HAL
open science

Étude des traits d'histoire de vie de "Melampsora larici-populina", agent de la rouille du peuplier : de leur déterminisme génétique à leurs conséquences évolutives

Michaël Pernaci

To cite this version:

Michaël Pernaci. Étude des traits d'histoire de vie de "Melampsora larici-populina", agent de la rouille du peuplier : de leur déterminisme génétique à leurs conséquences évolutives. Sylviculture, foresterie. Université de Lorraine, 2015. Français. NNT : 2015LORR0064 . tel-01751695

HAL Id: tel-01751695

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01751695

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Faculté des Sciences et Technologies
Ecole doctorale Ressources Procédés Produits Environnement
Département de Formation Doctorale Sciences Agronomiques et Forestières, Biologie et Ecologie, Biotechnologies
Spécialité Biologie Végétale et Forestière

Thèse

Présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Lorraine

Par

Michaël PERNACI

Etude des traits d'histoire de vie de *Melampsora larici-populina*, agent de la rouille du peuplier : de leur déterminisme génétique à leurs conséquences évolutives

Soutenue publiquement le 25 Juin 2015 devant la commission d'examen :

Catherine BASTIEN	Directrice de Recherche, INRA Orléans	Rapporteure
Cécile ROBIN	Directrice de Recherche, INRA Bordeaux	Rapporteure
Didier THARREAU	Chercheur, Cirad Montpellier	Rapporteur
Marie FOULONGNE-ORIOL	Chargée de Recherche, INRA Bordeaux	Examinatrice
Eric GELHAYE	Directeur de Recherche, INRA Nancy	Examinateur
Pascal FREY	Directeur de Recherche, INRA Nancy	Directeur de thèse

Membre invité :

Fabien HALKETT	Chargé de Recherche, INRA Nancy	Codirecteur de thèse

UMR 1136 INRA / Université de Lorraine, Interactions Arbres - Microorganismes
Equipe Ecologie des Champignons Pathogènes Forestiers
Centre INRA de Nancy, Champenoux

REMERCIEMENTS

Ce manuscrit de thèse marque la fin d'une longue aventure que j'ai débutée en 2010 par mon stage de master 1, que j'ai par la suite approfondie au cours de mon stage de master 2 en 2011. La thématique de recherche étant passionnante et l'équipe très chaleureuse, je n'aurais pu espérer trouver meilleures conditions de travail pour réaliser une thèse.

Je me permets tout d'abord de remercier les membres du jury pour l'honneur qu'ils me font en acceptant de considérer ce travail. Je suis reconnaissant envers Catherine Bastien, Cécile Robin et Didier Tharreau d'assumer la lourde tâche de rapporteurs, pour laquelle je les remercie vivement. Je remercie aussi sincèrement Marie Foulongne-Oriol et Eric Gelhaye de me faire l'honneur de juger ce travail. J'adresse également mes remerciements aux membres de mes comités de thèse, Véronique Jorge, Elisabeth Fournier, Didier Tharreau et Thierry Marcel, qui grâce à leurs regards extérieurs, m'ont prodigués d'excellent conseils.

Je tiens à remercier Pascal Frey, mon directeur de thèse, pour la qualité de son encadrement. Tu as toujours su te montrer disponible et prendre le temps de répondre à mes questions, en faisant preuve d'une pédagogie sans faille. Merci pour les qualités humaines dont tu as fait preuve à mon égard, dans les moments heureux (une scène en particulier m'a marquée) comme dans les périodes de doutes que j'ai pu traverser. Tu m'as écouté quand j'en ai eu besoin et tu as fait preuve de beaucoup de compréhension. Ayant été officiellement ton premier thésard depuis ton HDR, je peux affirmer que mon successeur aura beaucoup de chance de travailler avec toi.

Merci également à Fabien Halkett, Stéphane De Mita et Bénédicte Fabre, qui ont grandement participé à mes travaux de thèse. Les conseils que vous m'avez prodigués, les idées que vous m'avez soufflées et les compétences dont vous disposez sur vos thématiques de recherches respectives ont été des atouts certains pour mes travaux. Rien de ce qui a été accompli ne l'aurait été sans vous. Merci à Sébastien Duplessis, chef de l'équipe d'éco-génomique, pour sa participation indispensable à mes travaux de thèse, pour sa sympathie, son écoute et…ses ribs de compèt!

Merci également à Jérémy Pétrowski pour son aide indispensable au cours de mes expérimentations, ce qui m'a permis de considérablement les alléger. Merci aux stagiaires que

j'ai eu l'occasion d'encadrer, Mathilde Chertier, Lucile Delfosse et Célia Gobillard, pour m'avoir permis d'avancer de la sorte. Sans vous, j'en serais encore à rédiger l'introduction de ce manuscrit à l'heure qu'il est. Merci à Axelle Andrieux et Claude Husson pour leurs explications et conseils précieux concernant les techniques de biologie moléculaires. Axelle, je n'ai jamais rencontré quelqu'un d'aussi joyeux que toi, puisque sur une journée entière tu dois cumuler environ 10 heures de fous rires. Tu es le soleil de cette équipe, ne change pas car ça fait beaucoup de bien. Merci à Benoit Marçais pour son aide sous R, tu m'as permis de me sortir de situations dont je ne voyais pas le bout. Merci à Olivier Caël et Anaïs Gillet pour leur sympathie ainsi qu'à Katy Hayden pour nos discussions qui m'ont notamment permis d'améliorer mon expression orale en Anglais.

Un grand merci à mes camarades de bureau, avec qui j'ai passé des moments magiques et qui m'ont beaucoup soutenu. Merci à Jaime Aguayo, mi amigo, qui nous a quitté depuis mais qui n'est pas allé bien loin. Je garderai un excellent souvenir de ces années à travailler ensemble. Merci à Antoine Persoons pour son humour si particulier, capable du meilleur comme du pire, en passant par les jeux de mots les plus subtils à l'humour le plus trash. Tu m'as bien fais marrer. Parfois t'étais le meilleur, le top…le king…Ah il le sait, il le sait (Youn *et al.* 2003)! Merci pour ces moments de détente et de rigolade, où l'on a notamment découvert la fonction parlante de Google translate pour notre plus grand bonheur. Ce fut un plaisir de travailler à tes côtés et de pouvoir bénéficier de ton soutien. J'ai trouvé en toi un ami sur qui j'ai pu compter chaque fois où j'en ai eu besoin. Merci à Marie Grosdidier, fraichement arrivée dans notre bureau de mecs, pour avoir apporté un peu de délicatesse et de grâce dans ce lieu de travail où les règles de bonne tenue n'avaient plus cours.

Merci également à ceux qui nous ont quittés au cours de ma thèse et que j'ai eu la chance de côtoyer, Constance Xhaard, Aurore Coince et Thomas Scordia pour leur sourire et leur bonne humeur communicative. Mille merci à Nicole Thirion, Agnès Didier et Marie-Claude Monchablon, les gestionnaires de l'unité, pour leur gentillesse et leur aide concernant les nombreux documents administratifs que j'ai eu à remplir.

Je tiens à remercier ma famille pour son soutien indéfectible. Papa, maman, merci de m'avoir toujours encouragé à aller le plus loin possible dans mes études supérieures. Mais pour le moment je pense que je vais m'arrêter là, ça suffit pour l'instant! Merci également à ma grand-mère qui nous a quittés au cours de ma thèse et qui, ayant juste retenu que j'étudiais un champignon, me demandais à chaque fois : «Alors les champignons, ça pousse?». Merci de

m’avoir soutenu à ta manière. Merci également à ma belle-famille pour son appui, j’ai beaucoup de chance de pouvoir compter sur vous.

Enfin, je remercie du fond du cœur mon épouse et mon fils pour le soutien qu’ils m’ont apporté au quotidien. Aurélie, merci de m’avoir réconforté quand je rentrais dépité du laboratoire parce qu’une manip n’avais pas fonctionné. Ce n’est pas sans une certaine honte que je te remercie de m’avoir aidé à l’acquisition de données quand je croulais sous la masse de travail. La taille des urédies de *M. larici-populina* n’a aujourd’hui plus de secret pour toi. Merci à toi, Nolan, de m’avoir remonté le moral par tes sourires et tes éclats de rires. En rentrant à la maison, un câlin de ta part suffisait à me faire oublier la pénible journée que je venais de passer. Vous êtes mes rayons de soleil, qui m’ont permis de supporter et d’achever cette thèse. Je vous aime…

Merci à tous ceux que j’aurais oublié de citer et qui le mériteraient.

Mille merci à vous tous

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE 1

1. Pouvoir pathogène et résistances des plantes: une interaction complexe 2

1.1. Les résistances de la plante 2

1.2. Le pouvoir pathogène de l'agresseur 3

1.3. Interaction entre le pouvoir pathogène de l'agresseur et la résistance de l'hôte 3

2. Historique de la gestion des champignons pathogènes par les résistances qualitatives de la plante et conséquences 4

3. Les traits d'histoire de vie des champignons pathogènes 6

3.1. Les traits d'agressivité 6

3.1.1. Le cycle infectieux des champignons pathogènes 6

3.1.2. Les traits d'agressivité mesurés chez les champignons pathogènes 7

3.1.3. Expression des traits d'agressivité : un contrôle partagé par les deux partenaires 8

3.1.4. Effets des facteurs environnementaux sur l'expression des composantes de l'agressivité 10

3.1.5. Liens entre traits d'agressivité et potentiel adaptatif des champignons pathogènes 11

3.1.6. Contribution des traits d'agressivité à l'adaptation des champignons pathogènes 14

3.1.7. Structuration des populations de champignons pathogènes par les traits d'agressivité 16

3.2. Les traits morphologiques des spores 17

3.2.1. Les traits morphologiques mesurés 17

3.2.2. Impact potentiel des traits morphologiques des spores sur les populations d'un champignon pathogène 17

4. Le pathosystème Rouille / Peuplier 18

4.1. *Melampsora larici-populina*, l'agent de la rouille du peuplier 18

4.1.1. Biologie de *M. larici-populina* 18

4.1.2. Cycle de vie de *M. larici-populina* 19

4.2. L'hôte écidien, le mélèze 20

4.3. L'hôte télien, le peuplier 20

4.3.1. Le peuplier noir 21

4.3.2. Les peupliers cultivés 21

4.4. Etat des connaissances sur l'évolution des traits qualitatifs et quantitatifs de *M.larici-populina* 22

4.4.1. L'évolution des traits qualitatifs de *M. larici-populina* 22

4.4.2. L'évolution des traits quantitatifs de *M. larici-populina* 23

4.5. Le site de la vallée de la Durance 24

OBJECTIFS DE LA THESE 26

MATERIELS ET METHODES 28

1. La mesure des traits qualitatifs et quantitatifs 28

1.1. Caractérisation des traits qualitatifs 28

1.2. Caractérisation des traits quantitatifs 28

1.2.1. Les traits d'agressivité 28

1.2.2. Les traits liés à la morphologie des spores 32

2. Estimation des forces évolutives à l'origine de l'évolution des traits quantitatifs ... 33
2.1. Les forces évolutives potentiellement en cause ... 33
2.2. L'approche Q_{ST}-F_{ST} : principe et calculs des estimateurs de divergence génétique neutre et phénotypique entre populations ... 34
3. Le concept de l'héritabilité ... 36
3.1. La mesure de l'héritabilité ... 36
3.2. L'héritabilité, une mesure constante ? ... 38
3.3. Les idées fausses liées au concept d'héritabilité ... 38
4. La cartographie génétique ... 39
4.1. Définition et principe de la construction d'une carte génétique ... 39
4.2. Méthodologie: Les étapes clés de la construction d'une carte génétique ... 39
4.2.1. La production d'une population en ségrégation ... 40
4.2.2. Identification de marqueurs moléculaires polymorphes et génotypage de la descendance ... 41
4.2.3. Analyses bio-informatiques des données de ségrégation des marqueurs ... 43
5. La cartographie de QTL ... 45
5.1. Le principe de la cartographie de QTL ... 45
5.2. Méthodologie de l'analyse de QTL ... 46
5.2.1. Les méthodes d'analyses et logiciels ... 46
5.2.2. Les étapes clés de l'analyse de QTL ... 47
5.3. Les facteurs déterminants l'analyse de QTL ... 48
RESULTATS ... 50
Chapitre 1: Influence des traits d'histoire de vie sur la structuration des populations de *Melampsora larici-populina* : cas des traits liés à la morphologie des spores ... 50
ARTICLE 1: EVOLUTION OF SPORE SIZE DURING DISPERSAL OF THE POPLAR RUST FUNGUS MELAMPSORA LARICI-POPULINA ... 51
Article en préparation
Chapitre 2: Architecture génétique de traits morphologiques et d'agressivité au sein d'une descendance de *M. larici-populina* ... 77
ARTICLE 2: GENETIC ARCHITECTURE OF LIFE HISTORY TRAITS IN THE POPLAR RUST FUNGUS *MELAMPSORA LARICI-POPULINA* ... 78
Article en préparation
Chapitre 3: Vers la construction d'une carte génétique de *Melampsora larici-populina*, support de la cartographie des loci codants les traits d'histoire de vie ... 108
ARTICLE 3: GENOME-WIDE PATTERNS OF SEGREGATION AND LINKAGE DISEQUILIBRIUM : THE CONSTRUCTION OF A LINKAGE GENETIC MAP OF THE POPLAR RUST FUNGUS *MELAMPSORA LARICI-POPULINA* ... 109
Article publié en 2014 dans la revue *Frontiers in Plant Science* 5: article 454
Chapitre 3-bis : Construction d'une carte génétique de *Melampsora larici-populina*, support de la cartographie des loci codants les traits d'histoire de vie ... 145
1. Introduction ... 145
2. Matériels et méthodes ... 146
3. Résultats ... 148
4. Discussion ... 149

Chapitre 4 : Cartographie d'un locus de virulence et de QTL de traits quantitatifs chez *M. larici-populina* 151
1. Introduction 151
2. Matériels et méthodes 151
3. Résultats 152
4. Discussion 153

DISCUSSION GENERALE 155

1. Liens entre traits d'histoire de vie et évolution de *M. larici-populina* 155
1.1. Evolution des traits morphologiques des spores de *M. larici-populina* 155
1.2. Impact des traits d'histoire de vie sur le potentiel adaptatif de *M. larici-populina* 158
1.3. Confrontation entre modèles théoriques et études empiriques 161
1.4. Enseignements pour les stratégies de déploiement des cultivars de peuplier à résistances quantitatives 162
2. Carte génétique de *M. larici-populina* 163
2.1. Quelles utilisations ? 163
2.2. Les perspectives découlant des données de re-séquençage 164
3. Les apports des analyses de QTL 165

CONCLUSION 168

BIBLIOGRAPHIE 169

Introduction

INTRODUCTION GENERALE

Dans un contexte d'explosion démographique mondiale (9 milliards d'êtres humains en 2050), conjuguée aux changements climatiques majeurs, la sécurité alimentaire et énergétique de la population humaine constitue une question centrale et un enjeu majeur pour la recherche agronomique. Le maintien d'une forte production agricole, qu'elle soit dédiée à la production de denrées alimentaires ou de biomasse énergétique, nécessite de disposer de moyens de lutte efficaces contre les bio-agresseurs des cultures. Certaines caractéristiques des agents phytopathogènes, comme la multiplicité des cycles infectieux et la réalisation d'une reproduction sexuée, leur confère l'aptitude à s'adapter rapidement à des modifications de leur environnement biotique et abiotique (McDonald & Linde 2002), réduisant très fortement l'efficacité de ces moyens de lutte. Une méthode de lutte classiquement utilisée pour lutter contre les agents pathogènes est l'utilisation régulière et en grande quantité de produits phytosanitaires. Outre leurs coûts importants, l'utilisation de ces produits s'est révélée très nocive pour l'environnement (pollution des nappes phréatiques, impact sur la faune et la flore). De plus, l'utilisation de ces moyens de lutte se révèle très couteuse. Par exemple, les dépenses en pesticides en France se sont élevées en 2010 à environ 3 milliards d'euros, toutes filières confondues, représentant un coût moyen de 110 euros à l'hectare (http://agriculture.gouv.fr/L-utilisation-des-pesticides-en). En outre, malgré une protection relativement efficace des produits phytosanitaires contre les agents pathogènes, leur adaptation rapide a considérablement réduit leur efficacité et en font une solution peu durable sur le long terme. L'échec de la gestion de la septoriose du blé, causée par *Zymoseptoria tritici*, par l'utilisation de fongicides en est une bonne illustration. En effet, ce champignon pathogène ayant développé des résistances vis-à-vis de la majorité des pesticides récemment développés (Leroux *et al.* 2007), la gestion de cette maladie par l'utilisation de ces produits s'avère peu efficace. Par conséquent, le nombre d'applications et de types de traitements ne cesse d'augmenter dans de nombreux systèmes agricoles (De Lapeyre de Bellaire *et al.* 2009). Les coûts élevés liés à l'utilisation de ce type d'intrants, leurs impacts négatifs sur l'environnement ainsi que leur relative inefficacité a conduit le gouvernement français à lancer le plan ECOPHYTO 2018, qui vise à réduire progressivement l'utilisation des pesticides au profit d'autres modes de lutte. Une alternative potentiellement plus

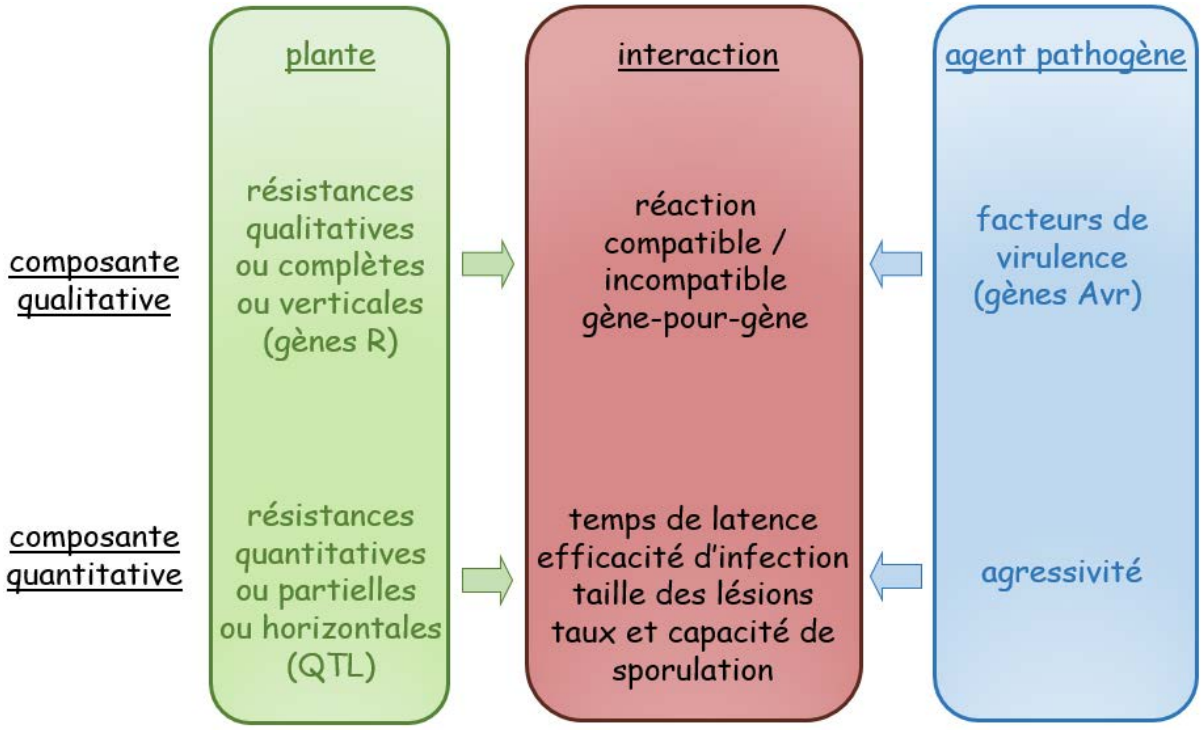


Figure 1: Description des composantes qualitatives et quantitatives du pouvoir pathogène et de la résistance des plantes et de la résultante de leur interaction.

durable et respectueuse de l'environnement à l'utilisation massive et systématique de produits phytosanitaires et de réussir à tirer parti des résistances variétales existantes pour lutter contre les bio-agresseurs des cultures, à savoir des résistances qualitatives et quantitatives de la plante hôte.

1. Pouvoir pathogène et résistances des plantes: une interaction complexe

Le développement d'une maladie, caractérisé par sa sévérité, est conditionné par l'interaction de deux caractéristiques fondamentales des protagonistes : les résistances de la plante et le pouvoir pathogène de l'agresseur (Figure 1).

1.1. Les résistances de la plante

La résistance d'une plante se définit comme la capacité à éviter ou à limiter une maladie, et se divise en deux composantes :

- D'une part, on distingue la résistance qualitative (ou complète, race-spécifique, verticale, ou encore gènes majeurs de résistance), qui confère à la plante hôte une résistance totale à certains isolats d'un agent pathogène, mais pas à tous les isolats (Lepoivre 2003). Ce type de résistance variétale repose sur un déterminisme génétique simple, souvent monogénique, qui conditionne la compatibilité de l'interaction entre l'hôte et l'agent pathogène selon la relation gène-pour-gène (Flor 1971). Ce concept a été formalisé pour la première fois par Harold Henry Flor en 1946 et démontré empiriquement dans le cadre de ses études sur la génétique de l'interaction entre le lin et *Melampsora lini*, l'agent de la rouille du lin. Ce concept postule qu'à chaque gène de résistance de l'hôte, présentant un allèle de résistance R (dominant) ou un allèle de sensibilité r (récessif), correspond un gène d'avirulence de l'agent pathogène.

- D'autre part, on distingue la résistance quantitative (ou partielle, générale, non race-spécifique ou horizontale), qui confère une résistance partielle exprimée vis-à-vis de tous les isolats d'un agent pathogène. Ainsi, un cultivar porteur d'une résistance quantitative sera sensible à toutes les souches d'un agent pathogène mais avec une sévérité variable selon la souche (Lepoivre 2003). Contrairement aux résistances qualitatives, ce type de résistance variétale repose le plus souvent sur un déterminisme polygénique (Kou & Wang 2010; Gonzalez *et al.* 2012). Les résistances quantitatives sont gouvernées par plusieurs gènes dont

les effets sont cumulatifs (Schiff *et al.* 2001) et que l'on décrit en général sous la forme de QTL (Quantitative Trait Loci) ; chaque QTL contenant par définition un gène ou un ensemble de gènes déterminant un effet particulier sur le développement de l'agent pathogène (Lindhout 2002).

1.2. Le pouvoir pathogène de l'agresseur

Le pouvoir pathogène se définit comme la capacité d'un agent pathogène à engendrer la maladie chez la plante hôte, et se divise en deux composantes (van der Plank 1963). D'une part, on distingue une composante qualitative du pouvoir pathogène, la virulence, qui est le pendant de la résistance qualitative de la plante hôte. Elle se définit comme la capacité d'un agent pathogène à engendrer la maladie. A l'instar de la résistance qualitative, la virulence de l'agent pathogène repose sur un déterminisme monogénique, et présente un allèle d'avirulence Avr (dominant) et un allèle de virulence avr (récessif) pour chaque gène. D'autre part, on distingue une composante quantitative du pouvoir pathogène, l'agressivité, qui est le pendant de la résistance quantitative de la plante hôte. L'agressivité se définit comme la quantité de maladie infligée par l'agent pathogène à la plante hôte et se compose d'un ensemble de traits associés à la maladie. A l'instar de la résistance quantitative, plusieurs études ont suggéré que l'agressivité de l'agent pathogène repose sur un déterminisme polygénique (Caten 1974; Blanch *et al.* 1981; Hawthorne *et al.* 1994; Cumagun *et al.* 2004), et se trouve codée par des QTL d'agressivité. Il est important de noter que le terme "virulence" est employé dans son acception qualitative en phytopathologie (van der Plank 1963) et dans son acception quantitative en pathologie animale ou humaine, qui correspond à "agressivité" en phytopathologie.

1.3. Interaction entre le pouvoir pathogène de l'agresseur et la résistance de l'hôte

L'interaction entre les composantes qualitatives de la résistance de la plante hôte (résistance qualitative) et du pouvoir pathogène (virulence) de l'agent pathogène se traduit par des interactions de compatibilité/incompatibilité, conduisant respectivement à l'échec ou à la réussite de l'infection de l'hôte par l'agent pathogène. En effet, selon la relation gène-pour-gène, l'interaction est incompatible et ne conduit pas au développement de la maladie lorsque l'agent pathogène présente un phénotype d'avirulence et lorsque la plante hôte présente un

phénotype de résistance (Tableau 1). Dans ce cas le produit du gène d'avirulence est reconnu par le produit du gène de résistance de la plante hôte qui déclenche alors des réactions de défense en cascade. A l'inverse, l'interaction est compatible dans les trois autres combinaisons (Tableau 1).

Au-delà de cette relation de type "tout ou rien", l'interaction entre les composantes quantitatives de la résistance de la plante hôte (résistance quantitative) et du pouvoir pathogène (agressivité) se traduit par une interaction compatible, dont l'intensité dépend des caractéristiques quantitatives des deux partenaires.

2. Historique de la gestion des champignons pathogènes par les résistances qualitatives de la plante et conséquences

Depuis un demi-siècle, la gestion des maladies des plantes a principalement consisté au déploiement à grande échelle de cultivars à résistances qualitatives à un champignon pathogène donné. Cependant, malgré une efficacité très satisfaisante à court terme, les résistances qualitatives déployées ont été, très souvent, rapidement mises en échec par l'évolution de la virulence du champignon. Le déterminisme monogénique de ce type de résistance s'est avéré être leur faiblesse, remettant en cause leur caractère durable. En effet dans ce système, le passage de l'avirulence à la virulence s'effectue par un seul changement génétique du gène d'avirulence, allant de la mutation ponctuelle à la délétion d'une région chromosomique (Gout *et al.* 2007), conférant une perte de reconnaissance par la plante hôte. Ceci mène à un contournement de résistance au champ pour lequel les champignons pathogènes s'adaptent à leur hôte résistant (Stukenbrock & McDonald 2009). Ainsi, même s'il existe des contre-exemples, la grande majorité des résistances qualitatives déployées au champ ont été plus ou moins rapidement contournées (Samborski 1985). Un exemple célèbre est celui de *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, agent de la rouille noire du blé, qui a successivement contourné l'ensemble des résistances qualitatives déployées au champ (Singh *et al.* 2011).

L'échec de la lutte contre les champignons pathogènes par l'utilisation des gènes de résistance qualitative a conduit les améliorateurs des plantes à s'intéresser aux résistances quantitatives des plantes, supposées être plus durable (Jorge *et al.* 2005; Brun *et al.* 2010; Fabre *et al.* 2012; Mundt 2014), c'est à dire restant efficaces sur une longue période en étant déployées à des grandes échelles spatiales (Johnson 1979). En effet, puisque ce type de

Tableau 1: Interaction entre l'agent pathogène et la plante hôte dans le cadre de la relation gène-pour-gène. La présence d'un allèle de résistance (dominant par rapport à l'allèle de sensibilité) chez la plante et d'un allèle d'avirulence correspondant (dominant par rapport à l'allèle de virulence) chez l'agent pathogène aboutit à l'échec de l'infection (ou interaction incompatible). Dans les trois autres combinaisons, il y a interaction compatible entre la plante et l'agent pathogène et donc infection de l'hôte. D'après Lepoivre 2003.

Phénotype de l'agent pathogène	Phénotype de la plante	
	Résistant	Sensible
Virulent	Compatible	Compatible
Avirulent	Incompatible	Compatible

résistance repose sur un ensemble de gènes mineurs, de multiples évènements de recombinaison et/ou mutations sont nécessaire pour que l'agent pathogène parvienne à les contourner (van den Berg *et al.* 2014). Dans ce cas, on s'attend à ce que ce phénomène d'adaptation se traduise par une érosion graduelle de la résistance plutôt que par un contournement brutale de celle-ci (McDonald and Linde 2002; Mundt *et al.* 2002). Cependant, les connaissances sur la durabilité effective de la résistance quantitative restent très limitées (Mundt 2002), son efficacité et la durabilité dépendant respectivement des caractéristiques et de l'évolution de l'agressivité au sein des populations de champignons pathogènes (McDonald et Linde 2002). Ainsi, il a été démontré que les résistances quantitatives peuvent être déjouées par l'évolution de l'agressivité du champignon (Pariaud *et al.* 2009a; Andrivon *et al.* 2007; Dowkiw *et al.* 2010; Caffier *et al.* 2014; Delmotte *et al.* 2014; van den Berg *et al.* 2014). Paradoxalement, il a été démontré que l'évolution et la structuration des populations de champignons pathogènes en systèmes agricoles sont fortement influencées par une sélection des traits quantitatifs exercée par l'hôte lui-même (Pariaud *et al.* 2009a; Leonard 1969; Chin & Wolfe 1984; Ahmed *et al.* 1996; Villaréal & Lannou 2000; Papaïx *et al.* 2011), qui peut s'opérer sur une période relativement courte (Leonard 1969). Cette sélection par l'hôte résulte notamment du contrôle partagé de l'expression des traits quantitatifs par l'hôte et le champignon (Lannou 2012), et favorise les individus les mieux adaptés en réponse aux résistances quantitatives. L'agressivité étant un caractère complexe résultant de l'interaction des composantes quantitatives de la plante hôte et du champignon pathogène et pouvant être soumises à des forces évolutives différentes, son évolution est donc complexe à appréhender. L'état actuel des connaissances sur les facteurs conditionnant l'agressivité d'un champignon pathogène ne nous permet pas de prédire son évolution en réponse aux pressions de sélection exercées par les résistances partielles de l'hôte. De plus, les traits liés à la morphologie des spores d'un champignon pathogène, une autre composante de ses traits quantitatifs, sont susceptible de conditionner son potentiel de dispersion et par conséquent d'évoluer en réponse à des pressions de l'environnement biotique ou abiotique, pouvant ainsi également intervenir dans les processus de structuration des populations du champignon pathogène à grande échelle.

Ainsi, il s'avère indispensable d'acquérir un maximum de connaissances sur les traits quantitatifs des champignons pathogènes (agressivité et morphologie des spores) de manière à améliorer la compréhension de leur adaptation en système agricole, ces traits pouvant conditionner la structuration des populations du champignon pathogène à grande échelle.

L'étude des traits quantitatifs permettrait ainsi de se rapprocher des concepts et outils utilisés en biologie évolutive pour comprendre l'évolution des caractéristiques phénotypiques, les stratégies d'adaptation et le lien entre valeurs de traits et fitness des champignons pathogènes. De plus, l'étude des traits quantitatifs permettra également d'ouvrir des pistes de travail pour l'amélioration des résistances quantitatives de l'hôte vis-à-vis de ses agresseurs (Lannou 2012).

3. Les traits d'histoire de vie des champignons pathogènes

En écologie, les traits biologiques ou traits d'histoire de vie se définissent comme l'ensemble des caractéristiques phénotypiques observables d'un organisme en lien avec sa croissance, sa survie, sa reproduction et sa dispersion. Ils concernent aussi bien des aspects de sa physiologie, de sa morphologie ou de son comportement. De par le rôle qu'ils jouent au cours des processus écologiques clés, les traits quantitatifs des champignons pathogènes, tels que l'agressivité et la morphologie des spores, s'apparentent aux traits d'histoire de vie classiquement étudiés en écologie sur divers taxa.

3.1. Les traits d'agressivité

Les traits d'agressivité des champignons pathogènes résultent de l'interaction des composantes quantitatives de la résistance de la plante hôte et du pouvoir pathogène du champignon. Par conséquent, on les mesure au cours du cycle infectieux du champignon (Hahn 2000), étape de son cycle biologique au cours duquel il interagit avec son hôte.

3.1.1. Le cycle infectieux des champignons pathogènes

La durée du cycle infectieux des champignons pathogènes varie selon le pathosystème considéré, et peut également varier selon le couple génotype hôte/génotype champignon pathogène pour un pathosystème donné. Par exemple, Le cycle infectieux de *Melampsora larici-populina*, agent de la rouille du peuplier, dure environ 7 jours à 19°C (Pinon & Frey 2005). Nous décrirons ici le cycle infectieux des champignons pathogènes appartenant à l'ordre des Pucciniales, ou agents de rouilles (Hahn, 2000).

Lorsque les urédospores du champignon pathogène disséminées par le vent tombent sur une feuille de l'hôte et que les conditions climatiques sont favorables (humidité saturante), celles-ci germent et émettent un tube germinatif (Figure 2). Celui-ci s'allonge jusqu'à rencontrer un stomate. Le tube germinatif se renfle en formant un appressorium, qui permet la pénétration du tube par l'orifice (l'ostiole) du stomate. Une vésicule se forme dans la chambre sous-stomatique. Cette vésicule donne naissance à des hyphes secondaires qui vont former des haustoria (suçoirs intracellulaires) dans les cellules végétales du parenchyme lacuneux. Dans le cas d'une interaction compatible (sensibilité), ces haustoria vont permettre au champignon de parasiter la plante et de former, en 10 jours environ, de nouvelles urédies. Dans le cas d'une interaction incompatible (résistance), les cellules végétales subissent une réaction hypersensible (HR) et se nécrosent au contact des hyphes secondaires, ce qui provoque un blocage de la progression du champignon.

3.1.2. Les traits d'agressivité mesurés chez les champignons pathogènes

Les traits d'agressivité classiquement étudiés en phytopathologie sont, du début à la fin du cycle infectieux, l'efficacité d'infection, la taille des lésions, la capacité de sporulation, le taux de sporulation et le temps de latence (Lannou 2012).

L'efficacité d'infection se définit comme la probabilité qu'une spore déposée à la surface d'une feuille sensible produise une lésion (Lannou 2012). La taille des lésions se définit comme la surface de la lésion productrice de spores (Kolmer & Leonard 1986; Robert *et al.* 2004), et est souvent considérée comme un indicateur de la capacité du champignon pathogène à coloniser les tissus de l'hôte (Pariaud *et al.* 2009b). Le taux de sporulation se définit comme le nombre de spores produites par lésion sporulante et par unité de temps (Leonard 1969; Clifford & Clothier 1974; Kardin & Groth 1989). Cependant, Pariaud *et al.* (2009b) ont observé que des différences de taux de sporulation entre deux génotypes de *Puccinia triticina* (agent de la rouille brune du blé) pouvaient s'expliquer à la fois par des différences de taille de lésions et par des différences de capacité de sporulation, qui correspond au nombre de spores produites par unité de surface sporulante et par unité de temps (Subrahmanyam *et al.* 1983; Dowkiw *et al.* 2003). Par conséquent, Lannou (2012) a suggéré que le taux de sporulation est un trait d'agressivité composite (au sens biologique), dérivé du produit de la taille de la lésion et de la capacité de sporulation, qui serait un indicateur de l'aptitude du champignon pathogène à exploiter les ressources de l'hôte (Pariaud *et al.* 2009b). Toutefois, c'est la capacité de sporulation qui, sur le plan expérimental, peut

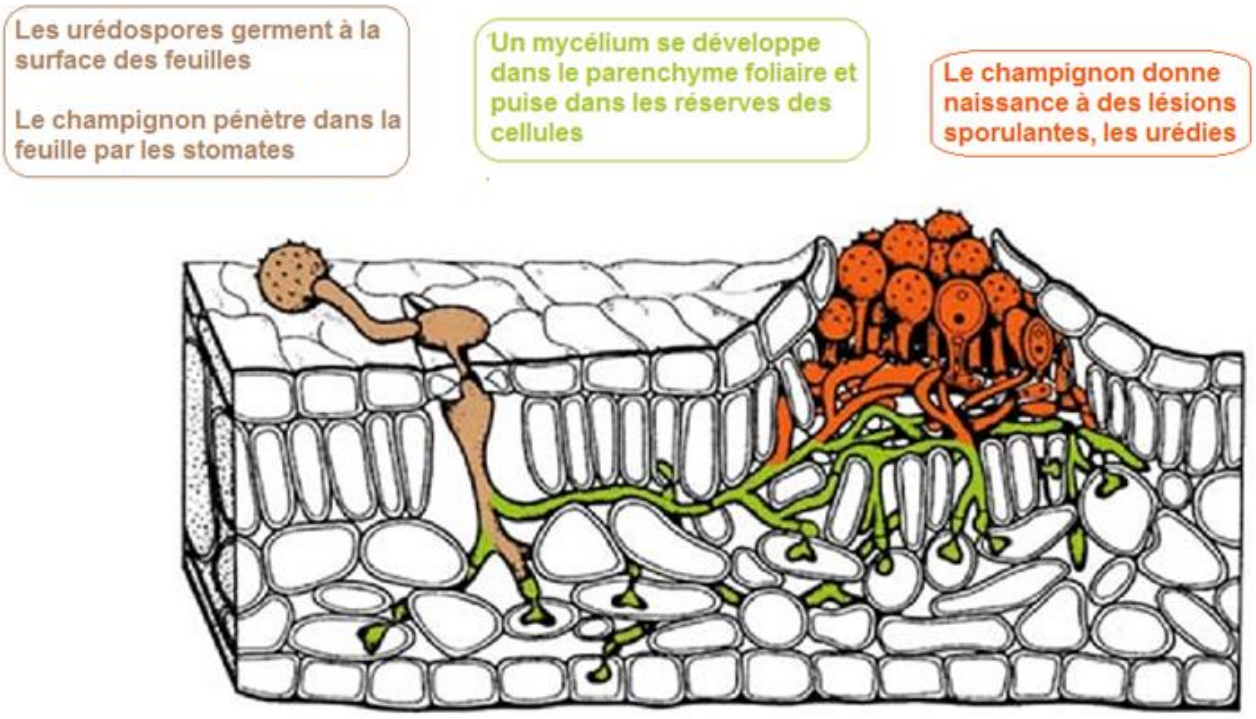


Figure 2: Schéma présentant les étapes successives du cycle infectieux d'une Pucciniale. D'après Hahn 2000.

être considéré comme un trait composite. En effet, seul le taux de sporulation et la taille des lésions sont mesurables directement en pratique, et la capacité de sporulation est estimée à partir de ces deux paramètres. Enfin, le temps de latence se définit comme l'intervalle de temps séparant l'infection de la plante par le champignon pathogène de l'apparition de la lésion sporulante (Lannou 2012).

A l'inverse des traits d'agressivité cités précédemment, la quantité de mycélium, défini comme la quantité d'hyphes mycéliens présents sous une lésion sporulante, et résultant de l'infection d'une spore, est nettement moins étudiée. En plus de la difficulté technique de mesure de ce trait, il ne présente aucun intérêt pour l'étude des champignons pathogènes ayant un mode de nutrition nécrotrophe. En effet, il est communément accepté que chez les champignons pathogènes nécrotrophes, la taille de la lésion sporulante est positivement corrélée à la quantité de mycélium sous-jacente, rendant sa mesure très peu informative. Cependant, la mesure de ce trait chez des champignons pathogènes biotrophes peut s'avérer très intéressante, aucune relation de proportionnalité entre la taille des lésions et la quantité de mycélium n'étant attendue a priori.

Les traits d'agressivité classiquement étudiés en phytopathologie, de par leur implication dans les processus écologiques des champignons pathogènes, s'apparentent aux traits d'histoire de vie étudiés généralement en écologie, notamment chez les végétaux. Ainsi, le temps de latence et le taux de sporulation chez les champignons pathogènes peuvent être considérés respectivement comme l'équivalent de l'âge à maturité et du nombre de graines produites par tige chez les végétaux. De même, la quantité de mycélium, paramètre qui conditionne l'acquisition des ressources disponible pour le champignon, peut-être assimilé à la surface spécifique foliaire chez les plantes, qui conditionne l'activité photosynthétique et donc la quantité de ressources disponibles. Enfin, l'efficacité d'infection mesurée chez les champignons pathogènes peut s'apparenter au succès d'établissement chez les plantes.

3.1.3. Expression des traits d'agressivité : un contrôle partagé par les deux partenaires

Pendant plusieurs décennies, il a été considéré que l'expression des traits quantitatifs d'un champignon pathogène était déterminée soit par le génotype de l'hôte, soit par le génotype du champignon (Lannou 2012). Dans ce système, l'agressivité d'une souche est la même quel que soit le génotype de la plante hôte, et le niveau de résistance quantitative de la

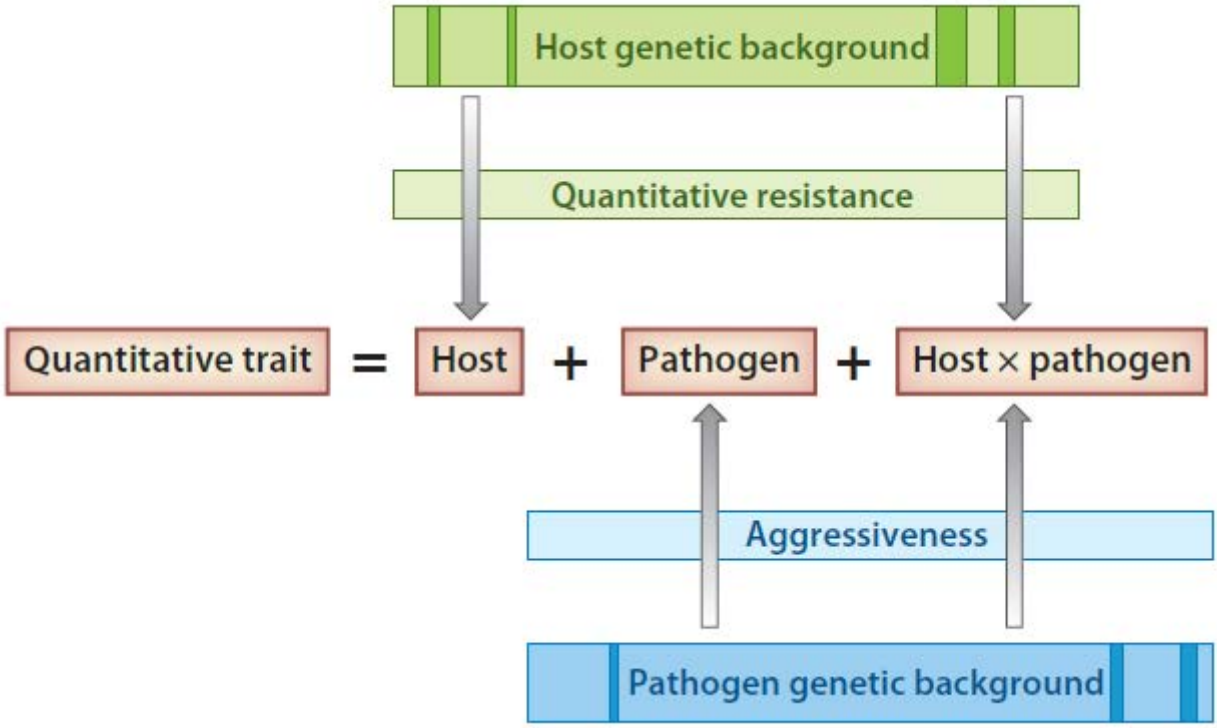


Figure 3 : Représentation du contrôle de l'expression des traits d'agressivité par le pathogène et la plante hôte. L'expression d'un trait d'agressivité est la résultante d'un effet de l'hôte, du pathogène et de leur interaction (au sens statistique). D'une part, les loci codants les traits quantitatifs (QTL) de résistance (vert foncé), détectés dans le fond génétique de l'hôte, définissent le niveau de résistance quantitatif (effet de l'hôte et de l'interaction). D'autre part, les loci codants les traits quantitatifs (QTL) d'agressivité (bleu foncé), détectés dans le fond génétique de l'agent pathogène, définissent son niveau d'agressivité (effet de l'agent pathogène et de l'interaction). D'après Lannou 2012.

plante hôte est le même quel que soit le génotype du champignon. Cette vue simplifiée du contrôle de l'expression des traits quantitatifs résulte du paradigme de van der Plank (1963), qui proposa de séparer le pouvoir pathogène en une composante qualitative, la virulence et une composante quantitative, l'agressivité, considérée comme la composante non-spécifique du pouvoir pathogène. Ceci a permis de relier d'une part les composantes qualitatives du pouvoir pathogène et de la résistance de la plante, respectivement déterminés par les gènes d'avirulence et les gènes de résistance correspondants, et d'autre part les composantes quantitatives d'agressivité et de résistance des deux partenaires. Malheureusement, ce paradigme a été mis à mal par la mise en évidence d'interactions génotype hôte X génotype du champignon pathogène (Caten 1974), largement observées par la suite (Pariaud *et al.* 2009a), démontrant que l'expression des traits quantitatifs n'est pas contrôlée uniquement par l'un ou l'autre des partenaires.

Les analyses plus récentes de QTL menées sur la résistance de l'hôte (Ballini *et al.* 2008) et sur l'agressivité du champignon pathogène (Lind *et al.* 2007b; Cumagun *et al.* 2004) ont mis en évidence la complexité de leur déterminisme génétique et le fait qu'il n'est pas résolu. Malgré cela, l'idée la plus communément acceptée au sein de la communauté scientifique et en particulier par les biologistes de l'évolution (Lambrechts *et al.* 2006), est de considérer que l'expression des traits d'agressivité du champignon pathogène est la résultante du contrôle partagé par le champignon, par la plante et par leur interaction (Lannou 2012), et non pas uniquement par la plante hôte ou le champignon (Figure 3).

En effet, chez la plante hôte, Calenge *et al.* (2004) ont mis en évidence dans le pathosystème Pommier-*Venturia inaequalis* l'existence de QTL à larges effets (exprimés indépendamment du génotype du champignon) ainsi que de QTL isolats-spécifiques (exprimés par la plante que lorsqu'elle est infectée par certains génotypes du champignon). De même, Marcel *et al.* (2008) ont démontré l'existence de QTL non-spécifiques et de QTL isolats-spécifiques chez la plante hôte dans le pathosystème Orge-*Puccinia hordei*. Enfin, Azzimonti *et al.* (2014) en sont arrivés très récemment aux mêmes conclusions dans le pathosystème Blé-*Puccinia triticina*. La détection de ces QTL isolats-spécifiques chez la plante hôte démontre bien la part d'implication de l'interaction hôte-agent pathogène dans l'expression des résistances des plantes.

En comparaison aux analyses de QTL de résistance de la plante hôte, les analyses de QTL d'agressivité des champignons pathogènes sont très rares. Seuls quelques QTL d'agressivité intervenant dans l'expression de la taille des lésions et de la croissance

mycélienne d'*Heterobasidion annosum* s.l. (Lind *et al.* 2007b) et dans la synthèse de mycotoxines de *Gibberella zeae* (Cumagun *et al.* 2004) ont été identifiés, sans pouvoir mettre en évidence de spécificité de QTL d'agressivité vis-à-vis du génotype de la plante hôte. Cependant, Pariaud *et al.* (2013) ont récemment mis en évidence chez *Puccinia triticina* des interactions génotypes de l'hôtes X génotypes du champignon dans la covariance entre le temps de latence et la capacité de sporulation du champignon, suggérant l'intervention de QTL d'agressivité cultivar-spécifique.

3.1.4. Effets des facteurs environnementaux sur l'expression des composantes de l'agressivité

La forte variance d'agressivité observée entre individus d'une même espèce peut s'expliquer en partie par les interactions isolat-environnement (Cumagun *et al.* 2004), les facteurs environnementaux pouvant influencer de manière non négligeable l'expression des traits d'agressivité.

D'une part, il a été démontré que la température est susceptible d'influencer le développement du champignon et l'expression de la résistance de l'hôte. Ainsi, il existe une température optimale pour la germination des spores, le développement des lésions et la sporulation qui peuvent différer selon le champignon considéré. De plus, pour une espèce donnée, la réponse à la température peut varier d'un isolat à l'autre (Milus *et al.* 2006), et ce d'autant plus qu'ils sont soumis à une température éloignée de l'optimum (Eversmeyer *et al.* 1980; Johnson 1980; Milus *et al.* 2006). Ainsi, les différences d'agressivité entre isolats d'une même espèce sont plus marquées dans des conditions éloignées de l'optimum (Eversmeyer *et al.* 1980; Johnson 1980). De plus, les aspects quantitatifs de l'interaction hôte-agent pathogène peuvent également être affectés par l'état physiologique de l'hôte et du champignon. En effet, les conditions de conservation et de multiplication des souches du champignon peuvent altérer son agressivité. Ainsi, la mesure de l'efficacité d'infection (probabilité qu'une spore engendre une lésion sporulante) pourrait se trouver biaisée par des taux de germination anormalement faible, limitant considérablement la réussite de l'infection. Quant à l'hôte, son stade de croissance (Eversmeyer *et al.* 1980; Johnson 1980; Milus & Line 1980; Tomerlin *et al.* 1983), le type ou l'âge des tissus (Turechek & Stevenson 1998) jouent un rôle à travers la quantité de ressources disponibles ou encore l'expression de gènes de résistance. Enfin, l'expression des traits d'agressivité du champignon peut également être influencée par la densité en lésions. Chez la plupart des champignons pathogènes biotrophes,

la taille des lésions et la capacité de sporulation sont très sensibles à la densité des lésions (Clifford & Clothier 1974; Sache 1997; Robert *et al.* 2004), découlant probablement d'une augmentation de la compétition entre individus pour les ressources de l'hôte et pour les tissus potentiellement colonisables (Pariaud *et al.* 2009a). De plus, selon leur génotype, les individus sont plus ou moins affectés par la densité en lésions.

La grande sensibilité de l'interaction hôte-agent pathogène à ces trois effets (climatique, physiologique et densité de lésion) a au moins deux conséquences. D'une part, elle constitue une contrainte pour les recherches empiriques menées sur l'agressivité, étant donné qu'il semble primordial de réaliser les mesures d'agressivité dans des conditions rigoureusement définies et contrôlées, avec des individus (hôte et champignon pathogène) standardisés. D'autre part, elle remet en question la réponse des traits d'agressivité à la sélection, un individu pouvant présenter une expression différentielle de ses traits d'agressivité selon l'environnement dans lequel il est placé, environnement qui agit lui-même comme filtre sélectif.

3.1.5. Liens entre traits d'agressivité et potentiel adaptatif du champignon pathogène

Le potentiel adaptatif d'un agent pathogène peut être défini comme la capacité à s'adapter aux multiples pressions de sélection que l'environnement peut exercer sur lui. Le potentiel adaptatif, relié à la diversité génétique, conditionne fortement l'adaptation des individus à un environnement donné. En effet, plus le potentiel adaptatif de l'agent pathogène est élevé, plus la probabilité d'observer des individus adaptés à un milieu donné est grande.

Le fait que l'expression des traits d'agressivité repose en partie sur les bases génétiques du champignon peut en théorie lui conférer un fort potentiel adaptatif (Lannou 2012). Cependant, l'adaptation de l'agent pathogène n'est possible que si ces traits présentent un caractère héritable (Pariaud *et al.* 2009a). En effet, l'héritabilité d'un trait quantitatif se définit comme la proportion de variance phénotypique attribuable à la variance génétique. En d'autres termes, l'héritabilité mesure la part d'implication des facteurs génétiques dans l'expression d'un caractère quantitatif, qui seront transmis à la descendance. De fait, elle représente un indicateur important du degré auquel une population peut répondre à la sélection artificielle ou naturelle. Si la condition d'héritabilité des traits quantitatifs est vérifiée, plusieurs contraintes génétiques sont susceptibles de conditionner le potentiel

adaptatif d'un champignon pathogène : (i) la variabilité des traits d'agressivité au sein des populations, (ii) la présence de compromis évolutifs (ou trade-offs) entre traits d'agressivité et (iii) la présence de trade-offs entre virulence et agressivité, définissant le concept de coût de la virulence.

Premièrement, la variabilité des traits d'agressivité au sein des populations constitue intuitivement un élément déterminant du potentiel adaptatif d'un champignon pathogène (Pariaud *et al.* 2009a). Globalement, plus une population présente une variabilité phénotypique importante, plus elle va être capable de s'adapter rapidement aux pressions de sélection exercées par l'environnement biotique (l'hôte) et abiotique (conditions environnementales) (Lande & Shannon 1996). En effet, la variabilité au sein d'une population offre une voie d'adaptation en réponse aux fluctuations aléatoires de l'environnement, puisque différentes sous-populations de la population mère seront bien adaptées à différents types d'environnement (Kussell & Leibler 2005). Par conséquent, les populations d'agents pathogènes mettent en œuvre des mécanismes permettant la création et le maintien d'une diversité stable de phénotypes, particulièrement en cas d'hétérogénéité temporelle et spatiale dans la direction et l'intensité de la sélection, augmentant ainsi son potentiel adaptatif à long terme (Frank & Slatkin 1990; Rovira-Graells *et al.* 2012). En effet, l'augmentation du taux de recombinaison, de migration ou de mutation sont autant de mécanismes qui peuvent favoriser le taux auquel la variabilité génétique est créée (Eshel & Feldman 1970; Leigh 1970; Otto & Barton 1997; Otto & Feldman 1997; Lenormand & Otto 2000; Otto & Michalakis 2007; Jarosz *et al.* 2010; Rovira-Graells *et al.* 2012).

Deuxièmement, les trade-offs (ou compromis évolutifs) entre traits d'agressivité peuvent également impacter le potentiel adaptatif du champignon pathogène. Un trade-off est défini par une corrélation négative entre deux traits corrélés positivement à la fitness et s'observe dans des conditions de ressources nutritives limitées (Lannou 2012). La fitness d'un individu peut être définie comme la contribution attendue d'un phénotype à la génération suivante (Lannou 2012) ou encore comme la performance d'un individu dans un contexte sélectif particulier. Ainsi, si les individus investissent positivement sur un trait, cela va se traduire par une diminution sur l'autre trait. Par conséquent, les trade-offs sont considérés comme une contrainte évolutive de la maximisation de la fitness, puisqu'ils limitent l'évolution simultanée des traits vers des valeurs de fitness élevées (Hall *et al.* 2010). Cependant, en dépit de la contrainte apparente des trade-offs sur la fitness des agents pathogènes, ils permettent de maintenir un certain niveau de variabilité génétique pour les

traits quantitatifs (Heraudet *et al.* 2008). Cela peut jouer un rôle crucial dans l'adaptation des agents pathogènes, puisque des stratégies adaptatives variées peuvent émerger des multiples combinaisons de valeurs de traits créées, qui dépendent des traits vers lesquels les ressources sont allouées. En particulier, des études par simulation ont montré que ces stratégies, similaires aux stratégies *r* et K décrites chez les plantes (MacArthur & Wilson 1967), peuvent intervenir au cours d'évènement de dispersion (Burton *et al.* 2010). Les individus sont sélectionnés pour leur aptitude à la dispersion et à la reproduction sur le front de dispersion (Travis & Dytham 2002; Hughes *et al.* 2007; Phillips *et al.* 2008), alors que les traits associés à l'aptitude à la compétition présentent des valeurs de fitness très faibles, et inversement pour la population source (Burton *et al.* 2010). De plus, il a été montré que les trade-offs sont susceptibles d'être impliqués dans des phénomènes d'adaptation locale conditionnés par l'hôte (Susi & Laine 2013).

Finalement, le coût de la virulence peut également influencer le potentiel adaptatif des champignons pathogènes et limiter leur évolution. Le concept de coût de la virulence, initialement proposé par van der Plank (1963) puis modélisé par Groth (1976), correspond à la réduction de la fitness du champignon induite par une mutation de l'avirulence vers la virulence vis-à-vis d'un gène de résistance qualitative (Pariaud *et al.* 2009a; Lannou 2012; Laine & Barrès 2013). En d'autres termes, le champignon sera capable d'infecter une gamme d'hôte plus large, mais avec un taux de multiplication réduit sur chacun d'entre eux. Le coût de la virulence peut être réduit à un trade-off entre le nombre d'hôtes sensibles et l'agressivité sur chacun d'entre eux. Dans la littérature, les résultats d'études du coût de la virulence sont assez contrastés puisque certaines d'entre elles ont mis en évidence un coût de la virulence significatif (Leonard 1969, 1977; Grant & Archer 1983; Vera Cruz *et al.* 2000; Leach *et al.* 2001; Thrall & Burdon 2003; Huang *et al.* 2006, 2010; Bahri *et al.* 2009; Janzac *et al.* 2010; Montarry *et al.* 2010; Fraile *et al.* 2011; Bruns *et al.* 2014), alors que d'autres ont montré que le gain d'une virulence qualitative ne s'accompagne pas nécessairement d'un coût sur la fitness (Bronson & Ellingboe 1986; Kolmer 1993; Zhan *et al.* 2002; Toffolatti *et al.* 2012). Toutefois, il a été démontré que les génotypes accumulant de multiples allèles de virulence ne sont jamais les individus présentant les fitness les plus élevées (Thrall & Burdon 2003), ce qui appuie l'hypothèse de l'implication du coût de la virulence dans la diminution de la fitness des champignons pathogènes.

3.1.6. Contribution des traits d'agressivité à l'adaptation des champignons pathogènes

La majorité des études de populations portant sur l'adaptation des champignons pathogènes pour les traits quantitatifs concernent les systèmes agricoles, mais des résultats intéressants ont également été obtenus avec des pathosystèmes non-anthropisés. Deux aspects de l'adaptation du champignon par les traits d'agressivité sont présentés ici: la sélection au profit de l'agressivité modulée par des paramètres climatiques ainsi que l'adaptation du champignon au cultivar hôte pour les traits quantitatifs.

Premièrement, l'environnement peut influencer l'expression des composantes d'agressivité au sein d'une même espèce. En effet, il a été montré que la fitness relative de différents génotypes appartenant à la même espèce peut varier selon les conditions climatiques. Milus *et al.* (2006) ont comparé deux générations de *Puccinia striiformis* f. sp *tritici*, l'agent de la rouille jaune du blé : dans un environnement contrôlé, les isolats « nouveaux » et « anciens » présentaient des niveaux d'agressivité similaires à 12°C, alors qu'à 18°C la période de latence était écourtée de 2 jours pour les isolats de la « nouvelle » population et les taux de germination doublés par rapport à l'« ancienne ». La température peut donc conduire à d'importants changements dans les populations au sein d'une espèce. Cependant, des effets plus subtils peuvent également apparaître dans un contexte d'adaptation locale (Laine 2008).

Deuxièmement, la majeure partie de nos connaissances sur l'évolution des champignons pathogènes dans les systèmes agricoles est basée sur la relation gène-pour-gène (Flor, 1971). Cependant, nous savons désormais que la sélection exercée par l'hôte pour les traits quantitatifs influence l'évolution du champignon dans les pathosystèmes. L'une des premières études d'adaptation quantitative basée sur une sélection artificielle a été publiée par Leonard (1969). Une population génétiquement hétérogène de *Puccinia graminis* f. sp. *avenae* était maintenue sur deux génotypes d'avoine pendant sept générations asexuées. L'efficacité d'infection moyenne avait augmenté de 10 à 15% à l'issue de l'expérience pour l'hôte sur lequel le champignon avait été maintenu mais pas sur l'autre. La conclusion de cette étude est que la sélection des traits quantitatifs peut s'opérer sur un petit nombre de générations (à l'échelle d'une seule épidémie) et a pour conséquence une agressivité plus élevée en fin de saison épidémique, et ce sur le génotype hôte sur lequel le champignon s'est multiplié.

Par la suite, plusieurs auteurs ont cherché à savoir si les populations isolées d'un cultivar donné sont plus agressives sur celui-ci que sur les autres, donc s'il existe un phénomène d'adaptation au cultivar d'origine. En serre comme au champ, Bonman *et al.* (1989) ont constaté que des isolats de *Magnaporthe oryzae* infectaient davantage les cultivars de riz issus de la même zone géographique qu'eux. Etant donné que les isolats testés dans cette expérience ont produit des réactions compatibles sur tous les cultivars testés, les auteurs ont conclu que la spécificité dans le cadre d'une adaptation au fond génétique était la cause principale de ces interactions différentielles, tout en soulignant cependant que les cultivars de type '*japonica'* et '*indica'* représentent des ressources génétiques différentes. En revanche, Knott & Mundt (1991) ont échantillonné et testé l'agressivité de *P. triticina* dans une chambre de culture sur des jeunes plants d'un même cultivar, mais n'ont pas pu mettre en évidence une efficacité d'infection supérieure ni une période de latence plus courte sur le cultivar d'origine.

Plus récemment, la question de l'adaptation des champignons pathogènes aux résistances quantitatives de l'hôte a suscité l'intérêt des chercheurs. Cependant, malgré le rôle central de ce type de processus dans l'adaptation et l'évolution des populations de champignons pathogènes, un faible nombre d'études parmi celles traitant de l'adaptation du champignon au cultivar hôte s'intéresse spécifiquement aux résistances quantitatives identifiées. Lehman & Shaner (1997) ont étudié l'adaptation de *P. triticina* sur un cultivar partiellement résistant dans une expérience de sélection artificielle. Pour cela, une population d'isolats a été multipliée pendant cinq générations asexuées sous serre sur des plants adultes possédant une résistance quantitative (déterminée par quatre gènes), puis testée sur cinq cultivars différents dont trois partiellement résistants et un sensible. A chaque génération, une pression de sélection a été appliquée : les spores produites par les premières urédies étaient collectées séparément de celles produites par les dernières urédies apparues. Ceci a permis d'exercer une sélection sévère pour une période de latence courte. Il s'avère que la population sélectionnée a contourné 47% de la résistance. Les auteurs ont alors estimé que la population sélectionnée avait contourné au moins un des gènes de résistance aux effets partiels. Cette sélection pour une période de latence plus courte modifiait également la production de spores par lésion, augmentait la taille des lésions sur le cultivar résistant mais la diminuait sur l'hôte sensible.

Dans le but d'évaluer la durabilité sur le long terme de la résistance quantitative, il est nécessaire de comprendre comment cette résistance affecte l'agressivité au sein des populations de champignons pathogènes. Un modèle théorique de Gandon & Michalakis

(2000) prévoit que l'augmentation de la résistance quantitative conduira à la sélection de génotypes plus agressifs. Les travaux de Cowger & Mundt (2002) vont dans ce sens : les niveaux d'agressivité les plus élevés se rencontrent sur les cultivars les plus résistants, ce qui signifie que les hôtes résistants ont sélectionné des génotypes plus agressifs que les hôtes sensibles.

3.1.7. Structuration des populations de champignons pathogènes par les traits d'agressivité

Les changements majeurs dans la structure des populations de champignons pathogènes ont parfois été reliés à une invasion par une population plus agressive résultant d'une sélection exercée par la plante hôte et se traduisant par une adaptation différentielle du champignon pathogène aux cultivars hôtes. L'une des situations les plus abondamment documentées est celle du remplacement relativement récent du clone US-1 de l'agent du mildiou de la pomme de terre, *Phytophthora infestans*, quasi omniprésent aux USA, par de nouveaux génotypes (Miller *et al.* 1997). Les isolats US-8 présentent un taux d'expansion plus important, une capacité de sporulation accrue et une période de latence plus courte que les isolats US-1, et provoquent plus rapidement une pourriture des tubercules (Lambert & Currier 1997; Miller *et al.* 1998). A partir de ces données, les auteurs ont conclu que les différences relatives d'agressivité peuvent expliquer en partie le remplacement de US-1 par US-8 dans la population de *P. infestans*. De même, Goyeau *et al.* (2006) ont expliqué la dominance d'un seul pathotype de *Puccinia triticina* sur le cultivar de blé 'Soissons' à l'échelle de la France par son agressivité supérieure. En effet, ce pathotype présentait une période de latence plus courte, une production de spores plus importante et des lésions plus larges que les autres pathotypes (Pariaud *et al.* 2009b). L'une des preuves les plus évidentes du rôle central de l'agressivité dans l'évolution du champignon a été établie avec le pathosystème sauvage *Melampsora lini – Linum marginale* par Thrall & Burdon (2003). Les auteurs ont mis en évidence une corrélation négative entre l'agressivité, mesurée par la production de spores par lésion, et la virulence moyenne, ici définie comme la capacité moyenne d'une population du champignon pathogène à contourner la diversité de gènes de résistance qualitative présents dans la population hôte. Il est probable qu'un tel trade-off entre virulence et agressivité joue un rôle important dans l'adaptation génétique locale dans les systèmes « gène-pour-gène » en retardant l'émergence et l'évolution de pathotypes qui soient à la fois hautement agressifs et capables de se développer sur tous les génotypes hôtes.

3.2. Les traits morphologiques des spores

3.2.1. Les traits morphologiques mesurés

En comparaison aux traits d'agressivité des champignons pathogènes, les traits quantitatifs liés à la morphologie de leurs spores ont été très peu étudiés. Il est toutefois possible de les distinguer en trois catégories : les paramètres de taille des spores, comprenant leur longueur, largeur et volume ; les paramètres de formes des spores, comprenant notamment leur ratio longueur/largeur ; ainsi que les paramètres de masse et de densité des spores. La masse et la densité (ou masse volumique) des spores, bien qu'étant potentiellement des caractères très informatifs, n'ont été que très peu étudiés.

De manière analogue aux traits d'agressivité, les traits morphologiques des champignons ont également des équivalents chez les plantes. En effet, la taille des graines ou pollens, leurs formes ou encore leur masse sont des traits d'histoire de vie classiquement étudiés chez les végétaux.

3.2.2. Impact potentiel des traits morphologiques des spores sur les populations d'un champignon pathogène

Très peu d'attention a été portée à l'effet de la taille et de la forme des spores de champignons sur l'évolution des populations de champignons pathogènes, malgré la démonstration de leur implication dans les processus de dispersion. La plupart des modèles de dispersion, appliqués généralement aux graines de plantes, prédisent que la dispersion des particules microscopiques de moins de 40 µm de diamètre, telles que les spores de champignons, n'est pas affectée par leur taille mais est totalement dépendante des mouvements d'air (Kuparinen *et al.* 2007). Cependant, Norros *et al.* (2014) ont récemment mis en évidence que la dispersion des spores de champignons est en réalité fortement dépendante de leur taille. En comparant la dispersion de spores de 1 µm et de 10 µm de diamètre, ils ont montré que les plus petites spores étaient 100 fois plus nombreuses que les plus grosses à parcourir une distance donnée. Philibert *et al.* (2011) ont également démontré que la taille des spores est un bon indicateur pour distinguer les espèces invasives (à stratégie de dispersion) des espèces non-invasives, les premières présentant des spores plus petites. De plus le ratio longueur/largeur des spores peut aussi impacter fortement le potentiel de dispersion des individus (Roper *et al.* 2008, 2010; Philibert *et al.* 2011), en considérant que

des spores allongées devraient migrer plus facilement que des spores plus arrondies, grâce à une meilleure pénétration dans l'air.

De plus, bien que les traits morphologiques des spores des champignons ne semblent pas, de prime abord, pouvoir impacter directement leur potentiel adaptatif, car ils n'interviennent pas dans l'interaction hôte-agent pathogène, aucune donnée actuelle n'a démontré qu'ils ne pouvaient être plus ou moins significativement corrélés aux traits d'agressivité. En effet, par analogie aux graines de plantes ou aux pollens (Smith & Fretwell 1974; Coomes & Grubb 2003; Jakobsson & Eriksson 2003), le volume des spores pourrait être directement corrélé à la quantité de ressources nutritives qu'elles contiennent et conditionnerait dès lors le potentiel infectieux et de survie des individus (Philibert *et al.* 2011). En effet, les ressources nutritives jouent un rôle primordial au cours du processus infectieux du champignon pathogène. Au cours des premières étapes de l'infection, comprenant le dépôt de la spore à la surface de la feuille et le développement du tube germinatif, le champignon vit sur ses réserves. Ce n'est qu'une fois ces étapes franchies, que le développement des hyphes mycéliens et la formation d'haustoria vont permettre au champignon de passer d'un mode de nutrition autotrophe à hétérotrophe en puisant les nutriments des tissus de l'hôte qu'il infecte. Ainsi, de par l'impact supposé des traits morphologiques sur l'aptitude à la dispersion du champignon pathogène et de par leur liens potentiels avec les traits d'agressivité du champignon, ces traits seraient susceptibles de conditionner directement ou indirectement le potentiel adaptatif et la structuration des populations du champignon.

4. Le pathosystème Rouille / Peuplier

4.1. *Melampsora larici-populina*, l'agent de la rouille du peuplier

4.1.1. Biologie de *M. larici-populina*

Melampsora larici-populina, un des agents de la rouille du peuplier, appartient à la division des Basidiomycètes, à la classe des Pucciniomycètes et à l'ordre des Pucciniales (autrefois appelées Urédinales). Le genre *Melampsora* compte plus d'une cinquantaine d'espèces dont 17 sont pathogènes sur les peupliers (genre *Populus*) (Vialle *et al.* 2011). Sur les neuf espèces présentes en Europe (dont *M. allii-populina* et *M. medusae* f. sp. *deltoidae*), *M. larici-populina*, notre objet d'étude, est celle qui cause les dégâts les plus important dans

les peupleraies françaises (Pinon & Frey 2005). Il s'agit d'un champignon pathogène biotrophe, ce qui implique qu'il n'est capable de se développer que dans les tissus d'hôtes vivants. L'infection des peupliers par la rouille a des conséquences considérables sur ces derniers. En effet, l'activité photosynthétique des feuilles infectées est détournée au profit du champignon. De plus, la multiplication intense durant la période estivale provoque une défoliation partielle ou totale des arbres ce qui diminue la mise en réserve des substances carbonées et azotées en automne. Les attaques répétées peuvent engendrer des pertes de croissance allant jusqu'à 60% et un affaiblissement général des arbres, pouvant causer leur mort (Pinon & Frey 2005).

4.1.2. Cycle de vie de *M. larici-populina*

Le cycle biologique de *M. larici-populina* est caractéristique d'une rouille hétéroïque, ce qui signifie que deux plantes hôtes différentes sont nécessaires à l'accomplissement de son cycle biologique, et macrocyclique, ce qui signifie que cinq types de spores sont produites au cours du cycle (Figure 4). L'alternance d'hôte coïncide avec l'alternance des modes de reproduction, la reproduction sexuée ayant lieu une fois par an sur le mélèze (l'hôte écidien) au début du printemps, suivi de nombreux cycles de multiplication asexuée qui ont lieu du printemps à la fin de l'automne sur le peuplier (l'hôte télien).

La phase primordiale dans le cycle biologique du champignon est le stade urédien sur peuplier qui correspond à la phase épidémique. Le champignon se trouve alors sous la forme dicaryotique (n+n). Les urédies produisent des urédospores qui se déposent sur les feuilles, germent à la surface inférieure et pénètrent les tissus par les stomates. Apres une semaine environ, les urédies, de petites pustules jaunâtres, apparaissent à la surface inferieure des feuilles et produisent à nouveau des urédospores. Ces dernières vont être emportées par le vent et si elles sont déposées sur de nouvelles feuilles de peuplier pourront les infecter à leur tour. En conditions optimales, une dizaine de cycles de multiplication asexuée est possible de fin Mai à Octobre. A la sénescence automnale des feuilles, lorsque les conditions commencent à devenir défavorables, on observe la formation de télies (encroutements noirâtres) contenant des téliospores (dicaryotiques au début) sous l'épiderme de la face supérieure des feuilles de peuplier. Au cours de la maturation des téliospores en automne, la reproduction sexuée débute par la caryogamie puis le début de la méiose, qui est interrompue en prophase I (Hacquard *et al.* 2013). Puis les téliospores entrent en dormance et constituent ainsi une forme de résistance sous laquelle *M. larici-populina* passe l'hiver. Au printemps, la méiose se poursuit avec la

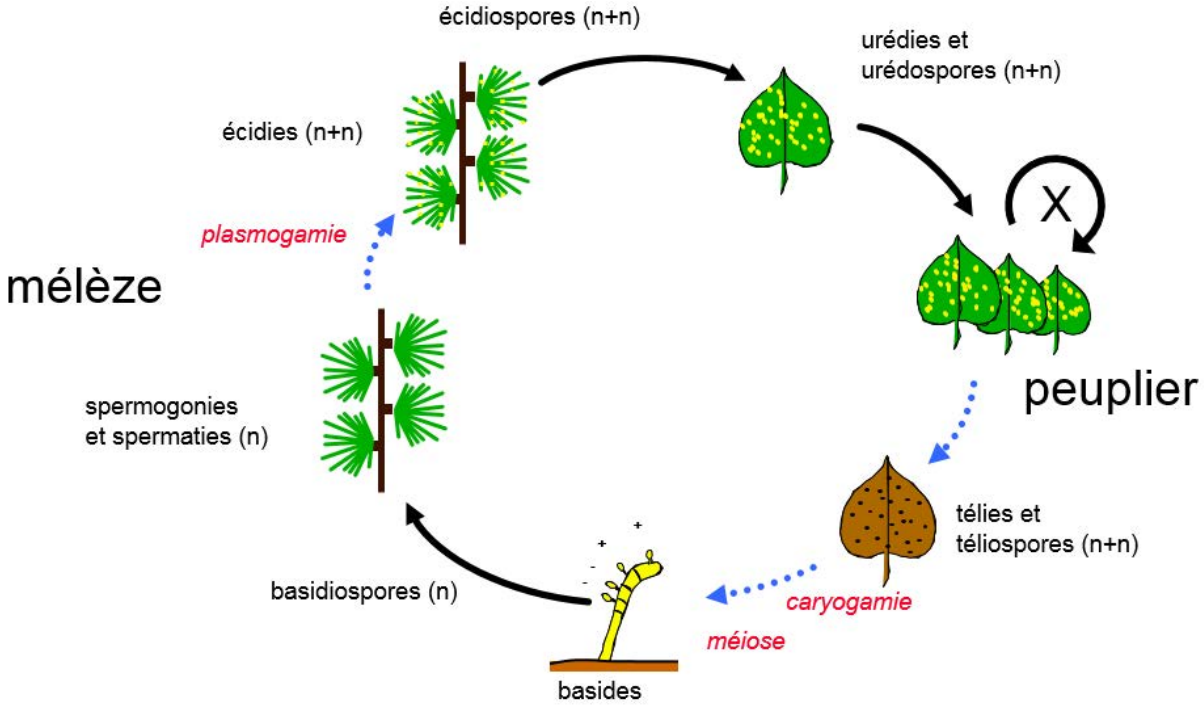


Figure 4: Cycle biologique de *M. larici-populina* comprenant ses deux hôtes peuplier (télien) et mélèze (écidien). Les flèches bleues et noires indiquent respectivement des changements d'état ou des évènements de dispersion. D'après Frey et Pinon 2004.

production de basides portant des basidiospores haploïdes qui sont dispersées par le vent pour infecter des aiguilles de mélèze. Ces infections conduisent à la formation des spermogonies quelques jours plus tard. La reproduction sexuée se poursuit sur le mélèze avec la plasmogamie entre une spermatie produite par une spermogonie d'un type sexuel (mating type) donné et une spermogonie du type sexuel opposé. Cette plasmogamie conduit à la formation d'une nouvelle forme de fructification dicaryotique sous forme de pustules jaunâtres, les écidies. Ces dernières produisent des écidiospores dicaryotiques qui sont disséminées par le vent pour infecter des feuilles de peuplier. Les hôtes mélèze (écidien) et peuplier (télien) sont deux espèces phylogénétiquement très éloignées, appartenant respectivement aux gymnospermes et aux angiospermes. Il en découle des caractéristiques particulières à chacune d'elles, pouvant avoir des conséquences sur la biologie de *M. larici-populina* (Hacquard *et al*. 2013).

