'oïdium du pommier et du pêcher. Une recherche des QTL de résistance à l'oïdium chez le pommier a montré que seulement deux sur les sept QTL détectés ont été retrouvés pour toutes les années d'expérimentation ; ces QTL expliquaient 29% à 37% de la variation phénotypique en fonction de l'année d'expérimentation (STANKIEWICZ-KOSYL *et al.* 2005). Ceci rejoint les résultats obtenus dans le cadre de l'étude de la résistance quantitative du pêcher à l'oïdium (populations issues d'un croisement entre un clone résistant de *P. davidiana* et un parent sensible cultivar Summergrand) qui a permis d'identifier treize QTL contrôlant cette résistance. La résistance de chacune de ces populations à l'oïdium a été évaluée dans les conditions naturelles, sur plusieurs années, et dans plusieurs régions. Uniquement cinq des treize QTL ont été systématiquement détectés dans les trois populations (FOULOGNE *et al.* 2003). Toutefois, la variance phénotypique expliquée par les QTL pour chaque variable dans notre étude est plus faible que celles des QTL de résistance chez le pommier (5.7% à 27.4%). L'instabilité des QTL indique un changement de déterminisme génétique en fonction de l'année de l'évaluation (CALENGE & DUREL 2006).

Les « co-localisations » observées entre les QTL de résistance et ceux régissant d'autres caractères sont intéressantes du point de vue biologique ; elles sont probablement dues à la pleiotropie des gènes impliqués dans ces caractères corrélés. La présence d'un cluster de gènes pourrait également expliquer cette corrélation entre les caractères différents. L'étude des QTL impliqués dans différents caractères physiologiques et ceux responsables de la résistance à l'oïdium a montré une co-localisation de plusieurs QTL de résistance avec ceux régissant le débourrement chez le chêne (SCOTTI-SANTAIGNE *et al.* 2004). Cette co-localisation s'observe en particulier pour le ou les QTL détectés sur le groupe de liaison LG10M où huit QTL associés avec le débourrement ou la croissance du chêne co-localisent avec les QTL de sensibilité à l'oïdium en conditions naturelles ou en inoculations contrôlées. Ces résultats sont en accord avec les observations phénotypiques montrant une résistance ontogénique du chêne à l'oïdium, c'est-à-dire une variabilité dans la sensibilité à l'oïdium en fonction des stades phénologiques (Edwards & Ayres 1982). Une autre hypothèse serait l'existence d'un gène de résistance qui s'exprimerait au stade sensible.

Une co-localisation entre QTL de résistance et quelques QTL associés aux caractères morphologiques différenciant les espèces de chêne (*Q. robur*/*Q. petraea*) est aussi observée ; ce qui pourrait témoigner d'une résistance différentielle à l'oïdium selon les espèces.

Des études ont déjà montré que quelques régions génomiques peuvent être associées à la résistance à plusieurs parasites et maladies : il peut y avoir des groupes de gènes de résistance étroitement liés, ou bien l'action des QTL peut être pléiotropique, par des signaux physiologiques partagés ou par des produits de gène multifonctionnels (MCMULLEN & SIMCOX 1995). La recherche d'une co-localisation des QTL impliqués dans la résistance à l'oïdium avec les QTL responsables de la résistance à *Phytophthora cinnamomi* chez le chêne est prévue (Collaboration avec Robin C.).

Les résultats préliminaires suggèrent une plus grande sensibilité à l'oïdium des descendants interspécifiques chêne pédonculé x chêne sessile relativement aux chênes pédonculés. Le chêne sessile étant moins sensible que le chêne pédonculé, on s'attendrait à ce que les hybrides *Q. robur* x *Q. petraea* soient plus résistants que les descendants du croisement intra-spécifique. Ces résultats demandent donc à être confirmés. DESPREZ-LOUSTAU & BARADAT (1991) par exemple ont démontré une plus grande sensibilité à la rouille courbeuse chez le pin maritime pour les hybrides entre races géographiques que pour chacun des deux parents. Toutefois, cette plus grande sensibilité chez les hybrides a été liée à la croissance et plus précisément à la phénologie. La résistance à l'oïdium du chêne ayant une forte composante ontogénique, une différence entre la phénologie des descendants du croisement inter et intra spécifique pourrait expliquer, comme dans le cas du pin, la sensibilité accrue des hybrides par rapport au chêne pédonculé ; ce qui pourrait être dû à une mal appréciation à l'œil nu du stade le plus sensible chez les plants de chêne. Il serait également important de regarder la résistance du deuxième parent du croisement utilisé à savoir le chêne sessile.

## Références bibliographiques

- AHUJA, M.R., 2001. Recent advances in molecular genetics of forest trees. *Euphytica* 121: 173-195.
- ARNTZ, A. M.; DELPH, L.F., 2001: Pattern and process: evidence for the evolution of photosynthetic traits in natural populations. *Oecologia* 127, 455-467
- AYRES, P.G., 1976: Natural resistance to oak mildew. *Arb. J.* 3, 23–29.
- BARRENECHE, T.; BODÉNÈS, C.; LEXER, C.; TRONTIN, J.F.; FLUCH, S.; STREIFF, R.; PLOMION, C.; ROUSSEL, G.; STEINKELLNER, H.; BURG, K.; FAVRE, J.M.; GLÖSSL, J.; KREMER, A., 1998: A genetic linkage map of *Quercus robur* L. (pedunculate oak) based on RAPD, SCAR, microsatellite, minisatellite, isozyme and 5S rDNA markers. *Theor Appl Genet* 97, 1090–1103.
- BRENDEL, O.; LE THIEC, D.; SCOTTI-SAINTAGNE, C.; BODÉNÈS, C.; KREMER, A.; GUEHL, J.M., 2008: Quantitative trait loci controlling water use efficiency and related traits in *Quercus robur* L. *Tree Genetics & Genomes*. 4 (2), p.263
- BROWN, A.F.; JUVIK, J.A.; PATAKY, J.K., 2001: Quantitative Trait loci in sweet Corn Associated with partial resistance to Stewart's Wilt, Northern Corn Leaf Blight and common Rust. *Phytopathology* 91 (3), 293-300.
- BUTIN, H., 1995: Tree diseases and disorders. Causes, biology and control in forest amenity trees. Oxford University Press, Oxford.
- CALENGE, F.; DUREL, C.E., 2006: Both stable and unstable QTLs for resistance to powdery mildew are detected in apple after four years of field assessments. *Molecular Breeding*, 17 (4), 329-339.
- CASASOLI, M., 2004 : Cartographie génétique comparée chez les fagacées. Thèse de doctorat. Université Bordeaux 1. 266p.
- CHELKOWSKI, J.; TYRKA, M.; SOBKIEWICZ, A., 2003 : Resistance genes in barley (*Hordeum vulgare* L.) and their identification with molecular markers. *J Appl Genet* 44, 291–309
- CHURCHILL, G.A.; DOERGE, R.W., 1994: Empirical threshold values for quantitative trait mapping, *Genetics* 138. 963–971.
- CHELKOWSKI, J.; TYRKA, M.; SOBKIEWICZ, A.; 2003: Resistance genes in barley (*Hordeum vulgare* L.) and their identification with molecular markers. *J. Appl. Genet.* 44(3), 291-309.
- CROUZILLAT, D.; PHILLIPS, W.; FRITZ, P.J.; PÉTIARD, V., 2000: Quantitative trait loci analysis in *Theobroma cacao* using molecular markers. Inheritance of phylogenetic resistance to *Phytophthora palmivora* in two related cacao populations. *Euphytica* 114 (25), 25-36.

DESPREZ-LOUSTAU, M.L., 2002 : L'oïdium des chênes : un parasite commun mais méconnu. Les Cahiers du DSF 1. La Santé des Forêts en 2000-2001, 95-99. Min. Agric. Alim. Pêche Aff. Rur. (DERF), Paris.

DEVEY, M.; CARSON, S.; NOLAN, M.; MATHESON, A.; TE RIINI, C.; HOHEPA, J., 2004: QTL associations for density and diameter in *Pinus radiata* and the potential for marker-aided selection. *Theoretical and Applied Genetics* 108 (3) 516-524.

DOWKIW, A.; BASTIEN, C., 2004: Characterization of two major genetic factors controlling quantitative resistance to *Melampsora larici-populina* leaf rust in hybrid poplars: strain specificity, field expression, combined effects, and relationship with a defeated qualitative resistance gene. *Phytopathology* 94: 1358–1367.

DIRLEWANGER, E.; ISAAC, P.G.; RANADE, S.; BELAJOUZA, M.; COUSIN, R.; DE VIENNE, D., 1994: Restriction fragment length polymorphism analysis of loci associated with disease resistance genes and developmental traits in *Pisum sativum* L. *Theor. Appl. Genet.* 88:17–27

EDWARDS, M.C.; AYRES, P.G., 1981: Cell Death and Cell Wall Papillae in the Resistance of Oak Species to Powdery Mildew Disease. *New Phytologist*, 89. 411- 418.

EDWARDS, M.C.; AYRES, P.G., 1982: Seasonal changes in resistance of quercus petraea (sessile oak) leaves to *Microsphaera alphitoides*. *Trans. Br. mycol. Soc* 78 (3) 596-570.

FLOR, H.H., 1955: Host-parasite interaction in flax rust—Its genetics and other implications. *Phytopathology* 45, 680–685.

FOULONGNE, M.; PASCAL, T.; PFEIFFER, F.; KERVELLA, J., 2003: QTLs for powdery mildew resistance in peach × *Prunus davidiana* crosses: consistency across generations and environments. *MOLECULAR BREEDING* 12 (1), 33-50.

GAILING, O.; LANGENFELD-HEYSER, R.; POLLE, A.; REINER FINKELDEY, R., 2008: Quantitative trait loci affecting stomatal density and growth in a *Quercus robur* progeny: implications for the adaptation to changing environments. *Global Change Biology* 14 (8), 1934 – 1946.

GEIGER, H.H.; HEUN, M., 1989: Genetics of quantitative resistance to fungal diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 27, 317–41.

GERBER, S.; LASCOUX, M.; KREMER, A., 1997: Relation between protein markers and quantitative traits in Maritime Pine (*Pinus pinaster*). *Silvae genetica* 46 (5), 286-291.

GRATTAPAGLIA, D.; SEDEROFF, R., 1994 Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. *Genetics* 137 : 1121-1137.

HEUSER, T.; ZIMMER, W., 2002: Quantitative analysis of phytopathogenic ascomycota on leaves of pedunculate oaks (*Quercus robur* L.) by real-time PCR. *Microbiology letters* 209, 295-299.

HULBERT, S.H.; MICHELMORE, R.W., 1985: Linkage analysis of genes for resistance to downy mildew (*Bremia lactucae*) in lettuce (*Lactuca sativa*). *Theor. Appl. Genet.* 70, 520–528.

- JANSEN, R.C.; STAM, P., 1994: High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping, *Genetics* 136, 1447– 1455.
- JONES, D.A.; THOMAS, C.M.; HAMMOND-KOSACK, K.E.; BALINTKURTI, P.J.; JONES J.D.G., 1994: Isolation of the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging, *Science* 266, 789–793.
- JORGE, V.; DOWKIW, A.; FAIVRE-RAMPANT, P.; BASTIEN, C., 2005: Genetic architecture of qualitative and quantitative *Melampsora larici-populina* leaf rust resistance in hybrid poplar: genetic mapping and QTL detection. *New Phytol.* **167**, 113–127.
- KIRCHERER, S.; BACKES, G.; WALTHER, U.; JAHOR, A., 2000: Localising QTLs for leaf rust resistance and agronomic traits in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor Appl Genet* 100, 881-888.
- LEPOIVRE, P., 2003 : Phytopathologie : bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte. De Boeck Université, Bruxelles.
- LESPINASSE, D.; GRIVET, L.; TROIPOUX, V.; RODIER-GOUD, M.; PINARD, F.; SEGUIN, M., 2000 : Identification of QTLs involved in the resistance to South American leaf blight (*Microcyclus ulei*) in the rubber tree. *Theor Appl Genet* 100, 975-984.
- LIPKA, V.; DITTGEN, J.; BEDNAREK, P.; BHAT, R.A.; STEIN, M.; LANDTAG, J.; BRANDT, W.; SCHEEL, D.; LLORENTE, F.; MOLINA, A.; WIERMER, M.; PARKER, J.; SOMERVILLE, S. C.; SCHULZE-LEFERT, P., 2005: Pre- and post-invasion defenses both contribute to non-host resistance in *Arabidopsis*. *Science* 310, 1180-1183
- MORTON, N.E., 1955: Sequential tests for the detection of linkage. *Am. J. Hum. Genet.* 7: 277- 318.
- MOUGOU A., DUTECH C. & DESPREZ-LOUSTAU M.-L., 2008: New insights into the identity and origin of the causal agent of oak powdery mildew in Europe. *Forest pathology* 38 (4), 275-287.
- MYSORE, K.S.; RYU, C.M., 2004: Nonhost resistance: how much do we know? *Trends Plant Sci* 9, 97–104.
- NEF, L.; PERRIN, R., 1999: Damaging agents in European forest nurseries. Practical handbook. European Communities, Italy.
- NICOT, P.C.; BARDIN, M.; DIK, A.J., 2002: Basic methods for epidemiological studies of powdery mildews: culture and preservation of isolates, production and delivery of inoculum, and disease assessment. *The Powdery Mildews: A Comprehensive Treatise* (eds R.R. Bélanger, R.B. Bushnell).
- NODARI, R.O.; TSAI, S.M.; GILBERTSON, R.L.; GEPTS, P., 1993: Toward an integrated linkage map of common bean. 3. Mapping genetic factors controlling host-bacteria interactions. *Genetics* 134, 341–50.

- NÜRNBERGER, T. ; LIPKA, V., 2005: Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Molecular Plant Pathology* 6, 335-345.
- PLOMION, C. ; DUREL, C.É. ; VERHAEGEN, D., 1996 : Utilisation des marqueurs moléculaires dans les programmes d'amélioration génétique des arbres forestiers : exemple du pin maritime et de l'eucalyptus. *Ann Sci for* 53, 819-848.
- PLOMION, C., YANI, A.; MARPEAU, A., 1996 : Genetic determinism of 3-carene in maritime pine using RAPD markers. *Genome* 39, 1123-1127.
- QI, X.; NICKS, R.E.; STAM, P.; LINDHOUT, P., 1998: Identification of QTLs for partial resistance to leaf rust (*Puccinia hordei*) in barley. *Theor Appl genet* 98, 1205-1215.
- SAINTAGNE, C.; BODÉNÈS, C.; BARRENECHE, T.; POT, D.; PLOMION, C.; KREMER, A.; 2004: Distribution of genomic regions differentiating oak species assessed by QTL detection. *Heredity* 92, 20-30.
- SCOTTI-SAINTAGNE, C.; MARIETTE, S.; PORTH, I.; GOIECOECHEA, P.G.; BARRENECHE, T.; BODÉNÈS, C.; BURG, K.; KREMER, A., 2004: Genome scanning for interspecific differentiation between two closely related oak species (*Quercus robur* L. and *Q. petraea* (Matt.) Liebl.). *Genetics* 168, 1615-1626.
- STANKIEWICZ-KOSYL, M.; PITERA, E.; GAWRONSKI, S. W., 2005: Mapping QTL involved in powdery mildew resistance of the apple clone U 211. *Plant Breeding*, 124 (1), 63-66.
- TAKAMATSU, S.; BRAUN, U.; LIMKAISANG, S.; KOM-UN, S.; SATO, Y.; CUNNINGTON, J.H., 2007: Phylogeny and taxonomy of the oak powdery mildew *Erysiphe alphitoides sensu lato*. *Mycol. Res.* 111, 809–826.
- TANKSLEY, S.D., 1993: Mapping polygenes. *Annu. Rev. Genet.* 27, 205-233.
- TANKSLEY, S.D.; GANAL, M.W.; MARTIN, G.B., 1995: Chromosome landing: a paradigm for map-based gene cloning in plants with large genomes. *Trends Genet.* 11, 63–68.
- TAYLOR, J.T.; FRITZEMEIER, K.H.; HAUSER, I.; KOMBRINK, E.; ROHWER, F., 1990: Structural analysis and activation by fungal infection of a gene encoding a pathogenesis-related protein in potato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 3, 72–77.
- VAN OOIJEN, J.W., 1992: Accuracy of mapping quantitative trait loci in autogamous species. *Theor. Appl. Genet.* 84, 803-811.
- VISSCHER, P.M.; THOMPSON, R.; HALEY, C.S., 1996: Confidence intervals in QTL mapping by bootstrapping. *Genetics* 143: 1013–1020.
- YOUNG, N.D.; DANESH, D.; MENANCIO-HAUTEA, D.; KUMAR, L., 1993: Mapping oligogenic resistance to powdery mildew in mungbean with RFLPs. *Theor. Appl. Genet.* 87, 243–49
- YOUNG, N.D., 1996: QTL mapping and quantitative disease resistance in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34, 479–501.



