

E.N.S.A. de RENNES

N° d'ordre : 96-23

Série : A

N° de série : 27

THESE

Présentée devant

L'ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE DE RENNES

Pour obtenir le titre de Docteur de l'E.N.S.A.R.

Mention : Protection des cultures



par

Irénée SOMDA



La Nécrose du collet des Crucifères due à *Leptosphaeria maculans*

**Polymorphisme de l'agent pathogène et conséquences sur l'efficacité
et la durabilité potentielle de la résistance des lignées de
recombinaison Colza-Moutarde brune**

Préparée à la Station de Pathologie Végétale, I.N.R.A.-RENNES-LE RHEU

Soutenue le 20 septembre 1996 devant le jury :

M. M. Lenormand
M. J. M. Lemaire
M. J. L. Notteghem

Professeur à l'E.N.S.A., Rennes
Directeur de Recherche à l'I.N.R.A., Avignon
Directeur de Recherche au C.I.R.A.D., Montpellier

Président
Rapporteur
Rapporteur

Mme H. Brun
M. J. Citharel
M. B. Jouan
Mme L. Parisi
M. M. Renard

Ingénieur de Recherche à l'I.N.R.A., Rennes-Le Rheu
Professeur à l'Université de RENNES I, Rennes
Directeur de Recherche à l'I.N.R.A., Rennes-Le Rheu
Chargé de Recherche à l'I.N.R.A., Angers
Directeur de Recherche à l'I.N.R.A., Rennes-Le Rheu

Examineur
Examineur
Examineur
Examineur
Examineur

E.N.S.A. de RENNES

N° d'ordre : 96-23

Série : A

N° de série : 27

THESE

Présentée devant

L'ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE DE RENNES

Pour obtenir le titre de Docteur de l'E.N.S.A.R.

Mention : Protection des cultures

par

Irénée SOMDA

La Nécrose du collet des Crucifères due à *Leptosphaeria maculans*

**Polymorphisme de l'agent pathogène et conséquences sur l'efficacité
et la durabilité potentielle de la résistance des lignées de
recombinaison Colza-Moutarde brune**

Préparée à la Station de Pathologie Végétale, I.N.R.A.-RENNES-LE RHEU

Soutenue le 20 septembre 1996 devant le jury :

M. M. Lenormand	Professeur à l'E.N.S.A., Rennes	Président
M. J. M. Lemaire	Directeur de Recherche à l'I.N.R.A., Avignon	Rapporteur
M. J. L. Notteghem	Directeur de Recherche au C.I.R.A.D., Montpellier	Rapporteur
Mme H. Brun	Ingénieur de Recherche à l'I.N.R.A., Rennes-Le Rheu	Examineur
M. J. Citharel	Professeur à l'Université de RENNES I, Rennes	Examineur
M. B. Jouan	Directeur de Recherche à l'I.N.R.A., Rennes-Le Rheu	Examineur
Mme L. Parisi	Chargé de Recherche à l'I.N.R.A., Angers	Examineur
M. M. Renard	Directeur de Recherche à l'I.N.R.A., Rennes-Le Rheu	Examineur

"La rédaction d'un rapport représente une aventure qui n'est pas sans dangers; une fois le point final apposé, ce document devient le travail sur le terrain et entame une carrière autonome, indépendante de celle de son auteur. A partir de ce moment, impossible d'interpréter d'une autre façon ce qui a été fait : l'expérience est empaquetée, scellée" (N. Barley cité par Le Hir, 1996).

A mes parents,

REMERCIEMENTS

Ces travaux de thèse sont réalisés à la Station de Pathologie Végétale de l'INRA-Rennes-Le Rheu sous la direction de M. B. Jouan, Directeur de recherches. Je suis heureux de lui exprimer mes sentiments de sincère gratitude pour avoir accepté de m'accueillir dans sa station et de mettre à ma disposition les moyens matériels nécessaires à la réalisation de mes travaux. Malgré ses multiples tâches administratives, il a accepté de diriger ma thèse. C'est pour moi un agréable devoir de lui rendre ce témoignage.

Ma plus profonde reconnaissance s'adresse à Mme H. Brun, responsable scientifique de ma thèse. Elle a su toujours me faire confiance et m'a fait bénéficier de son expérience, de ses connaissances et de ses conseils durant ces années de recherches.

Etre rapporteur, je m'en doute, demande dévouement et disponibilité. M. J.-L. Notteghem et M. J. M. Lemaire ont bien voulu s'adonner à cette tâche. J'en suis très honoré. Par ailleurs, M. J. M. Lemaire m'a prodigué des conseils très constructifs et fait des suggestions qui m'ont été très utiles dans la rédaction de la thèse. Je ne saurais lui dire combien je lui suis reconnaissant.

M. M. Renard, responsable du laboratoire Colza de la Station d'Amélioration des plantes, a suivi avec beaucoup d'attention le déroulement de mes travaux. Ce travail n'aurait pu être réalisé sans le matériel végétal qu'il a bien voulu nous fournir. En plus, il a accepté de faire partie du jury de ma thèse. Qu'il trouve dans le présent rapport le gage de toute ma reconnaissance.

J'aurai également un grand remerciement à adresser à Mme L. Parisi, membre du comité de pilotage de ma thèse, d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse et pour ses conseils sur mon programme de recherches.

M. M. Lenormand, professeur à l'ENSAR, a accepté de juger mon travail. Il s'est toujours montré disponible et m'a fait partager son expérience et ses connaissances dans le domaine de la Pathologie Végétale. Je lui en sais gré.

M. J. Citharel, professeur à l'Université de Rennes I, a accepté d'être membre du jury. Je lui en suis obligé.

Le CETIOM, à travers M. Y. Régnault puis Mme A. Pénaud et M. A. Pérez, a montré son attachement à mes travaux par le soutien financier qu'il m'a accordé. Qu'il trouve ici l'expression de mes vifs remerciements. La société PROMOSOL m'a également soutenu financièrement au cours de la dernière année de thèse. Qu'il me soit permis de la remercier vivement pour cette aide.

L'heure est venue de remercier tous ceux qui, de près ou de loin, m'ont apporté leur soutien de toute nature au cours de ces années de recherches.

Il m'est tout particulièrement agréable de pouvoir enfin dire mes sincères remerciements à MM. F. Rouxel, D. Andrivon, A. Somé, L. Saur et à Mmes A. M. Chèvre et R. Delourme, qui pour les conseils judicieux prodigués, qui d'autres pour la lecture critique de mes documents scientifiques et qui d'autres enfin, pour les analyses de mes données. Que chacun trouve ici l'expression de ma sincère amitié.

Quatre ans déjà et que de très bons souvenirs, sel de ma mémoire envahie par tant de moments difficiles mais oh! combien formateurs.

De très nombreux amis m'ont gratifié de leurs aides et encouragements au cours de ce travail et surtout pendant la période de rédaction. Parmi eux, je réserve le témoignage de ma très vive reconnaissance à mes collègues du 'trou' (M.L. Gac, G. Garry), à C. Béasse, S. Bekal, G. Blondel, K. Bouchek, C. Campion, L. Lebreton, S. Levivier, S. Méda, M. R. Méda, A. Mouton, S. Roussel et S. S. Saloum.

Merci, Michel et Armelle Brégeon pour la saisie des références bibliographiques. Ceci te demandait de la patience, Michel, et à toi Armelle, de la dextérité. Ensemble, vous avez su mener à bien cette tâche ingrate, je l'avoue. Pour ce dévouement, je vous dis doublement merci.

A mes parents et amis, j'adresse mes vifs remerciements pour la patience dont ils ont fait preuve durant ma si longue absence.

Je ne saurais oublier de rendre témoignage de la sympathique atmosphère de travail, de la gentillesse et de la disponibilité dont le personnel de la Station de Pathologie Végétale et du laboratoire Colza de la Station d'Amélioration des Plantes a fait preuve à mon égard.

A tous et à chacun, je réitère ma profonde amitié et mes sincères remerciements.

SOMMAIRE

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE ET PRESENTATION DE L'ETUDE	1
INTRODUCTION GENERALE	1
PRESENTATION DU SUJET	4
DONNEES GENERALES SUR LE PATHOSYSTEME <i>L. MACULANS</i>- <i>BRASSICA</i> SPP.	
Chapitre 1 : LE COLZA	6
Chapitre 2 : <i>LEPTOSPHERAERIA MACULANS</i>, AGENT DE LA NECROSE DU COLLET DES CRUCIFERES	12
Chapitre 3 : METHODES DE LUTTE	24
Chapitre 4 : DURABILITE DE LA RESISTANCE	28
MATERIEL ET METHODES	31
RESULTATS ET DISCUSSION	
PREMIERE PARTIE : EFFETS DE LA RESISTANCE D'ORIGINE MOUTARDE BRUNE SUR LA STRUCTURE DES POPULATIONS DE <i>L. MACULANS</i>	44
INTRODUCTION	45
Chapitre 1 : POLYMORPHISME CULTURAL, ENZYMATIQUE ET POUVOIR PATHOGENE DES SOUCHES DE <i>LEPTOSPHERAERIA MACULANS</i> ISOLEES DE <i>BRASSICA JUNCEA</i> CV. <i>PICRA</i>	46
Chapitre 2 : ANALYSE COMPAREE DES POPULATIONS ISOLEES DE LA LIGNEE MX, DU COLZA ET D'AUTRES CRUCIFERES CULTIVEES ET ADVENTICES	57
CONCLUSION DE LA PREMIERE PARTIE	75
DEUXIEME PARTIE : DETERMINISME GENETIQUE DE LA REPRODUCTION SEXUEE ET CARACTERISATION DE TETRADES NATURELLES DES GROUPES A ET B DE <i>L. MACULANS</i>	77
INTRODUCTION	78
Chapitre 1 : HETEROHALLISME BIPOLAIRE ET POLYMORPHISME ESTERASIQUE A L'INTERIEUR ET ENTRE DES TETRADES DU GROUPE B (NON-AGRESSIF) DE <i>LEPTOSPHERAERIA MACULANS</i>	80
Chapitre 2 : VARIABILITE CULTURALE ET BIOLOGIQUE DES TETRADES DES GROUPES A ET B ISOLEES DE <i>BRASSICA JUNCEA</i> CV. <i>PICRA</i>	91
CONCLUSION DE LA DEUXIEME PARTIE	98
TROISIEME PARTIE : ANALYSE DE LA RESISTANCE DES LIGNEES DE RECOMBINAISON COLZA-MOUTARDE BRUNE VIS-A-VIS DE <i>LEPTOSPHERAERIA MACULANS</i>	99
INTRODUCTION	100
Chapitre 1 : CARACTERISATION DE LA RESISTANCE DE DEUX LIGNEES DE RECOMBINAISON COLZA-MOUTARDE BRUNE, EN SERRE	101
Chapitre 2 : CARACTERISATION DE LA RESISTANCE DE LIGNEES DE RECOMBINAISON COLZA-MOUTARDE BRUNE, AU CHAMP	110
CONCLUSION DE LA TROISIEME PARTIE	120

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	121
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	128
ABREVIATIONS ET DEFINITIONS	
ANNEXES	

INTRODUCTION GENERALE
ET
PRESENTATION DE L'ETUDE



Verse parasitaire due à la Nécrose du collet. (Photo : H. Brun)

INTRODUCTION GENERALE

Le Colza est une espèce oléoprotéagineuse dont l'huile obtenue après trituration des graines est essentiellement destinée à l'alimentation humaine. Grâce à l'amélioration de la qualité des graines, les tourteaux (sous-produits de la trituration) entrent de plus en plus dans la composition des aliments des bovins et des porcs tandis que les graines entières trouvent un débouché dans l'alimentation de la volaille. Depuis quelques années, les débouchés des graines de Colza se diversifient et touchent en particulier le marché de la carburation qui ouvre de nouvelles perspectives intéressantes pour cette culture.

Sur le plan agronomique, le Colza tient une place importante dans les assolements céréaliers. L'amélioration de la structure du sol, la restitution de quantités importantes d'éléments minéraux (azote, phosphore et potassium) et de matières organiques au sol après la récolte font du Colza une bonne tête d'assolement. Certaines pratiques agricoles (fertilisation azotée et traitements phytosanitaires) suscitent de nombreuses interrogations sur leurs conséquences sur la qualité de l'environnement. Cependant, le Colza d'hiver, culture annuelle à cycle long, a un impact positif sur l'environnement par la limitation du lessivage des nitrates (CETIOM, 1995).

La création de cultivars adaptés aux besoins alimentaires et industriels a permis un accroissement important des surfaces cultivées et de la production française de graines de Colza. Toutefois, la réforme de la Politique Agricole Commune (PAC) institue le gel des terres cultivées (à un taux de 15 % de 1992 à 1995 puis à 10 % en 1996) et fixe des quotas de production des graines oléagineuses. Elle prévoit cependant l'exploitation des terres gélées à des fins non alimentaires. Le développement du biocarburant à base d'esters de méthyle d'acides gras dont le diester, crée une conjoncture très favorable à la culture du Colza énergétique sur jachères dans l'Union Européenne.

La satisfaction des besoins alimentaires et industriels (lubrifiants et lipochimie) ainsi que l'évolution de la culture du Colza reposent en partie sur l'assurance de marges bénéficiaires aux agriculteurs. La réduction des coûts de production et la régularité des rendements nécessitent la création de cultivars plus résistants aux différentes contraintes. En effet, la culture du Colza est confrontée à de nombreuses adversités parmi lesquelles la Nécrose du collet due à *Leptosphaeria maculans* constitue un facteur important à prendre en considération.

Longtemps décrit sur le Chou puis sur le Colza, *L. maculans* est un champignon Ascomycète très polymorphe capable d'attaquer de nombreuses Crucifères cultivées et sauvages

(Petrie, 1969). Deux sous-populations sont identifiées par les caractères cultureux, biochimiques, moléculaires et le pouvoir pathogène des souches sur le Colza. La sous-population dénommée 'fortement pathogène' (groupe A) se distingue de la sous-population 'faiblement pathogène' (groupe B) par sa capacité à induire la nécrose du collet. En outre, seules les souches du groupe A sont capables de produire des périthèces *in vitro*. Les croisements entre le groupe A et le groupe B sont impossibles bien qu'ils forment tous les deux des organes sexués au champ.

Le champignon peut se conserver pendant plusieurs années (Alabouvette et Brunin, 1970) sous forme de mycélium dans les débris de culture de Colza. A la faveur de conditions climatiques adéquates, se différencient des périthèces dont les ascospores sont à l'origine des infections primaires dès l'installation des cultures. *L. maculans* peut se manifester tout au long du cycle de la culture et sur tous les organes de la plante.

C'est en France que la première épidémie de Nécrose du collet a été observée sur le Colza, dans le Cher en 1964/1965, occasionnant des pertes de rendement de 50 % (CETIOM, 1992). Depuis, la maladie s'est également développée dans tous les pays producteurs de Colza avec toutefois des répercussions variables sur le rendement en fonction des régions et des années.

L'exploitation de la variabilité génétique intraspécifique pour la résistance à la Nécrose du collet a permis de commercialiser en France les premiers cultivars résistants : cv. Ramsès en 1970 puis cv. Jet Neuf en 1977. Le niveau élevé de la résistance partielle au stade adulte du cv. Jet Neuf a permis de réduire considérablement et durablement l'incidence de la Nécrose du collet en France et en Europe (Gladders et Musa, 1980). Cependant, trop riche en glucosinolates (90 $\mu\text{moles/g}$ de graines entières), il a été progressivement remplacé par des cultivars dits double-zéro ('00') dont le cv. Darmor (en 1984) sans acide érucique et à plus faible teneur en glucosinolates. Le cv. Darmor présente également une bonne résistance partielle au stade adulte à *L. maculans*. A l'exception de quelques cultivars (cv. Vivol et dans une moindre mesure le cv. Goéland), la plupart des cultivars à très faible teneur en glucosinolates actuellement cultivés en France ne présentent pas encore une résistance suffisante à la Nécrose du collet. La culture de ces cultivars sous des conditions climatiques particulièrement favorables a contribué à faire de la Nécrose du collet le problème parasitaire le plus important sur le Colza en France et en Europe durant ces dix dernières années. Cette situation est aggravée par la diminution de la durée des rotations subséquente à l'intensification de la culture du Colza.

Le problème se pose avec d'autant plus d'acuité qu'il n'existe pas de lutte chimique exploitable en grande culture et que les méthodes prophylactiques ne permettent pas un contrôle

efficace dans les régions déjà infestées. De plus, pratiquement tous les cultivars de Colza comprenant celles à résistance partielle au stade adulte, sont sensibles au stade jeunes plantes. McGee et Petrie (1979) ont montré que des dégâts importants de Nécrose du collet peuvent être observés si les infections interviennent avant le stade 6-feuilles.

Afin d'améliorer la résistance du Colza notamment au stade jeunes plantes et sur feuilles, des sources de résistance ont été prospectées chez des espèces voisines. Une résistance totale s'exprimant dès le stade jeunes plantes a été mise en évidence chez les Moutardes (Roy, 1978). Elle se manifeste par une réaction de type hypersensible. L'utilisation de cette source de résistance devrait permettre de protéger la culture dès le stade cotylédonaire. Les premiers hybrides interspécifiques entre un Colza et une Moutarde brune (*Brassica juncea*) ont été obtenus par Roy (1978). Ces hybrides présentent une résistance totale aux stade jeunes plantes et adulte au champ (Roy, 1984). Depuis ces travaux originaux, aucun cultivar portant ce type de résistance n'a été commercialisé jusqu'à nos jours.

PRESENTATION DU SUJET

En France, les différents programmes d'amélioration de la résistance du Colza à la Nécrose du collet sont basés sur l'exploitation de la variabilité intraspécifique et interspécifique (Chèvre *et al.*, 1991; Delourme *et al.*, 1995). Des lignées de recombinaison Colza-Moutarde brune quasi-isogéniques stables ($2n = 38$) résistantes au stade cotylédonaire et à la Nécrose du collet au champ sont obtenues à la Station d'Amélioration des Plantes à l'INRA-Le Rheu. Contrairement à la résistance partielle au stade adulte du cultivar de Colza Jet Neuf dont la durabilité a été éprouvée dans de nombreux pays, nous manquons de recul pour juger de l'efficacité et surtout de la durabilité de cette nouvelle source de résistance vis-à-vis d'une espèce aussi variable que *L. maculans*.

En Australie, Salisbury et Ballinger (1993) mettent en évidence des souches agressives sur des cultivars de *B. juncea* (Stoke et Zaria) dans les populations de *L. maculans* isolées de résidus de culture de Colza. Par conséquent, des souches du parasite possédant les gènes de virulence nécessaires pour contourner la résistance totale de la Moutarde brune peuvent exister ou apparaître dans les populations du champignon.

En Bretagne (France), H. Brun (comm. pers.) n'observe aucun symptôme typique de la maladie (macules, nécrose du collet) mais note, en fin de culture, la présence de noircissements sur *B. juncea* cv. Picra à partir desquels des souches de *L. maculans* peuvent être isolées.

Ces différentes observations indiquent que le risque de contournement de la résistance d'origine Moutarde brune ne peut être écarté dans le contexte de culture du Colza en France. Avant de mettre en place des essais multiloceaux et pluriannuels très coûteux mais nécessaires à l'évaluation de ce risque, nous avons mis au point une méthode expérimentale au champ nous permettant d'évaluer l'efficacité et la stabilité de la résistance des lignées de recombinaison et d'approcher autant que possible la notion de durabilité définie par Johnson (1984).

Le principe général des expérimentations conduites au champ repose sur l'accroissement éventuel au cours du temps de la fréquence des souches agressives sur la résistance d'origine Moutarde brune face à la pression de sélection exercée sur les populations de *L. maculans* par ce type de résistance. Trois lignées de recombinaison Colza-Moutarde brune, un cultivar de la Moutarde brune et des cultivars de Colza présentant différents niveaux de sensibilité sont semés au champ en 1993-1994 et en 1994-1995 suivant un dispositif expérimental identique d'une année à

l'autre (annexe 1). L'utilisation des restes de culture de l'essai précédent, en particulier ceux provenant des génotypes résistants, pour inoculer l'essai suivant constitue la base de ce dispositif expérimental.

A partir de ces expérimentations, nous avons développé des études sur :

1)-l'effet de la résistance de type Moutarde brune sur la structure des populations de *L. maculans* afin de détecter éventuellement des pathotypes aptes à contourner la résistance des lignées.

2)-le déterminisme génétique de la reproduction sexuée et la caractérisation des tétrades naturelles des groupes A et B.

3)-l'efficacité et la stabilité de la résistance des lignées de recombinaison Colza-Moutarde brune dans différentes conditions expérimentales.

DONNEES GENERALES SUR LE PATHOSYSTEME
***LEPTOSPHERIA MACULANS-BRASSICA* SPP.**

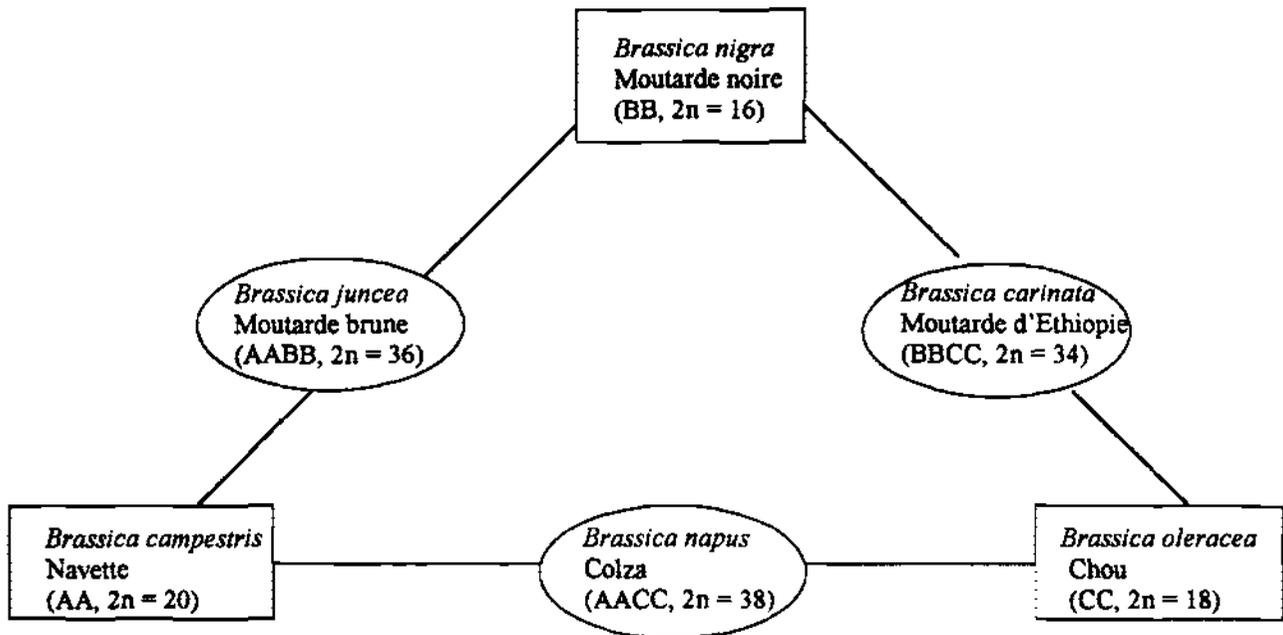


Figure 1 : Relations génomiques entre les espèces de *Brassica* (U, 1935).

Chapitre 1 : LE COLZA

I-LE COLZA ET LES AUTRES *BRASSICA*

a) *Caractéristiques botaniques et typologie*

Le Colza, *Brassica napus* L. var. *oleifera*, est une plante herbacée de la famille des Crucifères résultant de l'hybridation naturelle entre le Chou (*B. oleracea*, CC, $2n = 18$) et la Navette (*B. campestris*, AA, $2n = 20$). C'est donc une espèce allotétraploïde possédant le génome AACC à $2n = 38$. La plante peut atteindre 2 m de haut. Elle se caractérise par une racine pivotante, une tige rameuse, des feuilles glabres et une inflorescence en grappe simple à croissance indéfinie (Renard *et al.*, 1992). Le système de reproduction est de type autogame pour 2/3 et allogame pour 1/3 par l'intermédiaire d'insectes pollinisateurs tels que les abeilles (Mesquida et Renard, 1989) ou par le vent. A maturité, les fleurs donnent naissance à des siliques qui contiennent des graines riches en huiles 36-48 % (Mesquida et Renard, 1989). Deux types de Colza oléagineux peuvent être distingués : le Colza d'hiver dont la montaison nécessite 40 jours de vernalisation à des températures inférieures à 7°C et le Colza de printemps qui n'a pas besoin de vernalisation (Mesquida et Renard, 1989). Le Colza d'hiver est généralement plus productif que le Colza de printemps.

b) *Origines et relations avec les autres Crucifères*

Le centre de diversification du Colza serait, de l'avis de Downey et Robbelen (1989), situé dans le sud européen, dans la région méditerranéenne (Quiros, 1995), d'où il aurait été introduit en Asie au 18ème siècle. Les relations génomiques entre les six espèces cultivées du genre *Brassica* ont été établies par U (1935) (Fig. 1). La Moutarde brune (*B. juncea*) et la Moutarde d'Ethiopie (*B. carinata*) sont des espèces amphidiploïdes dérivant de l'hybridation entre les espèces diploïdes correspondantes (Fig. 1).

c) *Géographie de la culture des Brassica oléagineux*

Les six espèces de *Brassica* sont cultivées principalement pour des besoins alimentaires. Parmi celles-ci, nous nous intéresserons tout particulièrement au Colza et à la Moutarde brune. Le Colza est principalement cultivé en Australie, au Canada, en Chine, et en Europe. En Europe, le Colza est la seule espèce de Crucifères cultivée pour son huile. La Moutarde brune, mieux adaptée

Tableau 1 : Production mondiale de graines, d'huiles et de tourteaux en 1994-1995 (Millions de tonnes)

	Graines	Huiles	Tourteaux
Arachide	17	4,4	6
Colza	26	10,3	16
Coton	33	3,8	14
Palme	4	15,3	-
Soja	115	19,7	86
Tournesol	21	8,5	10
Palmiste	-	1,8	3
Mais + Gluten	-	-	15
Copra	5	-	-

Source : Oil World annual (1995) cité par Raymond et Marquié (1995).

aux conditions de sécheresse que le Colza est largement cultivée en Inde. En France, cette culture ne représente qu'environ 500 ha et est destinée à la production de la moutarde condimentaire (M. Renard, comm. pers.). En Australie, au Canada et en Chine, la Moutarde brune et le Colza constituent les deux principales Crucifères oléagineuses. Au Canada et aux USA, la Moutarde brune est de plus en plus cultivée comme une alternative au Colza (Quiros, 1995).

II-ASPECTS ECONOMIQUES DE LA CULTURE DU COLZA

Compte tenu de l'importance économique limitée de la Moutarde brune en France, l'analyse des données économiques ne portera que sur la culture du Colza. Cependant, l'intérêt de cette Moutarde sera également évoqué.

a) Le Colza sur le marché mondial

La consommation mondiale en huiles et graisses (végétales et animales) est passée de 32 millions de tonnes (MT) en 1963 à 86 MT en 1993 soit une progression d'environ 170 % en 30 ans (Gurtler, 1994). Si la production mondiale a suivi la même évolution pendant la période 1963-1993, il est à noter que depuis 1986 elle ne parvient plus à satisfaire les besoins sans cesse croissants (Rieux, 1994). Cette progression quantitative et qualitative de la demande en huiles repose sur l'élévation du niveau de vie, la croissance démographique et l'évolution des habitudes alimentaires.

Avec une production de 26 MT de graines en 1994-1995, le Colza occupe le 3ème rang mondial après le Soja (115 MT) et le Coton (33 MT) (Tableau 1). Les 16 MT de tourteau produits en 1994-1995, propulsent le Colza au 2ème rang mondial toujours après le Soja qui en produit 86 MT. Le Canada reste le principal pays exportateur de graines de Colza vers les USA, l'Union Européenne, l'Asie et bientôt la Chine et l'Amérique Latine (Gogels, 1994). Avec les estimations de plus de 5 millions d'hectares (M ha) et une production supérieure à 7 MT, le Colza canadien jouera, dans les années à venir, un rôle de premier plan sur le marché mondial en général et particulièrement sur le marché communautaire régulièrement déficitaire en graines. Par ailleurs, il restera le principal fournisseur extérieur du marché européen de la trituration (Gogels, 1994).

b) Le Colza sur le marché communautaire

La consommation européenne en huiles végétales est en constante évolution (Rieux, 1994) et repose essentiellement sur le Tournesol (1,79 MT), le Soja (1,74 MT) et le Colza (1,7 MT) en 1993-1994.

Après une croissance régulière pendant la dernière décennie, la production de Colza connaît un léger déficit entre 1992 et 1993 (Bonnet, 1994). Les cinq dernières années sont marquées par une production en deçà du record de 7,3 MT obtenu en 1991 bien qu'une légère augmentation soit observée en 1994. Les estimations pour 1995 s'inscrivent dans cette tendance (Palleau, 1995). Il convient de noter que l'accroissement de la production est subséquente à la forte progression du Colza non alimentaire qui atteint 18 % de la production globale de l'Union Européenne en 1995 (Palleau, 1995).

Les principaux pays producteurs en 1994 sont l'Allemagne (44 % de la production), la France (30 % de la production) et le Royaume Uni (20 %). La production française est principalement destinée aux marchés intérieur et communautaire et dans une moindre mesure à l'exportation (Bonnet, 1994).

Disposant d'un potentiel important dans l'industrie de la trituration, du raffinage et du biocarburant (Gogels, 1994), l'Europe reste une plaque tournante du marché mondial des huiles végétales en général et de celles du Colza en particulier.

III-POTENTIEL VARIETAL

L'adaptation du Colza aux besoins nouveaux et spécifiques des industries alimentaires et non alimentaires, l'augmentation de la productivité et l'assurance de la régularité des rendements et de la qualité des graines sont autant de facteurs qui détermineront l'avenir de la culture du Colza ainsi que celui du biocarburant (diester) et des autres industries de la lipochimie et des lubrifiants.

a) Evolution des variétés et diversité des débouchés

La production de graines de Colza, a d'abord essentiellement concerné l'alimentation humaine et animale. Jadis discrédités pour leur forte teneur en acide érucique pouvant causer des lésions cardiaques chez le rat (et pensait-on chez l'homme), les cultivars de Colza 'érucique' sont de nos jours destinés à l'industrie chimique. Grâce aux progrès réalisés par la recherche et la sélection dans la création variétale, la culture du Colza connaît depuis un certain temps une évolution

spectaculaire. Depuis les premiers travaux de recherches entrepris par l'INRA autour des années 40 (Renard *et al.*, 1992), quatre grands événements ont ponctué la progression de la culture du Colza en France. De 1940 aux années 60, les efforts de recherches sont focalisés sur l'amélioration des caractéristiques agronomiques générales en vue d'adapter le Colza aux différentes conditions pédoclimatiques (Cauderon, 1986).

Les années 70 sont marquées par l'apparition des premiers cultivars lignées pures 'simple-zéro' sans acide érucique dont les cvs. Primor (en 1974) et Jet Neuf (en 1977). L'huile de Colza retrouve ainsi, progressivement sa place dans l'alimentation humaine. Avec la création des cultivars lignées pures 'double-zéro', sans acide érucique et à faible teneur en glucosinolates (en dessous de 35 $\mu\text{mol/g}$ de graines entières) dans les années 80, de nouveaux débouchés se sont ouverts vers l'alimentation animale (CETIOM, 1991). Depuis l'inscription au catalogue français du premier cultivar '00' en 1984 (Darmor), la gamme des cultivars '00' s'élargit régulièrement.

La modification de la teneur en certains acides gras insaturés devra permettre de disposer de cultivars de Colza oléique et linoléique adaptés à la demande des industries alimentaires, énergétiques et chimiques (Renard et Pelletier, 1995). L'utilisation des huiles à haute teneur en acide érucique dans l'industrie du savon, des détergents et du plastique a conduit au développement du cultivar 'acide érucique' Gaspard de type hiver sélectionné en 1973 et commercialisé dès 1985. En 1993, 12.645 ha étaient cultivés en Colza-érucique en France contre 6.023 ha en 1995 (Palleau, 1995).

b) Amélioration de la productivité

Tous les cultivars cultivés en France jusqu'en 1994 sont des lignées pures obtenues par sélection généalogique ou par haplodiploïdisation. L'évolution qualitative de ces cultivars s'est accompagnée d'un accroissement régulier de la productivité allant d'environ 18,5 q/ha en 1965 (Morice, 1992) à 32 q/ha de rendement moyen national en 1995 (CETIOM, 1995). La mise en culture du premier cultivar 'double-zéro' composite hybride lignée (CHL) 'Synergy' en 1994/1995 signe un événement d'une grande importance dans l'évolution de la sélection du Colza en France et dans le monde. Le CHL Synergy est un cultivar qui résulte de l'association d'un hybride mâle stérile (80 %) et d'une lignée pollinisatrice (20 %) (Pinochet, 1994). Ce type de cultivar devrait permettre un gain de productivité d'environ 20 % (Renard et Pelletier, 1995). A l'avenir, d'autres types d'hybrides restaurés avec une productivité encore plus élevée devraient voir le jour (Renard et Pelletier, 1995).

IV-PROBLEMES PARASITAIRES DE LA CULTURE DU COLZA

a) *Les mauvaises herbes*

La végétation adventice, outre la concurrence horizontale et verticale livrée à la culture du Colza, est néfaste du fait des impuretés qui en résultent à la récolte et des risques concernant le parasitisme. Au nombre des mauvaises herbes rencontrées dans les cultures de Colza, la Matricaire, les Géraniums, le Gaillet et les Crucifères sauvages sont les plus nuisibles (Durand, 1995). Parmi les Crucifères adventices, les plus fréquentes et les plus dangereuses sont la Moutarde noire et le Rapistre qui ont des teneurs en glucosinolates dix fois supérieures à un Colza '00' du type Samourai (Perny *et al.*, 1991). La présence de ces graines qu'on ne peut séparer du Colza '00' peut entraîner le déclassement de la récolte et causer d'importantes pertes économiques.

b) *Insectes et maladies virales*

Tout au long de son cycle de végétation, le Colza est l'objet d'attaques de ravageurs dont l'incidence sur le rendement est fonction de l'espèce et de l'organe cible. La Mouche du Chou, la Petite et la Grosse Altise, les Charançons du bourgeon, de la tige et des siliques, la Cécidomye et le Mélégiète constituent la cohorte de ravageurs dont les adultes et/ou les larves sont préjudiciables à la culture du Colza. Les Pucerons verts (*Mysus persicae*) sont doublement néfastes au Colza en raison des prélèvements de sève qu'ils occasionnent et des viroses qu'ils peuvent transmettre (Vial, 1995).