4.2. L'hôte écidien, le mélèze

Le mélèze (*Larix* sp.) est l'un des rares conifères à feuilles caduques. Le mélèze Européen (*Larix decidua*) présente une aire de répartition naturelle relativement restreinte, puisque présente dans les massifs montagneux d'Europe centrale (comprenant l'arc Alpin, les Carpates, les Sudètes et les Tatras) ainsi que dans les plaines du Nord de la Pologne (Riou-Nivert 2001). Cependant, l'utilisation du mélèze en sylviculture ou en ornement depuis le dix-huitième siècle a conduit à un élargissement de son aire de répartition, expliquant qu'il est actuellement présent sur l'ensemble du territoire français (Riou-Nivert 2001). L'infection par *M. larici-populina* n'a aucune incidence sur le développement ou la croissance des arbres infectés.

4.3. L'hôte télien, le peuplier

En France comme dans le reste de l'Europe, on rencontre à la fois des peupliers à l'état sauvage (*Populus nigra* (peuplier noir), *P. alba* (peuplier blanc) et *P. tremula* (peuplier tremble)) et à l'état cultivé sous forme de cultivars (également appelé clones car obtenus par multiplication végétative), le plus souvent hybrides. Ainsi, on distingue les hybrides interaméricains (*P.* × *interamericana*, i. e. *P. deltoides* × *P. trichocarpa* ou l'inverse) issus de croisements entre deux espèces nord-américaines et les hybrides euraméricains (*P.* × *euramericana*, i. e. *P. deltoides* × *P. nigra*) issus du croisement entre une espèce européenne

et une espèce américaine. Même si *M. larici-populina* est capable d'infecter aussi bien les peupliers cultivés que les peupliers sauvages (*P. nigra*), la sévérité de la maladie est en général supérieure dans les peupleraies cultivées (Frey *et al.* 2005).

4.3.1. Le peuplier noir

L'aire de répartition du peuplier noir est très étendue, puisqu'on le retrouve dans toute l'Europe ainsi que dans l'ouest de l'Asie. Le caractère héliophile du peuplier fait qu'on le trouve en France principalement au sud de la Loire. Le peuplier aime les sols profonds et humides caractéristiques des vallées alluviales. De plus, le fait qu'il soit capable de se reproduire à la fois par voie sexuée et asexuée en fait un bon colonisateur des berges. Malgré le fait qu'aucune résistance qualitative vis-à-vis de *M. larici-populina* n'ait été mise en évidence chez le peuplier noir (Legionnet *et al.* 1999; Frey *et al.* 2005), la sévérité des symptômes est en générale très faible sur le peuplier noir (Legionnet *et al.* 1999; Frey *et al.* 2005), probablement lié à des niveaux de résistance quantitative élevés.

4.3.2. Les peupliers cultivés

De par sa croissance très rapide, le peuplier est une des premières essences de feuillus en terme de volume de bois récolté en France. Par conséquent, l'importance économique de la populiculture française est non négligeable. La France est au deuxième rang mondial, après la Chine, pour la superficie des peupleraies. Les principales régions populicoles françaises sont le Nord-Pas-de-Calais, la Champagne-Ardenne, la Picardie, l'Ile-de-France, le Centre et l'Aquitaine. Les peupleraies cultivées ont la particularité d'être monoclonales (un seul cultivar planté) et équiennes (âge identique) à l'échelle de la parcelle, et souvent pauciclonales à l'échelle régionale, représentant donc une diversité génétique très faible.

La résistance aux maladies, particulièrement à la rouille, est un des principaux critères de sélection des cultivars de peupliers, celle-ci ayant longtemps portée sur les résistances qualitatives. Cependant, les stratégies de sélection employées ne favorisant pas la sélection des résistances quantitatives, il en découle des symptômes nettement plus important en peupleraies cultivées par rapport aux peupleraies sauvage, les cultivars ne disposant pas ou peu de résistance quantitative pour faire face au champignon une fois la résistance qualitative contournée.

4.4. Etat des connaissances sur l'évolution des traits qualitatifs et quantitatifs de *M. larici-populina*

De manière générale, une plus grande attention a été portée jusqu'à présent à l'étude de l'évolution des traits qualitatifs de *M. larici-populina* qu'à l'étude de l'évolution des traits quantitatifs (Pinon & Frey 1997; Pei *et al.* 2005; Gérard *et al.* 2006; Barrès *et al.* 2008; Xhaard *et al.* 2011; Covarelli *et al.* 2013). Ceci tient notamment au fait que les efforts ont longtemps porté sur le développement des cultivars à résistance qualitative pour lutter contre le champignon.

4.4.1. L'évolution des traits qualitatifs de *M. larici-populina*

L'évolution des traits qualitatifs du champignon est à l'origine de l'échec des stratégies de gestion par déploiement de cultivars à résistances qualitatives. Les évènements les plus marquants ont été les contournements des résistances qualitatives R2 (portée principalement par le cultivar 'Luisa-Avanzo') en 1986, R7 (portée par 'Beaupré') en 1994 et R8 (portée par 'Hoogvorst') en 1997. Plus particulièrement, le contournement de la résistance qualitative R7 en 1994 a été suivi d'une succession d'épidémies de rouille sans précédent à l'échelle du territoire français, entre 1995 et 1999, qui ont eu un impact désastreux sur la filière populicole. En effet, le cultivar 'Beaupré' était particulièrement apprécié des populiculteurs de par ses qualités exceptionnelles de croissance et de qualité du bois. Il a donc été très largement planté en France (jusqu'à 80% des plantations en Picardie), exerçant ainsi de fortes pressions de sélection sur les populations du champignon, conduisant au contournement de la résistance R7 et à la propagation rapide de l'épidémie.

Plusieurs études ont mis en évidence l'influence de la sélection exercée par les cultivars de peuplier sur l'évolution et la structuration des populations de *M. larici-populina* (Pinon & Frey 1997; Gérard *et al.* 2006; Xhaard *et al.* 2011). Une étude des profils de virulence sur 472 individus a montré une différence nette entre les régions situées au Nord et au Sud de la Loire, les individus portant la virulence 7 (Vir7) s'observant en grande majorité au Nord et les individus avirulents (Avr7) généralement au Sud de cette limite (Xhaard *et al.* 2011). Cette observation coïncide et peut être corrélée avec les plantations du cultivar 'Beaupré', portant la résistance qualitative R7, qui ont été principalement réalisées au Nord de la Loire. Cette étude a donc mis en évidence l'influence des peupleraies cultivées sur

l'évolution des profils de virulence du champignon, les peupliers 'Beaupré' portant la résistance R7 sélectionnant les individus porteurs de la virulence 7.

Des travaux en cours de Hayden *et al*. (non publié), ont confirmé l'influence du paysage populicole et en particulier des résistances qualitatives déployées sur les profils de virulence observés. Pour ce faire, ils ont comparé les densités de plantation des différentes résistances qualitatives par région à l'échelle de la France avec les profils de virulence de populations de *M. larici-populina* collectées dans le cadre d'une enquête menée par le Département de la Santé des Forêts (DSF). Les premiers résultats ont montré une corrélation très forte entre le taux de plantation entre 1996 et 2010 du cultivar 'Beaupré' porteur de la résistance R7 et la fréquence de la virulence 7 à l'échelle du territoire, le même constat pouvant être fait pour le couple résistance/virulence 8. Ces résultats illustrent l'évolution des traits qualitatifs de *M. larici-populina* en réponse aux pressions de sélection drastiques exercées par les gènes de résistance qualitative déployées en populiculture. Cependant aucune corrélation entre les taux de plantations et les fréquences de virulence pour les couples résistance-virulence 1, 3, 4 et 5 n'a été trouvée. En effet, les fréquences de ces quatre virulences sont très corrélées à la fréquence de la virulence 7. La virulence 7 ayant émergé dans un fond génétique où les virulences 1, 3, 4 et 5 étaient présentes, ce résultat serait probablement dû à un phénomène d'entrainement de ces quatre virulences par la sélection très forte exercée sur les individus virulent 7 par la résistance R7.

4.4.2. L'évolution des traits quantitatifs de *M. larici-populina*

Parmi les traits quantitatifs étudiés chez *M. larici-populina*, les traits d'agressivité ont suscité plus l'intérêt des chercheurs que les traits liés à la morphologie des spores.

Les premières études sur l'évolution des traits quantitatifs de *M. larici-populina* ont été menées par Pinon & Frey (2005) et Fabre *et al*. (non publié), au cours desquelles ces auteurs ont étudié l'évolution du temps de latence du champignon suite au contournement de la résistance R7 portée par le cultivar 'Beaupré'. Pour ce faire, ils ont comparé les temps de latence de 74 isolats provenant de populations échantillonnées sur des cultivars R7 à travers la France entre 1994, date du contournement de la résistance R7, et 2006. Les résultats ont montré une augmentation significative du temps de latence de la population de 1994 (10 jours contre 8 jours en moyenne sur d'autres cultivars), suivi d'une diminution progressive du temps de latence au cours du temps, jusqu'à retrouver une valeur de 8 jours. Ces résultats montrent

que l'infection d'un nouvel hôte par le champignon peut engendrer un coût de fitness chez ce dernier, qui peut être progressivement compensé au cours du temps par des phénomènes d'adaptation du champignon à l'hôte. Ce phénomène d'adaptation à l'hôte suite au contournement de la résistance R7 portée par 'Beaupré' a également été mis en évidence par les travaux de Hayden *et al*. (non publié), au cours desquels les auteurs ont comparé les temps de latence et l'efficacité d'infection d'isolats Vir7 échantillonnés en 1994 et en 1998. Il a été observé un temps de latence significativement plus long et une efficacité d'infection réduite sur le cultivar 'Beaupré' pour les populations de 1994 par rapport à celles de 1998. Ainsi, les isolats échantillonnés en 1998, soit quatre ans après le contournement de la résistance R7, présentent des valeurs de fitness plus élevées que celle de 1994 (latence plus courte et efficacité d'infection plus élevée). Ceci résulterait d'un phénomène d'adaptation de cette population de 1998 au cultivar 'Beaupré', qui se serait opéré au cours des quatre années séparant le contournement de la résistance R7 et leur échantillonnage.

4.5. Le site de la vallée de la Durance

Une partie de ce travail de thèse s'est focalisée sur une région présentant une situation écologique particulière pour la rouille du peuplier. Il s'agit de la vallée de la Durance. Ce site a été sélectionné car il s'avère idéal pour suivre la dispersion de *M. larici-populina* et mesurer les conséquences évolutives d'une augmentation de son aire de répartition.

Cette vallée est située dans les Alpes, en partie dans l'aire de répartition naturelle du mélèze d'Europe (cf. Chapitre 1). La partie la plus en amont, dans le Briançonnais, constitue une zone de sympatrie entre peuplier et mélèze qui confine la reproduction sexuée de *M. larici-populina* uniquement dans cette zone. En aval de cette zone, la Durance, qui s'écoule vers le sud, est bordée de manière quasi continue d'une ripisylve majoritairement constituée de peupliers noirs sur environ 200 km. Cette vallée représente un véritable corridor écologique, qui canalise l'épidémie de rouille du peuplier de par son encaissement, et constitue ainsi un site idéal pour l'étude de la dispersion de ce champignon. De plus, des observations épidémiologiques réalisées depuis 2001 ont montré que les peupliers noirs présents dans la vallée de la Durance étaient tous les ans infectés progressivement de l'amont vers l'aval de la vallée, permettant ainsi le suivi d'épidémies de rouille annuelles et récurrentes (Frey *et al.* 2005; Gérard *et al.* 2006; Xhaard *et al.* 2012). L'épidémie est initiée chaque printemps par la reproduction sexuée qui se déroule dans la zone de sympatrie

peuplier-mélèze en amont, et qui génère l'inoculum initial (Gérard *et al.* 2006). Celle-ci se propage ensuite par reproduction asexuée le long de la ripisylve à *P. nigra* qui borde la Durance. Cette phase de colonisation est limitée dans le temps par la chute des feuilles de peuplier à l'automne. La reproduction sexuée ne pouvant se faire que sur mélèze en amont, le reste de la ripisylve se retrouve exempte de rouille chaque hiver, ce qui réinitialise le système chaque année (Xhaard *et al.* 2012).

Objectifs de la thèse

OBJECTIFS DE LA THESE

Ce travail s'articule autour de l'étude à différentes échelles des traits d'histoire de vie qualitatifs et quantitatifs de *M. larici-populina*, de l'étude de leur évolution en milieu naturel à l'étude de leur déterminisme génétique. Dans ce but, nous avons mêlé à la fois des approches de biologie évolutive, de génétique quantitative, de cartographie génétique et de cartographie de QTL.

Dans le premier chapitre, nous avons cherché à estimer l'impact des traits quantitatifs de *M. larici-populina* au cours d'un évènement de dispersion, notamment sur la structuration des populations du champignon, en se focalisant particulièrement sur les traits quantitatifs liés à la morphologie des spores. Pour cela, nous avons étudié l'évolution de la taille des spores au cours de deux épidémies annuelles successives dans la vallée de la Durance, site particulièrement propice à l'étude d'une épidémie de ce champignon. De plus, nous avons cherché à identifier la nature des forces évolutives à l'origine de cette évolution parmi les deux facteurs potentiels : la sélection naturelle et la dérive génétique. En effet, une preuve de l'intervention de la dérive génétique au cours d'une épidémie dans la vallée de la Durance a été apportée par les travaux de Xhaard *et al.* (2012). Ainsi les deux questions auxquelles nous souhaitons répondre sont les suivantes : la taille des spores évolue-t-elle au cours de la dispersion du champignon, impactant potentiellement la structure des populations ? Si oui, évolue-t-elle au hasard ou les individus sont-ils sélectionnés pour la taille des spores qu'ils produisent ?

Dans le second chapitre, nous avons cherché à estimer le potentiel adaptatif de *M. larici-populina*, au sein d'une population particulière de 95 descendants S1 issue de l'autofécondation d'une souche de référence. Pour ce faire, nous avons caractérisé les facteurs susceptibles de l'influencer : les niveaux d'héritabilité des traits quantitatifs, leur variabilité, l'occurrence de corrélations (ou compromis évolutifs) entre les traits quantitatifs et le coût potentiel de la virulence. Quel est le potentiel adaptatif de *M. larici-populina* ? Quels impacts ses traits qualitatifs et quantitatifs ont-ils sur son potentiel adaptatif ?

Dans le troisième chapitre, nous avons dans un premier temps réalisé une étude pilote de la construction d'une carte génétique à haute densité de marqueurs de *M. larici-populina*. Pour ce faire, nous avons généré une population de 95 descendants S1 issue de l'autofécondation d'une souche de référence, dont les génomes de 47 individus S1 ont été re-séquencés par la technologie Illumina®. Ces données ont ensuite été traitées via un script développé par Stéphane De Mita, chercheur au sein du laboratoire. Les résultats découlant de cette étude préliminaire se sont avérés très prometteurs. Dans un second temps, ce travail de cartographie génétique a été poursuivi en collaboration avec le Joint Genome Institute (JGI) du Département de l'Energie des Etats-Unis. Cette collaboration a permis la construction d'une carte génétique de *M. larici-populina* à haute densité de marqueurs, qui servira de support à la cartographie de loci d'avirulence, ainsi que de QTL d'agressivité et de traits morphologique des spores du champignon. Quelle est la structure du génome de *M. larici-populina* ? De combien de chromosomes est-il constitué ?

Enfin, le quatrième chapitre est la suite logique des chapitres précédents, car il met en relation directe les données phénotypiques acquises dans le chapitre 2 et les données de cartographie génétique acquises sur la descendance, obtenues dans le chapitre 3. Ces jeux de données ont été combinés afin de cartographier un locus d'avirulence ainsi que des QTL d'agressivité et de traits morphologiques des spores. Quelle est la nature du déterminisme génétique des traits qualitatifs et quantitatifs de *M. larici-populina* ? Combien de loci interviennent dans l'expression de ces caractères ?

Matériels et méthodes

MATERIELS ET METHODES

1. La mesure des traits qualitatifs et quantitatifs

1.1. Caractérisation des traits qualitatifs

L'étude de la composante qualitative du pouvoir pathogène permet de mieux comprendre l'évolution des populations du champignon au cours du temps. En effet, chaque isolat d'un champignon peut présenter une plusieurs des virulences connues vis-à-vis des gènes de résistances qualitatives de la plante hôte. L'ensemble des isolats d'un champignon pathogène qui possèdent la même combinaison de virulence définit un pathotype. Avec huit virulences ayant été décrites chez *M. larici-populina* vis-à-vis des huit résistances qualitatives identifiées chez l'hôte peuplier, on peut définir en théorie 2^8 soit 256 pathotypes différents, dont près de 100 ont été identifiés dans la nature (Pinon & Frey 2005). Une caractérisation des populations de *M. larici-populina* à l'aide des marqueurs phénotypiques que constituent les virulences, et qui peut s'appliquer à d'autres champignons pathogènes, consiste à réaliser des tests de pathotypage pour un grand nombre d'isolats récoltés dans un site donné, ou obtenus en laboratoire par croisement contrôlé (Figure 5). Pour ce test, chaque isolat est inoculé sur des disques foliaires d'une gamme différentielle de cultivars de peuplier, qui se compose de huit cultivars présentant chacun un des huits phénotypes de résistance qualitative nommé R1 à R8. Si l'inoculation d'un isolat sur un cultivar portant une résistance qualitative donnée se solde par l'infection de ce dernier, l'isolat sera qualifié de virulent et on déduit qu'il porte l'allèle de virulence avr (récessif) pour le gène d'avirulence donné. Dans le cas contraire, l'isolat sera qualifié d'avirulent et on déduit qu'il porte l'allèle d'avirulence Avr (dominant) pour ce gène d'avirulence.

1.2. Caractérisation des traits quantitatifs

1.2.1. Les traits d'agressivité

Bien que les définitions des traits d'agressivité soient globalement acceptées par l'ensemble de la communauté des phytopathologistes, les méthodes d'acquisition sont susceptibles de varier d'une étude à l'autre, influant ainsi sur la précision des mesures.

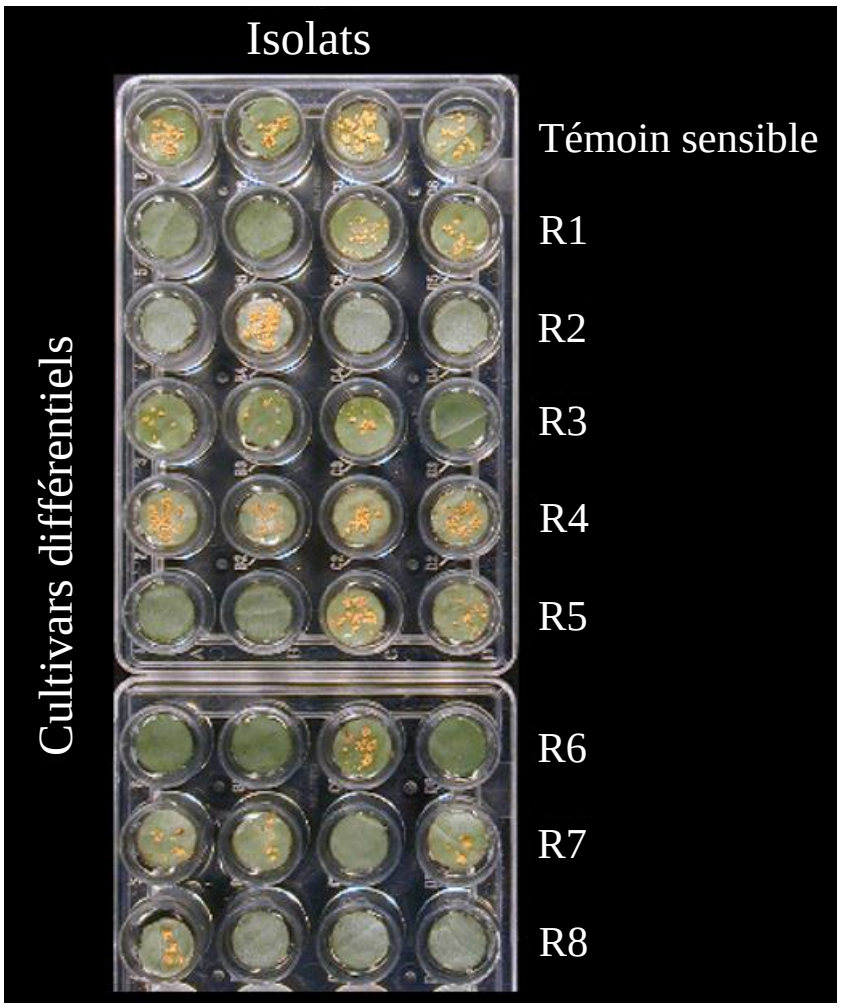


Figure 5: Test de pathotypage de *M. larici-populina* sur des disques foliaires de peuplier. En lignes, huit cultivars de peuplier présentant des phénotypes de résistance qualitative différents et un cultivar sensible (porteur d'aucune résistance qualitative) servant de témoin. En colonne, quatre isolats de *M. larici-populina* appartenant à des pathotypes différents. La présence d'urédies (pustules orangées) sur le disque foliaire, notée environ 10 jours après inoculation, indique que l'interaction cultivar x isolat est compatible, c'est-à-dire que l'isolat possède le facteur de virulence lui permettant de contourner la résistance qualitative correspondante.

L'efficacité d'infection, communément définie comme la probabilité qu'une spore déposée à la surface d'une hôte sensible produise une lésion sporulante (Lannou 2012), est généralement calculée en faisant le ratio du nombre de lésions observées (urédies dans notre cas) sur le nombre théorique de lésions, ce dernier correspondant au nombre de spores déposées. L'efficacité d'infection peut être exprimée en termes de probabilité d'infection ou de pourcentage.

$$Efficacité\ d'infection = \frac{Nb\ d'urédie\ observé}{Nb\ de\ spore\ déposé}$$

Cependant, en plus de la difficulté à quantifier précisément le nombre de spores déposé (Lannou 2012),cette méthode de calcul présente un second biais puisqu'il est supposé que chaque spore déposée germe et engendre potentiellement une urédie, ce qui est rarement le cas. Le nombre théorique d'urédies (nombre de spores déposées) est donc ici surestimé. En effet, une variabilité du taux de germination peut être observé entre isolats, ce qui biaise les comparaisons. Un moyen de contourner ce biais consiste à mesurer le taux de germination de chaque souche utilisée, au moment de l'inoculation, afin de corriger le nombre de spores déposées et ne considérer que les spores déposées qui auront germé, les seules à pouvoir engendrer une urédie (cf. Chapitre 2). L'efficacité d'infection peut donc être estimée de manière alternative par la formule suivante :

$$Efficacité\ d'infection = \frac{Nb\ d'urédie\ observé}{Nb\ de\ spore\ déposé * taux\ de\ germination}$$

La taille des lésions est définie comme la surface de la lésion productrice de spores (Kolmer & Leonard 1986; Robert *et al.* 2004). Elle peut être estimée de manière directe en mesurant la surface des tissus sporogènes après décapage des spores (Pariaud *et al.* 2009b), ou par mesure indirecte sans décapage des spores, la taille de la lésion étant alors assimilée à la surface couverte par le dôme de spores (Pei *et al.* 2002, 2003; Dowkiw *et al.* 2003). Son estimation se fait par une acquisition d'images de chaque urédie ou dôme de spores, soit par scanner (par exemple Pariaud *et al.* (2009b), soit par un dispositif de prise de photographies

couplé à une loupe binoculaire (cf. Chapitre 2). Ces images sont ensuite analysées via un logiciel d'analyse d'image (par exemple ImageJ®). La taille des lésions étant une aire, son unité varie selon le choix des auteurs. Cependant, elle est majoritairement exprimée en mm^2.

Le taux de sporulation se définit généralement comme le nombre de spores produit par lésion sporulante et par unité de temps de sporulation (Leonard 1969; Clifford & Clothier 1974; Kardin & Groth 1989), exprimé en $spores.lésion^{-1}.jour^{-1}$. Cependant, les inoculations artificielles classiquement réalisées pour l'étude des traits d'agressivité des champignons pathogènes se font en général par pulvérisation d'une suspension de spores et conduisent par conséquent à un grand nombre d'urédie par feuille ou disque foliaire (Lannou 2012). Le nombre de spores produites par urédie est donc une valeur moyenne estimée en divisant le nombre de spores produites par l'ensemble des urédies par le nombre total d'urédies.

$$Taux\ de\ sporulation = \frac{Nb\ de\ spores\ par\ urédie}{Temps\ d'observation} = \frac{\left(\frac{Nb\ de\ spores\ total}{Nb\ d'urédies\ observé}\right)}{Temps\ d'observation}$$

La capacité de sporulation correspond au nombre de spores produites par unité de surface sporulante et par unité de temps (Subrahmanyam *et al.* 1983; Dowkiw *et al.* 2003). De manière analogue au taux de sporulation, la capacité de sporulation se calcule en faisant le ratio du nombre de spores produites sur la taille des lésions, ce quotient étant ensuite divisé par la durée de sporulation. Elle est généralement exprimée en $spores.mm^{-2}.jours^{-1}$.

$$Capacité\ de\ sporulation = \frac{Nb\ de\ spores\ par\ unité\ de\ surface}{Durée\ de\ sporulation} = \frac{\left(\frac{Nb\ total\ de\ spores\ produit}{\sum\ des\ tailles\ des\ urédies}\right)}{Durée\ de\ sporulation}$$

L'estimation du nombre de spores produites par urédie, indispensable au calcul des taux et capacité de sporulation, peut être obtenue par divers moyens. Il est possible d'effectuer une mesure de concentration des spores à l'aide d'un hématimètre (cellule de Malassez) et de déduire le nombre de spores produites par urédie en ramenant la concentration au volume total. Cette approche est satisfaisante du point de vue de la précision des mesures et se révèle peu onéreuse mais présente l'inconvénient d'être chronophage, particulièrement si les effectifs sont importants. Une autre approche consiste à utiliser un compteur de particules

pour réaliser le comptage. Il existe plusieurs types de compteurs de particules, tels que le Coulter Counter® (Beckman Coulter), couramment utilisé en analyses biologiques et parfois en phytopathologie (Dowkiw *et al.* 2003; Montarry *et al.* 2008; Miclot *et al.* 2012; Delmas *et al.* 2014) ou l'Occhio Flowcell®, utilisé en analyses granulométriques et parfois en phytopathologie (Dowkiw *et al.* 2010). Ces appareils permettent des mesures précises et à haut débit du nombre de spores, mais présentent l'inconvénient d'être très onéreux. Toutefois, les taux et capacité de sporulation peuvent être exprimé de manière alternative, respectivement en masse de spores produite par urédie par unité de temps et en masse de spores produite par unité de surface sporulante par unité de temps (Pariaud *et al.* 2009b, 2013). Pour cette approche, les formules citées précédemment ont été appliquées, en remplaçant simplement le nombre de spores produit par leur masse.

Enfin, même si la définition du temps de latence est simple et acceptée par l'ensemble des phytopathologistes, sa mesure n'est pas pour autant aisée (Lannou 2012). En effet, le grand nombre d'urédie par feuille (ou disque foliaire) résultant des inoculations par pulvérisation, conduit à une variabilité non négligeable entre lésions qui est très difficile à prendre en compte (Lannou 2012). Ceci a conduit à deux méthodologies de mesure du temps de latence. La première consiste à estimer le temps à partir duquel la moitié du nombre total d'urédies observées est apparue (T50) (Knott & Mundt 1991; Flier & Turkensteen 1999). La méthode la plus précise de l'estimation du T50 a été proposée par Shaner (1980) en ajustant la dynamique de l'émergence des lésions à une courbe sigmoïde (courbe Probit). La seconde méthode consiste à mesurer le temps écoulé entre l'inoculation et l'apparition de la première urédie, temps qui indique la durée minimale requise au champignon pour réaliser son cycle infectieux. L'unité utilisée pour exprimer le temps de latence peut varier selon l'environnement dans lequel se place l'étude. En effet, si l'étude est réalisée en conditions contrôlées, notamment à température constante, le temps de latence sera généralement exprimé en jours. En revanche, si l'étude se déroule en conditions naturelles (essais au champ) ou semi-naturelles (en serre), le temps de latence sera préférentiellement exprimé en degrés jour, qui correspond à la somme des températures journalières dépassant une température de base (propre à chaque espèce). Cette unité permet de comparer les résultats entre étude d'une même espèce qui se sont déroulées dans des conditions environnementales différentes (Morais *et al.* 2015).

Contrairement au protocole classique d'inoculation par pulvérisation d'une suspension de spores, la méthodologie d'inoculation monospore que nous avons employée dans le

chapitre 2 nous a permis de mesurer le temps de latence, la taille des lésions, le taux de sporulation et la capacité de sporulation sur des urédies individuelles. Ceci a pour but de maximiser la prise en compte de la variabilité phénotypique et d'estimer plus précisément les traits quantitatifs.

1.2.2. Les traits liés à la morphologie des spores

Les longueurs et largeur des spores sont définies par les mesures de diamètres de Féret, c'est-à-dire la distance entre deux droites parallèles et tangentes à la spore (Walton 1948). La largeur d'une spore (également appelée diamètre de Féret minimum) correspond ainsi à la valeur minimale de l'ensemble des diamètres de Féret mesurés, tandis que la longueur (également appelée longueur de Féret) correspond au diamètre de Féret perpendiculaire au diamètre de Féret minimum. Pour les spores de champignons, ces deux paramètres sont exprimés en micromètres. Le ratio longueur/largeur et le volume des spores sont des paramètres composites calculés à partir de leur longueur et largeur. Comme son nom l'indique, le ratio longueur/largeur d'une spore correspond au ratio de sa longueur sur sa largeur et ne comprend pas d'unité

$$ratio\ L/l = \frac{Longueur\ de\ la\ spore}{Largeur\ de\ la\ spore}$$

Le volume des spores est quant à lui calculé à partir de la formule d'une sphère appliquée à une ellipsoïde (Philibert *et al.* 2011), et s'exprime généralement en μm^3 :

$$Volume = \frac{4}{3}\pi\left(\frac{Longueur}{2} * \left(\frac{Largeur}{2}\right)^2\right)$$

La mesure de la longueur et largeur des spores peut se faire de deux manières différentes. La première consiste à prendre des photographies au microscope optique puis à estimer ces paramètres par analyse d'image (cf. Chapitre 1), ce qui peut se révéler peu onéreux mais long et fastidieux. La seconde approche consiste à estimer ces paramètres par l'utilisation d'un compteur de particule basé sur un principe d'analyse d'images (par exemple Occhio Flowcell®), qui permet de mesurer très rapidement et à haut débit les longueurs et largeurs des spores, conduisant au calcul des ratios longueur/largeur et des volumes (cf. Chapitre 2).

Une alternative aux mesures directes des longueurs et largeurs des spores pour estimer leur volume consiste à le mesurer directement à l'aide d'un compteur de particule de type Coulter Counter® Multisizer™, qui permet d'estimer le volume des spores en mesurant le volume d'électrolyte déplacé par chaque spore en passant dans le capteur (Delmas *et al.* 2014). L'inconvénient de cette approche, outre son prix, est qu'elle permet de mesurer uniquement le volume des spores, les paramètres de longueur et de largeur des spores devant être estimés, en considérant que la spore est une ellipsoïde parfaite avec un ratio L/l fixe (Delmas *et al.* 2014).

2. Estimation des forces évolutives à l'origine de l'évolution des traits quantitatifs

2.1. Les forces évolutives potentiellement en cause

L'évolution des traits d'histoire de vie au cours d'un évènement de dispersion peut résulter de plusieurs processus évolutifs distincts. Elle peut être le produit de la sélection naturelle (Rimé *et al.* 2005; Keller & Taylor 2008; Burton *et al.* 2010), favorisant les individus les mieux adaptés à leur environnement. Une contrainte classique qui gouverne l'évolution de la dispersion est l'aptitude relative à la compétition en un site saturé versus la capacité à coloniser un milieu vierge ; l'évolution vers l'une ou l'autre de ces stratégies dépend, pour un environnement donné, du coût à la dispersion (Hamilton & May 1977; Comins *et al.* 1980; Gandon & Michalakis 2001). Cependant, la variation des traits d'histoire de vie peut aussi résulter de processus purement démographiques par le phénomène de dérive génétique. En effet, les fortes fluctuations démographiques susceptibles de s'opérer au cours du processus de dispersion peuvent distordre les fréquences d'allèles (Excoffier & Ray 2008; Excoffier *et al.* 2009), induisant ainsi une différenciation génétique forte entre populations le long du gradient de dispersion. Cette différenciation par effet de fondation peut toucher à la fois des loci neutres ou codant un trait. L'évolution des traits quantitatifs peut donc, selon le cas, s'accompagner d'une différenciation génétique neutre entre individus (notamment lors d'évènement de colonisation) ou non (dans le cas de migrations récurrentes qui tendent à homogénéiser les fréquences d'allèles (Slatkin 1985). Aussi, déterminer la nature des forces évolutives à l'origine d'une évolution des traits d'histoire de vie, dans le cas d'un évènement de dispersion, revient à estimer la part d'implication des processus démographiques dans ce phénomène.

2.2. L'approche Q_{ST}-F_{ST} : principe et calculs des estimateurs de divergence génétique neutre et phénotypique entre populations

Cette estimation est possible par la comparaison de deux indices : le F_{ST} (Wright 1951; Weir & Cockerham 1984) et le Q_{ST} (Spitze 1993). Le F_{ST} de Wright est un indice qui fournit une mesure précise du niveau de structuration génétique des populations, en quantifiant le niveau de partitionnement de la variation allélique totale qui s'observe entre populations. Etant calculé sur les données de génotypes multilocus microsatellites des individus (marqueurs neutres non soumis à sélection), le F_{ST} constitue un indice de différenciation entre populations sous hypothèse de neutralité. Il est traditionnellement estimé d'après les composantes d'une analyse de variance à deux niveaux (individus emboités dans les populations) réalisée sur les fréquences d'allèles à tous les loci, selon la formule :

$$F_{ST} = \frac{\sigma_{g(b)}}{\sigma_{g(T)}}$$

Où $\sigma_{g(b)}$ est la composante de variance (génétique) observée entre populations et $\sigma_{g(T)}$ la variance génétique totale.

Les résultats d'une analyse de variance génétique peuvent conduire à plusieurs interprétations. Si $0 < F_{ST} < 0{,}05$, on conclut à une différenciation génétique faible entre les deux populations. Si $0{,}05 < F_{ST} < 0{,}15$, la différenciation génétique est modérée. Si $0{,}15 < F_{ST} < 0{,}25$, une différenciation génétique importante s'observe. Et enfin si $F_{ST} > 0{,}25$, on peut conclure à une différenciation génétique très importante entre les populations.

Wright (1951) a également montré que le partitionnement de la variance génétique pour un trait quantitatif polygénique en une composante inter-populationnelle $\sigma_{g(b)}$ et intra-populationnelle $\sigma_{g(w)}$ est étroitement lié au calcul du F_{ST}. Sous hypothèse d'additivité des loci codant le trait quantitatif et si celui-ci évolue de façon neutre, on a :

$$\sigma_{g(b)} = 2F_{ST}\sigma_{g(T)}$$

Par ailleurs sous hypothèse de panmixie (reproduction au hasard des individus) on a :

$$\sigma_{g(w)} = (1 - F_{ST})\sigma_{g(T)}$$

Spitze (1993) a ainsi défini un indice analogue au F_{ST} de Wright, qu'il a nommé Q_{ST} (Q pour quantitatif) et qui est donné par la formule suivante :

$$Q_{ST} = \frac{\sigma_{g(b)}}{\sigma_{g(b)} + 2\sigma_{g(w)}}$$

Cette formule permet de s'affranchir de la variabilité génétique totale sous-jacente $\sigma_{g(T)}$ qu'il est impossible de quantifier simplement.

Les résultats d'une analyse de Q_{ST} peuvent conduire à plusieurs interprétations. Si $0 < Q_{ST} < 0{,}05$, on conclut à une différenciation phénotypique faible entre les deux populations. Si $0{,}05 < Q_{ST} < 0{,}15$, on conclut à une différenciation phénotypique modérée. Si $0{,}15 < Q_{ST} < 0{,}25$, une différenciation phénotypique importante s'observe. Enfin si $Q_{ST} > 0{,}25$, on peut conclure à une différenciation phénotypique très importante entre les populations.

Partant du postulat que les indices de F_{ST} et de Q_{ST} sont analogues et que le F_{ST} reflète une différenciation génétique entre populations sous hypothèse de neutralité (hypothèse nulle, $Q_{ST} = F_{ST}$), il est dès lors possible de tester cette hypothèse comme source de variation phénotypique entre populations. En d'autres termes, la détermination de la nature des forces évolutives à l'origine d'une évolution des traits d'histoire de vie par l'approche de comparaison Q_{ST}-F_{ST} consiste donc à comparer la différenciation génétique entre populations attendue sous hypothèse de neutralité (F_{ST}) à celle observée au niveau des traits quantitatifs (Q_{ST}). De ce fait, les analyses par comparaisons d'indices Q_{ST} - F_{ST} peuvent conduire à 3 types d'interprétations (Goudet & Büchi 2006). Si $Q_{ST} > F_{ST}$, la différenciation phénotypique observée ne peut pas être expliquée par un processus neutre (telle la dérive génétique), donc une sélection naturelle directionnelle intervient. Si $Q_{ST} = F_{ST}$, la différenciation phénotypique observée peut résulter d'un processus neutre (la sélection naturelle et la dérive génétique peuvent intervenir, mais les deux processus sont indissociables). Enfin, si $Q_{ST} < F_{ST}$, la différenciation phénotypique observée est moins forte que la structure génétique neutre, donc une « sélection stabilisatrice » intervient. A l'heure actuelle, la comparaison d'indices de différenciation Q_{ST}-F_{ST} représente l'outil le plus accessible et le plus universel pour tester le rôle de la sélection naturelle en cas de différenciation phénotypique de traits quantitatifs entre populations (Leinonen *et al.* 2008).

3. Le concept de l'héritabilité

Une question centrale en biologie évolutive est l'estimation de la part de la variation observée d'un trait quantitatif donné, expliquée par les facteurs environnementaux ou biologiques (Visscher *et al.* 2008). L'héritabilité est le concept qui résume la part de variation phénotypique dû à la variation des facteurs génétiques. Souvent, ce terme est utilisé pour faire référence à la ressemblance entre les parents et la descendance. Dans ce contexte, une héritabilité élevée implique une forte ressemblance entre les parents et la descendance pour le trait considéré, tandis qu'une faible héritabilité implique un faible niveau de ressemblance.

3.1. La mesure de l'héritabilité

La variation des phénotypes des individus d'une population est la résultante de l'influence des facteurs génétiques et environnementaux sur l'expression d'un trait donné, ainsi que des interactions possibles entre les facteurs génétiques et environnementaux (Falconer & Mackay 1996). A moins d'être génétiquement identiques (par exemple les jumeaux monozygote chez l'humain, les lignées consanguines en populations expérimentales ou encore les clones), les génotypes des individus au sein d'une population ont tendance à varier pour les loci affectant particulièrement certains traits. Les effets combinés de l'ensemble des loci, incluant de possibles interactions alléliques à un locus (effet de dominance) ou entre loci (effet d'épistasie), représentent la valeur génotypique. Cette valeur engendre des variations génétiques au sein d'une population lorsqu'elle varie entre individus. Par conséquent, l'héritabilité au sens large est définie comme la proportion de la variance phénotypique (V_P) liée à la variance génétique (V_G). La variance phénotypique étant la résultante des effets génétiques et environnementaux, elle correspond à la somme de la variance génétique (V_G) et de la variance environnementale (V_E) (Falconer & Mackay 1996; Lynch & Walsh 1998).

Les génotypes et valeurs génotypiques ne sont pas transmis des parents à la descendance, ce sont plutôt les allèles aux loci influençant le trait qui le sont. Par conséquent, afin d'estimer la valeur génotypique moyenne d'une population de descendants ainsi que leur moyenne phénotypique prédite, il est nécessaire de connaitre les effets des allèles au sein d'une population plutôt que l'effet d'un génotype. L'effet d'un allèle particulier sur l'expression d'un trait dépend de sa fréquence dans la population et des effets de chaque génotype qui porte cet allèle. Ceci est parfois défini sous le terme d'effet moyen d'un allèle.

La valeur génétique additive d'un individu correspond à la somme des effets moyens de l'ensemble des allèles portés par un individu (Falconer & Mackay 1996). Selon les principes de la ségrégation Mendélienne, un allèle de chaque locus est présent dans chaque gamète, et les valeurs génétiques additives sont par conséquent transmises des parents à la descendance.

On distingue deux valeurs d'héritabilité, qui se distinguent par le type de variance génétique prise en compte (Falconer & Mackay 1996; Lynch & Walsh 1998). D'une part, l'héritabilité au sens large (ou broad-sense heritability) mesure la proportion de variance phénotypique dû à l'ensemble des valeurs génétiques, incluant les effets de dominance et d'épistasie. L'héritabilité au sens large, noté H^2, est donnée par la formule suivante :

$$H^2 = \frac{V_G}{V_P} = \frac{V_G}{V_G + V_E}$$

Avec $V_G = V_A$ (variance additive) + V_I (variance d'épistasie) + V_D (variance de dominance)

D'autre part, l'héritabilité au sens strict (ou narrow-sense heritability) mesure uniquement la part de la variance phénotypique expliqué par la variance génétique additive. L'héritabilité au sens strict, noté h^2, est donnée par la formule suivante

$$h^2 = \frac{V_A}{V_P} = \frac{V_A}{V_G + V_E}$$

Plusieurs méthodes de calcul de l'héritabilité d'un trait quantitatif ont été développées (Hamid *et al.* 1982; Hill & Nelson 1982; Kolmer & Leonard 1986; Lehman & Shaner 1996, 2007). En particulier, Singh *et al.* (1993) ont développé une formule de l'héritabilité au sens large adaptée aux données issues d'essais variétaux.

Il est intéressant de noter que bien souvent, aucune distinction n'est faite entre l'héritabilité au sens large (H^2) et l'héritabilité au sens strict (h^2) (Wray & Visscher 2008). Cependant, l'héritabilité au sens strict a un intérêt particulier pour les programmes de sélection animale et végétale, car la réponse à la sélection artificielle et naturelle repose sur la variance génétique additive.

Puisque qu'elle est définie comme un ratio des composantes de variance, l'héritabilité d'un trait est comprise entre 0 et 1. A titre d'exemple, l'héritabilité au sens strict de la taille chez l'humain est de 0,8 (Macgregor *et al.* 2006). Pour les traits associés à la fitness en populations naturelles, l'héritabilité au sens large est typiquement de 0,1 à 0,2 (Visscher *et al.* 2008).

3.2. L'héritabilité, une mesure constante ?

De manière intéressante, les valeurs d'héritabilité d'un trait ne sont pas constantes. A titre d'exemple, l'héritabilité du rendement de lait à la première lactation de vaches laitières a quasiment doublé et est passé de 25% dans les années 1970 (Tong *et al.* 1979) à presque 40% de nos jours (Berry *et al.* 2003). L'héritabilité peut changer au cours du temps sous l'effet du changement de la variance génétique additive, du changement de la variance environnementale ou encore du changement dans la corrélation entre facteurs génétiques et environnementaux. La variance génétique peut changer si les fréquences d'allèles changent (par exemple sous l'effet de la sélection ou de la consanguinité), si de nouveaux génotypes intègrent la population (par exemple par migration ou mutation) ou encore si des génotypes pré-existants ne participent à la variance génétique que suite à un changement du fond génétique ou de l'environnement. Le même trait mesuré au cours de la vie d'un individu est susceptible d'être influencé par des effets génétiques et environnementaux variables, leurs variances respectives étant fonction de l'âge (Visscher *et al.* 2008). De plus, l'héritabilité peut varier si la variance expliquée par les facteurs environnementaux est modifiée. Il a été démontré que les traits morphologiques présentent une héritabilité plus faible en environnement appauvris, ce qui n'est pas le cas pour les traits liés à la fitness des individus (Charmantier & Garant 2005). La compréhension des effets des changements environnementaux sur l'héritabilité est importante pour comprendre les forces évolutives qui interviennent en population naturelle (Charmantier & Garant 2005).

3.3. Les idées fausses liées au concept d'héritabilité

Il existe un nombre important d'idées fausses concernant le sens exact et l'interprétation de l'héritabilité (Visscher *et al.* 2008). L'héritabilité n'est pas la proportion du phénotype qui repose sur des bases génétiques, mais plutôt la proportion de la variance phénotypique qui est expliquée par les facteurs génétiques. De plus, l'héritabilité est un paramètre populationnel, qui par conséquent, dépend de facteurs spécifiques aux populations, tels que les fréquences alléliques, les effets de la variabilité génique et la variation due aux facteurs environnementaux. L'héritabilité d'un trait mesuré sur une population donnée d'une espèce donnée ne permet en rien de prédire l'héritabilité de ce même trait sur une autre population ou une autre espèce. Cependant, il est surprenant de remarquer à quel point l'héritabilité est constante au sein des populations et des espèces (Visscher *et al.* 2008).

4. La cartographie génétique

4.1. Définition et principe de la construction d'une carte génétique

Une carte de liaison génétique est un mode de représentation du génome basé sur les positions relatives et distances entre marqueurs ou gènes le long des chromosomes (ou groupes de liaison) (Foulongne-Oriol 2012; Collard *et al.* 2005). Elle ne correspond en rien à la distance physique entre les marqueurs mais aux distances génétiques entre ceux-ci, définies en fonction de la fréquence des crossing-over (points de recombinaison) qui s'opèrent au cours de la méiose. En effet, des marqueurs proches les uns des autres ou fortement liés sont transmis plus fréquemment ensemble des parents à la descendance que des marqueurs plus éloignés. Par conséquent, on observe un mélange de génotypes recombinant et parentaux au sein d'une descendance. La fréquence des génotypes recombinants est utilisée pour calculer des fréquences de recombinaison, elles-mêmes utilisées pour inférer les distances génétiques entre marqueurs par l'utilisation de fonctions de cartographie. En analysant la ségrégation des marqueurs, l'ordre relatif des marqueurs et les distances qui les séparent peuvent être estimées. Plus la fréquence de recombinaison entre deux marqueurs est faible, plus ils sont proches sur le chromosome et inversement.

4.2. Méthodologie: Les étapes clés de la construction d'une carte génétique

L'étape préalable à celle de la construction d'une carte génétique consiste à définir les objectifs principaux du projet de cartographie génétique, car ils sont susceptibles de conditionner les choix aux étapes suivantes. Ces objectifs peuvent être de différents ordres : localisation et clonage de gènes d'intérêt, sélection assistée par marqueurs (SAM), cartographie de QTL, analyses de recombinaison ou encore annotation de génome. Une fois les objectifs fixés, le processus de cartographie génétique peut-être divisé en trois étapes clés qui sont (i) la production d'une population en ségrégation (ii) l'identification de marqueurs moléculaires polymorphes et le génotypage de la descendance et (iii) les analyses bio-informatiques des données de ségrégation des marqueurs.

4.2.1. La production d'une population en ségrégation

La première étape de la construction d'une carte génétique réside dans le fait de disposer d'une population d'individus en ségrégation.

D'une part, une attention particulière doit être prêtée au choix des souches parentales (Figure 6), puisque le niveau de polymorphisme (différence génétique entre les parents) est un élément important à ne pas négliger (Young 2000). En effet, le niveau de polymorphisme va déterminer le niveau d'investissement dans le développement de marqueurs moléculaires opérationnels. Un faible niveau de polymorphisme représente ainsi un facteur limitant certain dans la réussite d'un projet de cartographie. L'échec du projet de cartographie du génome de *Gibberella zeae* par Cumagun *et al.* (2007), lié au caractère monomorphe des génomes parentaux, en est une bonne illustration. Le niveau de polymorphisme étant inhérent à l'espèce considérée, il est préférable de l'analyser au sein d'une population d'individus avant d'initier le processus de cartographie, de manière à choisir les parents les plus adaptés. Cependant en pratique, le choix des souches parentales résulte généralement d'un compromis entre la question scientifique et la faisabilité technique en laboratoire. En effet, les génotypes parentaux sont le plus souvent choisis en fonction des objectifs initiaux (par exemple : cartographie de virulence vs avirulence) ou des contraintes biologiques (compatibilité sexuelles, difficultés technique à réaliser les croisements), plutôt qu'en fonction du niveau de variabilité génétique entre les parents. Enfin, outre le génotype des parents, leur phénotype peut également revêtir une importance particulière. En effet, si l'objectif initial de la carte génétique est la cartographie de QTL, il est préférable de choisir des parents aux phénotypes contrastés pour les traits considérés (Foulongne-Oriol 2012), de manière à observer une forte variabilité des traits au sein de la descendance.

D'autre part, la taille de la population en ségrégation joue un rôle capital dans la construction d'une carte génétique, puisque la précision de la carte augmente avec la taille de la population (Foulongne-Oriol 2012). En effet, les estimations de fréquences de recombinaison peuvent se révéler peu robustes lorsqu'elles sont calculées sur de faibles effectifs, ce qui peut affecter la puissance de détection des liaisons génétiques et conduire à la constitution de groupes de liaison fragmentés et à un mauvais arrangement des marqueurs le long de chaque groupe (Ferreira *et al.* 2006). Chez les champignons, la taille des populations en ségrégation utilisées en cartographie génétique se trouve contrainte par le nombre de descendants qui peuvent être obtenus. De manière générale, la taille des populations excède

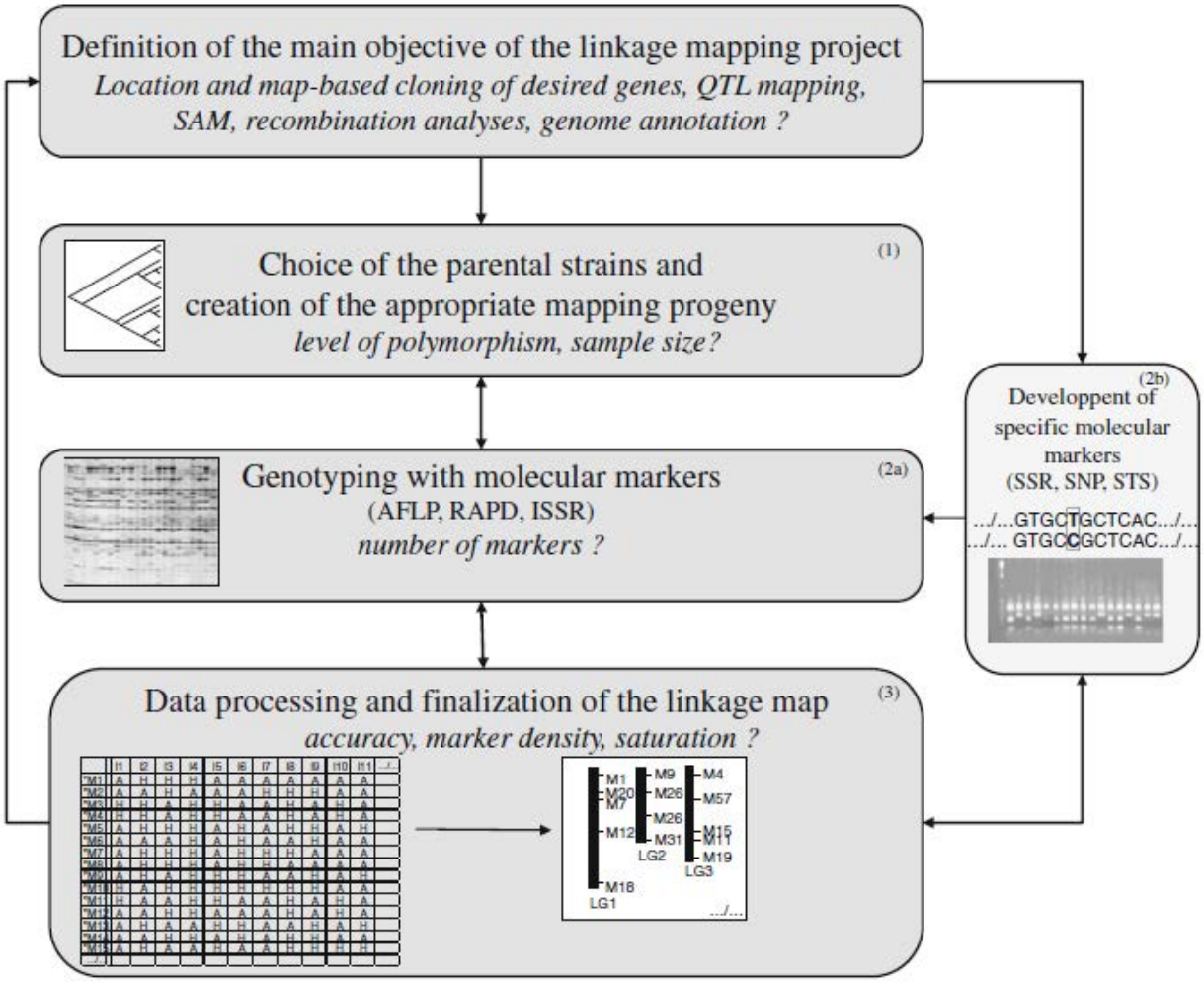


Figure 6: Diagramme résumant les étapes clés de la construction d'une carte génétique : (1) choix des deux souches parentales, obtention de la population en ségrégation et définition de sa taille ; (2) génotypage de la population en ségrégation via soit des marqueurs moléculaires universels (2a) ou des marqueurs spécifiques nécessitant une phase de développement (2b) ; (3) analyses des données génotypiques via des programmes de cartographie adéquats. D'après Foulongne-Oriol *et al*. 2012.

rarement la centaine d'individus, ce qui pose la question de la robustesse des cartes génétiques construite chez les champignons (Foulongne-Oriol 2012).

4.2.2. Identification de marqueurs moléculaires polymorphes et génotypage de la descendance

La deuxième étape de la construction d'une carte génétique consiste à identifier les marqueurs polymorphes qui vont être utilisés pour le génotypage de la descendance et les calculs de distances génétiques (Figure 6).

Les marqueurs moléculaires utilisés pour la construction de cartes génétiques de champignons sont les mêmes que ceux utilisés pour les plantes et les animaux (voir Vignal *et al.* 2002; Peters *et al.* 2003; Jones *et al.* 2009 pour des articles de synthèse). Les marqueurs moléculaires utilisés pour la construction de cartes génétiques de champignons sont variables, et ont fortement évolués au gré des améliorations des techniques de biologie moléculaire.

Au début des années 1990, l'avènement des techniques de biologie moléculaires a permis la construction des premières cartes génétiques basées sur des marqueurs ADN tels que les RFLP (restriction fragment length polymorphism) ou RAPD (random amplified polymorphic DNA) (Kerrigan *et al.* 1993; Xu & Leslie 1996). Le développement de nouvelles techniques de génotypage à haut débit a permis l'apparition de cartes génétiques de deuxième génération, basées notamment sur les marqueurs AFLP (amplified fragment length polymorphism) qui offraient l'avantage de pouvoir s'affranchir des données de séquences pour leur développement, d'être générés en grand nombre pour une cartographie à haute résolution (Vos *et al.* 1995), et d'être plus reproductibles que les marqueurs RAPD. Par conséquent, ces marqueurs ont été de plus en plus utilisés pour la construction de cartes génétiques de champignons (Forche *et al.* 2000; van der Nest *et al.* 2009), soit de manière exclusive (Terashima *et al.* 2002; Lind *et al.* 2005; Luna-Martínez *et al.* 2007; Okuda *et al.* 2009), soit en complément d'autres types marqueurs moléculaires de manière à saturer la carte et à augmenter sa résolution (Jurgenson *et al.* 2002a, 2002b; Foulongne-Oriol *et al.* 2010).

Plus récemment, la découverte des marqueurs microsatellites ou SSR (simple sequence repeats) a ouvert la voie de la construction de cartes génétiques de troisième génération. Outre leur popularité pour une large gamme d'utilisation en écologie, et en biologie, ce sont actuellement les marqueurs les plus utilisés en génétique, et particulièrement

en cartographie génétique (Kaye *et al.* 2003; Goodwin *et al.* 2007; Manzo-Sánchez *et al.* 2008; Foulongne-Oriol *et al.* 2010), de par le haut niveau de polymorphisme qu'ils présentent au sein d'une espèce. Cependant, Dutech *et al.* (2007) ont mis en évidence la difficulté de caractérisation et de développement de ce type de marqueurs chez les champignons. Les marqueurs microsatellites présentent également l'inconvénient d'être souvent spécifiques à une espèce et donc peu transférable, ce qui implique qu'un développement de novo est nécessaire pour chaque nouveau projet de cartographie (Foulongne-Oriol 2012).

Enfin, l'avènement des techniques de séquençages NGS (next generation sequencing), combinées aux techniques de screening de marqueurs moléculaires à l'échelle du génome entier tel que le RRS (reduced-representation sequencing) ou la technique de génotypage en multiplexage MSG (multiplexed shotgun genotyping), a permis de surmonter les contraintes techniques et financières de la cartographie génétique (Davey *et al.* 2011) liées à l'utilisation des marqueurs précédemment cités. La cartographie génétique de quatrième génération, basée sur les marqueurs SNPs (single nucleotide popymorphism) et en plein essor. En effet, les nouvelles technologies de séquençage à haut débit, telle que le séquençage Illumina®, a ouvert la voie de nouvelles stratégies de génotypage et de cartographie génétique basées sur le re-séquençage à une faible couverture d'un grand nombre de descendants (Huang *et al.* 2009; Xie *et al.* 2010). De plus, les nouvelles techniques d'étiquetage dédiées au séquençage d'un grand nombre d'individus en multiplexage (sur une seule ligne) permet de réduire encore le côut du re-séquençage (Cronn *et al.* 2008). Cette nouvelle méthodologie s'avère être environ 20 fois plus rapide pour l'acquisition des données, et les cartes de laisons qui en résulte 35 fois plus précise pour la détermination des points de recombinaison, comparé aux cartes basées sur des marqueurs amplifiés par PCR (Huang *et al.* 2009). Cette nouvelle stratégie de cartographie a été rapidement appliquée aux plantes (Huang *et al.* 2012; Zhou *et al.* 2014) et aux animaux (Andolfatto *et al.* 2011; You *et al.* 2013). Elle a également été récemment mise en œuvre dans la construction de cartes génétiques à haute densité pour le champignon Shiitake, *Lentinula edodes* (Au *et al.* 2013) et pour l'agent de la septoriose du blé *Zymoseptoria tritici* (Lendenmann *et al.* 2014).

La question de la densité en marqueurs moléculaires joue un rôle crucial dans le processus de cartographie génétique, celle-ci conditionnant directement la résolution de la carte. Leur nombre varie de quelques dizaines à plusieurs milliers dans le cas des marqueurs SNPs, simplifiés par la suite en unités appelées "bins de recombinaison". En plus de dépendre du nombre de marqueurs utilisés, la densité d'une carte génétique va également être

conditionnée par l'utilisation que l'on souhaite en faire (Foulongne-Oriol 2012). Ainsi, la cartographie de QTL, la sélection assistée par marqueurs ou encore la caractérisation d'un génome nécessite d'avoir une densité de marqueurs suffisante et homogène sur l'ensemble des chromosomes. A l'inverse, si l'objectif de la carte et de réaliser un clonage, il est préférable d'enrichir spécifiquement la région contenant le gène ciblé (Kubisiak *et al.* 2011). Cependant, il a été démontré qu'au-delà d'une certaine densité de marqueurs (dépendant de la taille du génome, du nombre de descendants et du nombre de crossing-over qui s'opèrent), l'ajout de marqueurs n'a aucun effet sur la résolution de la carte et la puissance de détection et de location de QTL. Ceci implique que les groupes de liaison sont saturés, et que leur nombre correspond au nombre réel de chromosomes du génome haploïde. Tout marqueur ajouté viendra donc s'insérer dans la structure des groupes déjà définis. Il convient donc si possible d'effectuer le travail de cartographie parallèlement à un caryotypage, de manière à connaitre à priori le nombre de groupes de liaison attendus.

4.2.3. Analyses bio-informatiques des données de ségrégation des marqueurs

La dernière étape de la construction d'une carte génétique consiste en l'analyse des données de génotypage des descendants, acquises au cours des étapes précédentes. Dans un premier temps, une étape de vérification de la ségrégation mendélienne des marqueurs moléculaires utilisés est nécessaire, sous peine de détecter de fausses liaisons entre marqueurs (Foulongne-Oriol 2012). Pour tester une éventuelle déviation par rapport aux ratios mendéliens attendus, des tests de Chi-2 (X^2) doivent être réalisés pour chaque marqueur. Une ségrégation non-mendélienne des marqueurs peut être le fruit de biais expérimentaux ou de phénomènes biologiques. Ainsi, un biais de sélection peut s'opérer au cours de l'isolement des individus de la population en ségrégation, pouvant conduire à des distorsions de ségrégation des marqueurs (Jurgenson *et al.* 2002a, 2002b; Larraya *et al.* 2000). De plus, la proximité entre les marqueurs utilisés et des gènes à allèles létaux ou à effets épistatiques a été suggérée comme source potentielle de ségrégation non-mendélienne de marqueurs, particulièrement dans le cas de marqueurs situé à proximité de loci liés au type sexuel (Terashima *et al.* 2002; Marra *et al.* 2004). Nous avons d'ailleurs récemment avancé cette hypothèse pour expliquer la distorsion observée dans la ségrégation de marqueurs microsatellites utilisés pour la validation d'une descendance de *M. larici-populina*, en vue de la construction d'une carte génétique (cf. Chapitre 3).

Une fois ces vérifications effectuées, le processus de cartographie *sensu stricto* peut débuter. La construction d'une carte génétique consiste à définir dans un premier temps les groupes de liaison, constitués de marqueurs qui co-ségrègent dans la descendance. Le degré de liaison entre marqueurs est estimé par le ratio entre la probabilité de présence d'une liaison et la probabilité de son absence, paramètre appelé « odds ratio ». Ce ratio est généralement exprimé en logarithme, appelé « LOD » score pour « logarithm of odds » (Risch 1992). Typiquement, on considère que deux marqueurs sont liés si le LOD score est supérieur à 3. Concrètement, un LOD score de 3 indique que la probabilité de présence d'une liaison entre deux marqueurs est 1000 fois plus élevée que la probabilité d'absence. Dans un second temps, ces marqueurs sont ordonnés le long des groupes de liaison en fonction des distances génétiques calculés entre paire de marqueurs, basées sur les fréquences de recombinaison (Paterson 1996). Des fonctions particulières, appelées « mapping functions » sont nécessaires à la conversion des fréquences de recombinaison en distance génétique (exprimées en centiMorgans (cM)). Ceci résulte du fait qu'il n'existe pas de relation linéaire entre la fréquence de recombinaison et la fréquence des crossing-over (Kearsey & Pooni 1996; Hartl & Jones 2001), du moins au-delà d'une certaine distance. En effet, il a été montré que cette relation linéaire existe pour de faibles distances génétiques entre marqueurs (inférieure à 10 cM), mais pas au-delà (Hartl & Jones 2001). Les deux fonctions les plus utilisées sont la fonction de Kosambi (Kosambi 1943), qui suppose que les évènements de recombinaison influencent l'apparition de recombinaisons avec les marqueurs adjacents, et la fonction de Haldane (Haldane 1919), qui ne suppose aucune interférence entre évènements de recombinaison (Kearsey & Pooni 1996; Hartl & Jones 2001).

Les logiciels utilisés pour la cartographie génétique chez les champignons sont les mêmes que ceux utilisés chez les plantes et les animaux, aucun logiciel dédié n'ayant été développé. On retrouve notamment les logiciels MapDisto (Lorieux 2012), MapManager QTX (Manly *et al.* 2001), MAPRF (Ritter & Salamini 1996), MapMaker (Lander *et al.* 1987) et JoinMap (Stam 1993). Ces deux derniers sont cependant les plus utilisés en cartographie de génomes fongiques, les autres programmes ayant été très peu utilisés. Ces deux logiciels diffèrent par l'algorithme utilisé pour ordonner les marqueurs et calculer les distances génétiques, leur interactivité, le système d'exploitation requis (Cheema & Dicks 2009) et présentent donc chacun leurs avantages et inconvénients. A titre d'exemple, JoinMap est un logiciel très facile d'utilisation (de type « presse bouton »), composé de fenêtres dédiées à chaque analyse (estimation des liaisons entre paires de marqueurs, arrangement des

marqueurs, test de distorsion de ségrégation,…). Cependant, il offre très peu de liberté à l'utilisateur qui ne peut modifier que très peu de paramètres. A l'inverse, MapMaker est un logiciel en lignes de commandes nettement moins accessible aux novices, mais qui permet de réaliser des analyses personnalisées en offrant la liberté de modifier les paramètres d'analyses. De plus, même si cela ne présente pas un grand intérêt pour la cartographie de génomes fongiques, les populations en ségrégation étant généralement haploïdes et ségrégeant en ratio 1:1, JoinMap peut prendre en charge tous les types de populations rencontrés chez les plantes alors que MapMaker ne le permet pas. Enfin, la représentation graphique de la carte génétique est très souvent produite via l'utilisation du logiciel MapChart 2.1 (Voorrips 2002).

Il est toutefois nécessaire de préciser que la construction d'une carte génétique ne se fait pas nécessairement par l'utilisation de logiciels de cartographie génétique dédiés. En effet, il est possible, à condition de disposer des compétences nécessaires en programmation, de développer un script d'analyses *de novo*. Cette option s'avère très chronophage mais offre l'avantage certain de pouvoir contrôler l'ensemble des paramètres d'analyses, et de ne pas se trouver en quelques sortes face à une « boîte noire », dans laquelle on importe des données et à la sortie de laquelle on obtient une carte génétique sans trop savoir comment elle a été conçue et sur la base de quelles valeurs de paramètres. Cette approche a été récemment appliquée au cours d'une étude pilote de la construction d'une carte génétique de *M. larici-populina* (cf. Chapitre 3). Dans ces travaux, les liaisons entre marqueurs génétiques utilisés ont été identifiées par analyse du déséquilibre de liaison, paramètre très utilisé en génétique des populations, qui est basé sur les fréquences alléliques observées dans la descendance à deux loci.

5. La cartographie de QTL

5.1. Le principe de la cartographie de QTL

L'analyse de QTL est basée sur le principe de détection, au sein d'une descendance, d'une association entre le phénotype d'un trait et le génotype de marqueurs polymorphes. Cela implique donc de disposer d'une descendance, avec d'une part les génotypes des descendants sur un ensemble de marqueurs génétiques polymorphes et d'autres part un jeu de données phénotypiques sur ces mêmes descendants. Les marqueurs sont utilisés pour partitionner la descendance en groupes génotypiques distincts, basés sur le génotype de chaque individu à un marqueur donné, et pour déterminer s'il existe une différence

significative entre groupes pour le trait considéré (Tanksley 1993; Young 1996). Une différence significative de la valeur moyenne du trait entre groupes génotypiques pour un marqueur génétique donné indique que ce dernier est lié à un QTL contrôlant le trait. En effet, plus un marqueur est proche d'un QTL, moins la probabilité qu'un crossing-over ne s'opère entre eux est grande. Par conséquent, le QTL et le marqueur vont très souvent ségréger ensemble dans la descendance, et la valeur moyenne du trait d'un groupe génotypique donné va être significativement différente de celles des autres groupes. Inversement, lorsqu'un marqueur est faiblement voire non lié à un QTL, ces derniers ségrégent indépendamment dans la descendance. Dans ce cas, aucune différence significative entre valeurs moyennes des traits des différents groupes n'est attendue.

Toutefois, la cartographie de QTL ne nécessite pas forcément de disposer d'une descendance. En effet il est possible, par une approche de génétique d'association pangénomique ou Genome-Wide Association Study (GWAS), de cartographier des QTL d'intérêt en populations naturelles. La génétique d'association consiste à identifier, à l'échelle du génome entier, les corrélations significatives entre les nombreuses variations génétiques (SNP) et les traits phénotypiques (Gibson & Muse 2009).

5.2. Méthodologie de l'analyse de QTL

5.2.1. Les méthodes d'analyses et logiciels

Actuellement, trois méthodes d'analyses de QTL sont majoritairement utilisées : l'analyse 'single-marker' (SM), le 'simple interval mapping' (SIM) et le 'composite interval mapping' (CIM) (Tanksley 1993; Liu 1998).

L'analyse 'single-marker' est la méthode la plus simple de détection de QTL et peut inclure des méthodes statistiques variées telles que les *t*-tests, l'analyse de variance (ANOVA) et la régression linéaire. La régression linéaire est largement utilisée car le coefficient de détermination (R^2) du marqueur indique le pourcentage de variance phénotypique expliquée par le QTL. Cette méthode ne nécessite pas de disposer d'une carte génétique, mais elle est relativement peu puissante. En effet, plus un QTL est éloigné du marqueur, plus son effet sera sous-estimé à cause des recombinaisons limitant sa détection (Tanksley 1993).

L'analyse par 'simple interval mapping' nécessite de disposer d'une carte génétique et analyse les intervalles entre marqueurs adjacents le long des chromosomes (Lander &

Botstein 1989). Dans cette approche, la prise en compte de marqueurs adjacents et liés permet de compenser les évènements de recombinaison entre marqueurs et QTL, ce que ne fait pas l'analyse 'single-marker'. Par conséquent, elle est considérée comme plus puissante que cette dernière (Lander & Botstein 1989; Liu 1998).

Plus récemment, l'analyse par 'composite interval mapping' est devenue très populaire. Cette méthode combine 'l'interval mapping' avec la régression linéaire et inclut des marqueurs génétiques additionnels dans le modèle statistique, en plus de ceux utilisés pour 'l'interval mapping' classique (Jansen 1993; Zeng 1993, 1994; Jansen & Stam 1994). Le principal avantage de cette méthode est qu'elle est beaucoup plus précise et puissante pour la détection et la localisation de QTL, notamment lorsque les QTL sont liés.

Un grand nombre de logiciels dédiés à la cartographie de QTL existe, en licence libre ou payante. L'ensemble de ces logiciels permet de réaliser des analyses de QTL suivant les trois méthodes décrites précédemment, certains offrant également d'autres algorithmes d'analyses. Cependant, pour effectuer des analyses en SIM, la majorité des auteurs ont utilisé MapMaker/QTL (Lincoln *et al.* 1993) et QGene (Nelson 1997), alors que QTL Cartographer (Basten *et al.* 2001), MapManager QTX (Manly *et al.* 2001), PlabQTL (Utz & Melchinger 1996) ou le package Rqtl (Broman *et al.* 2003) sont souvent utilisés pour les analyses en 'composite interval'.

5.2.2. Les étapes clés de l'analyse de QTL

La première étape consiste à choisir, parmi les méthodes existantes, celle qui est la plus adaptée pour répondre aux objectifs fixées. Classiquement, les analyses en cartographie par intervalle conduisent à un profil des sites potentiels de localisation des QTL, entre marqueurs adjacents et liés entre eux. Concrètement, les QTL sont positionnés par rapport à une carte génétique. Les résultats des tests statistiques pour des analyses en SIM ou en CIM sont typiquement représentés par un LOD score (logarithm of odds) ou un LRS (likelihood ratio statistic), la conversion du LOD vers le LRS étant donnée par : LRS = 4,6 x LOD (Liu 1998). Ces profils de LOD ou LRS permettent d'identifier la position la plus probable d'un QTL en relation avec la carte génétique, qui correspond à la position présentant le LOD ou LRS le plus élevé.

Dans un second temps, il convient de déterminer le seuil de LOD ou LRS au-delà duquel un QTL sera considéré comme statistiquement significatif. Généralement, la

détermination de ce seuil de significativité se fait en réalisant des tests de permutation (Churchill & Doerge 1994). Cette méthode consiste à permuter les valeurs de traits au sein de la population tout en gardant les génotypes aux marqueurs constants, ce qui rompt les associations entre traits et marqueurs. Des analyses de QTL sont ensuite conduites afin d'estimer les faux-positifs parmi les associations entre traits et marqueurs (Churchill & Doerge 1994; Haley & Andersson 1997; Hackett 2002). Ce processus est répété un grand nombre de fois (500 itérations ou plus) et le niveau de significativité est estimé en rapport avec le nombre de faux-positifs observés parmi les associations.

Dans un troisième temps, bien que la position la plus probable d'un QTL soit la position à laquelle le LOD ou le LRS est le plus élevé, il convient de déterminer l'intervalle de confiance du QTL. Il existe plusieurs méthodes d'estimation de l'intervalle de confiance, la plus simple étant l'intervalle 1-LOD. Elle correspond à la région de part et d'autre d'un QTL qui correspond à une diminution du LOD score de 1 unité (Lander & Botstein 1989; Hackett 2002). Le bootstrapping, une méthode statistique de ré-échantillonnage, est un autre moyen d'estimation de l'intervalle de confiance d'un QTL (Visscher *et al.* 1996; Liu 1998), implémenté dans de nombreux logiciels de cartographie de QTL.

Enfin, un QTL peut être qualifié de « majeur » ou « mineur » selon son effet sur le trait considéré. L'effet d'un QTL est défini comme la proportion de variance phénotypique expliquée par le QTL, et quantifiable par la valeur du R^2. Un QTL à effet « majeur » contribue pour une part importante de la variation phénotypique (généralement supérieure à 10%) alors qu'un QTL à effet « mineur », inversement, contribue pour une faible part à cette variation (généralement inférieure à 10%) (Collard *et al.* 2005).

5.3. Les facteurs déterminants l'analyse de QTL

Il existe plusieurs facteurs susceptibles d'influencer la détection et la localisation des QTL (Tanksley 1993; Asíns 2002). Les principaux facteurs sont les propriétés génétiques des QTL contrôlant les traits, les effets environnementaux, la taille de la population et les erreurs expérimentales.