ZENG, Z.B., 1994: Precise mapping of quantitative trait loci, *Genetics* 136. 1457–1468.

# **Chapitre 5**

## **Discussion générale**

## Chapitre 5 : Discussion générale

Pour qu'un parasite se développe sur un hôte donné, il est nécessaire qu'il y ait (1) rencontre entre le stade infestant du pathogène et des stades sensibles de son hôte puis (2) compatibilité entre eux provoquant ainsi la maladie. La compatibilité dissimule un conflit entre les intérêts de chacun des deux individus en interaction : l'hôte tente de se débarrasser de son parasite en utilisant ses mécanismes de défense et le parasite s'efforce de survivre dans cet environnement. Pratiquement, ce couple « rencontre-compatibilité » peut être représenté par deux filtres, qui permettent de visualiser les forces qui caractérisent l'affrontement entre le parasite et son hôte (COMBES 2001). Les filtres peuvent être définis comme des phénotypes croisés étant donné que le degré d'ouverture des filtres est déterminé par l'expression des gènes et que l'état du filtre dépend à la fois du génotype de l'hôte et du parasite (Figure 5.1).

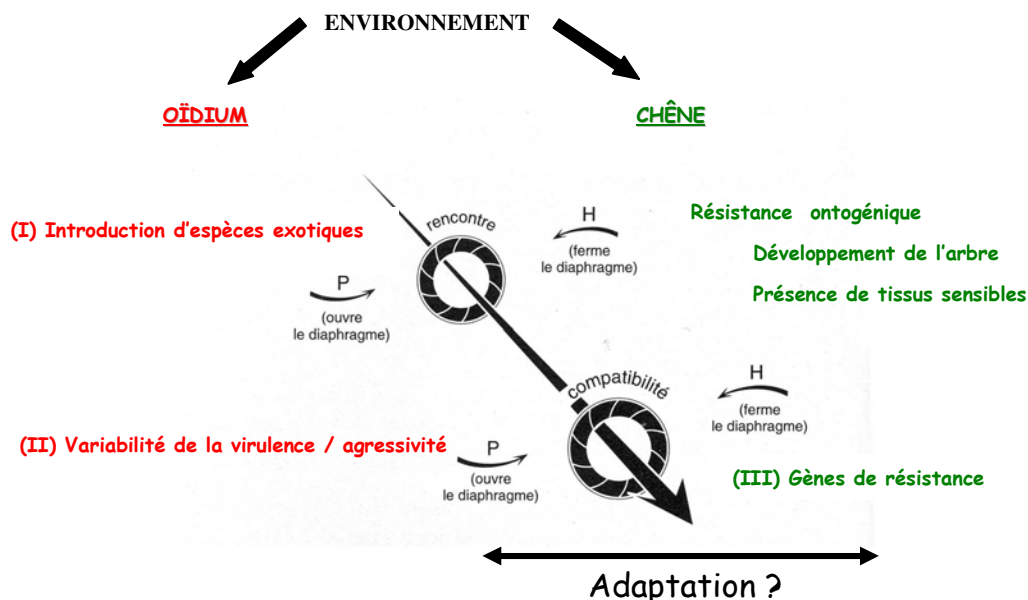


Figure 5.1 : Représentation schématique des filtres de rencontre et de compatibilité entre le chêne et l'oïdium (D'après COMBES 2001)

Ce schéma s'applique bien à l'interaction chêne-oïdium. En effet, l'apparition soudaine de la maladie au début du siècle dernier et la régression rapide de la sévérité des infections suggèrent un changement dans l'ouverture de ces deux filtres au long de la période

de cohabitation des espèces. L'apparition de la maladie a soulevé l'hypothèse d'une « nouvelle rencontre » liée à l'introduction d'espèce(s) exotique(s) pathogènes pour les chênes. La régression des dégâts pourrait montrer quant à elle un changement de résistance au sein des populations de l'hôte ou de la virulence/agressivité au sein des populations du parasite.

L'objectif général de cette thèse était donc de décrire et de comprendre la relation oïdium-chêne en étudiant trois composantes :

- L'identification des agents pathogènes associés à cette maladie
- L'adaptation locale des populations d'oïdium à leurs hôtes;
- La résistance génétique du chêne à l'oïdium et l'identification de QTL impliqués dans cette résistance ;

Après un rappel des principaux résultats obtenus pour chacun des trois axes cités, et des questions qui en découlent, nous exposerons les perspectives générales de recherches qui se dégagent de ce travail.

## **Principaux résultats acquis sur l'interaction oïdium-chêne et nouvelles pistes de recherches**

### **1.1- Etiologie de l'oïdium du chêne et histoire de l'invasion en France**

Avant le début du XX<sup>ème</sup> siècle, l'oïdium avait été observé et mentionné dans plusieurs endroits en Europe avec une faible incidence. Ces taches isolées avaient été attribuées à des infections par plusieurs espèces, en particulier *Phyllactinia corylea*. Les forestiers avaient du mal à croire qu'un champignon déjà présent soit à l'origine de la forte épidémie initiée en 1907, favorisant ainsi l'idée de l'introduction d'une nouvelle espèce ou d'une forme spéciale comme cela a été le cas pour d'autres oïdiums et notamment celui de la vigne (RAYMOND 1927). Puisque cette pathologie était observée sur des chênes en Amérique du nord, l'hypothèse favorisée, à ce moment là, était l'introduction d'une espèce d'Erysiphe d'origine américaine même si les chênes américains sont très peu sensibles voire résistants à l'oïdium européen (BUREAU 1908). Effectivement, GRIFFON & MAUBLANC (1912) ont estimé que l'espèce causant l'épidémie en Europe était différente de toutes les espèces déjà décrites sur chêne en Amérique, sur la base de la morphologie, et ont décrit la nouvelle espèce *Erysiphe alphitoides*. Plusieurs décennies après, l'épidémiologie de l'oïdium du chêne est devenue encore plus complexe suite à la description d'une nouvelle « espèce » : *Erysiphe hypophylla* en Russie, en Norvège puis dans plusieurs pays de l'Europe de l'est et de l'Europe centrale.

Quelques données moléculaires basées sur la diversité de l'ITS de l'oïdium du chêne étaient disponibles au début de notre étude toutefois la question de l'identité des espèces associées à l'oïdium du chêne en Europe n'avait pas été revisitée à l'aide de ces outils. Les principaux travaux concernant la diversité génétique des agents responsables de l'oïdium du chêne, sur la base de l'ADN ribosomal et surtout l'ITS, ont été entrepris par les équipes de TAKAMATSU et de BRAUN (BRAUN & TAKAMATSU 2000; BRAUN *et al.* 2006 ; TAKAMATSU *et al.* 1998 ; TAKAMATSU *et al.* 1999 ; TAKAMATSU 2004 ; TAKAMATSU *et al.* 2006 ; TAKAMATSU *et al.* 2007), dans une perspective de taxonomie et de phylogénie. Ces études moléculaires ont confirmé que le champignon communément associé à l'épidémie d'oïdium en Europe et particulièrement en France au début du siècle dernier est *E. alphitoides*. Toutefois, beaucoup de questions restent posées même après l'utilisation de ces nouvelles techniques. En effet, l'identité d'*E. hypophylla* est restée très discutée et controversée. TAKAMATSU *et al.* (2006) avait montré que des séquences d'ADN obtenues à partir d'échantillons prélevés sur *Paeonia lutea*, étaient identiques aux séquences d' (1) *E.*

*hypophylla* sur *Q. robur*, (2) d'*E. alphitoides* sur *Quercus* spp. et (3) d'*Oidium mangiferae* sur manguier. Ce résultat suggère qu'*E. hypophylla* est conspécifique à *E. alphitoides*, ce qui rejoint les résultats de SPEER (1975) basés sur la morphologie qui considérait que *E. hypophylla* et *E. alphitoides* sont synonymes. D'autres auteurs la considéraient comme espèce distincte d'*E. alphitoides* (ZAHOROVSKA 1988).

Au vu des données déjà existantes, nous nous sommes proposé de réaliser une première identification des agents pathogènes responsables de l'oïdium du chêne sur des échantillons prélevés majoritairement en France. La caractérisation de ces groupes génétiques a posé la question de leurs proportions relatives et de leur distribution en France. On a donc entrepris également une étude de la distribution spatiale des différents taxa à trois échelles spatiales : un échantillonnage régional au niveau de la France, un gradient altitudinal pyrénéen et un échantillonnage au niveau d'une parcelle forestière à Campet.

Le principal résultat de notre étude est la mise en évidence de plusieurs groupes génétiques associés à l'oïdium du chêne en France, sur la base de la diversité de l'ITS et de l'IGS. Les trois premiers groupes génétiques présentent une homologie de séquence respective de 100%, 99.4% et 97.64% avec *E. alphitoides*, *E. hypophylla* et *Phyllactinia* sp., ce qui confirme la présence de ces espèces, déjà décrites en Europe. Un résultat inattendu est celui de la détection d'un quatrième taxon encore jamais décrit en Europe et ayant 100% d'homologie de séquence avec *O. heveae* (98% d'homologie avec *E. alphitoides*). TAKAMATSU *et al.* (2006) ont isolé sur chêne (*Quercus phillyraeoides*) en Asie pratiquement pendant la même période une espèce montrant une parfaite homologie avec l'espèce isolée en France et l'ont décrite comme étant *Erysiphe quercicola*.

L'échantillonnage dans les différentes régions de France a confirmé la présence de ces quatre groupes génétiques et leur implication dans l'oïdium du chêne. En effet, les lésions d'oïdium échantillonnées sont causées dans plus de 80% des cas par *E. alphitoides*, par *E. quercicola* dans ~3 à 20 % (selon les régions échantillonnées). *E. hypophylla* a été également retrouvé lors des échantillonnages régionaux mais avec des proportions n'excédant pas les 10%. Les proportions de *Phyllactinia* sp. détectées restent largement inférieures à celle d'*E. alphitoides*. La divergence entre l'espèce identifiée de *Phyllactinia* et celle existante dans les bases de donnée pose la question de l'espèce qui sévit en Europe.

L'un des objectifs de ce travail était de mieux comprendre l'histoire et l'origine de l'oïdium du chêne en France. L'étude de la distribution spatiale des différents taxa causant cette maladie n'a pas aidé à mieux connaître l'origine de ces champignons et n'a pas permis de mettre en évidence une structuration spatiale des différents groupes génétiques. En effet, l'existence de deux espèces/taxa (*E. alphitoides* et *E. quercicola*) dans toutes les régions de la France ne va pas dans le sens de l'hypothèse d'un seul groupe génétique introduit mais plutôt d'une introduction multiple de plusieurs espèces d'Erysiphe. L'homologie entre les espèces d'Erysiphe isolées en France et celle trouvées en Asie plaide pour une introduction de ces espèces d'oïdium sur des hôtes exotiques.

Cette étude a également permis de suggérer la possibilité de coexistence d'au moins deux taxa/espèces sur un même arbre, une même feuille voire dans une même lésion. Ces résultats posent la problématique de coexistence de deux espèces/taxa dans une même niche écologique et de l'interaction qui peut exister entre elles.

La faible diversité génétique entre les quatre groupes génétiques causant l'oïdium du chêne pose la question des espèces cryptiques. Beaucoup de maladies de plantes avaient été associées à une seule espèce alors que la réalité montre qu'elles sont causées par un complexe de plusieurs espèces cryptiques, avec différentes implications épidémiologiques (KISS *et al.* 2006; BICKFORD *et al.* 2007) et un grand débat existe sur la notion d'espèce et sur les limites de leur définition (HARRINGTON & RIZZO 2002). Les données moléculaires disponibles dans la bibliographie ainsi que nos résultats concernant la diversité génétique de ces champignons restent insuffisants à ce jour pour pouvoir trancher sur la position systématique des taxa identifiés.

La région de l'ITS est connue pour être variable entre les espèces, bien qu'une variabilité intra spécifique limitée soit parfois observée (COHAN 2002). Une étude portant sur toutes les espèces de champignons pour lesquelles des séquences sont actuellement disponibles dans les bases de données a montré que la diversité intra spécifique au sein des champignons pouvait varier de 2.51% dans le règne des champignons à 1.96% pour la classe des Ascomycota, il est de 3.33% pour les *Basidiomycota*; 5.63% pour les *Chytridiomycota*, 7.46% pour les *Glomeromycota*: et 3.24% pour les *Zygomycota* (NILSSON *et al.* 2008). La définition d'un seuil unique de divergence (par exemple la valeur de 3% parfois suggérée) pour définir les espèces s'avère donc impossible (COHAN 2002; IZZO *et al.* 2005). L'ITS est toutefois la région du génome retenue pour les approches de « bar-coding » (TAYLOR *et al.* 2000 ; BRIDGE *et al.* 2005). En complément de ces approches automatisées, une expertise taxonomique reste

de première importance. Au final, l'étude de la diversité génétique sur un seul loci reste donc insuffisante pour pouvoir définir en toute rigueur le rang des champignons identifiés comme responsables de l'oïdium du chêne.

Une parfaite homologie de séquence d'ITS a été observée entre les différents groupes génétiques associés à l'oïdium du chêne et celles d'oïdiums d'arbres tropicaux, ce qui pourrait remettre en question la notion de spécificité des champignons responsables des oïdiums. En effet, *E. alphitoides* et *O. mangiferae* montrent 100% d'homologie de séquence. Une parfaite homologie de séquence d'ITS a été également observée entre *E. quercicola* et *O. heveae* (CUNNINGTON *et al.* 2003; LIMKAISANG *et al.* 2006). Cette homologie de séquence tend à dire que ces deux espèces de champignons sont conspécifiques et que *E. alphitoides* et *E. quercicola* auraient probablement élargi leurs spectres d'hôte respectivement de *Mangifera indica* à *Quercus* et de l'Hévéa à *Quercus*. *E. hypophylla* avait déjà été décrit sur des hôtes différents avec la même séquence d'ITS. *E. hypophylla* aurait donc probablement élargi son spectre d'hôte de *Quercus* à *Paeonia* (TAKAMATSU *et al.* 2006 ; HENRICOT & COOK 2007). Différentes espèces ont été décrites sous un nom différent, car isolées sur des hôtes différents, sur des plantes hôtes appartenant à des familles végétales éloignées et situées dans des régions géographiques distantes et montrant des ITS semblables pourraient donc être synonymes. Des auteurs stipulent qu'en absence de phase sexuée, un champignon qui se reproduit exclusivement par voie asexuée ne peut former une espèce distincte à part entière (PERKINS 1991). Or, on n'a pas jusqu'à nos jours identifié de chasmothèces d'*E. quercicola* en Europe ou des oïdiums sur arbres tropicaux ce qui plaideraient pour une espèce unique groupant *E. quercicola* et *O. heveae*. D'autre part, on a pu retrouver plusieurs espèces/taxa sur différentes espèces de chêne. Tous ces résultats confortent l'hypothèse d'un saut d'hôte émise suite à l'homologie de séquence d'ITS entre les échantillons prélevés sur manguier, pivoine et chêne ou encore entre chêne et hévéa (TAKAMATSU *et al.* 2006).