Trois virus transmis par les Pucerons sont identifiés sur le Colza en France. Il s'agit des virus BWYV, TuMV et CaMV responsables du nanisme des plantes, des déformations et des nécroses des feuilles et des siliques. Le CaMV et le TuMV sont les virus les plus nuisibles pouvant entraîner dans certains cas la mort de la plante. Toutefois, leur nuisibilité au champ n'est pas encore bien établie (Vial, 1995).

c) *Maladies fongiques*

De nombreuses maladies fongiques peuvent apparaître sur les différents organes de la plante et à tous les stades de végétation du Colza. Leur importance varie en fonction des années, des régions et des organes attaqués.

Au nombre des ces problèmes parasitaires, la Cylindrosporiose (*Pyrenopeziza brassicae*, f.c. *Cylindrosporium concentricum*), l'Alternariose (*Alternaria brassicae*), le Mildiou (*Peronospora brassicae*), l'Oïdium (*Erysiphe cruciferanum*) sont des maladies contre lesquelles des méthodes de lutte chimique et/ou génétique permettent de réduire les dégâts.

La Verticilliose (*Verticillium dahliae*) et la Hernie des Crucifères (*Plasmodiophora brassicae*) sont des maladies dont la nuisibilité n'est pas connue avec précision. Elles sont généralement localisées dans quelques régions de production du Colza. Les moyens de lutte quand ils existent sont d'efficacité limitée.

Des dessèchements prématurés des tiges ou 'pieds secs' apparaissent dans les champs de Colza d'hiver. Ils se caractérisent par une dégradation du système racinaire (Brun et Jacques, 1990). Des isollements réalisés à partir des plantes malades montrent souvent la coexistence de deux espèces : *L. maculans* et *V. dahliae*; cependant leurs rôles respectifs restent à élucider.

La Sclérotiniose (*Sclerotinia sclerotiorum*) se manifeste par un échaudage plus ou moins précoce des plantes occasionnant ainsi des pertes de rendement de 8 à 30 % (CETIOM, 1992). Les pétales jouent un rôle essentiel dans l'évolution de la maladie. Ils servent de support à la germination des ascospores et sont à l'origine de la contamination des feuilles. Si l'utilisation des produits chimiques en traitement préventif permet de contrôler plus ou moins efficacement la Sclérotiniose, une faible variabilité génétique est observée chez les Crucifères vis-à-vis de cette maladie (Brun *et al.*, 1989). Toutefois, la sélection de génotypes de Colza sans pétales permet d'espérer une lutte génétique efficace contre ce parasite (CETIOM, 1992).

La Nécrose du collet causée par *Leptosphaeria maculans* est également une maladie très dommageable aux cultures du Colza. Elle peut entraîner des pertes de rendement de plus de 50 % (Petrie, 1985) et compromettre l'évolution de la culture du Colza sous certains climats. Une connaissance approfondie de l'agent pathogène et des facteurs influençant la manifestation de la maladie est indispensable pour la définition de stratégies de lutte basées sur l'utilisation de la variabilité génétique pour la résistance existant chez le Colza et chez les Crucifères voisines, voire également pour le développement d'une méthode de lutte chimique.

Tableau 2 : Evolution de la nomenclature de l'agent causal de la Nécrose du collet

Formes	Appelations	Hôtes d'origine	Pays	Références
Asexuée	<i>Sphaeria lingam</i>	Chou rouge	Allemagne	Tode (1791) ¹
	<i>Phoma lingam</i>	Chou fleur	France	Desmazières (1849)
	<i>P. siliquastrum</i>	Chou fleur	France	Desmazières (1849)
	<i>P. oleracea</i>	Chou	Italie	Saccardo (1880) ¹
	<i>P. brassicae</i>	<i>Brassica</i> sp.	?	Von Thümen (1880) ¹
	<i>Aposphaeria brassicae</i>	Chou	?	Von Thümen (1880) ¹
	<i>Phoma napobrassicae</i>	Rutabaga	Danemark	Rostrup (1892) ¹
	<i>Plenodomus lingam</i>	<i>Brassica</i> sp.	?	Hohnel (1911) ²
Sexuée	<i>Leptosphaeria napi</i>	<i>Brassica</i> sp.	Italie	Saccardo (1883) ³
	<i>L. maculans</i>	Chou	Angleterre	Smith et Sutton (1964)

¹ Cité dans Henderson (1918)

² Cité dans Boerema (1976)

³ Cité dans Smith et Sutton (1964)

Tableau 3 : Classification des deux formes du champignon responsable de la Nécrose du collet

<i>Forme sexuée</i>	<i>Forme asexuée</i>
<p>Classe : Ascomycètes Thalle formé de filaments généralement cloisonnés (Septomycètes) à reproduction sexuée aboutissant à la formation de 8 spores sexuées contenues dans une cellule appelée asque.</p> <p>Sous-classe : Euascomycètes Asques agrégés contenus dans un ascocarpe</p> <p>Série : Loculoascomycètes Ascocarpes globuleux, pourvus d'un ostiole (Périthèces). Asques à parois bituniquées</p> <p>Ordre : Pléosporales Périthèces de couleur noire contenant des pseudoparaphyses</p> <p>Famille : Pléosporacées</p> <p>Genre : <i>Leptosphaeria</i></p> <p>Espèce : <i>maculans</i> Ascospores allongées à 5 septa, observées sur Crucifères</p>	<p>Deutéromycètes Reproduction par spores asexuées</p> <p>Sphaéropsidales conidies naissant dans un organe de fructification clos s'ouvrant généralement par un pore (Pycnide)</p> <p>Sphaérioidacées Pycnides plus ou moins globuleuses à ostiole ou closes à parois membraneuses, ou coriaces à parois foncées.</p> <p><i>Phoma</i> Ouverture par ostiole.</p> <p><i>lingam</i> Conidies hyalines, unicellulaires et ovoïdes.</p>

Chapitre 2 : *LEPTOSPHERAERIA MACULANS*, AGENT DE LA NECROSE DU COLLET DES CRUCIFERES

I-CARACTERISTIQUES DE L'AGENT PATHOGENE ET DE LA MALADIE

a) *Position taxinomique*

En 1791, Tode décrit un champignon saprophyte sur des tiges desséchées de Chou rouge, *Brassica oleracea* var. *rubra*, qu'il nomme *Sphaeria lingam* (Henderson, 1918). En 1849, Desmazières découvre le même champignon sur Chou-fleur et le classe dans le genre *Phoma* après avoir montré son caractère pathogène sur le Chou. Au fil des découvertes, diverses appellations sont attribuées à diverses formes de *Phoma* faisant parfois référence à l'organe ou à l'espèce d'hôte parasitée (Tableau 2). Après analyse des caractéristiques morphologiques et pathogéniques de quelques souches, Henderson (1918) et Smith et Sutton (1964) s'accordent à considérer *Phoma lingam* (Tode ex fr.) Desm. comme la forme imparfaite de l'agent pathogène des Crucifères, alors que *P. oleracea* Sacc. serait selon Smith et Sutton (1964) une espèce saprophyte des Crucifères jadis attribuée à *P. herbarum* West. C'est en Nouvelle Zélande que la forme parfaite de *P. lingam* est découverte en 1956 et décrite comme *Leptosphaeria napi* (Fuckel) Sacc. puis *L. maculans* (Desm.) Ces. et de Not. par Smith et Sutton (1964).

Leptosphaeria maculans (Desm.) Ces. et de Not. est un champignon hétérothallique de la classe des Ascomycètes. Le tableau 3 fait état de la classification des deux formes du champignon.

b) *Répartition et incidence économique*

La Nécrose du collet est une maladie endémique dans toutes les régions productrices de Colza, Rutabaga, Chou, Navette ou autres Cucifères susceptibles d'héberger *L. maculans* (CMI, 1991). L'importance économique de cette maladie est reconnue dès le début du 20ème siècle lorsque des épidémies importantes sur Choux et Choux-fleurs sont rapportées en Europe, en Australie et dans de nombreux états des Etats Unis (Henderson, 1918).

En Nouvelle Zélande, Cunningham (1927) cité dans Gabrielson (1983) et Cruickshank et Palmer (1954) observent des dégâts sur la Navette et sur le Rutabaga. L'intensification de la culture du Colza s'est accompagnée dans la seconde moitié du 20ème siècle de graves problèmes parasitaires dus à *L. maculans*.

En Australie, le Colza est cultivé à partir de 1968 comme une alternative aux cultures céréalières (Roy et Reeves, 1975). Des pertes de rendement dues à la Nécrose du collet provoquent un recul considérable des surfaces cultivées en Colza qui passent de 41.566 ha en 1972 à 2.225 ha l'année suivante (McGee, 1973; Roy et Reeves, 1975). La mise en culture du cultivar résistant Wesreo (Roy, 1978) contribue à réduire l'incidence de la maladie. La poursuite des efforts de sélection pour la résistance a permis le développement spectaculaire de la culture du Colza au cours de ces dernières années; les superficies cultivées atteignant 430.000 ha avec une production estimée à plus de 600.000 T. Cependant, la Nécrose du collet demeure toujours le problème parasitaire le plus important dans ce pays (Wratten *et al.*, 1995).

Au Canada, l'apparition de la Nécrose du collet sur les cultures de Colza est signalée au début des années 1960, cependant elle y est longtemps restée un problème mineur (Gugel et Petrie, 1992). La présence sporadique de souches faiblement pathogènes sur les plantes adultes en serait la principale raison (Petrie et Vanderpool, 1974). Toutefois, à partir de 1975, des souches agressives de *L. maculans* identiques à celles prévalant en Australie sont décrites pour la première fois dans le centre du Saskatchewan (McGee et Petrie, 1978). Dès 1977, 17 % des champs répertoriés dans le centre-est du Saskatchewan sont sévèrement attaqués avec des pertes de rendement estimées à 20 % (Petrie, 1978). De ces foyers d'infection, la maladie s'est propagée dans l'ensemble du Saskatchewan provoquant en 1982, une perte moyenne de 6 % pouvant atteindre 56 % dans certaines parcelles analysées (Petrie, 1985). La culture à grande échelle du cv. Westar, fortement sensible à la Nécrose du collet, a largement contribué au développement spectaculaire de la maladie dans le centre du Saskatchewan en 1984 et 1985 (Petrie, 1986).

En Europe, c'est en France que la maladie s'est d'abord manifestée avec le développement de la culture du Colza d'hiver. En 1966, des pertes de rendement de 40 % sont enregistrées (Lacoste *et al.*, 1969). Avec l'extension des surfaces cultivées en Colza d'hiver dans les années 1980, la Nécrose du collet est devenue un des problèmes parasitaires les plus importants en Allemagne où des pertes supérieures à 20 % sont observées (Schramm et Hoffmann, 1987). En Angleterre, de fortes attaques de Nécrose du collet avec 50 % des plantes nécrosées dans certaines parcelles analysées sont observées en 1977 (Gladders et Musa, 1980). En 1979, l'introduction du cv. Jet Neuf présentant une résistance partielle au stade adulte a permis de réduire la gravité des attaques de Nécrose du collet au Royaume Uni (Gladders, 1995). La période 1993-1995 est marquée par une recrudescence des épidémies de Nécrose du collet dans ce pays (Gladders, 1995).

Symptômes dus à *L. maculans* sur différents organes du Colza.

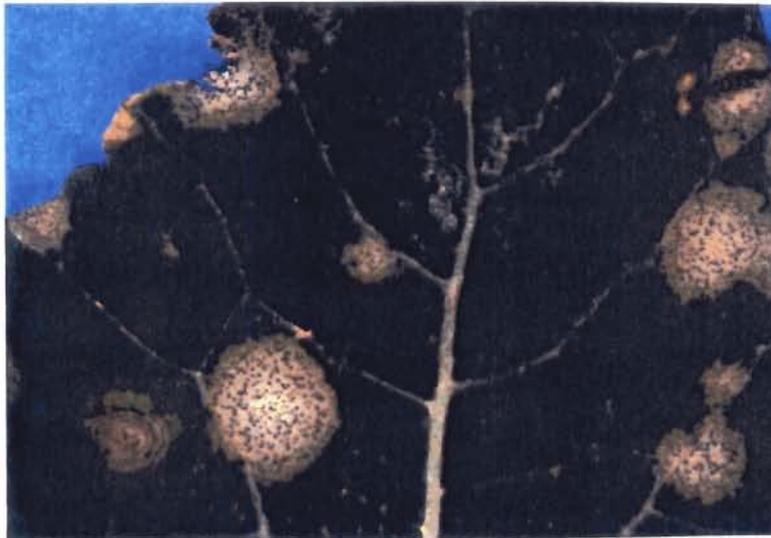


Figure 2 : Macules foliaires présentant de nombreuses pycnides. (Photo : H. Brun)



Figure 3 : Verse de plantes au champ due à la Nécrose du collet. (Photo : H. Brun)



Figure 4 : Tache sur tige (→) et nécrose au niveau du collet. (Photo : I. Somda)

c) *Symptomatologie*

La maladie peut affecter tous les organes de la plante. Deux types principaux de symptômes se manifestent successivement au champ : les macules sur organes foliaires et la nécrose du collet de la plante.

1) *Les macules (Fig. 2)*

Elles apparaissent très tôt d'abord sur cotylédons puis sur feuilles 10 à 14 jours après inoculation au champ (Brunin, 1970). Elles débutent par un affaissement et une décoloration des tissus qui prennent ensuite un aspect gris cendré. Elles se distinguent par la présence des organes de fructification asexuée (les pycnides).

2) *La nécrose du collet (Fig. 3)*

C'est le symptôme le plus redoutable de la maladie. La verse due à la Nécrose du collet se manifeste généralement au début du printemps à partir de la floraison. A la base de la tige, la nécrose commence par une décoloration grisâtre, se développe en profondeur et autour de la tige. Il en résulte un anneau brun au niveau duquel les tissus apparaissent liégeux. Cette lésion chancreuse évolue ensuite en 'pointe de crayon' et aboutit à la cassure de la plante : c'est la verse parasitaire qui peut occasionner de sérieuses pertes de rendement et des difficultés pour la récolte (Régnault *et al.*, 1987).

3) *Autres manifestations de la maladie (Fig. 4)*

Des fontes de semis et des pourritures racinaires sont observées en cas d'attaques précoces (Henderson, 1918; Petrie, 1969, Gabrielson, 1983). La maladie se manifeste également sur tige (Fig. 4) sous forme de taches ovales cernées de noir (Régnault *et al.*, 1987). Des symptômes sont également observés sur le pivot (pourritures racinaires) et sur siliques.

d) *Cycle biologique de L. maculans sur Colza d'hiver (Fig. 5)*

L. maculans est un champignon ascomycète hétérothallique pour lequel la manifestation de la phase sexuée nécessite la rencontre de thalles complémentaires. Dans les débris de culture, le champignon se conserve sous forme de mycélium. A la faveur de températures douces (environ 15 °C), d'humidité et de lumière, généralement réunies en Automne, la reproduction sexuée s'opère et

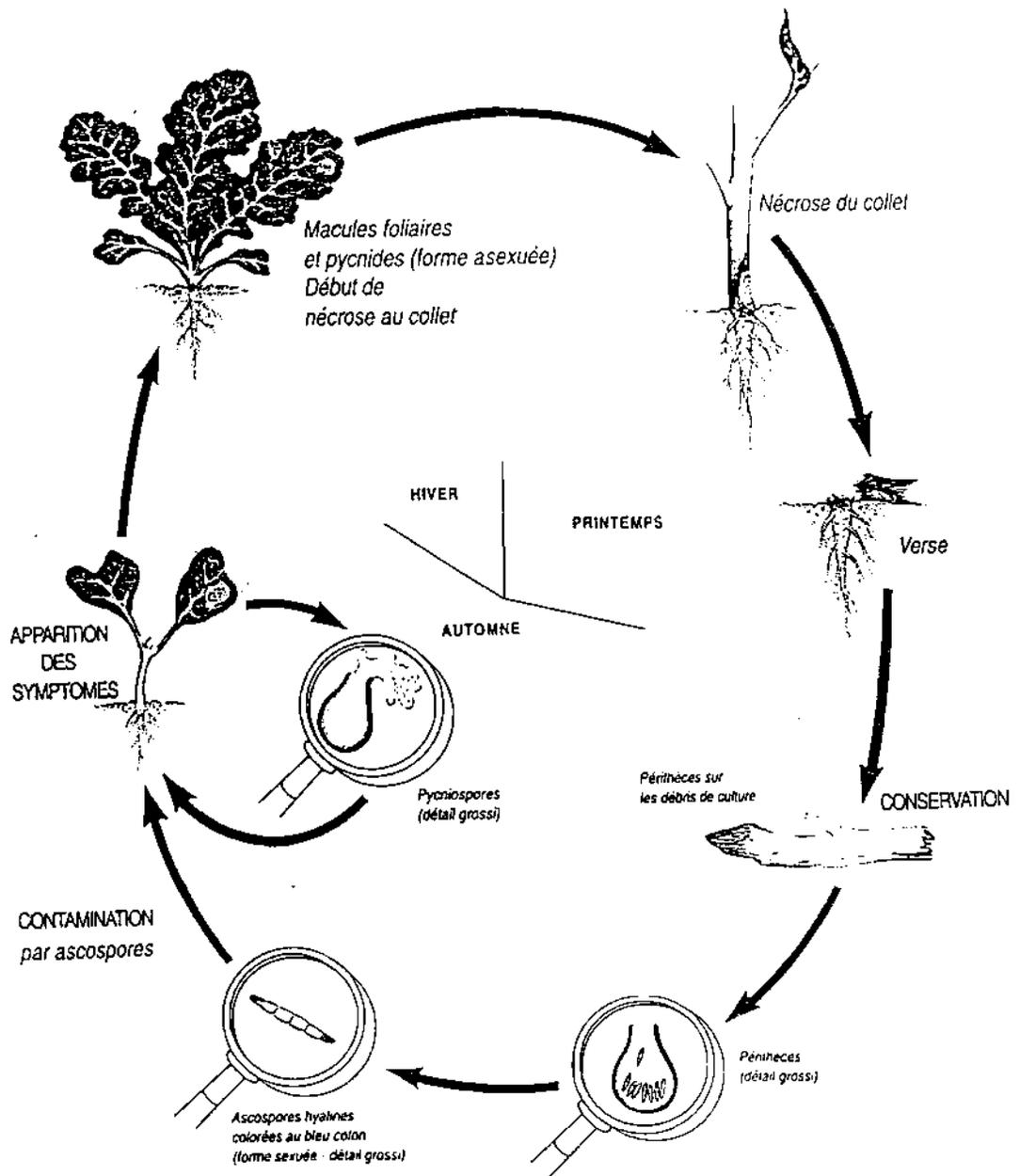


Figure 5 : Cycle biologique de *Leptosphaeria maculans* (CETIOM, 1992).

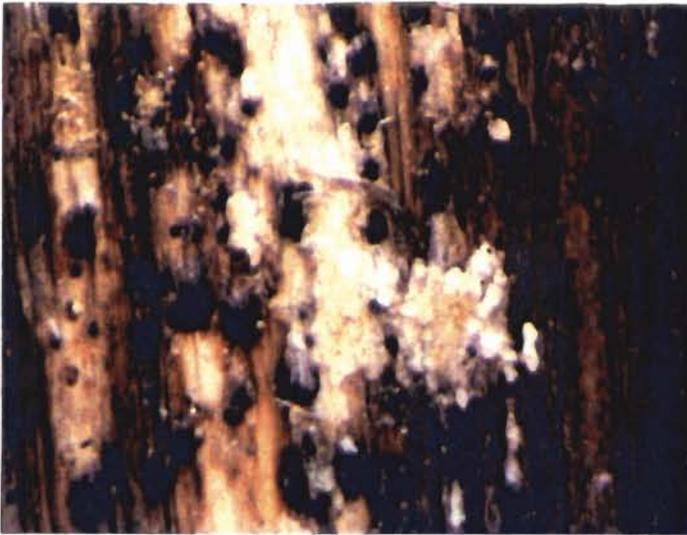


Figure 6 : Périthèces sur débris de culture de Colza.

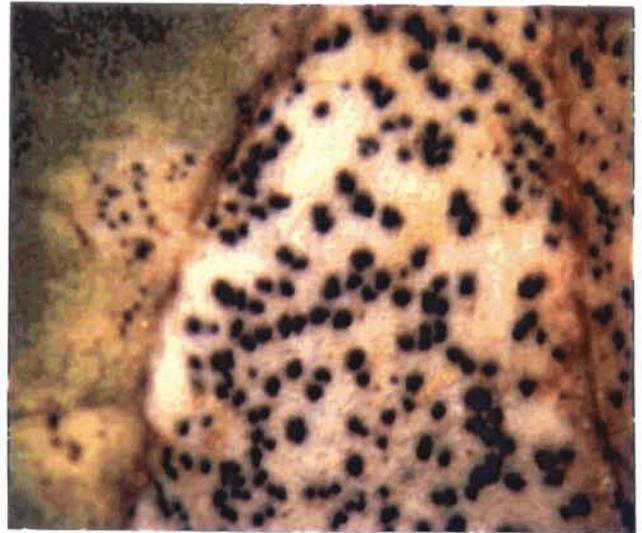


Figure 9 : Pycnides présentes sur une macule foliaire.

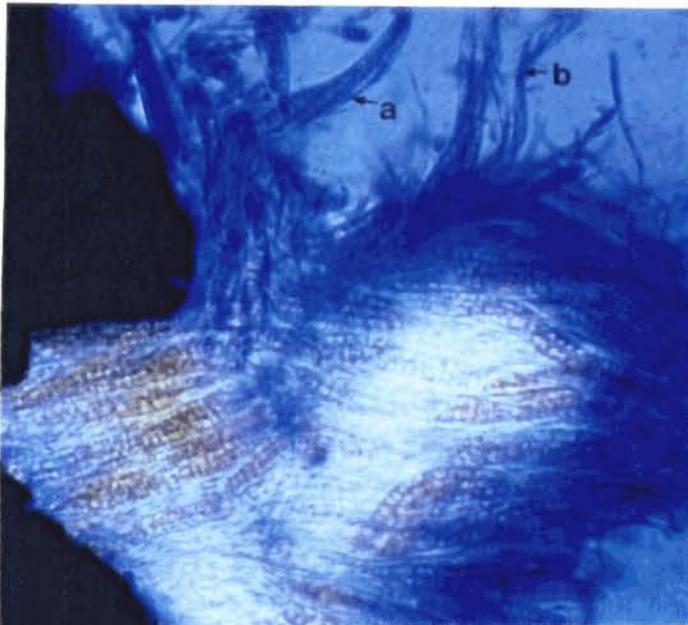


Figure 7 : Périthèce écrasé : a) asque mature
b) paraphyse.

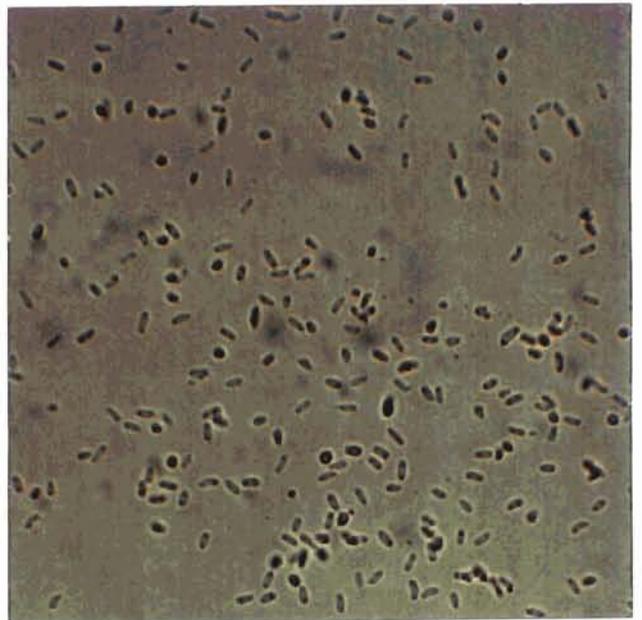


Figure 10 : Pycniospores unicellulaires.

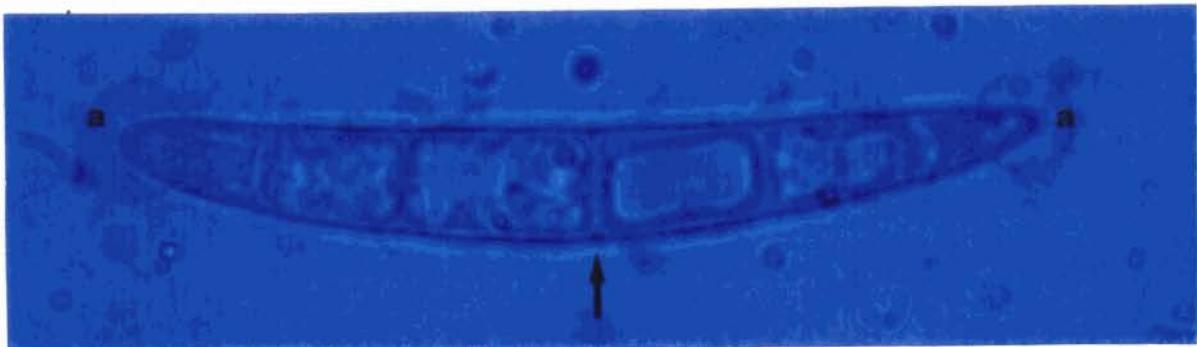


Figure 8 : Ascospore à six cellules. → : septum central. a: appendice hyalin rond. (Photos : I. Somda)

donne lieu à la différenciation des périthèces sur les débris de culture (Fig. 6) maintenus à la surface du sol (Lacoste *et al.*, 1969; Alabouvette et Brunin, 1970) : c'est la phase saprophytique.

Les organes sexués (périthèces) de couleur noire et de forme globuleuse apparaissent préférentiellement sur les parties noircies des tiges (Gabrielson, 1983). Ils se distinguent par leur taille (300-500 μm de diamètre et une hauteur de l'ordre de 250 μm) et par la présence d'un col court muni d'un ostiole par lequel s'échappent les ascospores à maturité (Smith et Sutton, 1964; Punithalingam et Holliday, 1972). Entremêlés dans des structures hyalines, filiformes et septées appelées pseudoparaphyses, les asques sont caractérisés par des parois épaisses (bitoniques), une forme oblongue et une taille variant de 85-125 x 15-22 μm . Ces sacs munis d'un pied court renferment chacun 8 ascospores haploïdes (Fig 7).

Les ascospores fusiformes légèrement incurvées sont généralement constituées de 6 cellules avec une légère constriction au niveau du septum central (fig. 8). Elles ont une longueur de 35-70 μm sur 5-8 μm de diamètre. Cependant, Petrie (1994) trouve une grande variabilité dans les dimensions des ascospores en fonction des conditions de température et de lumière.

A maturité, les périthèces libèrent les ascospores qui peuvent être disséminées par le vent sur plusieurs mètres voire plusieurs kilomètres (Alabouvette et Brunin, 1970; Lacoste *et al.*, 1969; Petrie, 1978; Gladders et Musa, 1980). La libération des ascospores peut durer pendant toute la période de végétation automnale et hivernale de la culture du Colza avec des optima déterminés par des conditions de fortes humidités ou des précipitations importantes (Alabouvette et Brunin, 1970; Gladders et Musa, 1980). L'infection primaire est assurée principalement par les ascospores. La propagule infectieuse, mise au contact de l'organe-cible, produit des filaments germinatifs qui pénètrent dans l'hôte à travers les stomates ou les blessures occasionnées par les insectes (Brunin, 1970). Le parasite envahit alors les espaces intercellulaires du mésophylle du limbe sans manifestation extérieure (Hammond *et al.*, 1985). Suite à la décoloration des tissus du limbe, se développent les macules qui constituent les premiers signes extérieurs de la maladie.

Sur ces macules se différencient les organes de multiplication asexuée du champignon : les pycnides (Fig. 9). De forme globuleuse (diamètre variant de 300 à 600 μm) à parois foncées, les pycnides se terminent par un ostiole libérant un mucilage hydrosoluble (cirrhe) le plus souvent de couleur rose. Ce mucilage renferme de très nombreuses pycniospores hyalines généralement ovoïdes et rarement cylindriques. Elles sont unicellulaires de dimension moyenne de 3-6 μm de long et 1,5-2 μm de diamètre (Punithalingam et Holliday, 1972). Les pycnides décrites sur les organes aériens vivants sont caractérisées par des parois minces, pseudoparenchymateuses alors que celles décrites

sur les débris de cultures sont de dimensions très variables et se distinguent par leurs parois épaisses sclérenchymateuses (Henderson, 1918; Boerema, 1976). Les pycniospores (Fig. 10) émises par les pycnides se disséminent sur de courtes distances par l'eau de pluie. Elles contaminent ainsi les autres organes de la même plante ou les plantes voisines et sont à l'origine des infections secondaires en foyers.

Parallèlement à cette fructification asexuée, les filaments mycéliens, qu'ils soient issus d'une propagule sexuée ou asexuée, gagnent les vaisseaux du xylème ou bien se propagent entre les cellules du parenchyme du xylème et du cortex. Le champignon évolue ensuite de façon systémique dans le cortex de la tige, sans symptôme apparent (Hammond *et al.*, 1985). Cette phase biotrophe de *L. maculans* se caractérise par une longue période de latence pouvant atteindre plusieurs mois (Nathaniels et Taylor, 1983). La phase nécrotrophe marque l'étape ultime de la phase parasitaire qui se traduit à la base de la tige par l'expression du faciès de la maladie le plus dommageable aux cultures : la nécrose du collet.

Si le cycle biologique ainsi décrit est généralement observé dans les cultures de Colza d'hiver, Petrie *et al.* (1995) montrent que des plantes apparemment saines (sans symptômes foliaires), peuvent manifester la nécrose du collet en fin de culture, tandis que Hall *et al.* (1993) pensent que des infections directes de la tige à travers des blessures d'insectes peuvent être à l'origine de ce symptôme typique de la maladie.

e) Diversité des populations de L. maculans

D'après de nombreux auteurs, *L. maculans* est un champignon très variable capable d'attaquer de nombreuses Crucifères. Desmazières n'écrivait-il pas en 1849 à propos de la forme imparfaite *P. lingam* : 'Il est peu d'espèces du genre qui soient aussi polymorphes...' En effet, ce champignon est largement décrit sur des espèces de *Brassica* cultivées mais également sur Crucifères adventices telles *Thlaspi arvense*, *Sisymbrium altissimum*, *Lepidium* sp, et le genre *Descurainia* (Petrie, 1969). Parmi les populations de *L. maculans*, seules les souches '*Thlaspi*' et '*Brassica*' ont fait l'objet d'analyses approfondies faisant appel à des outils biochimiques et moléculaires. Les souches '*Thlaspi*' semblent différentes des souches '*Brassica*', cependant, suivant les critères utilisés, elles se rapprochent plus de l'un des deux groupes de souches ('fortement pathogènes' et 'faiblement pathogènes') qui composent les populations '*Brassica*' (Johnson et Lewis, 1990; Morales *et al.*, 1993a).

Tableau 4 : Dénominations des deux types de souches de *L. maculans*

Types de souches		Auteurs
Groupe A	Groupe B	Johnson et Lewis (1990)
Strongly parasitic	Weakly parasitic	Cunningham (1927)
Highly virulent	Slightly virulent	Pound (1947)
Highly virulent	Weakly virulent	Taylor <i>et al.</i> (1991)
Virulent	Avirulent	Mc Gee et Petrie (1978)
Virulent	Non virulent	Humpherson-Jones (1983)
Aggressive	Non aggressive	Koch <i>et al.</i> (1989)
Strongly pathogenic	Weakly pathogenic	Delwiche (1980)

Dans les populations de *L. maculans* observées sur les espèces du genre *Brassica*, deux types de souches sont distingués très tôt en fonction de leur pouvoir pathogène. Dès 1927, Cunningham (cité dans Pound, 1947) observe des différences majeures dans les caractéristiques culturales et pathogéniques d'environ 400 souches de *P. lingam* provenant de graines et de divers organes de Rutabaga (*B. napus* var. *napobrassica*). L'auteur distingue les souches fortement pathogènes sur racines de Rutabaga (groupe 1) à croissance lente, des souches faiblement pathogènes (groupe 2) à croissance rapide. En fonction des auteurs et des critères d'étude, ces deux groupes de souches sont diversement nommés (Tableau 4).

Depuis les travaux de Cunningham (1927), l'utilisation d'autres outils de caractérisation, d'efficacité variable, a permis de confirmer l'existence de deux groupes (Tableau 5) et dans certains cas d'évaluer la variabilité intra-groupe.

Pound (1947) isole une souche de *L. maculans* dans la région Puget Sound des Etats Unis et la nomme 'Puget sound'. McGee et Petrie (1978) et d'autres auteurs montrent que la production de pigments dans le milieu de culture, permet de distinguer les souches non productrices des souches qui s'apparentent à la souche 'Puget sound' par la diffusion de pigments. Johnson et Lewis (1990) analysent les deux types de souches et montrent une forte corrélation entre la production de pigments et les profils RFLP. Ils dénomment groupes A et B, respectivement les souches non productrices et les souches productrices de pigments.

Par ailleurs, la production de phytotoxines (sirodesmine PL et acide phoménoïque) par *L. maculans* (Bousquet *et al.*, 1977; Boudart, 1978), permet de distinguer les souches non productrices (Tox⁰ ou groupe B) des souches productrices (Tox⁺ ou groupe A) (Badawy et Hoppe, 1989; Balesdent *et al.*, 1992).

Les résultats obtenus par Johnson et Lewis (1994) apportent des informations nouvelles sur le pouvoir pathogène des souches du groupe B sur les espèces du genre *Brassica*. Ils montrent pour la première fois que les souches du groupe B sont plus pathogènes que les souches du groupe A sur les cotylédons de diverses espèces de *Brassica*.

Au stade adulte, seules les souches du groupe A sont responsables de la manifestation de la nécrose du collet au champ alors que les souches du groupe B seraient à l'origine de la dégradation de la moelle des tiges (Johnson et Lewis, 1994). Le rôle des souches du groupe B et leur interaction avec les souches du groupe A dans l'épidémiologie de la Nécrose du collet sont jusqu'à nos jours inconnus. Les souches du groupe B sont cependant capables de progresser de manière systémique dans les tiges d'espèces résistantes et sensibles (Gugel *et al.*, 1990; Xi *et al.*, 1991; Petrie *et al.*,

Tableau 5 : Caractérisation des populations de *L. maculans* isolées de *Brassica* spp.