Les propriétés génétiques des QTL incluent leurs effets sur l'expression du trait considéré. Seul les QTL à effet majeur seront détectés, ceux à effet mineur se trouvant sous le seuil de significativité. La distance entre QTL est une autre propriété génétique qui influence également leur détection. En effet, les QTL très proches (moins de 20 cM) sont généralement

détectés comme un seul et même QTL lorsque la population ne dépasse pas les 500 individus (Tanksley 1993).

Les effets environnementaux peuvent également jouer un rôle majeur dans la détection des QTL, car ils peuvent fortement influencer l'expression des traits. La part d'implication des facteurs génétiques dans l'expression des traits par rapport aux facteurs environnementaux s'estiment par des mesures d'héritabilité (voir plus haut), paramètre qui module directement la puissance de détection. En effet, il a été montré que la puissance de détection augmente avec l'héritabilité du trait (Beavis 1998).

La taille de la population utilisée est sans doute le facteur qui conditionne le plus fortement la détection des QTL (Collard *et al.* 2005). En effet, plus les effectifs sont importants, plus la carte génétique sera précise et permettra la détection de QTL à effet mineur avec une précision de localisation accrue (Tanksley 1993; Haley & Andersson 1997). Une augmentation des effectifs induit un gain en puissance statistique, en estimation des effets des QTL et en estimation de leurs intervalles de confiance (Darvasi *et al.* 1993; Beavis 1998).

Finalement, les erreurs expérimentales impactent fortement la puissance de détection des QTL. Les principaux biais sont l'introduction d'erreurs de génotypage des marqueurs au sein de la descendance ainsi que des mesures faussées des traits. En effet, d'une part, les erreurs de génotypage sont susceptibles d'affecter l'ordre et les distances entre marqueurs de la carte génétique (Hackett 2002). D'autre part, la précision du phénotypage est d'une importance capitale pour la cartographie de QTL.

Résultats

Chapitre 1

Influence des traits d'histoire de vie sur la structuration des populations de *Melampsora larici-populina* : cas des traits liés à la morphologie des spores

Chapitre 1

Influence des traits d'histoire de vie sur la structuration des populations de *Melampsora larici-populina* : cas des traits liés à la morphologie des spores

Dans ce premier chapitre, nous nous sommes intéressés à l'évolution de la taille des spores au cours de la dispersion de *M. larici-populina* en milieu naturel. Notre but était de savoir si les traits liés à la morphologie des spores du champignon interviennent dans son adaptation aux facteurs abiotiques (environnementaux) et biotiques (hôte peuplier) au cours de sa dispersion, et s'ils peuvent ainsi potentiellement conditionner la structuration de ses populations à l'échelle du paysage.

Pour cela, les traits morphologiques des urédospores de trois populations de *M. larici-populina* échantillonnées sur peupliers sauvages, deux années successives dans la vallée de la Durance, ont été mesurés. Ces populations se distinguent par les caractéristiques spatio-temporelles de leur échantillonnage. Dans un premier temps, nous avons testé si les traits mesurés évoluent au cours de la dispersion le long du transect étudié. Dans un second temps, si une évolution significative est observée, la nature des forces évolutives qui en sont à l'origine, à savoir un simple processus démographique (dérive génétique) ou la sélection naturelle, a été testé par une approche de comparaison Q_{ST}-F_{ST}. Une mise en évidence de l'évolution par sélection des traits morphologiques des spores de *M. larici-populina* permettrait de valider l'hypothèse selon laquelle ces traits joueraient un rôle dans l'adaptation du champignon. Les deux échantillonnages successifs permettront de mettre en évidence une éventuelle répétabilité du phénomène dans le temps.

Au cours de cette étude, nous avons testé (i) l'évolution de la morphologie des spores au cours de la dispersion du champignon (Q_{ST}) ; (ii) testé l'existence d'une structuration génétique entre populations (F_{ST}) suite à leur dispersion en utilisant un panel de 25 marqueurs microsatellites développés au laboratoire (Barrès *et al.* 2008; Xhaard *et al.* 2009) et (iii) testé la nature des forces évolutives à l'origine de cette évolution phénotypique (comparaison Q_{ST}-F_{ST}).

Ce chapitre se présente sous la forme d'un article en préparation.

ARTICLE 1: EVOLUTION OF SPORE SIZE DURING DISPERSAL OF THE POPLAR RUST FUNGUS *MELAMPSORA LARICI-POPULINA*

Pernaci M., Fabre B., Frey P., Halkett F.

Abstract

A classical trade-off in the evolution of dispersal is the relative ability to colonize empty sites versus the ability to compete with relatives in a saturated site. In this study, the poplar rust fungus *Melampsora larici-populina* served as a model to test this paradigm. We focused on the evolution of fungal spores during dispersal, and attempted to decipher the nature of evolutionary forces involved, by means of Q_{ST}-F_{ST} comparisons. The study took place in an ecological corridor, the Durance River valley, in which rust epidemics were monitored on a yearly basis. Ninety fungal isolates were randomly sampled in 2008 and 2009 in three populations each year: an "initial" population sampled upstream at the beginning of the epidemic, a "resident" population sampled at the same place at the end of the epidemic and a "migrant" population collected downstream at the end of the epidemic. The analysis of neutral genetic differentiation (F_{ST}) among populations, using 24 microsatellite markers, revealed a lack of genetic structure between upstream populations and independent genetic drift events during migration. The phenotypic differentiation analysis (Q_{ST}) was based on two traits of spore morphology involved in dispersal: the spore volume and the length/width ratio. We observed a consistent pattern of evolution of spore volume both years, with a significant increase in size for the "migrant" populations. The pattern of evolution of the length/width ratio trait was less obvious. Comparisons of neutral genetic and phenotypic differentiation proved that selection occurred on the volume of spores during the fungus dispersal along the Durance River valley. Here, we thus highlight that natural selection is acting in the time course of a single yearly epidemic.

1. Introduction

Dispersal remains one of the most misunderstood process in evolutionary biology and ecology (Kokko & López-Sepulcre 2006; Edelaar & Bolnick 2012) despite being a key life history trait for diversification, evolution and persistence of species. Dispersal is crucial for pathogens as it determines the magnitude of disease spread (Brown & Hovmøller 2002; Viboud *et al.* 2006). Thus, one would expect the properties of fungal pathogen spores to evolve to reach their maximum dispersal capacities. Two dispersal life history traits which affect the process of fungal dispersal are the spore volume and the length/width ratio, since these traits are both involved in spore release, transport and deposition (Philibert *et al.* 2011). While it has never been demonstrated for airborne phytopathogenic fungi, they should be subject to evolution during an epidemic. Identifying the processes by which life history traits - especially dispersal traits- evolve is crucial in order to better understand epidemiology of plant diseases and to design strategies to manage them. However, identifying the processes underlying the evolution of life history traits is still a challenge, especially for pathogenic fungi.

It has been demonstrated that two of the primary traits of pollen grains that enhance dispersal are the shape and the size (Cruzan 1990; Jackson & Lyford 1999; Ackerman 2002). First, more spherical particles can disperse further thanks to an higher velocity than those which deviate from sphericity, since there is lower friction forces in the former (Jackson & Lyford 1999; Ackerman 2002). Second, it has been indicated that pollen grains of smaller size are better dispersed by wind in nature (Vonhof & Harder 1995). In addition, Arredondo-Nunez *et al.* (2011) observed that introduced species - presumed to generally be good dispersers - produce smaller pollen grains on average than native species. In the same way, it has been shown that smaller plant seeds disperse further than larger ones (Clark *et al.* 1998; Coomes & Grubb 2003).

Little attention has been paid to the effect of spore size and shape on airborne dispersal ability of fungal spores, compared to plant seeds or pollens (Norros et al. 2014). From the physical point of view, most of the Lagrangian stochastic turbulence models (LSTMs) applied to plant seeds and pollens predict that dispersal of spores is not sensitive to size (aerodynamic diameter below ca. 40µm) (Kuparinen *et al.* 2007). Indeed, their settling velocity, which is the only size-dependent process used in LSTMs, should be very low. Hence, the particle trajectories should be completely dominated by the airflow. Recently, Norros *et al.* (2014)

supplemented a LSTM (Kuparinen *et al.* 2007) with a mechanistic deposition model (Petroff *et al.* 2008b) fitted to empirical deposition data for 1-10 µm diameter fungal spores. The results showed that the dispersal is in fact highly sensitive to particle size, with almost hundredfold more of 1 µm diameter particles dispersing beyond a given distance than 10 µm particles. It has also been shown that spore size is a good proxy for classification between invasive (i.e. with high dispersal strategy) and non-invasive fungal species, the former presenting smaller spores (Philibert *et al.* 2011). In addition, the length/width ratio of airborne spores can also have a strong impact on the dispersal potential of individuals (Roper *et al.* 2008, 2010; Philibert *et al.* 2011) in that spindle-shaped spores may disperse more easily thanks to a better penetration in the air.

From the biological point of view, as it has been shown in plant seeds or pollens (Smith & Fretwell 1974; Coomes & Grubb 2003; Jakobsson & Eriksson 2003) that the fungal spore volume can be directly correlated to their nutrient content, and thus would condition infection and survival potential of individuals (Philibert *et al.* 2011). Nutrient reserves have a major importance in the infection process of the host plant by the pathogen, particularly for obligate biotrophic pathogens. During the early infection steps, including spore germination and development of a germ tube, spores can only use their own reserves (Hahn 2000). Upon colonization of host plant tissues and formation of the first haustoria, the pathogen becomes biotrophic and draws its energy from infected plant tissues (Hahn 2000). Based on these observations, we hypothesize that smaller, spindle-shaped spores would be the most efficient for dispersal, but they would suffer from lower infection efficiency.

Evolution of life history traits during a dispersal event can result from different evolutionary processes. It can be caused by natural selection (Rimé *et al.* 2005; Keller & Taylor 2008; Burton *et al.* 2010), favoring individuals the best fitted to their environment. A classical constraint which governs evolution of dispersal is the relative ability to compete with relatives in a saturated site versus the ability to colonize empty sites, with evolution towards one of these strategies depending on the cost of the dispersal in a given environment (Hamilton & May 1977; Comins *et al.* 1980; Gandon & Michalakis 2001). However, variation of life history traits can also result from demographic processes through genetic drift. Indeed, the strong demographic fluctuations likely to take place during the dispersal process can modify allele frequencies (Excoffier & Ray 2008; Excoffier *et al.* 2009) leading to a high genetic differentiation between populations along the dispersal gradient. Both neutral and non-neutral loci can be affected by this differentiation through founder effect.

Evolution of quantitative traits can thus come along with a neutral genetic differentiation between individuals, in particular during colonization events, which can be viewed as a spatial analogue of genetic drift (Slatkin & Excoffier 2012). Hence, determining the nature of evolutionary forces causing life history trait evolution during a dispersal event amounts to estimate the level of implication of the demographic processes in this phenomenon.

This estimation is possible by means of the comparison of two indices of the apportionment of genetic variability:

- F_{ST}, which represents a measurement of the genetic variance distribution between populations under hypothesis of neutral evolution (Wright 1951; Weir & Cockerham 1984).

- Q_{ST}, an analogue of the F_{ST} for phenotypic markers, which measures the variance distribution of polygenic quantitative traits between populations. Determination of the forces driving evolution of life history traits, provided by Q_{ST}-F_{ST} comparisons, thus consists in comparing the genetic differentiation between populations expected under hypothesis of neutrality (F_{ST}) to the observed differentiation for quantitative traits (Q_{ST}). Q_{ST}-F_{ST} comparisons represent the most accessible and universal tool to test the role of the natural selection in case of phenotypic differentiation in quantitative traits between populations (Leinonen *et al.* 2008).

We evaluated the evolution of spore size and shape in a plant pathogenic fungus (the poplar rust fungus *Melampsora larici-populina*) during an annual epidemic spread, with the aim to determine which selective and demographic processes are involved. To this aim, we took advantage of a particular ecological system, the Durance River valley (Figure 1), which allows us to follow annual rust epidemics in a one-dimensional natural environment (Xhaard *et al.* 2012). This valley forms a natural ecological corridor, which channels the poplar rust epidemics along the riparian stands of wild poplars, and thus constitutes an ideal site for studying the dispersal of this pathogen. The epidemic starts each spring, in May, by the sexual reproduction of the pathogen on larch, the aecial (sexual) host of *M. larici-populina*. Thus, the epidemic starting point is confined to the poplar-larch sympatry area, in the upstream part the Durance River valley (Xhaard *et al.* 2012). Then, the epidemic spreads downstream, through asexual reproduction on riparian stands of wild black poplar (*Populus nigra*) bordering the Durance River for about 200 kilometers. The epidemic is limited in time by the poplar leaf fall in autumn. Consequently, the riparian poplar forest is cleaned from rust disease each winter, resetting the system each year.

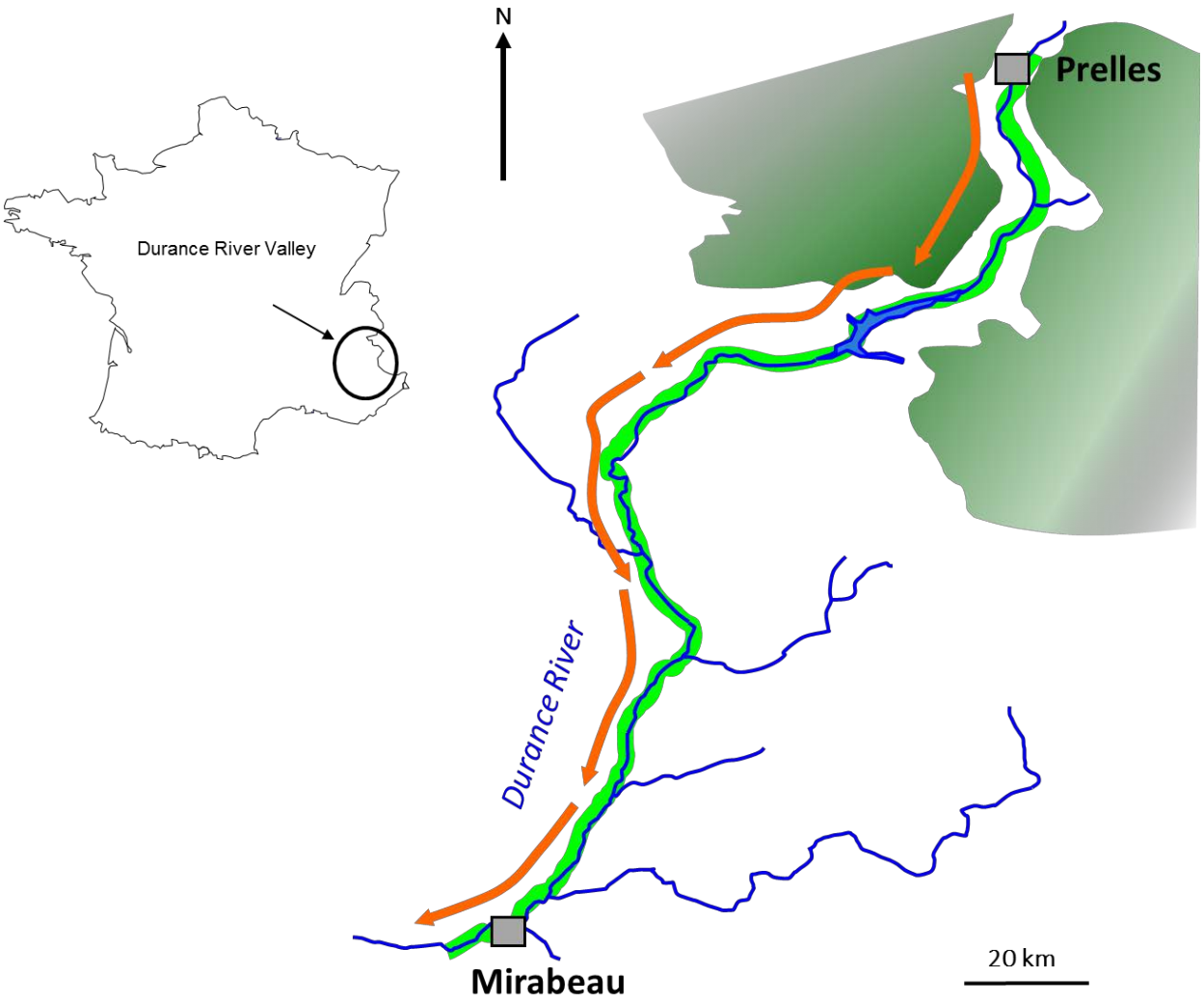


Figure 1: Schematic representation of the Durance River valley and of the two sampling locations of the three populations. The green areas at the top right of the figure represent the poplar-larch sympatry area where sexual reproduction of *Melampsora larici-populina* takes place. The green thick line along the Durance River (in blue) represents the wild *Populus nigra* riparian stands, while the orange arrows represent the direction of rust dispersal from upstream to downstream the Durance River valley.

The *sine qua non* condition for the use of the F_{ST} index is that it must be calculated on neutral marker genetic data (not subjected to selection). If it is not, there is a risk of biased estimates of genetic differentiation (Whitlock 2008). In our study, even if the genetic markers used can be considered to be neutral (i.e. amplifying non-coding regions as microsatellites), within any single year they can be hitchhiked by any selection event occurring during the epidemic phase. In our system, there is no recombination during dispersal, given that *M. larici-populina* propagates by asexual reproduction during the epidemic phase. This implies that alleles carried by different loci within an isolate are all bound during the dispersal event and thus neutral alleles can be pulled by the selection on advantageous loci coding quantitative traits. However, sexual reproduction, which occurs each spring upstream in the valley, leads to new allele combinations each year for both neutral and quantitative traits loci. Therefore, neutral loci are independent from the quantitative traits-coding loci in inter-annual comparisons. We thus decided to base our study on the analysis of two successive years of colonization of the Durance Valley, in 2008 and 2009. This enables us to test for both independence of neutral allelic frequency evolution (as expected through drift) and consistency of quantitative trait evolution (as expected through selection), when comparing results obtained the two years.

The aims of this study are (*i*) to assess the neutral genetic differentiation between populations after a dispersal event, (*ii*) test the hypothesis of an evolution of life history traits of *M. larici-populina* through natural selection, using Q_{ST}-F_{ST} comparisons, and (*iii*) to decipher the evolution pattern of spore traits under selective pressure during the fungal dispersal process.

2. Materials and methods

2.1. Sampling strategy

Three sampling modes were retained (combinations of time and different locations) and repeated in 2008 and 2009, in order to study *M. larici-populina* populations at three key stages of the epidemiological process and to respect the genetic marker neutrality conditions. Isolates were sampled at both ends of the Durance River transect: at Prelles, in the poplar-larch sympatry area (i.e. in the epidemic departure area), and at Mirabeau, downstream the river (the site southernmost from Prelles) (Figure 1). At Prelles, isolates were collected at two different dates and on both hosts: the "initial" populations were sampled on larch needles at

the beginning of the epidemic (end of May), whereas the "resident" populations were sampled on *P. nigra* leaves at Prelles at the end of the epidemic (mid-October). In contrast, the "migrant" populations were sampled at Mirabeau on poplar leaves at the end of the epidemic (mid-October). Isolate sampling periods were the same in 2008 and 2009 in order to allow inter-annual comparisons. Since a previous study revealed the existence of three *M. larici-populina* genetic groups in France (Xhaard *et al.* 2011), and the fungus reproduces clonally during the epidemic phase, the first analysis consisted of a careful discrimination of both genetic groups and clonal lineages (procedure and results detailed in supplementary material).

For each location and collection date, either infected larch needles or infected poplar leaves were collected. To avoid resampling of clonal replicates, each individual was isolated from a distinct leaf/needle. Whenever possible, about 100 leaves/needles were collected randomly from each site from up to 50 trees. For infected poplar leaves, one single uredinium (sporulating lesion-producing urediniospores) per leaf was selected randomly and grown on fresh leaf discs of *P.* × *euramericana 'Robusta'* as described by Barrès *et al.* (2008). For infected larch needles, one single aecium (sporulating lesion-producing aeciospores) per needle was selected randomly and grown similarly on fresh leaf discs of *P.* × *euramericana* 'Robusta'. Single-lesion isolation ensures that a single genotype per sampled leaf is isolated and multiplied, so that both life history trait measurements and molecular analyses can be performed on the same individual genotype. Each rust genotype was multiplied by spray-inoculation on detached poplar leaves of *P.* × *euramericana* 'Robusta' as previously described (Husson *et al*. 2013). For each isolate, an infected poplar leaf disc was frozen at -20°C for genetic analyses and a spore lot stemming from the multiplication was frozen at -80°C to keep them alive for life history trait measurements.

2.2. Genotypic analyses

2.2.1. Microsatellite genotyping

Each isolate collected was subjected to microsatellite genotyping, following the protocol described in (Xhaard *et al.* 2011). DNA was extracted from poplar leaf discs using the BioSprint 96 DNA plant kit used in combination with the BioSprint automated workstation (Qiagen), following the BS96-DNA-plant protocol. Genotyping was performed using 24 microsatellite polymorphic loci: MLP12 (Barrès *et al.*, 2006); MLP49, MLP50, MLP54, MLP55, MLP56, MLP57, MLP58, MLP59, MLP66, MLP68, MLP71, MLP73,

MLP77, MLP82, MLP83, MLP87, MLP91, MLP92, MLP94, MLP95, MLP96, MLP97, and MLP100 (Xhaard *et al.*, 2009, Xhaard *et al.*, 2011). Microsatellite loci were amplified in a GeneAmp PCR system 9700 thermocycler (Applied Biosystems) under the same conditions as in Xhaard *et al.* (2011): an initial denaturing stage of 5 min at 95°C; 32 cycles including 30 s of denaturation at 95°C, 90 s annealing at 60°C and 60 s extension at 72°C; and finally a 30 min extension stage at 60°C. PCR was run for each isolate using 5 µl of Qiagen Multiplex PCR kit, 2 µl of DNA, 0.2 µl of each reverse and forward (labelled with a fluorescent tag FAM, NED, VIC or PET) primers, for a 10-µl final reaction volume. Three multiplex PCRs, comprising 9, 7 and 9 loci, respectively, were run. PCR products from the three multiplex reactions (3 µl PCR1, 4 µl PCR2 and 5 µl PCR3) were pooled and loaded on an ABI 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). A LIZ-1200 size standard was used to size fragments, and alleles were scored using GENEMAPPER 4.0 (Applied Biosystems). Individuals were deleted from further analysis if more than six loci failed to amplify.

2.2.2. Population genetics analyses

Genetic differentiation between populations, which is likely to occur during the dispersal process, was estimated through F_{ST} calculations (Wright, 1951, Weir & Cockerham, 1984). Analyses were performed using FSTAT version 2.9.3 (Goudet 1995) and HierFstat version 0.04-4 (Goudet & Büchi 2006). The latter allowed us to test the effect of three hierarchical factors on the genetic population structure: an "individual" factor, nested in the "population" factor, itself nested in the "year" factor. *F*-statistics were calculated according to Weir & Cockerham (1984). A global F_{ST} concerning the six "initial", "resident" and "migrant" populations sampled in 2008 and 2009 and two annual F_{ST} (2008 and 2009) concerning the three populations within each year were calculated. Pairwise F_{ST} were also calculated to test for possible intra-annual (population pairs of the same year) and inter-annual (population pairs over the two years) genetic differences. Pairwise comparisons were performed with all possible combinations of each sampling modality, for a total of 15 comparisons. Calculations of the 95% confidence intervals (95CI) through the bootstrapping method over loci (1000 independent sub-samplings over five loci) and the F_{ST} significance tests for $\alpha = 0.05$ (1000 individuals permutations between populations) were also performed under FSTAT. Probability significance levels were corrected for multiple comparisons ($P = 0.0033$ for $\alpha = 5\%$ according to the Bonferroni method).

2.3. Phenotypic analyses

2.3.1. Experimental design

Fifteen isolates of each population were randomly selected without replacement from genotypes identified as belonging to the "wild" genetic group. The selected isolates had been multiplied beforehand by spray inoculation on detached poplar leaves of *P.* × *euramericana* 'Robusta' as previously described (Husson *et al.* 2013), in order to eliminate any environmental effect from sampling location and to insure enough material for phenotypic characterizations. For each isolate, the resulting urediniospores were harvested and kept in a desiccator at 1°C before measurements.

2.3.2. Spore volume and length/width ratio measurements

For each isolate, about 100 spores were photographed with a microscope at 400X magnification. A urediniospore suspension was prepared by mixing 1 mg urediniospores with 500 µL of lactic acid and 400 µL of water-agar (0.1 $g.L^{-1}$). This suspension was deposited on a Malassez haemocytometer. Spores were allowed to settle (approximately five minutes) to group on a single focal plane in order to shoot sharp images. Image analysis was performed using Axiovision 4.7® via a dedicated analysis script. We measured two variables expressing spore sizes: the minimal Feret diameter (i.e. width) and the maximal Feret diameter (i.e. length), which represent the smallest and the largest distance between two parallel lines tangential to the spore, respectively. A visual check of the identification of each spore by the software was performed. The spore volume, calculated as $V = [(4/3)\pi*(length/2)*(width/2)^2]$, as well as the length/width ratio (thereafter noted L/W ratio) were estimated from the maximal and minimal Feret values.

2.3.3. Multifactorial analysis

To highlight changes in spore size, the average spore volume and L/W ratio of 15 isolates for each of six populations (belonging to the two studied years) were compared. The same hierarchical factors as for genetic analyses were considered. However, sample sizes were unbalanced because the spore numbers measured per isolate were not equal. This led us to perform a three factor hierarchical analysis of variance (ANOVA) with unbalanced numbers for each quantitative trait. The corrected average volumes and L/W ratios, which

take into account previous factors, were calculated and compared pairwise (*t*-test). All three hierarchical ANOVAs and matching tests (*t*-test) were performed with R version 2.13.1.

2.3.4. Q_{ST} calculations and tests of selection

The possible phenotypic differentiations between populations, based on the spore volumes and L/W ratios, were estimated through Q_{ST} calculations (Spitze 1993). Inter- and intra-population variance components were deduced from ANOVAs performed on each quantitative trait. As was performed for the F_{ST} calculations, a global Q_{ST}, two annual Q_{ST} (2008 and 2009) and inter-annual and intra-annual Q_{ST} were estimated. 95CI were generated through the Jackknife method (re-calculations of Q_{ST} by omitting one by one all individuals of the considered populations). Probability significance levels were also corrected for multiple comparisons (P = 0.0033 for α = 5% according to the Bonferroni method). All these analyses were performed with R version 2.13.1. Hence, we performed global Q_{ST}-F_{ST} comparisons and annual Q_{ST}-F_{ST} comparisons, which allowed us to test the hypothesis of a selection for life history traits during the entire epidemic. Pairwise intra-annual comparisons within each year allowed us to identify more finely the key stage(s) where selection acts. Finally, inter-annual comparisons for the same modality allowed us to highlight possible selection repeatability between dispersal events.

3. Results

3.1. Genetic analyses

3.1.1 Genetic variability partitioning

Sample sizes of the "initial", "resident" and "migrant" populations were 84, 82 and 26 isolates in 2008 and 77, 75 and 62 isolates in 2009, respectively. The hierarchical genetic variance analysis showed a significant effect for the "population" factor within years (P = 0.001) and for the "isolate" factor within populations (P < 0.001). The "year" effect was not significant (P = 0.638). The global F_{ST} calculated on the six populations of 2008 and 2009 was relatively strong and was significant (F_{ST} = 0.017; P < 0.0001). Results were similar for the intra-annual F_{ST} in 2008 and 2009 (F_{ST} = 0.011 and F_{ST} = 0.027; P < 0.0001, respectively).

Table 1: Pairwise estimations of F_{ST} values for genetic divergence and Q_{ST} values for divergence in spore volume and length-to-width ratio. 95CI are indicated underneath each value. Significance levels of *P*-values after correction for multiple comparisons (*, 5 %; **, 1 %; ***, 1 ‰).

	Resident 2008	Migrant 2008	Initial 2009	Resident 2009	Migrant 2009
Initial 2008					
F_{ST}	0.004 (0.000-0.008)	0.026 *** (0.016-0.037)	0.001 (-0.002-0.006)	-0.001 (-0.002-0.000)	0.050 *** (0.032-0.071)
Q_{ST} volume	0.771 *** (0.735-0.817)	0.834 *** (0.816-0.881)	0.124* (0.037-0.332)	0.727 *** (0.695-0.788)	0.902 *** (0.895-0.921)
Q_{ST} L/W ratio	0.070 (0.0003-0.208)	0.020 (0.0005-0.165)	0.391 *** (0.247-0.551)	0.128 * (0.012-0.293)	0.423 *** (0.299-0.570)
Resident 2008					
F_{ST}		0.017 ** (0.007-0.029)	-0.001 (-0.003-0.001)	0.002 (-0.001-0.005)	0.037 *** (0.026-0.049)
Q_{ST} volume		0.377 *** (0.248-0.545)	0.667 *** (0.595-0.736)	0.008 (0.0001-0.105)	0.637 *** (0.578-0.719)
Q_{ST} L/W ratio		0.163 * (0.068-0.338)	0.574 *** (0.462-0.666)	0.305 *** (0.163-0.438)	0.577 *** (0.486-0.677)
Migrant 2008					
F_{ST}			0.021 *** (0.025-0.059)	0.024 *** (0.012-0.037)	0.059 *** (0.039-0.082)
Q_{ST} volume			0.792 *** (0.760-0.850)	0.318 *** (0.173-0.522)	0.139 (0.036-0.296)
Q_{ST} L/W ratio			0.353 *** (0.167-0.442)	0.065 (0.002-0.176)	0.375 *** (0.232-0.512)
Initial 2009					
F_{ST}				0.000 (-0.002-0.003)	0.040 *** (0.025-0.059)
Q_{ST} volume				0.628 *** (0.555-0.721)	0.877 *** (0.867-0.900)
Q_{ST} L/W ratio				0.129 (0.026-0.303)	0.015 (0.0004-0.138)
Resident 2009					
F_{ST}					0.046 *** (0.028-0.068)
Q_{ST} volume					0.582 *** (0.492-0.700)
Q_{ST} L/W ratio					0.184** (0.062-0.358)

3.1.2. Population genetic structure

A more detailed analysis showed that these strong levels of global and annual differentiations were only due to "migrant" populations (Table 1). One the one hand, estimates of genetic differentiation were low and not significant for all pairwise comparisons of "initial" and "resident" populations (F_{ST} values ranged from 0.001 to 0.004). On the other hand, we observed strong and significant differentiation for all the comparisons including a "migrant" population, and an "initial" or "resident" population of 2008 and 2009 (F_{ST} min = 0.017; $P < 0.01$ and F_{ST} max = 0.050; $P < 0.001$). Furthermore, we observed the strongest F_{ST} between the "migrant" populations of 2008 and 2009 ($F_{ST} = 0.059$; $P < 0.001$) (Table 1).

3.2. Phenotypic analyses

3.2.1. Multifactorial analysis

The multifactorial ANOVA including a nested model performed on the dependent variable of volume was significant ($P < 0.001$). Results showed a significant "year" effect for both volume and L/W ratio traits ($P < 0.01$; $P < 0.001$), a significant "population" effect ($P < 0.001$; $P < 0.05$) and a significant "isolate" effect ($P < 0.001$; $P < 0.001$), respectively, but it was lower than effects of "population" nested in year and "isolate" nested in population factors ($P < 0.0001$) (Table 2).

3.2.2. Q_{ST} and test of selection on the two quantitative traits

The global and annual Q_{ST} of 2008 and 2009 estimates calculated from the volume and L/W ratio traits were strong and significant ($P < 0.001$) (Table 1, Figure 2). Q_{ST} performed on the volume were significant for all pairwise comparisons ($P < 0.05$), except for pairwise comparisons Resident 2008-2009 and Migrant 2008-2009. We also observed significant Q_{ST} for the L/W ratio ($P < 0.05$), except for pairwise comparisons Initial-Resident and Initial-Migrant 2008 and 2009, and for the comparison Migrant 2008-Resident 2009.

The global and annual Q_{ST}-F_{ST} differences estimated from the volume and L/W ratio traits were also strong and significant. We observed that the Q_{ST}-F_{ST} differences for volume were always superior to those observed for the L/W ratio. Furthermore, Q_{ST}-F_{ST} differences for both traits were higher in 2009 than in 2008 (Figure 2). Pairwise intra-annual 2008 and 2009 comparisons always revealed strong and significant Q_{ST}-F_{ST} differences for volume

Table 2: Results of the hierarchical analyses of variance (ANOVA) performed on the traits of spore volume and length/width ratio.

Trait	Factors	df	Type 3 SS	Mean squares	*F*	Pr(<F)
Volume	Year	1	16405331	16405331	10.2	<0.01
	Population	4	1011066566	252766641	157.24	<0.001
	Isolate	42	1808260163	43053813	26.78	<0.001
L/W ratio	Year	1	4.67	4.69	47.37	<0.001
	Population	4	1.26	0.31	3.17	<0.05
	Isolate	42	60.19	1.43	14.49	<0.001

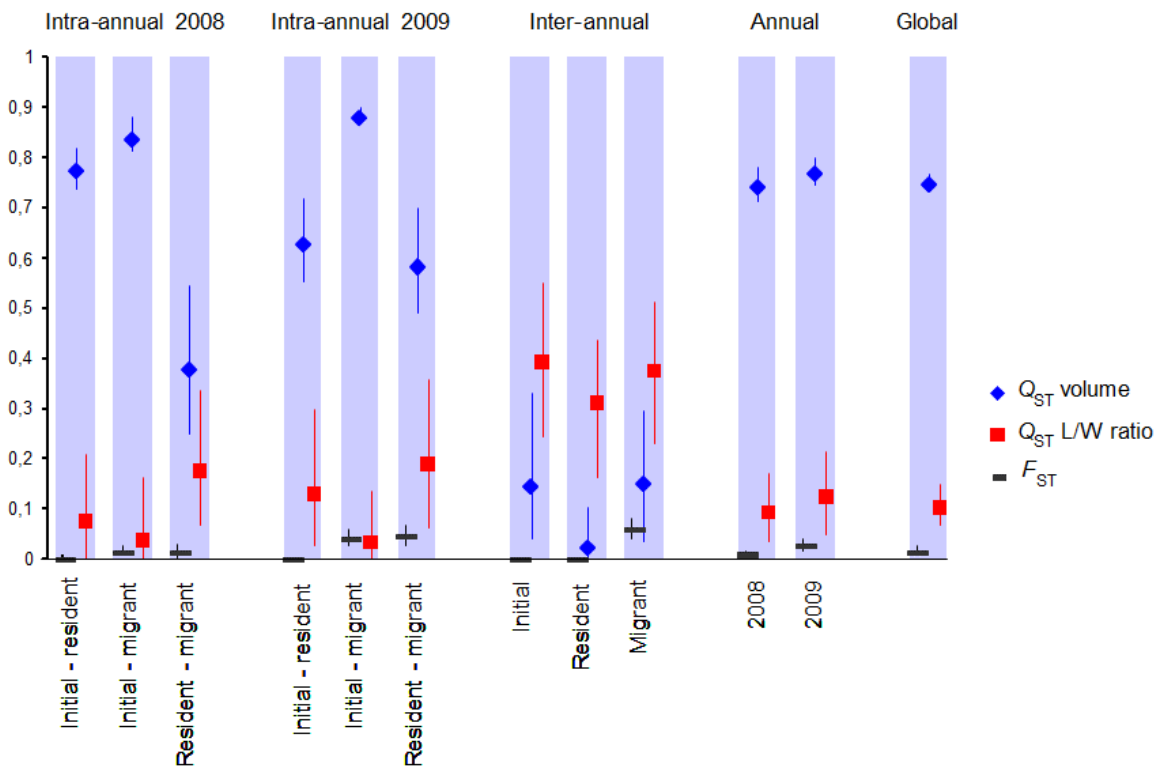


Figure 2: Patterns of Q_{ST}-F_{ST} differences for both quantitative traits for the different modalities. Horizontal black lines, blue diamonds and red squares represent F_{ST}, Q_{ST} volume and Q_{ST} L/W ratio, respectively. Vertical lines represent 95% confidence intervals.

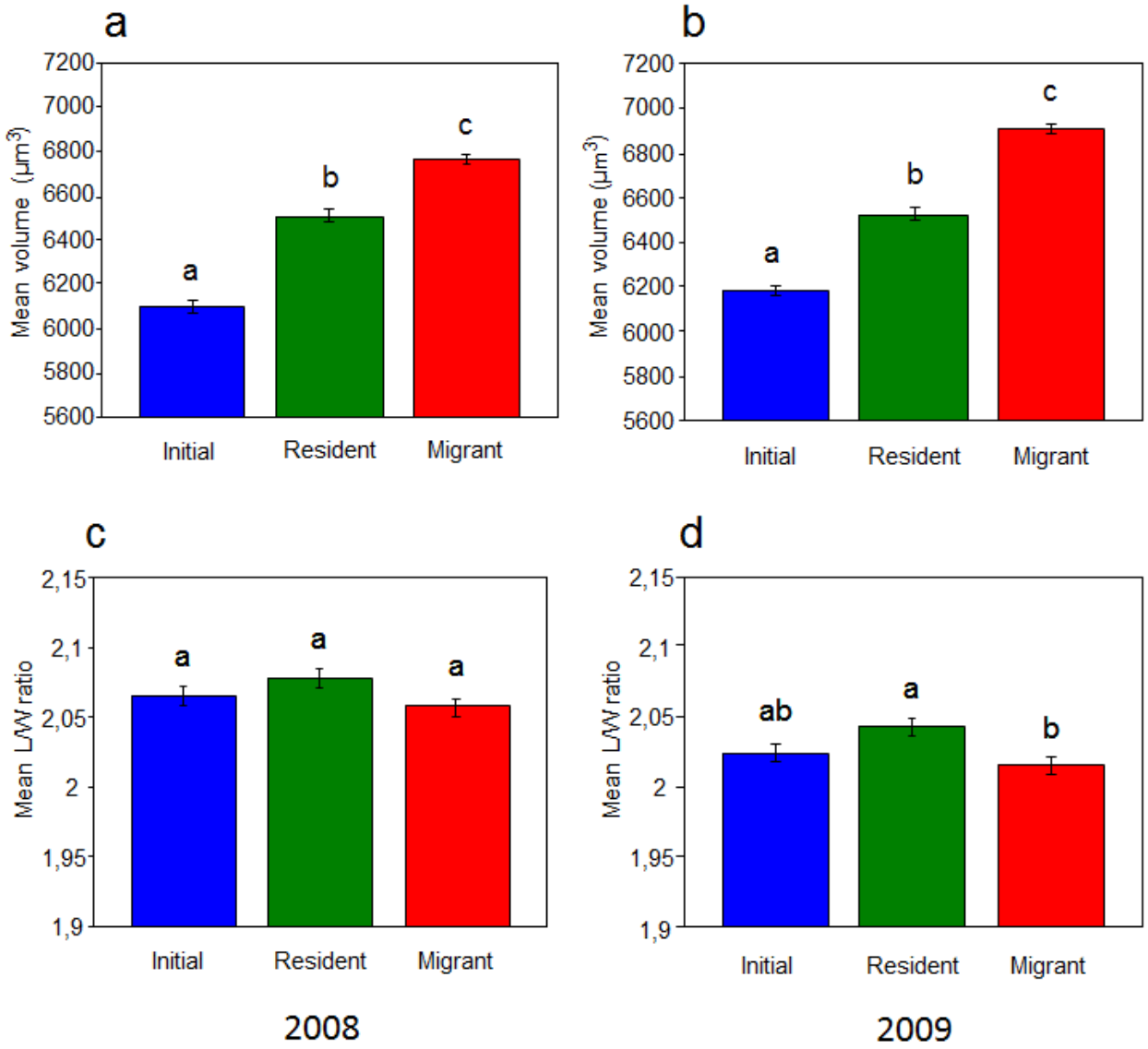


Figure 3: Mean spore volume of the three populations in 2008 (a) and 2009 (b), and mean spore L/W ratio of the three populations in 2008 (c) and 2009 (d). Corrected mean trait values with different letters are significantly different for α = 5 %. Vertical bars represent the standard error.

whereas those observed for the L/W ratio were weaker and often not significant. However, we note that the differences between population pairs followed the same pattern between years for both traits. Inter-annual comparisons revealed low and non-significant Q_{ST}-F_{ST} differences for volume and strong and significant differences for the L/W ratio (Figure 2).

3.2.3. Spore volume and L/W ratio patterns

The same pattern was observed in 2008 and 2009 for both traits (Figure 3). However, the significance levels of the differences between populations were not the same for both traits. Indeed, the average spore volume of the "initial" population was significantly lower than that of the "resident" population ($P < 0.001$), which was in turn significantly lower than that of the "migrant" population ($P < 0.001$). On the contrary, we did not observe any significant differences between populations for the L/W ratio, expect between the "resident" and "migrant" populations in 2009 ($P < 0.001$). Inter-annual comparisons showed that the L/W ratios of the populations of 2008 were always significantly larger than those observed in 2009 ($P < 0.0001$).

4. Discussion

The evolution of life history traits reflects the processes by which organisms adapt to their new environment during biological invasion (Keller & Taylor 2008), and bring information about the way individuals disperse (Olivieri 2009). In the case of plant pathogens, the identification of these evolutionary processes will allow for the better control of plant diseases and management of crops. However, identifying the processes underlying the evolution of life history traits is still a challenge, especially for phytopathogenic fungi, which exhibit a strong evolutionary potential (McDonald & Linde 2002). In this study, we evaluated the evolution of spore sizes in the phytopathogenic fungus *M. larici-populina* involved in a foliar disease on poplar, and determined which evolutionary processes are responsible of the observed changes.

4.1. Genetic differentiation

Structure and genetic differentiation levels between "initial", "resident" and "migrant" populations from both collection years were estimated through F_{ST} calculations (Wright 1951), on multilocus genotype data of each individual based on 24 microsatellite markers. We noticed an important effect of the "population" factor, indicating the build-up of a strong genetic structure during the dispersal process. Moreover, we did not observe a "year" effect, indicating that the genetic structure levels did not differ between 2008 and 2009.

Genetic analyses of two distinct annual epidemics were needed to distinguish whether the observed differentiation was due to genetic drift or selection. One of our main results is the very high level of differentiation between the two "migrant" populations of 2008 and 2009. Thus, there is a strong difference in allele frequencies in those two populations, while they both originate from the same homogeneous genetic pool upstream the valley. This differentiation is even stronger than within each year. This shows the independence of the evolution of allele frequencies in the two colonization events. Consequently, genetic drift occurs during colonization events of the Durance River valley and there is no selection on microsatellite neutral loci. These changes can be due to the "gene-surfing" phenomenon, which occurs during major demographic processes and causes strong distortions of allelic frequencies between populations (Excoffier & Ray 2008; Excoffier *et al.* 2009).

Pairwise intra-annual comparisons showed that differentiation was not equally distributed between populations: only the differentiation between the "migrant" populations and the two others was significant, whatever the collection year. This result suggests that changes in the allele frequencies occurred during colonization events, repeatedly over the two years. In addition, the fact we did not observe a "year" effect allows us to conclude that poplar rust epidemics in 2008 and 2009 gave rise each year to comparable genetic differentiation levels between the three populations. Nevertheless, it is necessary to note that this phenomenon repeatability was only verified over those two collection years. Indeed, another study of the 2004 poplar rust epidemic in the Durance River valley revealed higher F_{ST} values between populations to those observed here, reaching 0.30 (Becheler *et al.*, submitted). The epidemics in 2008 and 2009 were strong - depending on the initial inoculum and the climatic conditions - while that of 2004 was weaker. Therefore, stronger founder effects occurred in 2004, which led to a higher genetic differentiation between populations.

Therefore, the observed genetic differentiation during *M. larici-populina* dispersal in the Durance River valley in 2008 and 2009 seems to be a repeatable phenomenon with the same intensity. However, these colonization events seemed to be independent between years, as shown by the strong F_{ST} between both "migrant" populations. Thus, we can conclude the existence of genetic drift during colonization, which allows us to use F_{ST} as neutral reference to compare to Q_{ST}.

4.2. Phenotypic differentiation

Spore size was estimated through two parameters, their length and width, which allowed the estimation of the volume and L/W ratio traits. We clearly observed a genetic effect of the isolate for these two traits, which underlies they are both strongly heritable. However, the population effect remains the primary factor for the volume. Spores of *M. larici-populina* do not exhibit the same characteristics depending on whether they belong to the "initial", "resident" or "migrant" population. This applies to both years.

For spore volume, we observed a strong differentiation in trait values, which followed the same pattern in 2008 and 2009. The global and annual Q_{ST}-F_{ST} differences were very strong, significant and comparable to differentiation levels observed for *Pinus pinaster* (Gonzalez-Martinez *et al.* 2002), *Pinus sylvestris* (Waldmann *et al.* 2005), *Macoma balthica* (Luttikhuizen *et al.* 2003; Leinonen *et al.* 2008) and *Osmerus mordax* (Saint-Laurent *et al.* 2003), and higher than those observed for the fungus *Zymoseptoria tritici* (Zhan *et al.* 2005, 2006). This tends to validate the hypothesis of selection on spore volume in isolates during dispersal. On the contrary, the inter-annual comparisons for the same modality revealed very low Q_{ST}-F_{ST} differences for volume, suggesting an evolutionary convergence. These combined elements tend to demonstrate the repeatability of the differentiation between populations during the colonization of the Durance River valley, which would result from natural selection, favouring the individuals best adapted to competition or dispersal. In contrast, the lower differentiation of the L/W ratio trait values between populations did not seem to present a yearly repeatability. This is also shown by the very high Q_{ST}-F_{ST} differences in inter-annual comparisons. Furthermore, the global and annual Q_{ST}-F_{ST} differences were very low and had little or no statistical significance. This would suggest that this differentiation between populations does not exclusively result from selection on the dispersal abilities. Due to its heritability, the strong and repeatable differentiation observed between the

respective populations of the two years, and the selection signature during both epidemics, the volume represents a robust trait with which to examine in greater detail the selection process during dispersal. The random nature of the differentiation between populations based on the L/W ratio trait and the less obvious selection signature makes it a less robust and interesting trait for the final goal of our study.

The strong and significant pairwise intra-annual Q_{ST}-F_{ST} differences for the spore volume in 2008 and 2009 allow us to identify more precisely the stages where this selection acts. Furthermore, the differences between years were largely similar for the same population pairs. We posit that selection does not constitute a unique event, which occurs at a key stage of the dispersal process, but a succession of events occurring repeatedly at each step, since it is observed between the three populations of 2008 and 2009. However, plasticity is common if not ubiquitous in the wild (Brommer *et al.* 2005; Lind & Johanssen 2007; Noel *et al.* 2007). Thus in our experiments, isolates were multiplied and phenotyped in controlled environmental conditions in order to avoid any effect of plasticity, which could bias Q_{ST}-F_{ST} comparisons (Pujol *et al.* 2008). However, environmental conditions (temperature, humidity) being heterogeneous along the Durance River valley, we cannot rule out that the evolution of spore volume observed here was not driven by local environmental conditions. A recent study by Hangartner *et al.* (2011) showed that evolution of several life history traits of the moor frog (*Rana arvalis*) were correlated with environmental factors such as the acidification gradient, the geographic distance/latitude or the predator density. Consequently, studying correlations of divergence with environmental differences is required to better understand the nature of selection (Whitlock 2008).

Overall, the evolution of dispersal traits observed here is contradictory to our first expectations. Indeed, we speculated that the more spores are spindle-shaped, the more efficiently they will be dispersed (Roper *et al.* 2008, 2010; Philibert *et al.* 2011). However, we observed a decreasing trend of the L/W ratio (i.e. an increasing sphericity) of the "migrant" vs. the "resident" population in 2008 and 2009, which is consistent with studies on pollen grains (Jackson & Lyford 1999; Ackerman 2002) but contradictory to studies on fungal spores (Roper *et al.* 2008, 2010; Philibert *et al.* 2011). However, Roper *et al.* (2008) studied the impact of spore shape on ascomycete fungi with explosive spore release. In that case, the ejection of spindle-shape spores creates an air flow that carries spores through the nearly still air surrounding the apothecium. In the case of *M. larici-populina*, spores are simply detached from poplar leaves by wind, so the shape of spores may not impact dispersal in the same way.

Furthermore, we hypothesized that the greater a spore's volume, the greater its amount of nutrient supply, and the greater its infectivity, but conversely its dispersal would be reduced. However, we observed in 2008 and 2009 an average spore volume of the "migrant" population significantly higher than that of the "resident" population. A larger volume would thus imply a greater dispersal potential, which is quite counter-intuitive. This result could be explained by two alternative hypotheses: *(i)* a more voluminous spore could contain the same amount of nutrients, and not increase its mass; *(ii)* a more voluminous spore could contain more nutrients, but which do not increase proportionally with its volume. Both cases lead to a lower density, a parameter which conditions the sedimentation coefficient. Thus, spores from the "migrant" population would be more voluminous, and more spherical than those from the "resident" population, while having a lower density. These three characteristics may provide to the "migrant" spores higher velocity and a lower sedimentation coefficient. Therefore, they could be more easily carried by the wind and disperse further.

For these reasons, increase in *M. larici-populina* dispersal capacities during an epidemic would seem to be governed by natural selection. Significant increases in the average spore volume of the "resident" and "migrant" populations observed in 2008 and 2009, compared to the "initial" population, may be caused by a first selection acting on the spore nutrient reserves during the larch-poplar host alternation. Only the individuals with a higher spore volume, and thus containing a higher amount of nutrients (i.e. a greater competitive capacity) may succeed in germinating and eventually in colonizing poplars. These latter would constitute the individual pool of the future "resident" and "migrant" populations. Then, a second selection event could act on this first individual pool, explaining the significantly larger spore volumes of the "migrant" population compared to the "resident" population. In this scenario, only isolates producing spores with the lowest densities (i.e. a higher volume with a constant mass) would succeed in migrating along the Durance River valley, taking advantage of a lower sedimentation coefficient. These selected isolates would constitute the "migrant" population. Isolates with higher densities (i.e. a lower volume), which are dispersed less easily by the wind would constitute the "resident" population.

The dispersal scenario presented here remains hypothetical and would require measurements of other life history traits to be validated. Measurements of the "spore nutrient content" trait would allow us to verify if a spore of higher volume effectively contains more nutrients, which would allow it to be selected during the larch-poplar alternation. The "spore

density" trait should also be interesting to verify if a spore of higher volume exhibits a lower density, which would allow it to be selected after host alternation.

Moreover, study of the evolutionary processes occurring during dispersal should not be limited to the study of spore size. Indeed, morphology of fungal spores is not the only parameter that controls their dispersal. The physical properties of the spores, atmospheric conditions, and the physical properties of plant surfaces are likely to affect the dispersal of spores across a forest (Hussein *et al.* 2013). For example, Norros *et al.* (2012) demonstrated the high impact of wind speed on spore dispersal. These authors explained the overdispersion of spores in their models by their tendency to be carried in groups inside discrete air packages, as describe by Shraiman & Siggia (2000). This grouped dispersal process may have a strong impact on the aggressiveness of fungi, since spore dispersed in groups display an higher infection efficiency, a shorter latency period and produce larger lesions (Tack *et al.* 2014).

However, the aerodynamic features of the spores, which determine the bearing capacity of spores in the air and their sedimentation rate, are not the only traits involved in the dispersal process studied here. Indeed, the annual poplar rust epidemic along the Durance River valley extends over five months and over a distance of about 200 km (Xhaard *et al.* 2012). Thus the epidemic results from recurrent events of dispersal, infection of new hosts, and sporulation. Therefore, several other life history traits related to the aggressiveness of the fungus, such as latent period, infection efficiency, and sporulation capacity (Pariaud *et al.* 2009)**,** may play an indirect role in the epidemic process. Indeed, in a context of competition, individuals with a shorter latent period could infect new hosts more rapidly, higher infection efficiency will maximize infection probability, and higher sporulation capacity will increase the number of new propagules released. In addition, evolutionary trade-offs between life history traits, which are inherent to the fact that environmental resources are limited, may take place as a function of the allowance strategies adopted by organisms (Alizon *et al.* 2009). It is well documented that size/number trade-offs on plant seeds defines dispersal or competitive strategies, the smaller seeds showing higher dispersal ability but a lower competitive ability (Smith & Fretwell 1974; Coomes & Grubb 2003; Jakobsson & Eriksson 2003; Sera 2008). These trade-offs can play a major role in an epidemic process, since it has been clearly demonstrated that there is selection for increased dispersal ability on expanding range edges (Travis & Dytham 2002; Hughes *et al.* 2007; Phillips *et al.* 2008), whereas traits associated with fitness at equilibrium density show dramatic declines (Burton *et al.* 2010). The selected individuals benefit from the lower competitive context at the edge since they are the first to

arrive there (Thomas *et al.* 2001; Hanski *et al.* 2002, 2004; Phillips *et al.* 2006; Hughes *et al.* 2007). Therefore, study of the simultaneous evolution of aggressiveness and dispersal traits could bring more precise information on the individual selection modalities occurring during dispersal.

Finally, it is known that host-pathogen genotype interactions can be involved in dispersal processes. Indeed, Tack *et al.* (2014) showed that the number of spores, the average spore dispersal distance and the number of spores per group is dependent on both pathogen and host genotypes. This latter can impact aggressiveness traits at small spatial scale (Tack *et al.* 2012). In our study, even if the genetic variation between wild poplar genotypes is relatively low due to gene flow (Imbert & Lefèvre 2003), host genotype may have an impact on the dispersal process. In order to test the effect of host genotype on dispersal, controlled host x pathogen inoculation experiments should be performed with poplar and rust genotypes from upstream and downstream sites.

Another unexpected finding was that the mean spore volume of the "initial" population in 2009 was significantly lower than that of the "resident" population in 2008. Yet, the "resident" population of the year N directly generates the "initial" population of the year N+1 through sexual reproduction on larches. Thus, the "initial" population of 2009 should exhibit a spore volume similar to the "resident" population of 2008. Our results cannot be explained by genetic mixing between isolates of the "resident" population of 2008 due to meiosis in winter. Sexual reproduction should generate isolates of the "initial" population of 2009 with a wide range of spore volumes. If this were the case, we would observe a much larger 95IC for the "initial" population in 2009 than for the "resident" population in 2008. The return to similar spore volume values of the "initial" population each year could be due to a of counter-selection event during host alternation in spring, in which the alternate host exerts a counter-selection pressure against high spore volumes.

5. Conclusion

Our results showed a repeatable pattern of genetic differentiation over the two collection years, with the same intensity. We observed a repetition of phenotypic trait differentiation between populations on the trait of volume; this repetition was less obvious for the L/W ratio trait. Comparisons between genetic and phenotypic differentiation suggest two successive selection events on spore volume during dispersal, leading to the selection of more

voluminous spores for the migrant populations. The first one favours the competition ability of the "resident" and "migrant" populations, the second one the dispersal ability of the "migrant" population. Thus, natural selection may acts during annual dispersal of *M. larici-populina* along the Durance River valley. This selection seems to favour the most competitive isolates, firstly due to their higher nutrient amount and secondly due to their dispersal abilities, keeping in mind that aggressiveness traits should play a major role in the dispersal process of this pathogenic fungus.

6. References

Ackerman, J.D. (2002). Diffusivity in a marine macrophyte canopy: implications for submarine pollination and dispersal. *Am. J. Bot.*, 89, 1119–1127.

Alizon, S., Hurford, A., Mideo, N. & Van BAALEN, M. (2009). Virulence evolution and the trade-off hypothesis: history, current state of affairs and the future. *J. Evol. Biol.*, 22, 245–259.

Arredondo-Nunez, A.X., Salgado, O. & Molina-Montenegro, M.A. (2011). Sphericity and smaller pollen-size are better represented in introduced rather than native plant species. *Gayana Bot.*, 68, 330–332.

Barrès, B., Halkett, F., Dutech, C., Andrieux, A., Pinon, J. & Frey, P. (2008). Genetic structure of the poplar rust fungus *Melampsora larici-populina*: Evidence for isolation by distance in Europe and recent founder effects overseas. *Infect. Genet. Evol.*, 8, 577–587.

Brommer, J.E., Merilä, J., Sheldon, B.C. & Gustafsson, L. (2005). Natural selection and genetic variation for reproductive reaction norms in a wild bird population. *Evolution*, 59, 1362–1371.

Brown, J.K.M. & Hovmøller, M.S. (2002). Aerial dispersal of pathogens on the global and continental scales and its impact on plant disease. *Science*, 297, 537–541.

Burton, O.J., Phillips, B.L. & Travis, J.M.J. (2010). Trade-offs and the evolution of life-histories during range expansion. *Ecol. Lett.*, 13, 1210–1220.

Clark, J.S., Macklin, E. & Wood, L. (1998). Stages and spatial scales of recruitment limitation in southern appalachian forests. *Ecol. Monogr.*, 68, 213–235.

Comins, H.N., Hamilton, W.D. & May, R.M. (1980). Evolutionarily stable dispersal strategies. *J. Theor. Biol.*, 82, 205–230.

Coomes, D.A. & Grubb, P.J. (2003). Colonization, tolerance, competition and seed-size variation within functional groups. *Trends Ecol. Evol.*, 18, 283–291.

Cruzan, M.B. (1990). Variation in pollen size, fertilization ability, and postfertilization siring ability in *Erythronium grandiflorum*. *Evolution*, 44, 843–856.

Edelaar, P. & Bolnick, D.I. (2012). Non-random gene flow: an underappreciated force in evolution and ecology. *Trends Ecol. Evol.*, 27, 659–665.

Excoffier, L., Foll, M. & Petit, R.J. (2009). Genetic consequences of range expansions. In: *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, Annual Review of Ecology Evolution and Systematics. pp. 481–501.

Excoffier, L. & Ray, N. (2008). Surfing during population expansions promotes genetic revolutions and structuration. *Trends Ecol. Evol.*, 23, 347–351.

Gandon, S. & Michalakis, Y. (2001). Multiple causes of the evolution of dispersal. In: Causes, consequences and mechanisms of dispersal at the individual, population and community level.

Gonzalez-Martinez, S.C., Alia, R. & Gil, L. (2002). Population genetic structure in a Mediterranean pine (*Pinus pinaster* Ait.): a comparison of allozyme markers and quantitative traits. *Heredity*, 89, 199–206.

Goudet, J. (1995). FSTAT (Version 1.2): a computer program to calculate *F*-statistics. *J. Hered.*, 86, 485–486.

Goudet, J. & Büchi, L. (2006). The effects of dominance, regular inbreeding and sampling design on Q_{ST}, an estimator of population differentiation for quantitative traits. *Genetics*, 172, 1337–1347.

Hahn, M. (2000). The rust fungi. In: *Fungal Pathology*. (ed. Kronstad, J.W.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 267 – 306.

Hamilton, W.D. & May, R.M. (1977). Dispersal in stable habitats. *Nature*, 269, 578–581.

Hangartner, S., Laurila, A. & Räsänen, K. (2011). Adaptative divergence in moor frog (*Rana arvalis*) populations along an acidification gradient: inferences from Q_{ST}-F_{ST} correlations. *Evolution*, 66, 867–881.

Hanski, I., Breuker, C.J., Schöps, K., Setchfield, R. & Nieminen, M. (2002). Population history and life history influence the migration rate of female Glanville fritillary butterflies. *Oikos*, 98, 87–97.

Hanski, I., Erälahti, C., Kankare, M., Ovaskainen, O. & Sirén, H. (2004). Variation in migration propensity among individuals maintained by landscape structure. *Ecol. Lett.*, 7, 958–966.

Hughes, C.L., Dytham, C. & Hill, J.K. (2007). Modelling and analysing evolution of dispersal in populations at expanding range boundaries. *Ecol. Entomol.*, 32, 437–445.

Hussein, T., Norros, V., Hakala, J., Petäjä, T., Aalto, P.P., Rannik, U., *et al.* (2013). Species traits and inertial deposition of fungal spores. *J. Aerosol Sci.*, 61, 81–98.

Husson, C., Ioos, R., Andrieux, A. & Frey, P. (2013). Development and use of new sensitive molecular tools for diagnosis and detection of *Melampsora* rusts on cultivated poplar. *For. Pathol.*, 43, 1–11.

Imbert, E. & Lefèvre, F. (2003). Dispersal and gene flow of *Populus nigra* (Salicaceae) along a dynamic river system. *J. Ecol.*, 91, 447–456.

Jackson, S. & Lyford, M. (1999). Pollen dispersal models in quaternary plant ecology: assumptions, parameters, and prescriptions. *Bot. Rev.*, 65, 39–75.

Jakobsson, A. & Eriksson, O. (2003). Trade-offs between dispersal and competitive ability: a comparative study of wind-dispersed Asteraceae forbs. *Evol. Ecol.*, 17, 233–246.

Keller, S.R. & Taylor, D.R. (2008). History, chance and adaptation during biological invasion: separating stochastic phenotypic evolution from response to selection. *Ecol. Lett.*, 11, 852–866.

Kokko, H. & López-Sepulcre, A. (2006). From individual dispersal to species ranges: perspectives for a changing world. *Science*, 313, 789–791.

Kuparinen, A., Markkanen, T., Riikonen, H. & Vesala, T. (2007). Modeling air-mediated dispersal of spores, pollen and seeds in forested areas. *Ecol. Model.*, 208, 177–188.

Leinonen, T., O'Hara, R.B., Cano, J.M. & Merilä, J. (2008). Comparative studies of quantitative trait and neutral marker divergence: a meta-analysis. *J. Evol. Biol.*, 21, 1–17.

Lind, M.I. & Johanssen, F. (2007). The degree of adaptive phenotypic plasticity is correlated with the spatial environmental heterogeneity experienced by island populations of *Rana temporaria*. *J. Evol. Biol.*, 20, 1288–1297.

Luttikhuizen, P.C., Drent, J., Van Delden, W. & Piersma, T. (2003). Spatially structured genetic variation in a broadcast spawning bivalve: quantitative vs. molecular traits. *J. Evol. Biol.*, 16, 260–272.

McDonald, B.A. & Linde, C. (2002). Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 40, 349–379.

Noel, F., Machon, N. & Porcher, E. (2007). No genetic diversity at molecular markers and strong phenotypic plasticity in populations of *Ranunculus nodiflorus*, an endangered plant species in France. *Ann. Bot.*, 99, 1203–1212.

Norros, V., Penttilä, R., Suominen, M. & Ovaskainen, O. (2012). Dispersal may limit the occurrence of specialist wood decay fungi already at small spatial scales. *Oikos*, 121, 961–974.

Norros, V., Rannik, Ü., Hussein, T., Petäjä, T., Vesala, T. & Ovaskainen, O. (2014). Do small spores disperse further than large spores? *Ecology*, 95, 1612–1621.

Olivieri, I. (2009). Alternative mechanisms of range expansion are associated with different changes of evolutionary potential. *Trends Ecol. Evol.*, 24, 289–292.

Pariaud, B., Ravigné, V., Halkett, F., Goyeau, H., Carlier, J. & Lannou, C. (2009). Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens. *Plant Pathol.*, 58, 409–424.

Petroff, A., Mailliat, A., Amielh, M. & Anselmet, F. (2008b). Aerosol dry deposition on vegetative canopies. Part II: A new modelling approach and applications. *Atmos. Environ.*, 42, 3654–3683.

Philibert, A., Desprez-Loustau, M.-L., Fabre, B., Frey, P., Halkett, F., Husson, C., *et al.* (2011). Predicting invasion success of forest pathogenic fungi from species traits. *J. Appl. Ecol.*, 48, 1381–1390.

Phillips, B. L., Brown, G.P., Travis, J.M.J. & Shine, R. (2008). Reid's paradox revisited: the evolution of dispersal kernels during range expansion. *Am. Nat.*, 172, S34–S48.

Phillips, B.L., Brown, G.P., Webb, J.K. & Shine, R. (2006). Invasion and the evolution of speed in toads. *Nature*, 439, 803.

Pinon, J. & Frey, P. (2005). Interactions between poplar clones and *Melampsora* populations and their implications for breeding for durable resistance. In: *Rust Dis. Willow Poplar*. Pei, M. H., McCracken, A. R., pp. 139–154.

Pujol, B., Wilson, A.J., Ross, R.I.C. & Pannell, J.R. (2008). Are Q_{ST}–F_{ST} comparisons for natural populations meaningful? *Mol. Ecol.*, 17, 4782–4785.

Rimé, D., Robert, C., Goyeau, H. & Lannou, C. (2005). Effect of host genotype on leaf rust (*Puccinia triticina*) lesion development and urediniospore production in wheat seedlings. *Plant Pathol.*, 54, 287–298.

Roper, M., Pepper, R.E., Brenner, M.P. & Pringle, A. (2008). Explosively launched spores of ascomycete fungi have drag-minimizing shapes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 105, 20583–20588.

Roper, M., Seminara, A., Bandi, M.M., Cobb, A., Dillard, H.R. & Pringle, A. (2010). Dispersal of fungal spores on a cooperatively generated wind. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 107, 17474–17479.

Saint-Laurent, R., Legault, M. & Bernatchez, L. (2003). Divergent selection maintains high gene flow between sympatric rainbow smelt ecotypes (*Osmerus mordax* Mitchill). *Mol. Ecol.*, 12, 315–330.

Sera, B. (2008). Simple traits among diaspore weight/number, plant height and ability of vegetative propagation. *J. Integr. Plant Biol.*, 50, 1563–1569.

Shraiman, B.I. & Siggia, E.D. (2000). Scalar turbulence. *Nature*, 405, 639–646.

Slatkin, M. & Excoffier, L. (2012). Serial founder effects during range expansion: a spatial analog of genetic drift. *Genetics*, 191, 171–181.

Smith, C.C. & Fretwell, S. D. (1974). The optimal balance between size and number of offspring. *Am. Nat.*, 108, 499–506.

Spitze, K. (1993). Population structure in *Daphnia obtusa*: quantitative genetic and allozymic variation. *Genetics*, 135, 367–374.

Tack, A.J.M., Hakala, J., Petäjä, T., Kulmala, M. & Laine, A.-L. (2014). Genotype and spatial structure shape pathogen dispersal and disease dynamics at small spatial scales. *Ecology*, 95, 703–714.

Tack, A.J.M., Thrall, P.H., Barrett, L.G., Burdon, J.J. & Laine, A.L. (2012). Variation in infectivity and aggressiveness in space and time in wild host–pathogen systems: causes and consequences. *J. Evol. Biol.*, 25, 1918–1936.

Thomas, C.D., Bodsworth, E.J., Wilson, R.J., Simmons, A.D., Davies, Z.G., Musche, M., *et al.* (2001). Ecological and evolutionary processes at expanding range margins. *Nature*, 411, 577–581.

Travis, J.M.J. & Dytham, C. (2002). Dispersal evolution during invasions. *Evol. Ecol. Res.*, 4, 1119–1129.

Viboud, C., Bjørnstad, O.N., Smith, D.L., Simonsen, L., Miller, M.A. & Grenfell, B.T. (2006). Synchrony, waves, and spatial hierarchies in the spread of influenza. *Science*, 312, 447–451.

Vonhof, M. & Harder, L. (1995). Size-number trade-offs and pollen production by papilionaceous legumes. *Am. J. Bot.*, 82, 230–238.

Waldmann, P., Garcia-Gil, M.R. & Sillanpää, M.J. (2005). Comparing Bayesian estimates of genetic differentiation of molecular markers and quantitative traits: an application to *Pinus sylvestris*. *Heredity*, 94, 623–629.

Weir, B. & Cockerham, C. (1984). Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38, 1358–1370.

Whitlock, M.C. (2008). Evolutionary inference from Q_{ST}. *Mol. Ecol.*, 17, 1885–1896.

Wright, S. (1951). The genetic structure of populations. *Ann. Eugen.*, 15, 323–354.

Xhaard, C., Barrès, B., Andrieux, A., Bousset, L., Halkett, F. & Frey, P. (2012). Disentangling the genetic origins of a plant pathogen during disease spread using an original molecular epidemiology approach. *Mol. Ecol.*, 21, 2383–2398.

Xhaard, C., Fabre, B., Andrieux, A., Gladieux, P., Barres, B., Frey, P., *et al.* (2011). The genetic structure of the plant pathogenic fungus *Melampsora larici-populina* on its wild host is extensively impacted by host domestication. *Mol. Ecol.*, 20, 2739–2755.

Zhan, J., Linde, C.C., Jürgens, T., Merz, U., Steinebrunner, F. & McDonald, B.A. (2005). Variation for neutral markers is correlated with variation for quantitative traits in the plant pathogenic fungus *Mycosphaerella graminicola*. *Mol. Ecol.*, 14, 2683–2693.

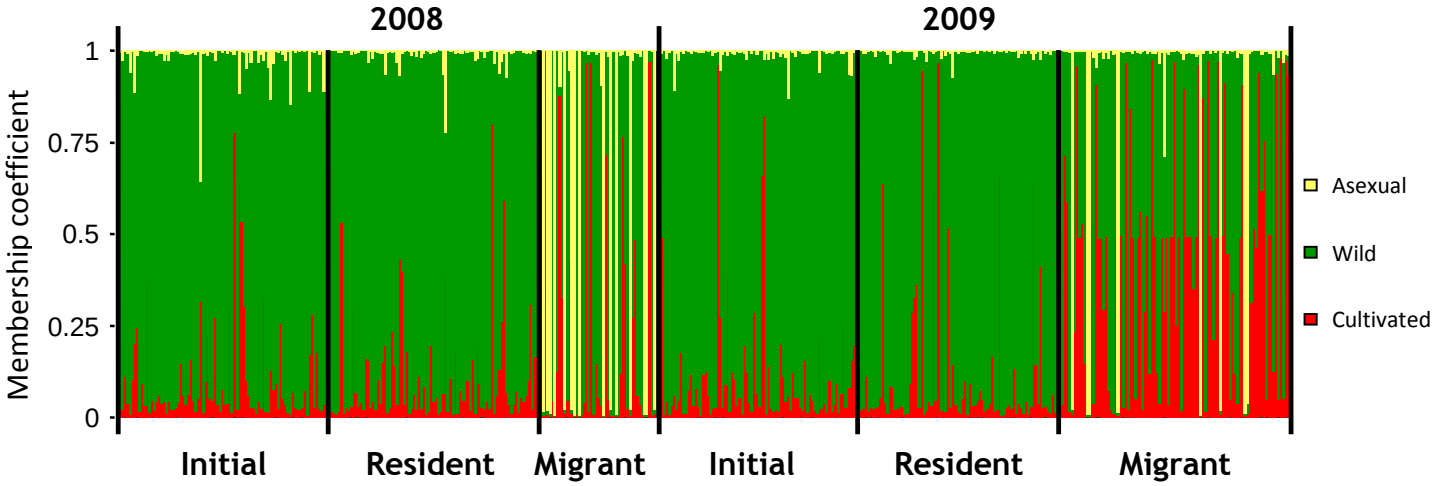
Zhan, J., Stefanato, F.L. & McDonald, B.A. (2006). Selection for increased cyproconazole tolerance in *Mycosphaerella graminicola* through local adaptation and in response to host resistance. *Mol. Plant Pathol.*, 7, 259–268.

Supplementary Material

A previous population genetics study (Xhaard *et al.* 2011) revealed the existence of three *M. larici-populina* genetic groups in France: the first presents a "cultivated" genetic profile, the second a "wild" genetic profile, both having sexual reproduction. Finally, a third group different from the two others with an "asexual" genetic profile, consisting of individuals with strictly asexual reproduction. The emergence of the "cultivated" group was widely documented (Pinon & Frey 2005). The spatial distribution of these genetic groups showed a contact area between "cultivated", "wild" and "asexual" groups in the alpine area (Xhaard *et al.* 2011). Furthermore, (Xhaard *et al.* 2012) showed that populations from the “wild” and “cultivated” genetic groups were admixed in the downstream part of the Durance River Valley. Thus, a Bayesian clustering analysis similar to that performed in Xhaard *et al.* (2011) is needed to identify the "cultivated", "asexual" or "hybrid" isolates and remove them from data sets, in order to calculate F_{ST} between populations including only isolates belonging to the "wild" group, which is at the origin of the studied epidemic.

Clustering analysis

A Bayesian clustering analysis was performed to identify the membership of each *M. larici-populina* isolate to the three genetic groups identified in a previous study (Xhaard *et al.* 2011). Genetic data of the six populations collected in this study (total of 473 isolates) were combined with genetic data of 171 isolates from the previous analysis (Xhaard *et al.* 2011), these latter serving as reference isolates for assignment. Analysis were performed using TESS version 2.3 3 (Chen *et al.* 2007) which has the advantage of including an admixture model and takes into account fine genetic structures. Briefly, this software uses the specific Reverse Jump MCMC (Markov Chain Monte Carlo) to assign isolates to a fixed K number - determined beforehand - of ancestral groups. Each iteration is based on two main stages: i) an updating of the ancestral group allelic frequencies according to contributions (i.e. coefficients of membership) of isolates and ii) an updating of the membership coefficients of isolates (genotypes) to minimize the genetic disequilibrium (Hardy-Weinberg law) within each ancestral group. Simulations were launched with the value K=3 only, corresponding to the three genetic groups previously defined by Xhaard *et al.* (2011), referred to as "wild", "cultivated" and "asexual" groups. Another feature of TESS is that isolates are not necessarily assigned to the defined groups: a group can be "empty" at the end of simulations. Independent



Supplementary Figure 1: Assignment results of *Melampsora larici-populina* individuals. Each vertical line represents an individual whose genome is partitioned into K coloured segments (here K = 3 genetic groups). Segment lengths are proportional to the individual's mean membership coefficients in each genetic group. Vertical bars separate individuals sampled from different locations. Geographical locations are indicated underneath.

runs were performed to check the convergence of the Markov chains and to obtain robust estimates of the membership coefficients. Run length was set to 550,000 iterations with a burn-in period of 50,000 iterations. Afterwards, an isolate was considered as assigned to one of the three genetic groups if the mean value (on five simulations) of the membership coefficient for this group was larger than 0.8. Only isolates assigned to the "wild" group were kept for further analyses. Clustering analyses allowed us to define six “real” populations (homogeneous genetic entities) formed by "wild" individuals within the six sampling modalities ("initial", "resident" and "migrant" sampled in 2008 and 2009).