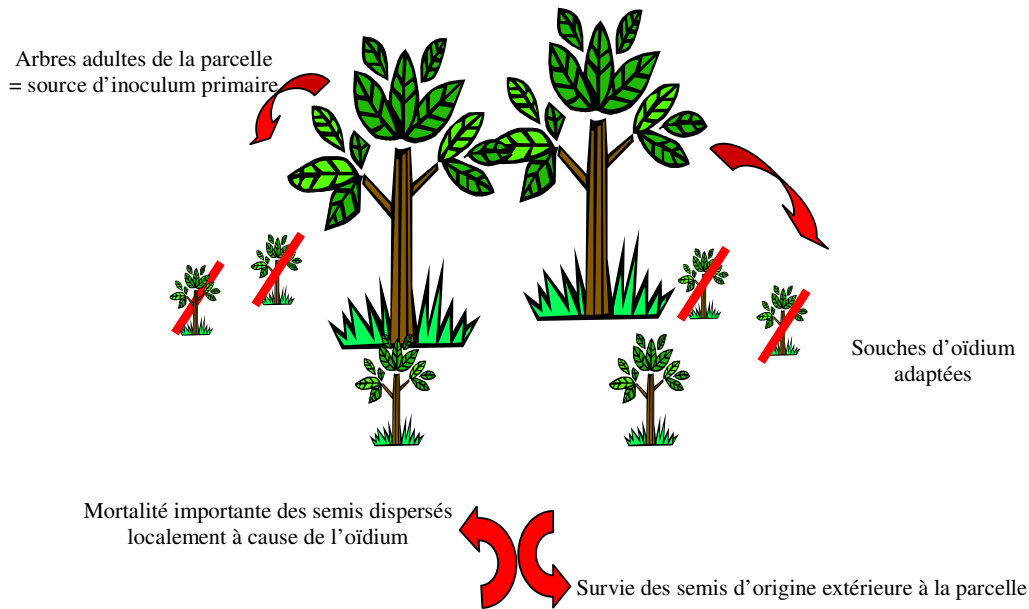


## 1.2- Adaptation locale des populations d'oïdium

De nombreuses études ont été réalisées sur la coévolution/co-adaptation hôte-parasite. La plupart des études ont été réalisées au niveau de la population (KOSELA *et al.* 2000; KALTZ & SHYKOFF 2002; ZHAN *et al.* 2002; MONTARRY *et al.* 2006; NIEMI *et al.* 2006) ou au niveau de la méta- population (DELMOTTE *et al.* 1999 ; GANDON & MICHALAKIS 2002). Ces travaux ont montré que le parasite est généralement plus performant sur son hôte d'origine que sur un hôte issu d'une population distante (KALTZ & SHYKOFF 1998 ; DYBBDAHL & STORFER 2003 et KAWECKI & EBERT 2004). Récemment, quelques études ont confirmé l'existence de l'adaptation locale à l'échelle micro-géographique ou à l'échelle du génotype (MOPPER *et al.* 2000; CAPELLE & NEEMA 2005 ; SALVAUDON *et al.* 2005).

Dans un contexte différent, d'écologie des communautés, JANZEN (1970) et CONNELL (1971) ont développé l'hypothèse (dite de JANZEN-CONNELL JC) qui stipule que les prédateurs et pathogènes jouent un rôle majeur dans le maintien de la diversité des communautés, initialement dans les forêts tropicales. Le mécanisme proposé est représenté par une mortalité différentielle des graines et semis entre espèces, liée à des effets de densité et de distance à l'arbre-mère. Ce mécanisme suppose que les parasites s'adaptent à leurs plantes hôtes et permettent ainsi la réduction de la densité des descendances sous leurs arbres mères (Figure 5.2) et le développement des descendances éloignées. Plusieurs études réalisées dans différents systèmes forestiers ont vérifié l'hypothèse de JC, en soulignant l'importance de ce phénomène dans la mise en place de la dynamique et de la structure de la population des plantes hôtes (GONZALEZ MARTINEZ *et al.* 2006).

La forte variabilité génétique spatiale des peuplements de chênes décrite par STREIFF *et al.* (1999) pourrait suggérer les mêmes mécanismes que ceux proposés par JANZEN et CONNELL, à un niveau infra-spécifique (C DUTECH, communication personnelle). Nous nous sommes donc proposé de tester l'hypothèse de J-C pour le couple oïdium-chêne dans un dispositif installé dans la forêt de Campet. Si l'adaptation locale transgénérationnelle pour l'oïdium du chêne est vérifiée i.e une meilleure performance des souches locales d'oïdium sur les descendances d'un génotype de chêne relativement à celles d'un génotype éloigné, l'hypothèse d'un effet sélectif différentiel causé par l'oïdium sur les semis de chêne serait confortée.



**Figure 5.2 : Pression des parasites locaux et mortalité des semis de chêne**

Nos résultats obtenus par inoculations contrôlées suggèrent effectivement une adaptation transgénérationnelle de l'oïdium au chêne. Un polymorphisme phénotypique pour la résistance du chêne et l'agressivité de l'oïdium a été identifié dans les populations naturelles en comparant la réaction des génotypes de chêne suite à l'infection par différentes souches d'oïdium. Notre étude a pu mettre en évidence une adaptation des souches d'oïdium à l'hôte local. En effet, les quatre souches d'oïdium utilisées dans ce travail ont montré de plus importantes probabilités d'infection et des croissances mycéliennes plus élevées sur les descendances de leurs arbres mères que sur celles d'arbres éloignés. Cette adaptation locale a aussi été décrite depuis notre étude pour le chêne et l'oïdium au niveau de l'arbre, dans d'autres conditions d'environnement dans le sud de la Finlande (ROSLIN *et al.* 2007). ROSLIN *et al.* (2007) avait également montré que les probabilités d'infection d'*E. alphitoides* étaient plus élevées sur les arbres d'origine, toutefois ces probabilités d'infection étaient peu importantes quelque soit l'origine de l'inoculum. La meilleure agressivité des souches locales pourrait être attribuable, selon ROSLIN (2007) à une mal adaptation des souches éloignées aux changements saisonniers dans la structure et la composition chimique de la feuille et à tout caractère génétique ou phénotypique de l'arbre hôte empêchant la mise en place de l'adaptation locale des parasites locaux. Nos résultats ont montré, sur le même nombre de génotypes d'hôtes, l'existence de cette même adaptation locale au niveau de la descendance des arbres mères aussi bien pour *E. alphitoides* que pour *E. quercicola*.

L'existence d'une adaptation locale des chênes et de leurs descendances à leurs parasites implique que la virulence / agressivité du parasite en réponse à la résistance de l'arbre-mère est également efficace quand le parasite se trouve face à la descendance de l'arbre, suggérant à la fois l'adaptation du parasite à son arbre-mère et l'héritabilité des caractères de résistance.

Toutefois, on n'a pas pu mettre en évidence une meilleure sporulation des souches d'oïdium sur descendances de leurs arbres d'origine relativement à celles d'autres arbres. Ceci pourrait être expliqué par le fort trade-off qui existe entre les fonctions de croissance végétative et de reproduction pour l'oïdium (BUTT & JEGER 1986). La multitude des facteurs influençant la coévolution hôte-parasite pourrait aussi expliquer que les études de la coévolution n'ont pas toujours réussi à démontrer les résultats attendus concernant l'adaptation du parasite à son hôte et à démontrer la mise en place d'une adaptation locale pour tous les couples hôte-parasite étudiés (LITTLE 2002, LAJEUNESSE & FORBES 2002).

### 1.3- Résistance du chêne à l'oïdium

Malgré la présence commune de la maladie dans les chênaies européennes, la résistance des chênes à l'oïdium a été très peu étudiée, en dehors d'observations en conditions naturelles, portant surtout sur des différences au niveau spécifique. Ces différences spécifiques de résistance à l'oïdium ont été associées à l'efficacité variable de différents mécanismes impliquant la mort cellulaire et la formation de papilles (EDWARDS & AYRES 1981). Le déterminisme génétique de la résistance des chênes à l'oïdium n'a pas encore été décrit.

Dans l'optique d'étudier la résistance génétique du chêne à l'oïdium, le premier apport de notre étude était d'ordre méthodologique. En effet, nous avons développé une méthode d'inoculation en conditions contrôlées permettant d'avoir une estimation quantitative du résultat de l'interaction chêne-oïdium. Lors de nos expérimentations, nous avons identifié plusieurs facteurs critiques pouvant conduire à un échec de développement des lésions suite aux inoculations, en particulier l'état physiologique du matériel inoculé, ou la présence d'eau (Annexe).

D'autre part, le succès des inoculations *in vitro* semblait être dépendant de la concentration de l'inoculum. La quantification de l'inoculum est un facteur crucial pour les études épidémiologiques et génétiques basées sur l'évaluation quantitative de la maladie. En effet, une forte dose de l'inoculum peut masquer la résistance de quelques génotypes (NICOT *et al.* 2003) et empêcher la détection de la sensibilité différentielle à l'oïdium. Par contre, une faible concentration peut être insuffisante pour l'initiation de l'infection.

Le résultat majeur de l'étude est la mise en évidence, à la fois par des inoculations contrôlées et des notations en conditions naturelles, d'une variabilité de la résistance infra-spécifique chez le chêne vis-à-vis de l'oïdium et de son déterminisme génétique. En effet, les descendants d'un croisement intra-spécifique de chêne pédonculé ont montré une sensibilité différentielle envers l'oïdium. Sur certains génotypes, une absence de développement de lésions d'oïdium en présence d'inoculum a été notée dans certaines conditions, mais on n'a pas pu démontrer l'implication d'une relation gène pour gène dans la résistance du chêne à l'oïdium.

La recherche de QTL a permis d'identifier 18 loci associés à la résistance à l'oïdium du chêne dont sept localisés sur LG3m, LG8m et LG10m et associés à la fois aux variables d'inoculations contrôlées et d'infections naturelles, et 11 associés à une seule variable (3 variables d'inoculation et 8 variables de sensibilité en conditions naturelles).

L'étude de la co-localisation des principaux QTL détectés a montré que quelques-uns de ces QTL co-localisaient avec des QTL régissant d'autres caractères physiologiques (SCOTTI-SANTAIGNE *et al.* 2004). En effet, on a noté que des loci contrôlant le débourrement ou le nombre de pousses co-localisaient sur le groupe de liaison LG10m, avec un locus régissant la résistance à l'oïdium. Le QTL localisé sur le groupe de liaison LG10m explique une partie importante de la variance phénotypique de la réaction à l'infection atteignant 61.5% pour une des variables d'inoculations contrôlées (inoc2-06). Ce QTL se retrouve pour plusieurs variables et explique la plus grande part du succès/échec des inoculations et de la variabilité dans le développement des lésions d'oïdium. EDWARDS & AYRES (1982) avait montré par une étude phénotypique que la résistance du chêne à l'oïdium est ontogénique. Nos résultats contribuent à expliquer cette sensibilité différentielle à l'oïdium en conditions naturelles. LIM (1973) et MOLOT *et al.* (1990) avaient aussi lié le succès d'infection et la sporulation chez les oïdiums avec l'âge de l'organe de la plante inoculée.

Cette étude a également montré que les descendants du croisement inter-spécifique chêne sessile\*chêne pédonculé étaient plus sensibles et présentaient de plus grandes probabilités d'infections et des croissances mycéliennes radiales plus élevées, par rapport au croisement intra spécifique. Ces résultats préliminaires devraient être confirmés. Une éventuelle corrélation avec la phénologie ou la vigueur des hybrides pourra être étudiée, comme démontré pour la résistance des hybrides chez le pin maritime à la rouille courbeuse (DESPREZ-LOUSTAU & BARADAT 1991).

La variabilité moléculaire des gènes de résistance de l'hôte et de la virulence du parasite ainsi que les interactions entre ces gènes sont à la base de la coévolution entre populations hôtes et populations parasites (SEGER 1992 ; STASKAWICZ *et al.* 1995 ; DE WIT 1997 ; BERGELSON *et al.* 2001). Il est donc important d'approfondir les études sur l'identité des parasites impliqués dans cette maladie et la résistance du chêne pour chacun d'entre eux afin de confirmer l'effet de l'oïdium sur la structure spatiale des populations de chênes.

## 2- Perspectives de recherche

Nos résultats ont permis de répondre à quelques questions concernant l'interaction chêne-oïdium mais beaucoup restent encore posées. Un résultat majeur et inattendu est la détection, en France, avec des fréquences relativement importantes (~20%) d'un groupe de souches présentant 100% d'homologie avec l'ITS d'*Oidium heveae* et avec l'ITS d'une espèce ultérieurement décrite en Asie sous le nom d'*E. quercicola*. Cette nouveauté dans l'étiologie de l'oïdium a donné lieu à plusieurs nouvelles interrogations et doit être intégrée dans l'ensemble du questionnement sur l'interaction chêne-oïdium.

La présence formelle d'*E. quercicola* reste toutefois à démontrer. En effet, seule la forme asexuée du champignon a été retrouvée jusqu'alors en France. L'utilisation de la région de l'ITS uniquement rend cette identification préliminaire insuffisante pour pouvoir affirmer l'identité du taxon. L'utilisation d'autres gènes que l'ITS pour l'étude de la phylogénie de ces groupes génétiques est donc d'une importance majeure, notamment pour *E. quercicola*. L'utilisation de gènes tels que l'histone ou la  $\beta$ -tubuline permettra aussi d'étudier la phylogénie d'*E. alphitoides* et *E. hypophylla* pour trancher quant à leur conspécificité. Des amorces sont disponibles pour l'amplification de ces régions chez les ascomycètes. Ces régions amplifiées peuvent être utiles dans l'étude de la phylogénie des genres et des espèces. Le niveau de polymorphisme observé dans ces gènes est semblable à celle de la région de l'ITS et il est peu probable que différentes espèces de champignons aient des séquences identiques pour toutes les régions identifiées (GLASS & DONALDSON 1995).

D'autre part, l'espèce de *Phyllactinia* identifiée ne présente que 97% d'homologie avec *Ph. guttata*, il serait donc nécessaire d'approfondir les données moléculaires également pour ce groupe génétique pour pouvoir déterminer l'espèce en question.

Il est également important de regarder de plus près les caractéristiques morphologiques, épidémiologiques et biologiques des différentes espèces/taxa que nous avons détectées pour vérifier l'existence d'une relation entre la phylogénie des quatre groupes génétiques et les caractéristiques adaptatives différentes liées à ces particularités biologiques (HARRINGTON & RIZZO 1999).