Critères	Types de souches		Références
	Groupe A	Groupe B	
Caractères morphologiques et cultureux			
Aspect du mycélium	peu abondant	abondant	Pound (1947)
Fructification	abondante	peu abondante	Pound (1947)
Vitesse de croissance	lente	rapide	Cunningham (1927) ¹
Production de pigments	-	+	Pound (1947)
Longueur des tubes germinatifs	court	long	Petrie (1988)
Caractères biologiques			
Compatibilité sexuelle <i>in vitro</i>	possible	A x B (impossible)	Lacoste (1965), Bonman <i>et al.</i> (1981)
Pouvoir pathogène/Colza : nécrose du collet	oui	non	Johnson et Lewis (1994)
cotylédons	oui/oui	oui/non	J. et Lewis (1994)/Mengistu <i>et al.</i> (1991)
Production de toxines			
Sirodesmine PL	+	-	Badawy et Hoppe (1989)
Acide phoménoïque	+	-	Balesdent <i>et al.</i> (1992)
Analyses moléculaires			
Protéines des parois : bandes spécifiques	2 bandes	1 bande	Hassan <i>et al.</i> (1991)
Protéines mycéliennes solubles	Indice moyen de similitude entre A et B : 46 %		Balesdent <i>et al.</i> (1992)
Polygalacturonases : bandes de poids moléculaires	faible	fort	Annis et Goodwin (1993)
Malate deshydrogénase	lente	rapide	Hill <i>et al.</i> (1984)
Glucose Phosphate Isomerase	rapide	lente	Sippell <i>et al.</i> (1988)
Pectinases	peu de bandes	beaucoup de bandes	Hanacziwskyj et Drysdale (1984)
8 systèmes enzymatiques	Pas ou très peu de bandes communes		Gall <i>et al.</i> (1995)
Analyses RFLP et RAPD; DNA fingerprinting	Mise en évidence de bandes RFLP et RAPD spécifique à chaque groupe		Johnson et Lewis (1990) Koch <i>et al.</i> (1991) Hansan <i>et al.</i> (1991) Goodwin et Annis (1991) Meyer <i>et al.</i> (1992) Schäfer et Wöstemeyer (1992) Plummer <i>et al.</i> (1994)
Analyse des caryotypes	8,6 x 10 ⁶ pb	1,6 x 10 ⁷ pb	Taylor <i>et al.</i> (1991)
ADN extrachromosomique	+	-	Hassan <i>et al.</i> (1991)
Séquençage des 2 régions intergéniques (ITS1 et 2)	Taux de similitude entre groupes A et B : 71 % pour ITS1 et 82 % pour ITS2		Morales <i>et al.</i> (1993)

¹ cité par Pound (1947)

1995) et de provoquer des lésions de la moelle (Jonhson et Lewis, 1994). Sur la Navette, ce groupe est capable d'induire la nécrose du collet.

1) Polymorphisme des souches du groupe A

Koch *et al.* (1991) observent des interactions différentielles au stade cotylédonaire entre certaines souches du groupe A et les cultivars de Colza Westar, Quinta et Glacier. Sur la base des interactions souche-cultivar, Mengistu *et al.* (1991) déterminent quatre pathotypes (Pathogenicity Groups), qu'ils nomment PG2, PG3 et PG4; le pathotype PG1 correspondant aux souches du groupe B. Cependant, les pathotypes ainsi obtenus sur les trois cultivars ne semblent pas rendre compte de la grande variabilité de la pathogénie des souches du groupe A ainsi que le démontrent Kuswinanti *et al.* (1995). En effet, ces auteurs déterminent sur les cultivars Lirabon, Glacier, Quinta et Jet Neuf six pathotypes dans les populations allemandes de *L. maculans* qu'ils dénomment PGA1 à PGA6 (Pathogenicity Group of Aggressive isolates). Les pathotypes PGA1, PGA2 et PGA6 sont ensuite subdivisés en 19 pathotypes sur une gamme d'hôtes élargie à 16 génotypes comprenant d'autres cultivars de Colza et des cultivars de Moutardes noire, brune et d'Ethiopie.

Les analyses à l'échelle moléculaire des souches du groupe A de différentes origines géographiques montrent qu'elles sont phylogénétiquement très peu distantes (Koch *et al.*, 1991).

La possibilité de croiser *in vitro* les souches du groupe A (Lacoste, 1965; Petrie et Lewis, 1985; Mengistu *et al.*, 1993) a permis à Ansan-Melayah *et al.* (1995) d'identifier à l'aide de marqueurs RAPD le premier gène d'avirulence *AvrLm1* sur la base de l'interaction incompatible d'une souche PG3 avec le cv. Quinta.

2) Polymorphisme des souches du groupe B

Pour leur pouvoir pathogène, les souches du groupe B sont classées dans le pathotype PG1 avirulent sur le cultivar sensible Westar (Mengistu *et al.*, 1991). Cette homogénéité du pouvoir pathogène cache en fait un polymorphisme important révélé par des marqueurs moléculaires et biochimiques. Koch *et al.* (1991) parviennent à subdiviser le groupe Non-agressif (NA ou groupe B) en trois sous-groupes génétiquement distants dénommés NA1, NA2 et NA3. L'analyse électrophorétique des protéines mycéliennes indique que le groupe B est plus polymorphe que le groupe A (Balesdent *et al.*, 1992; Gall *et al.*, 1995).

Les souches du groupe B produisent des métabolites caractéristiques dont la phomaligin A isolée de pigments jaunes (Pedras *et al.*, 1995). La similitude des métabolites, la forte homologie des séquences ITS 1 (98,3 %) et des séquences ITS 2 (99,4 %) entre *Phoma wasabiae* et les souches du

groupe B indiquent que les deux espèces appartiennent à une même entité taxinomique distincte du groupe A (Pedras *et al.*, 1995).

Les nombreuses tentatives pour croiser les souches du groupe B entre elles n'ont pas été concluantes (Bonman *et al.*, 1981; Petrie et Lewis, 1985; Mengistu *et al.*, 1993; Rouxel *et al.*, 1994).

3) Relations entre le groupe A et le groupe B

Les critères classiques (caractères cultureux, pouvoir pathogène), biochimiques (pathotoxine et protéines), moléculaires (caryotype, PCR, RFLP et RAPD) et l'incompatibilité sexuelle entre les deux groupes de souches (Tableau 5) confortent l'hypothèse que les groupes A et B seraient deux espèces différentes (Koch *et al.*, 1991; Goodwin et Annis, 1991; Morales *et al.*, 1993b). Cependant, Taylor et Borgmann (1994) et Taylor *et al.* (1995) montrent qu'un élément d'ADN répété, présent en grand nombre de copies, exclusivement dans le génome des souches du groupe A, existe également dans le génome d'une souche australienne du groupe B. Les auteurs suggèrent alors la possibilité d'échanges génétiques entre les deux groupes de souches qui, selon Balesdent *et al.* (1992), peuvent être isolés d'un même débris de culture.

Petrie (1982) observe une réduction des symptômes d'une souche fortement pathogène (souche du groupe A) par une souche faiblement pathogène (souche du groupe B). L'inoculation des feuilles de Colza avec une souche du groupe B, puis une souche du groupe A, permettrait de réduire la taille des symptômes dus à la souche du groupe A (Mahuku *et al.* cités par Thürwächter *et al.*, 1995). Thürwächter *et al.* (1995) pensent que l'inoculation préalable avec une souche du groupe B, protège la plante contre l'infection par les souches du groupe A au champ. Ces résultats restent cependant préliminaires et méritent d'être confirmés.

II-FACTEURS AFFECTANT LA GRAVITE DE LA MALADIE

La manifestation et la gravité de la maladie sont la résultante des interactions entre les composantes environnementales (température, humidité etc...), les facteurs inhérents à la plante-hôte (niveau de résistance, physiologie etc...) et les caractéristiques de l'agent pathogène (pouvoir pathogène...).

a) Effets des facteurs environnementaux

La température et la qualité de la lumière sont des facteurs-clés intervenant sur les différentes séquences de la reproduction sexuée chez *L. maculans*. En conditions contrôlées, Mengistu *et al.* (1993) obtiennent des périthèces des souches du groupe A sur milieu gélosé à l'issue de cinq semaines de culture, d'abord sous lumière blanche à 24 °C pendant une semaine puis sous lumière noire à 16 °C pendant quatre semaines.

L'importance d'une humidité relative élevée est bien établie pour la production de la forme sexuée au champ. La quantité d'ascospores produites, leur éjection et leur germination restent tributaires des conditions de température, mais aussi de la pluie et d'une forte humidité (Hall, 1992; Petrie, 1994; Alabouvette et Brunin, 1970).

L'effet de l'humidité sur l'infection reste encore mal élucidé. Toutefois, Lacoste *et al.* (1969) indiquent qu'une forte humidité est indispensable à l'infection. De même Xi *et al.* (1991) et Gladders (1995) constatent que le niveau de la maladie est plus faible pendant les années de sécheresse. En effet, la dissémination des pycniospores est exclusivement assurée par la pluie.

Au champ, les températures douces sont favorables au développement de la Nécrose du collet. Lacoste *et al.* (1969) montrent qu'elle apparaît quatre semaines après inoculation à 15 °C contre huit semaines à des températures inférieures à 10 °C. En conditions contrôlées, le développement de la nécrose du collet est ralenti entre 1 et 10 °C alors que les températures élevées accélèrent l'expression de la maladie (Hall, 1992). De même, la résistance des plantes peut devenir instable à températures supérieures à 22 °C (Badawy *et al.*, 1992).

Les blessures et autres dommages d'origines biotiques (insectes), abiotiques (herbicides) causés aux plantes peuvent contribuer à aggraver l'incidence de la maladie (Gabrielson, 1983; Petrie, 1973). La blessure des organes cibles avant l'inoculation d'ascospores ou de pycniospores favorise l'infection (Lacoste *et al.*, 1969; Brunin et Lacoste, 1970).

En France, l'incidence de plus en plus importante de la Nécrose du collet serait en partie imputable aux conditions d'automne et d'hiver relativement douces ces dernières années.

b) Effets des facteurs liés à *L. maculans*

1) Types d'inoculum :

Les ascospores ont une capacité d'infection supérieure à celle des pycniospores. En conditions de laboratoire, les ascospores germent au bout de 4 à 8 h alors que chez les pycniospores, les tubes germinatifs apparaissent entre 12 et 24 h. La capacité germinative des ascospores doublée de leur dissémination par le vent sur de grandes distances donnent à ces propagules infectieuses une place prépondérante dans l'épidémie. En comparant le pouvoir pathogène des ascospores et des pycniospores à différents stades de développement des plantes et dans différentes conditions, Lacoste *et al.* (1969) montrent une pathogénie plus importante des ascospores. Hammond et Lewis (1987) aboutissent à la même conclusion en testant les deux types d'inoculum sur feuilles après blessure.

2) Types de souches

La structure des populations de *L. maculans* en groupes A et B affecte également l'importance des dégâts occasionnés. Le groupe A, généralement pathogène sur tous les organes de la plante du Colza est reconnu comme l'agent responsable de la verse parasitaire au champ.

Quant au groupe B, il a pendant longtemps été considéré comme faiblement pathogène sur le Colza. Mengistu *et al.* (1991) montrent que le 'pathotype' PGI correspondant à ce groupe est non agressif sur trois cultivars de Colza. Cependant, récemment, l'analyse du pouvoir pathogène des souches de *L. maculans* sur *Brassica* spp. au stade cotylédonaire montre que le groupe B est plus pathogène que le groupe A (Jonhson et Lewis, 1994; Gall *et al.*, 1995). Les souches du groupe B sont également capables de causer des lésions sur feuilles aussi bien en conditions contrôlées qu'au champ (Jonhson et Lewis, 1994).

3) Apparition de nouveaux pathotypes

L. maculans peut se conserver dans les lots de semences sous sa forme asexuée (mycélium ou pycniospores). Bien que le rôle des semences dans l'aggravation de l'épidémie soit négligeable dans les régions où la maladie est endémique (Gabrielson, 1983; Petrie et Vanderpool, 1974), elles constituent néanmoins une source potentielle d'introduction du parasite dans des régions indemnes de la maladie ou de nouveaux pathotypes dans les régions déjà affectées (Hall *et al.*, 1996).

Comme *L. maculans* est un champignon hétérothallique, il peut engendrer par recombinaison au cours de la méiose des pathotypes nouveaux. Le cycle de développement de la maladie est assuré par des individus haploïdes (ascospores, mycélium de la phase parasitaire, pycniospores). Au cours

de cette phase haploïde, le champignon est soumis à des pressions sélectives pouvant modifier les caractères génétiques du parasite. Les mécanismes de la variabilité chez *L. maculans* ne sont pas tous connus avec certitude. Petrie (1969) évoque la parasexualité comme mécanisme possible, cependant sa manifestation en conditions naturelles reste à démontrer.

c) Effet de la variabilité génétique de l'hôte

1) Chez le Colza

Lorsqu'une collection de souches du groupe A de *L. maculans* est confrontée à une gamme de *Brassica* spp. au stade jeunes plantes, différents types d'interaction sont révélés. Les informations disponibles sur la nature des interactions restent fragmentaires et les avis des différents auteurs sont partagés. Cargeeg et Thurling (1980), en inoculant des souches australiennes sur du Colza de printemps, observent une variation continue de la réaction des cultivars et concluent que la résistance de l'hôte et la pathogénie du champignon seraient sous contrôle polygénique. Hill (1991) rapporte la présence de résistance récessive ou incomplètement dominante chez le Colza au stade cotylédonaire tandis que Stringam *et al.* (1992) pensent que la résistance au stade jeunes plantes chez des cultivars australiens est sous le contrôle d'un gène dominant. Plus récemment, l'utilisation de lignées haploïdes doublés et de marqueurs RFLP a permis à Ferreira *et al.* (1995) d'identifier un locus majeur LEM1 contrôlant la résistance à *L. maculans* chez le cultivar de Colza Major. Ce locus intervient dans la résistance spécifique au stade cotylédonaire et serait également impliqué dans la résistance polygénique au niveau des tiges en conditions contrôlées.

Au champ, tous les cultivars de Colza présentent une sensibilité au stade jeunes plantes et au niveau foliaire. Cependant, certains d'entre eux manifestent une résistance partielle au stade adulte vis-à-vis de la nécrose du collet. Ainsi, le cultivar de Colza d'hiver Jet Neuf, bien que sensible au stade jeunes plantes (Mithen *et al.* 1987; Gretenkort et Ingram, 1993) présente un bon niveau de résistance au stade adulte au champ (Sacristan et Gerdermann, 1986; Brun *et al.*, 1989). Brunin et Lacoste (1970) observent que la résistance s'établit à partir du stade trois feuilles par l'installation de barrières anatomiques qui empêchent l'évolution du champignon vers le collet. Le déterminisme génétique de la résistance au stade adulte du Colza serait de nature digénique (Sawatsky, 1989 cité par Rimmer et Van den Berg, 1992) ou polygénique (Cargeeg et Thurling, 1979; Ferreira *et al.*, 1995).

2) Chez les Moutardes

Les Moutardes noire (*B. nigra*), brune (*B. juncea*) et d’Ethiopie (*B. carinata*) manifestent une résistance totale à tous les stades de développement de la plante (Roy, 1978, 1984; Sacristan et Gerdermann, 1986; Zhu *et al.*, 1993). La résistance totale à *L. maculans* chez les *Brassica* serait donc portée par le génome B commun à toutes ces espèces. Les résistances de la Moutarde noire et de la Moutarde brune sont les plus étudiées. En dépit de l’absence des symptômes extérieurs, Keri (1991) cité par Rimmer et Van den Berg (1992), observe dans la majorité des lignées de *B. juncea* testées des infections racinaires dues à *L. maculans*. Le déterminisme génétique de la résistance totale de *B. juncea* vis-à-vis des souches du groupe A serait digénique à effets épistatiques d’après Rimmer *et al.* (1995). Hill (1991) rapporte que la réaction d’hypersensibilité observée sur les cotylédons de *B. juncea* serait contrôlée par un gène dominant. Chez la Moutarde noire différentes équipes sont parvenues à obtenir des lignées d’addition monosomiques (38 chromosomes du Colza plus un chromosome de la Moutarde noire). L’analyse de la résistance de ces différentes lignées vis-à-vis des souches du groupe A a permis à Zhu *et al.* (1993) et à Chèvre *et al.* (1996) d’identifier respectivement trois chromosomes et un chromosome portant la résistance à *L. maculans*. Chèvre *et al.* (1996) montrent que le chromosome 4 de la Moutarde noire confère à la lignée de Colza porteuse une résistance de type hypersensible au stade cotylédonaire.

Contrairement à *B. nigra*, les cultivars de *B. juncea* et *B. carinata* sont sensibles aux souches du groupe B aux stades cotylédonaire et adulte (Johnson et Lewis, 1994).

Chapitre 3 : METHODES DE LUTTE

L'importance de l'incidence économique de cette maladie et le manque de moyens de lutte efficaces expliquent la poursuite des efforts entrepris par les sélectionneurs, les pathologistes et les professionnels dans la recherche et l'expérimentation de méthodes de lutte agronomique, chimique et génétique.

I-METHODES AGRONOMIQUES

C'est un ensemble de pratiques culturales visant à réduire la quantité d'inoculum primaire en créant un environnement aussi défavorable que possible à la conservation, à la reproduction sexuée et à la dissémination des propagules infectieuses. La lumière étant un facteur indispensable à la formation des périthèces sur les résidus au champ, il est conseillé sous nos climats, de broyer et d'enfouir les restes de culture infestés (Alabouvette et Brunin, 1970). Le stade de sensibilité du Colza d'hiver en France (avant trois feuilles) coïncide avec la période de forte émission des ascospores au champ (Brunin et Lacoste, 1970). Par conséquent, l'implantation précoce des cultures est recommandée afin de décaler les deux périodes. La destruction des Crucifères adventices et des repousses de Colza susceptibles d'héberger le champignon et, dans certains cas, le traitement des semences (Gabrielson, 1983) font partie des mesures sanitaires visant à interrompre le cycle du parasite. Cependant, pour être efficace, l'ensemble de ces mesures prophylactiques devrait être appliqué à grande échelle en vue d'éviter les contaminations inter-parcelles *via* les ascospores (Petrie, 1978; Gladders et Musa, 1980; CETIOM, 1992) qui peuvent être transportées sur des kilomètres par le vent.

II-LUTTE CHIMIQUE

Les différents produits chimiques utilisés ont une efficacité variable en fonction des conditions d'expérimentation. En Australie, Brown *et al.* (1976) rapportent que l'utilisation du bénomyl en traitement de semences protège les jeunes plantes inoculées en serre mais s'avère inefficace au champ. Si les traitements chimiques des semences permettent d'éviter l'introduction du champignon dans les zones indemnes, ils n'ont aucune efficacité sur la réduction des épidémies dans les régions déjà infestées (Gabrielson, 1983; Humpherson-Jones, 1986). L'application au semis d'engrais enrobés avec du flutriafol réduit l'incidence de la Nécrose du collet (Ballinger *et al.*, 1988a

Tableau 6 : Différents types de résistance à *Leptosphaeria maculans* chez les crucifères

Espèces	Stades	Types de résistance	Symptômes	Déterminismes génétiques	Mécanismes physiologiques
Colza	Adulte	Partielle	Réduction de l'importance de la Nécrose du collet	Polygénique	Barrières anatomiques
Moutardes	Cotylédonaire Adulte	Totale	Réaction de type hypersensible	Mono ou oligogénique	Phytoalexines ?

et b). Des travaux similaires conduits au Canada (Xi *et al.*, 1989) montrent une efficacité variable de ce produit.

La production continue d'ascospores pendant la période de sensibilité des plantes expliquerait l'absence d'efficacité de la lutte chimique vis-à-vis des attaques foliaires (Alabouvette et Brunin, 1970; McGee et Petrie, 1979; Gladders et Musa, 1980; Gugel et Petrie, 1992). En France, des études préliminaires conduites par le CETIOM montrent que les pulvérisations foliaires au champ ont un effet significatif sur la réduction de la maladie si elles sont appliquées au moment des pics de contaminations (CETIOM, 1995). Les applications fongicides au champ avec de nombreuses spécialités n'ont pas donné de résultats satisfaisants (Kharbanda, 1992). Il ressort alors, de toutes ces études, qu'aucune lutte chimique efficace contre la Nécrose du collet ne peut être actuellement recommandée.

III-LUTTE GENETIQUE

Compte tenu du manque d'efficacité des méthodes précédentes face à la grande variabilité du champignon, l'exploitation de la résistance de l'hôte s'avère actuellement la méthode de lutte la plus prometteuse pour contrôler les épidémies de Nécrose du collet.

En France, la sélection généalogique doublée de l'évaluation de la résistance au champ a abouti à la création des deux premiers cultivars de Colza d'hiver présentant une résistance partielle au champ vis-à-vis de la Nécrose du collet (Ramsès en 1970 et Major en 1971). Le maintien des efforts de sélection pour la résistance à la Nécrose du collet a abouti à la commercialisation, en France, du cv. Jet Neuf à partir de 1977.

A l'exception du cv. Vivol, le niveau de résistance à la Nécrose du collet au stade adulte est actuellement encore insuffisant chez la plupart des cultivars commercialisés en France. Pour améliorer la résistance du Colza aussi bien au stade cotylédonaire qu'au stade adulte, différentes stratégies de sélection sont basées sur l'exploitation de la variabilité intraspécifique (Colza) et interspécifique (Moutardes) et sur la transformation génétique.

IV-SELECTION POUR LA RESISTANCE A LA NECROSE DU COLLET

a) Les hybridations intraspécifiques

Certains cultivars de Colza d'hiver ou de printemps présentent une résistance partielle au stade adulte qui a pour effet de limiter les pertes de rendements (Tableau 6).

En France, le cv. Darmor (dont la résistance provient du cv. Jet Neuf) est utilisé dans un programme d'étude génétique de la résistance partielle au champ (Delourme *et al.*, 1995), tandis que le cv. Jet Neuf reste le principal géniteur de résistance dans de nombreux pays. Au Canada, l'exploitation de la résistance intraspécifique est basée sur le cultivar de printemps Crésor et le cultivar d'hiver Jet Neuf (Rimmer *et al.*, 1995). De nos jours, nombre de programmes d'hybridation intraspécifique intègrent de nouvelles méthodes visant à raccourcir le cycle de sélection. Les lignées de Colza peuvent ainsi être créées en 4-5 ans par haplodiploïdisation au lieu de 8-9 ans par sélection généalogique (Renard *et al.*, 1992). L'utilisation de populations d'haploïdes doublés dérivant de croisements entre des cultivars résistants et sensibles (au stade adulte ou cotylédonaire) en présence de marqueurs moléculaires (isozymes, RAPD et RFLP) devrait aboutir à l'avenir à une cartographie des gènes impliqués dans les résistances intra- et interspécifiques (Ferreira *et al.*, 1995; Delourme *et al.*, 1995; Chèvre *et al.*, 1996). Grâce à la sélection assistée de marqueurs moléculaires, l'introgression de gènes de résistance pourra être optimisée.

b) Les hybridations interspécifiques

Pour élargir les bases génétiques de la résistance du Colza à la Nécrose du collet, des programmes de sélection visent à exploiter d'autres sources de résistance présentes chez les espèces voisines telles que *B. insularis*, *B. rapa* (Mithen *et al.*, 1987, 1988; Crouch *et al.*, 1993) et les Moutardes *B. juncea*, *B. nigra* et *B. carinata* (Rimmer et Van den berg, 1992). Toutes ces espèces expriment une résistance de type hypersensible au stade cotylédonaire vis-à-vis d'une large gamme de souches du groupe A. Cette résistance serait associée à la production et à l'accumulation rapide d'une phytoalexine, la brassilexine (Rouxel *et al.*, 1990) dans le cas de *B. juncea*. Depuis les travaux originaux de Roy (1978), de nombreuses équipes s'investissent dans l'introgression de la résistance des Moutardes dans le génome du Colza.

Sacristan et Gerdermann (1986) montrent que la résistance des hybrides Colza-Moutarde brune est plus stable que celle des hybrides Colza-Moutarde d'Ethiopie. Struss *et al.* (1991, 1992) et Zhu *et al.* (1993) obtiennent huit lignées d'addition Colza-Moutarde noire qui leur permettent d'identifier les chromosomes portant la résistance (voir paragraphe 2, page 23).

En France, deux types de lignées sont actuellement étudiés : les lignées d'addition Colza-Moutarde noire et les lignées de recombinaison Colza-Moutarde brune. Chèvre *et al.* (1991 et 1996) sélectionnent des lignées d'addition après hybridation entre *B. napus* cv. Darmor et *B. nigra* cv. Junius qu'ils caractérisent par des marqueurs moléculaires et par la résistance à *L. maculans* au stade cotylédonaire. Une translocation entre le chromosome 4 impliqué dans la résistance à *L. maculans* et un chromosome du Colza chez une plante est en cours de caractérisation (Chèvre *et al.*, 1996). A partir d'hybrides Colza-Moutarde brune provenant du matériel de Roy (1978), des lignées

de recombinaison résistantes au stade cotylédonaire ont été sélectionnées. Ces lignées à $2n = 38$ chromosomes ont un comportement méiotique normal et possèdent une bonne résistance au champ en conditions d'infestation semi-naturelle (M. Renard, comm. pers.).

c) La transgénèse

L'introduction de caractères nouveaux chez les espèces végétales fait désormais intervenir les techniques du génie génétique auxquelles le Colza se prête bien (Guerche *et al.*, 1994). La transformation génétique par l'introduction de gènes codant pour les chitinases permet d'obtenir des lignées résistantes à *L. maculans* (Rasmussen *et al.*, 1992). Les chitinases catalysent l'hydrolyse des β -1-4, glucosides de la chitine, composante majeure de la paroi de la plupart des champignons à l'exception des Oomycètes (Grezes-Besset *et al.*, 1995). Les lignées transgéniques de Colza obtenues avec ces constructions montrent un niveau élevé de résistance au champ vis-à-vis des quatre principaux champignons pathogènes du Colza dont *L. maculans*.

Chapitre 4 : DURABILITE DE LA RESISTANCE

I-INTRODUCTION

La co-évolution des plantes et des agents pathogènes est un phénomène général. Toute culture est endommagée si elle n'est pas protégée contre ses agents pathogènes (Hogenboom, 1993). De toutes les méthodes de lutte, la résistance variétale est de loin la plus adéquate parce qu'elle est la moins coûteuse et la plus respectueuse de l'environnement (Messiaen, 1981). Van der Plank (1968) définit deux concepts pour désigner deux types de manifestation de la résistance des plantes aux maladies : la résistance verticale et la résistance horizontale.

La résistance verticale protège les populations de l'hôte contre certaines souches du parasite. Elle est dite spécifique, complète et est sous contrôle mono ou oligogénique (Van der Plank, 1968). Elle est basée sur des mécanismes génétiques tenant compte de la capacité de variation du pathogène. Par conséquent, la principale caractéristique agronomique généralement associée à ce type de résistance est le cycle 'vogue et échec' (Robinson, 1976). De la popularité d'une variété pourvue d'une résistance spécifique découle une abondance de pathotypes du parasite munis de la virulence nécessaire pour contourner la résistance de l'hôte.

La résistance horizontale polygénique s'exprime vis-à-vis de toutes les souches du parasite, elle est qualifiée de partielle et le plus souvent à déterminisme polygénique (Van der Plank, 1968). Elle protège la plante après que la résistance verticale a été contournée (Van der Plank, 1968; Robinson, 1976; Johnson, 1979). En terme épidémiologique, la résistance horizontale ralentit l'épidémie, par son action sur la vitesse d'infection (Van der Plank, 1968; Johnson, 1979). Les auteurs qualifient la résistance horizontale de résistance générale et stable. Cette stabilité est attribuée à la stabilité des races du pathogène qui n'exclut pas l'apparition de nouvelles races ou la disparition d'anciennes races (Van der Plank, 1968). La résistance horizontale entretient un équilibre stable entre toutes les races du pathogène, permettant de limiter de manière permanente l'action du parasite (Van der Plank, 1968; Robinson, 1976; Johnson et Law, 1975; Rapilly *et al.*, 1989).

Si le meilleur contrôle des agents pathogènes des cultures repose essentiellement sur la variabilité génétique de l'hôte, celle-ci doit permettre d'assurer une protection complète ou de maintenir les populations du parasite en dessous de leur seuil de nuisibilité. Dans ce contexte, le principal objectif de la création variétale est la durabilité de la résistance sélectionnée (Hogenboom, 1993).

II-DEFINITION ET BASES GENETIQUES DE LA DURABILITE

Très rapidement après l'introduction d'un cultivar résistant à un pathogène, il apparaît que certaines populations du pathogène sont capables de s'adapter à la nouvelle résistance et de la contourner. Cependant, toutes les résistances variétales ne sont pas surmontées et des différences de durabilité peuvent être mises en évidence (Hogenboom, 1993).

Selon Johnson (1993), une résistance durable est une résistance qui demeure efficace dans un cultivar qui est cultivé sur de grandes surfaces et pendant toute la durée de sa commercialisation dans un environnement favorable à la maladie. La question est de savoir à partir de quand et comment peut-on dire qu'une résistance est durable ou non durable? Selon Johnson (1993), l'identification d'une telle résistance repose sur les connaissances concernant le pathosystème et tient compte de la performance d'autres cultivars possédant le même type de résistance.

La durabilité de la résistance est une notion très variable (Hogenboom, 1993) qui dépend fortement du pathosystème. De plus, la durabilité peut être influencée par des facteurs environnementaux et génétiques. D'une manière générale, la résistance verticale oligogénique correspondrait à une résistance instable et non durable alors que la résistance horizontale ou partielle à déterminisme polygénique serait alors synonyme de résistance stable et durable. Le terme 'résistance durable' est descriptif de l'état de la résistance, au cours du temps, du cultivar qui en est munie. Elle est alors subjective et ne renseigne pas sur la nature et les causes de cette durabilité (Burdon, 1993).

En effet, des exemples de résistances durables concernent aussi bien des résistances à déterminisme monogénique, oligogénique ou polygénique (Burdon, 1993). La résistance du maïs à *Helminthosporium maydis* est une résistance oligogénique durable (Johnson, 1984; Leonard, 1993). Cependant, les cas les plus nombreux de résistance durable se rencontrent chez les résistances polygéniques (Burdon, 1993; Parlevliet, 1993). La nature polygénique de la résistance partielle ne donne cependant aucune garantie qu'elle restera indéfiniment efficace (Burdon, 1993) donc durable.

III-EVALUATION DE LA DURABILITE DE LA RESISTANCE

Conformément à la définition proposée par Johnson (1984), la résistance durable ne peut être détectée que quand le cultivar qui la porte est cultivé sur de grandes surfaces et pendant de nombreuses années. Selon Johnson (1993) aucune autre approche ne peut permettre d'identifier légitimement une résistance durable. Il apparaît alors difficile d'évaluer la durabilité de la résistance

d'un génotype en cours de sélection et par conséquent non commercialisé et non cultivé à grande échelle.

La principale composante des programmes de sélection pour la résistance est l'évaluation de l'efficacité et de la stabilité de la résistance sélectionnée en utilisant :

- des tests multilocaux et pluriannuels. Ils permettent d'étudier l'adaptabilité des cultivars et la stabilité de la résistance dans différents contextes parasitaires et climatiques. La stabilité de la résistance dans un environnement donné est seulement une indication de la durabilité de cette résistance, cependant il n'existe aucune liaison stricte entre la stabilité observée et ce que sera la durabilité quand le cultivar résistant sera commercialisé (Subrahmanyam *et al.*, 1993). C'est par exemple le cas de la résistance du cultivar de triticales Coorong conférée par le gène Sr27 qui s'est avérée efficace dans des tests multilocaux et pluriannuels. Néanmoins sa commercialisation en Australie s'est suivie en quelques années de l'apparition d'une nouvelle race de *Puccinia graminis* portant la virulence pour contourner ce gène de résistance (Johnson, 1984).

- des tests en conditions contrôlées utilisant une collection de souches aussi diversifiée que possible. Dans le cas particulier d'une nouvelle source de résistance, les tests en conditions d'infection contrôlée apparaissent insuffisants (Johnson, 1984).

Si ces tests permettent d'étudier la stabilité de la résistance dans un contexte environnemental et parasitaire donné, ils n'évaluent pas la durabilité de la résistance même si ceux-ci sont répétés pendant plusieurs années (Johnson, 1984). Cependant, ils permettent de mettre en évidence l'existence éventuelle de souches capables de surmonter la résistance (Johnson, 1984).

IV-DURABILITE DE LA RESISTANCE A LA NECROSE DU COLLET

Aucune étude de la durabilité de la résistance du Colza vis-à-vis de la Nécrose du collet n'a été rapportée jusqu'à nos jours. Cependant, la résistance du cultivar français Jet Neuf s'est révélée efficace en France et en Europe, pendant toute la durée de sa commercialisation, de 1977 à 1983 alors qu'il était cultivé sur de grandes surfaces en présence du parasite. Par conséquent et conformément à la définition proposée par Johnson (1984), la résistance du cv. Jet Neuf peut être qualifiée de durable. Le cv. Jet Neuf est toujours utilisé par de nombreuses équipes comme géniteur de résistance dans des programmes de sélection.

Choix d'une terminologie : Les méthodologies que nous avons adoptées pour notre étude sur l'efficacité et la stabilité de la résistance des lignées de recombinaison colza-moutarde brune ne satisfont pas entièrement aux conditions définies par Johnson (1984) pour déterminer si cette nouvelle source de résistance est durable. C'est pourquoi nous utiliserons le terme 'durabilité potentielle'.