Genetic group identifications

The five independent Markov chain simulations all converged at the same membership coefficient values. These Bayesian clustering analyses thus allowed us to reliably estimate each isolate membership level for the three genetic groups (Figure S1). Isolates were mostly well assigned to a population, with a neighbouring membership coefficient of 0.7-0.8, except for the "migrant" population isolates of 2009, which appeared to be less well assigned. After applying the threshold, we obtained numbers of individuals assigned to each genetic group, for each of the six sampling modalities. The proportion of isolates assigned to the three genetic groups differed according to the modalities considered. The numbers were more or less equivalent between groups for the "initial" and "resident" modalities of 2008 and 2009, with a very large proportion of isolates assigned to the "wild" group and no isolate assigned to the "asexual" group. However in 2009 we observed a larger proportion of isolates assigned to the "cultivated" group than in 2008. On the other hand, the size of each genetic group was more balanced in the "migrant" populations of 2008 and 2009 with fewer isolates assigned to the "wild" group. Furthermore, these two populations were different for the numbers of isolates assigned to the two other genetic groups: their relative abundance was reversed between 2008 and 2009. These results allow us to clearly define “real populations" - genetically homogeneous units- constituted by isolates collected following the same modality and belonging to the same genetic group. In further analyses, we only focused on populations formed by "wild" isolates.

Chapitre 2

Architecture génétique de traits morphologiques et d'agressivité au sein d’une descendance de *M. larici-populina*

Chapitre 2

Architecture génétique de traits morphologiques et d'agressivité au sein d'une descendance de *M. larici-populina*

Dans le chapitre précédent, nous avons mis en évidence une évolution du volume des spores de *M. larici-populina* au cours de deux épidémies annuelles successives dans la vallée de la Durance, évolution résultant de la sélection naturelle exercée par les facteurs biotiques et/ou abiotiques. Les traits liés à la morphologie des spores, et plus largement, les traits quantitatifs du champignon, semblent donc intervenir dans son potentiel adaptatif, comme cela a été suggéré dans de nombreuses études sur d'autres pathosystèmes (Lannou 2012).

Il serait dès lors intéressant d'estimer les paramètres conditionnant le potentiel adaptatif de *M. larici-populina*, de manière à disposer d'une vision globale de sa fitness et pouvoir prévoir sa réponse au déploiement d'éventuelles résistances quantitatives au champ. Pour cela, nous avons mesuré les traits quantitatifs liés à la morphologie des spores et à l'agressivité de 95 descendants S1 issus d'une autofécondation d'une souche de référence (Pernaci *et al.* 2014), en incluant également la souche mère. Cette population offre la possibilité d'estimer la variabilité phénotypique engendrée par un seul évènement de reproduction sexuée, qui conditionne en partie le potentiel adaptatif de *M. larici-populina*. La caractérisation phénotypique de l'agressivité du champignon a été réalisée en suivant un protocole innovant d'inoculation monospore, offrant de nombreux avantages.

Par la mesure d'une gamme complète de traits quantitatifs du champignon en laboratoire, et par l'utilisation d'outils tels que la génétique quantitative, nous avons cherché à (i) estimer la variabilité des traits quantitatifs de *M. larici-populina*, (ii) évaluer leur niveau d'héritabilité, et (iii) tester l'hypothèse d'un coût potentiel de la virulence.

Ce chapitre se présente sous la forme d'un article en préparation.

ARTICLE 2: GENETIC ARCHITECTURE OF LIFE HISTORY TRAITS IN THE POPLAR RUST FUNGUS *MELAMPSORA LARICI-POPULINA*

Pernaci M., Fabre B., Andrieux A., Pétrowski J., Frey P., Halkett F.

Abstract

Over the last century, management of crop diseases by deployment of cultivars carrying qualitative resistance genes has led to successive failures, eac resistance being easily overcome by pathogen evolution. This has prompted breeders to search for quantitative resistance, supposed to be more durable. However, despite the more complex determinism of such quantitative resistance, some cases of quantitative resistance challenged by pathogen evolution have been reported. This brings out the need to assess the genetic architecture of the pathogen's aggressiveness traits in order to evaluate the durability of future quantitative resistance released in the field. In this study, we proposed to appraise the value of aggressiveness traits of the poplar rust fungus *Melampsora larici-populina* in the face of quantitative resistance. To this aim, the impact of several genetic constraints on adaptive potential was assessed by measuring aggressiveness and morphological traits of urediniospores in a specific selfed progeny of the fungus. On the one hand, the progeny displayed a high level of phenotypic variability for both morphological and aggressiveness traits. Higher heritability was observed for morphological than for aggressiveness traits, with contrasting values within the latter type of trait. On the other hand, co-variation analysis revealed interesting correlations between quantitative traits, which are consistent with adaptive strategies already described for pathogen. In addition, we showed that the gain of a new qualitative virulence might not be necessarily accompanied by a phenotypic cost of virulence, which classically represents a constraint on pathogen evolution. Altogether, these findings illustrate the high adaptive potential of the poplar rust fungus, and could cast doubt on the durability of future quantitative resistance deployed in the field.

1. Introduction

Plant diseases and pests are responsible for crop losses that may amount up to 40% worldwide (Boonekamp 2012). The use of resistant cultivars remains the best method to grow a crop with limited pesticide applications and low production costs. Plant breeders have used two main types of resistance to diseases, qualitative and quantitative resistance (Brun et al. 2010). In many cases, however, breakdown of qualitative resistance genes through rapid evolution of the pathogen population has occurred soon after the release of the resistant cultivars. The failure of qualitative resistance genes to control plant diseases has prompted breeders to search for quantitative resistance, which has been supposed to be more durable (Jorge *et al.* 2005; Brun *et al.* 2010; Fabre *et al.* 2012; Mundt 2014). Durable resistance is defined as resistance remaining effective in a cultivar for a long period of time during its widespread cultivation (Johnson 1979). Indeed, since quantitative resistance is in most cases based on multiple minor genes (Kou & Wang 2010; Gonzalez *et al.* 2012), multiple recombinations and/or mutations are required for the pathogen to overcome it (van den Berg *et al.* 2014). In this case, one would expect the adaptation of a pathogen to result in a gradual resistance erosion rather than a rapid breakdown (McDonald & Linde 2002; Mundt *et al.* 2002). Quantitative resistance can be challenged by the evolution of aggressiveness of a pathogen, which is the quantitative component of pathogenicity, determined by several disease-associated traits (Pariaud *et al.* 2009a; Andrivon *et al.* 2007; Dowkiw *et al.* 2010; Caffier *et al.* 2014; Delmotte *et al.* 2014; van den Berg *et al.* 2014). Furthermore, it has been demonstrated that evolution and structure of pathogen populations in agricultural systems is influenced by selection for quantitative traits exerted by the host (Pariaud *et al.* 2009a; Leonard 1969; Chin & Wolfe 1984; Ahmed *et al.* 1996; Villaréal & Lannou 2000; Papaïx *et al.* 2011), which may occur in relatively short time period (Leonard 1969). This selection by the host results from the interplay of host and pathogen genotypes (Lannou 2012), and favors individuals who are the best adapted to the quantitative resistance present in the field.

Adaptive success of a pathogen is closely linked to its adaptive potential, itself highly dependent on the genetic variability of the populations. Indeed, the higher the adaptive potential of a pathogen, the higher is the probability of observing well-adapted individuals to a particular environment.

The fact that aggressiveness traits are partly controlled by genetic factors can lead to adaptation of the pathogen. However, such adaptation can only occur if these traits are

heritable. Indeed, heritability is defined as the proportion of phenotypic variance attributable to genetic variance. In other words, it measures the implication of genetic factors in the expression of a quantitative character, which are transmitted to the next generation. Hence, it is an important predictor of the degree to which a population can respond to artificial or natural selection. Therefore, assuming that this prerequisite is met, several genetic constraints may drive pathogen adaptive potential, such as variability for aggressiveness within pathogen populations, trade-offs between aggressiveness traits, and trade-offs between qualitative virulence and aggressiveness, also known as cost of qualitative virulence (Pariaud *et al.* 2009a). Estimating the heritability of aggressiveness traits of a pathogen, which are involved in its evolutionary potential, would be useful in order to assess durability of quantitative resistance released in the field and to guide breeding strategies toward durable resistance.

However, two major points could represent impediments for such a study. The first one is that it would require accurate measurements of quantitative traits in order to estimate phenotypic variance, which is by nature technically difficult to perform (Lannou 2012). Indeed, classical artificial inoculation methods result in multiple infections per leaf, and each measurement (i.e. biological replicate) is performed over a population of lesions. This could introduce bias into phenotypic characterization since the not-negligible variation in trait values among infections of a same leaf is not taken into account (Lannou 2012). In addition, some traits are typically difficult to assess. For example, infection efficiency requires knowing the precise number of spores which lead to the observed infections (Lehman & Shaner 1997). Here we use an original methodological approach to characterize the infection phenotype of fungal genotypes when they develop in isolation.

The second one is that quantitative traits are by nature sensitive to environmental factors, which could introduce bias into quantitative genetics analysis. One major critical point of most studies is that they were carried on natural populations (Hamid *et al.* 1982; Lehman & Shaner 1996, 2007), which were thus subjected to many selective pressures before they were sampled. Heritability measured here seems more to be "*in natura*" heritability rather than "raw" heritability. In this study, we adress the links between the adaptive potential of a pathogen and its quantitative traits, focusing on a selfing cross obtained in laboratory conditions.

We focus our study on the pathogenic fungus *Melampsora larici-populina* (Basidiomycota, Pucciniales), causing poplar rust. This disease is the main factor limiting poplar cultivation worldwide (Gérard *et al.* 2006; Barrès *et al.* 2008), use for wood industry

(Heilman 1999) and more recently in the bio-energy sector (Covarelli *et al.* 2013). In the last half century, poplar rust was managed by deploying cultivars with qualitative resistance genes (i.e. major resistance genes), which have been successively defeated by pathogen evolution within a short period (Xhaard *et al.* 2011). For perennial hosts such as poplar, differences between time needed to deploy new host varieties and the pathogen's rapid generation time has been favored to explain such resistance breakdown by pathogen evolution (Xu 2012).

In order to assess the evolutionary potential of the poplar rust fungus, two types of quantitative traits were measured. To limit the sources of bias cited above in the analysis, measurements were performed over a progeny obtained in laboratory through selfing of a reference strain on the alternate host plant (larch) (Pernaci *et al.* 2014), using an original single-spore inoculation protocol (Nutman *et al.* 1963; Zadoks & Schein 1979; Pei *et al.* 2002). Hence, phenotypic traits were assessed more accurately than through the classical spray-inoculation method since our single-spore inoculation method permits to the independent monitoring of the entire infectious cycle of individual lesions.

First, several aggressiveness traits - classically studied in plant-pathogen systems (Lannou 2012) - were measured: infection efficiency, lesion size, sporulation capacity, sporulation rate, and latent period. Infection efficiency is commonly defined as the probability that a spore deposited on a receptive host surface produces a lesion (Lannou 2012). The lesion size is defined as the surface area that produces the spores (Kolmer & Leonard 1986; Robert *et al.* 2004), and has been suggested to be an indication of the pathogen capacity for host tissue colonization (Pariaud *et al.* 2009b). The sporulation rate is defined as the number of spores produced by the lesion per unit of time (Leonard 1969; Clifford & Clothier 1974; Kardin & Groth 1989). The sporulation capacity is considered to be a composite trait deriving from the sporulation rate and the lesion size, and is defined as the amount of spores produced per area unit of sporulating tissue per unit of time (Subrahmanyam *et al.* 1983; Dowkiw *et al.* 2003). The sporulation capacity is linked to the pathogen's ability to exploit host resources (Pariaud *et al.* 2009b). Finally, the latent period is defined as the time interval between infection and the onset of sporulation from that infection (Lannou 2012). Second, morphological traits of urediniospores linked to the dispersal ability of the fungus and perhaps indirectly to its aggressiveness were measured: two size parameters, the length and width, and two shape parameters, the length-to-width ratio (L/W ratio) and volume. The length and width of spores are defined by measurements of Feret diameter (i.e. the distance between two parallel lines tangent to the spore). The width of a spore (also called minimum Feret diameter)

is the minimum of all the Feret diameters measured, while the length (also called Feret length) is the Feret diameter perpendicular to the minimum Feret diameter.

The aims of this study were i) to assess the variability of quantitative traits of the poplar rust fungus; ii) to assess their level of heritability; iii) to study correlations between these traits and iv) to test the hypothesis of a potential cost of virulence.

2. Materials and methods

2.1. Phenotypic data acquisition

2.1.1. Qualitative traits

Since the poplar rust fungus *M. larici-populina* performs its sexual stage on an alternate host (larch), the progeny studied here were obtained through selfing of the reference strain 98AG31 on larch (*Larix decidua*) seedlings as previously described (Pernaci *et al.* 2014). A total of 95 S1 (selfed) offspring were studied. In order to test the hypothesis of a virulence cost, the pathotype of each offspring of the progeny was determined. In this gene-for-gene system (Flor 1971), the pathotype is defined as the combination of virulence factors, this latter being defined as the ability of the pathogen to overcome a specific qualitative resistance gene (Agrios 2005). Then, groups of isolates with different pathotypes were compared to test for differences in quantitative traits expression (i.e. fitness) due to the differential sets of virulence factors they carry. Each offspring of the progeny was inoculated on a differential set containing eight poplar cultivars with different known qualitative resistance genes (Pinon & Frey 1997, 2005) and on a susceptible one (*Populus deltoides × P. nigra* ‘Robusta’), as previously described (Gérard *et al.* 2006; Barrès *et al.* 2008). The phenotype of each of the offspring towards each qualitative resistance gene was denoted Vir if both resistant and susceptible leaf discs were infected, and Avr if only the susceptible (control) leaf disc was infected.

Furthermore, in order to test for the presence of unknown heterozygous virulence factors in the parental strain used for the selfing, the same progeny were inoculated in the same way on a set of 16 immune poplar genotypes (i.e. genotypes carrying qualitative resistances not yet overcome by the pathogen). These genotypes resulted from different crosses: eight *P. deltoides × P. nigra* hybrids (‘Degrosso’, ‘NL3486’, ‘NL3500’, ‘NL3554’, ‘NL3571’, ‘NL4040’, ‘NL4042’, ‘NL3972’), six *P. deltoides × P. deltoides* hybrids (‘55B20’,

‘57B04’, ‘57B16’, ‘57B24’, ‘58B21’, ‘A79’), one F2 (*P. deltoides* × *P. nigra*) × (*P. deltoides* × *P. nigra*) hybrid (‘Laxo7’) and one pure *P. deltoides* genotype (‘L270-3’).

2.1.2. Quantitative traits

2.1.2.1. Experimental design

Because of technical constraint linked to the single-spore inoculation protocol, which is highly time-consuming, the characterization of quantitative traits of the 95 S1 individuals plus the parental strain was divided into two successive experiments, i.e. the first one for the 47 first S1 individuals plus the parental strain and the second one for the remaining 48 individuals. Since we aimed to reach a number of 25 replicates per individual, the 48 individuals of each experiment were inoculated three times (series) within an experiment. Within each series, each S1 individual was inoculated onto 24 excised 12-mm-diameter poplar leaf discs, arranged in 24-well polystyrene cell culture plates. Since we were not able to inoculate more than 12 individuals per inoculation day, inoculation of a series comprising 48 individuals was distributed into 4 inoculation days over a week. Within each experiment, individuals were randomly distributed within series to minimize any “environmental” effect (e.g. light flow, humidity, temperature) due to their position in the growth chamber. Moreover, inoculators randomly performed inoculations between series of an experiment to minimize any “inoculator” effect (e.g. to avoid one isolate inoculated by the same inoculator over the three series).

Characterization of quantitative traits of the progeny was performed on excised leaf discs of *P. deltoides* × *P. nigra* ‘Robusta’. The poplar plants were grown in a greenhouse as previously described (Pernaci *et al.* 2014). Because of time constraints, two different cohorts of plants were used for the two successive experiments. However, since the growth stage of plants can influence the expression of quantitative traits of a pathogen (Eversmeyer *et al.* 1980; Johnson 1980; Milus & Line 1980), we carefully paid attention to use cohorts of plants of the same age for the two experiments in order to minimize any “plant cohort” effect between experiments. For each series, leaves of leaf plastochron index (LPI, (Larson & Isebrands 1971) 7 to 12 from four plants were used. Since the age of tissues (i.e. LPI) can also influence quantitative traits (Knott & Mundt 1991; Turechek & Stevenson 1998), leaf discs were systematically mixed within a series (48 individuals) according to the plant and the LPI. Therefore, each individual was inoculated on leaf discs from the four plants and of each LPI,

which minimized a potential “plant” and “LPI” effects within a series. However, since leaves used for the first day of the four inoculation days of a series could not be used for the last day (e.g. modified physiological state over the four days of inoculations), individuals were not inoculated on each plant-LPI combinations, but on particular combinations for each inoculation day. To summarize, the Latin square design of our experiment allowed us to assess several effects, which were susceptible to bias measurements of quantitative traits of the pathogen, and to take them into account for statistical analysis.

2.1.2.2. Single-spore inoculation protocol

Single-spore inoculation was performed with fresh urediniospores to maximize their germination and infection rate (Pei *et al.* 2002). Therefore, each S1 isolate was multiplied on fresh poplar leaf discs prior to its inoculation. To this aim, 1 mg of urediniospores was dispersed in 200 µl of water-agar (0.1 g l^{-1}). The resulting spore suspension was applied as 2 µl droplets on the abaxial surface of two 30-mm-diameter leaf discs of ‘Robusta’. Leaf discs were incubated floating on deionized water in 6-well polystyrene cell culture plates, with the abaxial surface above, at 19 ± 1°C, and under continuous fluorescent light. After a 10-13 days incubation period, the sporulating leaf discs were used for single-spore inoculations. For each S1 isolate, a sporulating leaf disc was gently tapped above a microscope slide to release urediniospores. Then, each single urediniospore was taken with a human eyelash under a stereomicroscope (63x magnification) and deposited onto a 5 µl water-agar droplet on the abaxial surface of one 12-mm-diameter leaf discs of ‘Robusta’, floating on deionized water in 24-well polystyrene cell culture plates. Each leaf disc was inoculated with two urediniospores in two droplets, at a distance of ca. 5 mm in order to avoid coalescence of the resulting uredinia. After each spore deposition, absence of remaining spores on the eyelash was checked to avoid double deposition in the next droplet. For each S1 isolate, 24 leaf discs were inoculated with two urediniospores each, and incubated in the same conditions as described above. In addition, a germination test was performed for each isolate immediately after its inoculation to ensure the quality of urediniospore used and to take it into account for trait measurement. To this aim, urediniospores of each isolate were dispersed on the surface of a Petri dish containing agar (20 g.l^{-1}). After an overnight incubation at 19±1°C, the ratio of germinated/total spores was counted under a light microscope (60x magnification) to determine the germination rate.

2.1.2.3. Quantitative trait measurements

The monitoring of the infection process lasted 13.5 days, allowing measurements of latent period and infection efficiency. Emergence of uredinia was scored twice a day for a more accurate assessment, in the early morning and at the end of the afternoon. Infection efficiency was assessed for each 24-well plate and corresponded to the ratio of the observed number of uredinia over the expected number, this latter corresponding to the number of deposited urediniospores (here 48). However, since not all the deposited urediniospores were able to generate a uredinium, the expected number had to be corrected by the germination rate of the isolate. Hence, infection efficiency was computed through the following formula:

$$Infection\ effiency = \left(\frac{Observed\ number\ of\ uredinia}{Expected\ number\ of\ uredinia * germination\ rate}\right) * 100$$

At the end of the monitoring, leaf discs bearing two uredinia were cut in two and processed independently if the two uredinia were at least 5 mm apart, or discarded if they were not, as were the discs bearing more than two uredinia. Leaf discs were placed in 2 ml Eppendorf tubes with 2 ml of Isoton® II isotonic buffered diluent (Beckman Coulter) supplemented with Tween® 20 detergent (Sigma-Aldrich) (0.1% v/v) and Sovilo® antifoam solution (Scotts France S.A.S.) (0.001% v/v). The tubes were vigorously shaken for 2 x 30 sec on a Qiagen TissueLyser, in order to release all the urediniospores from the uredinium. Both measurements of sporulation rate and urediniospore morphological parameters were performed on the resulting spore suspensions using an Occhio® Flowcell FC200+ optical morphogranulometer, which allows simultaneous particle counting and image analysis of the particles. Before counting, urediniospore suspensions were sonicated for 20 min and vortexed to disperse clusters of urediniospores. For each suspension, four technical counting replicates were performed using the following settings: 0.5 ml of priming, 1.5 ml of volume analysis and 10% of volume sampling (i.e. 10% within 1.5 ml are really analyzed, evenly distributed within the analyzed volume). Filters dedicated to urediniospore counting and size parameters were defined and independently applied on the raw data to get sporulation rate (i.e. urediniospore concentration.ml^{-1}*2) expressed in spores.$lesion^{-1}$.day^{-1}, and length and width of urediniospores produced by each uredinium, respectively. The L/W ratio and volume of urediniospores are composite traits, which derive from length and width:

$$L/W\ ratio = \frac{spore\ length}{spore\ width}$$

The spore volume was computed from the formula of the volume of an ellipsoid (Philibert *et al.* 2011). It is given by the following formula:

$$Volume = \frac{4}{3}\pi\left(\frac{length}{2} * \left(\frac{width}{2}\right)^2\right)$$

After shaking the leaf discs, photographs of the spore-free uredinia were taken under a stereomicroscope (63x magnification) coupled to a digital camera. Lesion size measurements were performed using ImageJ version 1.47. Finally, the composite trait sporulation capacity, expressed in urediniospore.mm^{-2}.day^{-1}, was computed for each lesion by dividing the sporulation rate by the lesion size.

2.2. Phenotypic data analysis

2.2.1. Variability and heritability of the traits

To characterize the phenotypic variability generated by a single meiosis event in *M. larici-populina*, we studied several characteristics of this progeny for each quantitative trait measured. Analysis of variance (ANOVA) was performed using R version 3.1.1 to estimate variance components of each trait, especially to test a significant effect of the "isolate" factor. ANOVA outputs were used to compute least-squares means taking into account significant model effects, using the 'lsmeans' package version 2.12 in R. Next, variance components were used to compute broad sense heritability of traits (i.e. unpartioned genetic variance into "additive", "epistasis" and "dominant" components), rather than narrow sense heritability which could have been much more informative. However, we were not able to compute narrow sense heritability since the pedigree of the parental strain is unknown. Broad sense heritability (H^2) of a trait is the ratio of genetic variability (σ_g^2) to phenotypic variability $(\sigma_g^2 + \sigma_e^2)$ and is computed by the formula given in Singh *et al.* (1993):

$$H^2 = \frac{\sigma_g^2}{\sigma_g^2 + \sigma_e^2}$$

Where $\sigma_g^2 = (M_g - M_{res})/b$, Mg is the mean square of the genetic factor, M_{res} is the mean square of the residual and b is the number of randomized complete blocks.

In addition, 95% confidence intervals (95CI) were generated through the Jackknife method. σ_g^2 was also used to compute the genotypic coefficient of variation (GCV), a parameter of phenotypic variability given by:

$$GCV = \left(\frac{\sqrt{\sigma_g^2}}{\mu_{pop}} \right) * 100$$

Where μ_{pop} = Mean of the quantitative trait of the progeny.

Since GCV involves dividing by the mean trait value of the population, it has no unit and allows comparisons between traits. Another parameter of trait variability was also computed within the progeny, %min and %max, which correspond to the percentage of the parental strain value represented by the offspring with the lowest and the highest value, respectively. Finally, a last parameter indicating the number of the offspring which are significantly different from the parental strain was assessed by performing Tukey's tests.

2.2.2. Covariation analysis

To get an overview of the covariance and relationships between quantitative traits, a principal component analysis (PCA) was performed over lsmeans of both morphological and aggressiveness traits using the R package "ade4" version 1.6-2. This analysis also allowed us to establish if it would be better to use single traits rather than the composite traits derived from them for the next analyzes. Then, pairwise correlation tests were performed using the Pearson's method in the "cor.prob" function, which provide the correlation coefficient and the associated probability of the correlation. Graphical correlation charts were generated using both the "chart.correlation" function implemented in the R package "PerformanceAnalytics" version 1.4.3541 and "ggplot" function implemented in the R package "ggplot2" version 1.0.0.

2.2.3. Cost of qualitative virulence

To test the hypothesis of a virulence cost, a PCA was performed over the whole trait dataset using the R package "ade4" version 1.6-2. This analysis brought out any potential phenotypic differentiation between pathotype groups. Then, simple pairwise *t*-tests using the

Table 1: Characteristics of aggressiveness and morphological traits studied in the S1 progeny, with from the left to the right: number of offspring significantly different from the parental strain 98AG31, %min and %max of variation, genotypic coefficient of variation (GCV) and broad sense heritability (H^2) with 95% confidence interval in parenthesis. In addition, analysis of variance for the "isolate" effect is given.

Quantitative trait		≠ 98AG31	Variation	GCV (%)	H^2 (95CI)	ANOVA Df	ANOVA Mean Sq	ANOVA Pr(>F)
Morphological	Urediniospore length	2	95% - 106%	20.3	0.686 (0.658 - 0.718)	95	142.605	p<0.001
	Urediniospore width	9	93% - 108%	31.5	0.598 (0.574 - 0.620)	95	72.231	p<0.001
	Urediniospore volume	12	86% - 125%	79.7	0.612 (0.580 - 0.641)	95	32641178	p<0.001
	Urediniospore L/W ratio	0	93% - 108%	23.1	0.575 (0.555 - 0.597)	95	0.831	p<0.001
Aggressiveness	Infection efficiency	58	33% - 232%	244.7	0.030 (0,028 - 0,023)	95	1.714	p<0.001
	Latent period	0	93% - 116%	16.6	0.010 (0.0095 - 0.0104)	95	7.201	p<0.001
	Lesion size	2	78% - 180%	60	0.017 (0.0161 - 0.0174)	95	26817125954	p<0.001
	Sporulation rate	3	45% - 355%	64.4	0.467 (0.444 - 0.497)	95	42443	p<0.001
	Sporulation capacity	0	24% - 162%	77.9	0.644 (0.624 - 0.664)	95	3532098	p<0.001

fdr method were performed for each single trait to test for significant differences between pathotype groups.

3. Results

3.1. Qualitative traits

In order to test for segregation of avirulence loci in the studied progeny, and for a potential cost of virulence, the pathotype of each S1 individual was determined. When inoculated on the poplar differential set comprising eight known qualitative resistance genes (numbered R1 to R8), all the offspring exhibited a virulent phenotype at loci Avr3, Avr4 and Avr7, as did the parental strain 98AG31. Furthermore, all the offspring exhibited an avirulent phenotype at loci Avr1, Avr2, Avr5, Avr6, and Avr8, as did the parental strain 98AG31. When the offspring were inoculated on a set of 16 immune poplar genotypes, 15 genotypes out of 16 remained uninfected. However, 30 out of 96 of the offspring were able to infect one poplar genotype (*P. deltoides* 'L270-3'). The corresponding avirulence locus was named AvrX, since the corresponding resistance gene has not been previously described.

3.2. Quantitative traits

3.2.1. Variability and heritability of quantitative traits

A significant “isolate” effect was observed for all the quantitative traits studied (*P*-value < 0.001) for both morphological and aggressiveness traits (Table 1, see Supplementary table S1 for detailed ANOVAs tables). Overall, high levels of phenotypic variability were observed for both morphological and aggressiveness traits, ranging from 95% - 106% to 45% - 355%. However, aggressiveness traits displayed higher phenotypic variability compared to morphological traits of urediniospores, with a minimum / maximum variation of 93% - 116% / 45% - 355% and 95% - 106% / 86% – 125%, respectively (Table 1). Interestingly, the finding was the same for the GCV. Indeed, high values of GCV were obtained for both morphological and aggressiveness traits, with GCV ranging from 3.4% to 244%. However, aggressiveness traits displayed higher GCV compared to morphological traits, with GCV ranging from 3.4% to 244% and from 23.1% to 79.7%, respectively. Moreover, we observed fewer offspring significantly different from the parental strain for aggressiveness traits than

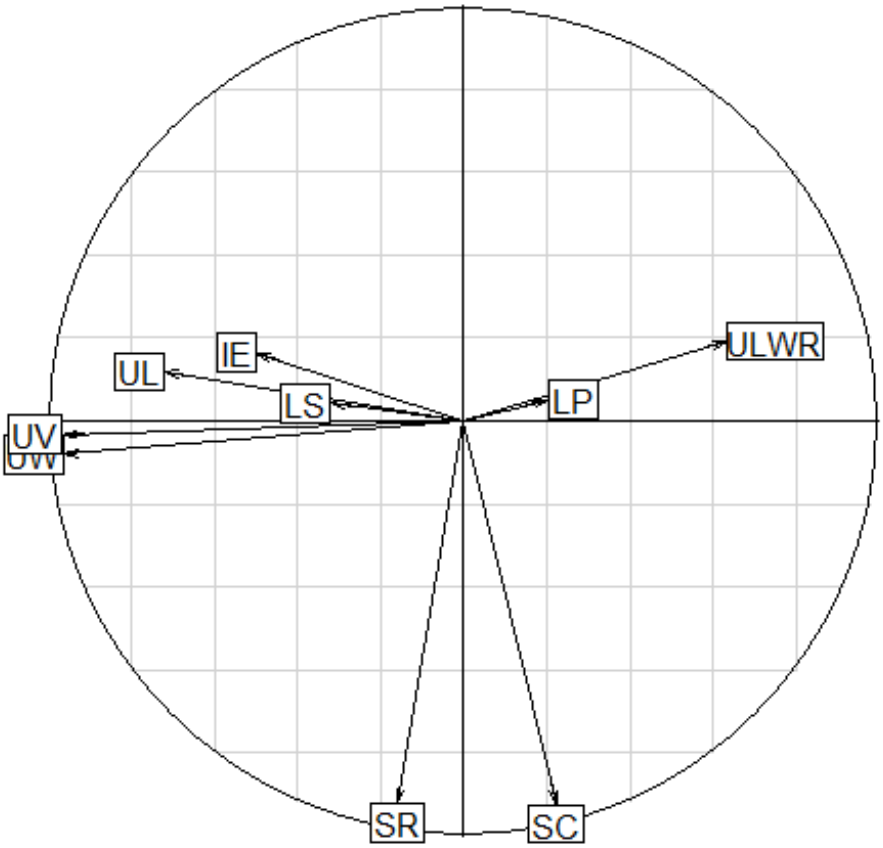


Figure 1: Principal Component Analysis (PCA) performed over morphological and aggressiveness traits of 95 offspring plus the parental strain: UL, urediniospore length; UW, urediniospore width; UV, urediniospore volume; ULWR, urediniospore length-to-width ratio; IE, infection efficiency; LP, latent period; LS, lesion size; SR, sporulation rate; SC, sporulation capacity.

for morphological traits, except for infection efficiency (58 of the offspring) (Table 1, Supplementary figures S2a-i).

Morphological traits globally displayed higher level of heritability than aggressiveness traits, with H^2 ranging from 0.57 to 0.69 and from 0.01 to 0.64, respectively. Within aggressiveness traits, sporulation rate and capacity displayed high levels of heritability, with H^2 = 0.47 and 0.64, respectively, compared to H^2 ranging from 0.01 to 0.03 for the other aggressiveness traits (Table 1).

3.2.2. Covariation analysis

The principal component analysis performed over the whole trait dataset suggested several correlations between traits. A positive correlation was suggested between volume and infection efficiency, whereas negative correlations were suggested between L/W ratio and both volume and infection efficiency (Figure 1). Moreover, urediniospore length and width seemed to be positively correlated.

Pearson's correlation tests revealed four significant correlations ($P < 0.05$) observed between morphological traits, between aggressiveness traits and between morphological and aggressiveness traits (Table2, Figures 2a-d). On the one hand, two significant negative correlations were found between urediniospore volume and L/W ratio, and lesion size and sporulation capacity, with R^2 = -0.6082 and -0.2172, and $P < 10^{-4}$ and 5.10^{-2}, respectively (Table 2, Figures 2a & 2b). On the other hand, two significant positive correlations were found between infection efficiency and both urediniospore volume and lesion size, with R^2 = 0.3426 and 0.2744, respectively, and $P < 0.05$ for both (Table 2, Figures 2c & 2d). Moreover, a significant positive correlation was found between urediniospore volume and lesion size (R^2 = 0.1811), and three negative correlations between latent period and infection efficiency, sporulation capacity and both urediniospore volume and infection efficiency, with R^2 = -0.2001, -0.1707 and -0.1751, for $\alpha = 0.1$ (Table 2, Supplementary figure S3). Conversely, no significant correlation was found for all other pairs of trait, with *P*-value ranging from 0.1104 to 0.9186 (Table 2, Supplementary figure S3). A summary diagram depicting correlations between traits is given in Figure 3 for a better overview of the relationships which link them.

Table 2: Matrix of *P*-values (above diagonal) and Pearson's coefficient (below diagonal) for all pairwise correlation tests between quantitative traits. Significant *P*-values ($P < 0.05$) are indicated in bold text.

	Urediniospore volume	Urediniospore L/W ratio	Latent period	Lesion size	Sporulation capacity	Infection efficiency
Urediniospore volume	-	**$< 10^{-4}$**	0.3221	0.077	0.096	**0.001**
Urediniospore L/W ratio	-0.6082	-	0.1104	0.8637	0.6347	0.1856
Latent period	-0.1021	0.1640	-	0.4090	0.9186	0.051
Lesion size	0.1811	-0.0178	-0.0852	-	**0.033**	**0.001**
Sporulation capacity	-0.1707	0.0491	0.0106	-0.2172	-	0.088
Infection efficiency	0.3426	-0.1363	-0.2001	0.2744	-0.1751	-

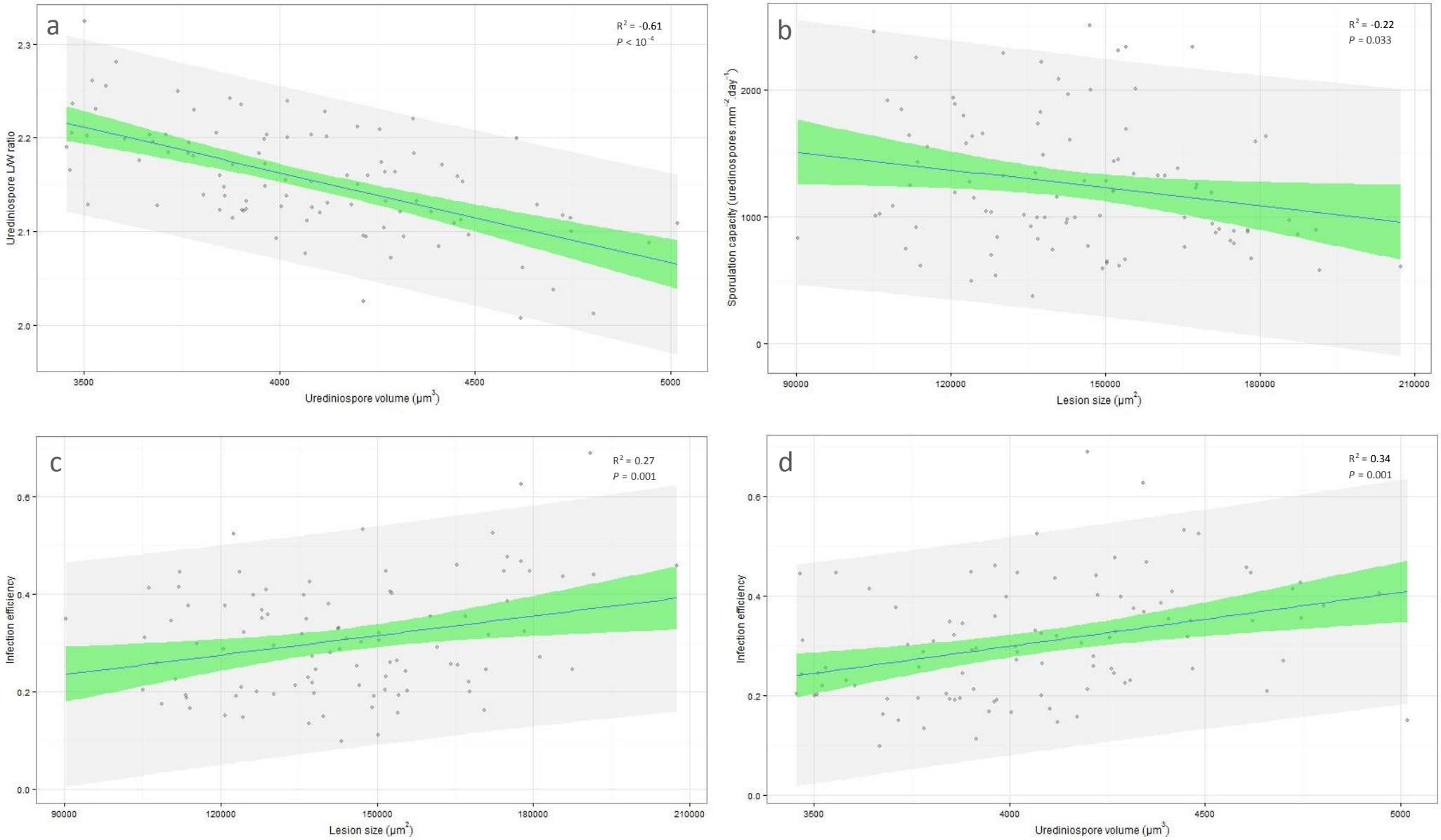


Figure 2: Plots of significant correlations detected between (a) urediniospore volume and length-to-width ratio, (b) lesion size and sporulation capacity, (c) lesion size and infection efficiency and (d) urediniospore volume and infection efficiency. The regression line fitted to the model is represented by the blue line, and the green and grey areas represent the confidence and predicted intervals, respectively. For each correlation, Pearson's coefficient (R^2) and *P*-value associated to the correlation test are given.

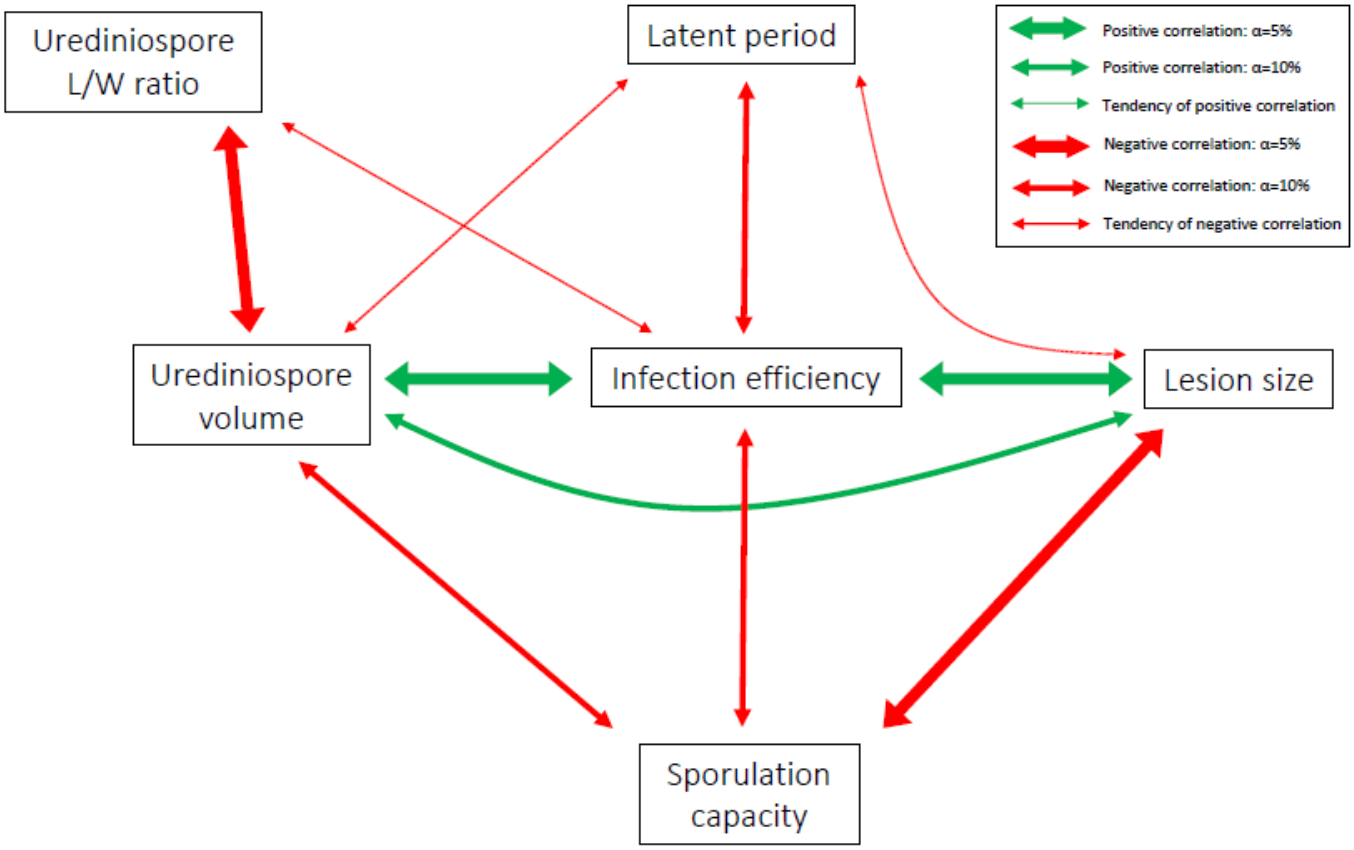


Figure 3: Summary diagram depicting correlations between aggressiveness and morphological traits of urediniospores.

3.2.3. Cost of qualitative virulence

No obvious differentiation was observed between avrX individuals (i.e. virulent on *P. deltoides* 'L270-3') and AvrX individuals (i.e. avirulent on 'L270-3'), based on the PCA performed over both morphological and aggressiveness traits (Figure 4). Indeed, centroids of the two ellipses were relatively close to each other. The two first axes of the PCA only explained 51.75% of the total inertia, with percentage of projecting inertia of 31.68 and 20.07, and Eigenvalues of 4.485 and 2.208 for axis 1 and 2, respectively.

All *t*-test performed over single traits did not show any significant difference between the avrX and the AvrX individuals. Indeed, *P*-values ranged from 0.15 to 0.94 for urediniospore volume and infection efficiency, respectively (Figure 5).

4. Discussion

The purpose of this study was to assess the genetic architecture of quantitative traits of the poplar rust fungus *M. larici-populina* by estimating their heritability, their variability, their correlations and the potential cost of qualitative virulence.

4.1. Qualitative traits

Since the parental strain 98AG31 exhibited a virulent phenotype at loci Avr3, Avr4 and Avr7 and according to the gene-for-gene relationship, which predicts that the avirulence allele is dominant and the virulence allele recessive (Flor 1971), we did not expected any segregation at these avirulence loci. It was the case since all of the offspring also exhibited a virulent phenotype at loci Avr3, Avr4 and Avr7. Furthermore, since the parental strain exhibited an avirulent phenotype at loci Avr1, Avr2, Avr5, Avr6, and Avr8, one would expect to observe segregation at some of these loci, if the parental strain is heterozygous Avr/avr at some loci. Mendelian segregation would result in 25% of homozygotes avr/avr, 50% of heterozygotes Avr/avr and 25% of homozygotes Avr/Avr. However, we did not observe any segregation of avirulence loci in the offspring, suggesting that the parental strain is homozygous Avr/Avr for these five avirulence loci.

A set of 16 immune poplar genotypes, on which the parental strain was avirulent, was inoculated with the same offspring, in order to search for a segregation of an unknown avirulence gene against a hypothetical qualitative resistance gene, which had never been

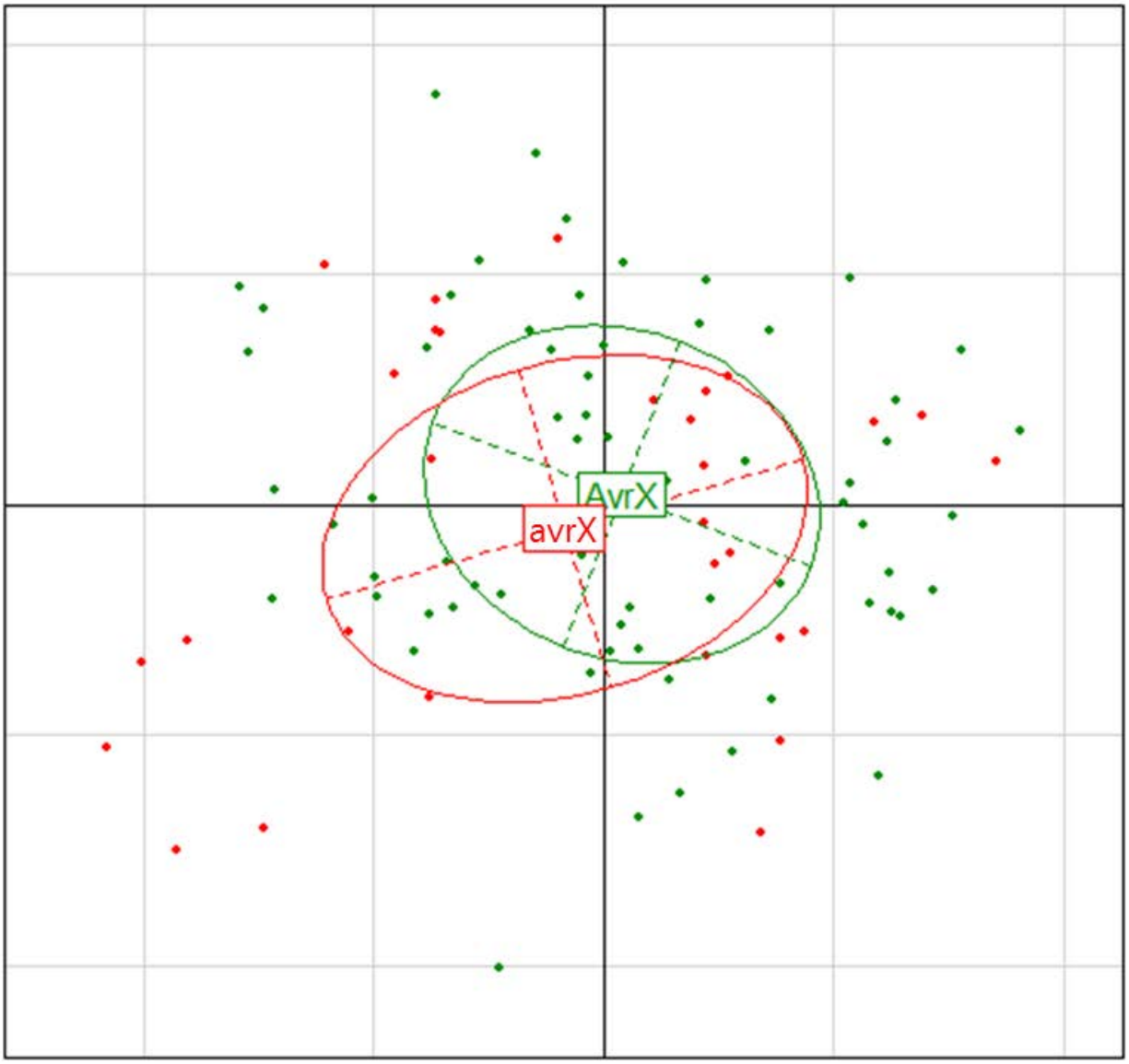


Figure 4: Principal Component Analysis (PCA) performed over morphological and aggressiveness traits of 95 offspring plus the parental strain. Avirulent individuals (AvrX) are in green and virulent individuals (avrX) are in red. Ellipses summarizing scatterplots of AvrX and avrX individuals are shown. With the settings k=1, almost 39% of the data should be in in their respective ellipse.

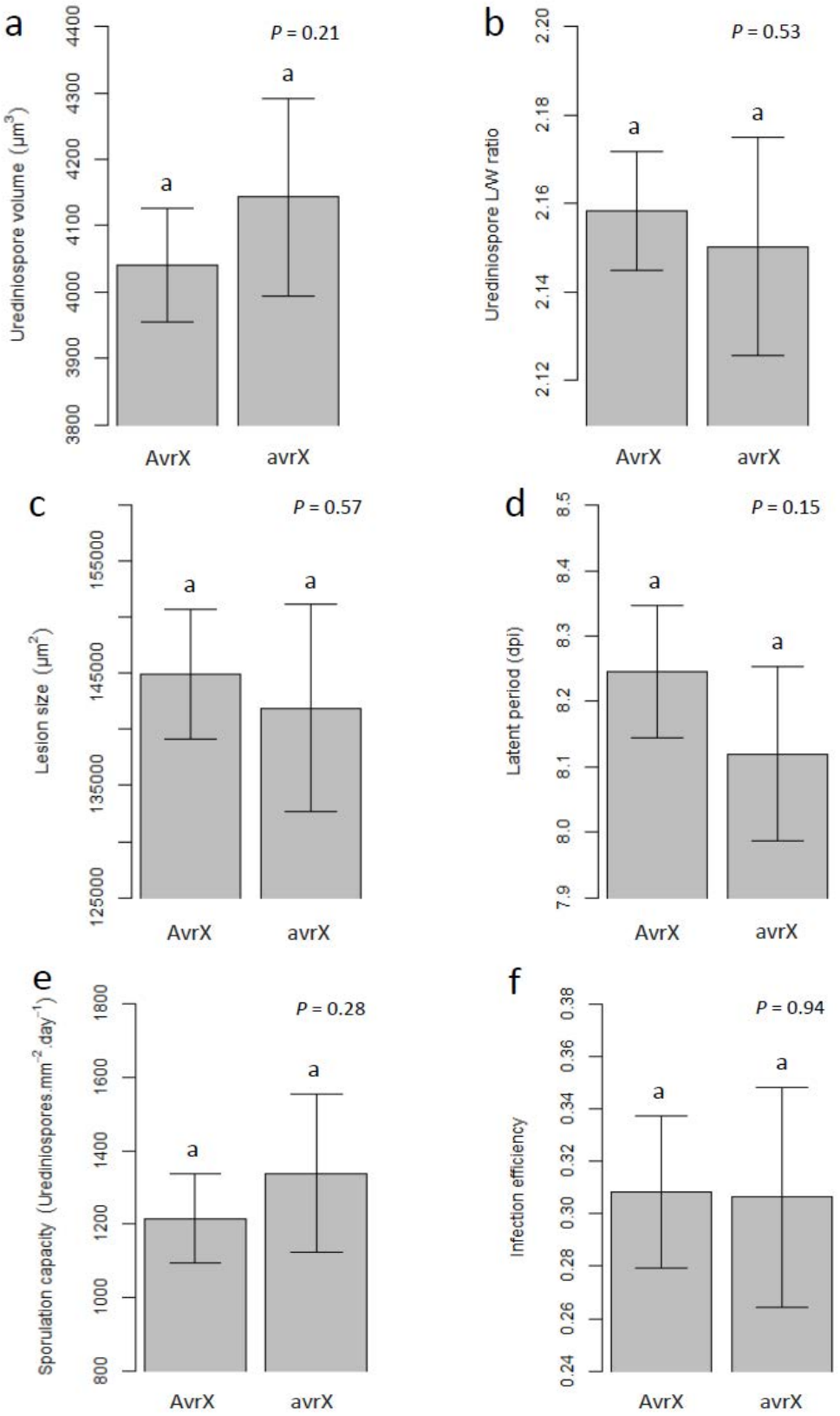


Figure 5: Pairwise *t*-tests between avirulent (AvrX) and virulent (avrX) individuals, performed over (a) urediniospore volume, (b) urediniospore length-to-width ratio, (c) lesion size, (d) latent period, (e) sporulation capacity and (f) infection efficiency. 95% confidence intervals are represented by vertical bars. Two different letters indicate significant difference for α = 5 %. *P*-value associated with the pairwise t-test is given.

overcome and had not been described so far. Only *P. deltoides* 'L270-3' was infected, by about 31% of the offspring. This *P. deltoides* male genotype was used in some backcrosses in the INRA poplar breeding program in 2004, but has never been planted in France, except a few stems in an experimental nursery (Catherine Bastien, personal communication). This suggests that the parental strain 98AG31 was heterozygous avr/Avr at the corresponding avirulence locus, thereafter referred to as AvrX. The pathogen, by carrying a mutated avirulence gene, was therefore potentially able to overcome a qualitative resistance gene, while the pathogen did not co-evolve with this host, and thus has not been subjected to strong selective pressure exerted by the host, which is expected to be a driver of breakdown. Thereby, a pool of avirulence genes recruited by the host to trigger defense mechanisms must already exist in the pathogen population in a mutated state. This finding illustrates the high evolutionary potential of *M. larici-populina*, the fragility of qualitative resistance genes, and the need for breeders to focus on quantitative resistance.

4.2. Accuracy of quantitative trait measurements

Despite the fact that infection efficiency, latent period, sporulation rate and capacity and lesion size are the most commonly studied aggressiveness traits in phytopathology, their accurate measurement is by nature technically difficult to perform (Lannou 2012). Generally, classical spray-inoculation methods for leaf pathogens result in multiple infections per leaf (or leaf disc), and each measurement (i.e. biological replicate) is performed over a population of lesions. This could introduce a bias into phenotypic characterization since the not-negligible variation in trait values among infections of the same leaf is not taken into account (Lannou 2012).

This is particularly the case for the latent period, for which assessment is not straightforward. Two different methods to assess latent period have been developed in order to minimize bias induced by multiple infections. The first method consists of estimating the time at which half of the lesions sporulate (T50) (Knott & Mundt 1991; Flier & Turkensteen 1999). The best method for T50 estimation has been proposed by Shaner (Shaner 1980) by adjusting the dynamics of lesion emergence to a sigmoid curve. The second method consists of measuring the time from inoculation to the first occurrence of sporulating lesions, which indicates the minimal time required for the pathogen to complete its life cycle (Jinks & Grindle 1963; Knott & Mundt 1991; Miller *et al.* 1998). However, whatever the method

chosen, the real variation in latent period of lesions on a single leaf is not well defined. The original single-spore inoculation protocol developed in this study allowed us to independently monitor the entire infection cycle of individual lesions, and to perform measurements of aggressiveness traits on each lesion. Hence, since the biological replicates here were single uredinia rather than populations of lesions, phenotypic measurements were more accurate than in other study involving classical spray-inoculation methods. However, even if this methodology is advantageous, it also comes with a drawback. Since appearance of lesions was scored twice a day, variance in this trait was high, leading to large 95CI on individual trait means.

Infection efficiency is another trait that is not straightforward to assess. Indeed, since it is commonly defined as the probability that a spore deposited on a receptive host surface produces a lesion (Pariaud *et al.* 2009a; Lannou 2012), the number of spores deposited should be controlled. However, given that this control is technically difficult to achieve, assessment of infection efficiency is often inaccurate (Lehman & Shaner 1997) or not performed (Morais *et al.* 2015). Single-spore inoculations, performed by Nutman *et al.* (1963), Zadoks & Schein (1979) and Pei *et al.* (2002) circumvent this difficulty. In the present study, performing single-spore inoculations permitted us to well control the number of urediniospores deposited onto each leaf disc, as the presence of only one urediniospore on the eyelash was checked under the stereomicroscope before each deposition.

Furthermore, lesion size and spore production are highly density-dependent for many biotrophic pathogens (e.g. Clifford & Clothier 1974; Sache 1997; Robert *et al.* 2004), probably stemming from increased competition for host resources and available tissues among lesions (Pariaud *et al.* 2009a). Hence, experimental measurements of aggressiveness traits might be strongly biased by density, especially if infection efficiency varies among isolates. Thus, it might be concluded that differences in spore production or lesion size are based on genetic differences among isolates while they could simply result from a density effect (Pariaud *et al.* 2009a). Once again, our single-spore inoculation protocol proves to be a powerful method to overcome a possible density effect on aggressiveness traits.

4.3. Heritability and variability of quantitative traits

A significant "isolate" effect was observed for each quantitative trait studied (*P*-value < 0.001) for both morphological and aggressiveness traits. This implies that a significant part of the phenotypic variation, and *in fine*, expression of quantitative traits is based on the genetic factors of the pathogen.

Contrasting values of broad sense heritability were found for the different quantitative traits measured. First, very low heritability values were found for latent period (H^2 = 0.01), lesion size (H^2 = 0.01) and infection efficiency (H^2 = 0.03), contrasting with the results found in literature. Lehman & Shaner (1996) observed H^2 for latent period ranging from 0.28 to 0.76 in the wheat leaf rust fungus *Puccinia triticina*, while Hamid *et al.* (1982) and Hill & Nelson (1982) observed heritability for lesion size of 0.87 in the maize pathogen *Bipolaris zeicola* and ranging from 0 to 0.6 in *Bipolaris maydis*, respectively. In the same way, Hill & Nelson (1982) found heritability for infection efficiency ranging from 0.21 to 0.58, which is considerably higher than our observation. On the contrary, heritability of sporulation capacity (H^2 = 0.64) and sporulation rate (H^2 = 0.46) in the present study were in the same order of magnitude as in Hill & Nelson (1982), where they measured heritability ranging from 0.23 to 0.52 for sporulation capacity. However, it is worth noting that heritability is measured on a species, in a particular environment, and thus does not establish an absolute measurement of the trait, nor is it a character ofthe species. Indeed, heritability of aggressiveness traits is particularly dependent on the genetics of the host-pathogen interaction (Pariaud *et al.* 2009a), leading to tricky comparisons between studies. Indeed the studies cited above involved different pathogens that were phenotyped on a set of host genotypes, whereas only one poplar genotype was inoculated in the present study. Moreover, heritability can change over time in response to environmental changes. For this reason, Kolmer & Leonard (1986) stated that heritability values determined from genetic responses in multiple environments were more realistic than values determined by analysis of variance and based on restricted environmental variation and a limited number of phenotypes. In addition, heritability of traits can also evolve over time in response to an increase or decrease of genetic diversity (e.g. mutation, migration) or to selection.

Second, morphological traits of urediniospores globally exhibited higher level of heritability than aggressiveness traits, ranging from 0.57 to 0.69. Interestingly, similar patterns of lower heritability of life history traits than morphological, physiological or behavioral traits have been widely described in literature (Gustafsson 1986; Charlsworth

1987; Mousseau & Roff 1987; Roff & Mousseau 1987; Falconer & Mackay 1996). These results can be explained by two hypotheses. First, Fisher's fundamental theorem (Fisher 1930) states that, since life history traits are more closely linked to fitness than morphological traits, they are more likely to be subjected to selection pressure. Hence, in populations at evolutionary equilibrium some alleles could be fixed, leading to a decrease of additive genetic variance and a decrease of heritability of life history traits. Second, Price & Schluter (1991) proposed that this observation could be due to higher sensitivity of life history traits to environmental factors, since many of them are complex and influenced by numerous features of individuals (i.e. morphological, physiological or behavioral traits) and therefore capture more environmental variance than morphological traits. Thus, variation in life history traits arises as the summed effects of variation in morphological traits, and is in addition influenced by environmental variation influencing the life history traits directly (Merilä & Sheldon 1999). This leads to an increase in variance from environmental causes and a decrease in heritability. In the present study, even if a higher sensitivity of life history traits cannot be discounted because of the lower heritability observed on aggressiveness traits, the first hypothesis is the most likely. Indeed, the parental strain 98AG31 was sampled in 1998, 4 years after the breakdown of R7 qualitative resistance, which was borne by several widespread poplar cultivars (Pinon & Frey 2005). Hence, *M. larici-populina* populations, from which strain 98AG31 originated, could have been subjected since breakdown to selection pressure exerted by the new host landscape, leading to adaptation in its aggressiveness traits, allele fixation and decrease of heritability in aggressiveness traits. Evidence of such host adaptation phenomena have already been observed in *M. larici-populina* populations after the qualitative resistance R7 breakdown. Fabre *et al.* (unpublished) observed a significant decrease in latent period of isolates sampled from 1994 to 1997, then stabilized until 2006, when inoculated on the R7 cultivar 'Beaupré'. Similarly, Hayden *et al.* (unpublished) showed that individuals collected in 1998 exhibited a higher infection efficiency and a shorter latent period on the cultivar they co-evolved with (i.e. 'Beaupré'), than individuals collected in 1994, soon after the R7 breakdown.

However, even if aggressiveness traits displayed a lower heritability than morphological traits, sporulation rate and capacity displayed higher level of heritability than the other aggressiveness traits. This result may be explained by the fact that individuals have been in competition for resources because of the huge inoculum pressure in poplar stands. So, in a competitive context, it could be better for an individual to infect hosts with high

efficiency and to complete its infectious cycle as quickly as possible, to ensure its presence on the site, rather than producing lots of urediniospores which is a feature of individuals with a strategy for dispersal. Hence, selective pressure suffered by *M. larici-populina* populations exerted on traits related to sporulation might have been less strong, leading to higher heritability.

Concerning the phenotypic variation of quantitative traits, a high variability of both aggressiveness and morphological traits of urediniospores was observed, with GCV ranging from 16.6% to 244.7%. As for heritability, differences between the two types of traits were also observed. Morphological traits of urediniospores displayed lower values of GCV than aggressiveness traits, with GCV ranging from 20.3% to 79.7% and from 16.6% to 244.7%, respectively. This lower segregation of morphological traits suggests that higher genetic and/or physiological constraints may apply on urediniospore characteristics than on aggressiveness traits, limiting the range of values they can take. Hence, the fungus should be constrained to producing urediniospore with size in a given range, preventing size minimization or maximization. In addition, a higher number of offspring were significantly different from the parental strain for morphological traits than for aggressiveness traits, with 0 to 12 and 0 to 3 offspring, respectively. For infection efficiency, in contrast, 58 offspring were different from the parental strain. Intuitively, one would expect that the higher the GCV for a trait, the higher the number of offspring significantly different from the parental strain. This counter-intuitive result might be explained in two different ways. GCV is computed from σ_g^2, that is, the overall genetic variance equal to the mean sum of squares of the distribution, whereas the number of offspring significantly different from the parental strain derives from a Tukey test based on ANOVA, and takes into account variance of each individual. On this basis, differences in variance levels visible among quantitative traits, revealing some weakness of our protocol on certain trait measurements, could introduce another bias in comparisons. Consequently, it seems that no relationships should be expected and that comparisons between these two parameters might not be relevant. The fact that fewer offspring were significantly different from the parental strain for aggressiveness traits than for morphological traits can also be explained by the higher selective pressure that may have been exerted on aggressiveness traits than on morphological traits. Indeed, as mentioned before, selection can lead to allele fixation and decreased genetic variability. Thus, creation of new offspring allele combinations through meiosis should be relatively constrained and should thus lead to phenotypes that are not significantly different from the parental one.

It is worth noting that levels of quantitative trait variability found in *M. larici-populina* are relatively high, even if they have been observed over 95 S1 individuals. It implies that measurable variability can result from a single meiosis event and on a narrow genetic background, since the offspring have been obtained by selfing of the reference strain 98AG31. Hence, one could expect high levels of phenotypic variability in natural populations of *M. larici-populina*, where sexual reproduction occurs between unrelated individuals.

4.4. Correlations between quantitative traits

The principal component analyses (PCA) performed allowed us to carefully choose which aggressiveness and morphological traits were the most relevant for further analysis and to avoid redundancy. Thus, we discarded urediniospore length and width and sporulation rate. Indeed, the PCA showed that urediniospore length and width were both significantly positively correlated to urediniospore volume. Results also showed a significant positive correlation between sporulation rate and capacity. The use of a single-spore inoculation protocol, avoiding any density effect on spore production (see above), allows us to retain sporulation rate rather than sporulation capacity. However, since we wanted to study the relationships between urediniospore production and their size, it might be better for comparisons to use spore production expressed per area unit rather than spore production per lesion, since lesion size was variable.

The relationships between aggressiveness traits suggested that higher infection efficiency was associated with a shorter latency period, a lower sporulation capacity and a larger lesion size, which was confirmed by a significant negative correlation between sporulation capacity and lesion size. This latter correlation suggests that spore production is physiologically constrained, since the pathogen will not be able to increase both size of sporulating lesion and sporulation capacity at the same time. Though, one would expect that, all things being equal, sporulation capacity would increase proportionally to the lesion size, if we hypothesize that mycelium quantity, which is the structure pumping nutrients from the plant, is positively correlated with the lesion size. This negative correlation could be due to the fact that even if, due to higher mycelium quantity, a larger lesion effectively pump nutrients proportionally to its size, an important part will be allocated to the maintenance of mycelium (keeping living mycelium alive and replacement of dead one). Thus, allocation of nutrients to mycelium maintenance being size-dependent, the proportion of nutrients allocated to spore production should decrease with lesion size, leading to a decrease of sporulation

capacity. However a significant positive correlation between lesion size and sporulation rate was found, which is in accordance with previous results obtained with *M. larici-populina* (Dowkiw *et al.* 2003; Pei *et al.* 2003) and the willow rust fungus *M. larici-epitea* (Pei *et al.* 2002). In addition, Pei *et al.* (2003) have reported significant correlations between the whole set of traits assessed in the present study (except between sporulation rate and latency period).

Concerning morphological traits, we observed that the greater a urediniospore's volume, the lower its L/W ratio is, i.e. the more they are spherical. Interestingly, this correlation has already been observed in this pathogen in a previous study (cf. Chapitre 1), where the evolution of urediniospore size of *M. larici-populina* was studied during an annual rust epidemic in the Durance River valley. We observed that individuals which dispersed further displayed urediniospores with a larger volume as well as a lower L/W ratio than individuals which did not disperse from the initial point of the epidemic. We concluded that urediniospores with larger volume and lower L/W ratio might enhance their dispersal abilities, by increasing their velocity and decreasing their settling velocity.

Concerning correlations between morphological and aggressiveness traits, urediniospore volume is more or less significantly correlated with infection efficiency, lesion size and sporulation capacity. In fact, a higher urediniospore volume is associated with a higher infection efficiency, larger lesions and lower sporulation capacity. These relationships have interesting biological interpretations. Indeed, if we hypothesize that the greater a spore's volume, the higher its resource quantity (Garrett 1973), we can imagine that such urediniospore may have a higher germination success and could produce longer germinating tubes to find stomata, leading to an increase of infection efficiency. Moreover, once penetrating the leaf, mycelium and haustoria could be produced faster and in higher quantity leading to a shorter latent period and a larger lesion size (even if relation between mycelium quantity and uredinia size has not been studied so far). The hypothesis of a faster early infection process (germination, penetration) and *in planta* growth rate has been recently proposed by Morais *et al.* (2015) to explain differences in latency period between two spore types - ascospore (sexual) and pycnidiospore (asexual) - in *Zymoseptoria tritici*, the cause of septoria tritici blotch. They observed that ascospores displayed longer latency period than pycnidiospores, which contradicts previous results obtained in *Leptospheria maculans*, the cause of blackleg disease on *Brassica* crops. In this pathogen, ascospores display shorter latency period than pycnidiospores (Brunin & Lacoste 1970; Alabouvette *et al.* 1974), particularly due to an earlier germination and penetration (Li *et al.* 2004). However, Morais *et*

al. (2015) noticed that whatever the spore type, the largest spores always display the shortest latency period. This suggest a positive correlation between spore volume and latency period. In the same way, they noticed that the spore type with the highest infection efficiency in the ascomycete fungi *Leptospheria maculans* (Mason & Huber 2001) and *Pyrenopeziza Brassicae* (Gilles *et al.* 2001; Karolewski *et al.* 2002) is the one with the largest spores. This also suggests a positive correlation between spore volume and infection efficiency, as we observed.

Finally, since *M. larici-populina* is a biotrophic pathogenic fungus, the amount of available resources for its growth and multiplication is limited by the plant photosynthetic activity. Hence, for a given quantity of resources, if individuals produce more voluminous spores and put more nutrients in them, they will produce a lower number of urediniospores, leading to the negative correlation observed between urediniospore volume and sporulation capacity. This negative correlation is in accordance with the size/number trade-off, widely described in plant grains and pollens (Smith & Fretwell 1974; Coomes & Grubb 2003; Jakobsson & Eriksson 2003; Sera 2008), and known to condition dispersal and competitive strategies in plants (Burton *et al.* 2010).

While some interesting correlations between aggressiveness traits were found in the present study, some others described in literature were not brought to light. Indeed, Milus & Line (1980) observed a negative correlation between latent period and lesion size in *Puccinia recondita*. While infection efficiency was positively correlated with lesion size and negatively correlated with latent period, we did not observe any negative correlation between latent period and lesion size, but just a tendency of negative correlation. In addition, Milus & Line (1980) and Pariaud *et al.* (2013) observed a trade-off between latent period and sporulation capacity. In our case we did not find any correlation between these two traits.

Overall, robust correlations were observed, which are consistent with competitive or dispersal strategies already described, especially for plant pathogens (Burton *et al.* 2010). Indeed, in a competitive context, the best strategy for individuals is to produce fewer spores, but to efficiently infect its host and with a short latent period in order to ensure its settlement in the site and quickly infect other host. On the contrary, in a dispersal context where competitive pressure is low, the best strategy for individuals is to produce lots of spores in order to invade the site, even if its infection efficiency is low and its latent period long. These evolutionary strategies fit with our results, since a higher infection efficiency was found correlated to a shorter latent period and a lower sporulation capacity, and *vice versa*. These

trade-offs can play a major role in an epidemic process, since it has been clearly demonstrated that there is selection for increased dispersal ability on expanding range edges (Travis & Dytham 2002; Hughes *et al.* 2007; Phillips *et al.* 2008), whereas traits associated with fitness at equilibrium density show dramatic declines (Burton *et al.* 2010).

4.5. Cost of qualitative virulence

Phenotypic comparisons between avrX and AvrX populations of *M. larici-populina* did not highlight any significant cost of phenotypic virulence.

Initially, this finding may be explained by the fact that cost of virulence might vary from neutral to nearly lethal. Indeed, it is highly dependent on the nature of the mutation, ranging from single-base mutation to a large chromosome deletion, the function of the qualitative virulence gene and its redundancy in the genome (Gout *et al.* 2007). Moreover, it has been suggested that subsequent mutations, similar to those observed in other organisms (Levin *et al.* 2000; Schoustra *et al.* 2006; Labbé *et al.* 2007), may progressively reduce the cost of virulence (Bahri *et al.* 2009; Montarry *et al.* 2010). This hypothesis is likely to be true if we keep in mind that the parental strain 98AG31 has been collected four years after the qualitative resistance R7 breakdown. Thus, such compensatory mechanisms may have had enough time to occur and attenuate a virulence cost, leading to an undetectable cost of virulence.

However, in view of the particular system used here to study the cost of virulence, this *a priori* negative result could prove to be very informative. Indeed, studying the cost of virulence requires the characterization of aggressiveness traits of avr *versus* Avr individuals on a susceptible cultivar (Montarry *et al.* 2010; Bruns *et al.* 2014), since individuals which are Avr for a given avirulence gene will not be able to infect host carrying the correspondent resistance gene. Consequently, in cost of virulence studies, aggressiveness of avr individuals is never assessed on the cultivar carrying the correspondent resistance gene, on which they may have co-evolved before sampling. Yet, host adaptation by the pathogen aggressiveness traits, after the breakdown of a qualitative resistance gene, has already been observed (Fabre *et al.* unpublished; Hayden *et al.* unpublished). Consequently, such host adaptation may introduce bias in the assessment of cost of virulence, since cost of virulence measured on a susceptible cultivar could result in a cost of adaptation to the resistant host rather than a real physiological cost of virulence (Bruns *et al.* 2014).

In the present study, the 95 S1 progeny used seemed to be ideal to assess a potential cost of a qualitative virulence. In addition to limiting the effect of the genetic background which could be problematic (Menzies & MacNeill 1987; Østergård 1987; Lannou 2012), it also avoids confounding a potential cost of adaptation and the physiological cost of virulence. Indeed, the only avirulence factor which distinguishes individuals of the progeny is an avirulence factor against a qualitative resistance gene never deployed in the poplar landscape. Hence, individuals carrying this virulence factor have never encountered the poplar genotype carrying the corresponding resistance gene in nature and have never experienced selection by the host, and thus are not expected to have adpated in aggressiveness traits. The fact that we did not observe any physiological cost of virulence raises the question of the nature of cost measured in other studies, and the need to distinguish between physiological cost linked to a loss of qualitative avirulence gene function and cost associated to host adaptation phenomena, to better assess the impact of such trade-offs on pathogen fitness.

Despite the fact that other traits, such as mycelium quantity, might be measured to better assess characteristics of pathogen aggressiveness (e.g. to gain a more precise view of correlations between traits), this study brought to light some evidence of the high adaptive potential of the poplar rust fungus *M. larici-populina*. Indeed, the high variability of both morphological and aggressiveness traits generated by only one sexual reproduction event on a narrow genetic background, the high heritability of morphological and some aggressiveness traits, significant negative correlations between quantitative traits which associated with different adaptive strategies, as well as the absence of cost of qualitative virulence may confer to *M. larici-populina* high capacity to adapt to new quantitative resistance genes deployed in the future. This points to the need to carefully select quantitative resistance genes (i.e. controlled by the largest number of minor genes), which would be efficient as long as possible, in order to avoid rapid breakdown of these resistance genotypes as has been already seen in the past for qualitative resistance. This also implies the need to improve, through QTL analysis, our knowledge of the genetic determinism of the qualitative and quantitative trait of the fungus, to better estimate its ability to adapt to new host quantitative resistance.

5. References

Agrios GN (2005) Plant Pathology. Elsevier Academic Press, Oxford.

Ahmed, H.U., Mundt, C.C., Hoffer, M.E. & Coakley, S.M. (1996). Selective influence of wheat cultivars on pathogenicity of *Mycosphaerella graminicola* (Anamorph *Septoria tritici*). *Phytopathology*, 86, 454–458.

Alabouvette, C., Brunin, B. & Louvet, J. (1974). Recherches sur la maladie du colza due à *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et De Not. IV. Pouvoir infectieux des pycnidiospores et sensibilité variétale. *Ann. Phytopathol.*, 6, 265–275.

Andrivon, D., Pilet, F., Montarry, J., Hafidi, M., Corbière, R., Achbani, E.H., *et al.* (2007). Adaptation of *Phytophthora infestans* to partial resistance in potato: evidence from French and Moroccan populations. *Phytopathology*, 97, 338–343.

Bahri, B., Kaltz, O., Leconte, M., de Vallavieille-Pope, C. & Enjalbert, J. (2009). Tracking costs of virulence in natural populations of the wheat pathogen, *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici*. *BMC Evol. Biol.*, 9, 1–12.

Barrès, B., Halkett, F., Dutech, C., Andrieux, A., Pinon, J. & Frey, P. (2008). Genetic structure of the poplar rust fungus *Melampsora larici-populina*: Evidence for isolation by distance in Europe and recent founder effects overseas. *Infect. Genet. Evol.*, 8, 577–587.

Van den Berg, F., Lannou, C., Gilligan, C.A. & van den Bosch, F. (2014). Quantitative resistance can lead to evolutionary changes in traits not targeted by the resistance QTLs. *Evol. Appl.*, 7, 370–380.