L'implication de l'hyperparasite *A. quisqualis* dans la diversité des agents pathogènes associés à l'oïdium serait également une piste de recherche intéressante. En effet, l'hyperparasite des champignons responsables de l'oïdium était souvent considéré comme appartenant à une seule espèce *Ampelomyces quisqualis*. Toutefois, les analyses par RFLP de l'ITS dans une collection d'isolats d'*Ampelomyces* ont montré l'existence de sept groupes

(KISS 1997). Les résultats indiquaient que *A. quisqualis* devrait être considéré comme un complexe d'espèces. La répartition géographique des souches génétiquement distinctes a montré que des isolats appartenant au même groupe étaient présents dans des régions géographiques très distantes et que d'autres isolats représentant des groupes RFLP différents ont été trouvés dans la même région géographique, dans les mêmes espèces d'*Erysiphaceae* et sur les mêmes plantes hôtes (KISS 1997). Une étude de la diversité de l'hyperparasite en France, en premier lieu, pourrait confirmer la présence/absence de spécificité des associations souches de *A. quisqualis* et taxa/espèces impliqués dans l'oïdium du chêne. *E. alphitoides* et *E. quercicola* étant les deux espèces majoritaires en France, il serait d'une importance particulière de regarder la spécificité éventuelle de l'hyperparasite pour ces deux taxa.

Les plantes hôtes se sont souvent adaptées à leurs agents pathogènes dans un processus évolutif portant sur plusieurs générations ; ce qui les rend dans la plupart des cas incapables de réagir à l'arrivée soudaine de nouveaux pathogènes. Ainsi l'hypothèse émise pour expliquer l'épidémie d'oïdium du début du siècle dernier a été l'introduction d'une nouvelle espèce de champignon (BUREAU 1908). L'étude des agents pathogènes identifiés a pu fournir des indices sur la question de l'origine de la maladie mais n'a pas pu y répondre catégoriquement. En effet, notre étude n'a pas pu trancher quant à l'identité des agents pathogènes et a soulevé la question de la diversité fongique dissimulée derrière des caractéristiques morphologiques et pathogéniques semblables. L'hypothèse de l'introduction multiple de plusieurs espèces d'Erysiphe peut alors être suggérée. Cette introduction pourrait être d'origine tropicale (probablement d'Asie) sur des plantes hôtes exotiques, dans une ou plusieurs entrées, par exemple par les premiers explorateurs européens comme l'a suggéré par RAYMOND (1927) ou plus récemment avec l'importation de plantes ornementales telles que *Q. phillyraeoides* puisqu'une homologie parfaite a été trouvée entre *E. alphitoides* isolée sur chêne pédonculé en France et une espèce d'Erysiphe isolée sur cette espèce de *Quercus*.

L'intégration des données moléculaires et l'étude de la diversité infra spécifique au niveau d'une série de gènes pour des isolats américains et asiatiques pourraient aider à confirmer notre hypothèse et à mieux expliquer l'origine de la maladie et l'invasion en Europe. L'utilisation des herbiers comme source d'informations antérieures pourrait également nous aider à comprendre l'histoire de la maladie en Europe et en France. L'utilisation des herbiers permettra aussi de regarder les proportions relatives de ces champignons à travers le temps et à vérifier si la situation actuelle représente l'état d'équilibre pour la maladie en Europe et

particulièrement en France. Il est également important de regarder de plus près les caractéristiques épidémiologiques de ces quatre groupes génétiques, comme la virulence/agressivité envers les différentes espèces de chêne et voir si la spécificité des différents groupes génétiques d'oïdium peut jouer un rôle dans le maintien des quatre taxa.

Les trois sommets du triangle épidémique illustrent les variables épidémiologiques, à savoir l'agent, l'hôte et l'environnement, conditionnant l'expression d'une maladie (Figure 5.3). Le triangle épidémique va au-delà de la notion de causalité entre un agent et une pathologie observée, en soulignant l'importance des interactions avec l'environnement, notamment en considérant les conditions favorables au développement des différentes espèces de champignons responsables de la maladie en question. Dans notre travail, nous nous sommes intéressés principalement au parasite et à l'hôte. Il serait intéressant d'évaluer aussi l'importance de l'environnement dans l'interaction chêne-oïdium par une détermination expérimentale des conditions optimales au développement de chacun des quatre taxa/espèces qui pourraient influencer le succès de l'infection.

L'hivernation est un des caractères biologiques dépendants de l'environnement. L'analyse de plusieurs types de données épidémiologiques suggère en effet que les infections primaires d'oïdium sur chênes au printemps sont déterminantes dans le développement ultérieur des épidémies. Ces infections primaires sont elles mêmes dépendantes de l'hivernation du champignon sous la forme mycélienne (dans les bourgeons) ou dans les cléistothèces et de la présence d'organes sensibles chez l'hôte. Cette synchronisation phénologique correspond au "filtre de rencontre" dans le schéma de COMBES (2001) précédant le "filtre de compatibilité", le passage de ces deux filtres étant une condition nécessaire à l'expression de la relation hôte-parasite. Les différents modes de survie du champignon pourraient également être un caractère important pour la différenciation des taxa. Cet aspect temporel dans les études épidémiologiques pourrait aussi servir à identifier la proportion relative des taxa/espèces durant le cycle biologique de l'oïdium et vérifier l'hypothèse d'une succession temporelle qui serait à l'origine de la coexistence des différents taxa/espèces.

L'adaptation locale de l'oïdium pourra aussi être dépendante du facteur environnement par son action sur la date d'émission des ascospores après hivernation. Pour cela, il faudrait caractériser la période de cette production pour diverses souches d'oïdium appartenant aux différentes groupes génétiques, en particulier *E. alphitoides* et *E. quercicola*, et étudier l'adaptation locale éventuelle de ces souches au climat et à la phénologie de différents génotypes d'hôtes.





**Figure 5.3 : Représentation schématique du triangle épidémiologique (Cas de l'oïdium du chêne)**

L'implication de plusieurs groupes génétiques dans la maladie pourrait influencer la nature de la coévolution dans l'interaction hôte-parasite. Les premiers résultats concernant l'adaptation locale ont montré une meilleure performance des souches d'oïdium sur les descendants de leurs arbres d'origine. Toutefois, on a remarqué que la souche *E. quercicola* semblait se comporter différemment d'*E. alphitoides*. En effet, la croissance mycélienne d'*E. alphitoides* est plus élevée que celle d'*E. quercicola*. D'autre part, seule la souche d'*E. quercicola* montre une croissance mycélienne plus élevée sur les descendants de son arbre mère puisque cette croissance n'est plus élevée qu'en moyenne pour les trois souches d'*E. alphitoides*. Il est donc important d'inclure dans des études futures, plus de souches des différents agents responsables de l'oïdium du chêne pour comparer leurs pathogénicités et leurs capacités respectives à s'adapter à l'hôte.

La spécialisation parasitaire des deux groupes génétiques majoritaires à savoir *E. alphitoides* et *E. quercicola* pourra aussi être étudiée au niveau de la gamme d'hôtes, en comparant la performance *in vitro* de souches isolées de différentes espèces-hôtes sur leur hôte d'origine par rapport à d'autres hôtes. Le bois de Briouant (Landes), où quatre espèces de chênes sont présentes, déjà utilisé par l'équipe de génétique afin d'étudier le rôle de l'hybridation dans l'évolution du complexe d'espèces des chênes blancs européen lors des travaux de thèse d'Olivier Lepais (LEPAIS 2008), pourrait constituer un bon cadre d'étude.

L'étude des bases génétiques de la résistance infra-spécifique du chêne à l'oïdium a montré la présence de QTL associés à cette résistance. Quelques QTL identifiés dans cette étude ont été détectés uniquement pour une des deux années ou pour une des deux

expérimentations (infections naturelles ou inoculations *in vitro*). Ceci pourrait être dû à une expression limitée de quelques QTL ou encore à des erreurs expérimentales. Il serait donc intéressant de confirmer l'implication de ces QTL dans la résistance à l'oïdium par d'autres répétitions pour l'une ou l'autre des conditions d'expérimentation.

D'autre part, dans notre étude, les essais d'inoculation *in vitro* pour la recherche de QTL ont été réalisés avec une souche d'*E. alphitoides*. Il est donc important, vu la présence relativement importante dans les chênaies françaises d'*E. quercicola*, de regarder la résistance du chêne spécifiquement à ce taxon et aux autres taxa/espèces d'oïdium pour pouvoir comparer le comportement de l'hôte vis-à-vis de l'infection par les différents groupes génétiques.

Une autre approche pour étudier la résistance serait la méthode de gène candidat qui consiste à supposer à l'implication d'un gène connu pour son rôle dans la résistance à l'oïdium chez d'autres plantes hôtes dans la résistance. Le projet de recherche « Realltime » qui vient de commencer se base sur cette approche pour identifier des gènes de résistance pour l'oïdium du chêne. L'étude s'appuie sur un dispositif expérimental de terrain où les données phénotypiques et génotypiques seront collectées. Cette étude portera sur deux populations de chênes présentant des taux d'apparement différents. La co-localisation des gènes candidats avec des QTL de résistance sera étudiée.

On a pu, dans ce travail, voir une résistance moins élevée à l'oïdium chez les chênes hybrides. Il est donc important de confirmer ces résultats préliminaires par une étude plus approfondie de la résistance chez le chêne sessile, et éventuellement d'autres espèces de chênes.

A l'issue de ce travail, l'étude qui nous semble la plus importante et la plus urgente à faire reste la détermination de l'identité des taxa identifiés comme responsables de l'oïdium du chêne, en particulier la confirmation d'*Erysiphe quercicola* en Europe. La délimitation des espèces est un préalable indispensable à toute étude épidémiologique ou de la coévolution oïdium-chêne.

## Références bibliographiques

ADLER, F.R.; MULLER-LANDAU, H.C., 2005: When do localized natural enemies increase species richness? *Ecology Letters* 8, 438–447.

AHUJA, M.R., 2001. Recent advances in molecular genetics of forest trees. *Euphytica* 121: 173-195.

AL-NAIMI F.A.; GARETT K.A; BOCKUS W.W, 2005: Competition, facilitation, and niche differentiation in two foliar pathogens. *Oecologia* 143, 449–457.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J., 1997: Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389–3402.

AMRANI L.; CORIO-COSTET M.-F., 2006: A single nucleotide polymorphism in the  $\beta$ -tubulin gene distinguishing two genotypes of *Erysiphe necator* expressing different symptoms on grapevine. *Plant pathology*. vol. 55, (4) , 505-512.

ANDRIVON, D., 1993: Nomenclature for pathogenicity and virulence: the need for precision. *Phytopathology* 83, 889-890

ARNAUD, G. ; FOEX, E., 1912a : Sur la forme parfaite de l'Oïdium du chêne. *Comptes rendus Académie des Sciences*. 1912. Tome 154 : 124.

ARNAUD, G. ; FOEX, E., 1912b : Sur l'Oïdium des chênes (*Microsphaera quercina*). *Comptes rendus Académie des Sciences*. 1912. Tome 154, 1302-1305.

ARNTZ, A. M.; DELPH L. F., 2001: Pattern and process: evidence for the evolution of photosynthetic traits in natural populations. *Oecologia* 127, 455-467

AUGSPURGER C., 1983: Seed dispersal of the tropical tree, *Platypodium elegans*, and the escape of its seedlings from fungal pathogens. *J Ecol* 71, 759–771

AYLOR D.E., 1990: The Role of intermittent wind in the dispersal of fungal pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 28, 73-92.

AYRES, P.G., 1976: Natural resistance to oak mildew. *Arboriculture J.* 3, 23-29.

BAKER, B.; ZAMBRYSKI, P.; STASKAWICZ, B.; DINESHKUMAR, S.P, 1997: Signalling in plant microbe interactions. *Science*. 276, 726-733.

BARRENECHE, T.; BODÉNÈS, C.; LEXER, C.; TRONTIN, J.F.; FLUCH, S.; STREIFF, R.; PLOMION, C.; ROUSSEL, G.; STEINKELLNER, H.; BURG, K.; FAVRE, J.M.; GLÖSSL, J.; KREMER, A., 1998: A genetic linkage map of *Quercus robur* L. (pedunculate oak) based on RAPD, SCAR, microsatellite, minisatellite, isozyme and 5S rDNA markers. *Theor Appl Genet* 97, 1090–1103.

BARTELS, J.M; BARKER, K.R.; PEDERSON, A.G.; WINDHAM, L.G., 1998: Plant nematode interactions, Madison.

- BARY-LENGER, A.; NEBOUT J.P., 1993: Le Chêne, Editions du Perron, p. 181.
- BENBOUZA, H.; JACQUEMIN, J.M.; BAUDOIN, J.P.; MERGEAI, G., 2006: Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 10 (2), 77 – 81
- BERGELSON, J.; KREITMAN, M.; STAHL, E.; TIAN, D., 2001: Evolutionary dynamics of plant R-genes. *Science* 292, 2281–2285.
- BICKFORD, D.; LOHMAN, D.J.; NAVJOT, S.S.; NG P.K.L.; MEIER, R.; WINKER, K.; KRISTA, K.I.; DAS, I., 2007 : Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends ecol evol* 22 (3), 148-155.
- BLACK, W.; MASTENBROEK, C.; MILLS, W. R.; PETERSON, L.C., 1953: A proposal for an international nomenclature of races of *Phytophthora infestans* and of genes controlling immunity in *Solanum demissum* derivatives. *Euphytica* 2, 173–240.
- BLAXTER, M.; FLOYD, R. 2003: Molecular taxonomics for biodiversity surveys: already a reality. *Trends Ecol. Evol.* 18, 268-269.
- BOESEWINKEL, H.J., 1980: The identity of mango mildew, *Oidium mangiferae*. *Phytopathologische Zeitschrift.* 99(2), 126-130.
- BOUDIER, E., 1908 : Le blanc du chêne et l'*Erysiphe Quercus* Mérat. *Comptes rendus Académie des Sciences.* Tome 147, 461-462.
- BRASIER, C. M., 1997: Fungal species in practice: identifying species units in fungi, in *Species: the units of biodiversity*, (eds., M. F. Claridge, H. A. Dawah, and M. R. Wilson), Chapman and Hall, London. pp. 135-70.
- BRAUN, U., 1995: The powdery mildews (Erysiphales) of Europe. Gustav Fisher Verlag.
- BRAUN, U.; COOK, R.T.A.; INMAN, A.J.; SHIN, H.D, 2002: The taxonomy of powdery mildew fungi. See Ref. 10, pp. 13–55 IN Bélanger RR, Bushnell WR, Dik AJ, Carver TLW, eds. 2002. *The Powdery Mildews: A Comprehensive Treatise.* APS Press. 292 pp.
- BRAUN, U.; TAKAMATSU, S. 2000: Phylogeny of *Erysiphe*, *Microsphaera*, *Uncinula* (Erysipheae) and *Cystotheca*, *Podosphaera*, *Sphaerotheca* (Cystothecaceae) inferred from rDNA ITS sequences - some taxonomic consequences. *Schlechtendalia* 4, 1-33.
- BRAUN, U.; TAKAMATSU, S.; HELUTA, V.; LIMKAIKANG, S.; DIVARANGKON, R.; COOK, R.; BOYLE, H. 2006: Phylogeny and taxonomy of powdery mildew fungi of *Erysiphe* sect. *Uncinula* on *Carpinus* species. *Mycological Progress* 5 (3), 139-153.
- BRENDEL, O.; LE THIEC, D.; SCOTTI-SAINTAGNE, C.; BODÉNÈS, C.; KREMER, A.; GUEHL, J.M., 2008: Quantitative trait loci controlling water use efficiency and related traits in *Quercus robur* L. *Tree Genetics & Genomes.* 4 (2), p.263
- BRIDGE P.D., SPOONER B.M. AND ROBERTS P.J., 2005. The impact of molecular data in fungal systematics. *Adv. Bot. Res.* 42: 34-67.