MATERIELS
ET
METHODES

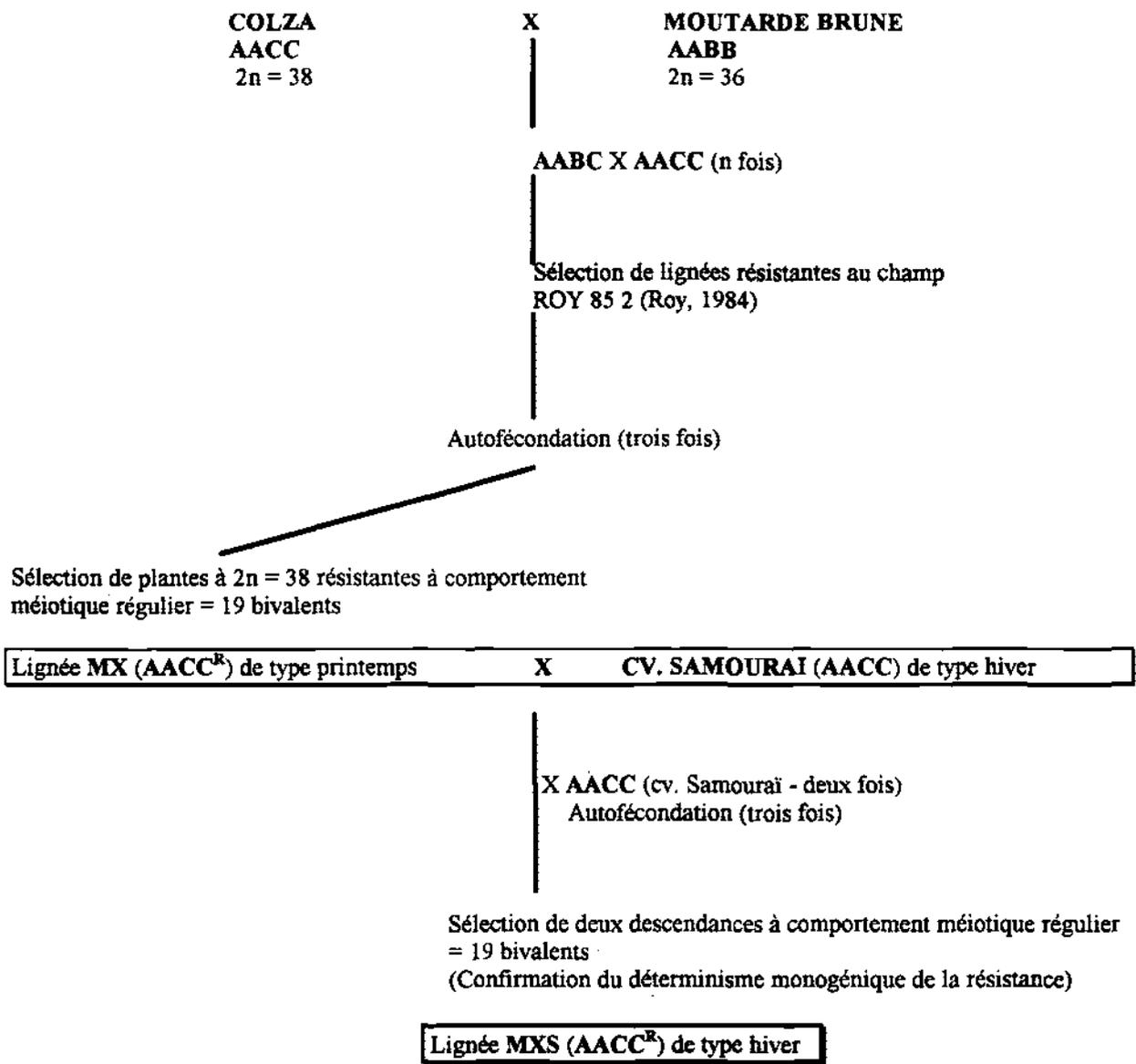


Figure 11 : Création des lignées de recombinaison Colza - Moutarde brune (M. Renard, comm. pers.).

MATERIELS ET METHODES

I-CARACTERISTIQUES DU MATERIEL VEGETAL

Les lignées de recombinaison sur lesquelles porte notre étude sont obtenues à partir de descendances d'hybrides Colza-Moutarde brune sélectionnés par Dr N. N. Roy, pour la résistance à *L. maculans* au champ (Roy, 1984) (Australia, Department of Agriculture, S. Perth, WA.). A l'issue de quatre générations d'autofécondation, des plantes à $2n = 38$ chromosomes à comportement méiotique régulier, homogènes, stables et résistantes à *L. maculans* ont été sélectionnées par la Station d'Amélioration des Plantes (INRA, Le Rheu) en utilisant le test cotylédonaire de Williams et Delwiche (1979) (M. Renard, comm. pers.). Ces lignées résistantes (*Brassica napus*^R) sont utilisées dans notre étude sous les dénominations de MX, LR1 et LR3. Elles sont toutes de type printemps. Pour la dernière année, nous avons disposé d'une lignée de recombinaison de cycle d'hiver MXS issue d'un croisement entre la lignée MX et le cultivar de cycle d'hiver Samourai rétrocroisé deux fois par le cv. Samourai (Fig. 11).

L'ensemble des génotypes hôtes ayant fait l'objet de nos investigations est consigné dans le tableau 7 (verso de la page 37). D'une manière générale la lignée MX, la Moutarde brune cv. Picra et le Colza cv. Westar sont utilisés dans tous les tests de pouvoir pathogène sauf indication contraire. Toutefois, le nombre de génotypes utilisés varie en fonction du type d'essai mis en place. Par conséquent, nous avons choisi de présenter pour chaque expérimentation la liste du matériel végétal correspondant.

II-ANALYSE DE LA DIVERSITE DES POPULATIONS DE *L. MACULANS*

a) Matériel fongique

1) Origines et caractéristiques des souches

A partir des plantes cultivées au champ et sur les résidus desquelles des périthèces se sont développés à l'automne, nous avons constitué trois populations de souches :

- les souches isolées de la lignée de recombinaison MX
- les souches isolées de la Moutarde brune cv. Picra
- les souches isolées de différents cultivars de Colza

Les populations ainsi collectées sont constituées essentiellement de souches monoascosporées. Dans le souci de diversifier notre collection de souches, nous avons utilisé quelques souches isolées de Colza et stockées dans la mycothèque. Ces souches proviennent de différentes régions de France et de divers pays.

Nous nous sommes également procurés des souches de référence en provenance d'Allemagne (A940 à A942 productrices de sirodesmine PL et B943 à B945 non productrices de sirodesmine PL)¹, d'Australie (DJB 10, 11, 14 18 et 21)², des USA (PHW1270 et 1268)³ et des souches isolées de Crucifères cultivées et adventices parmi lesquelles les souches Thlaspi 64 et 65 (IBCN)⁴ et une souche de *P. wasabiae* (Canada)⁵ isolée du Raifort. Nous nous sommes intéressés par ailleurs à d'autres espèces de *Phoma*⁶.

2) Isolement et conservation des souches

Les souches monoascosporées sont collectées suivant la méthode décrite par Smith et Sutton (1964). Des morceaux de tiges recouverts de périthèces sont lavés à l'eau courante du robinet puis séchés avec du papier filtre. Les morceaux de tige sont ensuite découpés en deux ou trois fragments puis collés à l'aide de vaseline sous le couvercle d'une boîte de Petri contenant de l'eau gélosée à 2 % additionnée de sulfate de streptomycine (Annexe 2). Les boîtes de Petri sont ensuite maintenues dans les conditions de laboratoire (à environ 20 °C). A l'issue de 12 à 24 h, les ascospores éjectées commencent à germer. Les ascospores en germination sont observées à la loupe binoculaire et prélevées individuellement au moyen d'une pipette pasteur effilée à la flamme. Les spores ainsi prélevées au hasard sont transférées sur milieu malt gélosé (Annexe 2) additionné de sulfate de streptomycine. Après 7 à 14 jours de culture à température ambiante, les souches sont repiquées en tubes (15 mm de diamètre) contenant du milieu malt gélose et stockées en mycothèque à 3-4 °C. La codification tient compte de l'hôte d'origine (P = cv. Picra, MX et R= lignée MX et Co = Colza) pour les souches et de l'organe d'origine (F = feuille, T = tige et C = collet) pour les isolats. Les codes formés d'un nombre précédé de la lettre A ou B identifient les souches et isolats de référence et ceux d'origines géographiques diverses appartenant respectivement aux groupes A et B.

3) Préparation de l'inoculum

¹ Dr. Poutot (Gesamthochschule Kassel, Witzenhausen, Germany)

² Dr. D. J. Ballinger (Victorian Institute for Dryland Agriculture, Horsham, Australia)

³ Dr. P. H. Williams (University of Wisconsin, Madison, USA)

⁴ IBCN : International Blackleg of Crucifers Network

⁵ Dr. G. Séguin -Swartz (AAFC Research Centre, Saskatoon, Canada)

⁶ V. Cerceau (Station de Pathologie Végétale, l'INRA, Le Rheu).

Des explantats mycéliens de la souche dont on veut produire l'inoculum sont déposés sur le milieu V8 gélosé (Annexe 2) en boîtes de Petri. Les cultures sont ensuite transférées dans une chambre de culture à 20 °C sous lumière noire (300-400 nm fournis par des lampes OSRAM L40W/75) avec une photopériode de 16 h. A l'issue de sept à dix jours de culture, les colonies sporulantes (formation de cirrhes) sont recouvertes de 5 à 10 ml d'eau stérile. En cas de faible sporulation, un léger grattage au moyen d'une pipette pasteur stérile permet d'optimiser la récupération des pycniospores. Une suspension de spores est obtenue après filtration à travers une gaze fine immédiatement placée sur de la glace fondante. L'évaluation de la concentration en pycniospores à l'aide d'une cellule Malassez suivie d'une dilution adéquate permet de disposer d'un inoculum à 10^7 spores/ml. Réparti dans des tubes de différents volumes (2 à 20 ml), l'inoculum est immédiatement utilisé ou conservé à -20 °C, ce qui lui conserve toutes ses qualités.

b) Critères d'analyse de la diversité des souches de *L. maculans*

Trois critères sont utilisés pour analyser la diversité et suivre l'évolution des populations de *L. maculans*.

1) Caractérisation culturelle et morphologique

Après une étude préliminaire des caractéristiques morphologiques et culturelles de quelques souches sur trois milieux gélosés (V8, Czapek et Malt) nous avons choisi d'utiliser le milieu malt gélose (MG) pour la caractérisation culturelle et morphologique des souches.

Des fragments de 5 mm de diamètre sont prélevés au front de croissance d'une colonie de sept jours et déposés en boîte de Petri sur le milieu MG fraîchement coulé à raison de 15 ml par boîte de Petri de 9 cm de diamètre. Cinq répétitions sont prévues par souche. Les cultures sont ensuite incubées à 20 °C, sauf indication contraire, et à l'obscurité. Les critères retenus pour l'analyse de la variabilité culturelle sont :

- la vitesse de croissance (en mm/j) obtenue après 14 jours d'incubation par la mesure de deux diamètres perpendiculaires.
- la morphologie des colonies et la diffusion de pigments dans le milieu de culture, après 28 jours d'incubation.

2) Analyse du pouvoir pathogène en chambres climatisées

● Culture du matériel végétal



Figure 12 : Méthode d'inoculation au stade cotylédonaire selon Williams et Delwiche (1979).

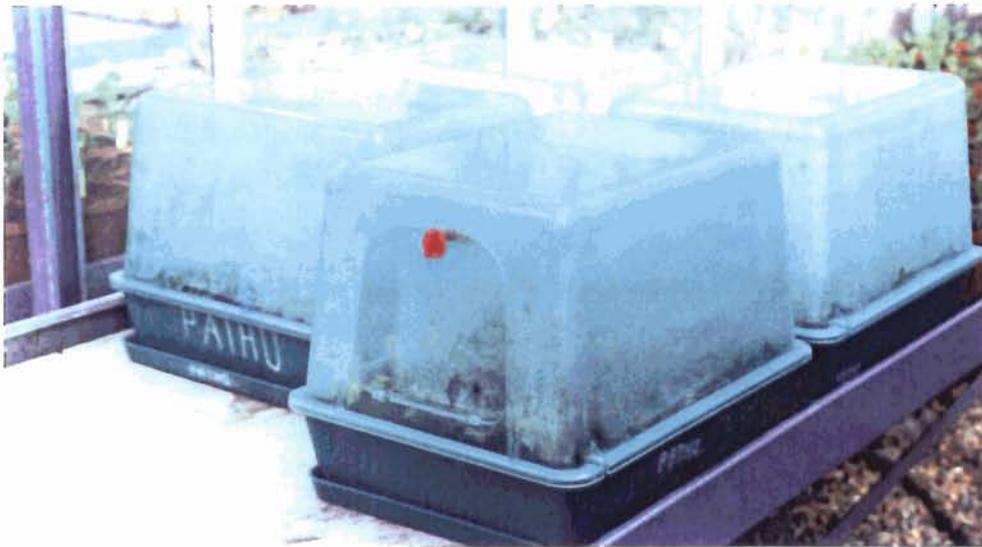


Figure 13 : Incubation des plantes inocuées à humidité relative saturante dans des maxiserres.



Figure 14 : Conduite en serre de la culture des différents génotypes. (Photos : H. Brun et I. Somda)

Les graines sont d'abord désinfectées pendant 30 s dans de l'eau de javel à 50 %, rincées trois fois à l'eau stérile et placées dans une boîte de Petri sur du papier filtre humidifié. A l'issue de deux à trois jours d'incubation, les graines en germination sont transférées dans des pots de 7 x 7 x 8 cm sur un support terreux (1:1:1 / terreau:tourbe:terre) à raison de quatre graines par pot. Quatre pots sont semés pour chaque combinaison souche-génotype. Les plantes sont cultivées en chambres climatisées à 15 ± 1 °C pendant dix jours sous une photopériode de 12 h.

② Méthodes d'inoculation et conditions d'incubation

A l'issue de dix jours de culture, les jeunes plantes sont inoculées suivant la technique décrite par Williams et Delwiche (1979) (Fig. 12). Les quatre lobes cotylédonaire de chaque plante sont légèrement blessés en leur centre au moyen d'une aiguille stérile. Au total, 64 blessures sont réalisées pour chaque combinaison souche- génotype.

L'inoculation est réalisée par le dépôt d'une goutte de 10 μ l de spores titrées à 10^7 spores/ml sur chaque blessure. Les plantes ainsi contaminées sont transférées dans des maxiserres à 20 °C et à l'obscurité. Après 24 h d'incubation, la lumière est rétablie à 16 h de photopériode et l'humidité relative maintenue à 80-90 %. Dans ces conditions, les premiers symptômes se manifestent au bout de cinq à dix jours suivant les souches et les génotypes.

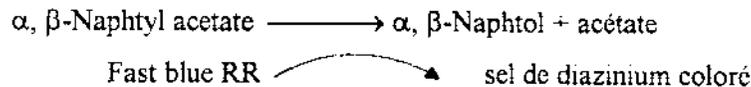
③ Evaluation de la maladie et analyse des résultats

L'évaluation de la maladie intervient 10 ou 14 jours après l'inoculation suivant l'échelle de Williams et Delwiche (1979) de 0 (résistance) à 9 (sensibilité) (Annexe 3). Pour chacune des combinaisons souche-cultivar, un indice moyen est calculé par plante (répétition) suivant la formule $IM = \sum (n_i \times i) / N$ où i = classe de maladie, n_i = nombre de lobes avec la note i et N = nombre total de lobes inoculés. Les données ainsi recueillies sont analysées à l'aide du logiciel SAS, version 6.

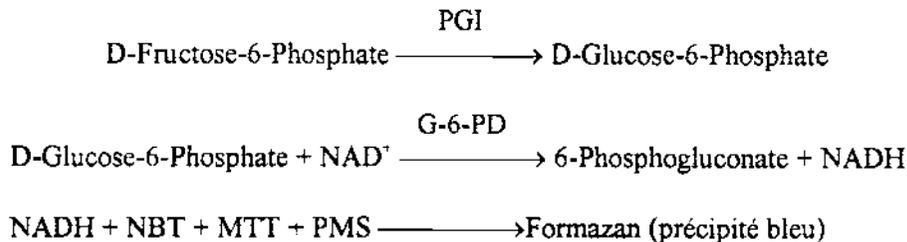
3) Caractérisation biochimique par électrophorèse

Deux systèmes enzymatiques ont été utilisés pour l'étude de la variabilité des populations de *L. maculans*. Il s'agit des isoestérases (E.C. 1.1.1.) sur gel de polyacrylamide et des phosphoglucose isomérases (E.C. 5.3.1.9.) sur gel d'amidon. Le polymorphisme des profils des protéines solubles totales est également analysé pour un certain nombre de souches. Pour l'étude détaillée du polymorphisme des souches de *L. maculans*, nous avons retenu le système des α , β -estérases en raison du polymorphisme révélé et de la bonne qualité de la révélation lors d'une étude préliminaire.

Les estérases constituent un groupe d'enzymes capables d'hydrolyser les esters selon la réaction suivante :



Les phosphoglucose isomérases interviennent dans le métabolisme carboné et catalysent l'isomérisation réversible du fructose-6-phosphate en glucose-6-phosphate suivant la réaction proposée par Pasteur *et al.* (1987) :



❶ Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions non dénaturantes

⊙ Culture et extraction des protéines mycéliennes

Des explantats mycéliens (de 5 mm de diamètre) sont prélevés au niveau du front de croissance de la colonie et transférés aseptiquement dans une fiole de Roux contenant 200 ml de milieu minéral Czapek liquide additionné de levure (Annexe 2). Après 12 jours de culture à 20 °C et à l'obscurité sans agitation, le mycélium est récupéré, rincé abondamment à l'eau stérile puis lyophilisé et conservé à -20 °C.

Pour extraire les protéines solubles, 50 mg de mycélium lyophilisé sont broyés dans un mortier préalablement refroidi, en présence de 50 mg de sable de Fontainebleau et 50 mg de polyvinylpyrrolidone et 1 ml de tampon d'extraction (Annexe 4). Le broyat est centrifugé à 16.000 g pendant 20 mn à 4 °C. Le surnageant est centrifugé à nouveau à 10.000 g pendant 10 mn. L'extrait ainsi obtenu est aliquoté dans plusieurs tubes Eppendorf et additionné de glycérol à raison de 10 % du volume final puis stocké à -20 °C.

⊙ Préparation des gels, dépôts des échantillons et migration

L'électrophorèse monodimensionnelle verticale sur gel de polyacrylamide (Laemmli, 1970) en système discontinu (Ornstein, 1964) en conditions non dénaturantes est la méthode analytique utilisée. Dans ces conditions, les protéines sont séparées en fonction de leur poids moléculaire et de leur charge et sont retenues dans les mailles constituées par l'association des molécules d'acrylamide et de bisacrylamide. La dimension de ces mailles est inversement proportionnelle à la concentration en acrylamide.

Le système discontinu que nous avons utilisé est constitué de deux gels superposés et de concentration en acrylamide différentes. Le gel de concentration à 3,75 % d'acrylamide est destiné à recevoir les extraits protéiques. Ses grandes mailles favorisent la concentration de toutes les

protéines de l'extrait à un même niveau, avant leur séparation dans le second gel : le gel de séparation à 10 % d'Acrylamide (Annexe 4).

Ces deux gels sont successivement confectionnés entre deux plaques (une plaque en alumine avec encoche et une autre en verre) de dimension 100 x 80 x 0,75 mm. Dix puits réalisés dans le gel de concentration grâce à un peigne reçoivent chacun 30 μ l d'extraits protéiques, les puits de bordure étant réservés à l'indicateur de migration (Bleu de bromophénol dissout dans le tampon d'extraction contenant 10 % de glycérol).

La migration électrophorétique est réalisée à 4 °C à l'aide d'une cuve verticale SE 280 (Hoefer) sous un voltage constant de 200 V pendant environ 2 à 2 h 30 suivant la hauteur du gel. Le tampon de migration est le tampon Tris-Glycine (Annexe 4). Les protéines migrent alors de la cathode vers l'anode et l'électrophorèse est interrompue lorsque le bleu de bromophénol atteint le bas du gel. Les protéines sont différemment révélées selon que l'on s'intéresse aux protéines totales ou aux enzymes.

● Coloration des protéines totales

Les protéines sont colorées au bleu de Coomassie selon la méthode de Fairbanks *et al.* (1971) (Annexe 5).

● Révélation des estérases

La révélation des estérases est basée sur le couplage de l'activité spécifique de l'enzyme avec une réaction colorée. La réaction de l'enzyme sur les substrats α , β -Naphthyl acétates, eux-mêmes couplés au réactif coloré (Fast Blue RR) donne lieu à un composé coloré insoluble.

Le protocole de révélation des α , β -estérases est décrit en annexe 5. Pour un système enzymatique donné, il peut exister plusieurs formes de la même enzyme qui sont alors appelées isozymes. Les zymogrammes ou profils enzymatiques représentent l'ensemble des isoenzymes d'un même échantillon (individu) donné.

● Conservation des gels et analyse des protéinogrammes et zymogrammes

Après coloration des protéines et révélation des enzymes, les gels sont photographiés et rapidement séchés entre deux feuilles de cellophane en vue d'une longue conservation des profils obtenus. Les gels ainsi séchés peuvent être utilisés sur rétroprojecteur ou pour une analyse ultérieure des profils.

Les résultats sont exploités à travers des supports photographiques et dans certains cas par des représentations schématiques des zymogrammes. Ces profils enzymatiques sont ensuite analysés visuellement par l'appréciation de la présence ou l'absence de bandes, et par identification des estérases α et β . En effet, l'affinité des enzymes avec le substrat α -Naphthyl acétate se révèle par la

présence de bandes verdâtres alors que les bandes roses matérialisent le couplage avec β -Naphthyl acétate. L'observation de coloration intermédiaire souligne la réaction simultanée des enzymes avec les deux substrats. Chaque bande représentant une ou plusieurs protéines peut être identifiée par sa mobilité relative qui est le rapport de la distance de migration de la bande concernée sur celle parcourue par le front de migration identifié par le bleu de bromophenol. Ce rapport ou Rf (référence frontale ou rapport frontal) est toujours compris entre 0 et 1 (Gottlieb et Hepden, 1966). Nous avons également calculé des coefficients de similitude (CS) en appliquant la formule de Hansen *et al.* (1986) :

$$CS = 2 \times Nab / Na + Nb$$

avec Na et Nb représentant le nombre de bandes totales pour les souches a et b, et Nab étant le nombre de bandes communes aux deux souches a et b. Nous avons ensuite calculé la distance pour chaque couple de souches (1-CS) et construit des dendrogrammes en utilisant le programme UPGMA du logiciel SAS (Institute Inc., 1987).

⊕ Electrophorèse sur gel d'amidon

Cette électrophorèse est effectuée en utilisant le protocole décrit par Chèvre *et al.* (1995) pour l'analyse des isozymes de différentes Crucifères.

⊕ Préparation du gel d'amidon

La préparation d'un gel d'amidon nécessite 300 ml de tampon de gel (Annexe 6) et 34 g d'amidon. Le mélange d'amidon et du tampon de gel (100 ml) est chauffé en agitant l'Erlen-meyer pendant que le reste du tampon (200 ml) est mis à bouillir. Après ajout du tampon bouillant et dès que l'amidon commence à s'épaissir, il est dégazé puis coulé dans la cuve de plexiglas. Le gel est immédiatement couvert avec un film plastique afin d'éviter son dessèchement.

Les gels d'amidon sont préparés la veille de l'électrophorèse et maintenus dans les conditions du laboratoire. Les protocoles des différents tampons sont décrits en annexe 6.

⊕ Cultures mycéliennes et extraction des protéines

Les souches sont mises en culture sur du milieu MG pendant deux semaines dans les conditions de laboratoire. L'extraction des protéines mycéliennes solubles est réalisée en broyant un explantat mycélien d'environ 1 à 2 cm² dans 200 ml de tampon d'extraction (Annexe 6). Des morceaux de papier Whatman n° 3 de 10 x 2 mm sont imbibés de l'extrait protéique, puis placés dans une fente opérée dans le gel d'amidon du côté de la cathode et parallèlement à celle-ci. Le bleu de Bromophénol est utilisé comme indicateur du front de migration.

Tableau 7 : Liste des génotypes hôtes utilisés dans notre étude.

Types d'essai	Moutarde brune	Lignées	Colza	Type
<i>Chambres climatisées</i>	cv. Picra	MX	cv. Westar	Printemps
		MXS	cv. Samourai	Hiver
<i>Serre</i>	cv. Picra	MX	cv. Westar	Printemps
		MXS	cv. Samourai	Hiver
<i>Champ</i>	cv. Picra	MX, LR1, LR3	cv. Shogun	Printemps
			cv. Darmor	Hiver
Essai 1993-94	cv. Picra	MX, LR1, LR3	cv. Falcon	Hiver
			cv. Samourai	Hiver
			cv. Westar	Printemps
			cv. Shogun	Hiver
			cv. Darmor	Hiver
Essai 1994-95	cv. Picra	MX MXS	cv. Falcon	Hiver
			cv. Samourai	Hiver
			cv. Westar	Printemps
			cv. Shogun	Hiver
			cv. Darmor	Hiver

● Migration électrophorétique et révélation des PGI

Après le dépôt des échantillons, le moule contenant le gel est disposé à cheval sur les deux bacs contenant le tampon d'électrode (Annexe 6), un film plastique couvrant le gel. L'ensemble du montage est placé au réfrigérateur et un voltage constant de 75 V est appliqué pendant 10 mn de sorte que les protéines passent dans le gel. Les buvards sont ensuite retirés et un bac contenant de la glace pilée est disposée sur le gel pendant la migration afin d'éviter les échauffements occasionnés par le passage du courant. Un courant de 175 V est alors appliqué pour la suite de la migration. L'électrophorèse est stoppée lorsque le bleu de bromophénol parvient à l'anode, généralement au bout de 5 h de migration.

Pour la révélation des PGI, les gels sont débarassés des parties anodique et cathodique puis découpés en fines tranches au moyen d'un fil à couper le beurre. La tranche est immergée dans la solution de coloration (Annexe 6) pendant environ 1 h à 37 °C et à l'obscurité. Après la révélation, les gels sont rincés à l'eau et analysés visuellement par l'appréciation de la mobilité relative des bandes enzymatiques. Les gels sont ensuite photographiés.

III-EVALUATION DE L'EFFICACITE DE LA RESISTANCE

Dans cette partie de nos travaux, nous distinguons deux types d'expérimentations :

-Les expérimentations conduites en serre visant à analyser la résistance des lignées de recombinaison Colza-Moutarde brune vis-à-vis des souches des groupes A et B sur différents organes de la plante (cotylédons, feuilles et tiges).

-Les expérimentations réalisées au champ ayant pour objectif l'évaluation de la durabilité potentielle de la résistance des lignées de recombinaison confrontée aux populations de *L. maculans* sélectionnées par la résistance d'origine Moutarde brune.

La liste des génotypes hôtes testés dans cette étude figure dans le tableau 7.

a) Expérimentations en serre

1) Matériel végétal et culture

Le semis des différents génotypes (Tableau 7) est réalisé le 8/11/1994 dans des pots de 7 x 7 x 8 cm, à raison de deux graines par pot. Les cultures sont conduites en serre à 20±5 °C avec une photopériode de 16 h. Pour chaque combinaison souche-génotype, 20 plantes sont inoculées et quatre plantes reçoivent de l'eau stérile à la place de l'inoculum. Après l'inoculation et la notation des symptômes sur les cotylédons et les feuilles, les génotypes de printemps sont transférés dans des pots de 16 cm de diamètre sur le même support terreux et tuteurés. Quant aux génotypes de type hiver, ils

Tableau 8 : Caractéristiques des souches et isolats utilisés pour les expérimentations en serre.

Souches		Origines		Agressivité ^a	
		Hôte	Lieu	cv. Picra	lignée MX
Groupe A					
MXC1	Isolat	MX	Le Rheu	MA	A
MX1-13	Souche	MX	Le Rheu	MA	MA
A942	Souche	cv. Falcon	Allemagne	NA	A
Mélange des souches du groupe A					
Groupe B					
MX-6	Souche	MX	Le Rheu	A	A
P3-1	Souche	cv. Picra	Le Rheu	NA	A
B867	Souche	cv. Cérés	Dijon	NA	A
B945	Souche	cv. Cérés	Allemagne	MA	A
Mélange des souches du groupe B					
Mélange des souches des groupes A et B					

^aA = agressive; MA = moyennement agressive et NA = non agressive.

sont vernalisés en chambre froide à 4 °C pendant 65 jours. Les plantes sont ramenées en serre à 20±5 °C où elles sont transplantées dans des pots de 16 cm de diamètre. Les plantes sont arrosées avec une solution nutritive (Akaphos : N-P-K-MgO / 15-10-15-2) toutes les deux semaines de la transplantation jusqu'à la montaison. A partir de la floraison, les plantes sont arrosées deux fois par semaine avec la solution nutritive.

2) Matériel fongique

Nous avons utilisé trois souches du groupe A et quatre souches du groupe B dont les caractéristiques sont mentionnées dans le tableau 8. En plus de ces souches utilisées séparément, trois mélanges de souches servent d'inoculum. Le mélange de deux souches du groupe A, le mélange de quatre souches du groupe B et le mélange des sept souches des groupes A et B. La concentration en spores des souches prises individuellement ou en mélange est ajustée à $1,25 \cdot 10^6$ spores/ml.

3) Conduite de l'essai

① Test sur cotylédons

La méthode d'inoculation est identique à celle décrite dans le paragraphe 2, page 33. Après l'inoculation, les plantes sont maintenues en serre à l'obscurité à l'aide de bâches plastiques noires. L'incubation est ainsi réalisée à 20±5 °C. Après 24 h, les bâches sont ôtées et les couvercles des maxiserres maintenus légèrement ouverts pour entretenir une humidité élevée pendant 48 h (Fig. 13). A l'issue de cette période d'incubation, les maxiserres sont découvertes et les symptômes sont notés 14 jours après l'inoculation suivant l'échelle de Williams et Delwiche (1979) (Annexes 3, 3a).

② Test sur feuilles (Annexes 3, 3a)

L'inoculation est effectuée sur les blessures réalisées de chaque côté de la nervure principale et dans la moitié supérieure du limbe. Afin de maintenir les gouttes sur les points d'inoculation, 5 µl de Tween 80 sont additionnés à 8 ml d'inoculum. Après l'inoculation des feuilles (27 jours après le semis), l'obscurité est maintenue pendant 48 h à l'issue desquelles les plantes sont couvertes pendant 48 heures supplémentaires en vue d'assurer une humidité saturante. Seules les deux premières feuilles sont inoculées. Au moment de l'inoculation des feuilles, le cv. Picra était au stade quatre feuilles et les autres géotypes au stade deux feuilles.

Les symptômes foliaires sont évalués 17 jours après l'inoculation suivant une échelle inspirée de celle de Newman et Bailey (1987) allant de 0 (résistance) à 6 (sensibilité).

③ Test sur tiges

Deux séries d'inoculation sur tiges sont effectuées. Une première inoculation réalisée le 10/01/95 concerne les génotypes de type printemps, la seconde intéresse les génotypes vernalisés (14/03/95). Dans les deux cas, la technique d'inoculation est rigoureusement identique.

Les génotypes de cycle de printemps sont inoculés 62 jours après le semis sur des plantes ayant atteint des stades de développement différents (Fig. 14) : la lignée MX au stade E, le Colza (cv. Westar) en début floraison (F1) et la Moutarde brune (cv. Picra) au stade G1 avec en moyenne 15 siliques formées (Fig. 14). Les génotypes d'hiver sont inoculés 128 jours après le semis soit 15 jours après leur transfert en serre. Au moment de l'inoculation, la lignée MXS et le cv. Samourai étaient en début de montaison.

L'inoculation sur la tige a alors consisté à blesser celle-ci entre la première et la deuxième feuille au moyen d'une aiguille stérile. Cinq blessures d'environ 1 mm de profondeur couvrant la surface d'une pastille de 5 mm de diamètre sont ainsi réalisées. Des pastilles stériles découpées dans du papier buvard sont imbibées dans l'inoculum et immédiatement appliquées sur les blessures. Une bande de parafilm permet de maintenir la pastille pendant toute la durée de l'expérimentation. Les plantes témoins sont inoculées avec des pastilles imbibées d'eau stérile. Deux semaines après l'inoculation des génotypes de type hiver, une attaque d'oïdium a été constatée. Les plantes ont été traitées au Rubigan 4 (Fénarimol, de la famille chimique des pyrimidines méthanol substituées) le 31/03/95 à la dose de 2,5 ml/l. Par ailleurs une forte attaque tardive de pucerons cendrés a écourté d'une semaine la durée de l'expérimentation.

Compte tenu des différences observées dans les symptômes induits sur les tiges par les deux types de souches, nous avons défini deux échelles consignées en annexes 3 et 3b. Ces échelles tiennent compte de la dégradation des tissus ligneux et de la moelle des plantes. Les plantes sont notées huit semaines après l'inoculation pour les génotypes de cycle de printemps et sept semaines après inoculation pour les génotypes de cycle d'hiver.

4) Méthodes d'analyse des résultats

Pour tous les tests, nous considérons chacune des 16 plantes testées comme une répétition. Un indice de maladie est calculé par plante suivant la formule :

$$IM = \sum (n_i \times i) / N$$

où i = classe de maladie variant de 0 à P, P différant en fonction des tests. n_i = nombre de sites d'inoculation avec la note i et N = nombre total de sites inoculés. Les données ainsi recueillies sont analysées à l'aide du logiciel SAS, version 6, suivant la procédure GLM. Les données n'étant pas distribuées suivant la loi normale et les variances étant non homogènes (test de Bartlett), nous avons utilisé un test non paramétrique de comparaison de moyennes, identique au test de Newman et Keuls, en remplaçant les moyennes par les sommes de rangs (Scherer, 1984).

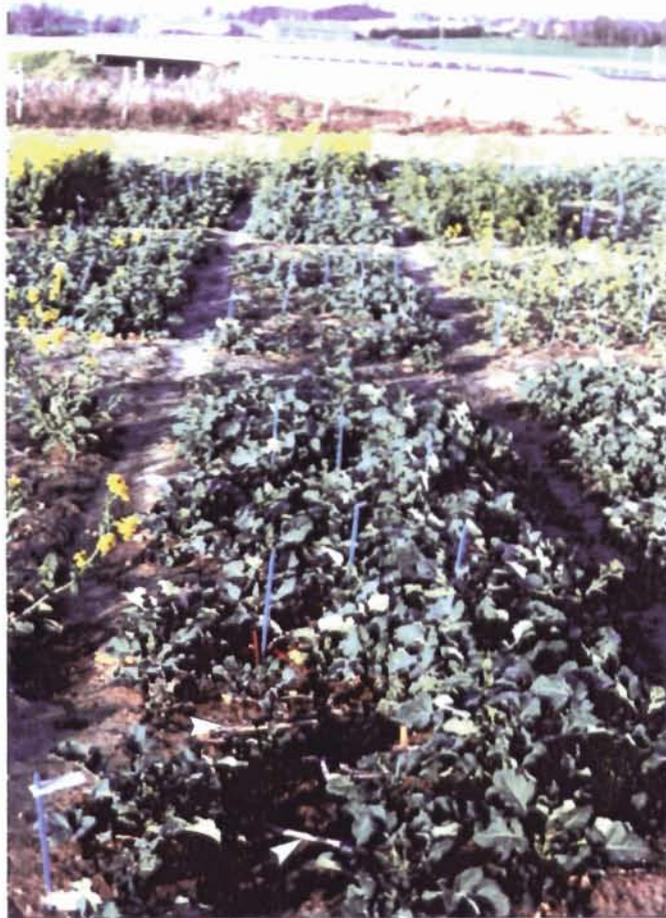


Figure 15a: Dispositif expérimental au champ (quatre répétitions par génotype).