Boonekamp, P. (2012). Are plant diseases too much ignored in the climate change debate? *Eur. J. Plant Pathol.*, 133, 291–294.

Brun, H., Chèvre, A.-M., Fitt, B.D., Powers, S., Besnard, A.-L., Ermel, M., *et al.* (2010). Quantitative resistance increases the durability of qualitative resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *New Phytol.*, 185, 285–299.

Brunin, B. & Lacoste, L. (1970). Recherches sur la maladie du colza due à *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et De Not. IV. Pouvoir pathogène des ascospores. *Ann. Phytopathol.*, 2, 477–488.

Bruns, E., Carson, M.L. & May, G. (2014). The jack of all trades is master of none: a pathogen's ability to infect a greater number of host genotypes comes at a cost of delayed reproduction. *Evolution*, 68, 2453–2466.

Burton, O.J., Phillips, B.L. & Travis, J.M.J. (2010). Trade-offs and the evolution of life-histories during range expansion. *Ecol. Lett.*, 13, 1210–1220.

Caffier, V., Lasserre-Zuber, P., Giraud, M., Lascostes, M., Stievenard, R., Lemarquand, A., *et al.* (2014). Erosion of quantitative host resistance in the apple × *Venturia inaequalis* pathosystem. *Infect. Genet. Evol.*, 27, 481–489.

Charlsworth, B. (1987). The heritability of fitness. In: Bradbury, J. W. and Andersson, M. B. (eds) Sexual Selection. Testing the Alternatives, pp. 21-40. John Wiley, Chichester.

Chin, K.M. & Wolfe, M.S. (1984). Selection on *Erysiphe graminis* in pure and mixed stands of barley. *Plant Pathol.*, 33, 535–545.

Clifford, B.C. & Clothier, R.B. (1974). Physiologic specialization of *Puccinia hordei* on barley hosts with non-hypersensitive resistance. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 63, 421–430.

Coomes, D.A. & Grubb, P.J. (2003). Colonization, tolerance, competition and seed-size variation within functional groups. *Trends Ecol. Evol.*, 18, 283–291.

Covarelli, L., Beccari, G., Tosi, L., Fabre, B. & Frey, P. (2013). Three-year investigations on leaf rust of poplar cultivated for biomass production in Umbria, Central Italy. *Biomass Bioenergy*, 49, 315–322.

Day, T. & Otto, S.P. (1997). Fitness. *Encycl. Life Sci.*

Delmotte, F., Mestre, P., Schneider, C., Kassemeyer, H.-H., Kozma, P., Richart-Cervera, S., *et al.* (2014). Rapid and multiregional adaptation to host partial resistance in a plant pathogenic oomycete: evidence from European populations of *Plasmopara viticola*, the causal agent of grapevine downy mildew. *Infect. Genet. Evol.*, 27, 500–508.

Dowkiw, A., Husson, C., Frey, P., Pinon, J. & Bastien, C. (2003). Partial resistance to *Melampsora larici-populina* leaf rust in hybrid poplars: genetic variability in inoculated excised leaf disk bioassay and relationship with complete resistance. *Phytopathology*, 93, 421–427.

Dowkiw, A., Voisin, E. & Bastien, C. (2010). Potential of Eurasian poplar rust to overcome a major quantitative resistance factor. *Plant Pathol.*, 59, 523–534.

Eversmeyer, M.G., Kramer, C.L. & Browder, L.E. (1980). Effect of temperature and host-parasite combination on the latent period of *Puccinia recondita* in seedling wheat plants. *Phytopathology*, 70, 938–941.

Fabre, F., Rousseau, E., Mailleret, L. & Moury, B. (2012). Durable strategies to deploy plant resistance in agricultural landscapes. *New Phytol.*, 193, 1064–1075.

Falconer, D. S. (1989). Introduction to Quantitative Genetics. Longman, London.

Fisher, R. A. (1930). The genetical theory of natural selection. Clarendon Press, Oxford.

Flier, W.G. & Turkensteen, L.J. (1999). Foliar aggressiveness of *Phytophthora infestans* in three potato growing regions in the Netherlands. *Eur. J. Plant Pathol.*, 105, 381–388.

Flor, H.H. (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 9, 275–296.

Garrett, S.D. (1973). Deployment of reproductive resources by plant pathogenic fungi: an application of E. J. Salisbury's generalization for flowering plants. *Acta Bot. Isl.*, 1, 1–9.

Gérard, P.R., Husson, C., Pinon, J. & Frey, P. (2006). Comparison of genetic and virulence diversity of *Melampsora larici-populina* populations on wild and cultivated poplar and influence of the alternate host. *Phytopathology*, 96, 1027–1036.

Gilles, T., Fitt, B.D.L., McCartney, H.A., Papastamati, K. & Steed, J.M. (2001). The roles of ascospores and conidia of *Pyrenopeziza brassicae* in light leaf spot epidemics on winter oilseed rape (*Brassica napus*) in the UK. *Ann. Appl. Biol.*, 138, 141–152.

Gonzalez, A.M., Marcel, T.C. & Niks, R.E. (2012). Evidence for a Minor Gene-for- Minor Gene Interaction Explaining Nonhypersensitive Polygenic Partial Disease Resistance. *Phytopathology*, 102, 1086-1093.

Gout, L., Kuhn, M.L., Vincenot, L., Bernard-Samain, S., Cattolico, L., Barbetti, M., *et al.* (2007). Genome structure impacts molecular evolution at the *AvrLm1* avirulence locus of the plant pathogen *Leptosphaeria maculans*. *Environ. Microbiol.*, 9, 2978–2992.

Gustafsson, L. (1986). Lifetime reproductive success and heritability: empirical support for Fisher's fundamental theorem. *Am. Nat.*, 761–764.

Hamid, A.H., Ayers, J.E., Schein, R.D. & Hill, R.R. (1982). Components of fitness attributes in *Cochliobolus carbonum* race 3. *Phytopathology*, 72, 1166–1169.

Heilman, P. (1999). Planted forests: poplars. *New For.*, 17, 89–93.

Hill, J.P. & Nelson, R.R. (1982). The heritability of three parasitic fitness attributes of *Helminthosporium maydis* race T. *Phytopathology*, 72, 525–528.

Hughes, C.L., Dytham, C. & Hill, J.K. (2007). Modelling and analysing evolution of dispersal in populations at expanding range boundaries. *Ecol. Entomol.*, 32, 437–445.

Jakobsson, A. & Eriksson, O. (2003). Trade-offs between dispersal and competitive ability: a comparative study of wind-dispersed Asteraceae forbs. *Evol. Ecol.*, 17, 233–246.

Jinks, J.L. & Grindle, M. (1963). Changes induced by training in *Phytophthora infestans*. *Heredity*, 18, 245–264.

Johnson, D.A. (1980). Effect of low temperature on the latent period of slow and fast rusting winter wheat genotypes. *Plant Dis.*, 64, 1006–1008.

Johnson, R. (1979). The concept of durable resistance. *Phytopathology*, 69, 198–199.

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.

Kardin, M.K. & Groth, J.V. (1989). Density-dependent fitness interactions in the bean rust fungus. *Phytopathology*, 79, 409–412.

Karolewski, Z., Evans, N., Fitt, B.D.L., Todd, A.D. & Baierl, A. (2002). Sporulation of *Pyrenopeziza brassicae* (light leaf spot) on oilseed rape (*Brassica napus*) leaves inoculated with ascospores or conidia at different temperatures and wetness durations. *Plant Pathol.*, 51, 654–665.

Knott, E.A. & Mundt, C.C. (1991). Latent period and infection efficiency of *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* populations isolated from different wheat cultivars. *Phytopathology*, 81, 435–439.

Kolmer, J.A. & Leonard, K.J. (1986). Genetic selection and adaptation of *Cochliobolus heterostrophus* to corn hosts with partial resistance. *Phytopathology*, 76, 774–777.

Kou, Y. & Wang, S. (2010). Broad-spectrum and durability: understanding of quantitative disease resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 13, 181–185.

Labbé, P., Berticat, C., Berthomieu, A., Unal, S., Bernard, C., Weill, M., *et al.* (2007). Forty years of erratic insecticide resistance evolution in the mosquito *Culex pipiens*. *Plos Genet.*, 3, 2190–2199.

Lannou, C. (2012). Variation and selection of quantitative traits in plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 50, 319–338.

Larson, P.R. & Isebrands, J.G. (1971). The plastochron index as applied to developmental studies of cottonwood. *Can. J. For. Res.*, 1, 1–11.

Lehman, J.S. & Shaner, G. (1996). Genetic variation in latent period among isolates of *Puccinia recondita* f.sp. *tritici* on partially resistant wheat cultivars. *Phytopathology*, 86, 633–641.

Lehman, J.S. & Shaner, G. (1997). Selection of populations of *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* for shortened latent period on a partially resistant wheat cultivar. *Phytopathology*, 87, 170–176.

Lehman, J.S. & Shaner, G. (2007). Heritability of latent period estimated from wild-type and selected populations of *Puccinia triticina*. *Phytopathology*, 97, 1022–1029.

Leonard, K.J. (1969). Selection in heterogeneous populations of *Puccinia graminis* f.sp. *avenae*. *Phytopathology*, 59, 1851–57.

Levin, B.R., Perrot, V. & Walker, N. (2000). Compensatory mutations, antibiotic resistance and the population genetics of adaptive evolution in bacteria. *Genetics*, 154, 985–997.

Li, H., Sivasithamparam, K., Barbetti, M.J. & Kuo, J. (2004). Germination and invasion by ascospores and pycnidiospores of *Leptosphaeria maculans* on spring-type *Brassica*

napus canola varieties with varying susceptibility to blackleg. *J. Gen. Plant Pathol.*, 70, 261–269.

Mason P. G. & and Huber, J.T. (2001). Biological Control Programmes in Canada, 1981–2000, Technology & Engineering. Wallingford, UK: CABI Publishing.

McDonald, B.A. & Linde, C. (2002). Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 40, 349–379.

Menzies, J.G. & MacNeill, B.H. (1987). Effect of unnecessary genes for virulence on six components of parasitic fitness in *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*. *Can. J. Plant Pathol.*, 9, 214–217.

Merilä, J. & Sheldon, B.C. (1999). Genetic architecture of fitness and nonfitness traits: empirical patterns and development of ideas. *Heredity*, 83, 103–109.

Miller, J.S., Johnson, D.A. & Hamm, P.B. (1998). Aggressiveness of isolates of *Phytophthora infestans* from the Columbia Basin of Washington and Oregon. *Phytopathology*, 88, 190–197.

Milus, E.A. & Line, R.F. (1980). Characterization of resistance to leaf rust in Pacific Northwest wheat lines. *Phytopathology*, 70, 167–172.

Montarry, J., Hamelin, F.M., Glais, I., Corbi, R. & Andrivon, D. (2010). Fitness costs associated with unnecessary virulence factors and life history traits: evolutionary insights from the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans*. *BMC Evol. Biol.*, 10, 9.

Morais, D., Laval, V., Sache, I. & Suffert, F. (2015). Comparative pathogenicity of sexual and asexual spores of *Zymoseptoria tritici* (septoria tritici blotch) on wheat leaves. *Plant Pathol.* doi: 10.1111/ppa.12372.

Mousseau, T.A. & Roff, D.A. (1987). Natural selection and the heritability of fitness components. *Heredity*, 59, 181–197.

Mundt, C.C. (2014). Durable resistance: a key to sustainable management of pathogens and pests. *Infect. Genet. Evol.*, 27, 446–455.

Mundt, C., Cowger, C. & Garrett, K. (2002). Relevance of integrated disease management to resistance durability. *Euphytica*, 124, 245–252.

Nutman, F.J., Roberts, F.M. & Clarke, R.T. (1963). Studies on the biology of *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 46, 27–44.

Østergård, H. (1987). Estimating relative fitness in asexually reproducing plant pathogen populations. *Theor. Appl. Genet.*, 74, 87–94.

Papaïx, J., Goyeau, H., Du Cheyron, P., Monod, H. & Lannou, C. (2011). Influence of cultivated landscape composition on variety resistance: an assessment based on wheat leaf rust epidemics. *New Phytol.*, 191, 1095–1107.

Pariaud, B., van den Berg, F., van den Bosch, F., Powers, S.J., Kaltz, O. & Lannou, C. (2013). Shared influence of pathogen and host genetics on a trade-off between latent period and spore production capacity in the wheat pathogen, *Puccinia triticina*. *Evol. Appl.*, 6, 303–312.

Pariaud, B., Ravigné, V., Halkett, F., Goyeau, H., Carlier, J. & Lannou, C. (2009a). Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens. *Plant Pathol.*, 58, 409–424.

Pariaud, B., Robert, C., Goyeau, H. & Lannou, C. (2009b). Aggressiveness components and adaptation to a host cultivar in wheat leaf rust. *Phytopathology*, 99, 869–878.

Pei, M.H., Ruiz, C., Harris, J. & Hunter, T. (2003). Quantitative inoculations of poplars with *Melampsora larici-populina*. *Eur. J. Plant Pathol.*, 109, 269–276.

Pei, M.H., Ruiz, C., Hunter, T., Arnold, G.M. & Bayon, C. (2002). Quantitative relationships between inoculum of *Melampsora larici-epitea* and corresponding disease on *Salix*. *Plant Pathol.*, 51, 443–453.

Pernaci, M., De Mita, S., Andrieux, A., Pétrowski, J., Halkett, F., Duplessis, S., *et al.* (2014). Genome-wide patterns of segregation and linkage disequilibrium: the construction of a linkage genetic map of the poplar rust fungus *Melampsora larici-populina*. *Front. Plant Sci.*, 5.

Philibert, A., Desprez-Loustau, M.-L., Fabre, B., Frey, P., Halkett, F., Husson, C., *et al.* (2011). Predicting invasion success of forest pathogenic fungi from species traits. *J. Appl. Ecol.*, 48, 1381–1390.

Phillips, B. L., Brown, G.P., Travis, J.M.J. & Shine, R. (2008). Reid's paradox revisited: the evolution of dispersal kernels during range expansion. *Am. Nat.*, 172, S34–S48.

Pinon, J. & Frey, P. (1997). Structure of *Melampsora larici-populina* populations on wild and cultivated poplar. *Eur. J. Plant Pathol.*, 103, 159–173.

Pinon, J. & Frey, P. (2005). Interactions between poplar clones and *Melampsora* populations and their implications for breeding for durable resistance. In: *Rust Dis. Willow Poplar*. Pei, M. H., McCracken, A. R., pp. 139–154.

Price, T. & Schluter, D. (1991). On the low heritability of life-history traits. *Evolution*, 853–861.

Robert, C., Bancal, M.O. & Lannou, C. (2004). Wheat leaf rust uredospore production on adult plants: influence of leaf nitrogen content and Septoria tritici blotch. *Phytopathology*, 94, 712–721.

Roff, D.A. & Mousseau, T.A. (1987). Quantitative genetics and fitness: lessons from *Drosophila*. *Heredity*, 59, 103–118.

Sache, I. (1997). Effect of density and age of lesions on sporulation capacity and infection efficiency in wheat leaf rust (*Puccinia recondita* f.sp. *tritici*). *Plant Pathol.*, 46, 581–589.

Schoustra, S.E., Debets, A.J.M., Slakhorst, M. & Hoekstra, R.F. (2006). Reducing the cost of resistance; experimental evolution in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *J. Evol. Biol.*, 19, 1115–1127.

Sera, B. (2008). Simple traits among diaspore weight/number, plant height and ability of vegetative propagation. *J. Integr. Plant Biol.*, 50, 1563–1569.

Shaner, G. (1980). Probits for analyzing latent period data in studies of slow rusting resistance. *Phytopathology*, 70, 1179–1182.

Singh, M., Ceccarelli, S. & Hamblin, J. (1993). Estimation of heritability from varietal trials data. *Theor. Appl. Genet.*, 86, 437–441.

Smith, C.C. & Fretwell, S. D. (1974). The optimal balance between size and number of offspring. *Am. Nat.*, 108, 499–506.

Subrahmanyam, P., McDonald, D. & Rao, P.V.S. (1983). Influence of host genotype on uredospore production and germinability in *Puccinia arachidis*. *Phytopathology*, 73, 726–729.

Travis, J.M.J. & Dytham, C. (2002). Dispersal evolution during invasions. *Evol. Ecol. Res.*, 4, 1119–1129.

Turechek, W.W. & Stevenson, K.L. (1998). Effects of host resistance, temperature, leaf wetness, and leaf age on infection and lesion development of pecan scab. *Phytopathology*, 88, 1294–1301.

Villaréal, L.M.M.A. & Lannou, C. (2000). Selection for increased spore efficacy by host genetic background in a wheat powdery mildew population. *Phytopathology*, 90, 1300–1306.

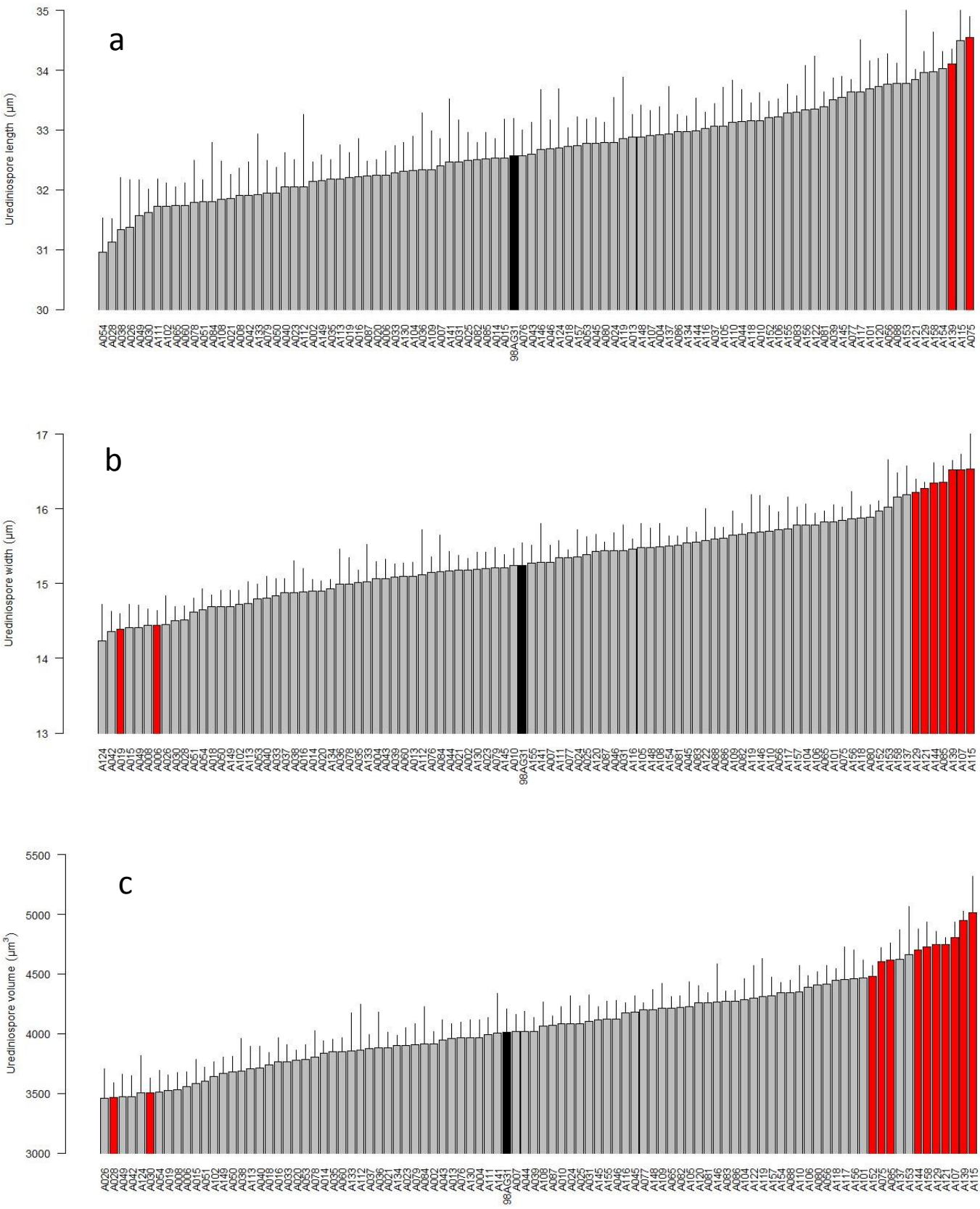
Xhaard, C., Fabre, B., Andrieux, A., Gladieux, P., Barres, B., Frey, P., *et al.* (2011). The genetic structure of the plant pathogenic fungus *Melampsora larici-populina* on its wild host is extensively impacted by host domestication. *Mol. Ecol.*, 20, 2739–2755.

Xu, X. (2012). Super-races are not likely to dominate a fungal population within a life time of a perennial crop plantation of cultivar mixtures: a simulation study. *BMC Ecol.*, 12, 16.

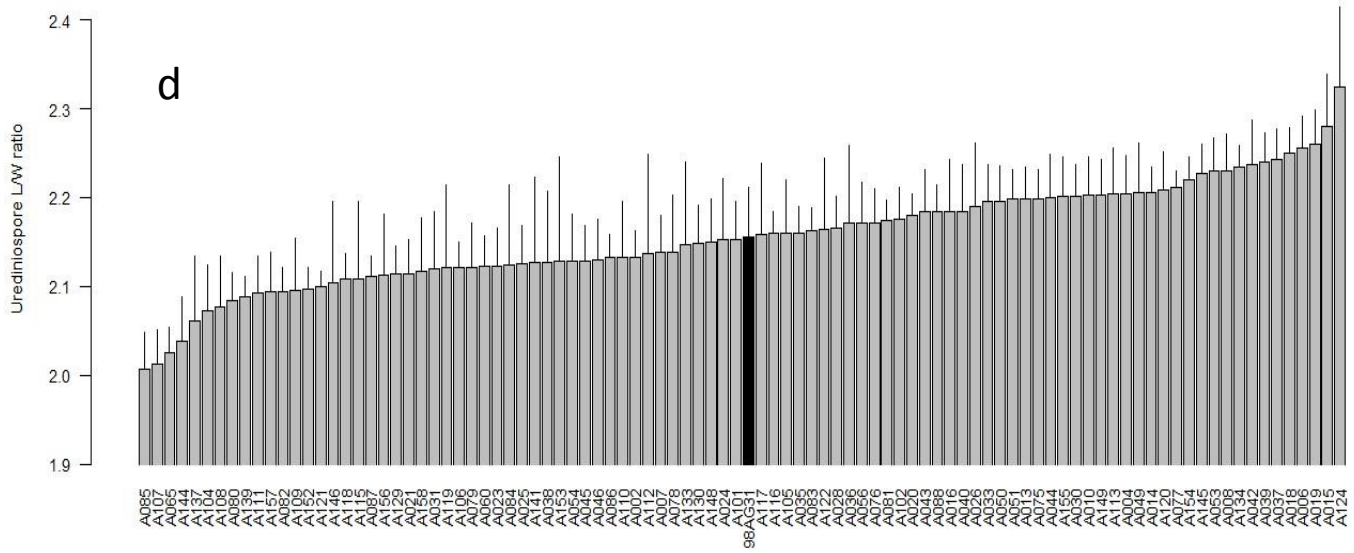
Zadoks J. C. & Schein, R.D. (1979). Epidemiology and plant disease management. Oxford, UK: Oxford University Press.

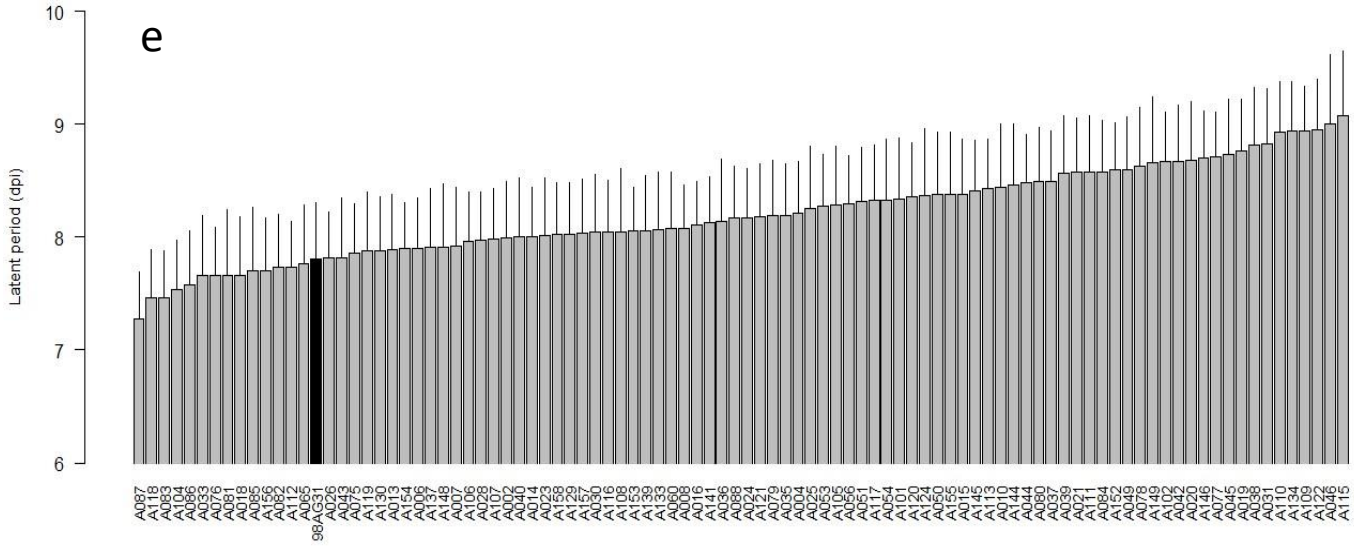
Supplementary Table S1: Detailed ANOVA table for each aggressiveness and morphological trait of urediniospores.

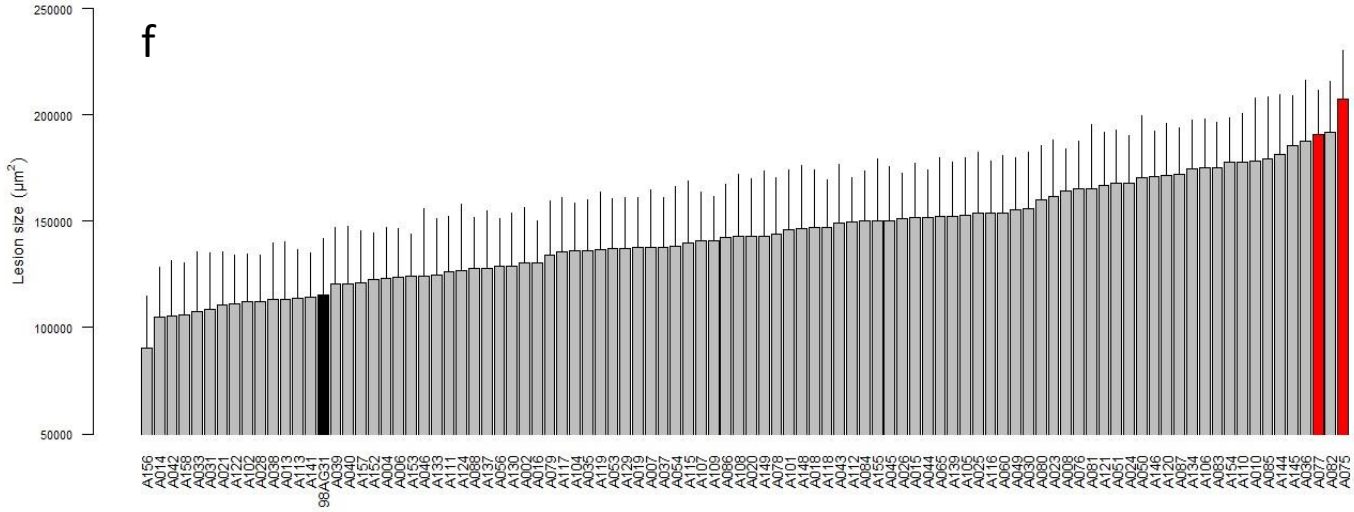
Quantitative trait	Factor	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Urediniospore length	numisolat:experiment	95	142.605	142.605	13.776	6.3E-206
	experiment:numplant	6	50.541	50.541	4.882	5.3E-05
	Residuals	23425	10.352	10.352	NA	NA
Urediniospore width	numisolat:experiment	95	72.231	72.2312	28.655	0
	experiment:numplant	6	44.575	44.575	17.684	1.5E-20
	Residuals	23425	2.521	2.521	NA	NA
Urediniospore volume	numisolat:experiment	95	32641178	32641178	31.568	0
	experiment:numplant	6	19170478	19170478	18.540	1.3E-21
	Residuals	23425	1034005	1034005	NA	NA
Urediniospore L/W ratio	numisolat:experiment	95	0.832	0.832	9.558	7.2-130
	experiment:numplant	6	0.467	0.467	5.368	1.5E-05
	Residuals	23425	0.087	0.087	NA	NA
Latency period	numisolat:experiment	95	7.201	7.201	4.377	4.8E-38
	experiment:numserie	4	169.688	169.688	103.146	4.9E-82
	numserie:numplant	9	12.645	12.649	7.689	3.1 -11
	Residuals	2794	1.645	1.645	NA	NA
Uredinia size	numisolat:experiment	95	26817125954	26817125954	6.019	2.3E-61
	experiment:numserie	4	363139947795	363139947795	81.511	1.7E-65
	numserie:numplant	9	75015173673	75015173673	16.838	2.6E-27
	Residuals	2782	4455089129	4455089129	NA	NA
Sporulation rate	numisolat:experiment	95	4032101	42443	4.453	5.5E-35
	experiment:numplant	6	169561	28260	2.965	7.1E-03
	Residuals	1183	11274768	9530	NA	NA
Sporulation capacity	numisolat:experiment	95	335549352	3532098	5.280	8.6E-45
	experiment:numplant	6	5502120	917020	1.371	0.223
	Residuals	1183	791431503	669003	NA	NA
Infection efficiency	numisolat:experiment	95	162.821	1.714	145.784	0
	experiment:numserie	4	73.783	18.446	1568.990	0
	numserie:numplant	9	0.696	0.077	6.576	2.1E-09
	Residuals	12016	141.266	0.012	NA	NA

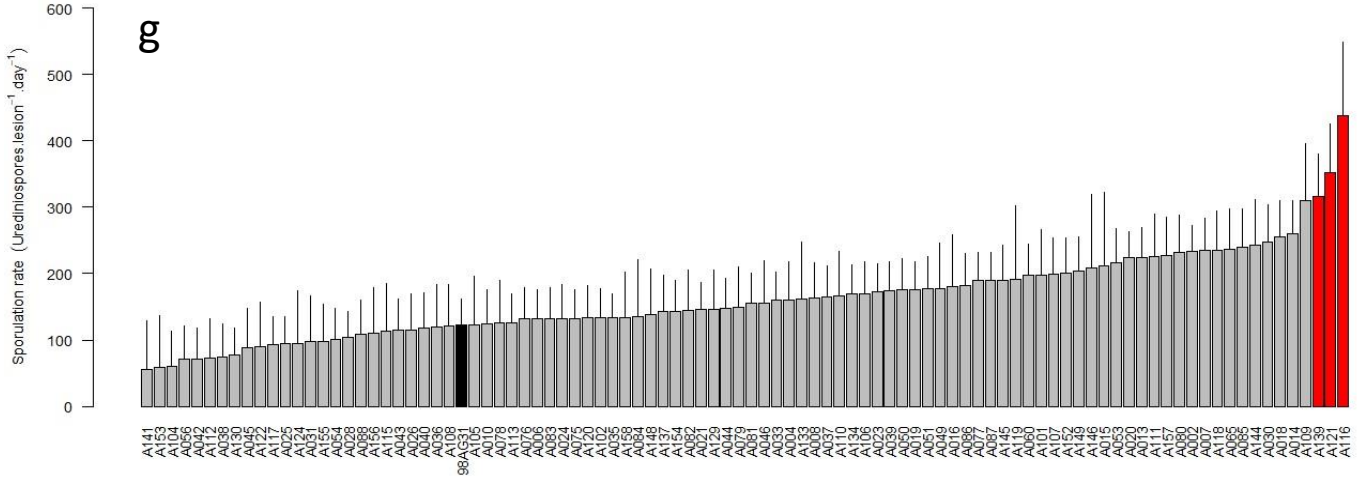


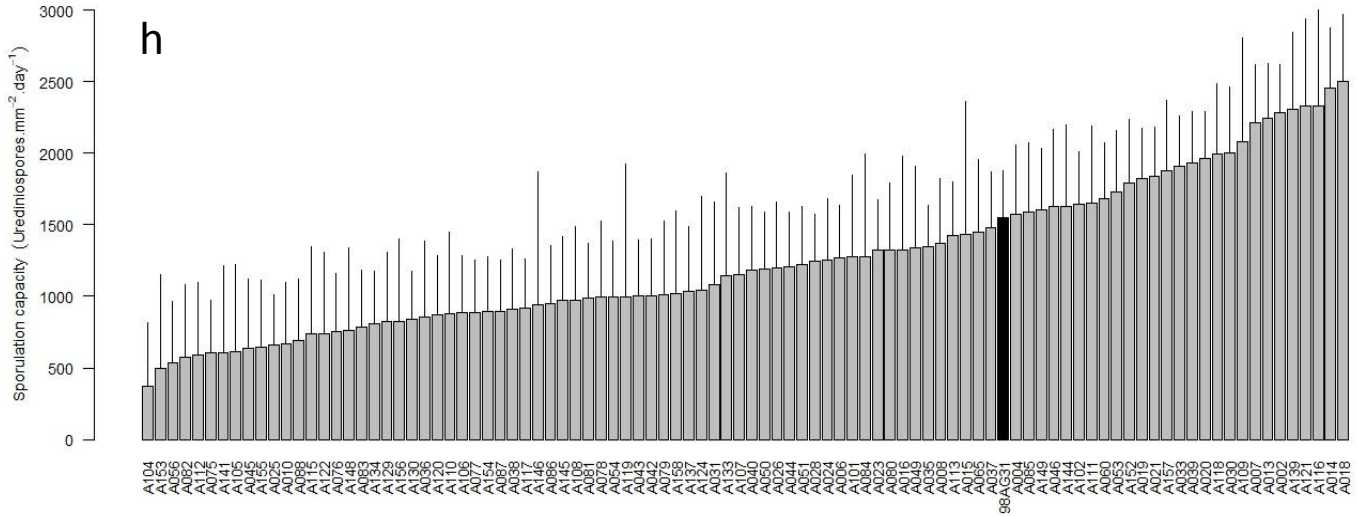
Supplementary Figure S2: Histograms of corrected mean trait values of the offspring plus the parental strain for (a) urediniospore length, (b) urediniospore width, (c) urediniospore volume, (d) urediniospore length-to-width ratio, (e) latent period, (f) lesion size, (g) sporulation rate, (h) sporulation capacity and (i) infection efficiency. 95% confidence intervals are represented by vertical bars. The parental strain 98AG31 is represented in black and offspring significantly different from the parental strain are represented in red.

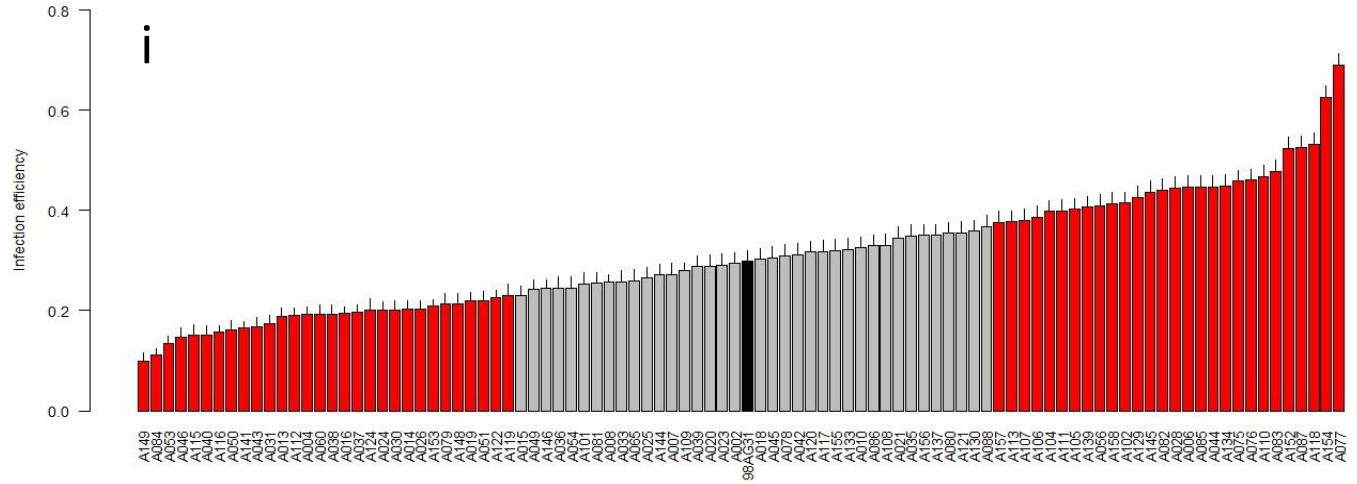

d
Urediniospore L/W ratio
2.4
2.3
2.2
2.1
2.0
1.9

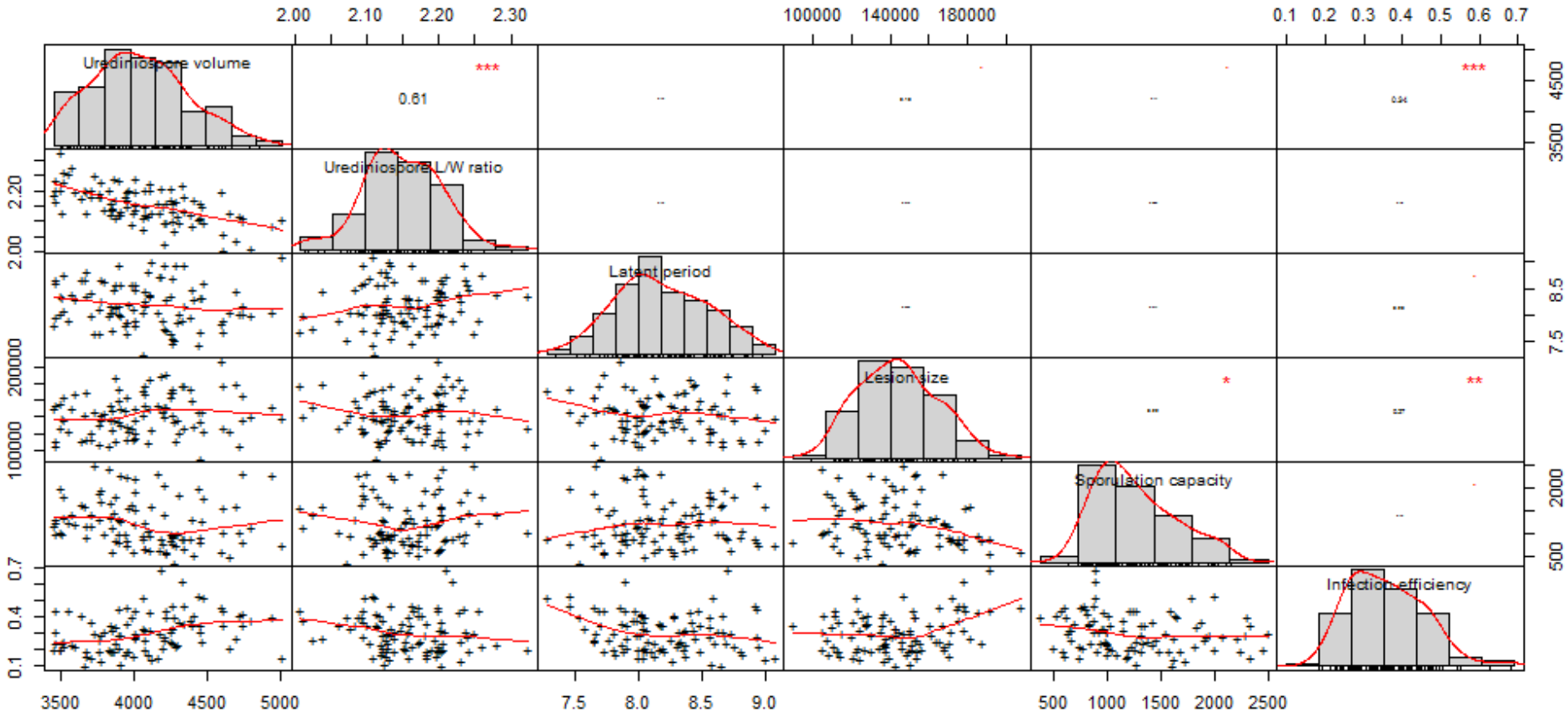

e
Latent period (dpi)
10
9
8
7
6


f
Lesion size (μm²)
250000
200000
150000
100000
50000


g
Sporulation rate (Urediniospores.lesion^{-1}.day^{-1})
0
100
200
300
400
500
600


h
Sporulation capacity (Urediniospores.mm^{-2}.day^{-1})
0
500
1000
1500
2000
2500
3000


i
Infection efficiency
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8



Supplementary Figure S3: Summary matrix of correlation tests between aggressiveness and morphological traits of urediniospores retained after the PCA analysis. Matrix of Pearson's coefficient with significance levels of *P*-values: *, 0.05; **, 0.01; ***, 0.001 (above diagonal) and matrix of corresponding correlation plots with smoothed fitted line in red (below diagonal). Histograms of the mean trait values' distributions are also given (diagonal panel).

Chapitre 3

Vers la construction d'une carte génétique de *Melampsora larici-populina*, support de la cartographie des loci codants les traits d'histoire de vie

Chapitre 3

Vers la construction d'une carte génétique de *Melampsora larici-populina*, support de la cartographie des loci codants les traits d'histoire de vie

Dans le chapitre précédent, nous avons mis en évidence une forte héritabilité de certains traits quantitatifs de *M. larici-populina*, à savoir des traits liés à la morphologie des urédospores ainsi que des traits d'agressivité liés à sa sporulation (capacité et taux). Par conséquent, l'expression de ces traits reposant sur des bases génétiques, il serait dès lors possible et intéressant de cartographier les régions codant ces traits (QTL), au même titre que le facteur de virulence non décrit à ce jour, mis en évidence dans le chapitre précédent. En effet, la connaissance du déterminisme génétique de ces traits pourrait s'avérer très utile pour l'élaboration de nouvelles stratégies d'amélioration variétale, en vue du déploiement de résistances plus durables.

Une telle étude nécessite de disposer au préalable d'une carte génétique du champignon. Ce chapitre présente la réalisation d'une étude pilote de la construction d'une carte génétique à haute densité de marqueurs de *M. larici-populina*. Pour ce faire, nous avons généré une population de 95 descendants S1 issue de l'autofécondation d'une souche de référence (la même descendance que celle utilisée dans le chapitre 2), dont les génomes ont été re-séquencés par la technologie Illumina®, à une couverture moyenne d'environ 6,9X. Ces données ont ensuite été traitées via un script développé *de novo* par Stéphane de Mita, chercheur au sein du laboratoire.

Les objectifs de cette étude ont été de déterminer, par une approche de cartographie génétique, la structure du génome de *M. larici-populina*, à savoir de combien de chromosomes il est constitué, aucun caryotypage n'ayant été réalisé jusque-là chez cette espèce. L'objectif sous-jacent a été de développer une approche innovante de cartographie génétique très peu adoptée par la communauté scientifique, la majorité des études étant basées sur l'utilisation de logiciels de cartographie génétique existants.

Ce chapitre se présente sous la forme d'un article publié dans la revue *Frontiers in Plant Science* (doi: 10.3389/fpls.2014.00454).

ARTICLE 3: GENOME-WIDE PATTERNS OF SEGREGATION AND LINKAGE DISEQUILIBRIUM: THE CONSTRUCTION OF A LINKAGE GENETIC MAP OF THE POPLAR RUST FUNGUS *MELAMPSORA LARICI-POPULINA*

Michaël Pernaci[1,2], Stéphane De Mita[1,2], Axelle Andrieux[1,2], Jérémy Pétrowski[1,2], Fabien Halkett[1,2], Sébastien Duplessis[1,2], Pascal Frey[1,2]*

[1]INRA, Interactions Arbres - Microorganismes, UMR1136, Champenoux, France.

[2]Université de Lorraine, Interactions Arbres - Microorganismes, UMR1136, Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

***Correspondence**:

Dr. Pascal Frey

INRA

Interactions Arbres – Microorganismes, UMR1136

F-54280 Champenoux, France

pascal.frey@nancy.inra.fr

Running title : Segregation and linkage disequilibrium in the poplar rust fungus

Keywords: fungal pathogen, linkage mapping, genome mapping, genome sequencing, Mendelian segregation, single nucleotide polymorphism, selfing, progeny

Abstract

The poplar rust fungus *Melampsora larici-populina* causes significant yield reduction and severe economic losses in commercial poplar plantations. After several decades of breeding for qualitative resistance and subsequent breakdown of the released resistance genes, breeders now focus on quantitative resistance, perceived to be more durable. But quantitative resistance also can be challenged by an increase of aggressiveness in the pathogen. Thus it is of primary importance to better understand the genetic architecture of aggressiveness traits. To this aim, our goal is to build a genetic linkage map for *M. larici-populina* in order to map quantitative trait loci related to aggressiveness. First, a large progeny of *M. larici-populina* was generated through selfing of the reference strain 98AG31 (which genome sequence is available) on larch plants, the alternate host of the poplar rust fungus. The progeny's meiotic origin was validated through a segregation analysis of 115 offspring with 14 polymorphic microsatellite markers, of which 12 segregated in the expected 1:2:1 Mendelian ratio. A microsatellite-based linkage disequilibrium analysis allowed us to identify one potential linkage group comprising two scaffolds. The whole genome of a subset of 47 offspring was resequenced using the Illumina HiSeq 2000 technology at a mean sequencing depth of 6X. The reads were mapped onto the reference genome of the parental strain and 144,566 SNPs were identified across the genome. Analysis of distribution and polymorphism of the SNPs along the genome led to the identification of 2580 recombination blocks. A second linkage disequilibrium analysis, using the recombination blocks as markers, allowed us to group 81 scaffolds into 23 potential linkage groups. These preliminary results showed that a high-density linkage map could be constructed by using high-quality SNPs based on low-coverage resequencing of a larger number of *M. larici-populina* offspring.

1. Introduction

Poplar is an important product for the wood industry worldwide (Heilman, 1999) and its contribution to energy systems has increased recently (Covarelli et al., 2013). Poplar rust, caused by the pathogenic fungus *Melampsora larici-populina* (Basidiomycota, Pucciniales), is the main phytosanitary constraint for commercial poplar cultivation in Europe and other parts of the world (Gérard et al., 2006; Barrès et al., 2008). In the last 50 years many rust-resistant cultivars were bred and released, but all the qualitative resistance genes (i.e. major resistance genes) released were overcome by pathogen evolution within a short period (Xhaard et al., 2011). Qualitative resistance is particularly subject to breakdown by pathogen evolution for perennial hosts, such as poplar trees, because of the wide inequality between the pathogen's rapid generation time and the time needed to deploy new host varieties (Xu, 2012). Knowledge of the genetic determinism of the virulence factors leading to resistance breakdown would be beneficial both from an academic perspective (e.g. to decipher interactions between avirulence loci and resistance loci, (Dangl et al., 2013)) and from an applied perspective (e.g., for determining strategies of spatiotemporal management of qualitative resistance, (McDonald and Linde, 2002)).

The failure of qualitative resistance genes to control poplar rust has prompted poplar breeders to search for quantitative resistance, which is supposed to be more durable (Jorge et al., 2005; Brun et al., 2010; Fabre et al., 2012). Durable resistance is defined as a resistance remaining effective in a cultivar for a long period of time during its widespread cultivation (Johnson, 1979). Nevertheless quantitative resistance can also be challenged by the evolution of aggressiveness, which is the quantitative component of pathogenicity, determined by several disease-associated traits (Andrivon et al., 2007; Pariaud et al., 2009; Dowkiw et al., 2010). Thus it is of primary importance to assess the potential evolution of aggressiveness traits in the pathogen and the potential trade-offs between these traits (Lannou, 2012). Knowledge of the genetic determinism of such aggressiveness life history traits (latency period, infection efficiency, sporulation capacity, lesion size, etc) would be useful in order to guide breeding strategies towards durable resistance. To this aim, a genetic linkage map of the poplar rust fungus would allow examination of the genetic architecture of those traits and mapping the QTL related to aggressiveness.

The genome of *M. larici-populina* was shotgun sequenced at a coverage of ~6.9X, assembled and annotated recently by the US Department of Energy Joint Genome Institute and an international consortium (Duplessis et al., 2011). The 101.1 Mbp genome is assembled into 462 scaffolds and contains a total of 16,399 predicted gene models. About half of the genome is contained in 27 scaffolds all at least 1.1 Mbp in length. Therefore, the construction of a genetic map of *M. larici-populina* and its integration with the physical map would enable us to identify a chromosomal order of scaffolds and provide a valuable resource for fine mapping and positional cloning of QTL associated with aggressiveness traits (Hahn et al., 2014).

Compared to plant and animal models, there has been much less interest in genetic mapping for fungi (for a review, see Foulongne-Oriol (2012)) and Oomycetes (Sicard et al., 2003). Among Ascomycota, genetic linkage maps have been developed for some major pathogens of economically important crops, such as *Blumeria graminis* (Pedersen et al., 2002), *Magnaporthe oryzae* (Kaye et al., 2003), *Leptosphaeria maculans* (Cozijnsen et al., 2000), *Mycosphaerella graminicola* (Kema et al., 2002), *Mycosphaerella fijiensis* (Manzo-Sánchez et al., 2008), and *Venturia inaequalis* (Broggini et al., 2011). Among Basidiomycota, most of the mapping efforts have been devoted to economically important edible mushrooms, such as *Agaricus bisporus* (Foulongne-Oriol et al., 2010), *Lentinula edodes* (Terashima et al., 2002), and *Pleurotus ostreatus* (Larraya et al., 2000), and some model ectomycorrhizal fungi (Doudrick et al., 1995; Labbé et al., 2008). Obtaining controlled crosses (either selfed or outcrossed) is even more challenging for rust fungi (Pucciniales), since (*i*) they are obligate biotrophs, which precludes crosses to be made *in vitro*, and (*ii*) most of the rust fungi are heteroecious, thus the completion of sexual crosses requires two non-related host plants (Leonard and Szabo, 2005). As a result there are very few reports of genetic linkage maps in rust fungi. To our knowledge, partial genetic maps have been built only for the fusiform rust fungus, *Cronartium quercuum* f. sp. *fusiforme* (Doudrick et al., 1993; Kubisiak et al., 2011), and the wheat stem rust fungus, *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* (Zambino et al., 2000). A genetic linkage map is also being constructed for the wheat leaf rust fungus, *Puccinia triticina* (Duplessis et al., 2014).

Genetic mapping is primarily based on the genotyping of a large number of individuals from a controlled cross, using PCR-based (SSR, AFLP, SNP, etc) molecular markers. For a genetic map of sufficient density, the development of a large number of

markers and the genotyping of a large number of progeny represent significant costs, both in time and in money. With the advent of next generation sequencing (NGS) techniques, combined with genome-wide marker discovery techniques such as reduced-representation sequencing (RRS), restriction-site-associated DNA sequencing (RAD-seq) or multiplexed shotgun genotyping (MSG), it is now possible to overcome the technical and financial constraints of genetic mapping (Davey et al., 2011). New technologies for high throughput sequencing, such as Illumina sequencing, open the way to new genotyping and genetic mapping strategies based on re-sequencing at low coverage of a large number of progeny (Huang et al., 2009; Xie et al., 2010). In addition, tagging techniques for multiplex sequencing of numerous individuals on a single Illumina sequencing lane further reduces the cost of re-sequencing (Cronn et al., 2008). This new approach has been successfully applied to build a ultra-high density genetic map of rice, through sequencing of 150 Recombinant Inbred Lines (RILs) to a depth of 0.02X (Huang et al., 2009). This new methodology was found about 20 times faster in data collection, and the linkage map obtained was 35 times more precise in recombination breakpoint determination, compared to the use of PCR-based markers. The accuracy of QTL detection was also improved (Huang et al., 2009; Xie et al., 2010; Yu et al., 2011). This new genetic mapping strategy has been recently applied to plants (Huang et al., 2012; Zhou et al., 2014) and animals (Andolfatto et al., 2011; You et al., 2013). It was also used for the first time to build a high-density sequence-based genetic linkage map for a fungus, the Shiitake mushroom, *Lentinula edodes* (Au et al., 2013). This example provides a proof-of-principle that low-coverage resequencing could allow rapid genotyping of basidiospore-derived progenies, thus facilitating the construction of high-density genetic linkage maps of Basidiomycota for QTL mapping (e.g. of aggressiveness traits in the case of phytopathogenic fungi) and improvement of whole-genome assembly.

The purpose of this work was (*i*) to generate S1 progeny of *M. larici-populina* through selfing of the reference strain 98AG31 on larch plants; (*ii*) to characterize the S1 progeny through a segregation analysis of polymorphic microsatellite loci; (*iii*) to test for linkage disequilibrium between these loci in the progeny; and (*iv*) to perform a pilot study of genetic mapping through whole-genome resequencing of a subset of 47 S1 individuals.

2. Materials and Methods

2.1. Production of the *M. larici-populina* S1 progeny

Since *M. larici-populina* is a heteroecious and macrocyclic rust fungus, the completion of the life cycle requires two unrelated host plants, poplar and larch (for detailed life cycles of *Melampsora* spp. and *M. larici-populina* see Vialle et al. (2011) and Hacquard et al. (2011), respectively).

2.1.1. Production of *M. larici-populina* telia

Poplar plants (*Populus deltoides* x *P. nigra* 'Robusta') were grown from dormant cuttings in 5-l pots containing a sand-peat (50:50, v/v) mixture, with an initial fertilization of 3.5 $g.l^{-1}$ $CaCO_3$ and 6 $g.l^{-1}$ of slow release 13:13:13 N:P:K fertilizer (Nutricote T 100). The plants were grown for four months (June to September) in a non-heated greenhouse with natural photoperiod and were watered daily with deionized water. After four months, young trees were about 1.2 m high and exhibited 25-30 fully expanded leaves. In late September, 20 poplar plants were spray-inoculated by *M. larici-populina* 98AG31. A urediniospore suspension (40,000 $urediniospores.ml^{-1}$) was sprayed (ca. 1.5 ml per leaf) on the abaxial (lower) surface of each fully expanded leaf with a fine atomization paint sprayer (Pico-Bel, Wagner, Germany). The inoculated plants were maintained under plastic bags overnight in order to ensure 100% relative humidity during the first steps of the infection process (Pinon et al., 2006). After one day, the plastic bags were removed and replaced by bags made of cotton fine mesh cloth (porosity < 20 µm), in order to avoid dissemination of rust urediniospores in the greenhouse. The plants were maintained in the non-heated greenhouse throughout autumn (September-December) in order to induce the formation of telia during autumnal senescence of the plants. They were visually inspected every week to check the formation of uredinia and subsequently telia on the leaves (Hacquard et al., 2013). After three months, the fallen poplar leaves were collected. Leaves bearing telia were placed in 50 x 20 cm bags made of 1 cm plastic mesh. The bags were allowed to sit on the soil outdoors during a continental European winter (December-February) in order to break teliospore dormancy through natural alternation of freezing/thawing and wetting/drying (Leonard and Szabo, 2005). Starting in February, one leaf was sampled every week to assess whether teliospores would germinate at 19 ± 1°C (see below). Once teliospore dormancy was broken (2-3 months), poplar leaves were collected and stored in a refrigerator (7 ± 1°C) until used for larch inoculation.

2.1.2. Inoculation of larch plants

Larch (*Larix decidua*) seedlings were grown in spring in small (8 x 12 x 5 cm) plastic containers in a greenhouse. When they were 5 to 8 cm tall, larch plants were inoculated with *M. larici-populina* basidiospores. For this, poplar leaves bearing telia were soaked in tap water for 6 hrs, and then incubated at 19 ± 1°C, adaxial (upper) surface uppermost, on wet filter paper in large (24 x 24 cm) Petri dishes. After 24 hrs, the production of basidia and basidiospores on the poplar leaves was checked under a stereomicroscope. Leaves producing large quantities of basidiospores were placed 5 cm over larch seedlings for one day, in large (30 x 20 x 15 cm) transparent plastic boxes (Curver). After one day, the poplar leaves were withdrawn, and the larch seedlings were maintained in the plastic boxes in a growth chamber (19 ±1°C, photoperiod 16/8 hrs) for 4-5 weeks. The larch plants were visually inspected every day to check the formation of pycnia, i.e. the haploid stage of the rust fungus, and subsequently aecia on the larch needles. Pycnia were not manually crossed, but spermatization of pycnia occurred naturally, likely through contacts between larch needles, or through the presence of small flies (dark-winged fungus gnats, Sciaridae, Diptera) that thrive in the larch seedling substratum.

2.1.3. Production of urediniospores of the offspring

Larch needles bearing individual aecia were harvested every two days, and then aeciospores from each single aecium (i.e. S1 individual) were inoculated onto one 12-mm-diameter poplar leaf disc (*Populus deltoides* x *P. nigra* 'Robusta') as previously described (Husson et al., 2013). After 8-10 days incubation, the sporulating leaf discs were used to inoculate 4-5 entire poplar leaves as previously described (Husson et al., 2013), in order to obtain 50-100 mg of clonal urediniospores per S1 individual for genomic DNA extraction.

2.2. Genetic analysis

2.2.1. Genotyping of the offspring

In order to avoid any bias in segregation and linkage disequilibrium analyses, the genetic purity of 138 of the offspring was verified twice through genotyping with a set of 25 polymorphic microsatellite loci specific to *M. larici-populina*: MLP12 (Barrès et al., 2006), MLP49, MLP50, MLP54, MLP55, MLP56, MLP57, MLP58, MLP59, MLP66, MLP68,

MLP71, MLP73, MLP77, MLP82, MLP83, MLP87, MLP91, MLP92, MLP93, MLP94, MLP95, MLP96, MLP97, and MLP100 (Xhaard et al., 2009; Xhaard et al., 2011). The first verification was performed on the poplar leaf disc inoculated with aeciospores from larch, in order to check the presence of a unique genotype in each S1 individual. The second verification was performed on the urediniospores after multiplication on poplar leaves, in order to detect any contamination from a non-related rust isolate. DNA was extracted from infected poplar leaf discs and from urediniospores using the BioSprint 96 DNA plant kit used in combination with the BioSprint automated workstation (Qiagen), as previously described (Barrès et al., 2008). Microsatellite loci amplification and fragment analysis were performed as previously described (Xhaard et al., 2011).

2.2.2. Segregation and linkage disequilibrium analyses

Segregation and linkage disequilibrium analyses were performed on 115 genetically pure S1 individuals, using the 14 microsatellite loci (out of the 25), which are heterozygous in the parental strain 98AG31 (Table 1). According to the Mendelian laws, loci which are homozygous in the parental strain are not expected to segregate in the progeny, whereas a 1 (homozygous 1) : 2 (heterozygous) : 1 (homozygous 2) segregation is expected for loci which are heterozygous in the parental strain. Chi-squared tests with a significance level of 0.05 were performed to test whether the observed segregation deviated from the expected ratio.

Linkage disequilibrium between all pairs of loci was tested using Fisher's exact test procedure (Garnier-Gere and Dillmann, 1992) implemented in GENEPOP on the Web (http://genepop.curtin.edu.au) (Rousset, 2008) with the following parameters of the Markov chain: 2000 dememorization steps, 250 batches, and 2000 iterations per batch. To adjust the resulting *P*-value distribution for multiple tests, we used the false discovery rate (FDR) procedure (Benjamini and Yekutieli, 2001). The resulting adjusted *P*-values are called *Q*-values. This procedure is implemented in the R package QVALUE (Storey and Tibshirani, 2003).

2.3. Genomic analysis

2.3.1. Genomic DNA extraction

Genomic DNA was extracted from a subset of 47 genetically pure S1 individuals of *M. larici-populina*, plus the parental strain 98AG31. For each individual, 10 aliquots of 5 mg

Table 1: Characteristics and genome position of the 14 microsatellite loci, polymorphic in strain 98AG31, used for segregation and linkage disequilibrium analyses in *M. larici-populina*. Scaffold/sequence position is given according to the *M. larici-populina* genome sequence v1.0 (http://genome.jgi-psf.org/Mellp1) retrived on April 1, 2014. NA, not available

Locus name	Repeat motif	Scaffold No.	Position (bp)	Scaffold length (bp)
MLP49	(GAT)18	37	803,561	929,451
MLP54	(ATG)14	8	807,623	2,004,758
MLP55	(ATC)15	1	2,804,879	4,071,029
MLP56	(AAC)7	5	2,550,898	2,603,268
MLP58	(AAG)12	3	728,772	3,255,379
MLP59	(ATC)13	8	1,544,938	2,004,758
MLP73	(AC)14	38	809,210	903,405
MLP77	(AT)10	15	629,856	1,649,323
MLP82	(TAC)10	15	1,199,792	1,649,323
MLP87	(TGT)8	11	834,087	1,841,903
MLP91	(GTT)10	40	444,668	887,115
MLP92	(TTG)11	26	241,476	1,146,214
MLP94	(TTC)10	1	236,499	4,071,029
MLP12	(AAG)10	NA	NA	NA

of urediniospores were placed in 2 ml Eppendorf tube, with two 3-mm-diameter glass beads and twenty 1-mm-diameter glass beads. The spores were homogenized for 1 minute at 30 Hz using a MM 200 Mixer Mill (TissueLyser, Retsch, Qiagen) and then suspended in 1 ml of hot (65°C) CTAB buffer (CTAB 2%, Tris pH9 0.1 M, NaCl 1.4 M, EDTA 0.02 M, ß-mercaptoethanol 0.2%). The content of the 10 Eppendorf tubes was pooled in a 50 ml Falcon tube. After carefully mixing by inverting, the tubes were incubated for 30 min at 65°C. One volume of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (50:48:2) (Euromedex) was added to the 50 ml Falcon tube. The content of the tube was carefully mixed and then centrifuged at 8,000 rpm for 10 min. The aqueous phase was transferred to a new tube and one volume of chloroform was added. The content of the tube was carefully mixed and then centrifuged at 8,000 rpm for 10 min. The aqueous phase was transferred to a new tube. RNA was digested with 100 µl of RNaseA (Fermentas, 10 $\mu g.\mu l^{-1}$) for 30 min at 37°C. One volume of chloroform was added and the tubes were centrifuged at 8,000 rpm for 10 min. The aqueous phase was recovered, distributed as aliquots of 800 µl in Eppendorf tubes, and 600 µl of isopropanol was added to each tube. Then the tubes were centrifuged at 14,000 rpm for 30 min at 4°C. The supernatant was removed by pouring liquid from the tube, and the DNA pellets were washed with 200 µl of 70% ethanol. The tubes were centrifuged at 14,000 rpm for 10 min at 4°C and washed again with 70 µl of 70% ethanol. The supernatant was removed by pipetting liquid from the tubes, the pellets were dried for 30 minutes under a fume hood, and then resuspended in TE 1X buffer (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0). Quality and quantity of recovered high molecular weight DNA was assessed by electrophoresis on agarose gel and with a QuBit fluorometer (Life Technologies).

2.3.2. Whole-genome resequencing

Genome DNA re-sequencing was performed by IntegraGen (Evry, France). Forty-eight genomic DNA libraries were prepared using TruSeq DNA sample preparation kit (v3) followed by paired-end 100 bases massively parallel sequencing on Illumina HiSeq 2000. Briefly, 3 µg of each sample of genomic DNA were fragmented by sonication and purified to yield fragments of 400-500 bp. Paired-end adaptor oligonucleotides from Illumina were ligated on repaired A-tailed DNA fragments, then purified and enriched by PCR cycles. Each library was quantified by qPCR before equimolar pooling of the 48 libraries. The 48-plex pool was sequenced on one flowcell lane of Illumina HiSeq 2000 platform as paired-end 100 bp

reads. Image analysis and base calling were performed using Illumina Real Time Analysis (RTA) Pipeline with default parameters.

2.3.3. Mapping and SNP detection

Mapping was performed with BWA version 0.6.2 (Li and Durbin, 2009). Version 1.0 of the *M. larici-populina* 98AG31 genome assembly (http://genome.jgi-psf.org/Mellp1) was used as reference in index using the IS algorithm. The reference genome contains 462 scaffolds and a total of 101,129,028 bp. Read alignment was performed using default options of the *aln* and *sampe* commands except maximum insert size (750 bp). Alignments were stored in the pileup format using SAMtools version 0.1.18 (Li et al., 2009).

We filtered sites presenting a potential single-nucleotide polymorphism (SNP) using liberal thresholds. All 48 individuals (including the parental strain) were considered jointly for each position, excluding all reads for which the base at this position was called with a quality Phred score lower than 25. We considered sites for which the minority allele (the second in frequency, if more than two) was represented by at least 3 copies, when merging all individuals. It was also required that each of the three genotypes was represented by two individuals each, where individuals were crudely assigned to one of the three genotypes (heterozygote if both alleles were represented, homozygote otherwise). If more than two alleles were observed, only the two most frequent were considered.

2.3.4. Identification of recombination blocks

In order to take into account genotype uncertainty when sequencing depth for a single individual is low, we used an *ad hoc* scoring function to represent the amount of evidence regarding the homozygous/heterozygous status of each site. The function gives a score of 0 (undetermined) if the depth is 0 or 1, positive scores if only one allele is observed and negative scores if two alleles are observed. Overall, scores are bounded by -1 and +1. We fitted the logistic function $c/(1+\exp[-r(x-b)])$, where x is the sequencing depth at a given SNP, to the observed proportion of observed heterozygotes in the 98AG31 parental strain, which is necessarily heterozygous in all true SNP positions. Minimum mean square error estimation yielded $r = 0.51714$, $b = 3.9148$ and $c = 0.98404$. This function was assumed to give the probability of observing a heterozygote if the genotype is truly heterozygous. Since, in our setting, true heterozygotes and true homozygotes are equally likely, we can use the same

function as the probability that a genotype is truly homozygous if it is observed to be homozygous. If a genotype was observed to be homozygous, we used an arbitrary weighting scheme to take into account both depth and allele frequency evenness when considering genotypes observed to be heterozygous. The score was computed as (M/m-1)/200-1 where M and m are the majority and minority allele absolute frequencies, respectively. In addition, the score of each SNP incorporates the scores of neighboring SNPs. Thus, the score of a given position was actually computed as the sum of the score of the focus SNP and the 15 neighboring SNPs on each side, weighted by the distance (a normal distribution with standard deviation 10,000 bp is used for weights, which gives high weights to SNPs about 20,000 kb apart).

A further step of smoothing was performed in order to identify recombination blocks. We assumed that a region of consecutive SNPs with constant heterozygous or homozygous status to be a block that was transmitted without recombination. We defined these blocks as regions of consecutive SNPs for which the score kept the same sign and at least one SNP exhibited an absolute value larger than 0.5. To avoid excessive false positive recombination points, we extended recombination blocks over SNPs with scores of opposite sign provided that they did not exceed |0.2| and up to a SNP with a score of at least |0.2| of the corresponding sign. These blocks represented overlapping regions of the genome with different putative recombination points defined in each individual. We defined a sample-wise set of blocks by dividing the genome in regions based on all putative recombination points. As a result recombination blocks were regions in which no recombination event had taken place.

Next, we generated the phased sequence of the two parental haplotypes of all blocks. We retrieved the majority allele of all SNPs for individuals that were classified as homozygous for the region under consideration. This generated the sequence of all putative homozygotes for each non-recombining region. We generated the maximum-likelihood phylogeny of those sequences using PhyML version 20120412 (Guindon and Gascuel, 2003) using the Jukes and Cantor model of substitution (all other parameters left to defaults). The two alleles should be represented by two deeply diverged clades in the resulting tree. For this reason, we excluded all recombination groups for which there was no internal branch representing at least 90% of the total tree length. This is expected to exclude recombination

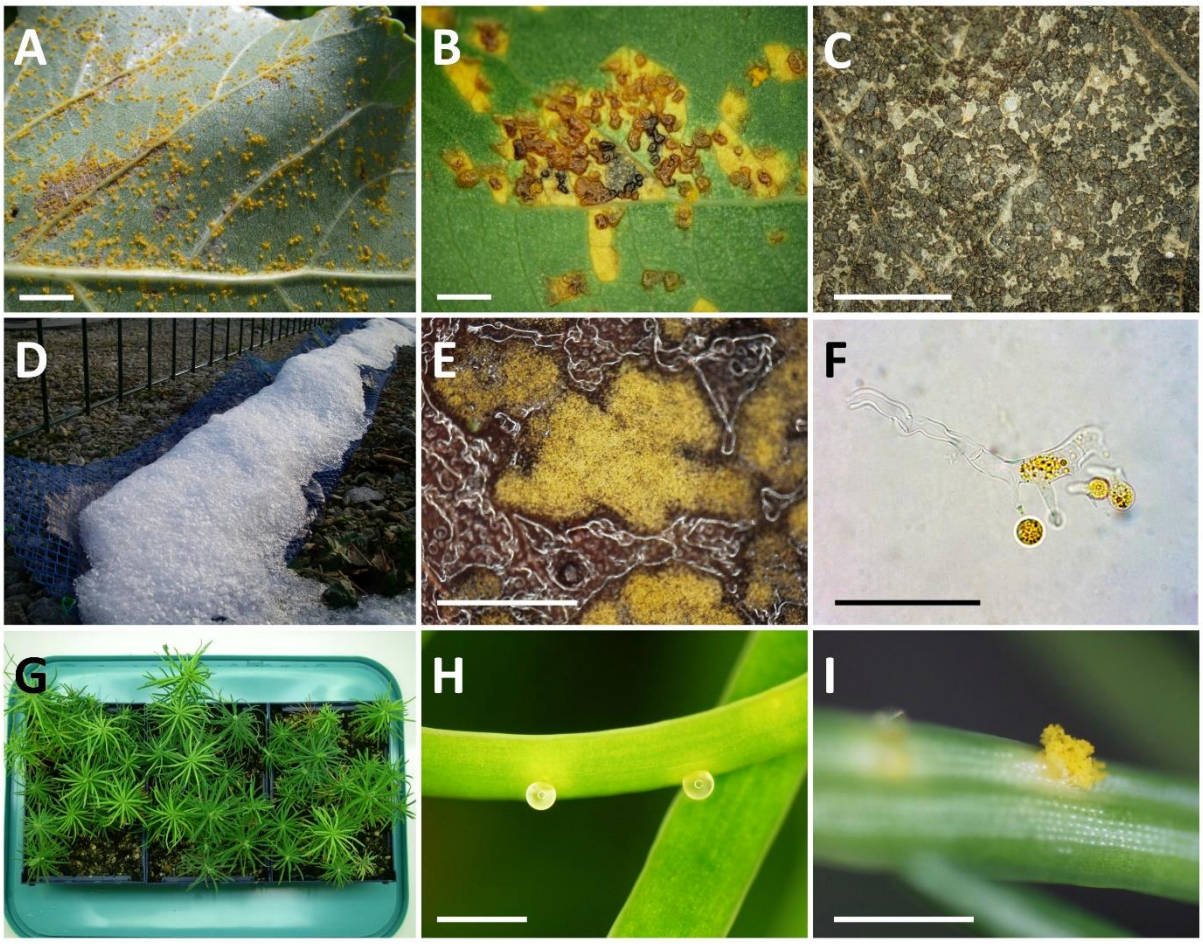


Figure 1: Successive stages of the life cycle observed in the production of the *M. larici-populina* S1 progeny. **A**, inoculated poplar leaf covered with uredinia on the abaxial surface (scale bar 1 cm). **B**, light brown to dark brown telia forming on the adaxial surface of a poplar leaf (scale bar 1 mm). **C**, black mature telia obtained at leaf fall (scale bar 5 mm). **D**, outdoor overwintering of poplar leaves in the plastic mesh bags. **E**, telia producing basidia and basidiospores (scale bar 1 mm). **F**, basidium producing four basidiospores (scale bar 50 µm). **G**, young larch seedlings used for inoculation with basidiospores. **H**, pycnia on the adaxial surface of a larch needle (scale bar 1 mm). **I**, aecium producing aeciospores on the abaxial surface of a larch needle (scale bar 1 mm).

groups that contained undetected recombination events or a large proportion of erroneous data.

For all pairs of recombination blocks, we used *P*-value for Fisher's exact test of independence (based on the 3x3 matrix of the three genotype frequencies at both sites) as a measure of linkage disequilibrium. The *P*-value was not computed if fewer than 10 individuals had non-missing data for both site, or if there was less than one copy of each homozygous genotype and fewer than two copies of each heterozygous genotype (over the two loci).

3. Results

3.1. Production of the *M. larici-populina* S1 progeny

In order to generate the *M. larici-populina* S1 progeny, four-month-old poplar plants were spray-inoculated with *M. larici-populina* strain 98AG31 in a greenhouse. Uredinia appeared on the abaxial surface of the inoculated poplar leaves 8-10 days after inoculation (Figure 1A). Pale brown telia began to appear on the adaxial surface of the leaves 3-4 weeks after inoculation (Figure 1B) and became dark brown and then black during the following weeks, as the leaves became senescent (Figure 1C). In December, almost all the poplar leaves were covered with black telia. After overwintering for two months outside in natural winter conditions (Figure 1D), poplar leaves bearing telia were tested for basidiospores production in laboratory. After water-soaking and incubation on wet filter paper for one day, masses of basidia and basidiospores, resulting from meiosis, were produced on the adaxial surface of the leaves (Figure 1E and 1F). Basidia were used to inoculate larch seedlings. Pycnia appeared on the adaxial surface of larch needles 5-7 days after inoculation (Figure 1H). Spermatization of pycnia by pycniospores of the opposite mating type occurred naturally, resulting in plasmogamy of two haploid cells and formation of a dikaryotic mycelium. The resulting aecia appeared on the abaxial surface of larch needles 10-15 days after inoculation (Figure 1I), and individual aecia representing single selfed progeny were harvested and then multiplied on poplar leaf discs.