- BROSE, U., 2008: Complex food webs prevent competitive exclusion among producer species. *Proc Biol Sci.* 7; 275(1650):2507-14.
- BROWN, A.F; JUVIK, J.A.; PATAKY, J.K., 2001: Quantitative Trait loci in sweet Corn Associated with partial resistance to Stewart's Wilt, Northern Corn Leaf Blight and common Rust. *Phytopathology* vol 91 (3) 293-300.
- BRUNET, J.; MUNDT, C., 2000: Disease, frequency-dependent selection, and genetic polymorphism: experiments with stripe rust and wheat. *Evolution* 54, 406–415.
- BRUNS T.D., 2001. ITS Reality. *Inoculum* 52: 2.
- BURCHILL, R.T., 1978: Powdery mildews of Tree Crops. In *The powdery mildews*. ED. D.M. Spencer: Academic Press. pp. 473-493.
- BURDON, J., 1987: *Diseases and Plant Population Biology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- BURDON, J.J.; THRALL, P.H., 1999: Spatial and temporal patterns in coevolving plant and pathogen associations. *American Naturalist*, 153, S15–S33.
- BUREAU, E., 1908 : Effets de l'Oïdium quercinum sur différentes espèces de chênes. *Comptes rendus Académie des Sciences*. Tome 147, 571-574.
- BURKEY T.V., 1994: Tropical tree species diversity: a test of the Janzen-Connell model. *Oecologia*. 97, 533-540
- BUTIN H., 1989: *Krankheiten der Wald- und Parkbäume*, 2nd edn. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- BUTIN, H. 1995: *Tree diseases and disorders. Causes, biology and control in forest amenity trees*. Oxford University Press, Oxford.
- BUTT, D.J.; JEGER, M. J., 1986: Components of spore production in apple powdery mildew (*Podosphaera leucotricha*) *Plant Pathology* 35 (4) , 491–497.
- CALENGE, F.; DUREL, C.E., 2006: Both stable and unstable QTLs for resistance to powdery mildew are detected in apple after four years of field assessments. *Molecular Breeding*, 17 (4), 329-339.
- CAPELLE, J.; NEEMA, C., 2005: Local adaptation and population structure at a micro-geographical scale of a fungal parasite on its host plant. *J. Evol. Biol.* 18, 1445–1454
- CARBONE, I.; KOHN, L.M., 1999: A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91, 553-556.
- CARIUS, H.J.; LITTLE, T.J.; EBERT, D., 2001: Genetic variation in a host-parasite association: Potential for coevolution and frequency-dependent selection. *Evolution*, 55, 1136–1145.
- CASASOLI, M., 2004 : *Cartographie génétique comparée chez les fagacées*. Thèse de doctorat. Université Bordeaux 1. 266p.

- CATTADORI, I.M. ; HAYDON, D.T. ; HUDSON, P.J., 2005 : Parasites and climate synchronize red grouse populations. *Nature* 433, 737–741
- CHELKOWSKI, J.; TYRKA, M.; SOBKIEWICZ, A., 2003: Resistance genes in barley (*Hordeum vulgare* L.) and their identification with molecular markers. *J. Appl. Genet.* 44(3), 291-309.
- CHEVAUGEON, J., 1957 : Mode d'action des champignons parasites. *Bulletin de la Société Botanique de France.* 104 (1-2), p. 56-101.
- CHURCHILL, G.A.; DOERGE R.W., 1994: Empirical threshold values for quantitative trait mapping, *Genetics* 138, 963–971.
- CINOTTI, B., 1996 : Évolution des surfaces boisées en France : proposition de reconstitution depuis le début du XIX<sup>e</sup> siècle, *Revue forestière française*, Vol. XLVIII (6), p. 547-562.
- CINTRA, R.; HORNA, V., 1997: Seed and seedling survival of the palm *Astrocaryum murumuru* and the legume tree *Dipteryx micrantha* in gaps in Amazonian forest. *Journal of Tropical Ecology* 13, 257-277.
- COCHARD, H.; BRÉDA, N.; GRANIER, A.; AUSSENAC, G., 1992: Vulnerability to air mbolism of three European oak species (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl., *Q. pubescens* Willd., *Q. robur* L.). *Ann. Sci. For.* 49, 225–233.
- COMBES C., 2001 : Les Associations du Vivant - L'art d'être parasite. Flammarion, Paris
- CONNELL, J.H., 1971: On the role of natural enemies in preventing competitive exclusion in some marine animals and in rain forest. In: *Dynamics of populations* (eds. Boer PJD, Gradwell PR). Center for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen. The Netherlands. pp. 298-312.
- CORTESI, P.; GADOURY, D.M.; SEEM, R. C.; PEARSON, R. C., 1995: Distribution and retention of cleistothecia of *Uncinula necator* on bark of grapevines. *Plant Disease* 79 (1), 15-19.
- CROUS, P.W.; GROENEWALD, J.Z.; PONGPANICH, K.; HIMAMAN, W.; ARZANLOU, M.; WINGFIELD, M.J., 2004. Cryptic speciation and host specificity among *Mycosphaerella* spp. occurring on Australian Acacia species grown as exotics in the tropics. *Studies Mycol.* 50 Special Issue, Part 2: 457-469.
- CROUZILLAT, D.; PHILLIPS, W.; FRITZ, P.J.; PÉTIARD, V., 2000: Quantitative trait loci analysis in *Theobroma cacao* using molecular markers. Inheritance of phylogenetic resistance to *Phytophthora palmivora* in two relatives cacao populations. *Euphytica* 114 (25), 25-36.
- CUNNINGTON, J. H.; TAKAMATSU, S.; LAWRIE, A.C.; PASCOE, I.G., 2003: Molecular identification of anamorphic powdery mildews (Erysiphales). *Austr Plant Pathol* 32, 421-428.
- DANGL J.L.; JONES J.D.G., 2001: Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411, 826-833.
- DAVIES, N.; BOURKE, A.; DE BROOKE, M., 1989: Cuckoos and parasitic ants: interspecific brood parasitism as an evolutionary arms race. *Trends ecol evol* 4, 274–278.

- DE WIT, P., 1997: Pathogen avirulence and plant resistance: a key role for recognition. Trends in Plant Sciences 2, 452–458.
- DELATOUR, C. 1990 : Dépérissement des chênes et pathogènes. Rev.For.fr 42. pp 182- 185.
- DELATOUR, C., 1983: Oak dieback in Europe. Revue Forestière Française. 35(4), 265-282.
- DELMOTTE, F.; BUCHELI E.; SHYKOFF, J.A., 1999: Host and parasite population structure in a natural plant–pathogen system, Heredity, 82, 300-308.
- DELYE, C., 1997 : Variabilité de l'agent de l'oïdium de la vigne (*Uncinula necator*) et résistance aux fongicides inhibiteurs de la biosynthèse des stérols. PhD thesis INA-PG université de Paris VI et XI.
- DELYE, C.; CORIO-COSTET, M.F., 1998: Origin of primary infections of grape by *Uncinula necator*. RAPD analysis discriminates two biotypes. Mycological research 102, 283-288.
- DESPREZ-LOUSTAU, M.L. 2002 : L'oïdium des chênes : un parasite commun mais méconnu. Les Cahiers du DSF 1. La Santé des Forêts en 2000-2001, 95-99. Min. Agric. Alim. Pêche Aff. Rur. (DERF), Paris.
- DEVEY, M.; CARSON, S.; NOLAN, M.; MATHESON, A.; TE RIINI, C.; HOHEPA, J., 2004: QTL associations for density and diameter in *Pinus radiata* and the potential for marker-aided selection. Theoretical and Applied Genetics, 108 (3), 516-524.
- DIGHTON, J., 2003: The Role of Fungi in Ecosystem Processes. ED CRC press. 424p.
- DIMOND, A. E.; WAGGONER, P. E., 1953: On the nature and role of vivo-toxins in plant disease. Phytopathology 43, 229-235.
- DIRLEWANGER, E.; ISAAC, P.G.; RANADE, S.; BELAJOUZA, M.; COUSIN, R.; DE VIENNE, D., 1994: Restriction fragment length polymorphism analysis of loci associated with disease resistance genes and developmental traits in *Pisum sativum* L. Theor. Appl.Genet. 88, 17–27.
- DOE, F., 1923 : L'oïdium et les forêts feuillues du Nord-Est de la France. Rev. Eaux et Forêts 61(10), 429-436.
- DOWKIW, A.; BASTIEN C., 2004: Characterization of two major genetic factors controlling quantitative resistance to *Melampsora larici-populina* leaf rust in hybrid poplars: strain specificity, field expression, combined effects, and relationship with a defeated qualitative resistance gene. Phytopathology 94, 1358–1367.
- DUCOMET, V., 1913 : Recherches sur les maladies du chêne et du chataignier en Bretagne. Ann. Epiphyt. 1, 87-105.
- DURAND-TARDIF, M. ; PELLETIER, G., 2003 : Apport de la biologie moléculaire et cellulaire et de la génétique à la protection des plantes C. R. Biologies 326.
- DUTECH, C.; ENJALBERT, J.; FOURNIER, E.; DELMOTTE, F.; BARRES, B.; CARLIER, J.; THARREAU, D.; GIRAUD, T., 2007: Challenges of microsatellite isolation in fungi. Fungal Genetics and Biology 44: 933–949.

- DYBDAHL, M. F.; STORFER, A., 2003: Parasite local adaptation: Red Queen versus Suicide King. *Trends ecol evol* 18 (10), 523-530.
- EBERT, D., 1994: Virulence and local adaptation of a horizontally transmitted parasite. *Science* 265, 1084–1086.
- EDWARDS, M.C.; AYRES, P.G., 1981: Cell Death and Cell Wall Papillae in the Resistance of Oak Species to Powdery Mildew Disease. *New Phytologist*, 89, 411-418.
- EDWARDS, M.C.; AYRES, P.G., 1982: Seasonal changes in resistance of *Quercus petraea* (sessile oak) leaves to *Microsphaera alphitoides*. *Tr. British Mycol. Soc.* 78:569-571.
- EDWARDS, I.P.; TURCO, R.F., 2005: Inter- and intraspecific resolution of nrDNA TRFLP assessed by computer-simulated restriction analysis of a diverse collection of ectomycorrhizal fungi. *Mycol Res.*;109:212–26.
- FLOR, H.H., 1955: Host-parasite interaction in flax rust—Its genetics and other implications. *Phytopathology* 45, 680–85.
- FOEX, M. E., 1919 : Quelques remarques au sujet de la présence de périthèces de *Phyllactinia corylea* sur des feuilles de Chêne atteintes de « Blanc ». *Bull. Soc. Pathol. Vég. France.* Tome 6, 161-166.
- FOEX, M.E. 1941 : L'invasion des chênes d'Europe par le blanc ou oïdium. *Revue des eaux et forêts* 79, 338-349.
- FOULONGNE, M.; PASCAL, T.; PFEIFFER, F.; KERVELLA, J., 2003. QTLs for powdery mildew resistance in peach ×*Prunus davidiana* crosses: consistency across generations and environments. *Molecular Breeding* 12 (1), 33-50.
- FOURNIER, E.; GIRAUD, T., 2008: Sympatric genetic differentiation of a generalist pathogenic fungus, *Botrytis cinerea*, on two different host plants, grapevine and bramble. *J. Evol. Biol.* 21: 122-132.
- FRANK, S. A., 2002: *Immunology and the Evolution of Infectious Disease*. Princeton University Press, Princeton.
- GADOURY, D.M.; PEARSON, R.C., 1986: A mechanism for ascospore discharge in *Uncinula necator*. *Phytopathology*, 76: 1145.
- GAILING, O.; LANGENFELD-HEYSE, R.; POLLE, A.; REINER FINKELDEY, R., 2008: Quantitative trait loci affecting stomatal density and growth in a *Quercus robur* progeny: implications for the adaptation to changing environments. *Global Change Biology* 14 (8), 1934 – 1946.
- GANDON, S., 2002: Local adaptation and the geometry of host–parasite coevolution. *Ecology Letters*, 5, 246–256.
- GANDON, S.; CAPOWIEZ, Y.; DUBOIS, Y.; MICHALAKIS, Y.; OLIVIERI, I., 1996: Local adaptation and gene-for-gene coevolution in a metapopulation model. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biology Sciences*, 263, 1003–1009.



- GANDON, S.; MICHALAKIS, Y., 2002: Local adaptation, evolutionary potential and host-parasite coevolution: interactions between migration, population size and generation time. *Journal of Evolutionary Biology*, 15, 451–462.
- GEFFENEY, S.; BRODIE JR, E.D.; RUBEN, P. C.; BRODIE, E. D., 2002: Mechanisms of adaptation in a predator–prey arms race: TTX-resistant sodium channels. *Science* 297, 1336–1339.
- GEIGER, H.H.; HEUN, M., 1989: Genetics of quantitative resistance to fungal diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 27, 317–41.
- GERBER, S., LASCoux, M.; KREMER, A., 1997: Relation between protein markers and quantitative traits in Maritime Pine (*Pinus pinaster*). *Silvae genetica* 46 (5), 286-291.
- GIBBS, J. N.; GREIG, B. J. W., 1997: Biotic and abiotic factors affecting the dying-back of pedunculate oak *Quercus robur* L. *Forestry* 70, 399–406.
- GIRAUD T., 2006: Selection against migrant pathogens: The immigrant inviability barrier in pathogens. *Heredity*, 97, 316-318.
- GLASS, N.L.; DONALDSON, G., 1995: Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl Environ Microbiol.* 61 (4) 1323-1330.
- GLAWE, D. A., 2008: The powdery mildews: A review of the world's most familiar (yet poorly known) plant pathogens. *ANNUAL REVIEW OF PHYTOPATHOLOGY* 46, 27-51.
- GOMES, E.A.; KASUYA, M.C.M.; BARROS, E.G.; BORGES, A.C.; ARAUJO, E.F., 2002: Polymorphism in the internal transcribed spacer (ITS) of the ribosomal DNA of 26 isolates of ectomycorrhizal fungi. *Genetics and Molecular Biology*, 25 (4), 1415-4757.
- Gomulkiewicz, R.; Thompson, J. N.; Holt, R. D.; Nuismer, S. L.; Hochberg, E. 2000: Hot spots, cold spots, and the geographic mosaic theory of coevolution. *Am. Nat.* 156, 156–174.
- Gonzalez-Martinez, S.C.; Burczyk, J.; Nathan, R.; Nanos, N.; Gil, L.; Alia, R., 2006: Effective gene dispersal and female reproductive success in Mediterranean maritime pine (*Pinus pinaster* Aiton). *Molecular Ecology*, 15, 4577-88.
- GRATTAPAGLIA, D.; SEDEROFF, R., 1994 Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. *Genetics* 137 : 1121-1137.
- GRIFFON, E. ; MAUBLANC, A., 1908 : Sur le blanc du Chêne. *CR Acad. Sc.* Tome 147, 437-439.
- GRIFFON, E. ; MAUBLANC, A., 1911 : Le blanc du chêne en 1910. *Bull. Soc. Mycol. F.* 27, 60-67.
- GRIFFON, E.; MAUBLANC, A., 1912a : Les *Microsphaera* des Chênes et les périthèces du blanc du Chêne. *CR Acad. Sc.*, 154, 935-938.

GRIFFON, E.; MAUBLANC, A., 1912b : Les *Microsphaera* des Chênes. Bull. Soc. Mycol. F 28, 88-104.

GRZEBYTA, J.; KAROLEWSKI, P.; ZYTKOWIAK, R.; GIERTYCH, M.J.; WERNER, A.; ZADWORNÝ, M.; OLEKSYN, J., 2005: Effects of elevated temperature and fluorine pollution on relations between the pedunculate oak (*Quercus robur*) and oak powdery mildew (*Microsphaera alphitoides*). Dendrobiology 53, 27-33.

GUILLAUMIN, J.J.; BERNARD, C.; DELATOUR, C.; BELGRAND, M., 1985: Contribution à l'étude du dépérissement du chêne: pathologie racinaire en forêt de Tronçais. Annales Des Sciences Forestières, 42, 1-22.