(→) résidus de récolte contaminés. (Photo : I. Somda)

b) Expérimentations au champ

Deux essais ont été réalisés au champ en 1993-94 et en 1994-95 respectivement sur les sites de Cintré (situé à 6 km de la station de Pathologie Végétale) et du Rheu. Les essais seront identifiés dans la suite du mémoire comme suit : Essai 1993-94 et Essai 1994-95. Sauf indication, la mise en place et la conduite des deux essais sont identiques.

1) Matériel végétal et culture

Les géotypes utilisés dans cette étude sont consignés dans le tableau 7. Les semis sont réalisés en automne (9 octobre 1993 pour le premier essai et 21 septembre 1994 pour le second essai) selon le dispositif blocs de Fischer à quatre répétitions (Fig. 15a). Chaque géotype est semé sur cinq lignes espacées de 30 cm par parcelle élémentaire. La distance interparcellaire est de 50 cm. La taille des parcelles élémentaires est 12 m² pour l'essai 1993-94 et 6 m² pour l'essai 1994-95.

2) Caractéristiques climatiques des deux campagnes

Les données climatiques concernant la période de végétation du Colza sont illustrées dans la figure 15b pour les deux années d'expérimentation.

3) Apport d'inoculum et échantillonnage

L'inoculum apporté environ un mois après le semis, est essentiellement constitué des débris de récolte de la campagne précédente disposés dans des conditions favorables à la différenciation des périthèces. Les résidus de récolte (environ 20 à 30 cm de tige avec pivot) des géotypes résistants (lignées et Moutarde) sont préférentiellement utilisés dans le but d'augmenter la pression d'inoculum des souches adaptées à cette résistance.

Pour le premier essai, les résidus de récolte proviennent d'un essai réalisé en 1992-93 en parcelle expérimentale sur le site du Rheu. Cet essai, inoculé avec des restes de tiges de Colza provenant de diverses régions de France, nous a permis de disposer en automne 1993 de rares périthèces sur les résidus de récolte des lignées de recombinaison et de la Moutarde brune (cv. Picra), bien que ces géotypes n'aient pas manifesté de maladie en végétation. Les résidus de récolte de ces géotypes résistants sont apportés sur les parcelles le 9 novembre 1993 à raison de deux tiges par mètre carré. Un apport complémentaire de quatre tiges de Colza par mètre carré a été nécessaire pour renforcer la pression d'inoculum.

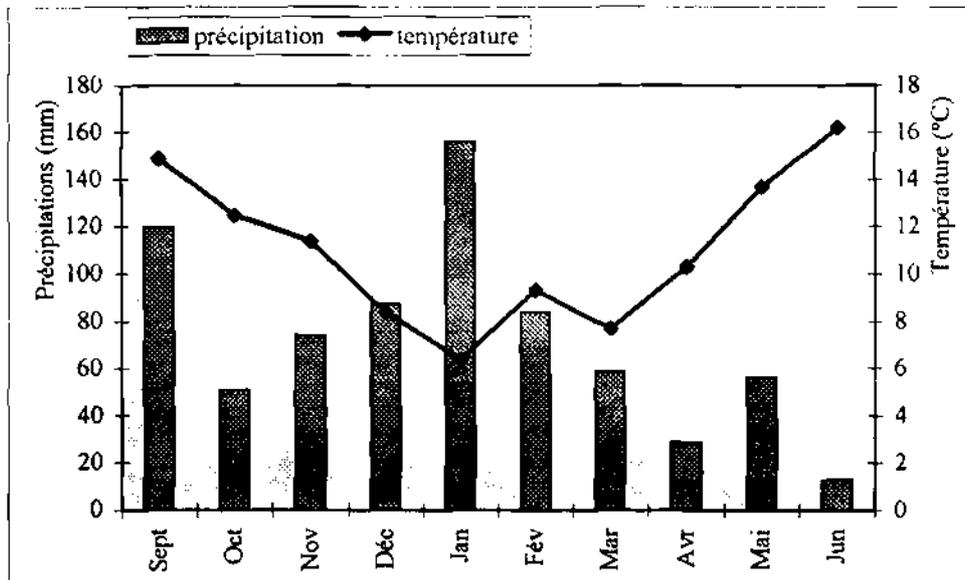
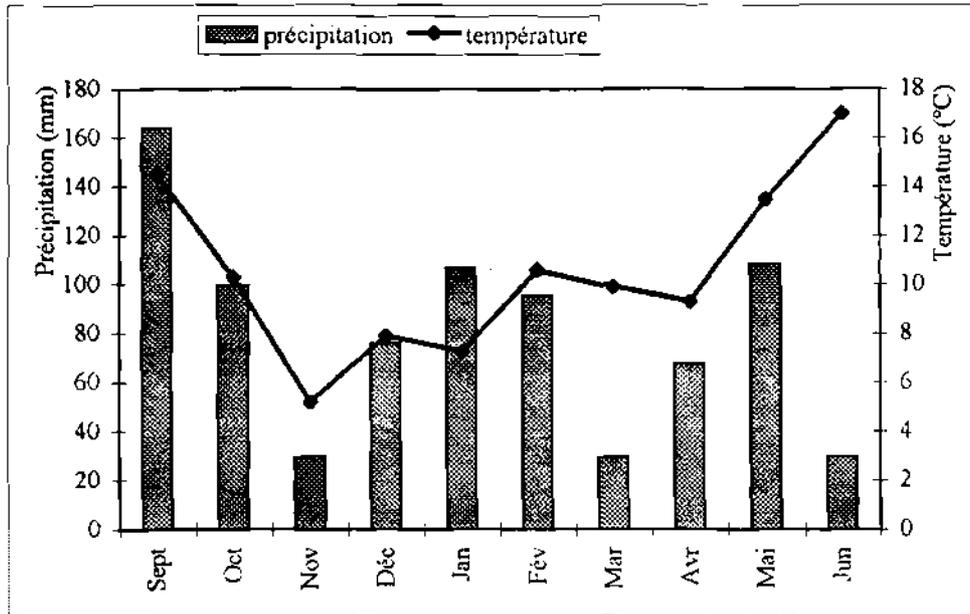


Figure 15b : Précipitations et températures moyennes mensuelles durant les campagnes 93-94 (en haut) et 94-95 (en bas).

Les résidus de récolte des géotypes résistants issus de l'essai 1993-94 présentent à l'automne 1994 une quantité plus importante de périthèces. Par conséquent, le second essai est contaminé le 4 novembre 1994 avec l'inoculum provenant majoritairement des géotypes résistants (Annexe 1). En effet, deux tiers des restes de culture apportés sont constitués de matériels résistants (soit quatre tiges/m²) et l'autre tiers de résidus de Colza (deux tiges/m²).

Avant le début de l'épidémie, 30 plantes de la lignée MX, des cvs. Picra et Samouraï sont retenues au hasard sur les trois lignes centrales de chacune des répétitions pour les analyses ultérieures de comptage de macules et de notation de nécrose du collet.

4) *Evaluation de la maladie*

① Les symptômes foliaires

Sur l'essai 1993-94, nous avons compté le nombre de feuilles malades par plante sur les 30 plantes échantillonnées environ cinq mois après l'apport de l'inoculum (22/03/1994). A cette date, MX était au stade G1-G2, cv. Samouraï au stade F0 et cv. Picra au stade D1 (Annexe 7). Pour l'essai 1994-95, l'évaluation du nombre de feuilles malades et du nombre de macules par feuille est effectuée les 22/11/95, 5/01/95 et 14/02/95.

② La nécrose du collet

En 1993-94, une seule évaluation de la nécrose du collet est effectuée à la récolte en juin 1994. Les 30 plantes identifiées au début de l'expérimentation plus 30 autres plantes arrachées au hasard sont notées pour l'intensité de la nécrose du collet. Cette évaluation de la maladie intéresse tous les géotypes testés.

L'essai 1994-95 a fait l'objet d'une notation de la nécrose du collet régulièrement tous les 15 jours du 4/04/95 au 16/06/95. A chaque date de notation, dix plantes sont arrachées au hasard par géotype et par répétition. Une dernière notation à la récolte (27/06/1995) a porté sur 30 plantes prélevées au hasard par géotype et par répétition.

Les plantes sont notées suivant une échelle de 1 (résistance) à 6 (plante cassée) (Annexe 8). Pour calculer l'indice de maladie (IM), les coefficients 0, 1, 3, 5, 7 et 9 sont respectivement affectés aux six classes.

5) *Analyse des résultats*

Les indices de nécrose sont analysés à l'aide du logiciel de statistiques SAS, version 6 suivant la procédure GLM.

**RESULTATS
ET
DISCUSSION**

PREMIERE PARTIE :
EFFETS DE LA RESISTANCE D'ORIGINE MOUTARDE BRUNE
SUR LA STRUCTURE DES POPULATIONS DE *L. MACULANS*

INTRODUCTION

Connaître l'importance de la variabilité des populations du pathogène face à différentes sources de résistance est capital pour prévoir l'évolution ultérieure des épidémies et la durabilité de ces résistances.

Nous avons cherché à caractériser les souches de *L. maculans* en nous basant sur les critères classiques (morphologie et pathogénie) et modernes (électrophorèse des protéines).

L'approche biochimique devrait nous permettre de définir des profils types de chacun des groupes de *L. maculans* utilisables pour des études ultérieures de caractérisation en routine des populations du parasite.

Le test miniaturisé d'inoculation des cotylédons, en conditions contrôlées, présente le double avantage d'être rapide, peu encombrant et de permettre l'analyse d'un grand nombre de souches et de génotypes. Ce test permet d'appréhender le spectre de virulence d'une population donnée du parasite sur une gamme d'hôtes et par conséquent, d'identifier éventuellement des virulences nouvelles.

Les données bibliographiques sur la caractérisation des populations de *L. maculans* ne traitent pas des souches inféodées à la Moutarde brune puisqu'elle est considérée comme totalement résistante. Pourtant, grâce au dispositif expérimental que nous avons utilisé (Annexe 1), il nous a été possible d'isoler des souches de *L. maculans* à partir de la lignée de recombinaison MX et de la Moutarde brune cv. Picra.

C'est dans l'objectif d'étudier la structure des populations de L. maculans, et en particulier d'identifier les souches aptes à surmonter le gène de résistance de la Moutarde brune introgressé dans le Colza, que nous avons réalisé les travaux qui sont rapportés dans cette première partie.

Le premier chapitre portera sur les populations de L. maculans isolées de la Moutarde brune (cv. Picra) et le second chapitre traitera des populations isolées de la lignée MX.

Chapitre 1 : POLYMORPHISME CULTURAL, ENZYMATIQUE ET POUVOIR PATHOGENE DES SOUCHES DE *LEPTOSPHAERIA* *MACULANS* ISOLEES DE *BRASSICA JUNCEA* CV. PICRA.

(Article accepté le 14 Mai 1996 pour publication dans Plant Pathology)

INTRODUCTION

En 1992-93, un essai visant à obtenir des contaminations sur les lignées de recombinaison Colza-Moutarde brune et sur la Moutarde brune cv. Picra est réalisé en plein champ. L'inoculum utilisé en début d'essai était constitué de résidus de Colza provenant de diverses régions de France. En fin de culture, les résidus de récoltes des lignées et du cv. Picra sont disposés séparément dans des conditions favorables à la production des périthèces. Ainsi, à l'automne 1993 nous avons pu observer de rares périthèces sur cinq tiges du cv. Picra à partir desquels des souches monoascosporees sont isolées. La caractérisation des populations isolées du cv. Picra fait l'objet de l'article 1.

RESUME DE L'ARTICLE 1

Les caractéristiques culturelles, biologiques (pathogénie) et biochimiques (isozymes) de 36 souches de *Leptosphaeria maculans* isolées du cv. Picra sont analysées en comparaison avec six souches de référence des groupes A et B. Les souches isolées du cv. Picra sont similaires aux trois souches de référence du groupe B isolées de colza sur la base des caractères cultureaux. Parmi les 36 souches isolées du cv. Picra, 29 souches sont agressives sur le cv. Picra. Il en est de même pour deux souches de référence du groupe B alors que les trois souches de référence du groupe A ne sont pas agressives sur ce génotype. Toutes les souches (42) testées sont agressives sur la lignée de recombinaison *B. napus*-*B. juncea* et sur le cultivar de Colza Westar.

L'analyse des phosphoglucose isomérase montre deux profils différents permettant de différencier les souches de référence du groupe A (bande rapide) de celles du groupe B (bande lente). Toutes les souches isolées du cv. Picra ont un profil identique à celui des souches du groupe B. L'analyse des profils d'isoestérases révèle des différences considérables entre les souches de référence des groupes A et B. Les souches isolées du cv. Picra se caractérisent par six profils isoenzymatiques différents dont celui des souches de référence du groupe B. Le dendrogramme construit au moyen du programme UPGMA à partir des coefficients de similitude des profils enzymatiques corrobore la distinction entre groupe A et groupe B des souches de *L. maculans*. Cependant, deux isolats ayant un profil enzymatique particulier se rattachent au groupe A. Les conséquences des souches isolées du cv. Picra sur l'épidémiologie de la Nécrose du collet et sur la sélection pour la résistance sont discutées.

Leptosphaeria maculans isolates from *B. juncea*

Morphology, pathogenicity and isozyme variation among French isolates of *Leptosphaeria maculans* recovered from *Brassica juncea* cv. Picra

I. SOMDA, M. RENARD* and H. BRUN

*Station de Pathologie Végétale, *Station d'Amélioration des plantes, INRA, BP 29, Domaine de la Motte, F-35653 Le Rheu Cedex, France*

The characteristics of 36 isolates of *Leptosphaeria maculans* originating from cv. Picra were investigated using cultural, pathogenicity and isozyme analyses in comparison with six known isolates of A- and B-Groups. Picra-related isolates were similar to the three known B-Group isolates from *B. napus* using a cultural test. Two known B-Group isolates and 29 of the 36 Picra-related isolates tested were aggressive on cv. Picra, whereas all the three known A-Group isolates were not. All the 42 isolates tested were aggressive on the *B. napus*-*B. juncea* recombinant line MX and on *B. napus* cv. Westar. Phosphoglucose isomerase analysis showed two different patterns, separating A-Group known (fast band) from B-Group known isolates (slow band). All cv. Picra isolates displayed the slow band. Considerable differences in isocitrate lyase patterns were found between known A- and B-Group isolates. Isolates recovered from cv. Picra displayed six different electrophoretic patterns, including that of the known B-Group isolates. Clusters of the 42 isolates, generated by UPGMA analysis based on similarity coefficients of electrophoretic types, matched the previous classification into A- and B-Groups, although two atypical Picra-related isolates with a singular pattern clustered with the A-Group. The importance of these isolates for blackleg epidemiology and resistance breeding is discussed.

INTRODUCTION

Leptosphaeria maculans, teleomorph of *Phoma lingam*, is the causal agent of blackleg (Smith & Sutton, 1964), one of the most yield-limiting diseases of cruciferous crops. This disease has been of particular concern in France over the 10 last years because *B. napus* cultivars are susceptible or moderately resistant to *L. maculans* at both the seedling and adult plant stages. An early study reported by Cunningham (1927) indicated that *L. maculans* populations can be distinguished into non-pathogenic or non-aggressive isolates and pathogenic or aggressive isolates. The aggressive isolates (also termed A-Group isolates) caused severe canker on rapeseed while the non-aggressive isolates (B-Group isolates) induced mild symptoms (Johnson & Lewis, 1994). Moreover, these two groups differ in cultural characteristics (Pound, 1947) and in ability to produce sirodesmin PL *in vitro* (Koch *et al.*, 1989). Genetic diversity in *L. maculans* was also studied using isozyme analyses (Balesdent *et al.*, 1992; Hall *et al.*, 1993), electrophoretic karyotyping (Taylor *et al.*, 1991) and DNA polymorphism (Johnson & Lewis, 1990). These results along with the cross incompatibility between the two groups of *L. maculans* isolates (Bonman *et al.*, 1981) indicate considerable genetic differences which lead to the suggestion that they might be different species.

To cope with the great variability of this pathogen, breeding for resistance must be given a high priority since cultural and chemical control measures are either inefficient or unavailable. Intraspecific and interspecific variation for blackleg resistance exists in *B. napus* and mustards with the B genome (*B. nigra* (L.) W. Koch, *B. juncea* (L.) Czernj. & Coss., and *B. carinata* A. Braun.), respectively. While *B. napus* partial resistance operates mainly at the adult plant stage, the mustard species exhibit total and stable resistance throughout the life of the plant (Roy, 1978; Sacristan & Gerdemann, 1986). In this context, interspecific crosses were used to transfer resistance genes from the mustards into the *B. napus* genome in order to improve the seedling and adult plant resistance of *B. napus*. Exploiting mustard complete resistance is of great interest but care must be taken to ensure the durability of this type of resistance. Indeed, Gugel & Petrie (1992) found that a low level of infection may occur on mustards grown in regions where blackleg is a problem on *B. napus*. Root infection could occur on *B. juncea* despite its resistance at both the cotyledon and the adult plant stage (Rimmer & Van den Berg, 1992). Moreover, some *B. napus*-related isolates were virulent on *B. juncea* cvs Stoke and Zaria in Australia (Salisbury & Ballinger, 1993). These results show that mustards are not immune to infection, and variation for the pathogenicity trait may exist in natural populations of the fungus. Since *B. juncea* resistance is used in breeding programs in France, it is important to know whether isolates capable of overcoming this type of resistance exist in French *L. maculans* populations. In this paper we report the characterization of *L. maculans* isolates obtained from *B. juncea* cv. Picra in the Brittany region of western France.

Table 9. List of *Leptosphaeria maculans* isolates used in this study

Isolates	Host cultivars	Origins
Single-ascospore isolates		
A940 ^a	<i>B. napus</i>	Germany
A941	<i>B. napus</i>	Germany
A942	<i>B. napus</i>	Germany
B943 ^b	<i>B. napus</i>	Germany
B944	<i>B. napus</i>	Germany
B945	<i>B. napus</i>	Germany
P1-1 ^c to P1-4	<i>B. juncea</i>	Le Rheu
P2-1 to P2-18	<i>B. juncea</i>	Le Rheu
P3-1 to P3-2	<i>B. juncea</i>	Le Rheu
P4-1 to P4-9 (without P4-4 and P4-7)	<i>B. juncea</i>	Le Rheu
P4-13 and P4-15	<i>B. juncea</i>	Le Rheu
Pycnidiospore-mass isolates^d		
PF1 to PF2	<i>B. juncea</i>	Le Rheu
PT1	<i>B. juncea</i>	Le Rheu

^aReference A-Group isolates; ^bReference B-Group isolates; ^cThe isolate number 1 came from the stem number 1 of cv. Picra (P); ^d These isolates came from leaf (F) or stem (T) lesions on cv. Picra (P).

MATERIALS AND METHODS

Isolates of *Leptosphaeria maculans*

Thirty three single-ascospore isolates and three pycnidiospore-mass isolates from cv. Picra were used in this study (Table 9). Single-ascospore isolates were obtained from stem bearing pseudothecia according to the method described by Smith & Sutton (1964). Mass isolates were obtained by surface-sterilizing infected tissue in alcohol for 20 s, rinsing in sterile water, drying with sterile N° 1 Whatman paper and transferring a small piece of tissue containing lesions to malt agar. Three known A-Group isolates (characterized as producing sirodesmin PL) and three known B-Group isolates (not producing sirodesmin PL) were generously provided by Dr Poutot (Gesamthochschule Kassel, Witzenhausen, Germany) and included in this study as references.

Morphology tests

Cultural characteristics were studied on 2 % malt agar supplemented with 250 µg/ml streptomycin sulphate. Five replicate plates were inoculated with 0.5 cm diam mycelial plugs cut from the margin 7 day old colonies of each isolate. Inoculated plates were incubated in the dark at 20 °C, and radial growth was measured 14 days later. The mean diameter was calculated as the average of two orthogonal measurements of colony diameter on each plate. Colony morphology, pigment diffusion, mycelial pigmentation, and pycnidium production were also recorded 28 days after inoculation.

Pathogenicity tests

The isolates were tested for pathogenicity on cv. Picra, cv. Westar and *B. napus*-*B. juncea* recombinant line MX, using the technique of Williams & Delwiche (1979). Seeds of each genotype were sown on soil mixture (sand/loam/compost, 1/1/1) in 7x7x8 cm plastic pots and incubated at 15 °C in a growth chamber with a 16 h light period. Ten days after planting, wounded cotyledons were inoculated with 10 µl drops of the pycnidiospore suspension at 10⁷ spores/ml. Inoculum was produced according to the technique described by De March *et al.* (1986). Inoculated seedlings were transferred to a growth chamber regulated at 20 °C with a 16 h light period. True leaves were removed as they developed in order to prevent early senescence of cotyledons.

Disease was rated 14 days after inoculation using the 0 (resistant) to 9 (susceptible) scale of Williams & Delwiche (1979). Each isolate was tested on at least 16 plants (i.e., 64 inoculation sites).

Each plant was considered as a replicate. A disease index was calculated as followed : $DI = \sum (N_i \times i) / N_t$ where N_i represented the number of inoculation sites with the disease score i (0 to 9), and N_t the total number of inoculation sites.

Isoesterase analysis

Five mycelial plugs (1 cm diam), cut from 7 day old colonies growing on V8-juice agar, were aseptically transferred into plastic bottles containing 100 ml of liquid Czapek medium supplemented with 0.2 % yeast extract. Liquid cultures were incubated statically at 20 °C in the dark for 12 days. After vacuum filtration, the mycelial mats were well rinsed with sterile water, lyophilized and then stored at -20 °C. Proteins were extracted according to the method described by Somé and Tivoli (1993). Extracts were stored at -20 °C until required.

Vertical polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) was performed according to Laemmli (1970). The gels were run and the isoesterase bands were visualized as described by Somé & Tivoli (1993). Isozyme analyses were repeated twice in order to check the reproducibility of the experiment.

Phosphoglucose isomerase analysis

Phosphoglucose isomerase (PGI) banding patterns were identified by horizontal starch gel electrophoresis. Samples were prepared by growing the isolates on malt agar. Mycelial plugs (1-2 cm square) were cut from the colony and directly ground in a mortar in 200 μ l extraction buffer containing 0.1 M Tris HCl, pH 7.5 and 1 % (w/v) reduced glutathione. The mycelial extracts were absorbed onto blotting paper wicks and inserted vertically into the sample slot of the starch gel (pH 7.0, 12 % (w/v) starch). The gels were then run and PGI banding patterns were stained according to Chèvre *et al.* (1995). The gels were analysed visually for the relative mobility of the bands. Each isolate was analysed twice to determine the repeatability of the results.

Isozyme data analysis

Isoesterase (EST) profiles were visually analysed by identifying both the α - and β -EST bands and the intermediately stained bands as described by Somé & Tivoli (1993). Based on EST and PGI data, similarity coefficients (Sc) for each pair of electrophoretic types (ETs) were calculated as twice the number of bands in common divided by the total number of bands in the two ETs (Hansen *et al.*, 1986). Relationships between ETs were investigated using average linkage cluster analysis, performed on the distance (1- Sc) matrix of ETs with the SAS cluster program (SAS Institute Inc., 1987).

Table 10. Characteristics of *Leptosphaeria maculans* isolates with respect to cultural character, pathogenicity.

Isolates	Growth rates ^a (mm / day)	Pathogenicity ^b			Means	Pigment ^c
		cv. Picra	MX line	cv. Westar		
A940	2.02e	3.0±1.0	4.6±1.3	9.0±0.4	5.5	-
A941	2.19e	2.8±1.0	4.0±1.2	8.5±1.0	5.1	-
A942	NT ^d	3.1±0.9	6.2±1.6	8.0±1.4	5.8	-
Means		3.0	4.9	8.5		
B943	4.49a	3.9±1.2	8.0±1.0	6.2±1.9	6.0	+
B944	3.03cd	6.7±1.6	8.0±0.8	6.5±1.5	7.1	+
B945	NT	4.4±1.5	7.2±1.7	5.0±1.4	5.5	+
Means		5.0	7.7	5.9		
P1-1	3.53bcd	4.6±1.5	8.7±0.7	8.6±0.7	7.3	+
P1-2	2.79d	5.2±2.0	8.7±0.7	8.4±1.0	7.4	+
P1-3	3.99ab	4.4±2.0	7.4±1.4	8.5±0.9	6.8	+
P1-4	2.82d	3.8±1.3	8.5±0.4	7.3±1.5	6.5	+
P2-1	3.41bcd	4.8±1.3	8.3±1.0	8.7±0.6	7.3	+
P2-2	3.12bcd	4.3±1.6	7.8±1.1	8.7±0.4	6.9	+
P2-3	3.20bcd	4.3±1.5	8.3±0.8	8.4±1.1	7.0	+
P2-4	2.87d	4.3±1.9	7.6±0.9	8.6±0.8	6.8	+
P2-5	3.25bcd	5.5±1.5	7.3±1.2	8.6±0.7	7.1	+
P2-6	3.76bc	6.1±2.0	8.2±0.7	8.6±0.8	7.6	+
P2-7	3.32bcd	5.3±1.4	8.3±0.9	8.3±1.3	7.3	+
P2-8	4.72a	5.8±2.1	8.9±0.3	8.8±0.5	7.8	+
P2-9	2.96cd	4.5±1.9	7.9±1.0	8.3±0.9	6.9	+
P2-10	2.75d	4.4±1.7	8.0±1.0	8.9±0.3	7.1	+
P2-11	3.13bcd	3.5±1.2	7.2±0.8	8.9±0.2	6.5	+
P2-12	2.97bcd	7.0±2.1	8.9±0.3	8.7±0.8	8.2	+
P2-13	3.04cd	5.7±1.6	8.0±0.7	8.9±0.3	7.5	+
P2-14	3.11bcd	4.8±2.2	7.4±1.0	8.4±0.8	6.9	+
P2-15	3.71bc	3.3±1.6	7.4±1.0	8.8±0.4	6.5	+
P2-16	3.85b	4.1±1.1	8.4±0.6	7.2±1.3	6.6	+
P2-17	3.01cd	3.2±1.2	7.8±0.9	6.8±2.0	5.9	+
P2-18	3.31bcd	7.0±1.6	8.9±0.3	8.8±0.4	8.2	+
P3-1	2.90d	3.2±1.0	8.1±0.9	7.6±1.4	6.3	+
P3-2	3.30bcd	7.8±1.8	8.6±0.7	8.7±1.2	8.4	+
P4-1	NT	8.5±0.7	8.5±0.9	8.7±0.6	8.6	+
P4-2	NT	7.1±2.3	7.5±1.7	8.0±2.0	7.5	+
P4-3	NT	7.4±1.6	8.2±1.5	8.1±1.4	7.9	+
P4-5	NT	7.5±2.5	8.2±1.5	8.0±1.5	7.9	+
P4-6	NT	5.8±1.6	8.3±2.6	8.6±0.6	7.6	+
P4-8	NT	8.0±1.6	8.9±0.3	7.5±1.6	8.1	+
P4-9	NT	7.3±2.4	8.4±0.9	7.9±2.0	7.9	+
P4-13	NT	6.9±0.2	8.9±0.4	6.4±2.3	7.4	+
P4-15	NT	6.1±2.3	8.2±1.1	6.9±2.1	7.1	+
PF1	2.99cd	3.3±2.5	5.9±2.0	7.1±2.7	5.4	+
PF2	2.28de	NT	NT	NT	NT	+
PT1	3.04cd	8.5±1.1	8.2±1.4	8.3±1.2	8.3	+
Means		5.5	8.1	8.2		

^aValues are the means of 5 replicates of each isolate incubated at 20 °C for 14 days. Mean values followed by the same letter are not significantly different at 5 % level using Newman-Keuls' test.

^bDisease was recorded 14 days after inoculation using a 0 to 9 scale. Data are the disease index (DI) of 16 replicates of each cultivar-isolate combination ± Standard deviation. Interaction phenotype : DI<4 = Resistance, 4≤DI<6 = Moderate resistance, DI≥6 = Susceptibility; -, absence; +, presence; ^dNT, not tested

RESULTS

Colony morphology and growth rate

Unlike known A-Group isolates, known B-Group and cv. Picra isolates produced a yellow to brown-red pigment on malt agar and displayed white, yellow and grey mycelium. Some of the isolates produced aerial and abundant fibrous mycelium while others yielded felty mycelium usually associated with the brown-red pigment (Fig. 16). Unexpectedly, the aerial mycelium was invaded by many pycnidia. Generally, A-Group known isolates grew slower (2.02-2.19 mm/day) than known B-Group and cv. Picra isolates (2.28-4.72 mm/day), although overlapping growth rates could be observed (Table 10). In some instances, cultural variability was due to sectoring of felty grey or yellow to white aerial mycelium.

Comparison of pathogenicity

Analysis of variance of disease indexes on the different *Brassica* genotypes tested indicated highly significant differences among isolates and cultivars. Known A-Group isolates, A940, A941, A942, were not aggressive on cv. Picra whereas they were moderately aggressive (A940 and A941) to highly aggressive (A942) on MX recombinant line. All A-Group isolates were highly aggressive on cv. Westar. The known B group isolates, B943, B944, B945, varied in aggressiveness (*sensu* Van Der Plank, 1968) towards cv. Picra (Table 10). Of the 35 isolates obtained from cv. Picra tested, 17.1 % were not aggressive, 45.7 % were moderately aggressive, and the remaining 37.2 % were highly aggressive on the cv. Picra. All known B-Group and Picra-related isolates were aggressive on both the MX recombinant line and cv. Westar.

The Picra-related isolates caused on cv. Picra, MX recombinant line and cv. Westar, necrotic symptoms with brownish spots, typical of B-Group isolates. These lesions were usually associated with chlorotic halos and appeared earlier than those caused by A-Group isolates. Sometimes, minute pycnidia were observed on cotyledons of cv. Westar or MX recombinant line inoculated with Picra-related isolates. In rare instances, these pycnidia generally encrusted under the peridermal layer were observed on senescent cotyledons of cv. Picra. On contrast, the known A-Group isolates produced greenish symptoms without chlorosis on cv. Westar.

Isozyme analysis

PGI analysis yielded one slow-moving isozyme, which was specific to B-Group isolates. All cv. Picra isolates shared the same slow band as the known B-Group isolates. A fast PGI isozyme

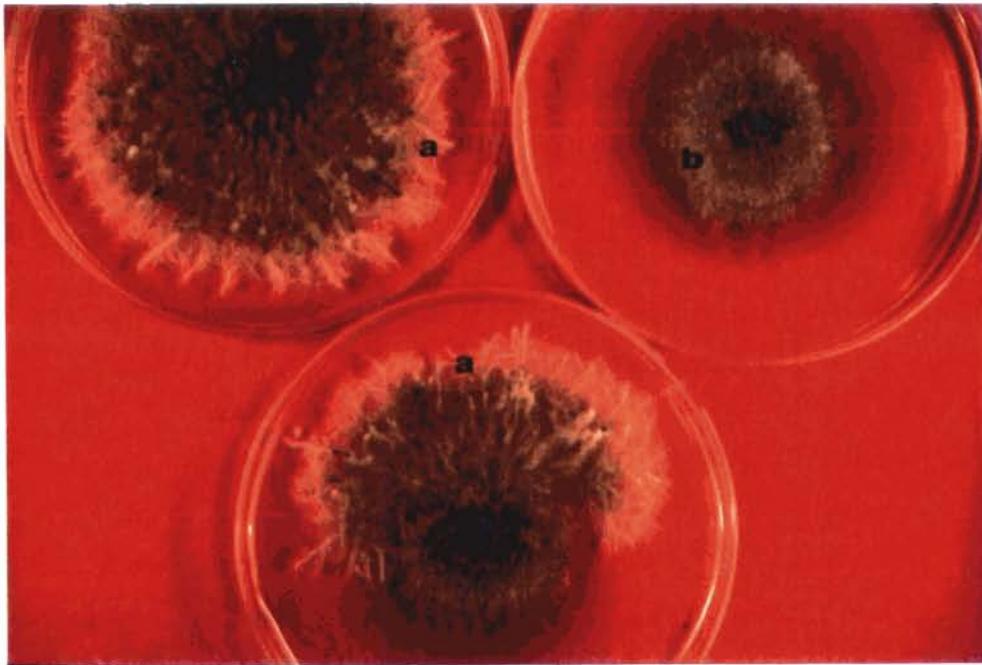


Figure 16 : Cultural morphology of B-group isolates of *Leptosphaeria maculans* :
 (a) aerial and fibrous mycelium ; (b) felty mycelium.

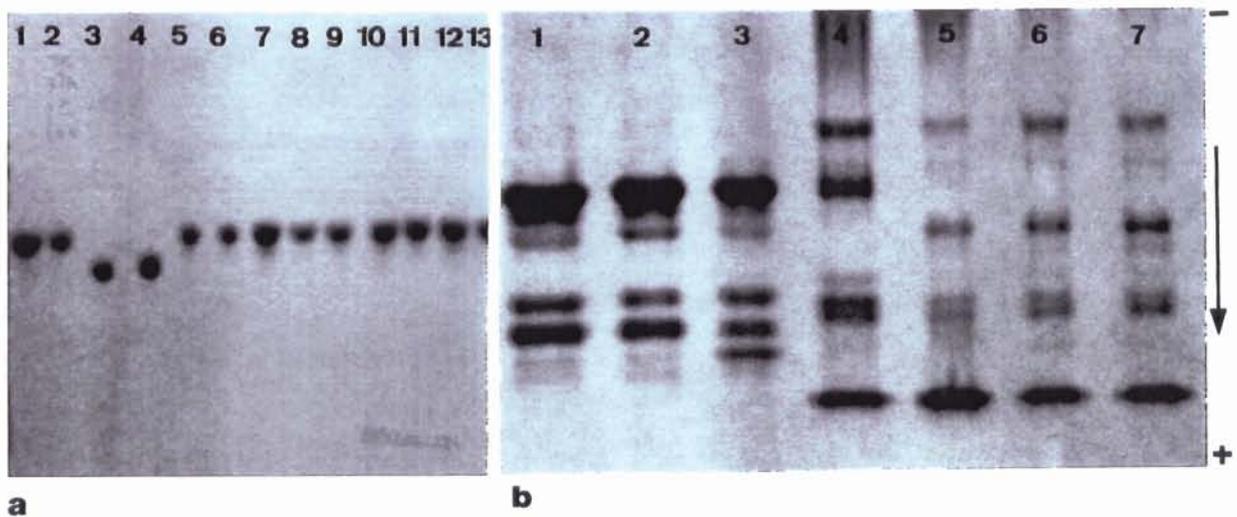


Figure 17 : Isozyme banding patterns of A- and B-Group isolates of *Leptosphaeria maculans* :
 (a) Phosphoglucose isomérase (PGI) profiles of reference A-Group isolates (lanes 3-4),
 B-Group isolates (lanes 1-2) and isolates recovered from cv. Picra (lanes 5-13).
 (b) Isoesterase (EST) profiles of A-Group isolates (lanes 1-3) and B-Group isolates
 (lanes 4-7).