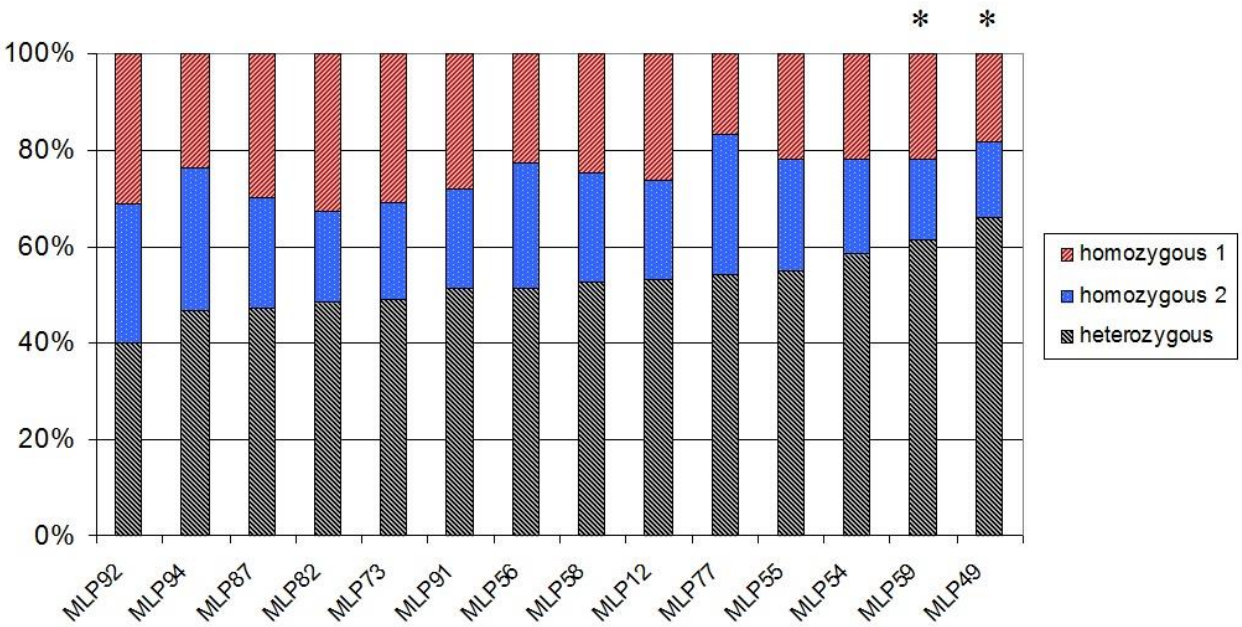


Figure 2: Percentage of individuals in the *M. larici-populina* S1 progeny, which are heterozygous, homozygous1, and homozygous 2 at each of the 14 polymorphic microsatellite loci. Stars denote loci with a significant deviation from the expected 1:2:1 Mendelian segregation for $\alpha = 0.05$.

3.2. Genotyping of the offspring

The genetic purity of 138 of the offspring was verified twice (on initial inoculation onto poplar leaf discs and after 2-3 rounds of multiplication on poplar leaves) through genotyping with a set of 25 polymorphic microsatellite loci specific to *M. larici-populina*. Results of genotyping allowed the detection of two types of contamination that may occur during the offspring production process. On the one hand, 4.3% of the individuals exhibited an "external" contamination, i.e. a contamination of an offspring with a non-related *M. larici-populina* isolate, resulting in the presence of non-parental alleles at one or several microsatellite loci. On the other hand, 12.3% of the individuals exhibited an "internal" contamination, i.e. a mixture of two of the offspring, resulting in the presence of unbalanced peak heights of parental alleles at one or several heterozygous microsatellite loci. Both types of contamination were detected at the first (i.e. poplar leaf disc inoculated with aeciospores from larch) and the second (i.e. urediniospores after multiplication on poplar leaves) verification. Isolates identified as contaminated were deleted from further analyses.

3.3. Segregation analysis

In order to validate the progeny's meiotic origin, a segregation analysis was performed on 115 genetically pure S1 individuals, using the 14 microsatellite loci (out of the 25), which are heterozygous in the parental strain 98AG31. Twelve out of the 14 microsatellite loci exhibited a Mendelian segregation of 2 (heterozygous) : 1 (homozygous 1) : 1 (homozygous 2), as expected (Figure 2). Two loci (MLP59 and MLP49) differed significantly from the expected ratio (P-value = 0.034 and 0.005, respectively), exhibiting an excess of heterozygotes (61.4% and 65.8% of heterozygotes, respectively).

3.4. Linkage disequilibrium analysis

In order to detect pairs of microsatellite loci, which are genetically linked, a linkage disequilibrium analysis was performed between all pairs of microsatellite loci. Two out of the 91 pairwise linkage disequilibrium tests were found significant (Q-value < 0.05) (Table 2). Highly significant linkage disequilibrium was found for MLP77/MLP56 and MLP77/MLP82 pairs, with Q-value < 10^{-4} for both. Therefore, these two pairs of loci are genetically linked

Table 2: Matrix of *Q*-values for all pairwise linkage disequilibrium tests between microsatellite loci. Significant *Q*-values ($Q < 0.05$) are indicated in bold text.

	MLP12	MLP49	MLP54	MLP55	MLP56	MLP58	MLP59	MLP73	MLP77	MLP82	MLP87	MLP94	MLP92
MLP49	0.73544												
MLP54	0.69846	0.73544											
MLP55	0.73544	0.73544	0.73544										
MLP56	0.73544	0.73544	0.73544	0.73544									
MLP58	0.73544	0.34450	0.78528	0.73544	0.73544								
MLP59	0.57010	0.57010	0.73544	0.73544	0.78528	0.38876							
MLP73	0.73544	0.69500	0.73544	0.73544	0.73544	0.78528	0.34450						
MLP77	0.80770	0.73544	0.57010	0.80770	**$< 10^{-4}$**	0.52127	0.52127	0.78670					
MLP82	0.78399	0.73544	0.52127	0.73544	0.73544	0.76627	0.73544	0.76627	**$< 10^{-4}$**				
MLP87	0.73544	0.73544	0.73544	0.69846	0.73544	0.76627	0.78528	0.73544	0.76627	0.76627			
MLP94	0.69846	0.73544	0.39876	0.77008	0.78528	0.73544	0.73544	0.80770	0.80770	0.76627	0.76627		
MLP92	0.73544	0.73544	0.80770	0.73544	0.78527	0.57010	0.44613	0.73544	0.73544	0.34450	0.73544	0.76627	
MLP91	0.73544	0.44613	0.78399	0.58058	0.73544	0.25345	0.30801	0.73544	0.39876	0.39876	0.73544	0.73544	0.73544

pairwise. Conversely, no significant linkage disequilibrium was found for all other pairs of loci, with *Q*-value ranging from 0.254 to 0.808.

3.5. Genome sequencing and mapping

The whole genome of the 47 S1 individuals of *M. larici-populina*, plus the parental strain 98AG31, was resequenced using the Illumina HiSeq 2000 technology. A total of over 40 billions bp were sequenced, with a relatively uneven repartition of sequencing depth per individual (Supplementary Table 1). Over three quarters of reads (268 millions) mapped to the reference genome, leading to an average genome sequencing depth of 265X when considering all individuals, but ranging from 1.3X to 9.9X with most individuals presenting a final genome sequencing depth of about 5 to 7X. Genome sequences were deposited in GenBank under the BioProject ID PRJNA255081 and the SRA accession number SRP044324.

3.6. Detection of SNPs and determination of recombination blocks

Based on the criteria described in Materials and Methods, we identified 144,566 SNPs across the genome. The average density is 1.4 SNP/kb, but exhibits a marked heterogeneity across the genome (see the example in Figure 3 for scaffold 1). Based on a smoothed scoring approach, we identified all potential recombination points and assigned regions to homozygote and heterozygote status (see the example in Figure 4 for scaffold 1). This led to the definition of a total of 3302 recombination blocks in the genome, of which 2580 exhibited two phylogenetically distinct homozygous alleles and were considered robust enough to be analyzed. It can be noted that the recombination blocks may have different sizes, both in terms of number of SNPs included and of physical region covered. The number of SNPs per block ranges from just 1 to 1465 and the length of the corresponding physical region reaches more than half a Mbp (Supplementary Table 2). In total, 140 of the 462 scaffolds contain at least one block (other scaffolds either have no SNP or the recombination block was excluded). Sixty-one have more than 10 blocks, and the three largest scaffolds have over 100 blocks. Each individual appears to be a mixture of homozygous and heterozygous regions as expected, although there appears to be a slight bias towards homozygous regions (Table 3). As expected, the fraction of the genome of the parental strain that is assigned was exclusively

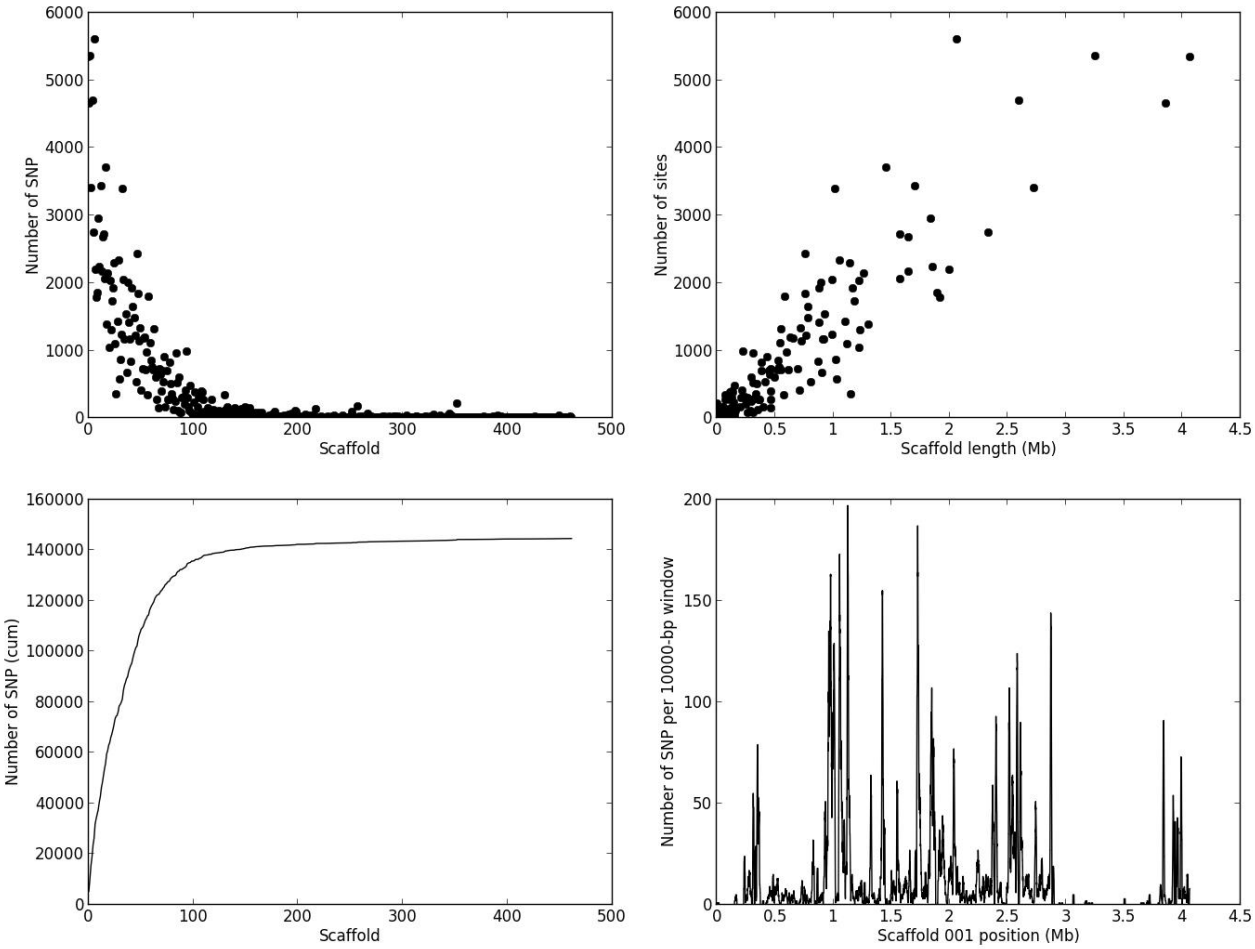


Figure 3: Distribution of SNPs across the *M. larici-populina* genome. The figure presents the number of SNPs detected per scaffold (upper-left panel, the scaffold are sorted by decreasing length in the genome assembly), and the resulting cumulative number of SNPs per scaffold (lower-left panel), the number of SNPs as a function of scaffold length (upper-right panel), and the local density of SNPs in scaffold 1 taken as an example (lower-right panel).

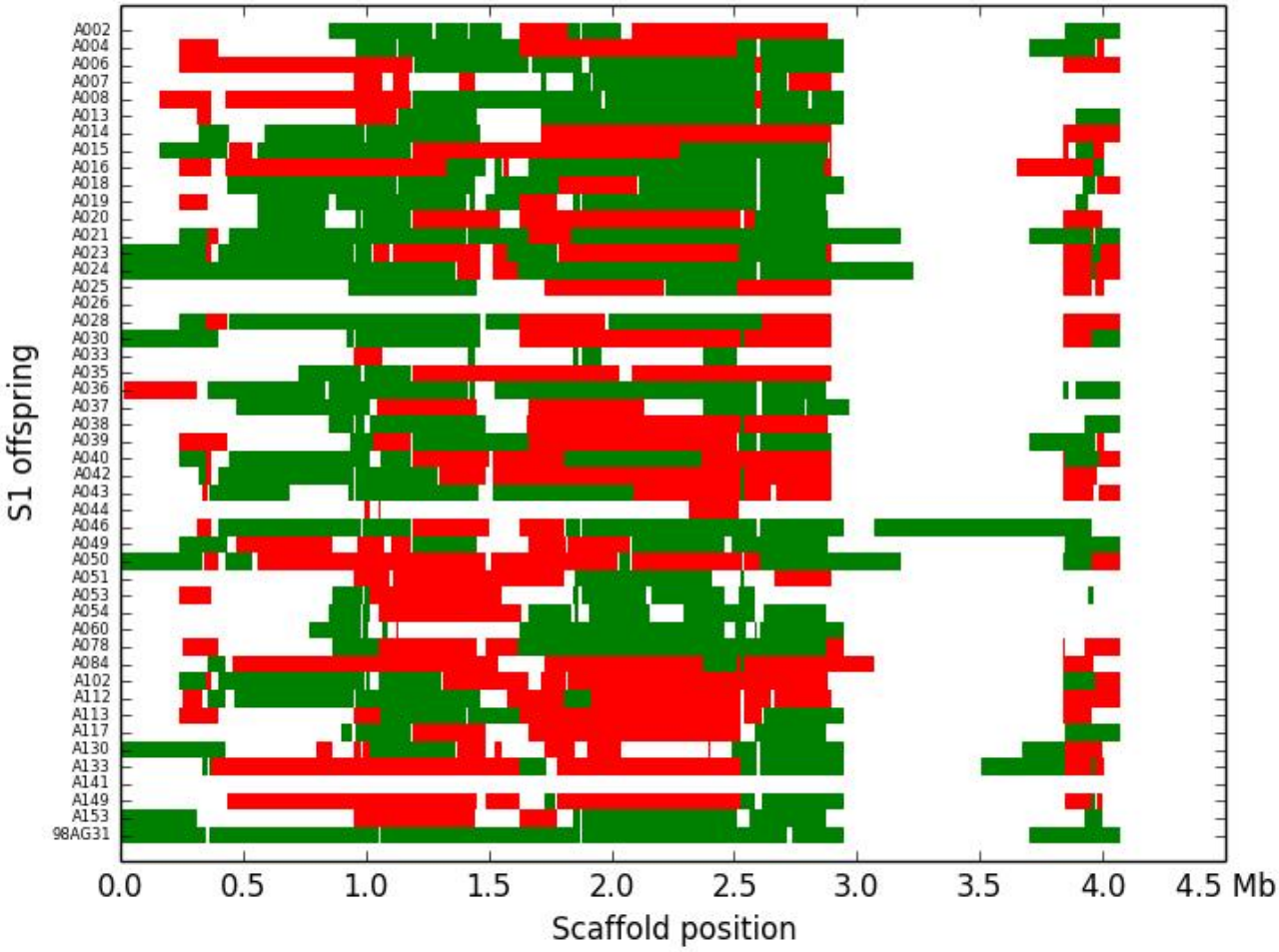


Figure 4: Recombination blocks and assignment of the 48 *M. larici-populina* individuals (including the parental strain) for scaffold 1. Every line represents an S1 individual, the last being the parental strain. The blocks are represented against their physical location along scaffold 1. Green blocks represent heterozygote regions, red blocks represent homozygote regions and white areas represent unassigned regions.

Table 3: Proportion of recombination blocks determined as heterozygous, homozygous, or unassigned for all *M. larici-populina* individuals.

Individual	Homozygous	Heterozygous	Unassigned
98AG31-A002	0.40	0.13	0.47
98AG31-A004	0.48	0.18	0.34
98AG31-A006	0.36	0.22	0.42
98AG31-A007	0.34	0.11	0.55
98AG31-A008	0.34	0.20	0.46
98AG31-A013	0.32	0.20	0.48
98AG31-A014	0.39	0.16	0.45
98AG31-A015	0.43	0.28	0.30
98AG31-A016	0.48	0.24	0.28
98AG31-A018	0.40	0.16	0.44
98AG31-A019	0.41	0.18	0.41
98AG31-A020	0.38	0.15	0.46
98AG31-A021	0.36	0.30	0.33
98AG31-A023	0.40	0.26	0.34
98AG31-A024	0.33	0.28	0.40
98AG31-A025	0.35	0.15	0.50
98AG31-A026	0.02	0.01	0.97
98AG31-A028	0.50	0.26	0.24
98AG31-A030	0.40	0.19	0.41
98AG31-A033	0.25	0.06	0.69
98AG31-A035	0.35	0.16	0.49
98AG31-A036	0.37	0.14	0.49
98AG31-A037	0.35	0.11	0.54
98AG31-A038	0.38	0.14	0.48
98AG31-A039	0.38	0.17	0.45
98AG31-A040	0.47	0.20	0.33
98AG31-A042	0.40	0.24	0.36
98AG31-A043	0.31	0.22	0.47
98AG31-A044	0.06	0.03	0.91
98AG31-A046	0.38	0.16	0.46
98AG31-A049	0.37	0.21	0.43
98AG31-A050	0.45	0.26	0.29
98AG31-A051	0.29	0.13	0.59
98AG31-A053	0.31	0.11	0.59
98AG31-A054	0.38	0.11	0.51
98AG31-A060	0.10	0.16	0.74
98AG31-A078	0.41	0.21	0.38
98AG31-A084	0.46	0.17	0.37
98AG31-A102	0.48	0.16	0.36
98AG31-A112	0.45	0.22	0.33
98AG31-A113	0.38	0.15	0.47
98AG31-A117	0.37	0.14	0.49
98AG31-A130	0.31	0.20	0.48
98AG31-A133	0.40	0.18	0.42
98AG31-A141	0.01	0.01	0.98
98AG31-A149	0.37	0.15	0.49
98AG31-A153	0.35	0.13	0.51
98AG31	0.00	0.27	0.73

heterozygous. For individuals for which sequencing depth was too low, the smoothed scores rarely achieved threshold scores and large fractions of their genome were left unassigned.

3.7. Analysis of genomic linkage disequilibrium

The 2580 recombination blocks were treated each as a diallelic marker with three genotypic states. All 3,326,910 pairwise comparisons were considered, and 3,149,154 Fisher's exact tests were performed (excluding pairs with too much missing data), of which 61,743 involved markers belonging to the same assembly scaffold. The analysis of the decay of linkage disequilibrium against physical distance shows that highly significant (*P*-values less than 10^{-4}) linkage disequilibrium extends to over a distance of 1 Mbp (Figure 5).

The study of pairwise linkage disequilibrium test between all pairs of markers (both within and between assembly scaffolds) allowed us to identify signatures of statistical linkage between different scaffolds (see Figure 6 for a focus on the first 7 scaffolds). A systematic but liberal analysis identified 158 pairs of scaffolds that may follow each other, grouping a total of 81 scaffolds into 23 linkage groups (Supplementary Table 3). Although 381 scaffolds (representing together over 35 Mbp) are left unlinked, the 81 grouped scaffolds contain 66 of the 100 largest scaffolds and represent more than 65 Mbp (65% of the genome). One of these links across scaffolds can be seen between scaffolds 2 and 4 in Figure 6 (second row, fourth column). While most pairs of sites exhibits low levels of linkage (white or blue pixels), a cluster of highly correlated pairs of sites appear at the upper-right corner of this panel, indicating linkage disequilibrium between the beginning of scaffold 2 and the end of scaffold 4.

However, this approach fails to account for signatures of linkage disequilibrium between scaffolds when they do not occur at the end of both scaffolds. A striking but not exceptional example can be seen in Figure 6 between the beginning of scaffold 7 and a region at the beginning of the second third of scaffold 1 (in the reverse orientation). In addition, there is no signature of linkage between the first and second thirds of scaffold 1. This pattern, which suggests that scaffolds are linked internally rather than serially, was found at multiple instances among pairwise comparisons, sometimes with internal connections in both scaffolds (Figures 6 and S1).

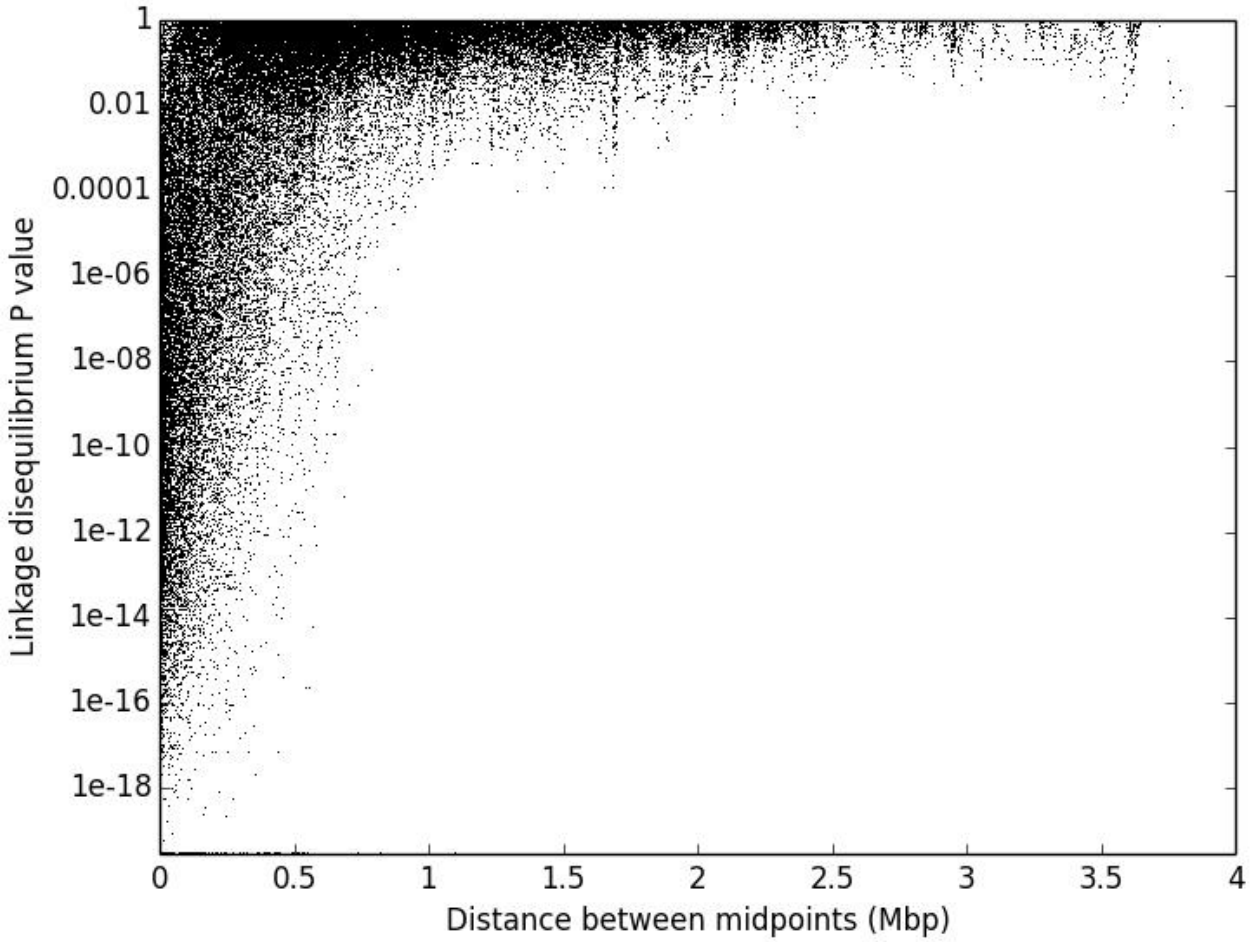


Figure 5: Decay of linkage disequilibrium against physical distance. The value of Fisher's exact test of association between 61,743 pairs of recombination blocks belonging to the same scaffold is represented as a function of the physical distance between block midpoints.

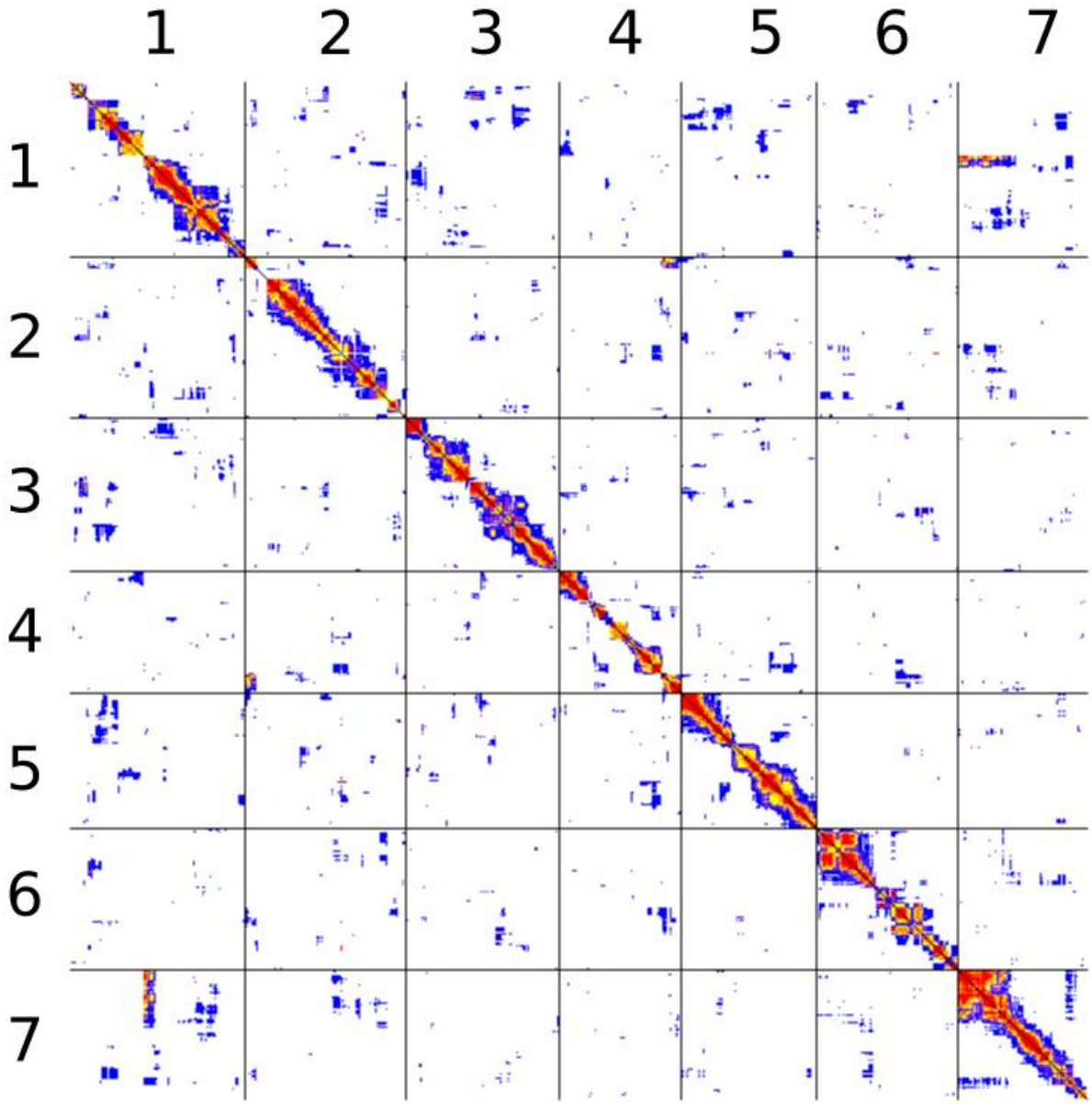


Figure 6: Pairwise linkage disequilibrium between all markers belonging to assembly scaffolds 1 through 7. The figure does not account for physical distance. Black lines separate scaffolds. All pairs are represented twice, above and below the diagonal. Each pair is represented by a single pixel. The color code is based on Fisher's exact test *P*-value: red, $P < 10^{-10}$; orange, $P < 10^{-8}$; yellow, $P < 10^{-6}$; purple, $P < 10^{-4}$; blue, $P < 10^{-2}$; white, larger *P*-values or not computed.

4. Discussion

4.1. Production of the *M. larici-populina* S1 progeny

In this study, we developed a segregating S1 progeny of the poplar rust fungus *M. larici-populina,* through selfing of the reference strain 98AG31 on larch plants. Pioneer work on classical genetics of rust fungi began in the 1930-1940's with the studies of Harold H. Flor on the flax/flax rust pathosystem (Flor, 1935; Flor, 1942). Since *Melampsora lini* is autoecious (i.e. completes its life cycle on a single host plant, flax), the production of F1 and F2 progenies through selfing or outcrossing was easier compared to heteroecious rusts. Nevertheless, early work on genetics of heteroecious cereal rusts also began in the 1940's (Johnson and Newton, 1946). In the present work several difficulties were overcome to manage the life cycle of the poplar rust fungus in controlled conditions. The first obstacle was the break of dormancy of teliospores. Several attempts were made to break dormancy in laboratory conditions with repeated cycles of freezing-thawing and wetting-drying for several months (Zambino et al., 2000), but remained unsuccessful. Thus the "natural overwintering" method (Pei et al., 1999; Leonard and Szabo, 2005) was used instead.

The second difficulty stems from the fact that it is not possible to grow basidiospore-derived haploid mycelium of *M. larici-populina* in vitro in order to genotype a haploid progeny, as can be done with other Basidiomycetes, such as Agaricomycotina (Doudrick et al., 1995; Labbé et al., 2008), and with some rust fungi, such as the fusiform rust fungus (Doudrick et al., 1993). Therefore, we decided to inoculate larch plants, the alternate host, and to genotype aeciospore-derived dikaryotic individuals of *M. larici-populina*.

The third difficulty was the availability of fresh larch needles at just the time that germinating teliospores were available. Several attempts were made to infect detached larch flushing buds produced from 2-year-old larch plants (Pei et al., 1999), but with limited success because the larch needles could not be maintained alive for 2-3 weeks without rotting. The use of larch seedlings has overcome this difficulty.

The fourth difficulty was the feasibility of performing controlled outcrosses with *M. larici-populina* by matching larch needles bearing pycnia derived from different telial sources. Although some authors have obtained outcrossed progenies (Pei et al., 1999), it is technically difficult to obtain single isolated pycnia on larch needles in order to perform

controlled spermatization of individual pycnia derived from one strain with spermatia derived from another strain. Therefore we decided to study a S1 (selfed) progeny obtained through spermatization of pycnia from one telial source (strain 98AG31) with spermatia obtained from the same telial source. One drawback of this strategy is that only loci that are heterozygous in the parental strain segregate in the S1 progeny. Nevertheless, thanks to the low level of inbreeding found in natural *M. larici-populina* populations (Barrès et al., 2008; Xhaard et al., 2011; Xhaard et al., 2012), as many as 144,566 segregating SNPs were observed in the progeny studied, which is largely sufficient for mapping purposes.

4.2. Segregation analysis

Results of the segregation analysis showed that two out of the 14 polymorphic microsatellite loci did significantly depart from the expected 1:2:1 ratio, namely loci MLP49 (located on scaffold 8) and MLP59 (located on scaffold 37). This result can still be explained by chance alone under Mendelian segregation. Applying the Bonferroni correction for multiple testing leads to a significance threshold of 0.0035, so that both loci no longer depart significantly from the expected ratio. Alternatively, a significant excess of heterozygotes may be due to the proximity of these loci to mating type loci. Eleven putative pheromone precursor genes and four pheromone receptor genes, which may be involved in the mating type, were annotated in the *M. larici-populina* genome (Duplessis et al., 2011). However, none of these potential mating type genes were located on scaffolds 8 or 37, where loci MLP49 and MLP59 are located. Considering that the genomic organization of the mating type loci is still unresolved for the poplar rust fungus, we cannot conclude that the mating type loci influence the excess of heterozygotes observed for loci MLP49 and MLP59.

Other forms of selection may cause an excess of heterozygotes, such as overdominant selection. This type of selection is known to occur within host-pathogen interactions (Hughes and Nei, 1988), and may therefore affect our experiment since *M. larici-populina* is an obligate biotroph and can be cultivated only in interaction with its host. Analysis of genome-wide data could help analyze putative signatures of selection. In this first study, however, SNPs obtained through whole-genome sequencing were filtered such as all three genotypes were represented, which could have caused a bias when testing for departure from Mendelian ratios, by excluding sites more often in case of distortion of Mendelian segregation.

4.3. Linkage disequilibrium analyses

Pairwise linkage disequilibrium tests on microsatellite data allowed us to bring to light two pairs of microsatellite loci in genetic linkage. Three different cases were encountered: (*i)* loci known to be physically linked because they are located on the same scaffold and found genetically linked; (*ii*) loci that are not physically linked but found genetically linked; and (*iii*) loci that are not found genetically linked despite being physically linked.

As expected, loci MLP77 (scaffold 15 / 629,856 bp) and MLP82 (scaffold 15 / 1,199,792 bp) were found in significant linkage disequilibrium (Q-value < 10^{-4}), since they are located on the same scaffold at 569,936 bp distance, which proved the efficiency of this method to confirm physical linkage by genetic linkage tests. In addition, locus MLP77 also was found in significant linkage disequilibrium with locus MLP56 (scaffold 5 / 2,550,898 bp), with a Q-value < 10^{-4}, despite located on different scaffolds. Consequently, this pair of loci is genetically linked and the respective scaffolds (scaffold 5 and scaffold 15) should be grouped into a linkage group. Furthermore, since locus MLP56 is located at the end of scaffold 5 and MLP77 is located at first third of scaffold 15, the most likely physical link should be between the end of scaffold 5 and the beginning of scaffold 15. Thus the microsatellite-based linkage disequilibrium analysis allowed us to build one linkage group for a total length of 4,252,591 bp, which accounts for about 4.2% of the total genome length. However, these two scaffolds were not found in the same linkage group as defined from the SNP-based linkage analysis (Supplementary Table 3).

Counter-intuitive results were observed for MLP94 (scaffold 1 / 236,499 bp) / MLP55 (scaffold 1 / 2,804,879 bp) and MLP54 (scaffold 8 / 807,623 bp) / MLP59 (scaffold 8 / 1,544,938 bp) pairs. Although each pair of loci is located on a single scaffold, no linkage disequilibrium was detected (Q-value = 0.77 and 0.74, respectively). Loci MLP94 and MLP55 are located on scaffold 1 at a distance of 2,568,380 bp, which could be far enough to break any genetic linkage. This result is consistent with the SNP-based linkage analysis, which showed that linkage is unlikely to be detected at distances higher than 2 Mbp. However, the situation is different for loci MLP54 and MLP59, which are located on scaffold 8 at a distance of 737,315 bp, and for which no linkage disequilibrium was found despite this relatively small distance. The SNP-based linkage analysis showed that linkage could be still detectable at distances up to 1 Mbp. This loss of linkage disequilibrium could be due to a

recombination hotspot in this specific region (Petes, 2001). Another possible explanation would be misassembly of scaffold 8, resulting in a chimeric scaffold. This latter hypothesis is supported by the linkage disequilibrium discontinuities observed along scaffold 8 (Figure S1).

In a second step, we aimed to adopt a whole-genome perspective on linkage disequilibrium patterns. We used shifts from homozygous to heterozygous genomic regions detected from whole-genome sequencing data to scale genomic data down to 2580 recombination blocks in which all SNPs were non-recombining. These blocks were then treated as markers, allowing us to integrate data from successive SNPs, and to cope with sequencing errors and missing data that could have had a strong impact due to the relatively small sample size and the unequal sequencing depth among individuals. The approach was however limited to genomic regions that were polymorphic within the parental strain, thereby generating informative segregating markers in the offspring. Thanks to the low level of inbreeding and the relatively high level of polymorphism in the *M. larici-populina* populations, the amount of diversity proved to be sufficient for our purpose (more than one SNP per kb on average).

Linkage disequilibrium could be detected between markers located at nearby locations on the same assembly scaffold, but also between markers located on different scaffolds, while many pairs of markers located on the same scaffold exhibited no linkage disequilibrium. We found that, as expected, linkage disequilibrium decays with increasing distance, as shown with microsatellite markers cited earlier, with linkage still detectable at distances up to 1 Mbp. Based on the 2580 SNP-based markers, we detected 23 putative linkage groups, including scaffolds that exhibit signals of linkage disequilibrium with at least one other scaffold of the same group. Interestingly, some of the between-scaffold signatures of linkage disequilibrium obtained with whole-genome sequencing data pointed out potential genome assembly issues. As tentatively evidenced using microsatellite-based analysis, it appears that, at several instances, contiguous genomic regions within a scaffold display discontinuities in genetic linkage. These results point to the fact that most of the largest scaffolds might have to be redefined, i.e. split and rearranged. Due to the large size and high repetitive sequence content (for a fungus), the genome of *M. larici-populina* is not easy to assemble properly, even based on high-depth genome sequencing. It is thus possible that some of the scaffolds are actually chimers.

Noteworthy, the pattern of linkage disequilibrium among these whole-genome markers (23 linkage groups) did not match the observation made using the 14 microsatellite markers. In other words, the linkage group made of scaffold 5 and 15 evidenced by the microsatellite-based linkage analysis is not supported by the SNP-based scaffold merging. This discrepancy can be further explained by a careful look at the pattern of SNP-based linkage along scaffold 15 (Figure S1) and may constitute another example of putative genome misassembly. First, we observed a clear break in statistical linkage between the very beginning of scaffold 15 and the rest of this scaffold. Second, while the very beginning of scaffold 15 is undoubtedly linked with scaffold 12 (which defined linkage group 7, Supplementary Table 3), we observed that the SNP-based markers located just after the genetic break (beginning of the second part of scaffold 15) are statistically linked with markers located at the end of scaffold 5. This observation is fully consistent with the linkage group formed by the microsatellite loci MLP77 (scaffold 15) and MLP56 (scaffold 5). The microsatellite-based analysis thus enables us to extend the linkage group 4 (consisting in scaffold 73 linked to the beginning of scaffold 5) by adding the largest portion of scaffold 15 (linked with the end of scaffold 5).

The linkage disequilibrium analysis performed over a narrow number (14) of microsatellite markers allowed us to define one linkage group in the *M. larici-populina* genome. The subsequent use of 2480 markers integrating the information of almost 150,000 SNPs detected in 47 S1 individuals suggested 23 linkage groups. Both methods have strengths and weaknesses -microsatellites were typed on more offspring individuals, and SNPs are available at higher density along genomes- but they are complementary. While the SNP-based and microsatellite-based linkage analyses appeared inconsistent at first sight, we demonstrated that these two analyses converged to question current genome assembly. These encouraging results demonstrate that an accurate genetic map could be constructed with a larger number of *M. larici-populina* S1 offspring, by using the method for constructing ultra-high-density linkage maps with high-quality SNPs based on low-coverage resequencing, as already described for plants (Huang et al., 2009; Xie et al., 2010) and fungi (Au et al., 2013).

Besides constituting by itself a valuable resource for investigating the architecture of complex traits of *M. larici-populina*, such a genetic map will provide complementary data for completing the genome assembly. The assembly of the genome of *M. larici-populina* has been made difficult by its large size (compared to most fungi) and especially its high content in

repetitive sequences (Duplessis et al., 2011). However the reference genome is an essential resource for genetic approaches as genes of interest might be much more difficult to identify if they are located in repeat-rich and poorly assembled regions. Genetic mapping is an excellent complementary approach, because, unlike physical sequencing, it is much less sensitive to the presence of repetitive sequences (it still is because of the possibility of ambiguous mapping). The integration of genetic mapping data to the current version of the genome assembly of *M. larici-populina* might therefore represent a significant advance.

5. Conflict of interest statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

6. Author contribution

M.P., S.D.M., F.H. and P.F. designed research; M.P., S.D.M., A.A., J.P., and P.F. performed research; M.P., S.D.M., F.H. and P.F. analyzed data; and M.P., S.D.M., F.H., S.D. and P.F. wrote the paper.

7. Acknowledgements

We are grateful to Mathilde Chertier for her help in genotyping the offspring and DNA extractions, to Bénédicte Fabre for her help in the production of poplar plants, and to Katherine J. Hayden and two anonymous reviewers for their helpful comments. This work was supported by grants from the French National Research Agency (ANR-12-ADAP-0009, GANDALF project; ANR-13-BSV7-0011, FunFit project) and from INRA (EFPA innovative project). The UMR IAM is supported by a grant from the French National Research Agency (ANR-11-LABX-0002-01, Laboratory of Excellence ARBRE). M. Pernaci was supported by a PhD fellowship from the French Ministry of Education and Research (MESR).

8. References

Andolfatto, P., Davison, D., Erezyilmaz, D., Hu, T.T., Mast, J., Sunayama-Morita, T., and Stern, D.L. (2011). Multiplexed shotgun genotyping for rapid and efficient genetic mapping. *Genome Res* 21**,** 610-617. doi: 10.1101/gr.115402.110.

Andrivon, D., Pilet, F., Montarry, J., Hafidi, M., Corbière, R., Achbani, E.H., Pellé, R., and Ellissèche, D. (2007). Adaptation of *Phytophthora infestans* to partial resistance in potato: Evidence from French and Moroccan populations. *Phytopathology* 97**,** 338-343. doi: 10.1094/phyto-97-3-0338.

Au, C., Cheung, M., Wong, M., Chu, A.K.K., Law, P.T.W., and Kwan, H. (2013). Rapid genotyping by low-coverage resequencing to construct genetic linkage maps of fungi: a case study in *Lentinula edodes*. *BMC Research Notes* 6**,** 307. doi: 10.1186/1756-0500-6-307.

Barrès, B., Dutech, C., Andrieux, A., Caron, H., Pinon, J., and Frey, P. (2006). Isolation and characterization of 15 microsatellite loci in the poplar rust fungus, *Melampsora larici-populina*, and cross-amplification in related species. *Molecular Ecology Notes* 6**,** 60-64. doi: 10.1111/j.1471-8286.2005.01137.x.

Barrès, B., Halkett, F., Dutech, C., Andrieux, A., Pinon, J., and Frey, P. (2008). Genetic structure of the poplar rust fungus *Melampsora larici-populina*: Evidence for isolation by distance in Europe and recent founder effects overseas. *Infection, Genetics and Evolution* 8**,** 577-587. doi: 10.1016/j.meegid.2008.04.005.

Benjamini, Y., and Yekutieli, D. (2001). The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. *Annals of Statistics* 29**,** 1165-1188.

Broggini, G.a.L., Bus, V.G.M., Parravicini, G., Kumar, S., Groenwold, R., and Gessler, C. (2011). Genetic mapping of 14 avirulence genes in an EU-B04 x 1639 progeny of *Venturia inaequalis*. *Fungal Genetics and Biology* 48**,** 166-176. doi: 10.1016/j.fgb.2010.09.001.

Brun, H., Chevre, A.M., Fitt, B.D.L., Powers, S., Besnard, A.L., Ermel, M., Huteau, V., Marquer, B., Eber, F., Renard, M., and Andrivon, D. (2010). Quantitative resistance increases the durability of qualitative resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *New Phytologist* 185**,** 285-299. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.03049.x.

Covarelli, L., Beccari, G., Tosi, L., Fabre, B., and Frey, P. (2013). Three-year investigations on leaf rust of poplar cultivated for biomass production in Umbria, Central Italy. *Biomass and Bioenergy* 49**,** 315-322. doi: 10.1016/j.biombioe.2012.12.032.

Cozijnsen, A.J., Popa, K.M., Purwantara, A., Rolls, B.D., and Howlett, B.J. (2000). Genome analysis of the plant pathogenic ascomycete *Leptosphaeria maculans*; mapping mating type and host specificity loci. *Molecular Plant Pathology* 1**,** 293-302. doi: 10.1046/j.1364-3703.2000.00033.x.

Cronn, R., Liston, A., Parks, M., Gernandt, D.S., Shen, R., and Mockler, T. (2008). Multiplex sequencing of plant chloroplast genomes using Solexa sequencing-by-synthesis technology. *Nucleic Acids Research* 36**,** e122. doi: 10.1093/nar/gkn502.

Dangl, J.L., Horvath, D.M., and Staskawicz, B.J. (2013). Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. *Science* 341**,** 746-751. doi: 10.1126/science.1236011.

Davey, J.W., Hohenlohe, P.A., Etter, P.D., Boone, J.Q., Catchen, J.M., and Blaxter, M.L. (2011). Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nat Rev Genet* 12**,** 499-510. doi: 10.1038/nrg3012.

Doudrick, R., Nelson, C., and Nance, W. (1993). Genetic analysis of a single urediniospore culture of *Cronartium quercuum* f. sp. *fusiforme*, using random amplified polymorphic DNA markers. *Mycologia* 85**,** 902-911.

Doudrick, R.L., Raffle, V.L., Nelson, C.D., and Furnier, G.R. (1995). Genetic analysis of homokaryons from a basidiome of *Laccaria bicolor* using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Mycological Research* 99**,** 1361-1366. doi: 10.1016/S0953-7562(09)81222-7.

Dowkiw, A., Voisin, E., and Bastien, C. (2010). Potential of Eurasian poplar rust to overcome a major quantitative resistance factor. *Plant Pathology* 59**,** 523-534. doi: 10.1111/j.1365-3059.2010.02277.x.

Duplessis, S., Bakkeren, G., and Hamelin, R. (2014). "Advancing knowledge on biology of rust fungi through genomics," in *Advances in Botanical Research*, ed. F.M. Martin. (Oxford: Academic Press), 173-209.

Duplessis, S., Cuomo, C.A., Lin, Y.-C., Aerts, A., Tisserant, E., Veneault-Fourrey, C., Joly, D.L., Hacquard, S., Amselem, J., Cantarel, B.L., Chiu, R., Coutinho, P.M., Feau, N., Field, M., Frey, P., Gelhaye, E., Goldberg, J., Grabherr, M.G., Kodira, C.D., Kohler,

A., Kües, U., Lindquist, E.A., Lucas, S.M., Mago, R., Mauceli, E., Morin, E., Murat, C., Pangilinan, J.L., Park, R., Pearson, M., Quesneville, H., Rouhier, N., Sakthikumar, S., Salamov, A.A., Schmutz, J., Selles, B., Shapiro, H., Tanguay, P., Tuskan, G.A., Henrissat, B., Van De Peer, Y., Rouzé, P., Ellis, J.G., Dodds, P.N., Schein, J.E., Zhong, S., Hamelin, R.C., Grigoriev, I.V., Szabo, L.J., and Martin, F. (2011). Obligate biotrophy features unraveled by the genomic analysis of rust fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108**,** 9166-9171. doi: 10.1073/pnas.1019315108.

Fabre, F., Rousseau, E., Mailleret, L., and Moury, B. (2012). Durable strategies to deploy plant resistance in agricultural landscapes. *New Phytologist* 193**,** 1064-1075. doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.04019.x.

Flor, H. (1942). Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathology* 32**,** 653-669.

Flor, H.H. (1935). Physiologic specialization of *Melampsora lini* on *Linum usitatissimum*. *Journal of Agricultural Research* 51**,** 819-837.

Foulongne-Oriol, M. (2012). Genetic linkage mapping in fungi: current state, applications, and future trends. *Applied Microbiology and Biotechnology* 95**,** 891-904. doi: 10.1007/s00253-012-4228-4.

Foulongne-Oriol, M., Spataro, C., Cathalot, V., Monllor, S., and Savoie, J.-M. (2010). An expanded genetic linkage map of an intervarietal *Agaricus bisporus* var. *bisporus* x *A. bisporus* var. *burnettii* hybrid based on AFLP, SSR and CAPS markers sheds light on the recombination behaviour of the species. *Fungal Genetics and Biology* 47**,** 226-236. doi: 10.1016/j.fgb.2009.12.003.

Garnier-Gere, P., and Dillmann, C. (1992). A computer program for testing pairwise linkage disequilibria in subdivided populations. *Journal of Heredity* 83**,** 239.

Gérard, P.R., Husson, C., Pinon, J., and Frey, P. (2006). Comparison of genetic and virulence diversity of *Melampsora larici-populina* populations on wild and cultivated poplar and influence of the alternate host. *Phytopathology* 96**,** 1027-1036. doi: 10.1094/phyto-96-1027.

Guindon, S., and Gascuel, O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52**,** 696-704. doi: 10.1080/10635150390235520.

Hacquard, S., Delaruelle, C., Frey, P., Tisserant, E., Kohler, A., and Duplessis, S. (2013). Transcriptome analysis of poplar rust telia reveals overwintering adaptation and tightly coordinated karyogamy and meiosis processes. *Frontiers in Plant Science* 4**,** 456. doi: 10.3389/fpls.2013.00456.

Hacquard, S., Petre, B., Frey, P., Hecker, A., Rouhier, N., and Duplessis, S. (2011). The Poplar-Poplar rust interaction: Insights from genomics and transcriptomics. *Journal of Pathogens* 2011**,** 716041. doi: 10.4061/2011/716041.

Hahn, M.W., Zhang, S.V., and Moyle, L.C. (2014). Sequencing, assembling, and correcting draft genomes using recombinant populations. *G3: Genes|Genomes|Genetics* 4**,** 669-679. doi: 10.1534/g3.114.010264.

Heilman, P.E. (1999). Planted forests: poplars. *New Forests* 17**,** 89-93. doi: 10.1023/a:1006515204167.

Huang, X., Feng, Q., Qian, Q., Zhao, Q., Wang, L., Wang, A., Guan, J., Fan, D., Weng, Q., Huang, T., Dong, G., Sang, T., and Han, B. (2009). High-throughput genotyping by whole-genome resequencing. *Genome Res* 19**,** 1068-1076. doi: 10.1101/gr.089516.108.

Huang, X., Kurata, N., Wei, X., Wang, Z.-X., Wang, A., Zhao, Q., Zhao, Y., Liu, K., Lu, H., Li, W., Guo, Y., Lu, Y., Zhou, C., Fan, D., Weng, Q., Zhu, C., Huang, T., Zhang, L., Wang, Y., Feng, L., Furuumi, H., Kubo, T., Miyabayashi, T., Yuan, X., Xu, Q., Dong, G., Zhan, Q., Li, C., Fujiyama, A., Toyoda, A., Lu, T., Feng, Q., Qian, Q., Li, J., and Han, B. (2012). A map of rice genome variation reveals the origin of cultivated rice. *Nature* 490**,** 497-501. doi: 10.1038/nature11532.

Hughes, A.L., and Nei, M. (1988). Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class I loci reveals overdominant selection. *Nature* 335**,** 167-170. doi: 10.1038/335167a0.

Husson, C., Ioos, R., Andrieux, A., and Frey, P. (2013). Development and use of new sensitive molecular tools for diagnosis and detection of *Melampsora* rusts on cultivated poplar. *Forest Pathology* 43**,** 1-11. doi: 10.1111/efp.12007.

Johnson, R. (1979). The concept of durable resistance. *Phytopathology* 69**,** 198-199.

Johnson, T., and Newton, M. (1946). Specialization, hybridization, and mutation in the cereal rusts. *The Botanical Review* 12**,** 337-392. doi: 10.1007/bf02861524.

Jorge, V., Dowkiw, A., Faivre-Rampant, P., and Bastien, C. (2005). Genetic architecture of qualitative and quantitative *Melampsora larici-populina* leaf rust resistance in hybrid poplar: genetic mapping and QTL detection. *New Phytologist* 167**,** 113-127. doi: 10.1111/j.1469-8137.2005.01424.x.

Kaye, C., Milazzo, J., Rozenfeld, S., Lebrun, M.-H., and Tharreau, D. (2003). The development of simple sequence repeat markers for *Magnaporthe grisea* and their integration into an established genetic linkage map. *Fungal Genetics and Biology* 40**,** 207-214. doi: 10.1016/j.fgb.2003.08.001.

Kema, G.H., Goodwin, S.B., Hamza, S., Verstappen, E.C., Cavaletto, J.R., Van Der Lee, T.A., De Weerdt, M., Bonants, P.J., and Waalwijk, C. (2002). A combined amplified fragment length polymorphism and randomly amplified polymorphism DNA genetic linkage map of *Mycosphaerella graminicola*, the septoria tritici leaf blotch pathogen of wheat. *Genetics* 161**,** 1497-1505.

Kubisiak, T.L., Anderson, C.L., Amerson, H.V., Smith, J.A., Davis, J.M., and Nelson, C.D. (2011). A genomic map enriched for markers linked to Avr1 in *Cronartium quercuum* f.sp. *fusiforme*. *Fungal Genetics and Biology* 48**,** 266-274. doi: 10.1016/j.fgb.2010.09.008.

Labbé, J., Zhang, X., Yin, T., Schmutz, J., Grimwood, J., Martin, F., Tuskan, G.A., and Le Tacon, F. (2008). A genetic linkage map for the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* and its alignment to the whole-genome sequence assemblies. *New Phytologist* 180**,** 316-328. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02614.x.

Lannou, C. (2012). Variation and selection of quantitative traits in plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 50**,** 319-338. doi: doi:10.1146/annurev-phyto-081211-173031.

Larraya, L.M., Pérez, G., Ritter, E., Pisabarro, A.G., and Ramirez, L. (2000). Genetic linkage map of the edible Basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Applied And Environmental Microbiology* 66**,** 5290-5300. doi: 10.1128/aem.66.12.5290-5300.2000.

Leonard, K.J., and Szabo, L.J. (2005). Stem rust of small grains and grasses caused by *Puccinia graminis*. *Molecular Plant Pathology* 6**,** 99-111. doi: 10.1111/j.1364-3703.2005.00273.x.

Li, H., and Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25**,** 1754-1760. doi: 10.1093/bioinformatics/btp324.

Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., and Durbin, R. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25**,** 2078-2079. doi: 10.1093/bioinformatics/btp352.

Manzo-Sánchez, G., Zapater, M.-F., Luna-Martínez, F., Conde-Ferráez, L., Carlier, J., James-Kay, A., and Simpson, J. (2008). Construction of a genetic linkage map of the fungal pathogen of banana *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of black leaf streak disease. *Current Genetics* 53**,** 299-311. doi: 10.1007/s00294-008-0186-x.

Mcdonald, B.A., and Linde, C. (2002). Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* 40**,** 349-379. doi: 10.1146/annurev.phyto.40.120501.101443.

Pariaud, B., Ravigne, V., Halkett, F., Goyeau, H., Carlier, J., and Lannou, C. (2009). Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens. *Plant Pathology* 58**,** 409-424. doi: 10.1111/j.1365-3059.2009.02039.x.

Pedersen, C., Rasmussen, S.W., and Giese, H. (2002). A genetic map of *Blumeria graminis* based on functional genes, avirulence genes, and molecular markers. *Fungal Genetics and Biology* 35**,** 235-246. doi: 10.1006/fgbi.2001.1326.

Pei, M.H., Royle, D.J., and Hunter, T. (1999). Hybridization in larch-alternating *Melampsora epitea* (*M. larici-epitea*). *Mycological Research* 103**,** 1440-1446. doi: 10.1017/S0953756299008655.

Petes, T.D. (2001). Meiotic recombination hot spots and cold spots. *Nat Rev Genet* 2**,** 360-369. doi: 10.1038/35072078.

Pinon, J., Frey, P., and Husson, C. (2006). Wettability of poplar leaves influences dew formation and infection by *Melampsora larici-populina*. *Plant Disease* 90**,** 177-184. doi: 10.1094/pd-90-0177.

Rousset, F. (2008). GENEPOP ' 007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8**,** 103-106. doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x.

Sicard, D., Legg, E., Brown, S., Babu, N.K., Ochoa, O., Sudarshana, P., and Michelmore, R.W. (2003). A genetic map of the lettuce downy mildew pathogen, *Bremia lactucae*,

constructed from molecular markers and avirulence genes. *Fungal Genetics and Biology* 39**,** 16-30. doi: 10.1016/S1087-1845(03)00005-7.

Storey, J.D., and Tibshirani, R. (2003). Statistical significance for genomewide studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100**,** 9440-9445. doi: 10.1073/pnas.1530509100.

Terashima, K., Matsumoto, T., Hayashi, E., and Fukumasa-Nakai, Y. (2002). A genetic linkage map of *Lentinula edodes* (shiitake) based on AFLP markers. *Mycological Research* 106**,** 911 - 917. doi: 10.1017/S0953756202006275.

Vialle, A., Frey, P., Hambleton, S., Bernier, L., and Hamelin, R. (2011). Poplar rust systematics and refinement of *Melampsora* species delineation. *Fungal Diversity* 50**,** 227-248. doi: 10.1007/s13225-011-0129-6.

Xhaard, C., Andrieux, A., Halkett, F., and Frey, P. (2009). Characterization of 41 microsatellite loci developed from the genome sequence of the poplar rust fungus, *Melampsora larici-populina*. *Conservation Genetics Resources* 1**,** 21-25. doi: 10.1007/s12686-009-9005-z.

Xhaard, C., Barrès, B., Andrieux, A., Bousset, L., Halkett, F., and Frey, P. (2012). Disentangling the genetic origins of a plant pathogen during disease spread using an original molecular epidemiology approach. *Molecular Ecology* 21**,** 2383-2398. doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05556.x.

Xhaard, C., Fabre, B., Andrieux, A., Gladieux, P., Barrès, B., Frey, P., and Halkett, F. (2011). The genetic structure of the plant pathogenic fungus *Melampsora larici-populina* on its wild host is extensively impacted by host domestication. *Molecular Ecology* 20**,** 2739-2755. doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05138.x.

Xie, W., Feng, Q., Yu, H., Huang, X., Zhao, Q., Xing, Y., Yu, S., Han, B., and Zhang, Q. (2010). Parent-independent genotyping for constructing an ultrahigh-density linkage map based on population sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107**,** 10578-10583. doi: 10.1073/pnas.1005931107.

Xu, X. (2012). Super-races are not likely to dominate a fungal population within a life time of a perennial crop plantation of cultivar mixtures: a simulation study. *BMC Ecology* 12**,** 16. doi: 10.1186/1472-6785-12-16.

You, X., Shu, L., Li, S., Chen, J., Luo, J., Lu, J., Mu, Q., Bai, J., Xia, Q., Chen, Q., Cai, Y., Zhang, H., Chen, G., Lin, H., Zhang, Y., and Shi, Q. (2013). Construction of high-density genetic linkage maps for orange-spotted grouper *Epinephelus coioides* using multiplexed shotgun genotyping. *BMC Genetics* 14**,** 113. doi: 10.1186/1471-2156-14-113.

Yu, H., Xie, W., Wang, J., Xing, Y., Xu, C., Li, X., Xiao, J., and Zhang, Q. (2011). Gains in QTL detection using an ultra-high density SNP map based on population sequencing relative to traditional RFLP/SSR markers. *PLoS One* 6**,** e17595. doi: 10.1371/journal.pone.0017595.

Zambino, P.J., Kubelik, A.R., and Szabo, L.J. (2000). Gene action and linkage of avirulence genes to DNA markers in the rust fungus *Puccinia graminis*. *Phytopathology* 90**,** 819-826. doi: 10.1094/phyto.2000.90.8.819.

Zhou, X., Xia, Y., Ren, X., Chen, Y., Huang, L., Huang, S., Liao, B., Lei, Y., Yan, L., and Jiang, H. (2014). Construction of a SNP-based genetic linkage map in cultivated peanut based on large scale marker development using next-generation double-digest restriction-site-associated DNA sequencing (ddRADseq). *BMC Genomics* 15**,** 351. doi: 10.1186/1471-2164-15-351.

Supplementary Material

Genome-wide patterns of segregation and linkage disequilibrium: the construction of a linkage genetic map of the poplar rust fungus *Melampsora larici-populina*

Michaël Pernaci[1,2], Stéphane De Mita[1,2], Axelle Andrieux[1,2], Jérémy Pétrowski[1,2], Fabien Halkett[1,2], Sébastien Duplessis[1,2], Pascal Frey[1,2]*

[1]INRA, Interactions Arbres - Microorganismes, UMR1136, Champenoux, France.

[2]Université de Lorraine, Interactions Arbres - Microorganismes, UMR1136, Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

***Correspondence**:
Dr. Pascal Frey
INRA
Interactions Arbres – Microorganismes, UMR1136
F-54280 Champenoux, France
pascal.frey@nancy.inra.fr

Supplementary Tables and Figures

Supplementary Table 1: Sequencing and mapping statistics for the 47 *M. larici-populina* S1 individuals and the parental strain.

Individual	Sequenced reads	Sequenced bp	Mapped reads	Genome coverage depth	Mapped rate
98AG31-A002	6,537,882	653,788,200	5,511,182	5.4X	84%
98AG31-A004	7,633,030	763,303,000	7,221,125	7.1X	95%
98AG31-A006	8,390,738	839,073,800	7,736,359	7.6X	92%
98AG31-A007	6,485,602	648,560,200	5,733,613	5.7X	88%
98AG31-A008	8,703,514	870,351,400	6,917,456	6.8X	79%
98AG31-A013	7,739,638	773,963,800	6,237,001	6.2X	81%
98AG31-A014	6,868,808	686,880,800	6,409,755	6.3X	93%
98AG31-A015	4,996,024	499,602,400	4,564,972	4.5X	91%
98AG31-A016	4,259,856	425,985,600	3,878,620	3.8X	91%
98AG31-A018	7,308,296	730,829,600	6,079,167	6.0X	83%
98AG31-A019	5,268,304	526,830,400	5,029,899	5.0X	95%
98AG31-A020	6,025,534	602,553,400	5,368,402	5.3X	89%
98AG31-A021	5,400,744	540,074,400	5,070,312	5.0X	94%
98AG31-A023	4,041,120	404,112,000	3,674,820	3.6X	91%
98AG31-A024	5,388,224	538,822,400	4,866,207	4.8X	90%
98AG31-A025	5,805,818	580,581,800	5,455,985	5.4X	94%
98AG31-A026	2,767,773	276,777,300	2,616,181	2.6X	95%
98AG31-A028	4,803,744	480,374,400	4,413,313	4.3X	92%
98AG31-A030	7,268,514	726,851,400	6,448,081	6.4X	89%
98AG31-A033	7,427,998	742,799,800	3,523,515	3.5X	47%
98AG31-A035	6,353,702	635,370,200	5,076,956	5.0X	80%
98AG31-A036	5,141,152	514,115,200	4,481,271	4.4X	87%
98AG31-A037	6,584,058	658,405,800	4,469,952	4.4X	68%
98AG31-A038	6,370,410	637,041,000	5,322,772	5.3X	84%
98AG31-A039	9,006,302	900,630,200	6,576,558	6.5X	73%
98AG31-A040	9,394,234	939,423,400	8,379,544	8.3X	89%
98AG31-A042	8,113,708	811,370,800	7,616,109	7.5X	94%
98AG31-A043	10,894,066	1,089,406,600	8,917,167	8.8X	82%
98AG31-A044	4,027,101	402,710,100	1,619,076	1.6X	40%
98AG31-A046	7,928,318	792,831,800	5,979,766	5.9X	75%
98AG31-A049	10,001,042	1,000,104,200	8,241,776	8.1X	82%
98AG31-A050	5,374,076	537,407,600	3,283,859	3.2X	61%
98AG31-A051	6,110,100	611,010,000	4,265,151	4.2X	70%
98AG31-A053	7,347,692	734,769,200	4,982,745	4.9X	68%
98AG31-A054	6,841,020	684,102,000	5,013,145	5.0X	73%
98AG31-A060	5,917,374	591,737,400	5,424,026	5.4X	92%
98AG31-A078	4,590,944	459,094,400	4,107,538	4.1X	89%
98AG31-A084	5,910,098	591,009,800	5,438,376	5.4X	92%
98AG31-A102	6,055,696	605,569,600	5,742,311	5.7X	95%
98AG31-A112	9,716,540	971,654,000	8,749,793	8.7X	90%
98AG31-A113	5,776,378	577,637,800	5,184,218	5.1X	90%
98AG31-A117	40,870,838	4,087,083,800	5,912,239	5.8X	14%
98AG31-A130	10,526,694	1,052,669,400	9,983,737	9.9X	95%
98AG31-A133	7,228,226	722,822,600	6,845,384	6.8X	95%
98AG31-A141	1,754,919	175,491,900	1,308,002	1.3X	75%
98AG31-A149	6,190,676	619,067,600	5,356,466	5.3X	87%
98AG31-A153	6,955,960	695,596,000	6,605,620	6.5X	95%
98AG31	7,731,436	773,143,600	7,004,617	6.9X	91%
Total	351,833,921	35,183,392,100	268,644,139	265.6X	76%

Supplementary Table 2: Statistics of recombination blocks identified in all scaffolds of the *M. larici-populina* genome.

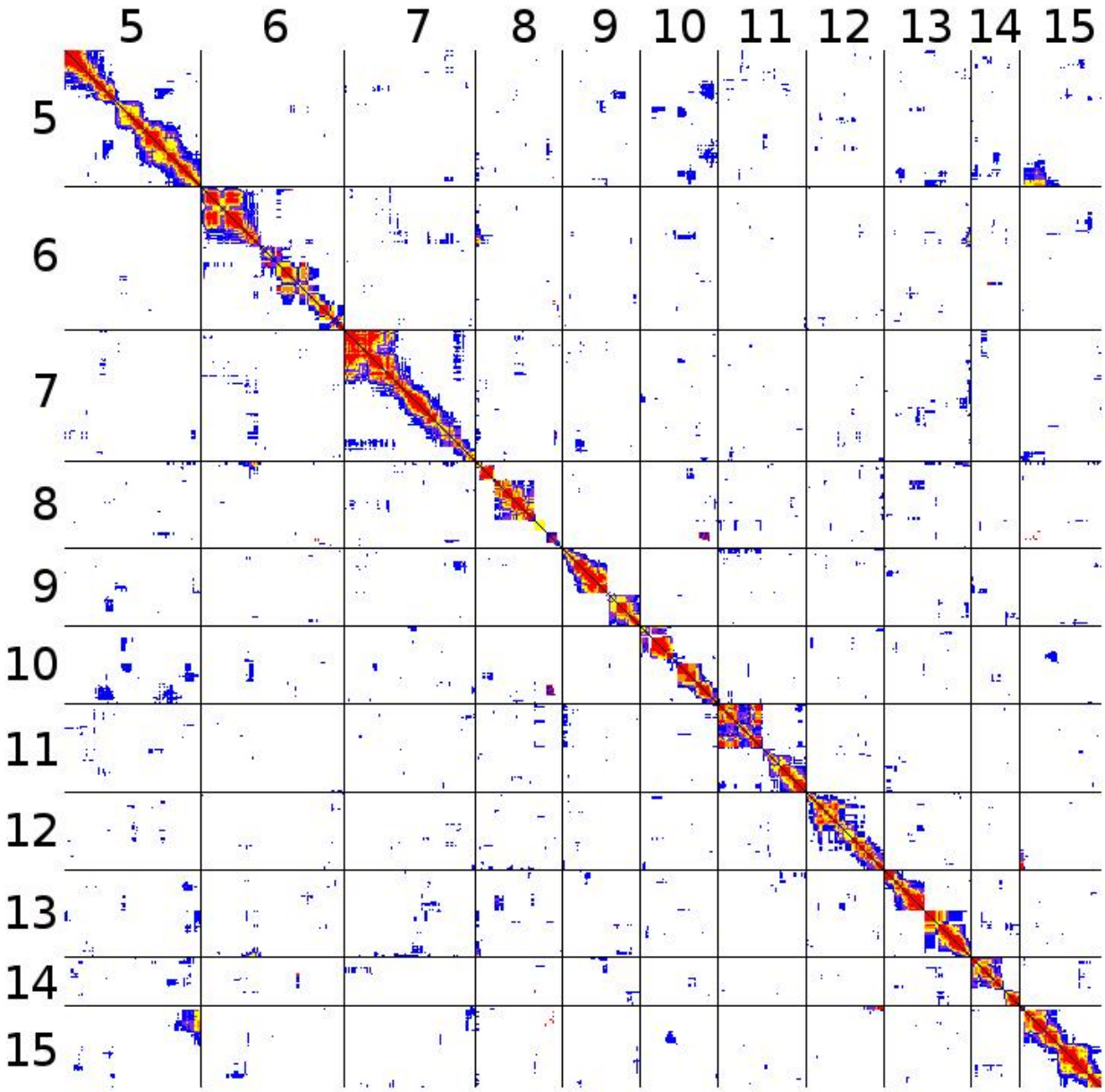
Scaffold #	Blocks	Min SNPs	Max SNPs	Average SNPs	Min bp	Max bp	Average bp
1	115	1	756	45.1	1	333797	27033.5
2	106	1	375	41.2	1	382810	30816.5
3	101	1	824	49.7	1	213884	24585.8
4	80	1	400	39.3	1	413923	27013.5
5	89	1	421	51.6	1	438478	27107.2
6	93	1	369	27.2	1	537303	19922.8
7	85	1	932	64.2	1	237008	22721.7
8	56	1	340	38.1	1	299332	31920.4
9	50	1	208	28.6	1	157933	18675.6
10	50	1	259	35.7	1	359872	35832.6
11	57	1	460	49.7	1	501196	26699.5
12	50	1	589	42.5	1	420660	35521.2
13	56	1	829	60.8	1	218874	29072.3
14	31	1	367	63.4	1	299450	48191.1
15	53	1	592	45.7	1	284041	23343.6
16	51	1	450	51.0	1	204235	28282.2
17	44	1	590	42.5	1	158136	19304.7
18	73	1	660	47.1	1	141062	15625.5
19	21	1	723	62.6	1	264082	42948.1
20	41	1	397	50.3	1	122090	26951.3
21	8	1	634	130.4	1	396459	150942.6
22	43	1	320	45.8	1	421946	25835.7
23	35	1	222	36.4	1	502478	34103.6
24	27	1	326	57.7	1	319743	35257.0
25	38	1	378	46.9	1	347314	29661.3
26	31	1	515	72.6	1	216218	34968.9
27	27	1	345	35.9	1	429815	36354.6
28	4	3	148	64.3	1095	420920	109996.5
29	27	1	284	48.2	1	509700	34455.3
30	37	1	505	60.0	1	131191	25379.8
31	2	2	307	154.5	1633	215792	108712.5
32	7	16	475	122.0	20612	518820	142404.0
33	28	1	213	40.9	1	122745	24994.8
34	55	1	478	57.9	1	105455	13700.5
35	38	1	409	42.4	1	109748	17743.8
36	14	1	481	80.6	1	340902	55621.0
37	25	1	337	53.6	1	138573	22260.9
38	14	1	158	31.6	1	244698	33286.6
39	55	1	489	34.3	1	221625	14044.6
40	26	1	349	52.5	1	177739	29701.1
41	24	2	216	45.4	49	172684	31883.1
42	15	1	342	55.1	1	265967	55119.8
43	47	1	286	33.0	1	77821	12505.2
44	39	1	467	40.3	1	163085	18310.7
45	16	1	529	86.3	1	163179	41744.5
46	9	1	535	110.8	1	179521	36454.1
47	7	9	117	37.4	5001	74628	41394.4
48	6	4	1465	399.3	4819	316842	121843.2
49	43	1	194	42.6	1	126878	16626.6
50	21	1	316	51.6	1	165006	32879.8
51	22	1	712	60.0	1	284682	32367.2
52	7	3	101	50.9	202	137320	34148.9
53	12	4	168	50.4	6082	119608	37039.6
54	32	1	238	35.2	1	147563	17161.9
55	31	1	326	38.0	1	147165	19669.5

56	3	12	528	208.0	1496	505158	204804.3
57	17	1	263	56.0	1	197245	33636.2
58	1	145	145	145.0	187724	187724	187724.0
59	27	1	873	66.1	1	194622	20620.1
60	18	1	435	59.2	1	312475	29759.9
61	13	3	271	59.1	61	112933	32712.1
62	15	1	201	38.1	1	197573	20606.0
63	4	28	361	175.8	1846	309042	126774.3
64	16	1	417	74.3	1	300614	31834.1
65	17	1	220	31.5	1	41255	8452.7
66	2	268	326	297.0	197804	301045	249424.5
67	3	48	141	79.0	16594	58675	43039.7
68	1	147	147	147.0	463446	463446	463446.0
69	21	1	218	33.8	1	150723	21287.1
70	18	1	88	16.2	1	30404	3780.1
71	4	8	169	82.0	4231	326904	109349.3
72	13	1	226	53.2	1	199263	34307.5
73	5	1	340	100.8	1	184247	66377.2
74	5	6	474	131.2	16590	76097	35597.0
76	12	1	225	51.6	1	93131	26940.8
77	7	1	215	37.7	1	325405	50988.4
78	8	1	69	20.0	1	74121	14613.1
79	2	48	766	407.0	55093	329568	192330.5
80	1	494	494	494.0	340243	340243	340243.0
81	8	1	133	42.0	1	206155	40336.5
82	10	1	95	27.9	1	101308	30538.1
84	2	85	147	116.0	135651	152064	143857.5
85	6	29	434	158.8	2315	105197	46257.0
86	6	1	159	49.3	1	159734	31652.3
87	3	11	50	34.3	1163	121148	48092.7
88	16	1	151	32.8	1	80553	16905.9
91	7	1	135	41.9	1	87578	27120.3
92	11	1	144	27.6	1	146188	21476.4
94	1	403	403	403.0	218141	218141	218141.0
95	12	1	314	81.9	1	55219	18277.2
96	6	1	123	45.8	1	145912	34482.3
97	1	151	151	151.0	203401	203401	203401.0
98	2	43	57	50.0	47590	110414	79002.0
99	1	468	468	468.0	158783	158783	158783.0
102	10	1	56	20.3	1	40508	11989.5
103	4	52	140	94.8	15889	63376	33244.3
106	1	152	152	152.0	117407	117407	117407.0
107	4	1	211	54.3	1	61884	16062.8
110	2	151	227	189.0	43567	58129	50848.0
111	9	1	142	30.3	1	76977	11054.2
112	1	92	92	92.0	107445	107445	107445.0
115	1	70	70	70.0	41065	41065	41065.0
117	1	73	73	73.0	89146	89146	89146.0
119	2	51	213	132.0	13075	65036	39055.5
121	1	3	3	3.0	8458	8458	8458.0
122	1	59	59	59.0	58830	58830	58830.0
126	1	41	41	41.0	36854	36854	36854.0
131	1	335	335	335.0	72575	72575	72575.0
134	4	3	35	13.8	301	33207	9839.5
136	1	86	86	86.0	57077	57077	57077.0
141	1	45	45	45.0	34542	34542	34542.0
142	1	52	52	52.0	59929	59929	59929.0
148	1	123	123	123.0	57297	57297	57297.0
149	1	70	70	70.0	52310	52310	52310.0
150	1	57	57	57.0	27796	27796	27796.0

151	1	66	66	66.0	36584	36584	36584.0
152	1	72	72	72.0	40992	40992	40992.0
155	1	84	84	84.0	39343	39343	39343.0
156	1	147	147	147.0	22622	22622	22622.0
158	1	28	28	28.0	24235	24235	24235.0
161	1	80	80	80.0	36944	36944	36944.0
164	1	69	69	69.0	40983	40983	40983.0
168	1	76	76	76.0	31962	31962	31962.0
169	1	21	21	21.0	10955	10955	10955.0
180	1	85	85	85.0	18940	18940	18940.0
197	1	45	45	45.0	8221	8221	8221.0
200	1	59	59	59.0	16776	16776	16776.0
204	1	101	101	101.0	11750	11750	11750.0
205	2	38	43	40.5	1319	12947	7133.0
215	1	49	49	49.0	14594	14594	14594.0
219	1	27	27	27.0	12389	12389	12389.0
225	1	38	38	38.0	4182	4182	4182.0
226	6	2	63	22.5	18	9600	2214.2
263	1	82	82	82.0	9997	9997	9997.0
268	1	167	167	167.0	5873	5873	5873.0
282	1	65	65	65.0	7828	7828	7828.0
360	1	24	24	24.0	6935	6935	6935.0
381	1	57	57	57.0	8656	8656	8656.0
390	2	66	152	109.0	1829	4503	3166.0
555	1	31	31	31.0	2282	2282	2282.0
Total	2580	1	1465	50.6	1	537303	28885.7

Supplementary Table 3: Candidate linkage groups in the *M. larici-populina* genome detected through between-scaffold linkage disequilibrium.