HADWIGER, L.E., 2008: Pea-Fusarium solani Interactions Contributions of a System toward Understanding Disease Resistance. Phytopathology 98(4):372-379.

HALL, T. A., 1999: BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98 NT. Nucl. Acids.Symp. Ser. 41, 95-98.

HAMILTON, W. D.; AXELROD, R.; TANESE, R., 1990: Sexual reproduction as an adaptation to resist parasites (a review). Proc. Natl Acad. Sci. USA 87, 3566-3573.

HANKS, L. M.; DENNO, R. F., 1994: Local adaptation in the armored scale insect *Pseudaulacaspis pentagona* (Targioni-Tozzetti) (Homoptera: Diaspididae). Ecology 75, 2301-2310.

HARIOT, P., 1907 : Note sur un oïdium du chêne. Bull. Soc. Mycol. F. 23, 157-159.

HARRINGTON, F.A.; POTTER, D., 1997: Phylogenetic relationships within *Sarcoscypha* based on nucleotide sequences of the internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA. Mycologia, 89, 258-67.

HARRINGTON, T.C.; RIZZO, D.M, 1999: Defining species in the fungi. In: Worrall JJ, ed Structure and dynamics of fungal populations. Amsterdam: Kluwer Publishers. pp. 41-73.

HEBERT, P.D.N.; CYWINSKA, A.; BALL, S.L.; DEWAARD, J.R., 2003: Biological identifications through DNA barcodes. Proc. R. Soc. Lond. B. 270, 313-321.

HENRICOT, B.; COOK, R.T.A., 2007: New report of powdery mildew on Wisteria in the UK. New Disease Reports (<http://www.bspp.org.uk/ndr/>) Volume 15.

HETRICK, B.A.D.; BLOOM, J., 1986: The Influence of host plant on production and colonization ability of vesicular-arbuscular mycorrhizal spores. Mycologia 78, (1),. 32-36.

HEUSER, T.; ZIMMER, W., 2002: Quantitative analysis of phytopathogenic ascomycota on leaves of pedunculate oaks (*Quercus robur* L.) by real-time PCR. Microbiology letters 209, 295-299.

HEWITT, H. G., 1974: Conidial germination in *Microsphaera alphitoides*. Trans. Br. Mycol. Soc. 63, 587-589.

- HEWITT, H. G.; AYRES, P.G., 1976: Effect of infection by *Microsphaera alphitoides* (powdery mildew) on carbohydrate levels and translocation in seedlings of *Quercus robur*. *New phytologist*, 77, 379-390.
- HEWITT, H.G.; AYRES, P. G., 1977: Changes in Glycolate Oxidase and Glyoxylate Reductase in *QUERCUS ROBUR* Infected by *Microsphaera alphitoides*. *Physiologia Plantarum* 40 (1), 31 – 34.
- HIBBETT, D. S.; FUKUMASA-NAKAI, Y.; TSUNEDA, A.; DONOGHUE, M.J., 1995: Phylogenetic diversity in shiitake inferred from nuclear ribosomal DNA sequences, *Mycologia*, 87, 618-88.
- HIRATA, T.; TAKAMATSU, S., 1996: Nucleotide sequence diversity of rDNA internal transcribed spacers extracted from conidia and cleistothecia of several powdery mildew fungi. *Mycoscience* 37, 283-288.
- HUDSON, P.J.; DOBSON, A.P.; NEWBORN, D., 1992: Do parasites make prey vulnerable to predation? Red grouse and parasites. *J. Anim. Ecol.* 61, 681–692.
- HULBERT, S.H.; MICHELMORE, R.W., 1985: Linkage analysis of genes for resistance to downy mildew (*Bremia lactucae*) in lettuce (*Lactuca sativa*). *Theor. Appl. Genet.* 70, 520–28
- HUTCHINSON, G.E., 1957: Concluding remarks. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 22 (2), 415–427.
- IZZO, A.; AGBOWO, J.; BRUNS, T.D., 2005: Detection of plot-level changes in ectomycorrhizal communities across years in an old-growth mixed-conifer forest. *New Phytol.*;166:619–30.
- JANZEN, D.H., 1970: Herbivores and the number of tree in tropical forests. *American Naturalist* 104, 501-527.
- Jansen, R.C.; Stam P., 1994: High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping, *Genetics* 136, 1447– 1455.
- JARVIS, W.R.; GUBLER, W.D.; GROVE, G.G., 2002: Epidemiology of powdery mildews in agricultural pathosystems. IN *The powdery mildews: a comprehensive treatise*. Ed Belanger, R. R.; Bushnell, W. R.; Dik, A. J.; Carver, T. L. W., 169-199.
- Jones, D.A.; Thomas, C.M.; Hammond-kosack, K.E.; Balintkurti, P.J.; Jones J.D.G., 1994: Isolation of the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging, *Science* 266, 789–793.
- Jorge, V.; Dowkiw, A.; Faivre-Rampant, P.; Bastien, C., 2005: Genetic architecture of qualitative and quantitative *Melampsora larici-populina* leaf rust resistance in hybrid poplar: genetic mapping and QTL detection. *New Phytol.* 167, 113–127.
- JUZWIK, J.; FRENCH, D.W., 1983: *Ceratocystis fagacearum* and *C. piceae* on the surfaces of free-flying and fungus-mat-inhabiting nitidulids. *Phytopathology*. vol. 73, (8), 1164-1168
- KALTZ, O.; GANDON, S.; MICHALAKIS, Y.; SHYKOFF, J.A., 1999: Local maladaptation of the plant pathogen *Microbotryum violaceum* to its host *Silene latifolia*: Evidence from a cross-inoculation experiment. *Evolution* 53, 395-407.

- KALTZ, O.; SHYKOFF, J., 2002: Within- and among-population variation in infectivity, latency and spore production in a host-pathogen system. *J Evol Biol* 15, 850–860.
- KALTZ, O.; SHYKOFF, J.A., 1998: Local adaptation in host– parasite systems. *Heredity*, 81, 361–370.
- KAWECKI, T.J.; EBERT, D., 2004: Conceptual issues in local adaptation. *Ecology letters* 7, 1225-1241.
- KIRCHERER, S.; BACKES, G.; WALTHER, U.; JAHOR, A., 2000: Localising QTLs for leaf rust resistance and agronomic traits in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor Appl Genet* 100, 881-888.
- KISS, L., 1997: Genetic diversity in *Ampelomyces* isolates, hyperparasites of powdery mildew fungi, inferred from RFLP analysis of the rDNA ITS region. *Mycological Research* 101, 1073-1080.
- KISS, L.; NAKASONE, K.K., 1998: Ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences do not support the species status of *Ampelomyces quisqualis*, a hyperparasite of powdery mildew fungi. *Current genetics*. Vol 33 (5).
- Kiss, L.; Khosla, K.; Jankovics, T; Niinomi, S.; Braun, U.; Takamatsu, S., 2006 : A morphologically ill-founded powdery mildew species, *Pleochaeta indica*, is recognized as a phylogenetic species based on the analysis of the nuclear ribosomal DNA sequences. *Mycological Research* 110 (11), 1301-1308.
- KLUGMANN, K.; ROLOFF, K., 1999: Ökophysiologische Bedeutung von Zweigabspürngen (Kladoptosis) unter besonderer Berücksichtigung der Symptomatologie von *Quercus robur* L. *Forstw. Cbl.*, 118, 271–286.
- KONG, P.; HONG, C.; RICHARDSON, P.A.; GALLEGLY, M. E., 2003: Single-strand-conformation polymorphism of ribosomal DNA for rapid species differentiation in genus *Phytophthora*. *Fungal Genetics and Biology*. 39 : 238–249
- Koskela, T.; Salonen, V.; Mutikainen, P., 2000: Local adaptation of a holoparasitic plant, *Cuscuta europaea*: variation among populations. *J Evol Biol*, 13, 749-755.
- Kremer, A.; Kleinschmit, J.; Cottrell, J.; Cundall, E.P.; Deans, J.D.; Ducouso, A.; Konig, A.O.; Lowe, A.J.; Munro, R.C.; Petit, R.J.; Stephan, B.R., 2002: Is there a correlation between chloroplastic and nuclear divergence, or what are the roles of history and selection on genetic diversity in European oaks? *Forest Ecology and Management*, 156 (1-3), 75-87.
- LAFFERTY, K.D., 2004: Fishing for lobsters indirectly increases epidemics in sea urchins. *Ecol. Appl.* 14, 1566–1573
- LAINE, A.L., 2005: Spatial scale of local adaptation in a plant-pathogen metapopulation. *Journal of Evolutionary Biology*, 18, 930–938.
- LAJEUNESSE, M.J. ; FORBES, M.R., 2002 : Host range and local parasite adaptation. *Proc Biol Sci.* 269 (1492), 703–710.

- LEPOIVRE, P., 2003 : Phytopathologie : bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte. De Boeck Université, Bruxelles.
- LESPINASSE, D., GRIVET, L. ; TROIPOUX, V. ; RODIER-GOUD, M. ; PINARD, F. ; SEGUIN, M., 2000 : Identification of QTLs involved in the resistance to South American leaf blight (*Microcyclus ulei*) in the rubber tree. *Theor Appl Genet* (100), 975-984.
- LIANG, S.; SUENAGAK S.; HEZ, H.; WANG, Z. L.; LIU, H.Y.; WANG, D.S.; SINGH R. P.; SOURDILLE P.; XIA X. C., 2006: Quantitative trait loci mapping for adult-plant resistance to powdery mildew in bread wheat. *Phytopathology* vol. 96 (7), 784-789
- Lim, T.M., 1973: A rapid laboratory method of assessing susceptibility of *Hevea* clones to *Oidium hevea*. *Exp.Agric.*9:275-279.
- LIMKAISANG, S. ; KOM-UN, S. ; LUIZ FURTADO, E. ; LIEW, W. K. ; SALLEH, B. ; SATO, Y. ; TAKAMATSU, S., 2005: Molecular phylogenetic and morphological analyses of *Oidium heveae*, a powdery mildew of rubber tree. *Mycoscience* 46, 220–226.
- LIMKAISANG, S.; CUNNINGTON J.H.; LIEW, K.W.; SALLEH, B., SATO, Y.; DIVARANGKOON, R.; FANGFUK, W.; TO-ANUN, C.; TAKAMATSU, S., 2006: Molecular phylogenetic analyses reveal a close relationship between powdery mildew fungi on some tropical trees and *Erysiphe alphitoides*, an oak powdery mildew. *Mycoscience* 47, 327-335.
- LIPKA, V.; DITTGEN, J.; BEDNAREK, P.; BHAT, R.A.; STEIN, M.; LANDTAG, J.; BRANDT, W.; SCHEEL, D.; LLORENTE, F.; MOLINA, A.; WIERMER, M.; PARKER, J.; SOMERVILLE, S.C.; SCHULZE-LEFERT, P., 2005: Pre- and post-invasion defenses both contribute to non-host resistance in *Arabidopsis*. *Science* 310, 1180-1183
- LITTLE, T.J., 2002: The evolutionary significance of parasitism: do parasite-driven genetic dynamics occur *ex-silico*? *Journal of Evolutionary Biology* 15, 1-9.
- LOWE, T.; SHAREIFKIN, J.; YANG, S.Q.; DIEFFENBACH, C.W., 1990: A computer program for selection of oligonucleotide primers for polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.*18: 1757-1761.
- MACEK, J., 1975: Three species of Oak powdery mildews in Slovenia. *Gozdarski Vestnik* 33 (6), 299-304.
- MAGNI, C.R.; DUCOUSSO, A.; CARON, H.; PETIT, R.J.; KREMER, A., 2005: Chloroplast DNA variation of *Quercus rubra* L. in North America and comparison with other Fagaceae. *Molecular Ecology* 14, 513–524.
- MAGYAROSY, A.C.; SCHURMANN, P.; BUCHANAN, B. B., 1976: Effect of powdery mildew infection on photosynthesis by leaves and chloroplasts of sugar beets. *Plant Physiol.* 57, 486-489.
- MALCOMSON, J.F.; BLACK, W., 1966: New R genes in *Solanum demissum* Lindl. and their complementary races of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. *Euphytica* 15,199–203.
- MANION, P.D., 1981: Tree disease concepts. Edition Prentice-Hal

- MARÇAIS, B.; CAËL, O., 2000: Comparison of the susceptibility of *Quercus petraea*, *Q. robur* and *Q. rubra* to *Collybia fusipes*. Eur. J. Plant. Pathol. 106, 227–232.
- MILGROOM, M.G.; LIPARI, S.E.; WANG, K. 1992. Comparison of genetic diversity in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria (Endothia) parasitica*, from China and the U.S. Mycological Research 96, 1114-1120.
- MITCHELL, C.E.; AGRAWAL, A.A.; BEVER, J.D.; GILBERT, G.S.; HUFBAUER, R.A.; KLIRONOMOS, J.N.; MARON, J.L.; MORRIS, W.F.; PARKER, I.M.; POWER, A.G.; SEABLOOM, E.W.; TORCHIN, M.E.; VÁZQUEZ, D.P., 2006: Biotic interactions and plant invasions. Ecology Letters, 9(6): 726-740.
- MITCHELL, C.E.; POWER, A.G., 2003: Release of invasive plants from fungal and viral pathogens. Nature 421, 625-627.
- MMBAGA, M.T.; KLOPFENSTEIN, N.B.; KIM, M.S.; MMBAGA, N.C., 2004: PCR-based identification of *Erysiphe pulchra* and *Phyllactinia guttata* from *Cornus florida* using ITS-specific primers. Forest Pathol 34 (5), 321–328.
- MOLOT, P.M.; LEROUX, J.P.; FERRIERE, H., 1987: Les oïdiums des cucurbitacées II. Mise au point d'une technique de conservation des souches en culture axénique. Agronomie 7, 339-343.
- MONTARRY, J.; CARTOLARO, P.; RICHARD-CERVERA, S.; DELMOTTE F., 2009: Spatio-temporal distribution of *Erysiphe necator* genetic groups and their relationship with disease levels in vineyards. Eur. J. Plant Pathol. 123: 61-70.
- MONTARRY, J.; CARTOLARO, P.; DELMOTTE, F.; JOLIVET, J.; WILLOCQUET, L., 2008: Genetic structure and aggressiveness of *Erysiphe necator* populations during grapevine powdery mildew epidemics, Applied Environmental Microbiology, 74, 6327–6332.
- MONTARRY, J.; CORBIÈRE, R.; LESUEUR, S.; GLAIS, I.; ANDRIVON, D., 2005: Does selection by resistant hosts trigger local adaptation in plant-pathogen systems? Journal of Evolutionary Biology. 19 (2). 522-531
- MONTARRY, J.; CORBIÈRE, R.; LESUEUR, S.; GLAIS, I.; ANDRIVON, D.; 2006: Does selection by resistant hosts trigger local adaptation in plant-pathogen systems? J Evol Biol. 19(2), 522-31.
- MOPPER, S.; STILING, P.; LANDAU, K.; SIMBERLOFF, D.; VAN ZANDT, P.; 2000: Spatiotemporal Variation In Leafminer Population Structure And Adaptation To Individual Oak Trees. Ecology 81, 1577-1587.
- MORAND, S.; MANNING, S. D.; WOOLHOUSE, M.E.J., 1996: Parasite-host coevolution and geographic patterns of parasite infectivity and host susceptibility. Proc. R. Soc. Lond. B 263, 119–128.
- MORGAN, A.D.; GANDON, S.; BUCKLING, A., 2005: The effect of migration on local adaptation in a coevolving host– parasite system. Nature, 437, 253–256.
- MORIN, P.A.; LUIKART, G.; WAYNE, R.K., 2004: SNPs in ecology, evolution and conservation. Trends ecol evol, Vol. 19 (4), 208-216.