Photos : I. Somda

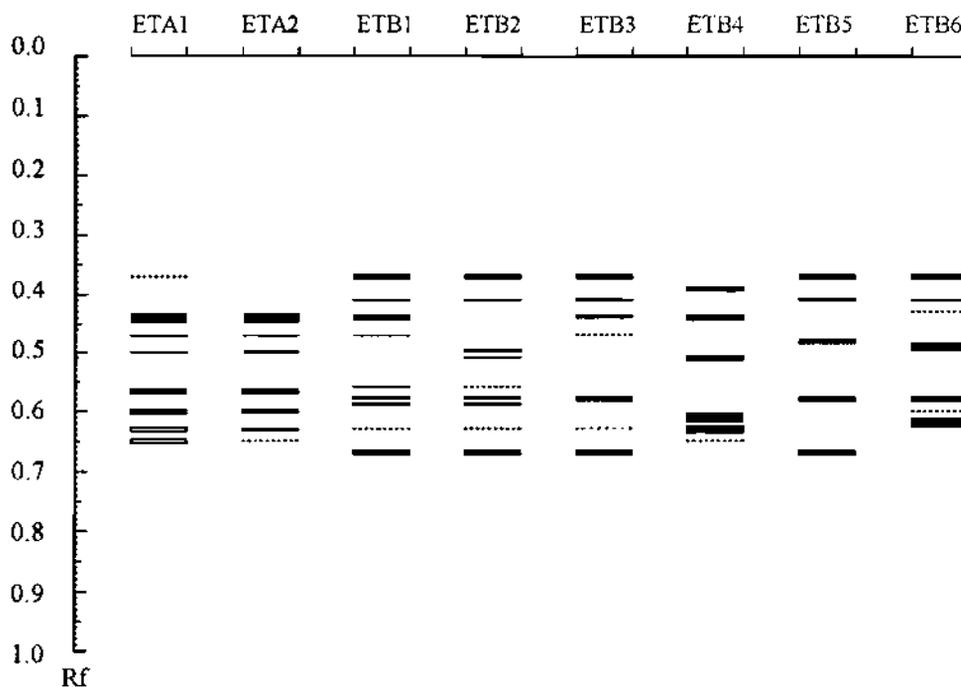


Figure 18 : Diagram of isoesterase polymorphic banding patterns among *Leptosphaeria maculans* isolates with Rf ranging from 0.37 to 0.67.

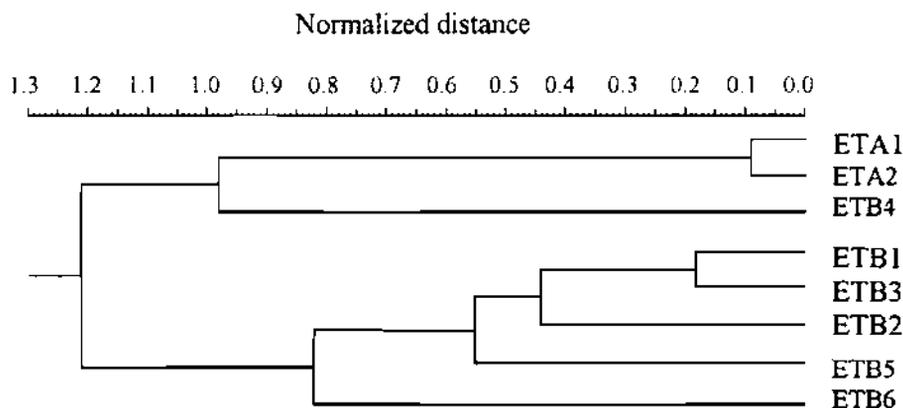


Figure 19 : Dendrogram of isozyme similarities among 8 electrophoretic types of *Leptosphaeria maculans*. Data based on the distance (1-Sc) between paired ETs were analysed by the unweighted paired-group method (UPGMA).

Table 11. Electrophoretic types of *Leptosphaeria maculans* isolates

Isolates	Hosts	Electrophoretic types	Frequencies	Aggressiveness on cv. Picra
940	<i>B. napus</i>	ETA1	0.67	-
941	<i>B. napus</i>			-
942	<i>B. napus</i>	ETA2	0.33	-
943	<i>B. napus</i>	ETB2	1.0	-
944	<i>B. napus</i>			+
945	<i>B. napus</i>			+
P1-4	<i>B. juncea</i>	ETB1	0.28	-
P2-1	<i>B. juncea</i>			+
P2-2	<i>B. juncea</i>			+
P2-3	<i>B. juncea</i>			+
P2-11	<i>B. juncea</i>			-
P2-13	<i>B. juncea</i>			+
P2-18	<i>B. juncea</i>			++
P3-2	<i>B. juncea</i>			++
P4-1	<i>B. juncea</i>			++
P4-6	<i>B. juncea</i>			+
P2-14	<i>B. juncea</i>	ETB2	0.19	+
P2-15	<i>B. juncea</i>			-
P3-1	<i>B. juncea</i>			-
P4-8	<i>B. juncea</i>			++
P4-9	<i>B. juncea</i>			++
P4-13	<i>B. juncea</i>			++
PT	<i>B. juncea</i>	ETB3	0.25	++
P2-4	<i>B. juncea</i>			+
P2-7	<i>B. juncea</i>			+
P2-9	<i>B. juncea</i>			+
P2-10	<i>B. juncea</i>			+
P2-12	<i>B. juncea</i>			++
P2-16	<i>B. juncea</i>			+
P2-17	<i>B. juncea</i>			-
P4-3	<i>B. juncea</i>			++
PF1	<i>B. juncea</i>	ETB4	0.06	-
PF2	<i>B. juncea</i>			NT
P1-1	<i>B. juncea</i>	ETB5	0.14	+
P1-2	<i>B. juncea</i>			+
P1-3	<i>B. juncea</i>			+
P4-2	<i>B. juncea</i>			++
P4-15	<i>B. juncea</i>			++
P2-5	<i>B. juncea</i>	ETB6	0.08	+
P2-6	<i>B. juncea</i>			++
P2-8	<i>B. juncea</i>			+

- = not aggressive, + = moderately aggressive, ++ = highly aggressive, NT = not tested

was found in the A-Group isolates (Fig. 17a). In our study, the number of total bands of EST and their relative mobility were reproducible, except for some minor differences rarely observed in the staining intensity of certain bands. EST isozymes of A-Group isolates could be visually distinguished from those of B-Group isolates (Fig. 17b). The A-Group isolates displayed two electrophoretic types termed ETA1 and ETA2, with a nearly identical EST pattern (Fig. 18). The known B-Group isolates all had the same EST banding pattern and were assigned to the ETB2 type. The 36 isolates recovered from cv. Picra were divided into six ETB type. The number of isolates per ETB type varied from 2 to 10 (Table 11). The ETB4 type appeared to be atypical and specific to leaf lesion isolates, since no ascospore isolates displayed this pattern. However, the small number of leaf isolates analysed precluded any final conclusion. There is a need to study more such isolates to determine to what extent this type of isolate occurs in *L. maculans* populations.

EST have either specific affinity for α -naphthyl acetate (green bands, α -EST) or β -naphthyl acetate (pink bands, β -EST) or can react simultaneously with the two substrates (intermediate colour). The α - and β -EST were found in both ETA and ETB types, however in different proportions. The intermediately coloured bands (α , β -EST) were only observed among ETB type.

Cluster analysis of isozyme profiles

Two main ET clusters could be distinguished by UPGMA (Fig. 19). The first group contained the two ETA types and the second group was composed of the ETB type. The ETB4 type atypically clustered with ETA, with however the highest normalized distance ($d = 0.98$). While the ETA1 and ETA2 types were closely clustered ($d = 0.09$), the ETB type showed the most important within-group variability since the greatest normalized distance values were observed in this cluster (Fig. 19).

DISCUSSION

The use of well-characterized reference A-Group and B-Group isolates allowed a quick and reliable classification of our test isolates. Picra-related isolates and known B-Group isolates produced pigments on malt agar and displayed identical PGI profiles which were different from those of A-Group isolates. Based to these results, all the isolates from the cv. Picra belonged to the B-Group. The distinction of A- and B-Group using PGI analysis is in agreement with the report of Hall *et al.* (1993), and matches previous studies based on molecular analyses (Johnson & Lewis, 1990).

In contrast to the polymorphic PGI profiles, α - and β - EST banding patterns allowed the discrimination of six subgroups among isolates from cv. Picra, while the A-Group was more homogeneous. In our cluster analysis of the isozyme data, the majority of B-Group isolates clustered together. This cluster was clearly separated from that of A-Group isolates, consistent with the separation of *L. maculans* into two groups. The large distance ($d > 1$) at which the two groups finally merged suggests a large genetic divergence between the two populations of *L. maculans*, supporting the statement of Koch *et al.* (1991) that A- and B-Groups represent different taxa. The A-Group cluster encompassed two B-Group isolates with, however, a high distance unit ($d = 0.98$). It is likely that these atypically clustered isolates may constitute a particular population of *L. maculans*. Indeed, based on RFLP analysis, three subgroups (NA1, NA2, and NA3) were determined among B-Group isolates while A-Group isolates were phylogenetically homogeneous (Koch *et al.*, 1991). Molecular analyses should be of great interest in order to determine whether identical subgrouping can be observed among B-Group isolates occurring on cv. Picra.

How the isozyme polymorphisms within and between *L. maculans* isolates corresponds to a pathogenic variation remains an important question for breeding for resistance towards this pathogen. The resistance of *B. juncea* cv. Picra towards A-Group isolates was in agreement with previous reports (Johnson & Lewis, 1994). This result provides evidence for total resistance of cv. Picra towards A-Group isolates since such isolates were not recovered from this mustard. However, the occurrence in Australia of isolates which were pathogenic to *B. juncea* cultivars, along with our atypical isolates from leaves, may raise the question of the possible occurrence of such isolates on cv. Picra in France. While cv. Westar was highly susceptible, the MX recombinant line exhibited slight to moderate resistance to A-Group isolates. This may indicate that the *B. juncea* resistance was incompletely introgressed into the MX recombinant line genome or there was a genetic background effect on the expression of this resistance.

Cultivar Picra was susceptible to the majority of B-Group isolates. This finding was consistent with that of Johnson & Lewis (1994). However, some differential reactions observed on cv. Picra to the 38 B-Group isolates tested in this study indicate that cv. Picra carries genes which condition resistance to some B-Group isolates. As sexual bodies of B-Group isolates form in field conditions on resistant material, the possible occurrence of more aggressive isolates through sexual recombination on intensively-grown *B. napus* cultivars with *B. juncea* resistance cannot be ruled out. The recombinant line MX was susceptible to all B-Group isolates. The susceptibility of cv. Westar towards these B-Group isolates did not match the results of Koch *et al.* (1991) who found that three *B. napus* cultivars, including cv. Westar, were resistant to all B-Group isolates tested. These differences may be due to the use of different isolates. It is likely that the aggressiveness of the

isolates depends on the host from which they are obtained. Indeed, the control B-Group isolates originating from *B. napus* were less pathogenic on cv. Westar than isolates from cv. Picra.

The incidence of B-Group isolates on blackleg epidemiology and yield losses has long been underestimated. Johnson & Lewis (1994) observed that B-Group isolates could induce pith lesions on *B. napus* cultivars. Owing to these results, more information is required into the biology of B-Group isolates and their interactions with A-Group isolates, responsible for typical stem canker symptoms.

Another question posed by our study is whether any correlation exists between the three methods used to characterize our test isolates. Pigment production was positively correlated to PGI banding patterns. In contrast, EST isozyme variation within B-Group isolates did not appear to be correlated with their ability to attack a particular genotype. However, the EST isozyme banding patterns of the two groups of isolates analysed in this study were so different that they could still be meaningful tools in investigating genetic variability and monitoring the genetic variation of *L. maculans* populations.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partially supported by a CETIOM grant. Dr S. POUTOT is gratefully acknowledged for providing isolates of *L. maculans*. The authors wish to thank Dr D. Andrivon, Dr J. Brace and Dr A. M. Chèvre for reviewing the manuscript.

REFERENCES

- Balesdent MH, Gall C, Robin P, Rouxel T, 1992. Intraspecific variation in soluble mycelial protein and esterase patterns of *Leptosphaeria maculans* French isolates. *Mycological Research* **96**, 677-84.
- Bonman JM, Gabrielson RL, Williams PH, Delwiche PA, 1981. Virulence of *Phoma lingam* to cabbage. *Plant Disease* **65**, 865-67.
- Chèvre AM, Delourme R, Eber F, Margale E, Quiros CF, Arus P, 1995. Genetic analysis and nomenclature for seven isozyme systems in *Brassica nigra*, *B. oleracea* and *B. campestris*. *Plant Breeding* **114**, 473-480.
- Cunningham GH, 1927. Dry-rot of swedes and turnips : its causes and control. *New Zealand Department of Agriculture Bulletin* **133**, 51p.
- De March G, Séguin-Swartz G, Petrie GA, 1986. Virulence and culture filtrate phytotoxicity in *Leptosphaeria maculans* : Perspectives for *in vitro* selection. *Canadian Journal of Plant Pathology* **8**, 422-28.

- Gugel RK, Petrie GA, 1992. History, occurrence, impact, and control of blackleg of rapeseed. *Canadian Journal of Plant Pathology* **14**, 36-45.
- Hall R, Peters RD, Assabgui RA, 1993. Occurrence and impact of blackleg on oilseed rape in Ontario. *Canadian Journal of Plant Pathology* **15**, 305-13.
- Hansen EM, Brasier CM, Shaw DS, Hamm PB, 1986. The taxonomic structure of *Phytophthora megasperma* : evidence for emerging biological species groups. *Transactions of the British Mycological Society* **87**, 557-73.
- Johnson RD, Lewis BG. 1990. DNA polymorphism in *Leptosphaeria maculans*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **37**, 417-24.
- Johnson RD, Lewis BG, 1994. Variation in host range, systemic infection and epidemiology of *Leptosphaeria maculans*. *Plant Pathology* **43**, 269-77.
- Koch E, Badawy HM, Hoppe HH, 1989. Differences between aggressive and non-aggressive single-spore lines of *Leptosphaeria maculans* in cultural characteristics and phytotoxin production. *Journal of Phytopathology* **124**, 52-62.
- Koch E, Song K, Osborn TC, Williams PH, 1991. Relationship between pathogenicity and phylogeny based on restriction fragment length polymorphism in *Leptosphaeria maculans*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **4**, 341-49.
- Laemmli UK, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-85.
- Pound GS, 1947. Variability in *Phoma lingam*. *Journal of Agricultural Research* **75**, 113-33.
- Rimmer SR, van den Berg CGJ, 1992. Resistance of oilseed *Brassica* spp. to blackleg caused by *Leptosphaeria maculans*. *Canadian Journal of Plant Pathology* **14**, 56-66.
- Roy NN, 1978. A study on disease variation in the populations of interspecific cross of *Brassica juncea* L. x *B. napus* L. *Euphytica* **27**, 145-49.
- Sacristan MD, Gerdemann M. 1986. Different behavior of *Brassica juncea* and *B. carinata* as sources of *Phoma lingam* resistance in experiments of interspecific transfer to *B. napus*. *Plant Breeding* **97**, 304-14.
- Salisbury P, Ballinger D, 1993. Race variability in *Leptosphaeria maculans*. *Blackleg News* **1**, 3-4.
- SAS Institute, 1987. *User's guide : Statistics*. Version 6 ed. SAS Institute, Cary, NC.
- Smith HC, Sutton BC, 1964. *Leptosphaeria maculans*, the ascogenous state of *Phoma lingam*. *Transactions of the British Mycological Society* **47**, 159-65.
- Somé A, Tivoli B, 1993. *Fusarium* spp. from potato : polymorphism of esterase phenotypes on polyacrylamide gel electrophoresis. *Agronomie* **13**, 637-49.
- Taylor JL, Borgmann I, Séguin-Swartz G, 1991. Electrophoretic karyotyping of *Leptosphaeria maculans* differentiates highly virulent from weakly virulent isolates. *Current Genetics* **19**, 273-77.
- Van Der Plank JE, 1968. *Disease resistance in plants*. Academic Press, New York.
- Williams PH, Delwiche PA, 1979. Screening for resistance to blackleg of crucifers in the seedling stage. *Proceedings of Eucarpia Conference on Breeding of Cruciferous Crops*. Wageningen, The Netherlands, 164-70.

CONCLUSION

Nous avons démontré que *I. maculans* peut contaminer la Moutarde brune et accomplir tout le cycle biologique conduisant à la production des périthèces en conditions naturelles. Cependant, au terme de l'analyse des populations de *I. maculans* isolées de la Moutarde brune (cv. Picra), il apparaît que seules les souches du groupe B sont aptes à contourner cette résistance. Parallèlement, des résultats préliminaires que nous avons obtenus (non inclus dans ce rapport) révèlent que la Moutarde noire (*B. nigra* cv. Junius) sélectionne majoritairement des souches du groupe A. Ces résultats originaux ont également fait l'objet d'une courte publication sous forme de 'Disease Note' dans la revue Plant Disease (Publication 3 en annexe 18).

Chapitre 2 : ANALYSE COMPAREE DES POPULATIONS ISOLEES DE LA LIGNEE MX, DU COLZA ET D'AUTRES CRUCIFERES CULTIVEES ET ADVENTICES

I-INTRODUCTION

*Le principal objectif de ce chapitre est d'analyser la structure des populations naturelles de *L. maculans*, en réponse à la pression de sélection exercée par la résistance d'origine Moutarde brune, conférée au Colza, sur les populations naturelles du champignon. Les isolats provenant de la lignée MX seront comparés à ceux du Colza et de diverses autres Crucifères cultivées ou adventices.*

Dans certains pathosystèmes, des plantes adventices sont des sources potentielles d'inoculum (Russell, 1978) dont le rôle dans l'apparition et le maintien des souches virulentes ne peut être négligé. Alors que les souches inféodées aux Crucifères adventices sont bien étudiées au Canada (Petrie, 1969), aucune donnée afférente à ces populations parasites n'est, à notre connaissance, disponible en France. *Dans ce contexte, nous nous sommes attaché à caractériser des isolats provenant de quelques Crucifères adventices et isolés à Le Rheu ou fournis par des laboratoires étrangers en vue d'évaluer leur rôle potentiel dans l'épidémiologie de la Nécrose du collet.*

La démarche expérimentale que nous adoptons dans cette partie du travail est identique à celle décrite dans l'article 1. Le matériel végétal (Tableau 7) et les différentes méthodes d'analyse sont présentés dans le chapitre Matériels et méthodes (Pages 33-34).

II-CARACTERISATION CULTURALE

Les principaux critères cultureux pris en compte dans cette analyse sont la vitesse de croissance journalière, la morphologie des colonies et la diffusion de pigments dans le milieu malt gélose. L'appréciation de la morphologie des colonies tient compte de l'aspect et de la pigmentation du mycélium, de la régularité de la marge et de la présence ou non de secteurs variants.

Tableau 12 : Caractéristiques morphologiques et culturales des souches du groupe A de *L. maculans* sur le milieu malt gélose à l'obscurité et à 20 °C.

Code d'identification	Aspects du mycélium	Pigmentation du milieu	Forme de la marge	Pycnides	Secteurs variants	
Populations isolées de la lignée MX						
R1	Souche	Gris, rasant	-	Irrégulière	-	+
R2	"	Gris, mi-aérien	-	Irrégulière	-	-
R3	"	Gris, rasant	-	Irrégulière	+	-
R4	"	Gris, mi-aérien	(+)	Irrégulière	-	-
R5	"	Gris, rasant	-	Irrég. à digité	-	-
R6	"	Blanc, mi-aérien	-	Irrégulière	-	-
R7	"	Gris, rasant	(+)	Irrégulière	+	-
R8	"	Gris, mi-aérien	-	Irrégulière	-	-
R9	"	Gris, mi-aérien	-	Irrégulière	+	-
R10	"	Gris, mi-aérien	(+)	Irrégulière	-	-
R11	"	Gris, rasant	(+)	Irrégulière	-	-
R12	"	Gris, mi-aérien	-	Irrégulière	-	-
R13	"	Gris, rasant	(+)	Irrégulière	-	-
R14	"	Blanc, aérien	-	Irrégulière	+	-
R15	"	Gris, mi-aérien	-	Irrégulière	-	-
R16	"	Blanc, aérien	-	Irrégulière	-	-
R17	"	Gris, aérien	-	Irrégulière	+	-
R18	"	Gris, aérien	-	Irrégulière	-	+
R19	"	Blanc, aérien	-	Irrégulière	-	-
R20	"	Blanc, aérien	-	Irrégulière	-	-
R21	"	Gris, mi-aérien	(+)	Irrégulière	-	-
R22	"	Gris, aérien	-	Irrégulière	-	+
R23	"	Blanc, aérien	-	Rég. à irrég.	-	-
MX1-13"	"	Gris, aérien	(+)	Rég. à irrég.	-	-
MXC1	Isolat	Gris, mi-aérien	-	Rég. à irrég.	-	-
Populations isolées du Colza						
A290	Souche	Gris, mi-aérien	-	Irrég. à digité	-	+
A447	Isolat	Gris, aérien	-	Rég. à irrég.	+	-
A813	Souche	Gris, rasant	-	Irrégulière	+	-
A922	"	Blanc, aérien	-	Rég. à irrég.	+	-
A923	"	Gris, mi-aérien	-	Rég. à irrég.	+	-
A924	"	Gris, rasant	-	Rég. à irrég.	+	-
A931	Isolat	Gris, rasant	-	Irrégulière	-	-
A932	Isolat	Gris, mi-aérien	-	Irrégulière	+	-
A940	Souche	Gris, mi-aérien	-	Irrégulière	-	-
A941	"	Gris, mi-aérien	-	Rég. à irrég.	-	-
A942	"	Gris, aérien	-	Rég. à irrég.	-	-
Co7	"	Gris, mi-aérien	-	Rég. à irrég.	-	-
Co18	"	Gris, mi-aérien	-	Rég. à irrég.	-	-

+ = présence, - = absence, (+) = présence inconstante sur les cultures vieillissantes.
Les codes commençant par R identifient les souches isolées de la lignée MX.

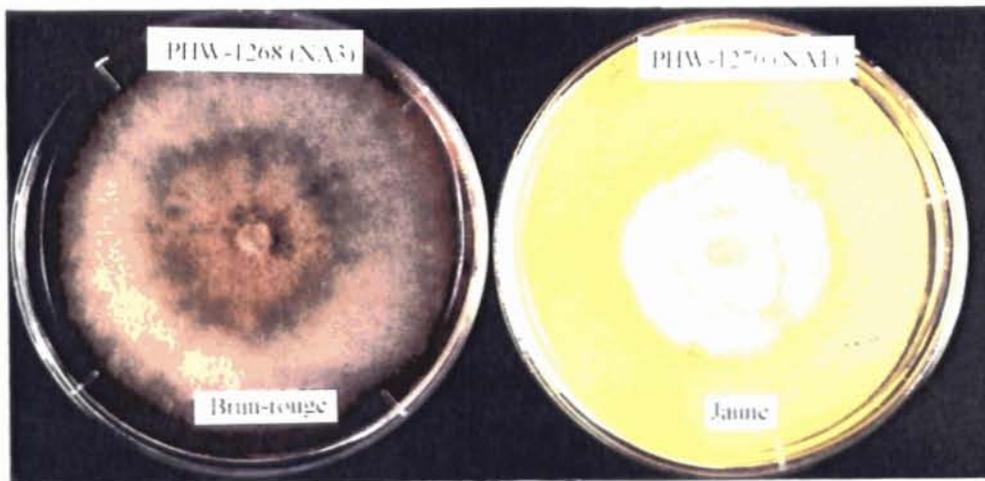


Figure 20 : Diffusion de pigments brun-rouge foncé et jaune dans le milieu de culture (malt gélose) par deux souches de référence du groupe B.

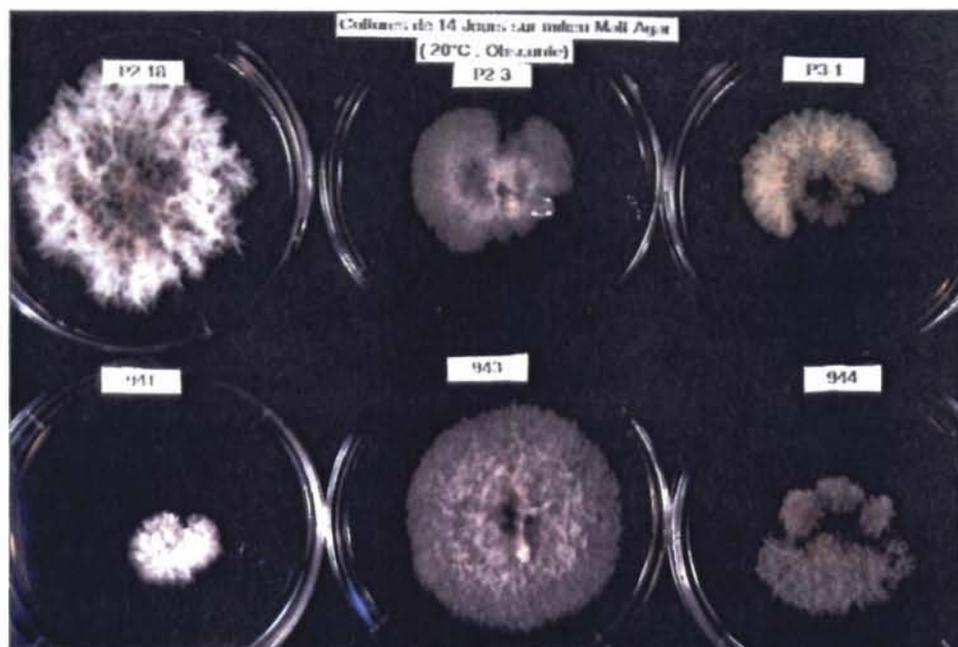


Figure 21 : Pigmentation, aspect du mycélium et présence de secteurs pour 5 souches du groupe B comparées à une souche du groupe A (941) sur milieu malt gélose.

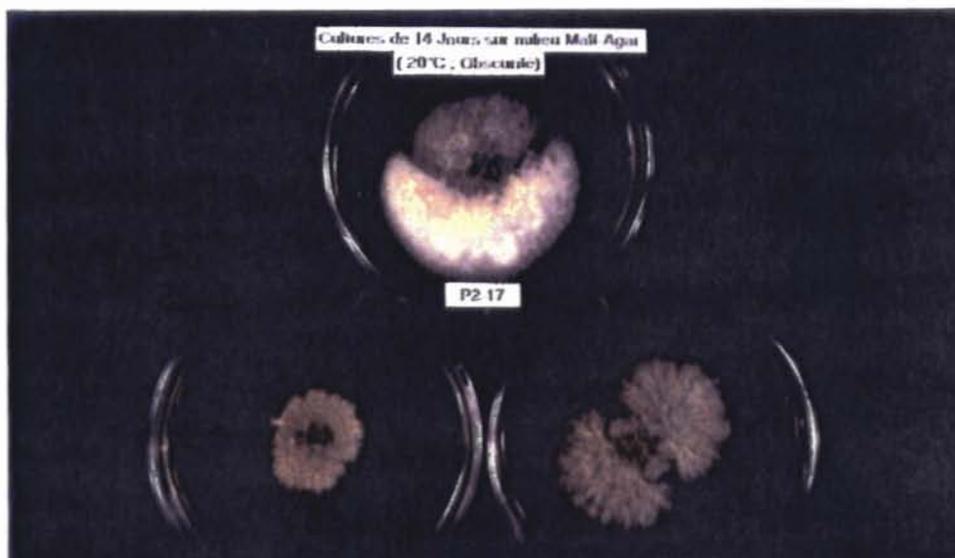


Figure 22 : Variabilité culturelle des colonies d'une souche monoasporée du groupe B, d'une répétition à l'autre.

(Photos : I. Somda)

Tableau 13 : Caractéristiques morphologiques et culturales des souches du groupe B de *L. maculans* sur le milieu malt gélose à 20 °C et à l'obscurité.

Code d'identification du matériel		Aspects du mycélium	Pigmentation du milieu	Régularité de la marge	Pycnides	Secteurs variants
<i>Populations isolées de la lignée MX</i>						
MX-4	Souche	Gris jaune, très aérien	Jaune	Régulière	+	+
MX-5	"	Blanc jaune, très aérien	Jaune	Régulière	+	+
MX-6	"	Blanc jaune, aérien	Jaune	Régulière	+	-
MX-7	"	Gris jaune, aérien	Jaune/Brun rouge	Rég. à irrégulière	+	+
MX-8	"	Blanc jaune, aérien	Jaune	Régulière	+	-
MX-F	Isolat	Gris jaune, aérien	Jaune/Brun rouge	Rég. à irrégulière	-	+
<i>Populations isolées de la Moutarde brune cv. Picra</i>						
P1-1	Souche	Gris jaune, aérien	Jaune/Brun rouge	Régulière	+	+
P1-2	"	Gris jaune, aérien	Jaune/Brun rouge	Rég. à irrégulière	+	+
P1-3	"	Gris jaune, très aérien	Jaune	Régulière	+	+
P1-4	"	Gris jaune, aérien	Jaune/Brun rouge	Rég. à irrégulière	+	+
P2-1	"	Gris jaune, rasant	Brun rouge	Irrégulière	-	-
P2-2	"	Gris jaune, aérien	Jaune	Irrégulière	-	+
P2-3	"	Gris rasant	Jaune	Régulière	+	-
P2-4	"	Gris jaune, mi-aérien	Jaune/Brun rouge	Régulière	+	+
P2-5	"	Gris jaune, aérien	Jaune	Régulière	+	-
P2-6	"	Blanchâtre, aérien	Jaune	Régulière	-	+
P2-7	"	Gris jaune, aérien	Jaune	Rég. à irrégulière	+	-
P2-8	"	Blanc, aérien	Jaune	Rég. à irrégulière	-	+
P2-9	"	Gris jaune, mi-aérien	Brun rouge	Rég. à irrégulière	-	+
P2-10	"	Gris jaune, aérien	Jaune	Régulière	+	-
P2-11	"	Gris jaune, mi-aérien	Jaune	Rég. à irrégulière	+	+
P2-12	"	Gris jaune, mi-aérien	Jaune	Rég. à irrégulière	-	-
P2-13	"	Gris jaune, mi-aérien	Brun rouge	Rég. à irrégulière	-	+
P2-14	"	Gris jaune, mi-aérien	Jaune	Rég. à irrégulière	+	+
P2-15	"	Gris jaune, aérien	Jaune	Rég. à irrégulière	+	+
P2-16	"	Gris jaune, aérien	Jaune	Rég. à irrégulière	+	+
P2-17	"	Gris jaune, aérien	Jaune	Rég. à irrégulière	+	+
P2-18	"	Jaune, aérien	Jaune	Régulière	-	-
P3-1	"	Gris jaune, mi-aérien	Jaune	Rég. à irrégulière	-	+
P3-2	"	Blanc jaune, aérien	Jaune	Régulière	-	-
PF1	Isolat	Gris jaune, rasant	Brun rouge	Régulière	-	-
PF2	"	Gris jaune, rasant	Brun rouge	Rég. à irrégulière	-	-
PT1	"	Gris, rasant	Brun rouge	Rég. à irrégulière	+	-
<i>Populations isolées du Colza</i>						
B867	Souche	Gris jaune, très aérien	Jaune	Régulière	+	+
B943	"	Gris jaune, mi-aérien	Brun rouge	Régulière	+	-
B944	"	Gris jaune, aérien	Jaune	Rég. à irrégulière	-	+
B945	"	Gris jaune, très aérien	Jaune	Régulière	-	-
B908	Isolat	Blanc jaune, très aérien	Jaune	Rég. à irrégulière	+	+
B980	Souche	Gris jaune, aérien	Jaune	Régulière	-	-
B981	Souche	Gris jaune, aérien	Jaune	Régulière	-	-
<i>Populations isolées d'autres Crucifères</i>						
NA 1	Isolat (Colza)	Jaune, aérien	Jaune	Irrégulière	-	-
NA 3	Isolat (Chou)	Gris, rasant	Brun rouge	Régulière	-	-
PW	Isolat (Wasabi)	Gris, rasant	Brun rouge	Régulière	-	-
Th164	Isolat (Thlaspi)	Gris, rasant	Brun rouge	Régulière	-	-

+ = présence, - = absence

a) Matériel fongique

Le matériel se compose de 38 souches et isolats du groupe A et de 44 souches du groupe B dont deux isolats issus de *Thlaspi arvense* (Tabouret des champs) et *Eutrema wasabiae* (Raifort ou 'japanese horseradish' en anglo-saxon).

Dans le souci d'évaluer la stabilité des caractéristiques culturelles, nous avons isolé des souches monopycniospores provenant d'une souche monoascosporee du groupe B (souche P1-2), d'un isolat du groupe A (A447) et d'un isolat du groupe B (PT).

b) Résultats

1) Variabilité morphologique et culturelle de *L. maculans*

① Observations préliminaires

L'observation à la loupe binoculaire des ascospores éjectées sur le milieu eau gélosée ne révèle pas de différence évidente permettant de distinguer les souches du groupe A des souches du groupe B. Après transfert sur le milieu MG, certaines souches produisent un pigment jaune qui diffuse dans le milieu au bout de sept jours de cultures dans les conditions de laboratoire.

Sur le milieu V8 gélosé et sous lumière noire, les souches produisent de nombreuses pycnides avec des cirrhes abondants.

L'observation des pycniospores au microscope optique ne révèle pas de différence nette entre les spores des souches du groupe B et celles du groupe A. Les pycniospores sont généralement ovoïdes et pourvues de deux gouttelettes lipidiques.

② Diffusion de pigment dans le milieu MG (Fig. 20)

Deux grands groupes de souches peuvent être distingués : il s'agit des souches ne diffusant pas de pigments dans le milieu de culture (groupe A, Tableau 12) et des souches qui en diffusent (groupe B, Tableau 13). La diffusion de pigments est une caractéristique stable chez les souches du groupe B. Les types de pigments produits sont variables d'une souche à l'autre. Ils peuvent être jaunes (jaune clair ou jaune foncé), brun rouge (clair ou foncé), noirs. Les pigments jaunes et brun rouges peuvent être observés sur une même colonie (Tableau 13).

Dans certains cas, des souches du groupe A diffusent de manière inconstante un pigment brun rouge léger (Tableau 12) dans le cas de colonies vieillissantes.