Linkage group	Number of scaffolds	Total length	Scaffolds (unordered)
1	2	4,384,908	001, 085
2	9	11,256,268	002, 004, 014, 022, 044, 059, 080, 161, 180
3	7	6,377,598	003, 026, 046, 050, 086, 110, 156
4	2	3,027,187	005, 073
5	2	2,547,235	006, 096
6	10	6,805,533	010, 028, 039, 043, 049, 067, 088, 095, 103, 148
7	2	3,509,521	012, 015
8	2	2,933,134	013, 021
9	3	2,593,998	017, 063, 070
10	2	1,516,315	018, 164
11	3	2,237,450	019, 064, 077
12	3	2,766,535	020, 033, 066
13	9	4,817,406	024, 047, 056, 060, 072, 079, 081, 092, 094
14	2	1,697,133	025, 065
15	4	1,624,364	035, 062, 131, 226
16	2	910,612	038, 390
17	2	1,178,973	040, 087
18	5	2,461,657	041, 054, 061, 091, 121
19	2	797,037	052, 119
20	2	605,644	071, 106
21	2	591,141	076, 097
22	2	495,527	078, 107
23	2	305,619	099, 102
unlinked	381	35,688,233	All others



Supplementary Figure S1: Pairwise linkage disequilibrium between all markers belonging to assembly scaffolds 5 through 15. The figure does not account for physical distance. Black lines separate scaffolds. All pairs are represented twice, above and below the diagonal. Each pair is represented by a single pixel. The color code is based on Fisher's exact test *P*-value: red, $P < 10^{-10}$; orange, $P < 10^{-8}$; yellow, $P < 10^{-6}$; purple, $P < 10^{-4}$; blue, $P < 10^{-2}$; white, larger *P*-values or not computed.

Chapitre 3-bis

Construction d’une carte génétique de *Melampsora larici-populina*, support de la cartographie des loci codants les traits d’histoire de vie

Chapitre 3-bis

Construction d'une carte génétique à haute densité de *M. larici-populina*, support de la cartographie des loci codants les traits d'histoire de vie

1. Introduction

Dans le chapitre précédent, nous avons réalisé une étude pilote de construction d'une carte génétique de *M. larici-populina*, basé sur le re-séquençage à faible profondeur de 47 descendants S1 issus de l'autofécondation de la souche de référence 98AG31 (Pernaci *et al.* 2014). Par l'approche que nous avons adoptée, nous avons pu regrouper 81 scaffolds parmi les 462 scaffolds résultant de l'assemblage de la séquence du génome de *M. larici-populina* (http://genome.jgi-psf.org/Mellp1), en 23 groupes de liaison, ce qui nous laissait penser qu'une carte génétique à très haute densité de marqueurs pouvait être construite.

Dans ce chapitre, nous vous présentons les avancées majeures réalisées dans le projet de construction d'une carte génétique de *M. larici-populina*. Ce travail a été réalisé en partenariat avec le JGI (Joint Genome Institute, US Department of Energy) dans le cadre d'un projet CSP (Community Science Program, CSP 1416), coordonné par S. Duplessis et intitulé "Combined population genomics and transcriptomics to decipher the molecular bases of virulence and host adaptation in the poplar leaf rust fungus *Melampsora larici-populina*". Les chercheurs du JGI ont réalisé le re-séquençage des génomes complets des descendants ainsi que de la majeure partie des analyses bio-informatiques : alignement des séquences sur le génome de référence, sélection et génotypage des SNPs au sein de la descendance et calculs des distances génétiques entre les marqueurs SNPs. Une fois les données réceptionnées, la construction finale de la carte génétique a été réalisée au laboratoire. La description du matériel et méthodes concernant le travail réalisé par le JGI se limitera donc aux informations qui nous ont été transmises.

2. Matériels et méthodes

2.1. Re-séquençage des descendants et sélection des SNPs et génotypage

Les ADN génomiques de 92 descendants génétiquement purs et de la souche parentale 98AG31 ont été extraits selon le protocole décrit plus haut (Pernaci et al. 2014), puis envoyés au JGI. Des banques d'ADN des descendants ont été préparées. Chaque banque a été quantifiée par qPCR avant mélange équimolaire des 92 banques. Les 92 descendants ont ensuite été re-séquencés en "paired-end" via la technologie Illumina HiSeq 2000, générant des séquences de 100 pb. En parallèle, la souche mère 98AG31 a également été re-séquencée en paired-end via la technologie Illumina HiSeq 2500, générant des séquences de 150 pb. Les analyses des séquences et le génotypage des bases ont été réalisées en utilisant le pipeline Analyses en Temps Réel Illumina (RTA) avec les paramètres par défaut.

Dans un premier temps, les séquences de la souche mère 98AG31 ont été alignées sur la version 1.0 de l'assemblage du génome de cette même souche de *M. larici-populina* (http://genome.jgi-psf.org/Mellp1). Le génome de référence contient 462 scaffolds et un total de 101 129 028 pb. Un filtre de sélection a été appliqué pour ne conserver d'abord que les séquences présentant une qualité d'alignement supérieure ou égale à 25 (Q25+) puis les bases présentant une qualité de séquençage supérieure ou égale à 14 (Q14+). Ceci a permis d'identifier un ensemble de positions hétérozygotes chez la souche mère qui seront utilisés comme marqueurs SNP et génotypées dans la descendance. Dans un second temps, les séquences Illumina des 92 descendants ont été alignées sur le génome de référence afin d'identifier les génotypes des descendants aux marqueurs SNPs identifiés chez la souche mère 98AG31. Un filtre comprenant trois conditions a été appliqué pour ne conserver que les SNPs: i) avec une qualité de séquençage supérieure ou égale à 30 (Q30+), ii) avec une profondeur de séquençage supérieure ou égale à 4X et iii) distants d'au moins 500 pb.

Finalement, les génotypes des SNPs conservés ont été identifiés, de manière à déterminer leur statut hétérozygote (identique à la souche mère, AB), homozygote AA ou BB au sein de la descendance. Leurs positions physiques sur les scaffolds existants ont également été déterminées.

2.2. Construction de la carte génétique, identification des évènements de recombinaison et évaluation de la qualité de la carte génétique

Dans un premier temps, les SNPs adjacent co-ségrégeant au sein de chaque descendant, c'est-à-dire présentant le même génotype, ont été regroupé en « blocs haplotypiques » (unité génétiquement homogène), de manière à simplifier les informations redondantes apportées par les SNPs adjacents. Dans un second temps, les évènements de recombinaison survenus au sein de chaque descendant, visibles par l'alternance de génotypes entre blocs haplotypiques, ont été identifiés. Dans un troisième temps, des « bins de recombinaison » (Huang *et al.* 2009; Xie *et al.* 2010) ont été définis au sein de la descendance. Un bin de recombinaison est défini comme une région du génome, comprise entre deux points de recombinaison les plus proches survenue dans la descendance, pour laquelle chaque individu ne présente qu'un génotype, ce dernier pouvant varier d'un individu à l'autre. Les bins pour lesquels un ou plusieurs génotypes de descendants étaient manquants ont été éliminés. Les positions physiques de début et fin de chaque bin ont été respectivement estimées en prenant la position de la base équidistante du premier SNP du bin N et du dernier SNP du bin N-1 d'une part, et du dernier SNP du bin N et du premier SNP du bin N+1 d'autre part. Ainsi, les longueurs physiques et la position des bins sur les scaffolds ont pu être estimées. Les bins obtenus ont été utilisés comme marqueurs pour la construction de la carte génétique. La constitution des groupes de liaison basée sur les bins de recombinaison et les calculs des distances génétiques entre ces derniers, visant à les organiser au sein des groupes de liaison, ont été réalisés en utilisant la fonction de Haldane (Haldane 1919). A cette étape, les positions physiques et génétiques de chaque bin sur les groupes de liaison (chromosomes) ont été estimées. La représentation graphique de la carte génétique a été réalisée avec le logiciel MapChart version 2.2 (Voorrips 2002).

Afin de quantifier les évènements de recombinaison qui se sont opérés, les cartes des haplotypes de chaque descendant S1 ont été générées.

Enfin, la qualité de la carte génétique construite a été testée en étudiant la corrélation entre les positions génétiques et physiques des marqueurs le long de chaque chromosome.

Figure 1: Carte génétique à haute densité de marqueurs de *M. larici-populina*, basée sur 2777 bins de recombinaison. Le nom de chaque bin d'un chromosome est composé d'un numéro, dépendant de sa position relative sur le chromosome, suivi du nombre de SNP qui le compose.

3. Résultats

3.1. Re-séquençage des descendants et identification des SNPs

Après alignement des séquences de la souche mère sur le génome de référence et application des filtres de sélection de qualité d'alignement des séquences et de qualité de séquençage, la profondeur de séquençage de la souche mère 98AG31 se révèle être très élevée, puisqu'elle atteint 158X. Environ 138 000 positions ont été déterminées comme hétérozygotes, ce qui représente un taux moyen d'hétérozygotie de 1 SNP pour 735 pb. Après alignement des séquences des 92 descendants sur le génome de référence et application des filtres de sélection, 29 169 SNPs parmi les 138 000 identifiés chez la souche mère ont été conservés, soit environ 1 SNP pour 3,5 kb.

Parmi les 92 descendants re-séquencés, il est à noter que plusieurs descendants partageaient entre 90 et 100% des crossing-over. Ces descendants ont par conséquent été considérés comme identiques (trois individus représentés en deux copies, et deux individus représentés en trois copies). Les sept individus considérés comme redondants ont par conséquent été éliminés de l'analyse, ce qui ramène le nombre de descendants analysés à 85.

3.2. Caractéristiques principales de la carte génétique

Après regroupement des SNPs en bins et élimination des bins dont les génotypes des descendants étaient incomplets, 2777 bins ont été identifiés et utilisés comme marqueurs pour la construction de la carte génétique. Cette dernière est composée de 18 groupes de liaison représentant une taille totale de 4140,05 cM, avec une distance moyenne entre marqueurs de 1,49 cM (Figure 1). Compte-tenu de la densité très élevée en marqueurs, nous pouvons considérer que la carte génétique est saturée et que les 18 groupes de liaison identifiés correspondent à 18 chromosomes. En moyenne, chaque groupe de liaison contient 154 marqueurs et mesure 230 cM. Le plus grand groupe de liaison est le chromosome 1 (Chr1) mesurant 341,17 cM et contenant 226 marqueurs, avec une distance moyenne entre marqueurs de 1,51 cM. Le plus petit groupe de liaison est le chromosome 18 (Chr18) mesurant 133,68 cM et contenant seulement 83 marqueurs, avec une distance moyenne entre marqueurs de 1,63 cM. La distance génétique la plus grande entre deux marqueurs adjacents est de 23,10 cM, localisé sur le chromosome 10 (Chr10), alors que la distance la plus courte est de 0,09 cM, localisé sur le chromosome 16 (Chr16) (Tableau 1).

Tableau 1: Caractéristiques principales des 18 chromosomes de la carte génétique de *M. larici-populina*.

Chromosome	Taille (cM)	Taille (pb)	Nombre de marqueurs (bins)	Distance moyenne entre marqueurs (cM)	Distance min - max entre marqueurs (cM)
Chr1	341,17	6601744	226	1,51	0,36-18,05
Chr2	300,53	6633601	201	1,50	0,16-21,10
Chr3	287,13	6811163	205	1,41	0,06-13,1
Chr4	271,10	5387438	173	1,58	0,36-15,15
Chr5	264,12	5278531	177	1,50	0,24-15,02
Chr6	262,27	5507512	156	1,69	0,29-19,16
Chr7	250,43	4893283	167	1,51	0,59-18,45
Chr8	248,70	5868105	187	1,34	0,25-15,34
Chr9	234,60	4085074	166	1,42	0,06-8,01
Chr10	231,92	3744974	152	1,54	0,28-23,10
Chr11	214,15	4417376	127	1,70	0,17-16,19
Chr12	205,38	4522172	158	1,31	0,39-10,98
Chr13	189,38	3497662	133	1,43	0,22-13,17
Chr14	187,11	3112229	128	1,47	0,06-21,47
Chr15	187,08	3984361	112	1,69	0,40-12,99
Chr16	172,62	3545705	121	1,44	0,09-9,29
Chr17	158,69	3678762	105	1,53	0,40-9,92
Chr18	133,68	3786611	83	1,63	0,31-12,44
Total	4140,05	85356303	2777	1,51	0,06-23,10

3.3. Quantification des évènements de recombinaison au sein de la descendance

Des cartes de bins de recombinaison ont été générées pour chacun des 85 descendants S1 (Figure 2). La carte des bins de recombinaison obtenue contient 2777 bins de recombinaison. La longueur physique moyenne d'un bin sur l'ensemble du génome est de 30,7 kb, avec les bins les plus petits et plus grands mesurant respectivement 24,3 kb et 45,6 kb. Au total, 2760 évènements de recombinaison ont été détectés sur l'ensemble du génome au sein de la descendance, avec un minimum et maximum de 225 points de recombinaison pour le chromosome 1 et de 82 points de recombinaison pour le chromosome 18. En moyenne, 82 évènements de recombinaison ont été observés par descendant sur l'ensemble du génome, avec des minimums et maximums respectifs de 59 évènements de recombinaison pour le descendant 98AG31-A026 et de 106 évènements de recombinaison pour le descendant 98AG31-A117. A l'échelle des groupes de liaison, les nombres minimums et maximums d'évènements de recombinaison observés par descendant sont respectivement de 0, comme pour le descendant 98AG31-A101 sur le chromosome 4 et de 13 pour le descendant 98AG31-A113 sur le chromosome 2 et le descendant 98AG31-A081 sur le chromosome 3 (Tableau 2).

3.4. Evaluation de la qualité de la carte génétique

La corrélation entre les positions génétiques et physiques des marqueurs est un indicateur important de la qualité de la carte génétique, car elle reflète la colinéarité de la carte génétique avec le génome (Sim *et al.* 2012). Plus le coefficient de corrélation est proche de 1, plus les cartes génétiques et physiques sont colinéaires. Dans notre cas, la corrélation entre les positions génétiques et physiques des marqueurs semble très satisfaisante (Figure 3).

4. Discussion

La carte génétique présentée ici constitue la première carte génétique de *M. larici-populina* construite à ce jour. Cette carte se révèle être d'une très haute résolution, comme en témoigne le nombre important de marqueurs qui la constituent et la distance génétique moyenne très faible entre ces derniers à l'échelle du génome. Cette haute résolution découle de la forte densité en marqueurs SNPs utilisés pour la détection des points de recombinaison

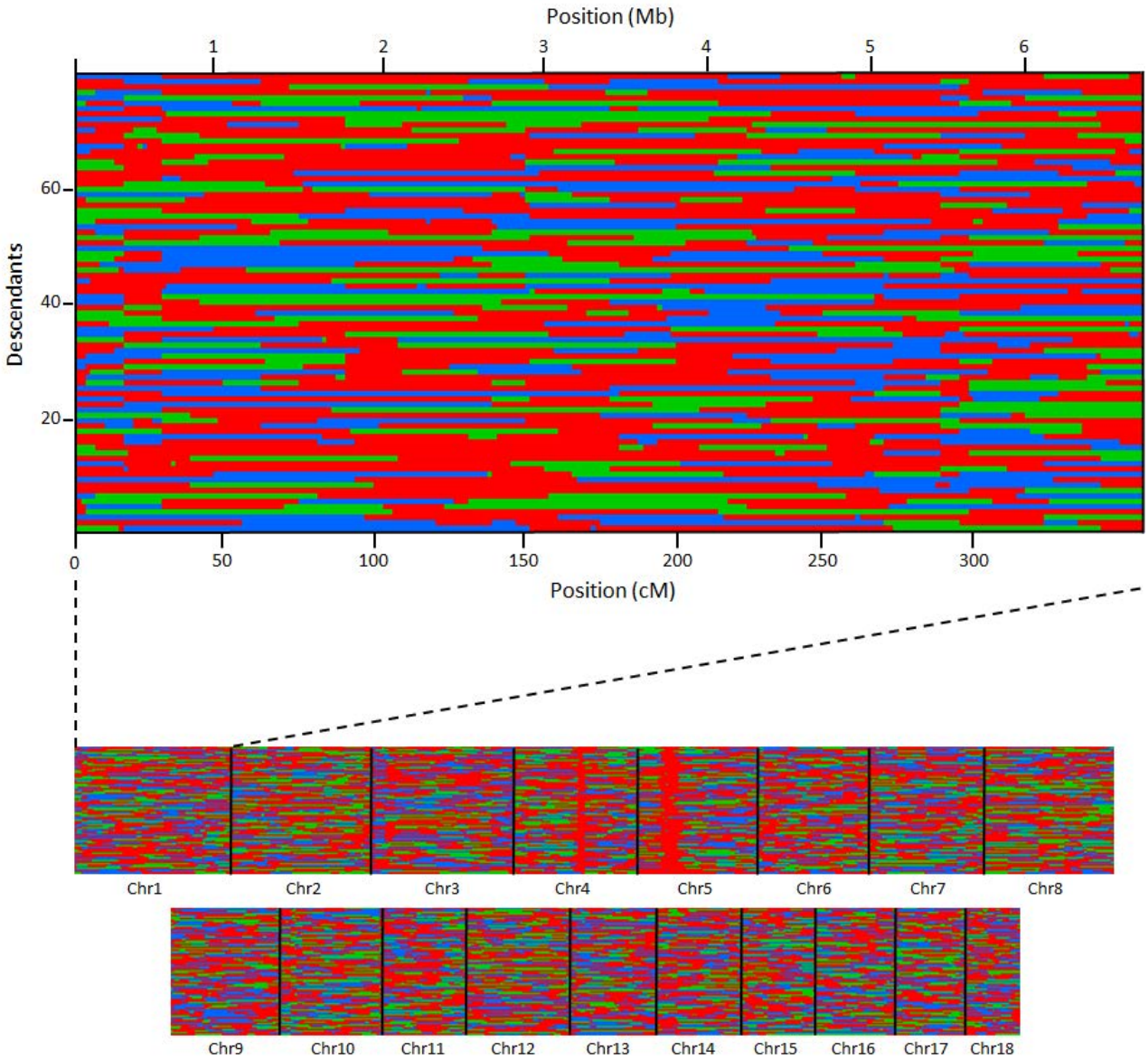


Figure 2: Carte des haplotypes de la carte génétique de *M. larici-populina*. Les bins de recombinaison hétérozygotes sont représentés en rouge, les bins homozygotes 1 en bleu et les bins homozygotes 2 en vert. Chaque ligne représente le génotype d'un descendant vis-à-vis des marqueurs en colonnes. En haut est représenté un agrandissement du chromosome 1.

Tableau 2 : Caractéristiques principales de la carte des haplotypes de la descendance de *M. larici-populina*.

Chromosome	Nombre de bins	Taille moyenne d'un bin (pb)	Nb de points de recombinaison	Nb moyen de points de recombinaison par descendant	Nb min - max de points de recombinaison par descendant
Chr1	226	29211	225	7	2-11
Chr2	201	33003	200	6	2-13
Chr3	205	33225	204	6	2-13
Chr4	173	31141	172	5	0-12
Chr5	177	29822	176	5	1-11
Chr6	156	35305	155	5	1-11
Chr7	167	29301	166	5	1-10
Chr8	187	31380	186	5	1-10
Chr9	166	24609	165	5	0-9
Chr10	152	24638	151	5	1-9
Chr11	127	34782	126	4	0-10
Chr12	158	28621	157	4	0-9
Chr13	133	26298	132	4	0-9
Chr14	128	24314	127	4	0-9
Chr15	112	35575	111	4	0-8
Chr16	121	29303	120	3	0-8
Chr17	105	35036	104	3	1-7
Chr18	83	45622	82	3	0-7
Total	2777	30737	2760	82	59-106

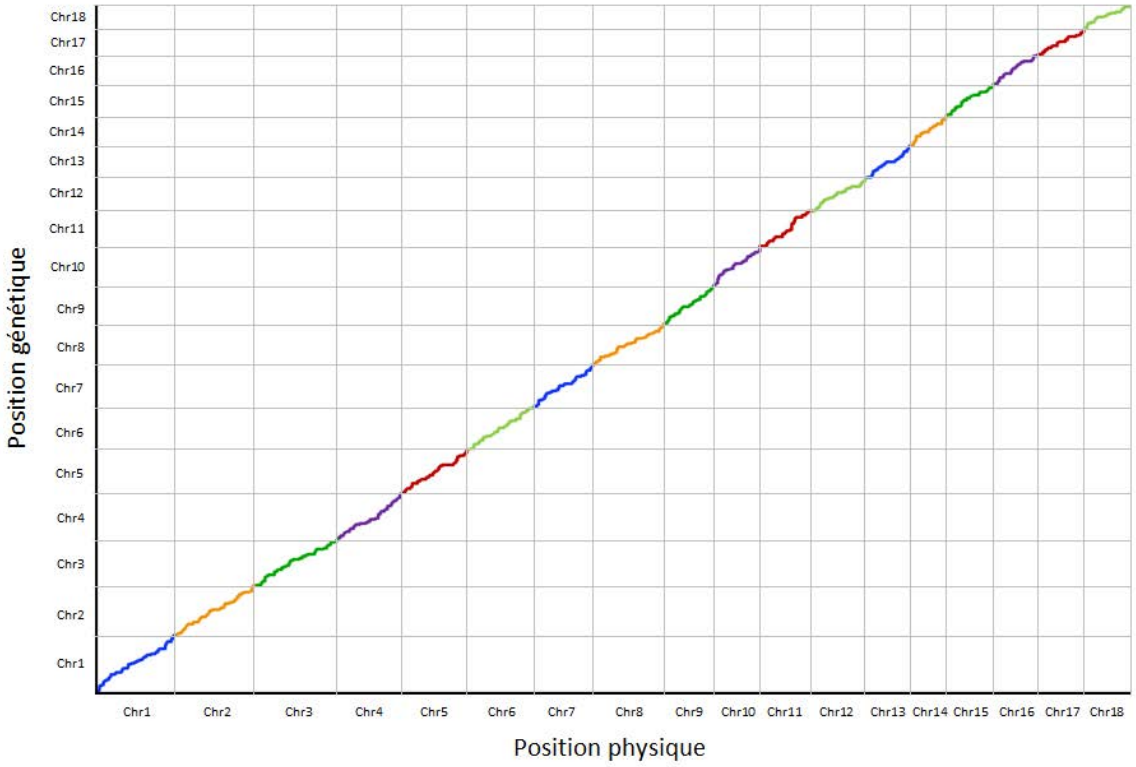


Figure 3: Corrélation entre les positions physiques et génétiques des marqueurs sur la carte au sein des 18 groupes de liaison de *M. larici-populina*.

et la constitution des bins, ces derniers ayant été utilisés comme marqueurs pour la construction de la carte génétique. Cependant, en dépit de cette forte densité en marqueurs, la résolution de la carte pourrait encore être perfectible. En effet, nous avons observé à de nombreuses reprises au sein de la descendance, l'occurrence de multiples évènements de recombinaison entre bins adjacents. La densification en marqueurs dans ces régions particulières permettrait de distinguer ces évènements de recombinaison vraisemblablement distincts (positions différentes) et de définir ainsi des bins plus petits. Ceci permettrait la construction d'une carte génétique encore plus précise et surtout, d'augmenter la résolution de la localisation de QTLs que nous pourrions potentiellement cartographier.

Malgré cela, il est intéressant de noter que le nombre de groupes de liaison détectés concorde avec le nombre de chromosomes observés par caryotypage chez *Melampsora lini* (Boehm & Bushnell 1992), ce qui renforce l'hypothèse que notre carte est saturée et que le nombre de chromosomes est effectivement 18 chez *M. larici-populina*. La carte génétique peut être considérée comme définitive, bien que des analyses complémentaires soient menées par les équipes du JGI. En effet, les efforts qu'ils investissent actuellement concernent principalement l'étude de la structure du génome (points chauds et points froids de recombinaison, distorsions de ségrégation), ainsi que la mise en relation des cartes physiques et génétiques du champignon, en vue de l'amélioration de l'assemblage du génome mis à la disposition de la communauté scientifique. En conclusion, la carte génétique à haute résolution dont nous disposons à présent constitue une base solide pour la cartographie les QTLs de traits morphologiques et d'agressivité, ainsi que du locus d'avirulence AvrX, caractérisés dans le chapitre 2 sur cette même descendance.

Chapitre 4

Cartographie d'un locus d'avirulence et de QTL de traits quantitatifs chez *M. larici-populina*

Chapitre 4

Mise en évidence d'un locus de virulence et de QTLs de traits quantitatifs chez *M. larici-populina*

1. Introduction

Dans les chapitres précédents, nous avons acquis des données sur *M. larici-populina* qui vont nous permettre de répondre au dernier objectif de cette thèse. En effet, nous avons décrit dans le chapitre 3 une descendance S1 issue de l'autofécondation d'une souche de référence (Pernaci *et al.* 2014), dont un ensemble de traits qualitatifs et quantitatifs ont été acquis dans le chapitre 2.

Dans le chapitre 3-bis, une carte génétique du champignon a été construite sur la base de la ségrégation, au sein de cette descendance, d'un grand nombre de marqueurs polymorphes. Nous disposons donc à présent de l'ensemble des éléments nécessaires pour rechercher dans le génome de *M. larici-populina* les régions intervenant dans l'expression de ces caractères, par une approche d'analyse de QTLs. Pour rappel, l'analyse de ségrégation des facteurs de virulence au sein de la descendance réalisée dans le chapitre 2 n'avait révélé aucune ségrégation de virulence, excepté celle d'une virulence vis-à-vis d'une résistance qualitative encore non décrite à ce jour. Ce facteur de virulence X est donc le seul que nous pourrons tenter de cartographier dans le génome de *M. larici-populina*. Parallèlement, un ensemble de traits morphologiques des spores du champignon (longueur, largeur, volume, ratio L/l) et de traits d'agressivité (efficacité d'infection, temps de latence, taille des lésions, taux et capacité de sporulation) ont été mesurés et nous pourrons tenter de cartographier.

2. Matériels et méthodes

Chaque trait a été analysé indépendamment par la méthode en intervalle composite (CIM) (Zeng 1993, 1994) à l'aide du logiciel QGene version 4.3.10. (Nelson 1997). Ces analyses ont été conduites en suivant un pas de 0,1 cM et en laissant le logiciel sélectionner automatiquement les marqueurs à considérer comme cofacteurs (paramètres par défaut). Le seuil de significativité de LOD score au-delà duquel un QTL est considéré comme significatif a été estimé par tests de permutations (Churchill & Doerge 1994), réalisés sur l'ensemble du

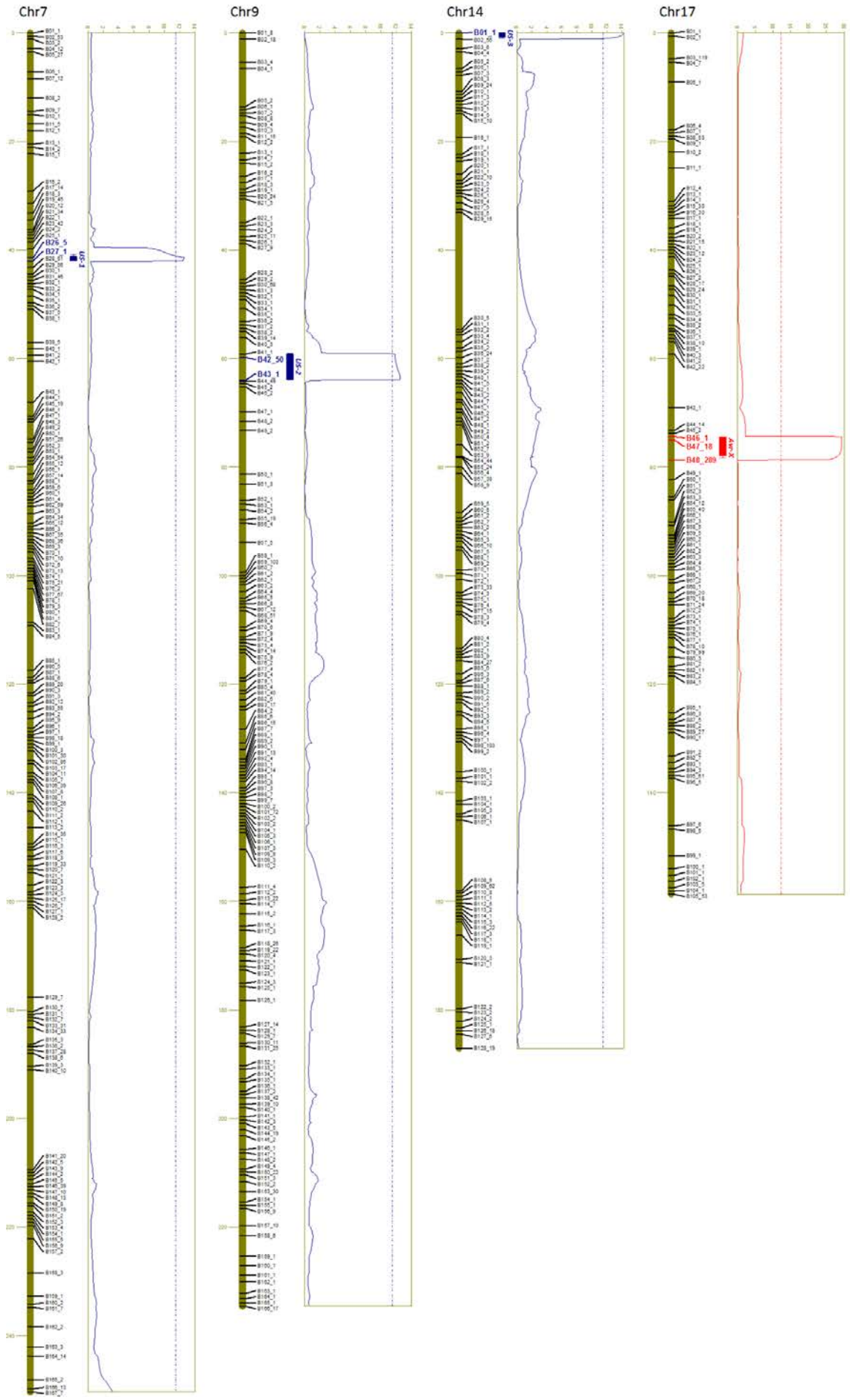


Figure 1: QTLs de taille des lésions (bleu) et locus d'avirulence *AvrX* (rouge) identifiés au sein de la descendance. Pour chaque caractère, les LOD score associés à chaque position sur le chromosome (trait plein) et le LOD score seuil pour α=0,05 (pointillés) sont indiqués. Pour chaque QTL, le rectangle indique la région du chromosome significativement détectée et les barres indiquent l'intervalle de confiance d'après la méthode 1-LOD. Les marqueurs associés aux différents QTLs sont représentés en gras et de la même couleur que le trait correspondant.

génome et comprenant 1000 itérations. Le seuil de significativité α choisi pour ces analyses est de 0,05. L'intervalle de confiance associé à chaque QTL significatif a été calculé suivant la méthode de l'intervalle 1-LOD (Lander & Botstein 1989; Hackett 2002). Pour chaque QTL, la position du marqueur présentant le LOD score le plus élevé a été retenue pour positionner le QTL sur la carte génétique. Enfin, les QTLs ont été qualifiés de majeur ou mineur selon la proportion de la variance phénotypique expliqués par le QTL, selon que la valeur du R^2 soit supérieure ou inférieure à 10% (Collard *et al.* 2005).

3. Résultats

3.1. Cartographie d'un trait qualitatif : le facteur de virulence X

L'analyse en intervalle composite à mis en évidence la présence d'un QTL au seuil α=0.05 sur le chromosome 17 (Figure 1). Ce QTL, nommé *Avr-X*, est à effet majeur puisqu'il explique 79,5% de la variation phénotypique observée. Il se trouve associé à trois marqueurs, à savoir les bins B46_1, B47_18 et B48_289. La position génétique de ce QTL est située entre 74,4 et 78,6 cM. Sa position physique quant à elle, est située entre la base 1 504 301 et 2 136 129 sur le chromosome 17, représentant un intervalle de 631 828 pb (Tableau 1).

3.2. Cartographie de traits quantitatifs : les traits liés à la morphologie des spores et d'agressivité

Les analyses en intervalle composite ont permis de détecter des QTLs uniquement pour la taille des lésions, aucun QTL significatif n'ayant été détecté pour les autres traits testés.

Concernant le trait taille des lésions, abrégé US pour uredinia size (Dowkiw *et al.* 2003 ; Jorge *et al.* 2005), les analyses ont permis de mettre en évidence trois QTLs à effets majeurs, *US-1*, *US-2* et *US-3*, situés respectivement sur les chromosomes 7, 9 et 14 (Figure 1). Le QTL *US-1* explique 49,5% de la variation phénotypique observée et se trouve associé à deux marqueurs sur le chromosome 7, les bins B26_5 et b27_1. La position génétique de ce QTL est située entre 41,4 et 42 cM. Sa position physique quant à elle, est située entre la base 563 289 et 570 933 sur le chromosome 7, représentant un intervalle de 7 644 pb (Tableau 1). Le QTL *US-2* explique 49,1% de la variation phénotypique observée et se trouve également

Tableau 1: Caractéristiques des QTLs identifiés pour l'avirulence X et la taille des lésions au sein de la descendance de *M. larici-populina*

Trait	QTL	LOD	R^2	Effet	Chromosome	Marqueur(s) associé(s)	Position génétique (cM)	Intervalle de confiance	Position Physique (pb)	Taille physique (pb)	Marqueurs flanquants
Avirulence X	*Avr-X*	29,28	79,5	Majeur	17	B46_1, B47_18, B48_289	74,4-78,6	74,4-78,6	1504301-2136129	631828	B45_2-B49_1
Taille des lésions	*US-1*	12,61	49,5	Majeur	7	B26_5, B27_1	41,4-42	40,7-42	563289-570933	7644	B25_1-B28_61
	US-2	12,45	49,1	Majeur	9	B42_50, B43_1	59,7-63,9	59,1-63,9	840599-1005101	164502	B41_1-B44_49
	US-3	14,24	53,8	Majeur	14	B01_1	0-1	0-1,1	0-1744	1744	B02_56

associé à deux marqueurs sur le chromosome 9, les bins B42_50, B43_1. Il est situé entre 59,7 et 63,9 cM et se trouve physiquement positionné entre les bases 563 289 et 570 933, représentant un intervalle de 164 502pb (Tableau 1). Enfin, le QTL *US-3* est localisé sur le chromosome 14 et explique 53,8% de la variation phénotypique. Il est associé à un seul marqueur, le bin B01_1. Il est situé à l'extrémité du chromosome 14 (0 cM) et se trouve physiquement positionné entre les bases 0 et 1744, représentant ainsi un intervalle de 1744 pb (Tableau 1).

4. Discussion

Les analyses de QTLs de traits qualitatifs et quantitatifs de *M. larici-populina* présentées ici se sont avérées partiellement concluantes, puisque des QTLs de certains traits d'intérêt ont été localisés. Un locus à effet majeur a été identifié pour le facteur de virulence X, ce qui fait sens, le déterminisme génétique des résistances qualitatives et des facteurs de virulence correspondants étant supposé monogénique selon la relation gène-pour-gène (Flor 1971). A proprement parler, il faudrait qualifier ce QTL de "Qualitative Trait Locus" puisqu'il s'agit d'un trait qualitatif (Freymark *et al.* 1993). Ce locus devrait contenir le gène d'avirulence *AvrX*, dont le produit (protéine d'avirulence, ou effecteur) serait reconnu par le gène de résistance R_X, porté par le génotype 'L270-3' de *P. deltoides*.

Par ailleurs, trois QTLs à effet majeur ont été identifiés pour la taille des lésions, ce qui supposerait un déterminisme génétique relativement peu complexe pour ce trait. De plus, la résistance R_{US} (uredinia size) du peuplier, qui limite la taille des lésions du champignon sur les cultivars porteurs (Dowkiw & Bastien 2004, 2007; Jorge et al. 2005 ; Bresson *et al.* 2011), pourrait être le pendant chez la plante de ces QTLs de taille de lésion chez le champignon. Le fait que cette résistance ait été contournée par le champignon suggèrerait un faible nombre de mutations pour conduire au contournement, affectant donc un faible nombre de gènes (Dowkiw *et al.* 2010).

Les intervalles physiques de certains QTLs se trouvent être très réduits, les QTLs *US-1* et *US-3* présentant respectivement des tailles physiques de 7644 et 1744 pb. En revanche, la taille physique du locus d'avirulence *Avr-X* est relativement conséquente puisqu'elle couvre environ 631 kb. Une densification en marqueurs, telle que celle énoncée dans le chapitre 3-bis, permettrait de détecter plus de points de recombinaison et de définir des bins plus petits, afin de resserrer la taille des QTLs. A titre d'exemple, six crossing-over sont visibles entre les

bins B48_289 associé au QTL *Avr-X* et le bin adjacent B49_1. De même, trois crossing-over se sont opérés entre les bins B26_5 et B27_1 associés au QTL de taille de lésion *US-1* et leurs bins adjacents respectifs.

La non détection de QTLs pour les autres traits, liés à la morphologie des urédospores et à l'agressivité, peut être due à différents facteurs. D'une part, la nature du déterminisme génétique influence fortement la puissance de détection. En effet, plus le déterminisme génétique est simple (faible nombre de gènes à effets majeurs), plus les QTLs sont faciles à détecter. Cela suggère que le déterminisme génétique des traits non détectés serait plus complexe que celui de la taille des lésions. En particulier, les traits liés à la morphologie des spores sont potentiellement moins soumis à sélection que les traits d'agressivité qui conditionnent directement l'interaction hôte-agent pathogène. La pression de sélection exercée sur les gènes impliqués dans les traits morphologiques serait moins forte, impliquant des effets moins importants, et donc les QTL seraient plus difficilement détectables. Dans le cas du temps de latence, la nature du trait lui-même pourrait expliquer qu'on ne détecte pas de QTL. En effet, ce trait couvre l'ensemble du cycle infectieux, de l'arrivée de la spore initiale à la production de nouvelles spores. Un grand nombre de mécanismes et par conséquent de gènes sont susceptibles d'intervenir au cours de ce processus infectieux.

D'autre part, la taille de la population en ségrégation revêt une importance majeure dans la puissance de détection (Darvasi *et al.* 1993; Tanksley 1993; Haley & Andersson 1997; Beavis 1998), en particulier si les traits mesurés présentent un déterminisme complexe avec de nombreux gènes à effets mineurs. Dans la présente étude, l'effectif de 85 descendants considérés pour l'analyse de QTLs pourrait ne pas être suffisant pour offrir la puissance nécessaire à la détection de QTLs à effets mineurs. Augmenter la taille de la population permettrait potentiellement un gain de puissance pour définir plus précisément les QTLs déjà identifiés, détecter d'autres QTLs à effets mineurs, et détecter un signal sur les autres traits mesurés.

En conclusion, cette étude a permis de mettre en évidence un locus d'avirulence et des QTLs de taille de lésions, une première concernant les Pucciniales. Elle constitue donc une avancée majeure dans la compréhension du déterminisme génétique des traits d'histoire de vie des champignons pathogènes, en particulier des agents de rouille. La perspective majeure découlant de cette étude consisterait à identifier dans la séquence physique du génome de *M. larici-populina* les régions correspondant à ces QTLs et d'identifier des gènes candidats, dans une perspective de caractérisation fonctionnelle.

Discussion générale

DISCUSSION GENERALE

Les analyses effectuées au cours de ce travail sur les traits d'histoire de vie de *Melampsora larici-populina* ont pour objectif la caractérisation de leur variation, ainsi que leur influence sur l'évolution et la structuration de ses populations qui en découle. Dans un premier temps, l'étude de l'évolution des traits liés à la morphologie des spores, qui a mêlé des approches de phénotypage et de génétique des populations, a permis de mettre en évidence l'implication des traits quantitatifs dans l'adaptation de ce champignon lors de la dispersion. Dans un second temps, nous avons souhaité caractériser le potentiel adaptatif de *M. larici-populina* en lien avec ses traits d'histoire de vie. Les paramètres conditionnant le potentiel adaptatif ont été estimés sur un jeu de données phénotypiques que nous avons voulu être le plus exhaustif et mesuré de la façon la plus précise possible, en développant un protocole d'inoculation innovant. Dans un troisième temps, la volonté de cartographier les QTL de traits morphologiques et d'agressivité de *M. larici-populina*, ainsi qu'un locus d'avirulence sur son génome, nous a conduit à réaliser une étude pilote de construction de carte génétique. Ce projet à été par la suite mené en parteneriat avec le JGI, et a conduit à la construction d'une carte génétique à haute densité de marqueurs composée de 18 chromosomes. Enfin, trois QTL de taille de lésion ainsi qu'un locus d'avirulence ont pu être détectés et localisés avec précision.

1. Liens entre traits d'histoire de vie et évolution de *M. larici-populina*

1.1. Evolution des traits morphologiques des spores de *M. larici-populina*

Nous avons évalué l'impact des traits morphologiques des spores sur l'évolution et la structuration des populations de *M. larici-populina* suite à un évènement de dispersion, en faisant appel à des approches de génétique des populations combinées à du phénotypage. Cette approche originale, jamais appliquée à notre connaissance à un champignon phytopathogène, a permis de mettre en évidence l'implication directe du volume des spores dans le processus épidémique, le ratio longueur/largeur jouant vraisemblablement un rôle moins important. En effet, un signal significatif de convergence évolutive s'exerçant sur le

volume des spores a été détecté, les individus migrants étant sélectionnés pour un volume de spore moyen supérieur à celui des individus restant dans la zone de départ de l'épidémie. Ces patrons d'évolution phénotypique, de sélection ainsi que de différenciation génétique entre populations ont été étudiés lors de deux épidémies annuelles consécutives. Il en est ressorti une remarquable répétabilité de ces processus d'une épidémie à l'autre, renforçant ainsi les résultats obtenus et les conclusions tirées concernant les processus évolutifs mis en jeu au cours d'une épidémie. Cette étude marque une avancée significative dans la compréhension de l'évolution d'un champignon phytopathogène, puisque même si de tels évènements de sélection sont attendus, c'est la première fois qu'ils sont mis en évidence et aussi nettement décrits.

Cependant, notre étude souffre d'une limite liée au type de trait quantitatif considéré. En effet, celle-ci n'a porté que sur les traits liés à la morphologie des spores de *M. larici-populina*, et *a fortiori* à son aptitude à la dispersion, sans tenir compte des traits d'agressivité qui constituent la composante quantitative du pouvoir pathogène, et qui interviennent directement dans l'interaction hôte-agent pathogène. De plus, comme nous l'avons déjà souligné, l'évènement de dispersion étudié dans la vallée de la Durance n'est pas un évènement unique, mais bien une épidémie polycyclique composée de nombreuses étapes d'infection/dispersion, au cours desquelles les traits d'agressivité jouent un rôle primordial. Enfin, l'étude réalisée dans le Chapitre 2 a clairement mis en évidence des trade-offs entre traits liés à la morphologie des spores et traits d'agressivité. Une vision globale de l'évolution de ses traits et des trade-offs qui s'opèrent aiderait grandement à une meilleure compréhension des processus évolutifs qui régissent la dispersion et la colonisation de milieux vierges par ce champignon. La prise en compte de l'ensemble des traits quantitatifs du champignon aiderait à mieux interpréter les résultats contre-intuitifs obtenus sur l'évolution du volume des spores, qui vont à l'encontre des modèles théoriques de dispersion de champignons pathogènes par voie aérienne (Norros *et al.* 2014), et à l'encontre de ce qui est connu chez les plantes. Plusieurs compléments à cette étude seraient nécessaires pour aller dans ce sens.

Dans un premier temps, il serait indispensable de compléter notre jeu de données phénotypiques pour y inclure les traits d'agressivité tels que ceux mesurés dans le Chapitre 2, à savoir l'efficacité d'infection, le temps de latence, la capacité de sporulation et la taille des lésions. Un jeu de données comprenant ces trois premiers traits d'agressivité a déjà été obtenu dans le cadre de plusieurs stages de master. Malheureusement, celui-ci porte uniquement sur

la campagne d'échantillonnage 2008, ne permettant pas les comparaisons Q_{ST}-F_{ST} en interannuel.

Un second point d'amélioration concerne l'effort d'échantillonnage dédié au décryptage plus fin d'une étape particulière de l'épidémie. En effet, nous avons observé une augmentation significative du volume moyen des spores de la population résidante par rapport à la population initiale. Ce constat nous amène à nous questionner sur l'origine du processus biologique qui y conduit. Est-ce qu'une sélection naturelle s'opère au cours du passage mélèze-peuplier en début de saison, favorisant les individus à spores plus volumineuses ? Ou au contraire, l'évolution vers des spores plus volumineuses résulte t-elle de la compétition entre individus résidants au cours de la saison épidémique, favorisant les individus les plus compétitifs et présentant des spores plus volumineuses (cf. Chapitre 2) ? Pour répondre à ces questions, il est envisageable d'échantillonner une population sur peuplier, directement en sortie de mélèze en début d'épidémie. Si aucune différence significative n'était observée entre cette population et la population initiale (échantillonnée sur mélèze), l'hypothèse d'évolution de la population résidante vers des volumes de spores plus élevés sous l'effet de la compétition entre individus serait validée.

Enfin, le retour à des valeurs de volume moyen de spores plus faibles pour la population initiale de l'année N+1 (2009) par rapport à la population résidante de l'année N (2008) soulève également des questions quant à l'origine biologique de ce phénomène. En effet, seuls les individus qui n'auront pas dispersé et qui seront restés dans la zone de sympatrie peuplier-mélèze (population résidante) participeront à la phase de reproduction sexuée. Ainsi, ce sont leurs descendants qui initieront l'épidémie l'année suivante. Par conséquent, nous nous attendions à n'observer aucune différence significative entre les populations résidante 2008 et initiale 2009, ni au sein des quatres populations initial et résidante de 2008 et 2009. Est-ce qu'une contre-sélection s'opère au cours du passage peuplier-mélèze, favorisant les individus à volume de spore plus faible ? Ou serait-ce dû à un biais d'échantillonnage de la population résidante ? Cette dernière hypothèse est plausible si l'on tient compte du fait que l'échantillonnage est tardif et s'effectue en toute fin d'épidémie (mi-octobre). Ainsi, on retrouve déjà de très nombreuses feuilles mortes au sol, et les individus sont échantillonnés sur les feuilles encore présentes sur les arbres. Par conséquent, les individus échantillonnés seraient les plus compétitifs, car ils se seraient maintenus le plus longtemps, et présenteraient des volumes de spores plus élevés que les individus déjà au sol (cf. Chapitre 2). Pour autant, ces derniers participeront à la population initiale de l'année N+1

au même titre que les individus persistants, ce qui pourrait expliquer cette diminution de volume entre les populations résidante 2008 et initiale 2009. Pour tester ces hypothèses, il serait intéressant d'inoculer les individus de la population résidante 2008 sur mélèze, avec toutes les difficultés techniques que cela implique (cf. Chapitre 3), et de les ré-inoculer sur peuplier. Si une diminution de volume était observée, nous pourrions conclure à une contre sélection au cours du passage peuplier-mélèze. Dans le cas contraire, l'hypothèse d'un biais d'échantillonnage comme origine de ce résultat pourrai être validée. Une alternative serait d'effectuer un échantillonnage un peu plus tôt dans la saison (fin aout) quand la majorité de la population résidente est encore présente sur l'hôte peuplier. Cette option présenterait toute fois l'inconvénient d'avoir à réaliser deux nouvelles campagnes d'échantillonnage.

1.2. Impact des traits d'histoire de vie sur le potentiel adaptatif de *M. larici-populina*

Dans cette étude, différents paramètres liés aux traits d'histoire de vie conditionnant le potentiel adaptatif des champignons phytopathogènes ont été examinés. Pour ce faire, nous avons opté pour un protocole original pour la mesure des traits d'agressivité, l'inoculation monospore (Pei *et al.* 2002). Contrairement à l'approche classique qui consiste à mesurer les traits d'agressivité sur une population de lésions, obtenue par pulvérisation d'une suspension de spores sur une feuille ou un disque foliaire (Lannou 2012), l'inoculation monospore permet de mesurer les traits à l'échelle de la lésion. En plus d'un net gain dans la prise en compte de la variabilité entre lésion lors d'une expérience, elle permet de s'affranchir des effets de compétition pour les ressources, susceptibles de biaiser les mesures de traits (Clifford & Clothier 1974; Sache 1997; Robert *et al*. 2004). Les analyses ont ainsi été menées sur un jeu de données phénotypiques robuste dans lequel l'introduction de biais d'acquisition a été limitée au maximum. Cependant, les analyses ont révélé *a posteriori* une limite de cette approche, particulièrement concernant l'estimation du temps de latence. En effet, nous avons observé une très forte variance intra-isolat, résultant du pas de temps de notation (environ 12 h), limitant ainsi toute mise en évidence de différences significatives entre descendants. Une première solution technique pour pallier ce problème serait d'effectuer des notations plus resserrées dans le temps (toutes les 6 h), mais cela s'avèrerait extrêmement contraignant à mener en pratique. La seconde consisterai à estimer le temps de latence par l'intermédiaire

d'un système automatisé de prise de photographie des disques, qui serait ensuite analysées par un logiciel d'analyse d'image pour déterminer le moment précis de l'apparition de l'urédie.

L'étude menée sur ce jeu de données acquis sur une descendance S1 a permis de mettre en évidence le potentiel adaptatif très élevé de *M. larici-populina*, comme en ont notamment témoigné les niveaux élevés d'héritabilité de certains traits quantitatifs et la présence de trade-offs cohérent avec les stratégies évolutives déjà décrites. De plus, la descendance S1 que nous avons étudiée a permis d'évaluer le niveau de variabilité phénotypique engendré par un seul évènement de reproduction sexué, et ce à partir d'un fond génétique qui est limité au polymorphisme existant entre les deux noyaux haploïdes de la souche parentale. Il est primordial de souligner que notre étude sous-estime le niveau réel de variabilité phénotypique, puisque l'ensemble des descendants obtenus n'a pas été étudié au cours de ces travaux. Un biais de sélection probable s'est glissé dans cette étude, puisque les individus les moins agressifs ont été vraisemblablement écartés de cette étude en raison de leur faible survie. En effet, l'étape de multiplication en grande quantité (100 mg) des urédospores des descendants pour l'extraction de l'ADN génomique pour le re-séquençage a inévitablement privilégié les individus qui se multipliaient le mieux, donc *a priori* les plus agressifs. Ce sont ces mêmes individus qui ont fait l'objet de l'analyse des traits du Chapitre 2. Cette étape a donc potentiellement contribué à diminuer la variabilité totale que nous aurions pu observer. Toutefois, la variabilité phénotypique observée au sein de la descendance s'est révélé très importante, ce qui laisse imaginer le niveau de variabilité créé *in natura*, suite à un nombre énorme de croisements qui s'opèrent entre individus non apparentés et génétiquement très différents.

Enfin, l'absence de coût de virulence associé au gain de la virulence X vis-à-vis d'un gène de résistance R_X découvert de manière fortuite est un résultat fort de cette étude, qui contribue également au potentiel adaptatif élevé de *M. larici-populina*. En effet, le fait qu'il puisse étendre son spectre d'hôte sans subir de baisse significative d'agressivité est un atout majeur pour le champignon. Un coût de virulence nul ou faible associé au gain d'une virulence avait déjà été supposé par Gérard *et al.* (2006) et Xhaard *et al.* (2011), ces derniers avançant cette hypothèse pour expliquer la persistance de la virulence 7 dans des populations collectés sur l'hôte sauvage, dont l'infection ne nécessite pas de disposer de cette virulence. Plus récemment, Fabre *et al*. (non publié) et Hayden *et al*. (en préparation) ont mis en évidence une diminution d'agressivité de *M. larici-populina* lors du contournement de la résistance R7, suivie d'un retour progressif à une valeur normale en quelques années. Ces

résultats ont montré que le gain de la virulence 7 s'est en réalité fait au prix d'un coût significatif de fitness, qui a été peu à peu compensé. L'étude du coût de la virulence X présenté dans le Chapitre 2 apporte une nouvelle pierre à l'édifice, puisque le contexte biologique nous a permis de dissocier le coût d'adaptation au nouvel hôte du coût physiologique de la virulence, en testant spécifiquement ce dernier. Nous avons ainsi montré que le gain de cette virulence X ne s'accompagne pas d'un coût physiologique de virulence. Plus généralement, cette découverte pose la question de la nature des coûts de virulence décrit chez d'autres pathosystèmes (Leonard 1969, 1977; Grant & Archer 1983; Vera Cruz *et al.* 2000; Leach *et al.* 2001; Thrall & Burdon 2003; Huang *et al.* 2006, 2010; Bahri *et al.* 2009; Janzac *et al.* 2010; Montarry *et al.* 2010; Fraile *et al.* 2011; Bruns *et al.* 2014), et de la nécessité de faire la distinction entre coût physiologique de la virulence et coût d'adaptation au nouvel hôte contourné.

Cette étude offre de nombreuses perspectives afin d'améliorer notre compréhension des paramètres qui régissent la fitness de *M. larici-populina*.

La première d'entre elles serait de tester si le gain de la virulence X s'accompagne d'un coût de virulence lié à l'adaptation au nouvel hôte contourné. Pour cela, il faudrait pouvoir caractériser l'agressivité des descendants avrX sur le cultivar 'L270-3' porteur de la résistance R_X (population virulente sur le cultivar contournée) et la comparer à l'agressivité de ces mêmes descendants sur un cultivar proche de 'L270-3' mais de phénotype r_X. Une diminution significative de l'agressivité des descendants avrX sur 'L270-3' par rapport à un cultivar proche de 'L270-3' témoignerait d'un coût de virulence lié à l'adaptation à l'hôte.

Dans un second temps, l'étude de ségrégation des facteurs de virulence réalisée dans cette étude n'a révélé aucune ségrégation des huit facteurs de virulence connus. Le panel de loci d'avirulence potentiellement cartographiables se limite donc actuellement à la virulence X découverte au cours de ces travaux. Pour pallier ce problème, une descendance issue d'une allofécondation entre deux souches présentant des pathotypes différents a été obtenue au laboratoire, descendance au sein de laquelle la probabilité d'observer une ségrégation des virulences est plus forte. De plus, les traits quantitatifs pourront également être mesurés sur cette même descendance afin d'avoir une vision plus réaliste du niveau de variabilité créé par un évènement unique de recombinaison.

Enfin, il s'avèrerait très intéressant d'affiner le jeu de données phénotypiques acquis sur la descendance actuelle, en mesurant la quantité de mycélium sous-jacente à chaque urédie. L'acquisition de ce trait représenterait une source d'informations très utiles qui

permettrait de faire le lien entre la taille des spores, la taille des lésions et la capacité de sporulation : des spores plus volumineuses engendrent-elles des urédies avec plus de mycélium sous-jacent ? Y a-t-il une corrélation entre la taille de la lésion et la quantité de mycélium ? Le taux de sporulation (nombre de spores produites/unité de surface/unité de temps) est-il corrélé à la quantité de mycélium ? Autant de questions dont les réponses permettraient de faire le lien entre traits morphologiques des spores et traits d'agressivité, ainsi qu'une meilleur compréhension des trade-offs entre traits quantitatifs.

1.3. Confrontation entre modèles théoriques et études empiriques

Les modèles théoriques et les études empiriques appliqués tant aux plantes (Vonhof & Harder 1995; Clark *et al.* 1998; Coomes & Grubb 2003; Arredondo-Nunez *et al.* 2011) qu'aux champignons phytopathogènes (Philibert *et al.* 2011; Norros *et al.* 2014) suggèrent que les individus à stratégie de dispersion présentent des formes de dispersion (graines, pollens ou spores) de plus petite taille que celles des individus à stratégie de compétition. L'étude menée dans le Chapitre 2 a mis en évidence un schéma de trade-offs cohérent avec les stratégies de compétition et de dispersion déjà décrit. En effet, la stratégie de dispersion est caractérisée par une efficacité d'infection plus faible, une latence plus élevée (agressivité faible), une capacité de sporulation plus élevée et un volume de spore plus faible (dispersion élevée) que les individus à stratégie de compétition. De plus, les travaux de Burton *et al.* (2010) ont montré que les individus à stratégie de dispersion sont présents sur le front de dispersion, ceux à stratégie de compétition se trouvant en retrait. Ainsi, l'étude de l'évolution de la taille des spores présentée au Chapitre 1 aurait dû révéler, en toute logique, une diminution du volume des spores des individus de la population migrante (présente sur le front de dispersion) par rapport à ceux de la population résidante (restée dans la zone de départ de l'épidémie). Ceci met en évidence que les schémas de stratégie des champignons phytopathogènes en lien avec les traits quantitatifs sont théoriques et ne tiennent pas compte des particularités propres au processus dispersion de chaque modèle étudié. Dans notre cas, l'épidémie annuelle comprend de nombreux cycles d'infection/dispersion, les traits d'agressivité jouant un rôle primordial au cours de chaque cycle infectieux. Les traits liés à la dispersion ne seraient donc pas les seuls à conditionner la dispersion de *M. larici-populina* au cours d'une épidémie annuelle, ce qui peut expliquer que l'on n'observe pas l'évolution phénotypique attendue. Ceci pose la nécessité de bien replacer les modèles théoriques dans

leur contexte naturel, en prenant soin de prendre en compte les particularités biologiques du modèle, particulièrement le déroulement de la phase épidémique de son cycle biologique.

1.4. Enseignements pour les stratégies de déploiement des cultivars de peuplier à résistances quantitatives

Les résultats apportés par ce travail de thèse peuvent nous amener à nous questionner sur l'efficacité des déploiements futurs des cultivars à résistances quantitatives actuellement en cours de sélection. En effet, des cas de contournement de résistances quantitatives ont déjà été observés suite au déploiement de cultivars porteurs de résistances quantitatives, dans plusieurs pathosystèmes (Andrivon *et al.* 2007; Pariaud *et al.* 2009a; Caffier *et al.* 2014; Delmotte *et al.* 2014; van den Berg *et al.* 2014), y compris dans le pathosystème peuplier - rouille (Dowkiw *et al.* 2010). Dans le cas de *M. larici-populina*, nous avons mis en évidence un fort potentiel adaptatif dans le Chapitre 2. Dans le Chapitre 1, nous avons pu observer une évolution rapide des traits morphologique des spores, au cours d'une seule épidémie annuelle couvrant une dizaine de cycles de reproduction asexuée.

De plus, il a été montré que les corrélations entre traits d'agressivité peuvent intervenir dans le contournement de résistances quantitatives déployées au champ. Particulièrement, van den Berg *et al.* (2014) ont montré que pour contourner un gène de résistance quantitative ciblant spécifiquement la capacité de sporulation (spores/unité de surface/unité de temps) intervenant dans l'expression du taux de sporulation (spores/lésion/unité de temps), le champignon peut augmenter la valeur de la taille des lésions (unité de surface) corrélée positivement au taux de sporulation. Dans le cas de *M. larici-populina*, une corrélation positive entre le taux de sporulation et la taille des lésions a également été observée. Un tel phénomène de contournement serait donc également susceptible de se produire suite au déploiement de gènes de résistance ciblant spécifiquement la capacité de sporulation.

Le couplage de ces facteurs serait donc susceptible de conférer à *M. larici-populina* la faculté de contourner à relativement court terme les gènes de résistance quantitative déployés dans le futur.

2. Carte génétique de *M. larici-populina*

Dans un premier temps, nous avons réalisé une étude pilote de la construction d'une carte génétique à haute densité de marqueurs de *M. larici-populina*, qui servira de support à la cartographie de gènes d'avirulence, ainsi que de QTL d'agressivité et de traits morphologiques des spores. Pour ce faire, cette analyse s'est basée sur les données de re-séquençage à faible couverture du génome complet de 47 descendants S1 et de la souche parentale 98AG31. Cette étude pilote a déjà permis de regrouper 83 scaffolds (parmi les 462 scaffolds initiaux que comportait la version 1 de l'assemblage de la séquence du génome de la souche 98AG31 de *M. larici-populina*) en 23 groupes de liaison. Ces résultats préliminaires montrent qu'une carte génétique à haute densité pourra être construite par cette approche innovante, et pourra être à terme utilisée pour la cartographie fine des QTL d'agressivité. De plus, nous avons pu mettre en évidence des assemblages erronés de la séquence du génome du champignon réalisée par le Joint Genome Institute (JGI) en 2006. Ceci pointe la nécessité de revoir l'assemblage du génome mis à disposition de la communauté scientifique, de manière à disposer d'une base solide pour les futures études portant sur le génome de *M. larici-populina*.

Dans un second temps, notre partenariat avec le JGI a permis de construire, à partir des données de re-séquençage de 85 descendants, la première carte génétique de *M. larici-populina* à haute densité de marqueurs, précise et robuste. Elle a permis d'identifier 18 groupes de liaison, ce qui correspond au nombre de chromosomes observés chez l'agent de la rouille du lin *Melampsora lini* (Boehm & Bushnell 1992).

2.1. Quelles utilisations ?

De manière générale, les cartes génétiques chez les champignons se révèlent être très utiles pour un grand nombre d'applications (Foulongne-Oriol 2012). En effet, elles peuvent servir à la localisation de gènes ou de loci codant des traits quantitatifs (QTL) intervenant dans l'expression de caractères présentant un intérêt économique (Foulongne-Oriol *et al.* 2012a, 2012b; Larraya *et al.* 2002, 2003) ou à de la sélection assistée par marqueurs (SAM) (Foulongne-Oriol *et al.* 2011; Kerrigan *et al.* 1992; Loftus *et al.* 2000; Sonnenberg *et al.* 2005; Okuda *et al.* 2009). Elles peuvent également servir de base pour du clonage de gènes (Linning *et al.* 2004; Gout *et al.* 2006; Fudal *et al.* 2007), pour l'analyse de l'architecture du génome (Nitta *et al.* 1997; Lee *et al.* 2008; Wittenberg *et al.* 2009) ou encore pour

l'assemblage de la séquence physique du génome (Labbé *et al.* 2008; Ellwood *et al.* 2010; Stajich *et al.* 2010). Dans notre cas particulier, la carte génétique obtenue a permis d'atteindre un second objectif autre que celui de la cartographie de QTL initialement annoncée.

En effet, même si elle n'a pas été initialement destinée à cela, la carte génétique a contribuée à l'amélioration de l'assemblage du génome de *M. larici-populina* par l'équipe du JGI. En effet, la séquence constitue une source de marqueurs pour la cartographie, alors que la cartographie est un outil qui permet d'ordonner les scaffolds au sein de chaque chromosome au cours de l'assemblage de la séquence (Foulongne-Oriol 2012). De plus, les allers-retours récurrents entre les données physiques et génétiques permettent une validation croisée, ce qui conduit à une colinéarité entre marqueurs des cartes physiques et génétiques (Labbé *et al.* 2008; Ellwood *et al.* 2010; Stajich *et al.* 2010). Cela a donc permis de générer rapidement une nouvelle version de la séquence du génome, dans laquelle les erreurs d'assemblage sont limitées, et qui servira de base à l'ensemble des futures études portant sur le génome de *M. larici-populina* (génétique, génomique, transcriptomique,…). Le nouvel assemblage du génome (Version 2) ancré sur les 18 chromosomes de *M. larici-populina* sera rendu public sur le portail du JGI après la ré-annotation du génome qui est en cours au JGI.

2.2. Les perspectives découlant des données de re-séquençage

A partir des données de re-séquençage obtenues sur les 85 descendants S1 que nous leur avons fournis, le JGI a mené un certain nombre d'analyses annexes, visant notamment à étudier l'architecture du génome. Les résultats préliminaires se sont révélés être particulièrement intéressants.

D'une part, les premières analyses ont révélé des régions présentant des points chauds (hotspots) et des points froids (coldspots) de recombinaison. Il a notamment été observé un point chaud de recombinaison d'environ 40 cM, ce qui est bien supérieur à ce qui peut être observé chez les plantes et chez la souris, le point chaud de recombinaison le plus fort ayant été estimé à 6 cM chez cette dernière. Des erreurs résiduelles d'assemblage pourraient cependant expliquer en partie de tels taux de recombinaison. De plus, des profils anormaux de ségrégation dans la descendance ont été observés dans certaines régions du génome. En effet, de larges régions présentant un excès d'individus hétérozygotes ont été mises en évidence sur les chromosomes 4 et 5. Le même constat avait été fait au cours de la vérification de la ségrégation mendélienne des 14 marqueurs microsatellites polymorphes réalisée dans le

Chapitre 3 (Pernaci *et al.* 2014). D'après ces nouvelles données, ces régions seraient visiblement associées à des gènes liés au type sexuel (codant des récepteurs aux phéromones), tel que suggéré dans des études précédentes (Terashima *et al.* 2002; Marra *et al.* 2004). Il semblerait également que le début du chromosome 3 présente des régions dans lesquelles un des trois génotypes (AA) est absent. Ceci suggère que l'haplotype A serait récessif délétère, et qu'une sélection dirigée contre les variants présentant ce génotype dans cette région s'opèrerait. A l'inverse, la fin de ce même chromosome 3 présente une fréquence anormalement élevée d'individus homozygotes BB, leur nombre étant plus important que ceux du génotype hétérozygote AB et beaucoup plus important que ceux du second génotype homozygote AA. Dans ce cas, une sélection positive pour l'haplotype B s'opèrerait, les individus présentant un seul allèle (hétérozygotes AB) étant également sélectionnés.

3. Les apports des analyses de QTL

D'une manière générale, les analyses de QTL de champignons que l'on retrouve dans la littérature visent à étudier le déterminisme des types sexuels (Xu *et al.* 1993; Forche *et al.* 2000; Terashima *et al.* 2002; Muraguchi *et al.* 2003; Kubisiak & Milgroom 2006), les incompatibilités somatiques (Lind *et al.* 2007a), le mode de reproduction (Imbernon *et al.* 1996) ou encore des traits d'intérêt économique, principalement pour les champignons comestibles. Cette dernière catégorie est particulièrement riche en études, concernant notamment la vitesse et le taux de croissance mycélienne (Foulongne-Oriol *et al.* 2012a, 2012b; Larraya *et al.* 2002, 2003) ainsi que la taille ou la couleur des carpophores (Foulongne-Oriol *et al.* 2012a; Sivolapova *et al.* 2012). Ainsi, l'intérêt porté à l'étude de QTL d'agressivité des champignons phytopathogènes a été très limité, ces caractères ayant été rarement étudiés (Lind *et al.* 2007b; Cumagun *et al.* 2004), et *a fortiori* chez les agents de rouilles. Les résultats apportés par les analyses de QTL menés dans le Chapitre 4 représentent ainsi des éléments importants dans la compréhension du déterminisme génétique des traits qualitatifs et quantitatifs d'un agent de rouille, et contribue plus largement aux connaissances acquises sur cette thématique chez d'autres champignons phytopathogènes.

Les analyses que nous avons menées nous ont permis d'une part d'identifier trois régions probablement impliquées dans l'expression de la taille des lésions, trait également étudié par Cumagun *et al.* (2004). La suite logique de ces résultats consistera à identifier le nombre de gènes qui interviennent dans l'expression de ce trait d'histoire de vie ainsi que les

familles auxquelles ils appartiennent, en se référant à la nouvelle version de l'assemblage du génome dont l'annotation devrait être conduite dans les prochains mois.

D'autre part, un locus d'avirulence vis-à-vis d'un gène de résistance qualitatif non décrit à ce jour a pu être détecté et localisé avec précision. La cartographie de ce locus d'avirulence AvrX ouvre de nombreuses perspectives d'amélioration des recherches en cours. En effet, de nombreux phytopathologistes étudient les dialogues moléculaires qui s'opèrent au cours de l'interaction entre l'hôte et le champignon, et notamment les mécanismes permettant ces échanges et leur localisation (Petre & Kamoun 2014). Pour ce faire, des gènes codants pour des effecteurs candidats sont sélectionnés *a priori* selon des critères définis (voir Hacquard *et al.* 2011 pour une synthèse). Les produits de ces gènes, identifiés comme des petites protéines sécrétées (SSP) (Hacquard *et al.* 2011, 2012; Petre *et al.* 2014; Petre & Kamoun 2014), sont synthétisés et injectés dans une plante hôte par agro-infiltration. Dans le cas de *M. larici-populina*, les tentatives d'agro-infiltration sur peuplier se sont avérées infructueuses, ce qui a conduit à mener ce type d'étude sur des plantes hôtes modèles, tels que le tabac (*Nicotiana benthamiana*). Ainsi, il a été montré très récemment chez le tabac qu'un de ces effecteurs candidats de *M. larici-populina* se localise dans les chloroplastes de la plante, qui serait le lieu de cette interaction moléculaire (Petre *et al.* 2015). Toutefois, le statut de protéine d'avirulence de ces effecteurs candidats n'a pas été démontré. L'identification du locus d'avirulence AvrX permettrait une avancée majeure sur cette thématique de recherche. En effet, la sélection de gènes candidats se faisant *a priori* selon des critères plus ou moins stringents, il est possible de retenir un trop grand ou un trop petit nombre de gènes potentiels. Ainsi, la localisation du locus d'avirulence AvrX représente un gain de temps considérable, puisqu'elle permettrait l'identification précise du gène codant l'effecteur. Pour ce faire, une première étape consistera, par analogie à ce qui a été proposé pour la taille des lésions, à rechercher les gènes présents au niveau de ce QTL, en se référant à la nouvelle version de l'assemblage du génome. Si un seul gène était identifié comme étant une SSP, il sera alors possible de le synthétiser et d'étudier avec certitude la localisation d'une protéine d'avirulence *in planta* par agro-infiltration sur tabac. Enfin, il serait également envisageable d'isoler la protéine de résistance R_X en passant un filtrat du clone 'L270-3',porteur du gène de résistance, sur une colonne d'affinité porteuse de la protéine d'avirulence correspondante. Ceci permettrait l'étude des structures primaires, secondaires et tertiaire d'une protéine de résistance du peuplier, ce qui n'a jamais été réalisé jusqu'à présent.

Conclusion

CONCLUSION

Au cours de ces travaux de thèse, nous avons étudié le lien important qui existe entre les traits d'histoire de vie d'un champignon pathogène et son évolution en réponse aux pressions de sélections exercées par le milieu, illustré chez le champignon modèle *M. larici-populina*. D'une part, nous avons montré que la sélection naturelle est à l'origine de l'évolution du volume des spores du champignon au cours de sa dispersion, révélée à l'aide d'outils moléculaires. Ceci a démontré le rôle des traits quantitatifs dans la fitness de ce champignon pathogène, que nous avons estimé d'autre part en étudiant finement les paramètres qui la conditionne, en lien avec ses traits qualitatifs et quantitatifs. Enfin, après une première étape dédiée à la construction d'une carte génétique de *M. larici-populina* à haute densité de marqueurs, nous avons pu positionner sur cette dernière un locus de virulence ainsi que trois QTL intervenant dans l'expression d'un trait d'agressivité, la taille des lésions. C'est la première fois que l'architecture génétique de traits qualitatifs et quantitatifs est mise en évidence chez une rouille.

En conclusion, grâce à l'association de la génétique quantitative et de la génétique des populations, on constate qu'une certaine indissociabilité existe entre l'évolution des champignons pathogènes et ses traits d'histoire de vie : les traits d'agressivité, dépendants de l'interaction hôte-agent pathogène et les traits morphologiques des spores, dépendants indirectement de cette dernière. Il devient donc nécessaires de combiner différentes disciplines pour estimer au mieux le potentiel adaptatif d'un champignon pathogène et identifier les traits les plus soumis à sélection, de manière à pouvoir élaborer des stratégies de gestion basées sur les résistances quantitatives supposées plus durable (Jorge *et al.* 2005; Brun *et al.* 2010; Fabre *et al.* 2012; Mundt 2014). De plus, l'avancée réalisée dans la compréhension du déterminisme génétique des traits de *M. larici-populina* consistitue une base solide pour des analyses futures, visant à identifier les bases génétiques de l'adaptation de ce champignon pathogène à son hôte. Cette question fondamentale pour la compréhension de l'évolution de l'interaction peuplier-*M. larici-populina*, qui s'inscrit dans la suite logique de ces travaux, constitue un axe de recherche majeur de l'équipe Ecologie de Champignons Pathogènes Forestier.