- MOUGOU, A.; DUTECH, C.; DESPREZ-LOUSTAU, M.L., 2008: New insights into the identity and origin of the causal agent of oak powdery mildew in Europe. *Forest pathol* 38 (4), 275-287.
- MYSORE, K.S.; RYU, C.M., 2004: Nonhost resistance: how much do we know? *Trends Plant Sci* 9, 97–104.
- NAGELEISEN, M., 2006 : Quelques indicateurs de la santé des forêts françaises. *Les Cahiers du DSF*, 1-2006 (La santé des forêts [France] en 2003-2004), Min. Agri. Pêche (DERF), Paris. pp 16-17.
- NEF, L.; PERRIN, R., 1999: Damaging agents in European forest nurseries. Practical handbook. European Communities, Italy.
- NEWSHAM, K. K.; OXBOROUGH, K.; WHITE, R.; GREENSLADE, P.D.; MCLEOD, A.R., 2000: UV-B radiation constrains the photosynthesis of *Quercus robur* through impacts on the abundance of *Microsphaera alphitoides*. *Forest Pathology* 30, 265-275.
- NEWSHAM, K. K.; LOW, M. N. R.; MCLEOD, A. R.; GREENSLADE, P. D.; EMMETT, B. A., 1997: Ultraviolet-B radiation influences the abundance and distribution of phylloplane fungi on pedunculate oak (*Quercus robur*). *New Phytol.* 136: 287-297.
- NICOT, P.C.; BARDIN, M.; DIK, A.J., 2002: Basic methods for epidemiological studies of powdery mildews: culture and preservation of isolates, production and delivery of inoculum, and disease assessment. *The Powdery Mildews: A Comprehensive Treatise* (eds R.R. Bélanger, R.B. Bushnell,
- NIEMI, L.; WENNSTROM, A.; HJALTEN, J.; WALDMANN, P.; ERICSON, L., 2006: Spatial variation in resistance and virulence in the host–pathogen system *SALIX TRIANDRA–MELAMPORA AMYGDALINAE*. *Journal of Ecology* 94 (5), 915-921.
- NILSSON, R.H., KRISTIANSSON, E.; RYBERG, M.; HALLENBERG, N.; LARSSON, K.H., 2008: Intraspecific ITS Variability in the Kingdom *Fungi* as Expressed in the International Sequence Databases and Its Implications for Molecular Species Identification. *Evol. Bioinf.* 4, 193–201.
- NODARI, R.O.; TSAI, S.M.; GILBERTSON, R.L.; GEPTS, P., 1993: Toward an integrated linkage map of common bean. 3. Mapping genetic factors controlling host-bacteria interactions. *Genetics* 134, 341–50
- NOFAL, M.A.; HAGGAG, W.M., 2005: Integrated management of powdery mildew mango in Egypt. *Crop protection* 25, 480-486.
- NOIR, S.; LASHERMES, P., 2000: Organisation et évolution des gènes de résistance chez les plantes. *Cahiers Agricultures*, 8, 301-309.
- NÜRNBERGER, T.; LIPKA, V., 2005: Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Molecular Plant Pathology* 6, 335-345
- ORITA, M.; IWAHANA, H.; KANAZAWA, H.; HAYASHI, K.; SEKIYA, T., 1989: Detection of Polymorphisms of Human DNA by Gel Electrophoresis as SSCP. *Proc. Natl. Ac. Sci. USA* 86, 2766-70.

- PACKER, C.; HOLT, R.D.; LAFFERTY, K.D.; DOBSON, A.P., 2003: Keeping the herds healthy and alert: implications of predator control for infectious disease. *Ecol. Lett.* 6, 797-802.
- PARELLE, J.; ZAPATER, M.; SCOTTI-SAINTAGNE, C.; KREMER, A.; JOLIVET, Y.; DREYER, E.; BRENDDEL, O., 2006: Quantitative trait loci of tolerance to waterlogging in a European oak (*Quercus robur* L.): physiological relevance and temporal effect patterns. *Cell and Environment*, 30 (4), 422-434.
- PARKER, A.; CLAY, K., 2000: Soil pathogens and temperate tree seedling mortality: a mechanism for the Janzen-Connell hypothesis. *Nature* 404, 278-281.
- PARKER, I.M.; GILBERT, G.S., 2004: The evolutionary ecology of novel plant-pathogen interactions. *Ann. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 35, 675-700
- PARMENTIER, J.L., 1977: *Le grand livre du bois*, Nathan, 276.
- PETIT, R.J.; BODENES, C.; DUCOUSSO, A.; ROUSSEL, G.; KREMER, A., 2003: Hybridization as a mechanism of invasion in oaks. *New Phytologist*, 161 (1), 151-164.
- PINON, J.; TAINTER, F.H.; MACDONALD, W.L., 1988: Short-term tests of european oaks to oak wilt. Abs. in *Phytopathology* 331.
- PLOMION, C.; DUREL, C.É. ; VERHAEGEN, D., 1996 : Utilisation des marqueurs moléculaires dans les programmes d'amélioration génétique des arbres forestiers : exemple du pin maritime et de l'eucalyptus. *Ann Sci for* 53, 819-848.
- PLOMION, C.; YANI, A.; MARPEAU, A., 1996: Genetic determinism of 3-carene in maritime pine using RAPD markers. *Genome* 39, 1123-1127.
- PONCE DE LEÓN, I.; OLIVER, J.P.; CASTRO, A.; GAGGERO C.; BENTANCOR, M.; VIDAL, S., 2007: *Erwinia carotovora* elicitors and *BOTRYTIS CINEREA* activate defense responses in *Physcomitrella patens*. *BMC PLANT BIOLOGY*, 7:52.
- POULIN, R.; MARSHALL, L.; SPENCER, H., 2000: Metazoan parasite species richness and genetic variation among freshwater fish species: cause or consequence? *International Journal for Parasitology* 30, 697-703.
- PRICE, P.W.; WESTOBY, M.; RICE, B.; ATSATT, P.R.; FRITZ, R.S.; THOMPSON, J.N.; MOBLEY K., 1986. Parasite mediation in ecological interactions. *Ann. Rev. Ecol. System.* 17, 487-505.
- PRINGLE, A.; TAYLOR, J.W., 2002: The fitness of filamentous fungi. *Trends in Microbiology* 10, 474-481.
- PUTTEMANS, A., 1920 : Sur l'oïdium du chêne au Brésil. *Bull. Soc. Pathol. Vég. France.* Tome 7, 37-40.
- QI, X.; NICKS, R.E.; STAM, P.; LINDHOUT, P., 1998: Identification of QTLs for partial resistance to leaf rust (*Puccinia hordei*) in barley. *Theor Appl genet* 98, 1205-1215.
- RAYMOND, J., 1924: Périthèces de *Microsphaera quercina* (Schw.) Burr observés dans le sud-ouest de la France. *Rev. Pathol. Vég. Entomol. Agric.* 11, 254-25.



- RAYMOND, J., 1927: Le ‘‘blanc’’ du chêne. *Ann. Epiphyties* 13, 94–129.
- REPKA, V., 2002: Chlorophyll-Deficient Mutant in Oak (*Quercus petraea* L.) Displays an accelerated hypersensitive-Like cell death and an enhanced resistance to powdery mildew disease. *Photosynthetica* 40 (2) 183-193.
- RICHLY, E.; KURTH, J.; LEISTER, D., 2002: Mode of amplification and reorganization of resistance genes during recent *Arabidopsis thaliana* evolution. *Mol. Biol. Evol.* 19, 76–84.
- RICKLEFS, R.E.; MILLER, G., 2000: *Ecology*. Ed W.H. Freeman and Co., New York. 822 p.
- ROBIN, C.; DESPREZ-LOUSTAU, M.L.; CAPRON, G.; DELATOUR, C.; 1998: First record of *Phytophthora cinnamomi* on cork and holm oaks in France and evidence of pathogenicity. *Annales des sciences forestières* 55(8), 869-883
- ROLL-HANSEN, E.M, 1999: Disease and diversity in forest ecosystems. *Australasian Plant Pathology*, 28, 313–319.
- ROLL-HANSEN, F., 1961: *Microsphaera hypophylla* Nevodovskij (*M. silvatica* Vlasov), an Oak Powdery Mildew Fungus. *Medd. Norsk. Skogfor.* 59, 41-61.
- ROSLIN, T.; LAINE A.L.; GRIPENBERG, S., 2007: Spatial population structure in an obligate plant pathogen colonizing oak *Quercus robur*. *Functional Ecology* 21, 1168–1177
- ROZEN, S.; SKALETSKY, H.J., 2000: Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386
- SAENZ, G.S.; TAYLOR, J.W., 1999: Phylogeny of the Erysiphales (powdery mildews) inferred from internal transcribed spacer ribosomal DNA sequences. *Can. J. Bot.* 77, 150-168.
- SAINTAGNE, C.; BODÉNEÈS, C.; BARRENECHE, T.; POT, D.; PLOMION, C.; KREMER A., 2004: Distribution of genomic regions differentiating oak species assessed by QTL detection. *Heredity* 92, 20-30.
- SALVAUDON, L.; HÉRAULT, V.; SHYKOFF, JA., 2005: Parasite-host fitness trade-offs change with parasite identity: genotype-specific interaction in a plant-pathogen system. *Evolution* 59 (12), 2518-2524.
- SARGENT, R.; ACKERLY, D.D., 2008: Plant-pollinator interactions and community assembly. *Trends in Ecology and Evolution* 23, 123-130.
- SCHUPP, E.W., 1992: The Janzen-Connell model for tropical tree diversity: population implications and the importance of spatial scale. *Am Nat* 140, 526-530.
- SCOTTI-SAINTAGNE, C.; BERTOCCHI, E.; BARRENECHE, T.; KREMER, A.; PLOMION, C., 2005: Quantitative trait loci mapping for vegetative propagation in pedunculate oak. *Annals of Forest Science* 62, 369-374.
- SCOTTI-SAINTAGNE, C.; MARIETTE, S.; PORTH, I.; GOIECOECHEA, P.G.; BARRENECHE, T.; BODÉNÈS, C.; BURG, K.; KREMER, A.; 2004: Genome scanning for interspecific differentiation

between two closely related oak species (*Quercus robur* L. and *Q. petraea* (Matt.) Liebl.). Genetics 168, 1615-1626.

SEGER, J., 1992: Evolution of exploiter–victim relationships. In Natural Enemies: The Population Biology of Predators, Parasites and Diseases (ed. M. Crawley). Blackwell, Oxford.

SIVAPALAN, A., 1993: Effects of water on germination of powdery mildew conidia. Mycol. Res. 97, 71-76.

SPEER, E. O., 1975: Investigations of the morphology and systematics of the Erysiphaceae II. Oak mildew *Microsphaera alphitoides* Griff. & Maubl. Sydowia 27, 112–126.

SPEER, E.O., 1978: Beitrag zur Morphologie von *Ampelomyces quisqualis* Ces. Sydowia 31, 242-246.

STASKAWICZ, B.; AUSUBEL, F.; BAKER, B.; ELLIS, J.; JONES, J., 1995: Molecular genetics of plant disease resistance. Science 268, 661–667.

STREIFF, R.; DUCOUSSO, A.; LEXER, C.; STEINKELLNER, H.; GLOESSL, J.; KREMER A., 1999: Pollen dispersal inferred from paternity analysis in a mixed oak stand of *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. Molecular Ecology, 8, 831-841.

STANKIEWICZ-KOSYL, M.; PITERA, E.; GAWRONSKI, S. W., 2005: Mapping QTL involved in powdery mildew resistance of the apple clone U 211. Plant Breeding, 124 (1), 63-66.

SUNNUCKS, P.; WILSON, A.C.C.; BEHEREGARAYL, B.; ZENGER, K.; FRENCH, J.; TAYLOR, A.C., 2000: SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. Molecular Ecology 9, 1699-1710.

SUTTON, B.C., 1980: The Coelomycetes. Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. Kew, UK: Commonwealth Mycological Institute.

TAKAMATSU, S.; MATSUDA, S., 2004: Estimation of molecular clocks for ITS and 28S rDNA in Erysiphales. Mycoscience 4 (5), 340-344.

TAKAMATSU, S., 2004: Phylogeny and evolution of the powdery mildew fungi (Erysiphales, Ascomycota) inferred from nuclear ribosomal DNA sequences. Mycoscience 45, 147-157.

TAKAMATSU, S.; HIRATA, T.; SATO, Y., 1998: Phylogenetic analysis and predicted secondary structures of the rDNA internal transcribed spacers of the powdery mildew fungi (Erysiphaceae). Mycoscience 39, 441-453.

TAKAMATSU, S.; BOLAY, A.; LIMKAISANG, S.; KOM-UN, S.; TO-ANUN, C.; 2006: Identity of a powdery mildew fungus occurring on Paeonia and its relationship with *Erysiphe hypophylla* on oak. Mycoscience 47, 367–373.

TAKAMATSU, S.; BRAUN, U.; LIMKAISANG, S.; KOM-UN, S.; SATO, Y.; CUNNINGTON, J.H., 2007: Phylogeny and taxonomy of the oak powdery mildew *Erysiphe alphitoides* sensu lato. Mycol. Res. 111, 809–826.

- TAKAMATSU, S.; HIRATA, T.; SATO, Y., 1998: Phylogenetic analysis and predicted secondary structures of the rDNA internal transcribed spacers of the powdery mildew fungi (Erysiphaceae). *Mycoscience* 39, 441-453.
- TAKAMATSU, S.; HIRATA, T.; SATO, Y.; NOMURA, Y., 1999: Phylogenetic relationships of *Microsphaera* and *Erysiphe* section *Erysiphe* (Powdery mildews) inferred from the rDNA ITS sequences. *Mycoscience* 40, 259-268.
- TAKAMATSU, S.; MATSUDA, S., 2004: Estimation of molecular clocks for ITS and 28S rDNA in Erysiphales. *Mycoscience*, Volume 4 (5), 340-344.
- TANKSLEY, S.D., 1993: Mapping polygenes. *Annu. Rev. Genet.* 27: 205-233.
- TANKSLEY, S.D.; GANAL, M.W.; MARTIN, G.B., 1995: Chromosome landing: a paradigm for map-based gene cloning in plants with large genomes. *Trends Genet.* 11:63-68.
- TAYLOR, J.T.; FRITZEMEIER, K.H.; HAUSER, I.; KOMBRINK, E.; ROHWER, F., 1990: Structural analysis and activation by fungal infection of a gene encoding a pathogenesis-related protein in potato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 3, 72-77
- TAYLOR, J.W.; TURNER, E.; TOWNSEND, J.P.; DETTMAN, J.R.; JACOBSON D., 2006: Eukaryotic microbes, species recognition and the geographic limits of species: examples from the kingdom Fungi. *Phil. Trans. R.Soc. B.* 361, 1947-1963.
- TAYLOR, J.W.; JACOBSON, D.J.; KROKEN, S.; KASUGA, T.; GEISER, D.M.; HIBBETT, D.S.; FISHER, M.C., 2000: Phylogenetic Species Recognition and Species Concepts in Fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 31 (1) 21-32.
- THALER, J.S.; FIDANTSEF, A.L.; DUFFEY, S.S.; BOSTOCK, R.M., 1999: Trade offs in plant defense against pathogens and herbivores: a field demonstration of chemical elicitors and induced resistance. *J. Chem. Ecol.* 25, 1597-1609
- THOMAS, F. M.; BLANK, R; HARTMANN, G., 2002: Abiotic and biotic factors and their interactions as causes of oak decline in Central Europe. *FOREST PATHOLOGY*, 32, 277-307.
- THOMPSON, D.A.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G., 1997: The clustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25, 4876-4882.
- THOMPSON, J.N., 1994: The geographic mosaic of evolving interactions. in: *Individuals, Populations and Patterns in Ecology*, S.R. Leather, A.D. Watt, N.J. Mills and K.F.A. Walters, eds. Andover, UK, Intercept Press. pp 419-431.
- THOMPSON, J.N., 1999: Specific hypothesis on the geographic mosaic of coevolution. *American Naturalist*, 153, S1-S14.
- THOMPSON, J.N.; BURDON, J.J., 1992: Gene-for-gene coevolution between plants and parasites. *Nature* 360, 121-125.
- THRALL, P.H.; BURDON, J.J.; BEVER, J.D., 2002: Local adaptation in the *Linum marginale* *Melampsora lini* host pathogen interaction. *Evolution*, 56, 1340-1351.