③ Pigmentation du mycélium (Fig. 21)

La pigmentation des colonies varie du gris, gris jaune, jaune, blanchâtre au blanc. Les souches du groupe A présentent un mycélium généralement gris ou blanc (Tableau 12). Par contre, chez les souches du groupe B, une grande variabilité est révélée pour ce caractère (Tableau 13). Une pigmentation grise est également commune chez ce groupe. Certains thalles colorés en jaune donnent lieu à des colonies pigmentées gris jaune ou blanc jaune. Dans la plupart des cas, le mycélium est couvert de gouttelettes jaunes, brun rouges ou noires.

④ Aspect du mycélium et production de pycnides (Fig. 21)

L'aspect du mycélium est soit rasant, mi-aérien, aérien ou très aérien. Le mycélium est dit rasant lorsqu'il ne se dresse pas sur le milieu de culture. Entre le type mi-aérien (mycélium se dressant de quelques millimètres sur le milieu) et le type très aérien (mycélium touchant le couvercle de la boîte de Petri) se définit le mycélium aérien. Alors que le mycélium des souches du groupe A est généralement rasant à mi-aérien et parfois aérien, tous les types sont rencontrés chez les souches du groupe B.

Le mycélium peut être compact, lâche, filamenteux ou cotonneux. Les colonies à mycélium compact présentent des thalles groupés. Si cette catégorie est associée au mycélium généralement rasant, les autres catégories rappellent les mycéliums aériens individualisés (lâche ou filamenteux) ou non (cotonneux). L'aspect filamenteux identifie le mycélium en forme de mèches de cheveux ou en verticilles.

Les souches du groupe A produisent généralement des pycnides au contact de la gélose ou incrustées dans celle-ci. Tandis que les souches du groupe B forment le plus souvent des pycnides sur les thalles aériens. Ces pycnides 'aériennes' sont exclusivement observées sur les colonies à mycélium aérien et très aérien. Elles sont réparties sur toute la colonie si celle-ci est uniforme.

L'apparition de 'secteurs variants' est un phénomène régulièrement mis en évidence chez les souches du groupe B dans nos conditions d'étude. Ces zones diffèrent en tous points de vue de la colonie mère (type majoritaire). Le type mycélien du secteur variant est, dans la plupart des cas, gris rasant avec pigment brun rouge et sans pycnides. Outre la production de secteurs variants, le type mycélien d'une souche donnée peut différer d'une boîte de Petri à l'autre (Fig. 22). Des données non incluses dans ce mémoire nous indiquent une grande instabilité des caractères cultureux pour un type mycélien donné. Les repiquages successifs d'explants issus des types rasant et très aérien développés sur une même colonie d'une souche monoasporée montrent dans les deux cas des secteurs variants. Dans nos conditions d'étude, les colonies des souches du groupe A se sont avérées uniformes.

Tableau 14 : Classement des souches en fonction de leur vitesse de croissance sur le milieu malt gélose à l'obscurité et à 20 °C.

Groupe B		Groupe A	
Souches	Vitesse de croissance moyenne (mm/j)	Souches	Vitesse de croissance moyenne (mm/j)
MX-4	5,35 ± 0,15	A314	3,49 ± 0,16
MX-5	4,97 ± 0,39	R23	2,99 ± 0,34
B908	4,73 ± 0,46	MX-C1	2,98 ± 0,54
B867	4,52 ± 0,17	R22	2,96 ± 0,35
MX-6	4,41 ± 0,38	A942	2,86 ± 0,16
NA3	4,21 ± 0,52	R20	2,82 ± 0,46
B943	3,85 ± 0,31	Co18	2,56 ± 0,12
MX-7	3,64 ± 0,26	R15	2,47 ± 0,53
B980	3,62 ± 0,22	A290	2,16 ± 0,33
B944	3,50 ± 0,73	R1	1,97 ± 0,28
RF	3,45 ± 0,37	Co7	1,83 ± 0,47
MX-8	3,32 ± 0,74	A813	1,77 ± 0,09
B981	3,30 ± 0,12	A925	1,75 ± 0,17
Th164	2,93 ± 0,53	R8	1,49 ± 0,42
NA1	1,91 ± 0,26	R14	1,47 ± 0,27
PW	1,54 ± 0,10	R10	1,21 ± 0,21
Moyenne	3,70 ± 0,19	Moyenne	2,30 ± 0,14

⑤ Régularité du front de croissance (Figs 21, 22, 23)

Les souches du groupe A se caractérisent par un front de croissance irrégulier ou digité (Tableau 12). Quant aux souches du groupe B, elles ont très souvent une marge régulière ou régulière à irrégulière du fait de la présence de secteurs variants (Tableau 13). Les colonies à mycélium aérien ont généralement une marge régulière.

⑥ Croissance mycélienne (Tableau 14)

Globalement, les souches du groupe A ont une croissance lente alors que les souches du groupe B se caractérisent par une croissance mycélienne rapide. Cependant, il existe une variation continue de la vitesse de croissance chez les deux groupes de souches (Tableau 14) et des différences significatives existent à l'intérieur de chaque groupe. Les souches sont statistiquement stables pour ce caractère. La vitesse de croissance ne permet pas de différencier les deux groupes de souches dans la mesure où ils se recouvrent pour ce critère.

2) Variabilité morphologique intra-souche et intra-isolat

L'ampleur de la variabilité morphologique et culturelle des populations de *L. maculans* est telle que nous nous sommes interrogé sur la stabilité des clones monopycniospores issus d'une souche monoasporée.

Les clones issus de la souche monoasporée P1-2 du groupe B présentent d'importantes variations se traduisant par des secteurs variants et des types de colonie différents d'une boîte de Petri à l'autre (Fig. 24). Ces souches monopycniospores montrent dans certains cas des cultures dont la morphologie diffère de celle de la souche-mère (Tableau 15). Cependant la production et la non production de pigment est un caractère stable.

Les souches monopycniospores issues de l'isolat du groupe B (PT1) sont homogènes et stables et présentent une morphologie différente de celle de PT1. Aucun secteur n'est observé chez ces souches (Fig. 25).

A l'intérieur du groupe A, les caractéristiques morphologiques des souches monopycniospores dérivant de l'isolat A447 montrent deux types de colonie différents de celui de l'isolat. Il s'agit d'une colonie à mycélium blanc aérien pourvue d'une auréole excentrique constituée de pycnides et d'une colonie formée uniquement de pycnides, pratiquement sans mycélium et caractérisée par une marge digitée (Fig. 26). A l'instar de l'isolat du groupe B, celui du groupe A est différent de ses souches monopycniospores (Tableau 15). En outre pour une souche monoasporée donnée, les colonies peuvent être de types différents d'une répétition à l'autre.

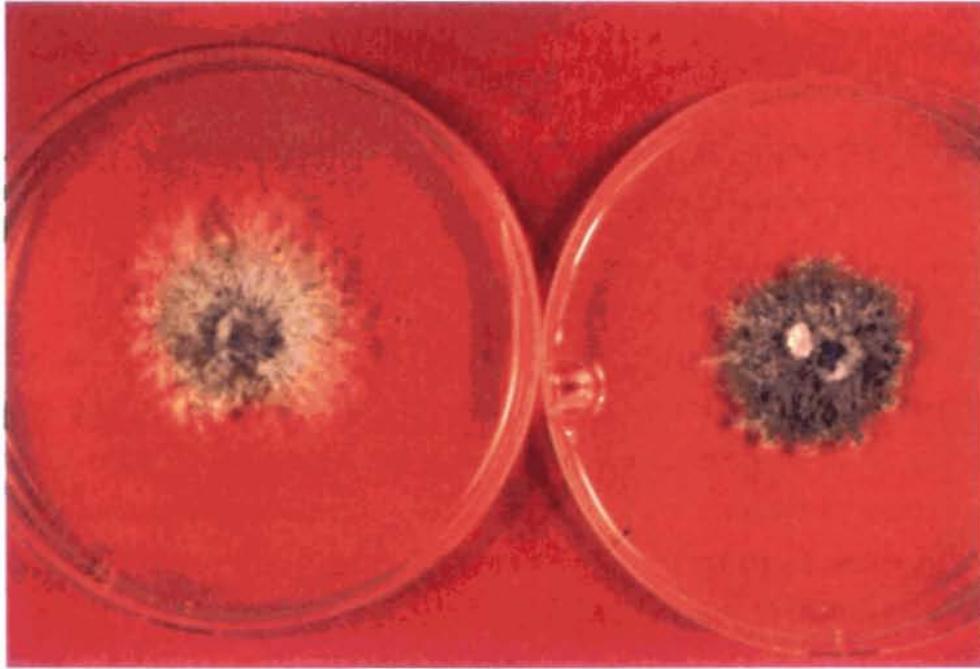


Figure 23 : Morphologie et couleur du mycélium de deux souches du groupe A sur milieu malt gélose.

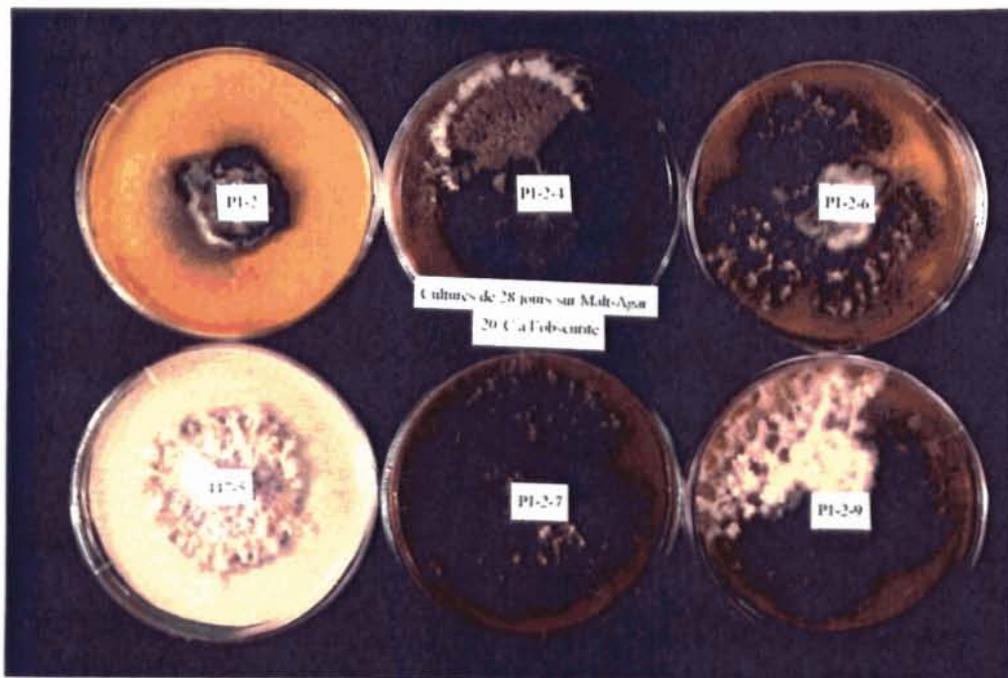


Figure 24 : Variabilité culturelle des souches monopycniospores (P1-2-4, P1-2-6, P1-2-7 et P1-2-9) issues d'une souche monoascosporee P1-2 du groupe B. (447-5 : souche monopycniospore du groupe A). (Photos : I. Somda).

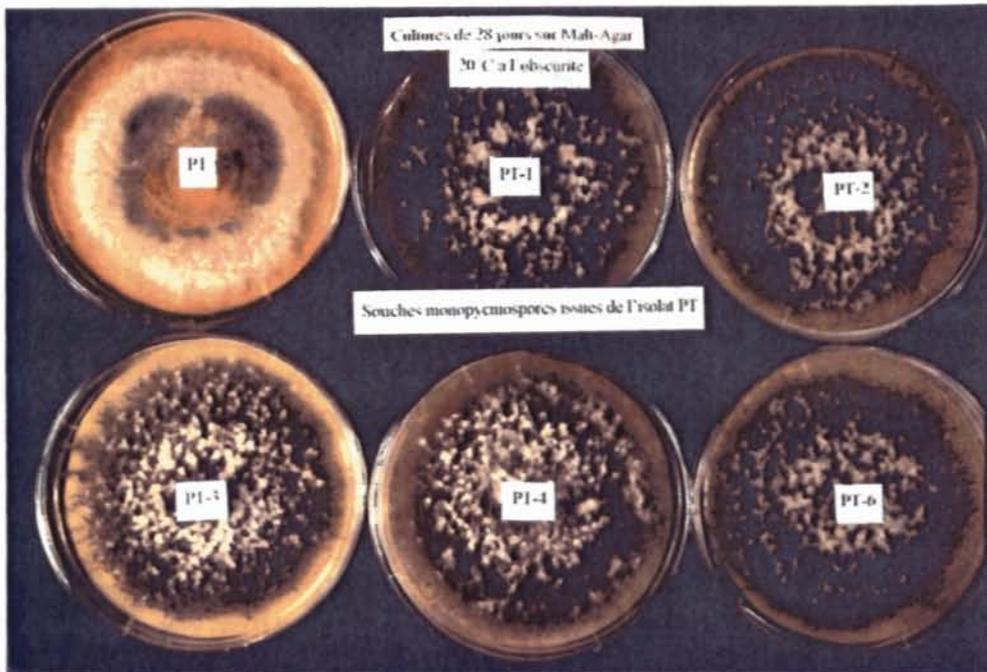


Figure 25 : Variabilité culturale des souches monospores (PT-1 à PT-6) issues d'un isolat (PT) du groupe B.

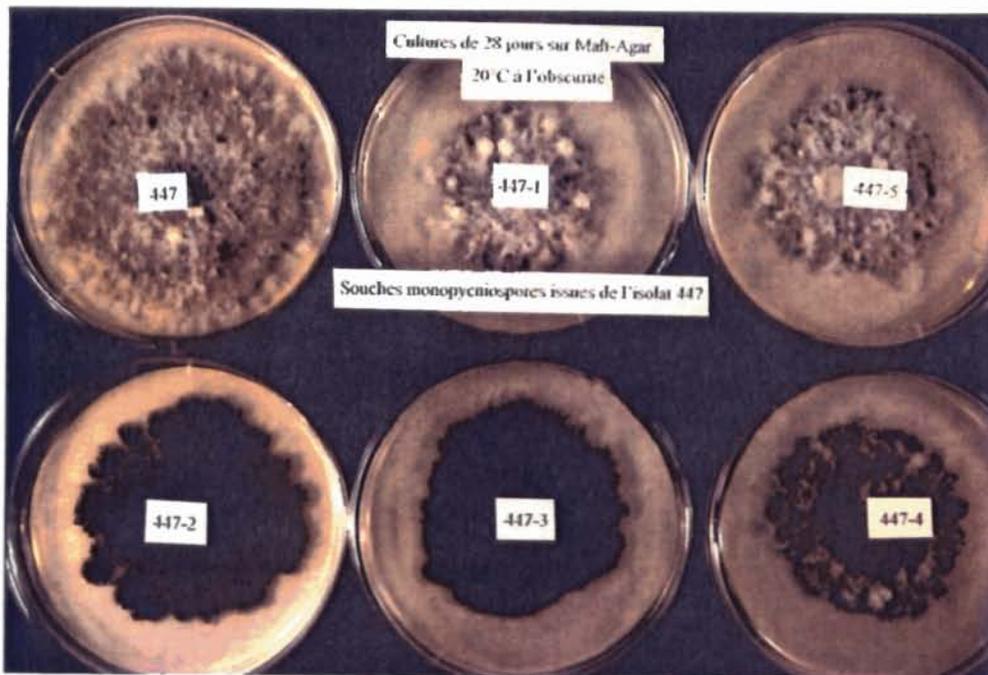


Figure 26 : Variabilité culturale des souches monospores (447-1 à 447-5) issues d'un isolat (447) du groupe A.

(Photos : I. Somda).

Tableau 15: Caractéristiques morphologiques et culturales des souches monopycnidiospores issues d'un isolat du groupe A, d'un isolat et d'une souche monoascosporee du groupe B sur milieu malt gélose à l'obscurité et à 20 °C.

Souches Origines	Aspects du mycélium	Marge/Pycnides	Pigments	Secteurs
Groupe A				
<i>Souches monopycnidiospores issues de A447</i>				
A447 Isolat	Blanc, aér., lâche	Irrég./-	-	-
A447-1 Souche	Blanc, aér., coton.	Irrég./auréole	-	-
A447-2 Souche	Mycélium absent	I-D/abondantes	-	-
A447-3 Souche	Mycélium absent	I-R/abondantes	-	-
A447-4 Souche	Gris, aér., coton.	Irrég./auréole	-	-
A447-5 Souche	Blanc, aér., coton.	Irrég./auréole	-	-
Groupe B				
<i>Souches monopycnidiospores issues de PT1</i>				
PT1 Isolat	Bl. Jaune, aér., coton.	Rég./-	Jaune	-
PT1-1 Souche	Gris, aér. filam.	Rég./abondantes	Jaune	-
PT1-2 Souche	Gris, aér. filam.	Rég./abondantes	Jaune	-
PT1-3 Souche	Gris, aér. filam.	Rég./abondantes	Jaune	-
PT1-4 Souche	Gris, aér. filam.	Rég./abondantes	Jaune	-
PT1-6 Souche	Gris, aér. filam.	Rég./abondantes	Jaune	-
PT1-9 Souche	Gris, aér. filam.	Rég./abondantes	Jaune	-
<i>Souches monopycnidiospores issues de P1-2</i>				
P1-2 Souche	Gris J., très aér. filam. Gris, rasant, compact	Rég./abondantes Irrég./-	Jaune Brun rouge	- ++
P1-2-4 Souche	Gris J., très aér. filam. Gris, rasant, compact	Rég./abondantes Irrég./-	Jaune Brun rouge	+ ++
P1-2-6 Souche	Gris J., très aér. filam. Gris, rasant, compact Gris, rasant, compact	Rég./abondantes Irrég./- Irrég./-	Jaune Brun rouge Brun rouge	+ - ++
P1-2-7 Souche	Gris J., très aér. filam. Gris, rasant, compact	Rég./abondantes Irrég./-	Jaune Brun rouge	+ ++
P1-2-9 Souche	Blanc, très aér., coton. Gris J., aér. filam.	Rég./- Rég./abondantes	Jaune Jaune	++ -
P1-2-10 Souche	Gris J., très aér. filam. Gris, rasant, compact	Rég./abondantes Irrég./-	Jaune Brun rouge	+ ++

Bl. = Blanc; Gris J. = Gris Jaune; aér. = aérien; filam. = filamenteux; coton. = cotonneux; Irrég. = Irrégulier; Rég. = Régulier; I-D = Irrégulier à digité; I-R = Irrégulier à régulier; - = absent; + = mycélium rasant; ++ = mycélium aérien lâche ou filamenteux.

c) Discussion

Le milieu MG nous semble le mieux adapté pour une classification rapide (sept jours après repiquage) des souches de *L. maculans* pour leur capacité à produire ou non des pigments dans le milieu. Jusqu'à présent, tous les auteurs utilisent le milieu Czapek liquide additionné de levure pour analyser la diffusion de pigments (Hanacziwskyj et Drysdale, 1984, Johnson et Lewis, 1990 et Gall, 1994). Ce milieu minéral est de composition complexe et son utilisation nécessite une durée d'incubation assez longue (28 jours) pour une lecture au spectrophotomètre. Par ailleurs, notre expérience a montré qu'il existe des risques de contaminations bactériennes pouvant limiter la validité des mesures de densité optique. Le milieu MG présente l'avantage d'être rapide et efficace pour une détection visuelle des souches du groupe B tout en permettant une analyse complémentaire de l'aspect des colonies.

L'ensemble des critères analysés permet de rendre compte de l'extrême variabilité culturelle chez *L. maculans* et surtout d'illustrer les variations importantes à l'intérieur de chacun des deux groupes.

Nous observons que les souches françaises de *L. maculans* présentent des différences importantes sur la base des caractères morphologiques et culturels. Les populations analysées se composent des deux groupes de souches rapportés dans la bibliographie sur les espèces du genre *Brassica* : les souches diffusant des pigments dans le milieu de culture et caractérisées par une croissance rapide, un mycélium aérien et très peu de pycnides (groupe B) en opposition aux souches non productrices de pigments à croissance lente, au mycélium ras et produisant de nombreuses pycnides (groupe A) (Pound, 1947, McGee et Petrie, 1978). Alors que les isolats PW (*Phoma wasabiae*) et Th164 (isolé de *Thlaspi*) sont morphologiquement similaires, la souche NA3 se singularise par son pigment brun rouge foncé. Quant à la souche de référence PW 1270 (NA1 = Non-agressive 1), elle se rapproche de certaines souches du groupe B isolées de la lignée MX et de la Moutarde brune.

Par ailleurs, contrairement à Gall (1994), nous observons une stabilité dans la **production de pigments** chez les souches du groupe B. Au regard de nos résultats, la diffusion de pigments distingue parfaitement les deux types de souches 7 jours après la mise en culture. Cependant, nous notons comme Gall (1994) la diffusion d'un pigment rouge par quelques souches du groupe A au bout de trois semaines de culture. Ce caractère est aléatoire d'une répétition à l'autre.

Une grande variabilité est notée à l'intérieur de chacun des groupes de souches tant pour la croissance que pour la morphologie des colonies. En effet, tout comme le mentionne Pound (1947), nous observons des souches à croissance rapide et lente aussi bien dans le groupe A que dans le

groupe B. En accord avec les travaux de Gall (1994), nos observations concernant la vitesse de croissance et la diffusion de pigments montrent une indépendance de ces critères. Delwiche (1980) cité dans Rouxel (1994) parvient à la même conclusion après avoir analysé des souches isolées de chou dans le Wisconsin (USA).

Les variations morphologiques se manifestent par la formation de secteurs ou par des hétérogénéités observées dans les descendance clonales d'une souche (Caten et Jinks, 1968). Chez *L. maculans*, les variations morphologiques sont fréquemment mises en évidence chez les souches du groupe B soit d'une répétition à l'autre ou sur une même colonie (secteurs) pour une souche monoascosporee donnée. Nous avons montré que les types mycéliens des secteurs d'une souche monoascosporee sont instables et peuvent régénérer le type mycélien originel. Ces résultats non présentés dans le présent document méritent d'être évoqués, même s'ils nécessitent une confirmation. De plus, des souches monopycniospores issues d'une souche monoascosporee, supposées être des clones nucléaires, montrent la même variabilité morphologique.

Manifestation la plus importante de l'instabilité culturelle des souches, la formation de secteurs est un phénomène largement décrit chez les champignons phytopathogènes facultatifs. Chez *Ascochyta fabae* par exemple, Reynaud (1984) rapporte la présence de nombreux 'secteurs variants' différant par leur pigmentation, leur vitesse de croissance et leur fructification. De même, Sharma et Brown (1983) soulignent que les secteurs observés chez *Septoria nodorum* augmentent avec la température, la colonie originelle étant restaurée après un retour à la température optimale.

Les observations que nous rapportons sur la variabilité et l'instabilité des souches du groupe B sont originales. En effet, Pound (1947) montre que la souche 'Puget Sound' assimilée au groupe B ne manifeste aucune variation morphologique quel que soit le milieu de culture. La formation de secteurs est mise en évidence exclusivement chez les souches du groupe A par Pound (1947) et Rouxel (1994) qui observe également des variations morphologiques chez des clones monopycniospores issus d'une souche monoascosporee.

Au vu de la diversité du matériel fongique analysé, il nous apparait nécessaire d'évoquer les effets éventuels de l'hôte et de l'origine géographique sur la variabilité morphologique et culturelle des deux types de souches. Les secteurs semblent affecter principalement les souches monoascosporees du groupe B provenant de la Moutarde brune et, dans une moindre mesure, celles issues de la lignée de recombinaison. Nos données sur la morphologie des souches de référence des sous-groupes NA1 (PHW1270), NA3 (PHW 1268) et des isolats issus de *Thlaspi arvense* et *Eutrema wasabiae* corroborent le polymorphisme important chez les souches assimilées au groupe B.

Il ressort de notre étude, et dans la limite du nombre de souches analysées, que l'origine biologique ou géographique ne paraît pas rendre compte de toute la diversité du champignon puisque des clones d'une souche génétiquement homogène sont instables pour leurs caractéristiques culturales.

Ce constat nous autorise à penser que des phénomènes génétiques, inhérents à l'agent pathogène, peuvent contribuer à expliquer les inconstances des caractères morphologiques et culturels observés dans les deux groupes de souches. Le rôle potentiel de la mutation spontanée n'est pas à écarter bien que sa fréquence par gène soit de l'ordre de 10^{-6} chez les champignons (Caten, 1996). Ces mutations pourraient résulter de la présence d'éléments d'ADN transposables (transposons) dans les chromosomes (Kleckner, 1981). Les résultats obtenus par Calvert *et al.* (1949) et Petrie (1969) montrent que des mutants caractérisés par des colonies morphologiquement différentes de celles des souches-mères peuvent être produits par mutagenèse thermique, chimique et physique. Les mutants de la souche du groupe B apparaissent morphologiquement stables alors que des 'secteurs variants' sont observés chez les mutants du groupe A.

Les pycniospores sont unicellulaires et uninuclées tandis que les cellules mycéliennes sont plurinuclées (Pound, 1947). L'hétérocaryose ne peut de ce fait s'imposer comme mécanisme possible de variation puisque les souches testées sont soit des clones conidiens (Calvert *et al.*, 1949) soit d'origine monoascosporee. Cependant, la coexistence de noyaux mutants et 'sauvages' dans le même thalle pourrait engendrer *via* la recombinaison mitotique des individus 'hybrides' à l'origine des colonies 'saltantes' (*i.e.* produisant des secteurs).

Toutes les variations culturales et morphologiques n'ont pas forcément un support nucléaire (Caten, 1996). De nombreux exemples traitant de l'hérédité cytoplasmique de certains caractères culturels telle que la croissance radiale sont rapportés chez les champignons phytopathogènes (Petrie, 1969; Russell, 1978; Caten, 1996). Par ailleurs, les milieux synthétiques de culture constituent également un facteur d'instabilité chez les champignons (Caten, 1996). Ce phénomène est décrit chez *L. maculans* par Calvert *et al.* (1949) et Petrie (1969). Gall (1994) ne parvient pas à mettre en évidence des différences morphologiques entre les souches des groupes A et B sur le milieu V8 à 20 °C et à l'obscurité. La confrontation de nos résultats obtenus sur milieu MG avec ceux de Gall (1994) souligne l'influence des conditions environnementales sur les variations culturales des souches.

L'explication la plus vraisemblable du polymorphisme culturel chez *L. maculans* provient des travaux originaux de Morales *et al.* (1993) et de Plummer et Howlett (1993, 1995) sur l'hétéropléidie et le polymorphisme de taille des chromosomes. Ces variations se produisent pendant la phase de reproduction sexuée (méiose) (Plummer et Howlett, 1993; 1995) et pourraient également

Tableau 16 : Caractéristiques des souches et isolats du groupe A provenant de la lignée de recombinaison MX

Identification	du matériel	Organes d'origine	Année d'isolement
R1	Souche	Périthèce	1992
R2	"	"	"
R3	"	"	"
R4	"	"	"
R5	"	"	"
R6	"	"	"
R7	"	"	"
R8	"	"	"
R9	"	"	"
R10	"	"	"
R11	"	"	"
R12	"	"	"
R13	"	"	"
R14	"	"	"
R15	"	"	"
R16	"	"	"
R17	"	"	"
R18	"	"	"
R19	"	"	"
R20	"	"	"
R21	"	"	"
R22	"	"	"
R23	"	"	"
R24	"	"	"
R25	"	"	"
MX-1	"	"	1993
MX-2	"	"	"
MX-3	"	"	"
MX1-2	"	"	"
MX1-3	"	"	"
MX1-5	"	"	"
MX1-6	"	"	"
MX1-7	"	"	"
MX1-8	"	"	"
MX1-9	"	"	"
MX1-10	"	"	"
MX1-11	"	"	"
MX1-12	"	"	"
MX1-13	"	"	"
MX1-14	"	"	"
MX2-1	"	"	"
MX2-2	"	"	"
MX2-4	"	"	"
MX2-5	"	"	"
MX2-6	"	"	"
MX2-7	"	"	"
MX2-8	"	"	"
MX3-1	"	"	"
MX3-2	"	"	"
MX3-3	"	"	"
MX3-4	"	"	"
MX3-6	"	"	"
MX3-7	"	"	"
MX3-8	"	"	"
MX4-1	"	"	"
MX4-2	"	"	"
MX4-3	"	"	"
MX4-7	"	"	"
MX4-8	"	"	"
MX4-9	"	"	"
RT	Isolat	Tige	"
MXC1	"	Collet	1994
MXC2	"	"	"
MX-S	"	Silique	"
MX-T1	"	Tige	"

se produire durant la phase de multiplication végétative (Caten, 1996). Des résultats similaires, obtenus chez de nombreux autres champignons phytopathogènes (Kistler et Miao, 1992), semblent expliquer une partie de leur variabilité.

Au regard des données accumulées sur la variabilité de *L. maculans*, il convient de préciser que l'efficacité des caractères morphologiques et cultureux comme marqueur de groupes de souches réside dans la conjonction de deux critères à savoir la diffusion ou non de pigments et l'aspect du mycélium.

III. CARACTERISATION BIOLOGIQUE

Le polymorphisme de *L. maculans* ainsi révélé par les critères cultureux et morphologiques pourrait présager de la variabilité des ces populations pour leur capacité à attaquer les espèces du genre *Brassica*. En effet, de nombreux auteurs à la suite de Cunningham (1927) et de Pound (1947) ont montré une corrélation entre le pouvoir pathogène et les caractères cultureux. Les souches du groupe A sont capables de causer d'importantes dégradations des tissus de certaines espèces du genre *Brassica*, alors que les souches du groupe B sont généralement considérées comme très peu pathogènes. De nombreux auteurs à la suite de Mengistu *et al.* (1989) assimilent le groupe B au groupe non agressif sur le Colza sensible cv. Westar. Cependant, il convient de noter que ces différentes études, bien que concordantes dans l'ensemble, sont souvent réalisées sur un nombre très limité de souches, isolées le plus souvent d'espèces sensibles tels que le Colza, le Chou ou le Rutabaga.

Nous avons donc cherché à analyser la variabilité du pouvoir pathogène des souches isolées de la lignée MX et d'autres Crucifères cultivées et adventices comparativement aux souches isolées du Colza sur notre gamme d'hôtes.

a) Matériel fongique

Les tableaux 16, 17, 18 et 19 font état des caractéristiques et des origines des souches analysées dans cette partie de l'étude. L'adjonction de souches de référence appartenant aux groupes A et B provenant de la mycothèque du laboratoire Colza ou d'origines étrangères permet une caractérisation fiable de notre collection.

Tableau 17 : Caractéristiques et origines de 40 souches et isolats provenant du Colza.

Identification	du matériel	Origines	Année d'isolement
A290	Souche	Le Rheu	1985
A314	Isolat	Finistère	"
A447	"	Canada	1987
A759	Souche	Delmes	1990
A764	"	Demanges	"
A775	"	Le Rheu	"
A813	"	"	"
A824	"	Demanges	"
A827	"	SW (France)	"
A901	"	Allemagne	1992
A922	"	Deux villes	"
A923	"	Rigny	"
A924	"	Mairy	"
A925	"	Tressanges	"
A929	Isolat	Canada	1993
A930	"	"	"
A931	"	Angleterre	"
A932	"	"	"
A940	Souche	Allemagne	1994
A941	"	"	"
A942	"	"	"
Co1	"	Le Rheu	1993
Co2	"	"	"
Co3	"	"	"
Co4	"	"	"
Co7	"	"	"
Co9	"	"	"
Co11	"	"	"
Co12	"	"	"
Co13	"	"	"
Co14	"	"	"
Co17	"	"	"
Co18	"	"	"
Co21	"	"	"
Co22	"	"	"
Co23	"	"	"
Co24	"	"	"
Co25	"	"	"
Co27	"	"	"
Co29	"	"	"

Tableau 18 : Caractéristiques des populations du groupe B isolées de différentes Crucifères.

Codes d'identification		Origines géographiques	Années d'isolement
Populations isolées de la lignée MX			
MX-4	Souche	Le Rheu	1993
MX-5	"	"	"
MX-6	"	"	"
MX-7	"	"	"
MX-8	"	"	"
MX-F	Isolat	"	"
Populations isolées du Colza			
B867	Isolat	Dijon	1991
B908	"	Lyon	1992
B980	Souche	Pologne	1994
B981	"	"	"
B943	"	Allemagne	?
B944	"	"	"
B945	"	"	"

Tableau 19 : Caractéristiques des isolats de *L. maculans* provenant de différentes Crucifères cultivées et adventices

Identification		Hôtes d'origine		Année d'isolement
Es1	Groupe A	<i>Eruca sativa</i>	Roquette	1994
Es2	Groupe B	"	"	"
Rs1	Groupe A	<i>Raphanus sativus</i>	(Radis)	"
Rs2	Groupe B	"	"	"
RBMN	Groupe B	<i>Raphanobrassica</i>	"	"
Sa1	Groupe A	<i>Sinapis arvensis</i>	(Moutarde des champs ou Sanve)	"
Sa2	Groupe B	"	"	"

b) Résultats

1) Pathogénie des souches du groupe A

① Souches provenant de MX

D'une manière générale, l'agressivité moyenne des souches testées sur chacun des trois génotypes montre une variation continue de la gravité des symptômes induits. Sur la lignée de recombinaison MX, trois groupes de souches peuvent être distingués : les souches agressives ($IM \geq 6$), les souches moyennement agressives ($4 \leq IM < 5,9$), et les souches non agressives ($IM < 4$) (Fig. 27, annexe 9). Alors que le cv. Westar est très sensible, la Moutarde brune présente une très forte résistance vis-à-vis des 65 souches testées. L'utilisation du cv. Westar met en évidence une souche non pathogène : la souche R15. Cette absence de pathogénie se manifeste également sur la lignée MX et le cv. Picra.

② Souches provenant du Colza

Quarante souches sont analysées. Sur la lignée MX, des différences peuvent être observées entre les souches (Fig. 28, annexe 10). Toutes les souches sont très agressives sur le cv. Westar. Le cv. Picra manifeste une résistance de type hypersensible. Il existe des souches non agressives sur la lignée MX qui se montrent très fortement agressives sur le cv. Westar : par exemple les souches Co7, A827, A931.

③ Comparaison des souches du groupe A provenant de MX et du Colza (Fig. 29)

La proportion de souches isolées de la lignée MX et pathogènes sur cette dernière lignée est très forte (58,4 % de souches virulentes) comparativement à celles isolées du Colza (33,4 % de souches). Quel que soit l'hôte d'origine, les souches classent les génotypes de la même manière, en fonction de leur niveau de résistance. La Moutarde brune cv. Picra est toujours classée plus résistante que la lignée MX. Le cv. Westar apparaît le génotype le plus sensible à toutes les souches.