Bibliographie

BIBLIOGRAPHIE

Ackerman, J.D. (2002). Diffusivity in a marine macrophyte canopy: implications for submarine pollination and dispersal. *Am. J. Bot.*, 89, 1119–1127.

Agrios GN (2005) Plant Pathology. Elsevier Academic Press, Oxford.

Ahmed, H.U., Mundt, C.C., Hoffer, M.E. & Coakley, S.M. (1996). Selective influence of wheat cultivars on pathogenicity of *Mycosphaerella graminicola* (Anamorph *Septoria tritici*). *Phytopathology*, 86, 454–458.

Alabouvette, C., Brunin, B. & Louvet, J. (1974). Recherches sur la maladie du colza due à *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et De Not. IV. Pouvoir infectieux des pycnidiospores et sensibilité variétale. *Ann. Phytopathol.*, 6, 265–275.

Alizon, S., Hurford, A., Mideo, N. & Van BAALEN, M. (2009). Virulence evolution and the trade-off hypothesis: history, current state of affairs and the future. *J. Evol. Biol.*, 22, 245–259.

Andolfatto, P., Davison, D., Erezyilmaz, D., Hu, T.T., Mast, J., Sunayama-Morita, T., *et al.* (2011). Multiplexed shotgun genotyping for rapid and efficient genetic mapping. *Genome Res.*, 21, 610–617.

Andrivon, D., Pilet, F., Montarry, J., Hafidi, M., Corbière, R., Achbani, E.H., *et al.* (2007). Adaptation of *Phytophthora infestans* to partial resistance in potato: evidence from French and Moroccan populations. *Phytopathology*, 97, 338–343.

Arredondo-Nunez, A.X., Salgado, O. & Molina-Montenegro, M.A. (2011). Sphericity and smaller pollen-size are better represented in introduced rather than native plant species. *Gayana Bot.*, 68, 330–332.

Asíns, M.J. (2002). Present and future of quantitative trait locus analysis in plant breeding. *Plant Breed.*, 121, 281–291.

Au, C., Cheung, M., Wong, M., Chu, A., Law, P. & Kwan, H. (2013). Rapid genotyping by low-coverage resequencing to construct genetic linkage maps of fungi: a case study in *Lentinula edodes*. *BMC Res. Notes*, 6, 1–8.

Azzimonti, G., Marcel, T.C., Robert, O., Paillard, S., Lannou, C. & Goyeau, H. (2014). Diversity, specificity and impacts on field epidemics of QTLs involved in components

of quantitative resistance in the wheat leaf rust pathosystem. *Mol. Breed.*, 34, 549–567.

Bahri, B., Kaltz, O., Leconte, M., de Vallavieille-Pope, C. & Enjalbert, J. (2009). Tracking costs of virulence in natural populations of the wheat pathogen, *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici*. *BMC Evol. Biol.*, 9, 1–12.

Ballini, E., Morel, J.-B., Droc, G., Price, A., Courtois, B., Notteghem, J.-L., *et al.* (2008). A Genome-Wide Meta-Analysis of Rice Blast Resistance Genes and Quantitative Trait Loci Provides New Insights into Partial and Complete Resistance. *Mol. Plant. Microbe Interact.*, 21, 859–868.

Barrès, B., Dutech, C., Andrieux, A., Caron, H., Pinon, J. & Frey, P. (2006). Isolation and characterization of 15 microsatellite loci in the poplar rust fungus, *Melampsora larici-populina*, and cross-amplification in related species. *Mol. Ecol. Notes*, 6, 60–64.

Barrès, B., Halkett, F., Dutech, C., Andrieux, A., Pinon, J. & Frey, P. (2008). Genetic structure of the poplar rust fungus *Melampsora larici-populina*: Evidence for isolation by distance in Europe and recent founder effects overseas. *Infect. Genet. Evol.*, 8, 577–587.

Basten, C., Weir, B., Zeng, Z. B. (2001). QTL cartographer. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC.

Beavis, W. (1998). QTL analyses: power, precision and accuracy. In: *Mol. Dissection Complex Traits*. A.H. Paterson, Boca Raton.

Benjamini, Y. & Yekutieli, D. (2001). The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. *Ann. Stat.*, 29, 1165–1188.

Berry, D.P., Buckley, F., Dillon, P., Evans, R.D., Rath, M. & Veerkamp, R.F. (2003). Genetic parameters for body condition score, body weight, milk yield, and fertility estimated using random regression models. *J. Dairy Sci.*, 86, 3704–3717.

Blanch, P.A., Asher, M.J.C. & Burnett, J.H. (1981). Inheritance of pathogenicity and cultural characters in *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 77, 391–399.

Boehm, E.W.A. & Bushnell, W.R. (1992). An ultrastructural pachytene karyotype for *Melampsora lini*. *Phytopathology*, 82, 1212–1218.

Bonman, J.M., Bandong, J.M., Lee, Y.H. & Lee, E.J. (1989). Racespecific partial resistance to blast in temperate japonica rice cultivars. *Plant Dis.*, 73, 496–499.

Boonekamp, P. (2012). Are plant diseases too much ignored in the climate change debate? *Eur. J. Plant Pathol.*, 133, 291–294.

Bresson, A., Jorge, V., Dowkiw, A., Guerin, V., Bourgait, I., Tuskan, G.A., *et al.* (2011). Qualitative and quantitative resistances to leaf rust finely mapped within two nucleotide-binding site leucine-rich repeat (NBS-LRR)-rich genomic regions of chromosome 19 in poplar. *New Phytol.*, 192, 151–163.

Broggini, G.A.L., Bus, V.G.M., Parravicini, G., Kumar, S., Groenwold, R. & Gessler, C. (2011). Genetic mapping of 14 avirulence genes in an EU-B04 x 1639 progeny of *Venturia inaequalis*. *Fungal Genet. Biol.*, 48, 166–176.

Broman, K.W., Wu, H., Sen, Ś. & Churchill, G.A. (2003). R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics*, 19, 889–890.

Brommer, J.E., Merilä, J., Sheldon, B.C. & Gustafsson, L. (2005). Natural selection and genetic variation for reproductive reaction norms in a wild bird population. *Evolution*, 59, 1362–1371.

Bronson, C.R. & Ellingboe, A.H. (1986). The influence of four unnecessarygenes for virulence on the fitness of *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*. *Phytopathology*, 76, 154–158.

Brown, J.K.M. & Hovmøller, M.S. (2002). Aerial dispersal of pathogens on the global and continental scales and its impact on plant disease. *Science*, 297, 537–541.

Brun, H., Chèvre, A.-M., Fitt, B.D., Powers, S., Besnard, A.-L., Ermel, M., *et al.* (2010). Quantitative resistance increases the durability of qualitative resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *New Phytol.*, 185, 285–299.

Brunin, B. & Lacoste, L. (1970). Recherches sur la maladie du colza due à *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et De Not. IV. Pouvoir pathogène des ascospores. *Ann. Phytopathol.*, 2, 477–488.

Bruns, E., Carson, M.L. & May, G. (2014). The jack of all trades is master of none: a pathogen's ability to infect a greater number of host genotypes comes at a cost of delayed reproduction. *Evolution*, 68, 2453–2466.

Burton, O.J., Phillips, B.L. & Travis, J.M.J. (2010). Trade-offs and the evolution of life-histories during range expansion. *Ecol. Lett.*, 13, 1210–1220.

Caffier, V., Lasserre-Zuber, P., Giraud, M., Lascostes, M., Stievenard, R., Lemarquand, A., *et al.* (2014). Erosion of quantitative host resistance in the apple × *Venturia inaequalis* pathosystem. *Infect. Genet. Evol.*, 27, 481–489.

Calenge, F., Faure, A., Goerre, M., Gebhardt, C., Van de Weg, W.E., Parisi, L., *et al.* (2004). Quantitative trait loci (QTL) analysis reveals both broad-spectrum and isolate-specific QTL for scab resistance in an apple progeny challenged with eight isolates of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology*, 94, 370–379.

Caten, C.E. (1974). Intra-racial variation in *Phytophthora infestans* and adaptation to field resistance for potato blight. *Ann. Appl. Biol.*, 77, 259–270.

Charlsworth, B. (1987). The heritability of fitness. In: Bradbury, J. W. and Andersson, M. B. (eds) Sexual Selection. Testing the Alternatives, pp. 21-40. John Wiley, Chichester.

Charmantier, A. & Garant, D. (2005). Environmental quality and evolutionary potential: lessons from wild populations. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*, 272, 1415–1425.

Cheema, J. & Dicks, J. (2009). Computational approaches and software tools for genetic linkage map estimation in plants. *Brief. Bioinform.*, 10, 595–608.

Chin, K.M. & Wolfe, M.S. (1984). Selection on *Erysiphe graminis* in pure and mixed stands of barley. *Plant Pathol.*, 33, 535–545.

Churchill, G.A. & Doerge, R.W. (1994). Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics*, 138, 963–71.

Clark, J.S., Macklin, E. & Wood, L. (1998). Stages and spatial scales of recruitment limitation in southern appalachian forests. *Ecol. Monogr.*, 68, 213–235.

Clifford, B.C. & Clothier, R.B. (1974). Physiologic specialization of *Puccinia hordei* on barley hosts with non-hypersensitive resistance. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 63, 421–430.

Collard, B.C.Y., Jahufer, M.Z.Z., Brouwer, J.B. & Pang, E.C.K. (2005). An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica*, 142, 169–196.

Comins, H.N., Hamilton, W.D. & May, R.M. (1980). Evolutionarily stable dispersal strategies. *J. Theor. Biol.*, 82, 205–230.

Coomes, D.A. & Grubb, P.J. (2003). Colonization, tolerance, competition and seed-size variation within functional groups. *Trends Ecol. Evol.*, 18, 283–291.

Covarelli, L., Beccari, G., Tosi, L., Fabre, B. & Frey, P. (2013). Three-year investigations on leaf rust of poplar cultivated for biomass production in Umbria, Central Italy. *Biomass Bioenergy*, 49, 315–322.

Cowger, C. & Mundt, C.C. (2002). Aggressiveness of *Mycosphaerella graminicola* isolates from susceptible and partially resistant wheat cultivars. *Phytopathology*, 92, 624–630.

Cozijnsen, A.J., Popa, K.M., Purwantara, A., Rolls, B.D. & Howlett, B.J. (2000). Genome analysis of the plant pathogenic ascomycete *Leptosphaeria maculans*; mapping mating type and host specificity loci. *Mol. Plant Pathol.*, 1, 293–302.

Cronn, R., Liston, A., Parks, M., Gernandt, D.S., Shen, R. & Mockler, T. (2008). Multiplex sequencing of plant chloroplast genomes using Solexa sequencing-by-synthesis technology. *Nucleic Acids Res.*, 36.

Cruzan, M.B. (1990). Variation in pollen size, fertilization ability, and postfertilization siring ability in *Erythronium grandiflorum*. *Evolution*, 44, 843–856.

Cumagun, C.J.R., Bowden, R.L., Jurgenson, J.E., Leslie, J.F. & Miedaner, T. (2004). Genetic mapping of pathogenicity and aggressiveness of *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*) toward wheat. *Phytopathology*, 94, 520–526.

Cumagun, C.J.R., Parzies, H.K. & Miedaner, T. (2007). Genetic variation and segregation of DNA polymorphisms in *Gibberella zeae* detected with AFLP and RAPD markers. *Asian J. Plant Sci.*, 6, 1174–1181.

Dangl, J.L., Horvath, D.M. & Staskawicz, B.J. (2013). Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. *Science*, 341, 746–751.

Darvasi, A., Weinreb, A., Minke, V., Weller, J.I. & Soller, M. (1993). Detecting marker-QTL linkage and estimating QTL gene effect and map location using a saturated genetic map. *Genetics*, 134, 943–51.

Davey, J.W., Hohenlohe, P.A., Etter, P.D., Boone, J.Q., Catchen, J.M. & Blaxter, M.L. (2011). Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nat. Rev. Genet.*, 12, 499–510.

Day, T. & Otto, S.P. (1997). Fitness. *Encycl. Life Sci.*

De Lapeyre de Bellaire, L., Chillet, M., Lassois, L., Ewané, C.A., Bastiaanse, H., Jijakli, M.H., *et al.* (2009). The post-harvest quality of bananas is determined by preharvest factors. Presented at the 6th International postharvest symposium, Antalya, Turkey.

Delmas, C.E.L., Mazet, I.D., Jolivet, J., Delière, L. & Delmotte, F. (2014). Simultaneous quantification of sporangia and zoospores in a biotrophic oomycete with an automatic particle analyzer: Disentangling dispersal and infection potentials. *J. Microbiol. Methods*, 107, 169–175.

Delmotte, F., Mestre, P., Schneider, C., Kassemeyer, H.-H., Kozma, P., Richart-Cervera, S., *et al.* (2014). Rapid and multiregional adaptation to host partial resistance in a plant pathogenic oomycete: evidence from European populations of *Plasmopara viticola*, the causal agent of grapevine downy mildew. *Infect. Genet. Evol.*, 27, 500–508.

Doudrick, R., Nelson, C. & Nance, W. (1993). Genetic analysis of a single urediniospore culture of *Cronartium quercuum* f. sp. *fusiforme*, using random amplified polymorphic DNA markers. *Mycologia*, 85, 902–911.

Doudrick, R.L., Raffle, V.L., Nelson, C.D. & Furnier, G.R. (1995). Genetic analysis of homokaryons from a basidiome of *Laccaria bicolor* using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Mycol. Res.*, 99, 1361–1366.

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.

Dowkiw, A. & Bastien, C. (2007). Presence of defeated qualitative resistance genesfrequently has major impact on quantitative resistance to *Melampsora larici-populina* leaf rust in*P*.x*interamericana* hybrid poplars. *Tree Genet. Genomes*, 3, 261–274.

Dowkiw, A., Husson, C., Frey, P., Pinon, J. & Bastien, C. (2003). Partial resistance to *Melampsora larici-populina* leaf rust in hybrid poplars: genetic variability in inoculated excised leaf disk bioassay and relationship with complete resistance. *Phytopathology*, 93, 421–427.

Dowkiw, A., Voisin, E. & Bastien, C. (2010). Potential of Eurasian poplar rust to overcome a major quantitative resistance factor. *Plant Pathol.*, 59, 523–534.

Duplessis, S., Cuomo, C.A., Lin, Y.C., Aerts, A., Tisserant, E., Veneault-Fourrey, C., *et al.* (2011). Obligate biotrophy features unraveled by the genomic analysis of rust fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 108, 9166–9171.

Dutech, C., Enjalbert, J., Fournier, E., Delmotte, F., Barrès, B., Carlier, J., *et al.* (2007). Challenges of microsatellite isolation in fungi. *Fungal Genet. Biol.*, 44, 933–949.

Edelaar, P. & Bolnick, D.I. (2012). Non-random gene flow: an underappreciated force in evolution and ecology. *Trends Ecol. Evol.*, 27, 659–665.

Ellwood, S.R., Liu, Z., Syme, R.A., Lai, Z., Hane, J.K., Keiper, F., *et al.* (2010). A first genome assembly of the barley fungal pathogen *Pyrenophora teres* f. *teres*. *Genome Biol.*, 11, R109–R109.

Eshel, I. & Feldman, M.W. (1970). On the evolutionary effect of recombination. *Theor. Popul. Biol.*, 1, 88–100.

Eversmeyer, M.G., Kramer, C.L. & Browder, L.E. (1980). Effect of temperature and host-parasite combination on the latent period of *Puccinia recondita* in seedling wheat plants. *Phytopathology*, 70, 938–941.

Excoffier, L. & Ray, N. (2008). Surfing during population expansions promotes genetic revolutions and structuration. *Trends Ecol. Evol.*, 23, 347–351.

Excoffier, L., Foll, M. & Petit, R.J. (2009). Genetic consequences of range expansions. In: *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, Annual Review of Ecology Evolution and Systematics. pp. 481–501.

Fabre, F., Rousseau, E., Mailleret, L. & Moury, B. (2012). Durable strategies to deploy plant resistance in agricultural landscapes. *New Phytol.*, 193, 1064–1075.

Falconer, D. S. (1989). Introduction to Quantitative Genetics. Longman, London.

Falconer, D.S. & Mackay, T.F.C. (1996). Introduction to quantitative genetics. Longman Lond..

Ferreira, A., Silva, M.F. da, Silva, L. da C. e & Cruz, C.D. (2006). Estimating the effects of population size and type on the accuracy of genetic maps. *Genet. Mol. Biol.*, 29, 187–192.

Fisher, R. A. (1930). The genetical theory of natural selection. Clarendon Press, Oxford.

Flier, W.G. & Turkensteen, L.J. (1999). Foliar aggressiveness of *Phytophthora infestans* in three potato growing regions in the Netherlands. *Eur. J. Plant Pathol.*, 105, 381–388.

Flor, H.H. (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 9, 275–296.

Forche, A., Xu, J., Vilgalys, R. & Mitchell, T.G. (2000). Development and characterization of a genetic linkage map of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* using amplified fragment length polymorphisms and other markers. *Fungal Genet. Biol.*, 31, 189–203.

Foulongne-Oriol, M. (2012). Genetic linkage mapping in fungi: current state, applications, and future trends. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 95, 891–904.

Foulongne-Oriol, M., Dufourcq, R., Spataro, C., Devesse, C., Broly, A., Rodier, A., *et al.* (2011). Comparative linkage mapping in the white button mushroom *Agaricus bisporus* provides foundation for breeding management. *Curr. Genet.*, 57, 39–50.

Foulongne-Oriol, M., Rodier, A. & Savoie, J.-M. (2012b). Relationship between yield components and partial resistance to *Lecanicillium fungicola* in the button mushroom, *Agaricus bisporus*, assessed by quantitative trait locus mapping. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78, 2435–2442.

Foulongne-Oriol, M., Rodier, A., Rousseau, T. & Savoie, J.-M. (2012a). Quantitative trait locus mapping of yield-related components and oligogenic control of the cap color of the button mushroom, *Agaricus bisporus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78, 2422–2434.

Foulongne-Oriol, M., Spataro, C., Cathalot, V., Monllor, S. & Savoie, J.-M. (2010). An expanded genetic linkage map of an intervarietal *Agaricus bisporus* var. *bisporus* × *A. bisporus* var. *burnettii* hybrid based on AFLP, SSR and CAPS markers sheds light on the recombination behaviour of the species. *Fungal Genet. Biol.*, 47, 226–236.

Fraile, A., Pagán, I., Anastasio, G., Sáez, E. & García-Arenal, F. (2011). Rapid genetic diversification and high fitness penalties associated with pathogenicity evolution in a plant virus. *Mol. Biol. Evol.*, 28, 1425–1437.

Frank, S.A. & Slatkin, M. (1990). Evolution in a variable environment. *Am. Nat.*, 136.

Frey, P., Gérard, P.R., Feau, N., Husson, C. & Pinon, J. (2005). Variability and population biology of *Melampsora* rusts on poplars. In: *Rust Dis. Willow Poplar*. Pei, M. H., McCracken, A. R., Wallingford, UK, pp. 63–72.

Freymark, P.J., Lee, M., Woodman, W.L. & Martinson, C.A. (1993). Quantitative and qualitative trait loci affecting host-plant response to *Exserohilum turcicum* in maize (*Zea mays* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 87, 537–544.

Fudal, I., Ross, S., Gout, L., Blaise, F., Kuhn, M.L., Eckert, M.R., *et al.* (2007). Heterochromatin-like regions as ecological niches for avirulence genes in the *Leptosphaeria maculans* genome: map-based cloning of *AvrLm6*. *Mol. Plant. Microbe Interact.*, 20, 459–470.

Gandon, S. & Michalakis, Y. (2000). Evolution of parasite virulence against qualitative or quantitative host resistance. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 267, 985–990.

Gandon, S. & Michalakis, Y. (2001). Multiple causes of the evolution of dispersal. In: Causes, consequences and mechanisms of dispersal at the individual, population and community level.

Garnier-Gere, P. & Dillmann, C. (1992). A computer program for testing pairwise linkage disequilibria in subdivided populations. *J. Hered.*, 83, 239.

Garrett, S.D. (1973). Deployment of reproductive resources by plant pathogenic fungi: an application of E. J. Salisbury's generalization for flowering plants. *Acta Bot. Isl.*, 1, 1–9.

Gérard, P.R., Husson, C., Pinon, J. & Frey, P. (2006). Comparison of genetic and virulence diversity of *Melampsora larici-populina* populations on wild and cultivated poplar and influence of the alternate host. *Phytopathology*, 96, 1027–1036.

Gibson, G. & Muse S.V. (2009). A Primer of Genome Science. MA: Sinauer Associates.

Gilles, T., Fitt, B.D.L., McCartney, H.A., Papastamati, K. & Steed, J.M. (2001). The roles of ascospores and conidia of *Pyrenopeziza brassicae* in light leaf spot epidemics on winter oilseed rape (*Brassica napus*) in the UK. *Ann. Appl. Biol.*, 138, 141–152.

Gonzalez, A.M., Marcel, T.C. & Niks, R.E. (2012). Evidence for a Minor Gene-for- Minor Gene Interaction Explaining Nonhypersensitive Polygenic Partial Disease Resistance. *Phytopathology*, 102, 1086-1093.

Gonzalez-Martinez, S.C., Alia, R. & Gil, L. (2002). Population genetic structure in a Mediterranean pine (*Pinus pinaster* Ait.): a comparison of allozyme markers and quantitative traits. *Heredity*, 89, 199–206.

Goodwin, S.B., van der Lee, T.A.J., Cavaletto, J.R., te Lintel Hekkert, B., Crane, C.F. & Kema, G.H.J. (2007). Identification and genetic mapping of highly polymorphic microsatellite loci from an EST database of the septoria tritici blotch pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Fungal Genet. Biol.*, 44, 398–414.

Goudet, J. & Büchi, L. (2006). The effects of dominance, regular inbreeding and sampling design on Q_{ST}, an estimator of population differentiation for quantitative traits. *Genetics*, 172, 1337–1347.

Goudet, J. (1995). FSTAT (Version 1.2): a computer program to calculate *F*-statistics. *J. Hered.*, 86, 485–486.

Gout, L., Fudal, I., Kuhn, M.-L., Blaise, F., Eckert, M., Cattolico, L., *et al.* (2006). Lost in the middle of nowhere: the *AvrLm1* avirulence gene of the Dothideomycete *Leptosphaeria maculans*. *Mol. Microbiol.*, 60, 67–80.

Gout, L., Kuhn, M.L., Vincenot, L., Bernard-Samain, S., Cattolico, L., Barbetti, M., *et al.* (2007). Genome structure impacts molecular evolution at the *AvrLm1* avirulence locus of the plant pathogen *Leptosphaeria maculans*. *Environ. Microbiol.*, 9, 2978–2992.

Goyeau, H., Park, R., Schaeffer, B. & Lannou, C. (2006). Distribution of pathotypes with regard to host cultivars in french wheat leaf rust populations. *Phytopathology*, 96, 264–273.

Grant, M.W. & Archer, S.A. (1983). Calculation of selection coefficient against unnecessary genes for virulence from field data. *Phytopathology*, 73, 547–551.

Groth, J.V. (1976). Multilines and “super races” - a simple model. *Phytopathology*, 66, 937–939.

Guindon, S. & Gascuel, O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.*, 52, 696–704.

Gustafsson, L. (1986). Lifetime reproductive success and heritability: empirical support for Fisher’s fundamental theorem. *Am. Nat.*, 761–764.

Hackett, C. (2002). Statistical methods for QTL mapping in cereals. *Plant Mol. Biol.*, 48, 585–599.

Hacquard, S., Delaruelle, C., Frey, P., Tisserant, E., Kohler, A. & Duplessis, S. (2013). Transcriptome analysis of poplar rust telia reveals overwintering adaptation and tightly coordinated karyogamy and meiosis processes. *Front. Plant Sci.*, 4.

Hacquard, S., Joly, D.L., Lin, Y.-C., Tisserant, E., Feau, N., Delaruelle, C., *et al.* (2012). A comprehensive analysis of genes encoding small secreted proteins identifies candidate effectors in *Melampsora larici-populina* (poplar leaf rust). *Mol. Plant. Microbe Interact.*, 25, 279–293.

Hacquard, S., Petre, B., Frey, P., Hecker, A., Rouhier, N. & Duplessis, S. (2011). The poplar-poplar rust interaction: insights from genomics and transcriptomics. *J. Pathog.*, 2011.

Hahn, M. (2000). The Rust Fungi. In: *Fungal Pathol.* (ed. Kronstad, J.W.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 267 – 306.

Hahn, M.W., Zhang, S.V. & Moyle, L.C. (2014). Sequencing, assembling, and correcting draft genomes using recombinant populations. *G3 GenesGenomesGenetics*, 4, 669–679.

Haldane, J. (1919). The combination of linkage values, and the calculation of distance between the loci of linked factors. *J Genet*, 8, 299–309.

Haley, C. & Andersson, L. (1997). Linkage mapping of quantitative trait loci in plants and animals, pp. 49–71. In: P. Dear (Ed.), Genome mapping–A practical approach, Oxford University Press, New York.

Hall, S.R., Becker, C.R., Duffy, M.A. & Caceres, C.E. (2010). Variation in resource acquisition and use among host clones creates key epidemiological trade-offs. *Am. Nat.*, 167, 557–565.

Hamid, A.H., Ayers, J.E., Schein, R.D. & Hill, R.R. (1982). Components of fitness attributes in *Cochliobolus carbonum* race 3. *Phytopathology*, 72, 1166–1169.

Hamilton, W.D. & May, R.M. (1977). Dispersal in stable habitats. *Nature*, 269, 578–581.

Hangartner, S., Laurila, A. & Räsänen, K. (2011). Adaptative divergence in moor frog (*Rana arvalis*) populations along an acidification gradient: inferences from Q_{ST}-F_{ST} correlations. *Evolution*, 66, 867–881.

Hanski, I., Breuker, C.J., Schöps, K., Setchfield, R. & Nieminen, M. (2002). Population history and life history influence the migration rate of female Glanville fritillary butterflies. *Oikos*, 98, 87–97.

Hanski, I., Erälahti, C., Kankare, M., Ovaskainen, O. & Sirén, H. (2004). Variation in migration propensity among individuals maintained by landscape structure. *Ecol. Lett.*, 7, 958–966.

Hartl, D. & Jones, E. (2001). Genetics: analysis of genes and genomes, Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, MA.

Hawthorne, B.T., Ball, R.D. & Rees-George, J. (1994). Genetic analysis of variation of pathogenicity in *Nectria haematococca* (*Fusarium solani*) on *Cucurbita* sp. *Mycol. Res.*, 98, 1183–1191.

Heilman, P. (1999). Planted forests: poplars. *New For.*, 17, 89–93.

Heraudet, V., Salvaudon, L. & Shykoff, J.A. (2008). Trade-off between latent period and transmission success of a plant pathogen revealed by phenotypic correlations. *Evol. Ecol. Res.*, 10, 913–924.

Hill, J.P. & Nelson, R.R. (1982). The heritability of three parasitic fitness attributes of *Helminthosporium maydis* race T. *Phytopathology*, 72, 525–528.

Hill, W.G., Goddard, M.E. & Visscher, P.M. (2008). Data and theory point to mainly additive genetic variance for complex traits. *PLoS Genet*, 4, e1000008.

Huang, X., Kurata, N., Wei, X., Wang, Z.-X., Wang, A., Zhao, Q., *et al.* (2012). A map of rice genome variation reveals the origin of cultivated rice. *Nature*, 490, 497–501.

Huang, X.H., Feng, Q., Qian, Q., Zhao, Q., Wang, L., Wang, A.H., *et al.* (2009). High-throughput genotyping by whole-genome resequencing. *Genome Res.*, 19, 1068–1076.

Huang, Y.-J., Balesdent, M.-H., Li, Z.-Q., Evans, N., Rouxel, T. & Fitt, B.L. (2010). Fitness cost of virulence differs between the *AvrLm1* and *AvrLm4* loci in *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker of oilseed rape). *Eur. J. Plant Pathol.*, 126, 279–291.

Huang, Y.-J., Evans, N., Fitt, B.D.L., Li, Z.-Q., Rouxel, T. & Balesdent, M.-H. (2006). Fitness cost associated with loss of the *AvrLm4* avirulence function in *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker of oilseed rape). In: *Sustain. Strateg. Manag. IBrassica*

Napusi Oilseed Rape Resist. ILeptosphaeria Maculansi Phoma Stem Canker (eds. Fitt, B.D.L., Evans, N., Howlett, B.J. & Cooke, B.M.). Springer Netherlands, pp. 77–89.

Hughes, A.L. & Nei, M. (1988). Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class I loci reveals overdominant selection. *Nature*, 335, 167–170.

Hughes, C.L., Dytham, C. & Hill, J.K. (2007). Modelling and analysing evolution of dispersal in populations at expanding range boundaries. *Ecol. Entomol.*, 32, 437–445.

Hussein, T., Norros, V., Hakala, J., Petäjä, T., Aalto, P.P., Rannik, U., *et al.* (2013). Species traits and inertial deposition of fungal spores. *J. Aerosol Sci.*, 61, 81–98.

Husson, C., Ioos, R., Andrieux, A. & Frey, P. (2013). Development and use of new sensitive molecular tools for diagnosis and detection of *Melampsora* rusts on cultivated poplar. *For. Pathol.*, 43, 1–11.

Imbernon, M., Callac, P., Gasqui, P., Kerrigan, R.W. & Velcko, A.J. (1996). BSN, the primary determinant of basidial spore number and reproductive mode in *Agaricus bisporus*, maps to chromosome I. *Mycologia*, 88, 749–761.

Imbert, E. & Lefèvre, F. (2003). Dispersal and gene flow of *Populus nigra* (Salicaceae) along a dynamic river system. *J. Ecol.*, 91, 447–456.

Jackson, S. & Lyford, M. (1999). Pollen dispersal models in quaternary plant ecology: assumptions, parameters, and prescriptions. *Bot. Rev.*, 65, 39–75.

Jakobsson, A. & Eriksson, O. (2003). Trade-offs between dispersal and competitive ability: a comparative study of wind-dispersed Asteraceae forbs. *Evol. Ecol.*, 17, 233–246.

Jansen, R.C. & Stam, P. (1994). High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. *Genetics*, 136, 1447–1455.

Jansen, R.C. (1993). Interval mapping of multiple quantitative trait loci. *Genetics*, 135, 205–211.

Janzac, B., Montarry, J., Palloix, A., Navaud, O. & Moury, B. (2010). A point mutation in the polymerase of *potato virus* Y confers virulence toward the *Pvr4* resistance of pepper and a high competitiveness cost in susceptible cultivar. *Mol. Plant. Microbe Interact.*, 23, 823–830.

Jarosz, D.F., Taipale, M. & Lindquist, S. (2010). Protein homeostasis and the phenotypic manifestation of genetic diversity: principles and mechanisms. *Annu. Rev. Genet.*, 44, 189–216.

Jinks, J.L. & Grindle, M. (1963). Changes induced by training in *Phytophthora infestans*. *Heredity*, 18, 245–264.

Johnson, D.A. (1980). Effect of low temperature on the latent period of slow and fast rusting winter wheat genotypes. *Plant Dis.*, 64, 1006–1008.

Johnson, R. (1979). The concept of durable resistance. *Phytopathology*, 69, 198–199.

Jones, N., Ougham, H., Thomas, H. & Pašakinskienė, I. (2009). Markers and mapping revisited: finding your gene. *New Phytol.*, 183, 935–966.

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.

Jurgenson, J.E., Bowden, R.L., Zeller, K.A., Leslie, J.F., Alexander, N.J. & Plattner, R.D. (2002a). A genetic map of *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*). *Genetics*, 160, 1451–1460.

Jurgenson, J.E., Zeller, K.A. & Leslie, J.F. (2002b). Expanded genetic map of *Gibberella moniliformis* (*Fusarium verticillioides*). *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 1972–1979.

Kardin, M.K. & Groth, J.V. (1989). Density-dependent fitness interactions in the bean rust fungus. *Phytopathology*, 79, 409–412.

Karolewski, Z., Evans, N., Fitt, B.D.L., Todd, A.D. & Baierl, A. (2002). Sporulation of *Pyrenopeziza brassicae* (light leaf spot) on oilseed rape (*Brassica napus*) leaves inoculated with ascospores or conidia at different temperatures and wetness durations. *Plant Pathol.*, 51, 654–665.

Kaye, C., Milazzo, J., Rozenfeld, S., Lebrun, M.-H. & Tharreau, D. (2003). The development of simple sequence repeat markers for *Magnaporthe grisea* and their integration into an established genetic linkage map. *Fungal Genet. Biol.*, 40, 207–214.

Kearsey, M. & Pooni, H. (1996). The genetical analysis of quantitative traits. Chapman & Hall, London.

Keller, S.R. & Taylor, D.R. (2008). History, chance and adaptation during biological invasion: separating stochastic phenotypic evolution from response to selection. *Ecol. Lett.*, 11, 852–866.

Kema, G.H.J., Goodwin, S.B., Hamza, S., Verstappen, E.C.P., Cavaletto, J.R., Van der Lee, T.A.J., *et al.* (2002). A combined amplified fragment length polymorphism and randomly amplified polymorphism DNA genetic linkage map of *Mycosphaerella graminicola*, the septoria tritici leaf blotch pathogen of wheat. *Genetics*, 161, 1497–1505.

Kerrigan, R.W., Baller, L.M., Horgen, P.A. & Anderson, J.B. (1992). Strategies for the efficient recovery of *Agaricus bisporus* homokaryons. *Mycologia*, 84, 575–579.

Kerrigan, R.W., Royer, J.C., Baller, L.M., Kohli, Y., Horgen, P.A. & Anderson, J.B. (1993). Meiotic behavior and linkage relationships in the secondarily homothallic fungus *Agaricus bisporus*. *Genetics*, 133, 225–36.

Knott, E.A. & Mundt, C.C. (1991). Latent period and infection efficiency of *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* populations isolated from different wheat cultivars. *Phytopathology*, 81, 435–439.

Kokko, H. & López-Sepulcre, A. (2006). From individual dispersal to species ranges: perspectives for a changing world. *Science*, 313, 789–791.

Kolmer, J.A. & Leonard, K.J. (1986). Genetic selection and adaptation of *Cochliobolus heterostrophus* to corn hosts with partial resistance. *Phytopathology*, 76, 774–777.

Kolmer, J.A. (1993). Selection in a heterogeneous population of *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*. *Phytopathology*, 83, 909–914.

Kosambi, D.D. (1943). The estimation of map distances from recombination values. *Ann. Eugen.*, 12, 172–175.

Kou, Y. & Wang, S. (2010). Broad-spectrum and durability: understanding of quantitative disease resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 13, 181–185.

Kubisiak, T.L. & Milgroom, M.G. (2006). Markers linked to vegetative incompatibility (vic) genes and a region of high heterogeneity and reduced recombination near the mating type locus (MAT) in *Cryphonectria parasitica*. *Fungal Genet. Biol.*, 43, 453–463.

Kubisiak, T.L., Anderson, C.L., Amerson, H.V., Smith, J.A., Davis, J.M. & Nelson, C.D. (2011). A genomic map enriched for markers linked to Avr1 in *Cronartium quercuum* f.sp. *fusiforme*. *Fungal Genet. Biol.*, 48, 266–274.

Kuparinen, A., Markkanen, T., Riikonen, H. & Vesala, T. (2007). Modeling air-mediated dispersal of spores, pollen and seeds in forested areas. *Ecol. Model.*, 208, 177–188.

Kussell, E. & Leibler, S. (2005). Phenotypic Diversity, Population Growth, and Information in Fluctuating Environments. *Science*, 309, 2075–2078.

Labbé, J., Zhang, X., Yin, T., Schmutz, J., Grimwood, J., Martin, F., *et al.* (2008). A genetic linkage map for the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* and its alignment to the whole-genome sequence assemblies. *New Phytol.*, 180, 316–328.

Labbé, P., Berticat, C., Berthomieu, A., Unal, S., Bernard, C., Weill, M., *et al.* (2007). Forty years of erratic insecticide resistance evolution in the mosquito *Culex pipiens*. *Plos Genet.*, 3, 2190–2199.

Laine, A.-L. & Barrès, B. (2013). Epidemiological and evolutionary consequences of life-history trade-offs in pathogens. *Plant Pathol.*, 62, 96–105.

Laine, A.-L. (2008). Temperature-mediated patterns of local adaptation in a natural plant–pathogen metapopulation. *Ecol. Lett.*, 11, 327–337.

Lambert, D.H. & Currier, A.I. (1997). Differences in tuber rot development for North American clones of *Phytophthora infestans*. *Am. Potato J.*, 74, 39–43.

Lambrechts, L., Fellous, S. & Koella, J.C. (2006). Coevolutionary interactions between host and parasite genotypes. *Trends Parasitol.*, 22, 12–16.

Lande, R. & Shannon, S. (1996). The role of genetic variation in adaptation and population persistence in a changing environment. *Evolution*, 50, 434–437.

Lander, E.S. & Botstein, D. (1989). Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics*, 121, 185–99.

Lander, E.S., Green, P., Abrahamson, J., Barlow, A., Daly, M.J., Lincoln, S.E., *et al.* (1987). MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics*, 1, 174–181.

Lannou, C. (2012). Variation and selection of quantitative traits in plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 50, 319–338.

Larraya, L.M., Alfonso, M., Pisabarro, A.G. & Ramírez, L. (2003). Mapping of genomic regions (quantitative trait loci) controlling production and quality in industrial cultures of the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 3617–3625.

Larraya, L.M., Idareta, E., Arana, D., Ritter, E., Pisabarro, A.G. & Ramírez, L. (2002). Quantitative trait loci controlling vegetative growth rate in the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 1109–1114.

Larraya, L.M., Pérez, G., Ritter, E., Pisabarro, A.G. & Ramírez, L. (2000). Genetic linkage map of the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 5290–5300.

Larson, P.R. & Isebrands, J.G. (1971). The plastochron index as applied to developmental studies of cottonwood. *Can. J. For. Res.*, 1, 1–11.

Leach, J.E., Cruz, C.M.V., Bai, J.F. & Leung, H. (2001). Pathogen fitness penalty as a predictor of durability of disease resistance genes. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 39, 187–224.

Lee, J., Jurgenson, J.E., Leslie, J.F. & Bowden, R.L. (2008). Alignment of genetic and physical maps of *Gibberella zeae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74, 2349–2359.

Legionnet, A., Muranty, H. & Lefevre, F. (1999). Genetic variation of the riparian pioneer tree species *Populus nigra*. II. Variation in susceptibility to the foliar rust *Melampsora larici-populina*. *Heredity*, 82, 318–327.

Lehman, J.S. & Shaner, G. (1996). Genetic variation in latent period among isolates of *Puccinia recondita* f.sp. *tritici* on partially resistant wheat cultivars. *Phytopathology*, 86, 633–641.

Lehman, J.S. & Shaner, G. (1997). Selection of populations of *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* for shortened latent period on a partially resistant wheat cultivar. *Phytopathology*, 87, 170–176.

Lehman, J.S. & Shaner, G. (2007). Heritability of latent period estimated from wild-type and selected populations of *Puccinia triticina*. *Phytopathology*, 97, 1022–1029.

Leigh, E.G. (1970). Natural selection and mutability. *Am. Nat.*, 104, 301–305.

Leinonen, T., O'Hara, R.B., Cano, J.M. & Merilä, J. (2008). Comparative studies of quantitative trait and neutral marker divergence: a meta-analysis. *J. Evol. Biol.*, 21, 1–17.

Lendenmann, M.H., Croll, D., Stewart, E.L. & McDonald, B.A. (2014). Quantitative trait locus mapping of melanization in the plant pathogenic fungus *Zymoseptoria tritici*. *G3 GenesGenomesGenetics*, 4, 2519–2533.

Lenormand, T. & Otto, S.P. (2000). The evolution of recombination in a heterogeneous environment. *Genetics*, 156, 423–438.

Leonard, K.J. & Szabo, L.J. (2005). Stem rust of small grains and grasses caused by *Puccinia graminis*. *Mol. Plant Pathol.*, 6, 99–111.

Leonard, K.J. (1969). Selection in heterogeneous populations of *Puccinia graminis* f.sp. *avenae*. *Phytopathology*, 59, 1851–57.

Leonard, K.J. (1977). Virulence, temperature optima, and competitive abilities of isolines of races T and O of Bipolaris maydis. *Phytopathology*, 67, 1273–1279.

Lepoivre, P. (2003). Phytopathologie: bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte. De Boeck Supérieur. Louvain-la-Neuve.

Leroux, P., Albertini, C., Gautier, A., Gredt, M. & Walker, A.-S. (2007). Mutations in the CYP51 gene correlated with changes in sensitivity to sterol 14α-demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Manag. Sci.*, 63, 688–698.

Levin, B.R., Perrot, V. & Walker, N. (2000). Compensatory mutations, antibiotic resistance and the population genetics of adaptive evolution in bacteria. *Genetics*, 154, 985–997.

Li, H. & Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics*, 25, 1754–1760.

Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., *et al.* (2009). The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25, 2078–2079.

Li, H., Sivasithamparam, K., Barbetti, M.J. & Kuo, J. (2004). Germination and invasion by ascospores and pycnidiospores of *Leptosphaeria maculans* on spring-type *Brassica napus* canola varieties with varying susceptibility to blackleg. *J. Gen. Plant Pathol.*, 70, 261–269.

Lincoln, S., Daly, M. & Lander, E.S. (1993). Mapping genes controlling quantitative traits using MAPMAKER/QTL. Version 1.1. In: Whitehead Inst. Biomed. Res. Tech. Rep. 2nd Edn.

Lind, M., Dalman, K., Stenlid, J., Karlsson, B. & Olson, A. (2007b). Identification of quantitative trait loci affecting virulence in the basidiomycete *Heterobasidion annosum* s.l. *Curr. Genet.*, 52, 35–44.

Lind, M., Olson, Å. & Stenlid, J. (2005). An AFLP-markers based genetic linkage map of *Heterobasidion annosum* locating intersterility genes. *Fungal Genet. Biol.*, 42, 519–527.

Lind, M., Stenlid, J. & Olson, Å. (2007a). Genetics and QTL mapping of somatic incompatibility and intraspecific interactions in the basidiomycete *Heterobasidion annosum s.l. Fungal Genet. Biol.*, 44, 1242–1251.

Lind, M.I. & Johanssen, F. (2007). The degree of adaptive phenotypic plasticity is correlated with the spatial environmental heterogeneity experienced by island populations of *Rana temporaria*. *J. Evol. Biol.*, 20, 1288–1297.

Lindhout, P. (2002). The perspectives of polygenic resistance in breeding for durable disease resistance. *Euphytica*, 124, 217–226.

Linning, R., Lin, D., Lee, N., Abdennadher, M., Gaudet, D., Thomas, P., *et al.* (2004). Marker-based cloning of the region containing the *UhAvr1* avirulence gene from the basidiomycete barley pathogen *Ustilago hordei*. *Genetics*, 166, 99–111.

Liu, B. (1998). Statistical genomics: linkage, mapping and QTL Analysis CRC Press, Boca Raton.

Loftus, M., Bouchti-King, L. & Robles, C. (2000). Use of SCAR marker for cap color in *Agaricus bisporus* breeding programs. *Mushroom Sci.*, 15, 201–205.

Lorieux, M. (2012). MapDisto: fast and efficient computation of genetic linkage maps. *Mol. Breed.*, 30, 1231–1235.

Luna-Martínez, F., Rodríguez-Guerra, R., Victoria-Campos, M. & Simpson, J. (2007). Development of a molecular genetic linkage map for *Colletotrichum lindemuthianum* and segregation analysis of two avirulence genes. *Curr. Genet.*, 51, 109–121.

Luttikhuizen, P.C., Drent, J., Van Delden, W. & Piersma, T. (2003). Spatially structured genetic variation in a broadcast spawning bivalve: quantitative vs. molecular traits. *J. Evol. Biol.*, 16, 260–272.

Lynch, M. & Walsh, B. (1998). Genetics and analysis of quantitative traits. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts.

MacArthur, R.H. & Wilson, E.O. (1967) The Theory of Island Biogeography Princeton University Press, Princeton.

Macgregor, S., Cornes, B., Martin, N. & Visscher, P. (2006). Bias, precision and heritability of self-reported and clinically measured height in Australian twins. *Hum. Genet.*, 120, 571–580.

Manly, K.F., Cudmore, J., Robert H. & Meer, J.M. (2001). Map Manager QTX, cross-platform software for genetic mapping. *Mamm. Genome*, 12, 930–932.

Manzo-Sánchez, G., Zapater, M.-F., Luna-Martínez, F., Conde-Ferráez, L., Carlier, J., James-Kay, A., *et al.* (2008). Construction of a genetic linkage map of the fungal pathogen of banana *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of black leaf streak disease. *Curr. Genet.*, 53, 299–311.

Marcel, T.C., Gorguet, B., Ta, M.T., Kohutova, Z., Vels, A. & Niks, R.E. (2008). Isolate specificity of quantitative trait loci for partial resistance of barley to *Puccinia hordei* confirmed in mapping populations and near-isogenic lines. *New Phytol.*, 177, 743–755.

Marra, R.E., Huang, J.C., Fung, E., Nielsen, K., Heitman, J., Vilgalys, R., *et al.* (2004). A genetic linkage map of *Cryptococcus neoformans* variety *neoformans* serotype D (*Filobasidiella neoformans*). *Genetics*, 167, 619–631.

Mason, P.G. & and Huber, J.T. (2001). Biological Control Programmes in Canada, 1981–2000, Technology & Engineering. Wallingford, UK: CABI Publishing.

McDonald, B.A. & Linde, C. (2002). Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 40, 349–379.

Menzies, J.G. & MacNeill, B.H. (1987). Effect of unnecessary genes for virulence on six components of parasitic fitness in *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*. *Can. J. Plant Pathol.*, 9, 214–217.

Merilä, J. & Sheldon, B.C. (1999). Genetic architecture of fitness and nonfitness traits: empirical patterns and development of ideas. *Heredity*, 83, 103–109.

Miclot, A.-S., Wiedemann-Merdinoglu, S., Duchêne, E., Merdinoglu, D. & Mestre, P. (2012). A standardised method for the quantitative analysis of resistance to grapevine powdery mildew. *Eur. J. Plant Pathol.*, 133, 483–495.

Miller, J.S., Hamm, P.B. & Johnson, D.A. (1997). Characterization of the *Phytophthora infestans* population in the Columbia Basin of Oregon and Washington from 1992 to 1995. *Phytopathology*, 87, 656–660.

Miller, J.S., Johnson, D.A. & Hamm, P.B. (1998). Aggressiveness of isolates of *Phytophthora infestans* from the Columbia Basin of Washington and Oregon. *Phytopathology*, 88, 190–197.

Milus, E.A. & Line, R.F. (1980). Characterization of resistance to leaf rust in Pacific Northwest wheat lines. *Phytopathology*, 70, 167–172.

Milus, E.A., Seyran, E. & McNew, R. (2006). Aggressiveness of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* isolates in the south-central united states. *Plant Dis.*, 90, 847–852.

Montarry, J., Glais, I., Corbiere, R. & Andrivon, D. (2008). Adaptation to the most abundant host genotype in an agricultural plant–pathogen system – potato late blight. *J. Evol. Biol.*, 21, 1397–1407.

Montarry, J., Hamelin, F.M., Glais, I., Corbi, R. & Andrivon, D. (2010). Fitness costs associated with unnecessary virulence factors and life history traits: evolutionary insights from the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans*. *BMC Evol. Biol.*, 10:283. doi :10.1186/1471-2148-10-283.

Morais, D., Laval, V., Sache, I. & Suffert, F. (2015). Comparative pathogenicity of sexual and asexual spores of *Zymoseptoria tritici* (septoria tritici blotch) on wheat leaves. *Plant Pathol.*, doi : 10.1111/ppa.12372.

Mousseau, T.A. & Roff, D.A. (1987). Natural selection and the heritability of fitness components. *Heredity*, 59, 181–197.

Mundt, C., Cowger, C. & Garrett, K. (2002). Relevance of integrated disease management to resistance durability. *Euphytica*, 124, 245–252.

Mundt, C.C. (2014). Durable resistance: a key to sustainable management of pathogens and pests. *Infect. Genet. Evol.*, 27, 446–455.

Muraguchi, H., Ito, Y., Kamada, T. & Yanagi, S.O. (2003). A linkage map of the basidiomycete *Coprinus cinereus* based on random amplified polymorphic DNAs and restriction fragment length polymorphisms. *Fungal Genet. Biol.*, 40, 93–102.

Nelson, J. (1997). QGENE: software for marker-based genomic analysis and breeding. *Mol. Breed.*, 3, 239–245.

Nitta, N., Farman, M.L. & Leong, S.A. (1997). Genome organization of *Magnaporthe grisea*: integration of genetic maps, clustering of transposable elements and identification of genome duplications and rearrangements. *Theor. Appl. Genet.*, 95, 20–32.

Noel, F., Machon, N. & Porcher, E. (2007). No genetic diversity at molecular markers and strong phenotypic plasticity in populations of *Ranunculus nodiflorus*, an endangered plant species in France. *Ann. Bot.*, 99, 1203–1212.

Norros, V., Penttilä, R., Suominen, M. & Ovaskainen, O. (2012). Dispersal may limit the occurrence of specialist wood decay fungi already at small spatial scales. *Oikos*, 121, 961–974.

Norros, V., Rannik, Ü., Hussein, T., Petäjä, T., Vesala, T. & Ovaskainen, O. (2014). Do small spores disperse further than large spores? *Ecology*, 95, 1612–1621.

Nutman, F.J., Roberts, F.M. & Clarke, R.T. (1963). Studies on the biology of *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 46, 27–44.

Okuda, Y., Murakami, S. & Matsumoto, T. (2009). Development of STS markers suitable for marker-assisted selection of sporeless trait in oyster mushroom, *Pleurotus pulmonarius*. *Breed. Sci.*, 59, 315–319.

Olivieri, I. (2009). Alternative mechanisms of range expansion are associated with different changes of evolutionary potential. *Trends Ecol. Evol.*, 24, 289–292.

Østergård, H. (1987). Estimating relative fitness in asexually reproducing plant pathogen populations. *Theor. Appl. Genet.*, 74, 87–94.

Otto, S.P. & Barton, N.H. (1997). The Evolution of Recombination: Removing the Limits to Natural Selection. *Genetics*, 147, 879–906.

Otto, S.P. & Feldman, M.W. (1997). Deleterious Mutations, Variable Epistatic Interactions, and the Evolution of Recombination. *Theor. Popul. Biol.*, 51, 134–147.

Otto, S.P. & Michalakis, Y. (2007). The evolution of recombination in changing environments. *Trends Ecol. Evol.*, 13, 145–151.

Papaïx, J., Goyeau, H., Du Cheyron, P., Monod, H. & Lannou, C. (2011). Influence of cultivated landscape composition on variety resistance: an assessment based on wheat leaf rust epidemics. *New Phytol.*, 191, 1095–1107.

Pariaud, B., Ravigné, V., Halkett, F., Goyeau, H., Carlier, J. & Lannou, C. (2009a). Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens. *Plant Pathol.*, 58, 409–424.

Pariaud, B., Robert, C., Goyeau, H. & Lannou, C. (2009b). Aggressiveness components and adaptation to a host cultivar in wheat leaf rust. *Phytopathology*, 99, 869–878.

Pariaud, B., van den Berg, F., van den Bosch, F., Powers, S.J., Kaltz, O. & Lannou, C. (2013). Shared influence of pathogen and host genetics on a trade-off between latent period and spore production capacity in the wheat pathogen, Puccinia triticina. *Evol. Appl.*, 6, 303–312.

Paterson, A.H. (1996). Making genetic maps. In: A.H. Paterson (Ed.), Genome mapping in plants, pp. 23–39. R. G. Landes Company, San Diego, California; Academic Press, Austin, Texas.

Pedersen, C., Rasmussen, S.W. & Giese, H. (2002). A genetic map of *Blumeria graminis* based on functional genes, avirulence genes, and molecular markers. *Fungal Genet. Biol.*, 35, 235–246.

Pei, M.H., Royle, D.J. & Hunter, T. (1999). Hybridization in larch-alternating *Melampsora epitea* (*M. larici-epitea*). *Mycol. Res.*, 103, 1440–1446.

Pei, M.H., Ruiz, C., Bayon, C., Hunter, T. & Lonsdale, D. (2005). Pathogenic variation in poplar rust *Melampsora larici-populina* from England. *Eur. J. Plant Pathol.*, 111, 147–155.

Pei, M.H., Ruiz, C., Harris, J. & Hunter, T. (2003). Quantitative inoculations of poplars with *Melampsora larici-populina*. *Eur. J. Plant Pathol.*, 109, 269–276.

Pei, M.H., Ruiz, C., Hunter, T., Arnold, G.M. & Bayon, C. (2002). Quantitative relationships between inoculum of *Melampsora larici-epitea* and corresponding disease on *Salix*. *Plant Pathol.*, 51, 443–453.

Pernaci, M., De Mita, S., Andrieux, A., Pétrowski, J., Halkett, F., Duplessis, S., *et al.* (2014). Genome-wide patterns of segregation and linkage disequilibrium: the construction of a linkage genetic map of the poplar rust fungus Melampsora larici-populina. *Front. Plant Sci.*, 5.

Peters, J.L., Cnudde, F. & Gerats, T. (2003). Forward genetics and map-based cloning approaches. *Trends Plant Sci.*, 8, 484–491.

Petes, T.D. (2001). Meiotic recombination hot spots and cold spots. *Nat Rev Genet*, 2, 360–369.

Petre, B. & Kamoun, S. (2014). How do filamentous pathogens deliver effector proteins into plant cells? *PLoS Biol*, 12, e1001801.

Petre, B., Joly, D.L. & Duplessis, S. (2014). Effector proteins of rust fungi. *Front. Plant Sci.*, 5.

Petre, B., Saunders, D.G., Sklenar, J., Lorrain, C., Win, J., Duplessis, S., *et al.* (2015). Candidate effector proteins of the rust pathogen *Melampsora larici-populina* target diverse plant cell compartments. *Mol. Plant. Microbe Interact.*

Petroff, A., Mailliat, A., Amielh, M. & Anselmet, F. (2008b). Aerosol dry deposition on vegetative canopies. Part II: A new modelling approach and applications. *Atmos. Environ.*, 42, 3654–3683.

Philibert, A., Desprez-Loustau, M.-L., Fabre, B., Frey, P., Halkett, F., Husson, C., *et al.* (2011). Predicting invasion success of forest pathogenic fungi from species traits. *J. Appl. Ecol.*, 48, 1381–1390.

Phillips, B.. L., Brown, G.P., Travis, J.M.J. & Shine, R. (2008). Reid's paradox revisited: the evolution of dispersal kernels during range expansion. *Am. Nat.*, 172, S34–S48.

Phillips, B.L., Brown, G.P., Webb, J.K. & Shine, R. (2006). Invasion and the evolution of speed in toads. *Nature*, 439, 803.

Pinon, J. & Frey, P. (1997). Structure of *Melampsora larici-populina* populations on wild and cultivated poplar. *Eur. J. Plant Pathol.*, 103, 159–173.

Pinon, J. & Frey, P. (2005). Interactions between poplar clones and *Melampsora* populations and their implications for breeding for durable resistance. In: *Rust Dis. Willow Poplar*. Pei, M. H., McCracken, A. R., pp. 139–154.

Price, T. & Schluter, D. (1991). On the low heritability of life-history traits. *Evolution*, 853–861.

Pujol, B., Wilson, A.J., Ross, R.I.C. & Pannell, J.R. (2008). Are Q_{ST}–F_{ST} comparisons for natural populations meaningful? *Mol. Ecol.*, 17, 4782–4785.

Rimé, D., Robert, C., Goyeau, H. & Lannou, C. (2005). Effect of host genotype on leaf rust (*Puccinia triticina*) lesion development and urediniospore production in wheat seedlings. *Plant Pathol.*, 54, 287–298.

Riou-Nivert, P. (2001). *Le mélèze*. Institut pour le Développement Forestier.

Risch, N. (1992). Genetic linkage: interpreting lod scores. *Science*, 255, 803–804.

Ritter, E. & Salamini, F. (1996). The calculation of recombination frequencies in crosses of allogamous plant species with applications to linkage mapping. *Genet. Res.*, 67, 55–65.

Robert, C., Bancal, M.O. & Lannou, C. (2004). Wheat leaf rust uredospore production on adult plants: influence of leaf nitrogen content and Septoria tritici blotch. *Phytopathology*, 94, 712–721.

Roff, D.A. & Mousseau, T.A. (1987). Quantitative genetics and fitness: lessons from *Drosophila*. *Heredity*, 59, 103–118.

Roper, M., Pepper, R.E., Brenner, M.P. & Pringle, A. (2008). Explosively launched spores of ascomycete fungi have drag-minimizing shapes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 105, 20583–20588.

Roper, M., Seminara, A., Bandi, M.M., Cobb, A., Dillard, H.R. & Pringle, A. (2010). Dispersal of fungal spores on a cooperatively generated wind. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 107, 17474–17479.

Rousset, F. (2008). GENEPOP '007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resour.*, 8, 103–106.

Rovira-Graells, N., Gupta, A.P., Planet, E., Crowley, V.M., Mok, S., Ribas de Pouplana, L., *et al.* (2012). Transcriptional variation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Genome Res.*, 22, 925–938.

Sache, I. (1997). Effect of density and age of lesions on sporulation capacity and infection efficiency in wheat leaf rust (*Puccinia recondita* f.sp. *tritici*). *Plant Pathol.*, 46, 581–589.

Saint-Laurent, R., Legault, M. & Bernatchez, L. (2003). Divergent selection maintains high gene flow between sympatric rainbow smelt ecotypes (*Osmerus mordax* Mitchill). *Mol. Ecol.*, 12, 315–330.

Samborski, D.J. (1985). *Wheat leaf rust*. Academic press. Orlando.

Schiff, C.L., Wilson, I.W. & Somerville, S.C. (2001). Polygenic powdery mildew disease resistance in *Arabidopsis thaliana*: quantitative trait analysis of the accession Warschau-1. *Plant Pathol.*, 50, 690–701.

Schoustra, S.E., Debets, A.J.M., Slakhorst, M. & Hoekstra, R.F. (2006). Reducing the cost of resistance; experimental evolution in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *J. Evol. Biol.*, 19, 1115–1127.

Sera, B. (2008). Simple traits among diaspore weight/number, plant height and ability of vegetative propagation. *J. Integr. Plant Biol.*, 50, 1563–1569.

Shaner, G. (1980). Probits for analyzing latent period data in studies of slow rusting resistance. *Phytopathology*, 70, 1179–1182.

Shraiman, B.I. & Siggia, E.D. (2000). Scalar turbulence. *Nature*, 405, 639–646.

Sicard, D., Legg, E., Brown, S., Babu, N.K., Ochoa, O., Sudarshana, P., *et al.* (2003). A genetic map of the lettuce downy mildew pathogen, *Bremia lactucae*, constructed from molecular markers and avirulence genes. *Fungal Genet. Biol.*, 39, 16–30.

Singh, M., Ceccarelli, S. & Hamblin, J. (1993). Estimation of heritability from varietal trials data. *Theor. Appl. Genet.*, 86, 437–441.

Singh, R.P., Hodson, D.P., Huerta-Espino, J., Jin, Y., Bhavani, S., Njau, P., *et al.* (2011). The emergence of Ug99 races of the stem rust fungus is a threat to world wheat production. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 49, 465–481.

Sivolapova, A.B., Shnyreva, A.V., Sonnenberg, A. & Baars, I. (2012). DNA marking of some quantitative trait loci in the cultivated edible mushroom *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kumm. *Russ. J. Genet.*, 48, 383–389.

Slatkin, M. & Excoffier, L. (2012). Serial founder effects during range expansion: a spatial analog of genetic drift. *Genetics*, 191, 171–181.

Slatkin, M. (1985). Gene-flow in natural populations. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 16, 393–430.

Smith, C.C. & Fretwell, S.D. (1974). The optimal balance between size and number of offspring. *Am. Nat.*, 108, 499–506.

Sonnenberg, A.S.M., Baars, J.J.P., Hendrickx, P.M. & Kerrigan, R.W. (2005). Breeding mushroom: state of the art. *Acta Edulis Fungi Suppl*, 12, 163–173.

Spitze, K. (1993). Population structure in *Daphnia obtusa*: quantitative genetic and allozymic variation. *Genetics*, 135, 367–374.

Stajich, J.E., Wilke, S.K., Ahrén, D., Au, C.H., Birren, B.W., Borodovsky, M., *et al.* (2010). Insights into evolution of multicellular fungi from the assembled chromosomes of the mushroom *Coprinopsis cinerea* (*Coprinus cinereus*). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 107, 11889–11894.

Stam, P. (1993). Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: Join Map. *Plant J.*, 3, 739–744.

Storey, J.D. & Tibshirani, R. (2003). Statistical significance for genomewide studies. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100, 9440–9445.

Stukenbrock, E.H. & McDonald, B.A. (2009). Population Genetics of Fungal and Oomycete Effectors Involved in Gene-for-Gene Interactions. *Mol. Plant. Microbe Interact.*, 22, 371–380.

Subrahmanyam, P., McDonald, D. & Rao, P.V.S. (1983). Influence of host genotype on uredospore production and germinability in *Puccinia arachidis*. *Phytopathology*, 73, 726–729.

Susi, H. & Laine, A.-L. (2013). Pathogen life history trade-offs revealed in allopatry. *Evolution*, 67, 3362–3370.

Tack, A.J.M., Hakala, J., Petäjä, T., Kulmala, M. & Laine, A.-L. (2014). Genotype and spatial structure shape pathogen dispersal and disease dynamics at small spatial scales. *Ecology*, 95, 703–714.

Tack, A.J.M., Thrall, P.H., Barrett, L.G., Burdon, J.J. & Laine, A.L. (2012). Variation in infectivity and aggressiveness in space and time in wild host–pathogen systems: causes and consequences. *J. Evol. Biol.*, 25, 1918–1936.

Tanksley, S.D. (1993). Mapping polygenes. *Annu. Rev. Genet.*, 27, 205–233.

Terashima, K., Matsumoto, T., Hayashi, E. & Fukumasa-Nakai, Y. (2002). A genetic linkage map of *Lentinula edodes* (shiitake) based on AFLP markers. *Mycol. Res.*, 106, 911–917.

Thomas, C.D., Bodsworth, E.J., Wilson, R.J., Simmons, A.D., Davies, Z.G., Musche, M., *et al.* (2001). Ecological and evolutionary processes at expanding range margins. *Nature*, 411, 577–581.

Thrall, P.H. & Burdon, J.J. (2003). Evolution of virulence in a plant host-pathogen metapopulation. *Science*, 299, 1735–1737.

Toffolatti, S., Venturini, G., Maffi, D. & Vercesi, A. (2012). Phenotypic and histochemical traits of the interaction between *Plasmopara viticola* and resistant or susceptible grapevine varieties. *BMC Plant Biol.*, 12, 1–16.

Tomerlin, J.R., Eversmeyer, M.G., Kramer, C.L. & Browder, L.E. (1983). Temperature and host effects on latent and infectious periods and on urediniospore production of *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*. *Phytopathology*, 73, 414–419.

Tong, A.K.W., Kennedy, B.W. & Moxley, J.E. (1979). Heritabilities and genetic correlations for the first three lactations from records subject to culling. *J. Dairy Sci.*, 62, 1784–1790.

Travis, J.M.J. & Dytham, C. (2002). Dispersal evolution during invasions. *Evol. Ecol. Res.*, 4, 1119–1129.

Turechek, W.W. & Stevenson, K.L. (1998). Effects of host resistance, temperature, leaf wetness, and leaf age on infection and lesion development of pecan scab. *Phytopathology*, 88, 1294–1301.

Utz, H. & Melchinger, A. (1996). PLABQTL: A program for composite interval mapping of QTL. *J. Quant. Loci*, 2.

Van den Berg, F., Lannou, C., Gilligan, C.A. & van den Bosch, F. (2014). Quantitative resistance can lead to evolutionary changes in traits not targeted by the resistance QTLs. *Evol. Appl.*, 7, 370–380.

Van der Nest, M.A., Slippers, B., Steenkamp, E.T., De Vos, L., Van Zyl, K., Stenlid, J., *et al.* (2009). Genetic linkage map for *Amylostereum areolatum* reveals an association between vegetative growth and sexual and self-recognition. *Fungal Genet. Biol.*, 46, 632–641.

van der Plank, J.E. (1963). Plant diseases: epidemics and control. *Academic Press, New York.*

Vera Cruz, C.M., Bai, J., Oña, I., Leung, H., Nelson, R.J., Mew, T.-W., *et al.* (2000). Predicting durability of a disease resistance gene based on an assessment of the fitness loss and epidemiological consequences of avirulence gene mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97, 13500–13505.

Vialle, A., Frey, P., Hambleton, S., Bernier, L. & Hamelin, R.C. (2011). Poplar rust systematics and refinement of *Melampsora* species delineation. *Fungal Divers.*, 50, 227–248.

Viboud, C., Bjørnstad, O.N., Smith, D.L., Simonsen, L., Miller, M.A. & Grenfell, B.T. (2006). Synchrony, waves, and spatial hierarchies in the spread of influenza. *Science*, 312, 447–451.

Vignal, A., Milan, D., SanCristobal, M. & Eggen, A. (2002). A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet. Sel. Evol. GSE*, 34, 275–305.

Villaréal, L.M.M.A. & Lannou, C. (2000). Selection for increased spore efficacy by host genetic background in a wheat powdery mildew population. *Phytopathology*, 90, 1300–1306.

Visscher, P.M., Hill, W.G. & Wray, N.R. (2008). Heritability in the genomics era- concepts and misconceptions. *Nat Rev Genet*, 9, 255–266.

Visscher, P.M., Thompson, R. & Haley, C.S. (1996). Confidence intervals in QTL mapping by ootstrapping. *Genetics*, 143, 1013–1020.

Vonhof, M. & Harder, L. (1995). Size-number trade-offs and pollen production by papilionaceous legumes. *Am. J. Bot.*, 82, 230–238.

Voorrips, R.E. (2002). MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *J Hered*, 93, 77 – 78.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., *et al.* (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.*, 23, 4407–4414.

Waldmann, P., Garcia-Gil, M.R. & Sillanpää, M.J. (2005). Comparing Bayesian estimates of genetic differentiation of molecular markers and quantitative traits: an application to *Pinus sylvestris*. *Heredity*, 94, 623–629.

Walton, W.H. (1948). Feret's statistical diameter as a measure of particle size. *Nature*, 162, 329–330.

Weir, B. & Cockerham, C. (1984). Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38, 1358–1370.

Whitlock, M.C. (2008). Evolutionary inference from Q_{ST}. *Mol. Ecol.*, 17, 1885–1896.

Wittenberg, A.H.J., van der Lee, T.A.J., Ben M'Barek, S., Ware, S.B., Goodwin, S.B., Kilian, A., *et al.* (2009). Meiosis drives extraordinary genome plasticity in the haploid fungal plant pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *PLoS ONE*, 4, e5863.

Wray, N. & Visscher, P. (2008). Estimating trait heritability. *Nat. Educ.*, 1, 29.

Wright, S. (1951). The genetic structure of populations. *Ann. Eugen.*, 15, 323–354.

Xhaard, C., Andrieux, A., Halkett, F. & Frey, P. (2009). Characterization of 41 microsatellite loci developed from the genome sequence of the poplar rust fungus, *Melampsora larici-populina*. *Conserv. Genet. Resour.*, 1, 21–25.

Xhaard, C., Barrès, B., Andrieux, A., Bousset, L., Halkett, F. & Frey, P. (2012). Disentangling the genetic origins of a plant pathogen during disease spread using an original molecular epidemiology approach. *Mol. Ecol.*, 21, 2383–2398.

Xhaard, C., Fabre, B., Andrieux, A., Gladieux, P., Barres, B., Frey, P., *et al.* (2011). The genetic structure of the plant pathogenic fungus *Melampsora larici-populina* on its wild host is extensively impacted by host domestication. *Mol. Ecol.*, 20, 2739–2755.

Xie, W.B., Feng, Q., Yu, H.H., Huang, X.H., Zhao, Q.A., Xing, Y.Z., *et al.* (2010). Parent-independent genotyping for constructing an ultrahigh-density linkage map based on population sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 107, 10578–10583.

Xu, J. & Leslie, J.F. (1996). A genetic map of *Gibberella fujikuroi* mating population A (*Fusarium moniliforme*). *Genetics*, 143, 175–189.

Xu, J., Kerrigan, R.W., Horgen, P.A. & Anderson, J.B. (1993). Localization of the mating type gene in *Agaricus bisporus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 3044–3049.

Xu, X. (2012). Super-races are not likely to dominate a fungal population within a life time of a perennial crop plantation of cultivar mixtures: a simulation study. *BMC Ecol.*, 12, 16.

You, X., Shu, L., Li, S., Chen, J., Luo, J., Lu, J., *et al.* (2013). Construction of high-density genetic linkage maps for orange-spotted grouper *Epinephelus coioides* using multiplexed shotgun genotyping. *BMC Genet.*, 14, 113.

Young, N.D. (1996). QTL mapping and quantitative disease resistance in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 34, 479–501.

Young, N.D. (2000). Constructing a plant genetic linkage map with DNA markers. In: *DNA-Based Markers Plants*. Phillips RL, Vasil JK, Netherlands, pp. 31–37.

Yu, H.H., Xie, W.B., Wang, J., Xing, Y.Z., Xu, C.G., Li, X.H., *et al.* (2011). Gains in QTL detection using an ultra-high density SNP map based on population sequencing relative to traditional RFLP/SSR markers. *Plos One*, 6.

Zadoks J. C. & Schein, R.D. (1979). Epidemiology and plant disease management. Oxford, UK: Oxford University Press.

Zeng, Z.B. (1993). Theoretical basis for separation of multiple linked gene effects in mapping quantitative trait loci. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90, 10972–10976.

Zeng, Z.B. (1994). Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics*, 136, 1457–68.

Zhan, J., Linde, C.C., Jürgens, T., Merz, U., Steinebrunner, F. & McDonald, B.A. (2005). Variation for neutral markers is correlated with variation for quantitative traits in the plant pathogenic fungus *Mycosphaerella graminicola*. *Mol. Ecol.*, 14, 2683–2693.

Zhan, J., Mundt, C.C., Hoffer, M.E. & McDonald, B.A. (2002). Local adaptation and effect of host genotype on the rate of pathogen evolution: an experimental test in a plant pathosystem. *J. Evol. Biol.*, 15, 634–647.

Zhan, J., Stefanato, F.L. & McDonald, B.A. (2006). Selection for increased cyproconazole tolerance in *Mycosphaerella graminicola* through local adaptation and in response to host resistance. *Mol. Plant Pathol.*, 7, 259–268.

Zhou, X., Xia, Y., Ren, X., Chen, Y., Huang, L., Huang, S., *et al.* (2014). Construction of a SNP-based genetic linkage map in cultivated peanut based on large scale marker development using next-generation double-digest restriction-site-associated DNA sequencing (ddRADseq). *BMC Genomics*, 15, 1–14.

Etude des traits d'histoire de vie de *Melampsora larici-populina*, agent de la rouille du peuplier : de leur déterminisme génétique à leurs conséquences évolutives

Résumé: L'adaptation d'un champignon pathogène à son milieu, ainsi que l'évolution et la structuration des populations qui en découlent, sont fortement influencés par ses traits d'histoire de vie qui conditionnent sa fitness. C'est ce que nous avons illustré chez *Melampsora larici-populina*, l'agent de la rouille du peuplier. Ainsi, nous avons mis en évidence que le volume des spores du champignon évolue de manière répétable au cours des épidémies annuelles dans la vallée de la Durance, et ce sous l'effet de la sélection naturelle, signe que ce trait intervient directement dans le processus adaptatif du champignon. Par conséquent, les contraintes génétiques conditionnant le potentiel adaptatif du champignon en lien avec les traits d'histoire de vie ont été étudiées en laboratoire, au sein d'une descendance S1 issue de l'autofécondation d'une souche de référence. Les résultats obtenus suggèrent que *M. larici-populina* présente un potentiel adaptatif élevé. Enfin, une carte génétique à haute résolution du champignon, comprenant 18 chromosomes, a été construite afin d'étudier le déterminisme génétique de ces traits d'histoire de vie. Un locus de virulence ainsi que des QTL intervenant dans l'expression de la taille des lésions ont pu être détectés et positionnés avec précision sur cette carte. Ce travail a mis en évidence le rôle des traits quantitatifs dans l'adaptation et la structuration des populations de *M. larici-populina* en réponse aux pressions de sélection du milieu, en lui conférant un potentiel adaptatif élevée, essence de l'adaptation des organismes. Il ouvre également de nombreuses perspectives de recherche visant à identifier les bases génétiques de l'adaptation de ce champignon pathogène à son hôte, éléments indispensables à l'élaboration de stratégies de lutte durables.

Mots-clés : Champignon phytopathogène, biologie évolutive, potentiel adaptatif, génétique quantitative, cartographie génétique, cartographie de QTL.

Study of life history traits of the poplar rust fungus *Melampsora larici-populina*: from their genetic determinism to their evolutionary consequences.

Abstract: Adaptation of a phytopathogenic fungus to its environment, as well as the resulting evolution and structuration of its populations, are strongly influenced by its life history traits which condition its fitness. This is illustrated here with the poplar rust fungus *Melampsora larici-populina*. Hence, we showed that spore volume repeatedly evolved through natural selection, during annual epidemics in the Durance River valley, showing the implication of this trait in the fungus adaptive processes. Consequently, genetic constraints conditioning the adaptive potential of the fungus, in connection with life history traits, were studied in laboratory, over a progeny resulting from a selfing of a reference strain. Results suggest that *M. larici-populina* has a high adaptive potential. Finally, a high resolution genetic map of the fungus, comprising 18 chromosomes, has been built in order to study genetic determinism of these traits. One locus of virulence and three QTL involved in the expression of the lesion size were detected and accurately mapped on this map. This work emphasizes the role of quantitative traits in adaptation and structuration of *M. larici-populina* populations in response to the environmental selective pressures, by conferring an adaptive potential, the basis of organisms' adaptation. It also opens many opportunities to identify the genetic bases of adaptation of this fungus, these elements being essential for the development of sustainable strategies of disease control.

Keywords: Fungal plant pathogen, evolutionary biology, adaptive potential, quantitative genetics, genetic mapping, QTL mapping.