- TORCHIN, M.E.; LAFFERTY, K.D.; DOBSON, A.P.; MCKENZIE, V.J.; KURIS, A.M., 2001: Introduced species and their missing parasites. *Nature* 421, 628–630.
- VALLAD, G.E.; GOODMAN, R.M., 2004: Systemic Acquired Resistance and Induced Systemic Resistance in Conventional Agriculture. *Crop Sci.* 44, 1920–1934.
- VAN DER PLANK, J.E., 1968: *Disease Resistance in Plants*. Academic Press, New York. 206 pp.
- VAN OOIJEN, J.W., 1992: Accuracy of mapping quantitative trait loci in autogamous species. *Theor. Appl. Genet.* 84, 803-811.
- VAN ZANDT, P.; MOPPER, S., 2004: The effects of maternal salinity and seed environment on germination and growth in *Iris hexagona*. *Evolutionary Ecology Research* 6, 813-832.
- VIENNOT-BOURGIN, G., 1949 : Les champignons parasites des plantes cultivées. Paris: Masson, pp. 755.
- VIENNOT-BOURGIN, G., 1968 : Note sur les Erysiphacées. *Bull. Soc. Mycol. F.* 84, 117-118.
- VILGALYS, R., 1991: Speciation and species concepts in the *Collybia dryophila* complex, *Mycologia*, 83, 758-73.
- VINEY, R., 1970: L'oïdium du chêne, incident léger ou désastre? *Rev. For. France.* 23(3), 365-369.
- VISSCHER, P.M.; THOMPSON, R.; HALEY, C.S., 1996: Confidence intervals in QTL mapping by bootstrapping. *Genetics* 143, 1013–1020.
- VIVIN, P.; AUSSENAC, G.; LEVY, G.; 1993: Differences in drought resistance among 3 deciduous oak species grown in large boxes. *Annales des sciences forestières*, 50 (3), 221-233.
- WALDMÜLLER, T. ; COSIO, E.G. ; GRISEBACH, H.; EBEL, J., 1992: Release of highly elicitor-active glucans by germinating zoospores of *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *Planta* 188 (4), 498-505.
- WALSH, P.S.; METZGER, D.A.; HIGUCHI, R., 1991: Chelex 100 as a Medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* 10, 506-513;
- WEI, Z.M.; LABY, R.J.; ZUMOFF, C.H.; BAUER, D.W.; HE S.Y.; COLLMER, A.; BEER, S.V., 1992: Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science*, 257 (5066) 85-88.
- WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J., 1990: Genetics and evolution in amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenies. In: *PCR protocols: A guide to methods and applications*. pp 315-322.
- WOODWARD, R. C.; WALDIE, J. S. L.; STEVEN, H. M., 1929: Oak mildew and its control in forest nurseries. *Forestry* 3(1), 38-56.
- YARWOOD, C. E., 1950: *American Journal of Botany* 37 (8), 636-639.

- YARWOOD, C.E.; GARDNER, M.W., 1970: Leaf surface and leaf hairs affect length of conidiophores of Erysiphaceae. *Mycologia* 62, 707-713.
- YOUNG, N. D., 1996: QTL mapping and quantitative disease resistance in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34, 479–501.
- YOUNG, N.D, 2000: The genetic architecture of resistance. *Curr Opin Plant Biol.* 3(4):285-290.
- YOUNG, N.D.; DANESH, D.; MENANCIO-HAUTEA, D.; KUMAR, L., 1993: Mapping oligogenic resistance to powdery mildew in mungbean with RFLPs. *Theor. Appl. Genet.* 87, 243–49
- ZAHOROVSKA, E., 1988: Parasitic *Microsphaera* and its ascocarp state on Slovakian oaks. *Ceska Mykol.* 42, 149–157.
- ZENG Z.B., 1994: Precise mapping of quantitative trait loci, *Genetics* 136, 1457-1468.
- ZHAN, J.; MUNDT, C.C.; HOFFER, M.H.; McDONALD, B.A., 2002: Local adaptation and effect of host genotype on the rate pathogen evolution: an experimental test in a plant pathosystem. *Journal of Evolutionary Biology* 15, 634-647.
- ZHANG, D. ; ZHANG, Z ; YANG, K., 2006 : QTL analysis of growth and wood chemical content traits in an interspecific backcross family of white poplar (*Populus tomentosa* × *P. bolleana*) × *P. tomentosa*. vol. 36, n°8, pp. 2015-2023.
- ZOLAN, M. E.; PUKKILA, P. J., 1986: Inheritance of DNA methylation in *Coprinus cinereus*. *Mol. Cell.Biol.* 6, 195–200.

# **Annexe : Inoculation de l'oïdium par suspension sporale**

## **1/ Principe de la méthode**

Suivre la croissance mycélienne de l'oïdium du chêne

## **2/ Matériels nécessaires**

Bacs en Aluminium autoclavés

Papier filtre

Boîte de Pétri contenant du milieu ERGB

Eau permutée stérile

Pincés, scalpels et ciseau

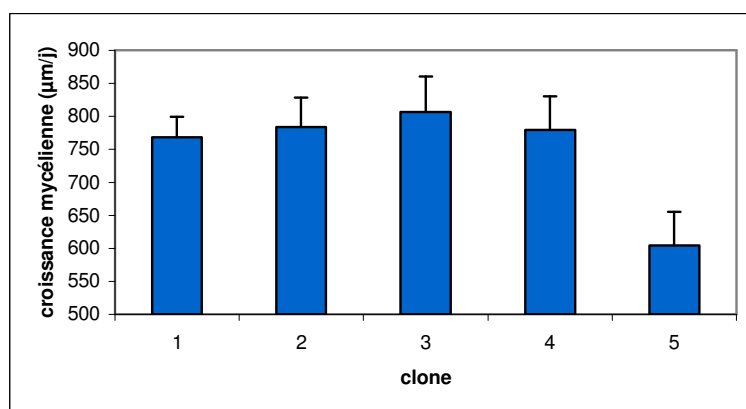
## **3/ Etude des facteurs de variation**

### **La résistance due à l'état physiologique du matériel végétal**

Une expérimentation a été réalisée pour préciser la variation de la résistance au sein d'un même génotype de chêne pédoncule (plusieurs clones du même génotype). Plusieurs copies du même génotype ont été inoculées, en prélevant plusieurs feuilles par plant (copie), sur des branches ayant débourré à des dates différentes (pour évaluer l'effet de la phénologie). Cinq génotypes de chênes du croisement intra-spécifique utilisé pour la recherche de QTL de résistance à l'oïdium (85, 297, 366, 377 et 384) ont été utilisés, à raison de 4 à 6 copies par génotype. L'échantillonnage a été réalisé à raison d'une feuille par génotype, par copie et par branche. On a ensuite procédé à une inoculation par suspension sporale (450 spores/ 2.5 $\mu$ l) de ces feuilles. L'expérimentation a été réalisée sur 3 jours constituant les répétitions.

On observe une forte variation intra génotype : coefficient de variation allant de 30 à 55% pour la taille des lésions. Cette variation pourrait être en partie expliquée par l'état physiologique des différentes copies. Nous avons en effet noté la couleur claire de certains plants. La croissance moyenne des lésions est de 731 $\mu$ m/j pour les feuilles normales alors que la moyenne est de 495  $\mu$ m/j pour les feuilles chlorosées.

Si on ne considère que les plants non chlorosés et les inoculations réussies, le coefficient de variation varie de 20 à 45. On obtient les résultats suivants (Figure 1).



**Figure 1 : Taille de la lésion en fonction des génotypes**

(1 :85, 2 : 297, 3 : 366, 4 : 377, 5 : 384)

L'analyse de variance ne montre pas d'effet significatif du génotype, ni de la copie intra génotype ou de la feuille, ni d'effet âge de la feuille. Le tableau 1 montre que la majeure partie de la variance pour les composantes liées au végétal est due à l'effet individu, plus que l'effet descendance ou feuille, ce qui confirme l'effet du plant sur l'installation de la maladie.

**Tableau 1: Analyse des composantes de la variance**

%	
arbre	3
descendant	36
feuille	11
erreur	50
TOTAL	1,00

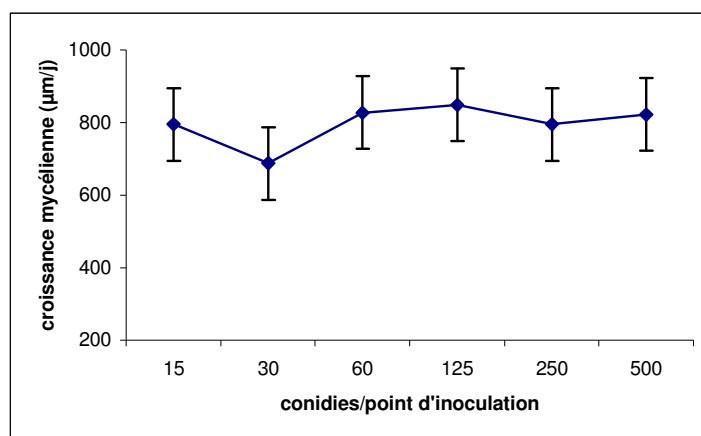
### **La concentration de l'inoculum ou absence de conditions optimales**

Le taux global de réussite des inoculations est de 72.5%. Lors de l'examen des taches d'oïdium à la loupe binoculaire pour les notations, nous avons observé parfois un séchage incomplet des gouttes d'inoculum. Dans ce cas, le taux de réussite des infections tombe à 30%, alors qu'il est de 80% pour les inoculations sans trace de goutte (=séchage complet).

Sachant que les spores d'oïdium requièrent certaines conditions pour la germination notamment l'absence d'eau (YARWOOD 1950), on a testé l'effet de l'humidité par le facteur temps de séchage de la « goutte inoculum ». Pour cela, nous avons procédé à une inoculation de semis de chêne avec 6 modalités pour le temps de séchage (15 min, 30 min, 45 min, 1h, 1h30 et 2h). Toutefois, la croissance mycélienne journalière ne semblait pas varier en

fonction de ce facteur. On a remarqué qu'une durée moyenne de 45 min à 1h était nécessaire au séchage complet de l'inoculum.

La quantification de l'inoculum peut être un facteur crucial pour les études épidémiologiques et génétiques basées sur l'évaluation quantitative de la maladie. En effet, une forte dose de l'inoculum peut masquer la résistance de quelques génotypes (NICOT *et al.* 2003) et empêcher la détection de la sensibilité différentielle à l'oïdium. Nous avons alors testé l'effet de la concentration de conidies en testant 6 modalités (15, 30, 60, 125, 250 et 500 spores/2.5µl) avec 4 répétitions chacune. L'allure de la courbe (Figure 2) montre la présence d'un pseudo plateau à partir de ~ 100 spores /2.5µl. Le choix a été donc fait pour des inoculations à 125 spores par goutte.



**Figure 2: Evolution de la croissance mycélienne/j en fonction de la concentration de la suspension sporale**

#### 4/ Mode opératoire

##### **STERILISATION ET PREPARATION DES FEUILLES**

- Prélever les feuilles jeunes au bon stade (ni trop molles ni trop cireuses), les feuilles doivent être un peu duveteuses.
- Couper les extrémités des feuilles, côté pétiole à l'aide d'un ciseau bien aiguisé
- Rincer les feuilles pendant une quinzaine de minutes dans un bain de 2 litres d'eau permutée additionnée d'une goutte de tween. Les feuilles ne sont plus hydrofuges.
- Allumer les UV pendant 15mn et mettre dessous :
  - \* les bacs autoclavés
  - \* les bouteilles d'eau stérile
  - \* la spatule



- \* la loupe binoculaire
- \* les pinces

### **SOUS LA HOTTE**

Désinfecter les feuilles dans un bain d'1L hypochlorite de calcium (40g/1l d'eau stérile sur agitateur puis filtré) pendant 3 min en remuant peu et délicatement sinon risque de nécrose (20 feuilles/ bain au maximum).

Prélever les feuilles, les égoutter et les rincer dans un premier bain d'eau permutée stérile.

Rincer les feuilles 10 min dans un deuxième bain d'eau permutée stérile.

Faire sécher les feuilles entre des feuilles de papier stérile.

Poser les feuilles sans les appuyer dans les boîtes de pétri, face inférieure côté gélose (ERGB).

### **Préparation de l'inoculum**

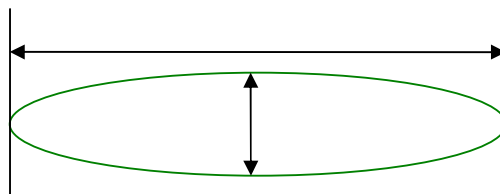
- Choisir une feuille oïdiée de 12 à 20 jours avec des chaînettes de conidies bien individualisées
- Faire tomber les conidies avec 1 ml d'eau permutée (aller et retour avec la pipette) (il est souhaitable de disposer de 2 feuilles bien sporulantes / souche.
- Vérifier au microscope la concentration des spores (150 à 200 spores/ 2.5 µl de suspension) à l'aide d'une lame de Malassez (3 comptages) et ajuster la concentration si nécessaire soit en diluant la suspension par de l'eau permutée stérile soit rinçant une seconde tache avec la suspension déjà préparée.

### **Inoculation**

- Maintenir la suspension dans la glace durant toute la durée de la préparation et de l'inoculation (agiter régulièrement).
- Déposer une goutte de 2.5µl de cette suspension sur chaque feuille, loin d'une nervure et sur une zone plane.
- Vérifier la concentration de la suspension à la fin des inoculations
- Laisser sécher la goutte ½ à 1h sous la hotte boîte de pétri ouverte.
- Placer les boîtes de pétri à 22°C avec une photopériode de 12h de jour dans la chambre de culture.

### **Notation**

Après une incubation de 12 jours, on fait les notations des taches d'oïdium à la loupe binoculaire. Deux mesures sont prises par feuille L et l (comme présentées par le schéma ci-dessous).



Les valeurs de L et l sont ensuite reportées à une même unité, les valeurs notées en nombre de graduations doivent donc être converties en  $\mu\text{m}/\text{j}$ .

### **Préparation du milieu ERGB :**

Peser 20g de Bacto Agar

Compléter avec de l'eau du Robinet jusqu'à 1L.

Bien agiter le mélange

Autoclaver à 121°C pendant 20mn

Ajouter 1ml de benzimidazole lorsque le milieu a un peu refroidit

Bien agiter le milieu avant de commencer

Puis verser à peu près 15 ml de milieu dans chaque boîte

Laisser reposer (1 à 2 heures) sous la hotte

### **Préparation de l'hypochlorite :**

25 g d'hypochlorite de calcium à 65% Attention, l'hypochlorite se dégrade rapidement. Si le flacon est ouvert depuis longtemps, il est possible que la stérilisation soit moins efficace)

500 ml d'eau permutée

Mélanger avec un agitateur à 750 t/mn

Filtrer la suspension (opération longue)

Nettoyer les cristallisoirs afin d'éliminer tous les dépôts.