2) Pathogénie des souches du groupe B provenant de MX et du Colza

Toutes les souches du groupe B isolées de la lignée MX sont virulentes sur la lignée MX et le cv. Westar alors que des niveaux d'agressivité variables sont observés sur le cv. Picra (Fig. 30, annexe 11). Une variation continue de l'agressivité des souches sur la lignée MX est mise en évidence. Trois groupes de souches sont mis en évidence sur le cv. Picra : huit souches agressives, trois souches moyennement agressives et deux souches non agressives (B943 et B867).

	Souches	cv. Picra	MX	cv. Westar		Souches	cv. Picra	MX	cv. Westar
1	MX-1	1,95	7,61	8,61	35	MX1-10	1,46	3,33	8,67
2	MX-1-2	2,28	2,43	6,21	36	MX1-11	1,94	5,27	8,55
3	MX-1-3	2,51	2,17	5,84	37	MX1-12	1,10	3,90	6,98
4	MX-1-5	1,30	2,70	5,29	38	MX1-13	4,29	5,83	8,93
5	MX-1-6	0,95	1,83	5,69	39	MX1-14	1,77	4,35	7,14
6	MX-1-7	1,63	1,64	5,20	40	RT	1,39	7,03	7,9
7	MX-1-8	3,95	5,20	8,86	41	R1	1,53	5,21	6,45
8	MX-1-9	1,66	4,48	8,63	42	R10	2,61	4,43	9,00
9	MX-2	1,28	4,19	7,87	43	R11	1,56	2,47	9,00
10	MX-2-1	0,95	1,90	4,96	44	R12	1,66	2,50	8,78
11	MX-2-2	2,29	6,78	7,66	45	R13	1,40	7,88	9,00
12	MX-2-4	2,69	8,77	8,94	46	R14	1,34	7,25	7,50
13	MX-2-5	3,09	5,93	8,53	47	R15	0,90	1,92	2,12
14	MX-2-6	1,41	3,18	6,35	48	R16	1,54	3,11	8,97
15	MX-2-7	1,48	3,57	6,23	49	R17	0,27	1,20	5,73
16	MX-2-8	2,30	5,95	8,88	50	R18	1,00	6,48	8,72
17	MX-3	2,53	6,29	7,52	51	R19	0,73	2,20	9,00
18	MX-3-1	2,05	2,89	8,17	52	R2	1,62	8,55	8,44
19	MX-3-2	1,68	4,36	8,31	53	R20	1,31	4,11	5,44
20	MX-3-3	1,96	2,34	7,34	54	R21	1,32	4,78	7,77
21	MX-3-4	2,43	2,64	8,46	55	R22	2,23	2,56	9,00
22	MX-3-6	0,83	2,00	7,00	56	R23	3,37	5,82	9,00
23	MX-3-7	2,69	3,65	8,83	57	R24	1,58	3,02	8,86
24	MX-3-8	1,92	4,68	9,00	58	R25	1,14	2,50	8,88
25	MX-4-1	1,37	3,81	8,66	59	R3	1,40	2,09	8,63
26	MX-4-2	2,52	8,57	8,87	60	R4	1,92	8,13	8,58
27	MX-4-3	0,72	8,61	7,65	61	R5	1,45	3,63	8,97
28	MX-4-7	1,65	8,61	8,53	62	R6	2,25	8,47	8,63
29	MX-4-8	2,67	6,02	6,34	63	R7	1,87	8,13	8,90
30	MX-4-9	3,16	8,14	8,53	64	R8	2,51	8,10	9,00
31	MX-C1	4,14	8,6	8,72	65	R9	2,80	7,25	8,72
32	MX-C2	3,40	8,5	8,53					
33	MX-S	2,96	8,8	8,97					
34	MX-T1	2,73	8,9	8,50					

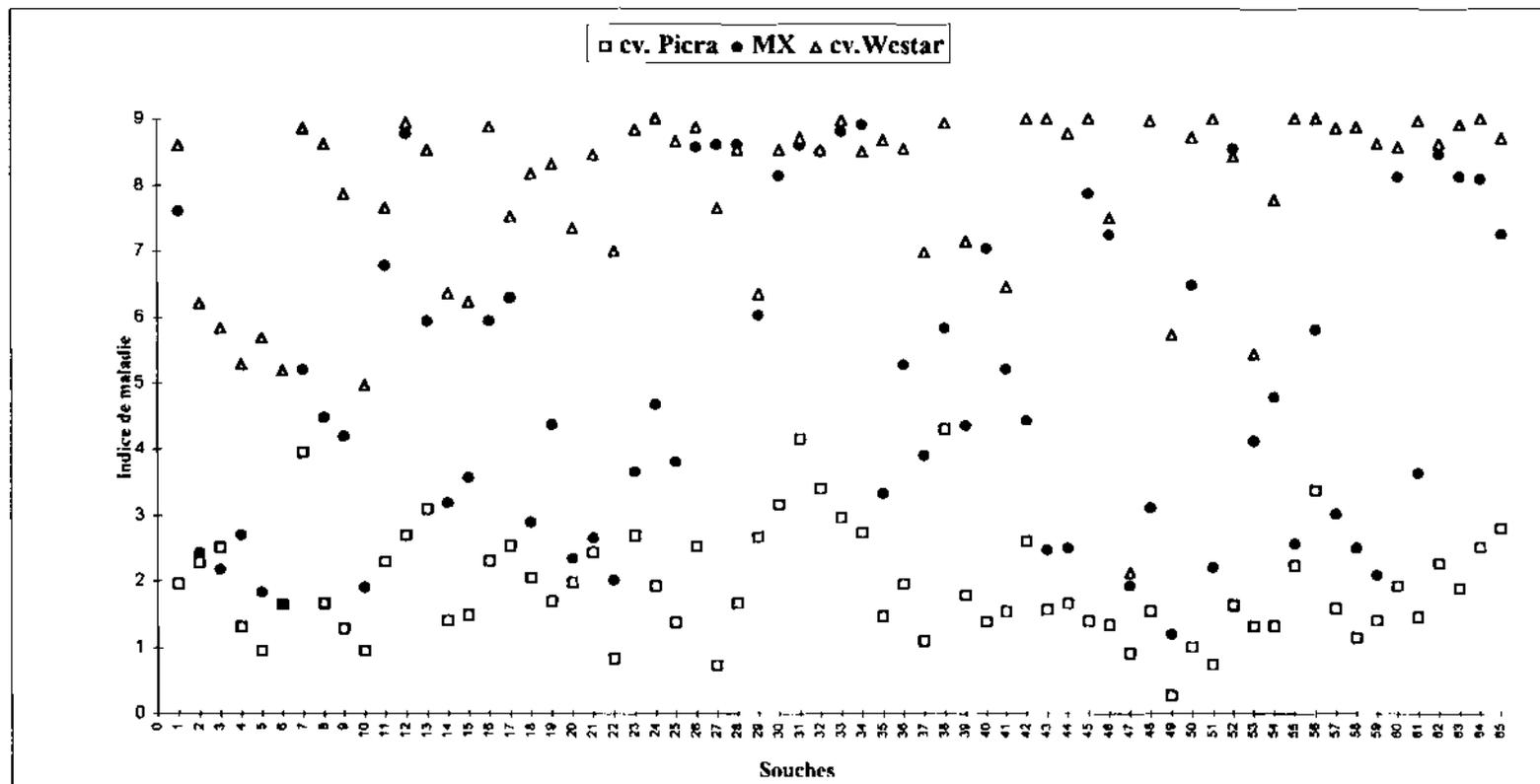


Figure 27 : Agressivité, sur trois génotypes (cv. Picra, MX et cv. Westar), de 65 souches et isolats du groupe A provenant de la lignée MX

Souches		cv. Picra	Lignée MX	cv. Westar
1	A290	0,89	2,64	8,84
2	A314	0,84	1,55	6,59
3	A447	1,67	3,37	9,00
4	A759	2,55	5,54	9,00
5	A764	1,18	2,98	9,00
6	A775	0,92	2,39	9,00
7	A813	1,06	2,64	8,88
8	A824	0,95	2,76	8,80
9	A827	0,92	1,85	7,59
10	A901	0,95	.	8,94
11	A922	0,73	1,80	6,77
12	A923	1,97	6,76	9,00
13	A924	1,03	2,23	8,08
14	A925	0,85	3,12	8,75
15	A929	0,95	2,03	7,11
16	A930	0,00	0,21	5,58
17	A931	1,13	1,95	8,75
18	A932	1,55	2,92	8,36
19	A940	2,95	4,60	8,86
20	A941	2,71	3,98	8,45
21	A942	3,16	6,19	7,97
22	Co1	1,28	3,40	7,05
23	Co11	1,47	5,55	7,90
24	Co12	1,68	6,95	7,96
25	Co13	1,46	6,11	9,00
26	Co14	0,57	3,24	5,67
27	Co17	1,63	5,82	9,00
28	Co18	2,16	6,33	8,76
29	Co2	2,17	3,34	6,95
30	Co21	0,75	2,82	8,78
31	Co22	2,36	5,96	7,89
32	Co23	3,12	2,42	9,00
33	Co24	1,52	4,44	6,35
34	Co25	1,57	2,73	8,42
35	Co27	1,84	2,19	4,69
36	Co29	0,76	2,23	5,30
37	Co3	1,73	2,97	6,84
38	Co4	1,91	6,59	6,96
39	Co7	2,79	1,93	9,00
40	Co9	1,67	2,08	9,00

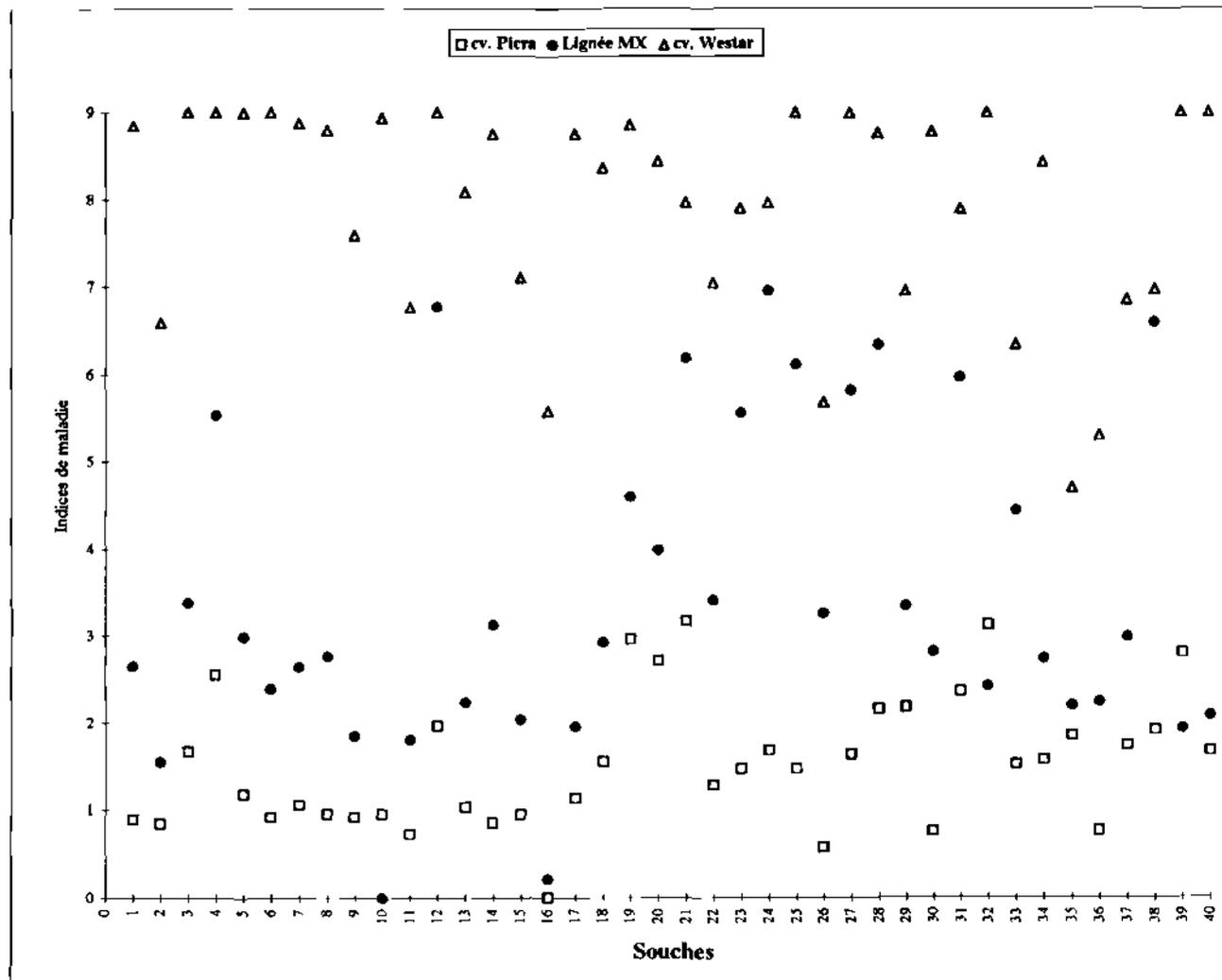


Figure 28 : Agressivité sur trois génotypes (cv. Picra, lignée MX et cv. Westar) de 40 souches et isolats du groupe A provenant du Colza

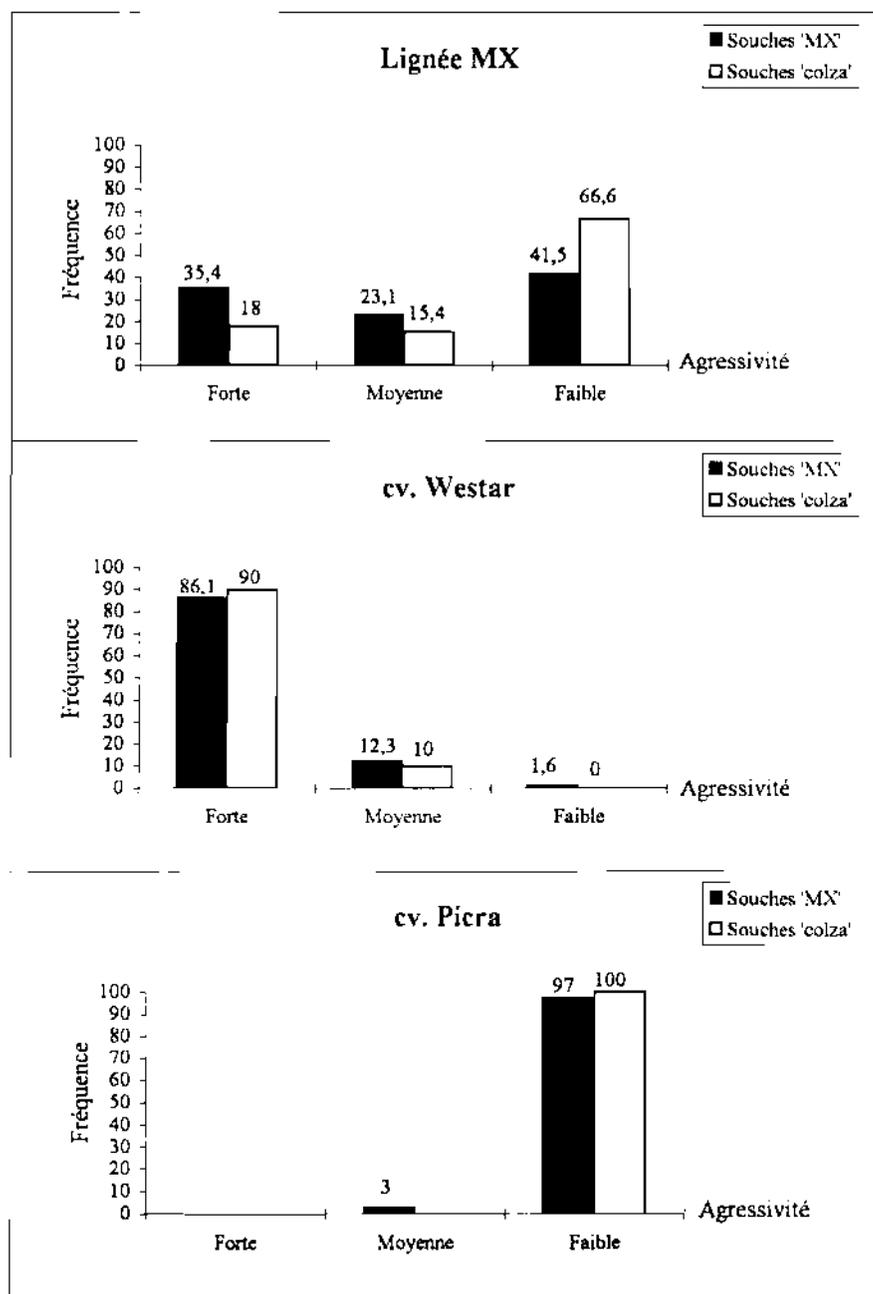


Figure 29 : Comparaison des fréquences des souches du groupe A isolées de la lignée MX et du Colza en fonction de leur agressivité sur trois génotypes (cv. Picra, Lignée MX et cv. Westar).

Souches	cv. Picra	Lignée MX	cv. Westar
B867	2,61	8,96	8,72
B908	4,78	8,88	NT
B943	3,77	7,97	6,33
B944	6,63	7,94	6,48
B945	4,35	7,17	4,90
B980	6,79	9,00	7,60
B981	7,79	9,00	9,00
MX-4	8,46	9,00	9,00
MX-5	6,72	9,00	9,00
MX-6	7	9,00	9,00
MX-7	7,43	8,74	9,00
MX-8	7,32	8,40	7,76
R-F	4,62	8,81	8,09

NT = Non testé

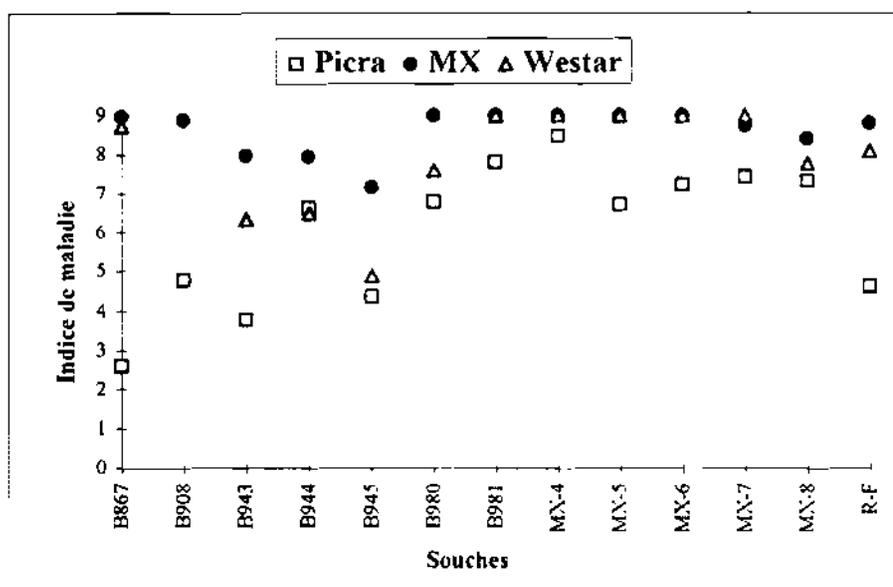


Figure 30 : Agressivité sur trois géotypes des souches et isolats du groupe B provenant de la lignée MX et du Colza

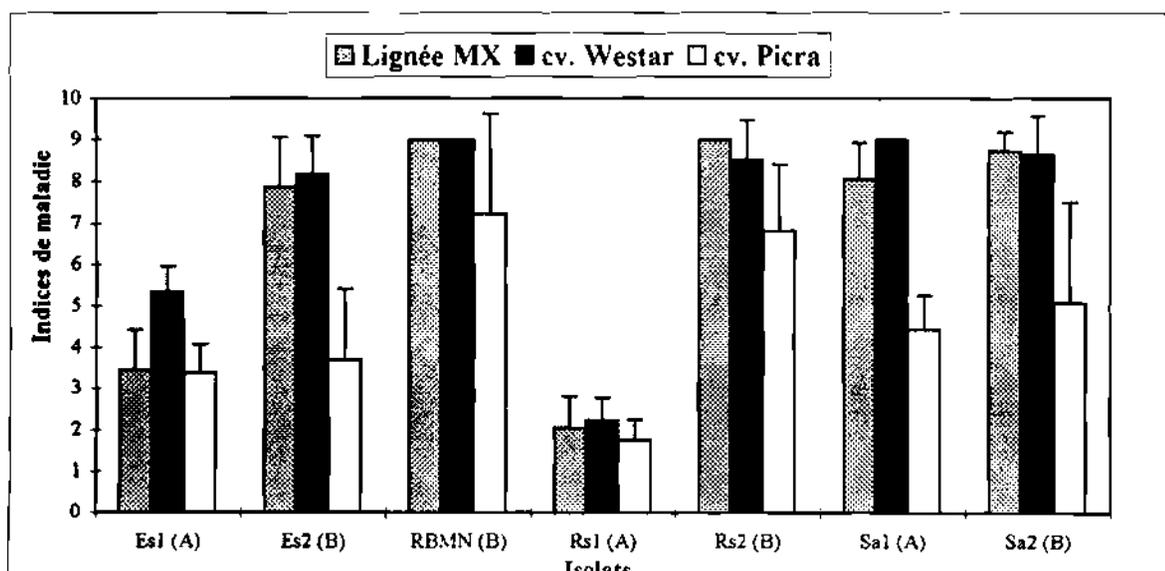


Figure 31 : Agressivité des isolats provenant de Crucifères cultivées et adventices sur les trois géotypes étudiés () : groupe de souches.

Parmi les souches du groupe B provenant du Colza, les souches polonaises (B980 et B981) ont des niveaux d'agressivité plus élevés que les souches d'origines allemande (B943 et B945) et française (B867 et B908) sur le cv. Picra.

3) Pathogénie des isolats de *L. maculans* issus d'autres Crucifères

Sept isolats (quatre isolats du groupe B et trois isolats du groupe A) obtenus à partir de symptômes développés sur des Crucifères adventices et cultivées, autres que les espèces du genre *Brassica* sont testés pour leur pouvoir pathogène sur la gamme d'hôtes composée de la lignée MX, du cv. Picra et du cv. Westar.

Tous les isolats du groupe B sont virulents sur toute la gamme d'hôtes quel que soit l'hôte d'origine (Fig. 31). Le niveau d'agressivité des isolats est cependant le plus faible sur le cv. Picra vis-à-vis duquel l'isolat Es2 (isolé d'*Eruca sativa*) est faiblement agressif. Parmi les isolats du groupe A, l'isolat Sa1 provenant de *Sinapis arvensis* est le plus agressif (IM = 7,0) sur les 3 génotypes avec un niveau moyen d'agressivité sur le cv. Picra. L'isolat Rs1 (provenant de *Raphanus sativus*) est le moins agressif de tous les isolats du groupe A.

4) Analyse comparée de l'ensemble des souches étudiées (Fig. 32)

La lignée MX discrimine les souches du groupe A, particulièrement celles isolées du Colza alors que le cv. Picra permet de distinguer le groupe A du groupe B et même de trouver des sous-groupes à l'intérieur du groupe B. Quelle que soit leur origine biologique, les souches du groupes B se repartissent en deux groupes sur le cv. Picra. Les souches isolées du Colza forment deux groupes : le groupe faiblement agressif qui est majoritaire et le groupe agressif. Les souches du groupe A isolées de la lignée MX ont une distribution plus étalée qui témoigne de la grande variabilité pour leur agressivité sur la lignée MX.

d) Discussion

Les tests de pouvoir pathogène ont été réalisés dans des conditions standardisées pour nous permettre de comparer des essais indépendants. Le type de symptômes induits et leur délai d'apparition varient en fonction du groupe de souches (voir article 1).

Pathogénie des souches du groupe A : La comparaison des génotypes testés vis-à-vis des souches du groupe A met en évidence des différences de sensibilité importantes entre ces génotypes.

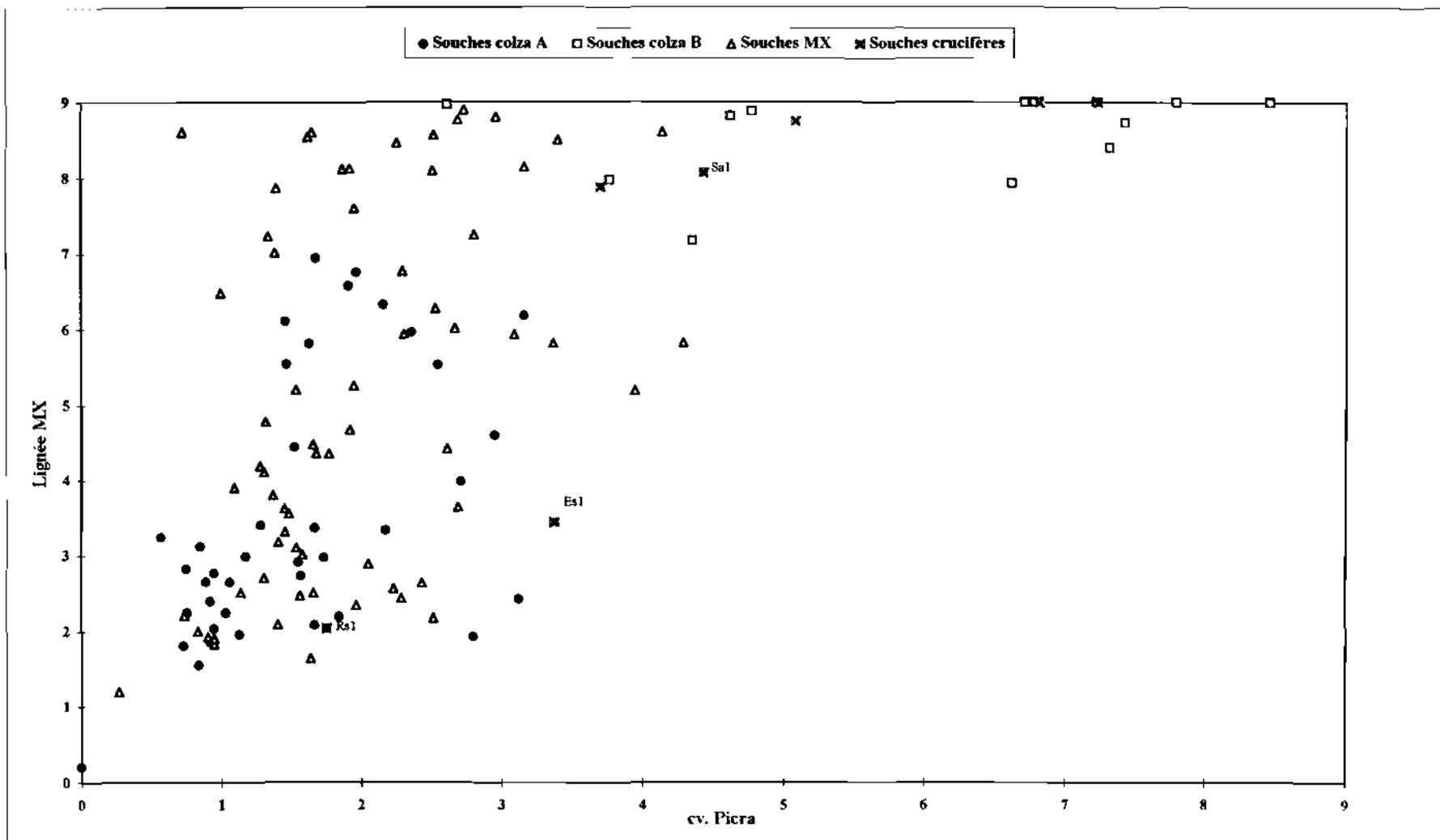


Figure 32 : Analyse comparée du pouvoir pathogène sur le cv. Picra et la lignée MX, des populations de *L. maculans* isolées de la lignée MX, du Colza et d'autres Crucifères adventices et cultivées

Le cv. Westar apparaît le plus sensible tandis que la Moutarde brune cv. Picra confirme sa grande résistance. Les souches diffèrent par leur aptitude à attaquer la lignée MX.

La fréquence des souches virulentes sur la lignée MX est plus importante parmi les populations isolées de MX; les populations isolées du Colza restant majoritairement avirulentes sur cette lignée, quelle que soit l'origine géographique. Il en ressort que le gène de résistance introgressé dans la lignée sélectionnent des souches munies de la virulence nécessaire pour le contourner.

Les souches virulentes sur ce génotype peuvent donc préexister et se maintenir sur les Crucifères adventices et/ou apparaître et se multiplier sous l'effet de la pression de sélection exercée par l'introduction de la nouvelle source de résistance.

Aucune souche virulente sur la Moutarde brune cv. Picra n'a été décelée dans la collection de souches de *L. maculans* provenant du Colza et de la lignée MX en dépit du grand nombre de souches testées. Cette observation semble indiquer que le Colza et la lignée MX ne sélectionnent pas pour la virulence sur la Moutarde brune. Cependant, Salisbury et Ballinger (1993), isolent à partir de résidus de Colza des souches virulentes sur deux cultivars de Moutarde brune. Ces souches, quoique isolées de résidus de Colza, pourraient provenir des champs de Moutarde brune voisins ou des repousses de cette espèce dans la culture car celle-ci est également cultivée en Australie pour son huile. En effet, des souches pathogènes sur la Moutarde brune sont capables de se maintenir sur la Moutarde des champs (ou sanve) comme l'indique nos résultats. **Il semble alors possible que les Crucifères adventices communément rencontrées en France comme la sanve, puissent héberger des souches du groupe A particulièrement aptes à contourner la résistance d'origine Moutarde.**

Pathogénie des souches du groupe B : Notre étude démontre, dans nos conditions expérimentales, que les souches du groupe B sont capables d'induire des symptômes de sensibilité sur les cotylédons du cv. Westar, de la lignée MX et, dans une moindre mesure, du cv. Picra quelle que soit leur origine. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Johnson et Lewis (1994) et Gall *et al.* (1995) qui montrent en outre que les souches du groupe B sont virulentes sur les cotylédons de nombreuses espèces de Crucifères.

La grande sensibilité de la lignée MX vis-à-vis du groupe B montre que le gène de résistance d'origine Moutarde brune introgressé dans la lignée MX s'avère inefficace contre ce groupe de souches. Une explication plausible nous vient du schéma de sélection pour la résistance à *L. maculans*. Les programmes d'amélioration de la résistance du Colza à la Nécrose du collet sont essentiellement dirigés contre les souches du groupe A. Un isolat du groupe A a été utilisé dans la sélection de la lignée MX au stade cotylédonaire et en chambres climatisées. En conditions naturelles, le gène de résistance introgressé dans la lignée a été éprouvé vis-à-vis d'une population

pathogène structurée par le Colza et composée principalement de souches du groupe A. Cette situation pourrait avoir vraisemblablement contribué à la contre-sélection ou la non sélection de la résistance vis-à-vis de ce groupe de souches.

Ne disposant pas des vrais parents de la lignée MX, il nous paraît difficile de mener une discussion approfondie par rapport à leur résistance. Cependant, il se pourrait que le fond génétique du parent Colza soit sensible ou ne permette pas l'expression du gène de la Moutarde brune vis-à-vis de ce groupe B.

Le cv. Picra, à l'opposé des deux autres génotypes, n'est pas sensible à toutes les souches du groupe B et porterait alors des gènes de résistance qu'il conviendrait d'exploiter dans la perspective de sélectionner des variétés à résistance efficace vis-à-vis des deux groupes de souches.

Nos résultats montrent que les souches du groupe B sont capables de se maintenir sur les Crucifères adventices et que ces souches contournent la résistance d'origine Moutarde brune introduite dans le Colza.

IV-CARACTERISATION BIOCHIMIQUE PAR ELECTROPHORESE DES PROTEINES

Les marqueurs biochimiques neutres ont été largement utilisés pour la caractérisation et la classification systématique chez de nombreux microorganismes phytopathogènes (Micales *et al.*, 1992). Les premières applications de la technique d'électrophorèse des protéines à la caractérisation des souches de *L. maculans* sont réalisées par Hill *et al.* (1984) puis Sippell *et al.* (1988). A la suite de ces auteurs, Balesdent *et al.* (1992) différencient au sein de *L. maculans* les deux types de souches A et B sur la base des protéines mycéliennes solubles et des estérases.

Ce critère analytique basé sur les isoestérases, utilisé pour l'étude des souches issues de cv. Picra (chapitre 1), a été également appliqué à la caractérisation des souches faisant l'objet de ce chapitre. Dans cette partie de notre travail, nous avons cherché à appréhender le polymorphisme qui existe chez les deux groupes de souches et à déterminer des profils types utilisables pour des études ultérieures de cartographie des populations de *L. maculans*.

a) Matériel fongique

Il comprend 89 souches et isolats issus de la lignée MX et 51 souches et isolats obtenus du Colza. En plus des souches de référence des sous-groupes NA1 et NA3, nous avons également analysé 10 isolats provenant de Crucifères cultivées et adventices. Enfin des isolats de *Phoma* spp. parasitant d'autres espèces végétales ont fait l'objet d'une analyse biochimique comparative. Parmi les souches isolées de Colza, nous avons analysé cinq souches australiennes agressives sur la

Moutarde brune. Ce matériel, identifié par le préfixe DJB, nous été gracieusement fourni par Dr D. J. Ballinger (Australia, Victoria, Victorian Institute for Dryland Agriculture).

b) Résultats

Dans l'analyse des profils protéiques et enzymatiques, nous appellerons bandes majeures toutes les bandes dont l'intensité de révélation est forte et bandes mineures lorsque celles-ci sont faiblement révélées. Les zones floues se réfèrent aux zones d'activité où aucune bande ne peut être distinctement identifiée.

1) Les phosphoglucose isomérases (PGI) et les protéines mycéliennes solubles

L'analyse des zymogrammes des PGI de 50 souches du groupe A et de 50 souches du groupe B, préalablement déterminées respectivement par la non diffusion et la diffusion de pigment dans le milieu de culture, montrent une bande spécifique à chaque groupe. La bande la plus rapide (bande cathodique) caractérise le groupe A alors que la bande la plus lente (bande anodique) identifie les souches du groupe B (voir article 1, Fig. 2b pour l'illustration).

Les deux isolats 'Thlaspi' (Th164 et Th165), l'isolat de *Phoma wasabiae* (PW) et les souches australiennes présentent des profils distincts entre eux. Les souches australiennes sont identiques au groupe A et l'isolat PW présente la même isozyme que les souches du groupe B (bande lente). Les isolats 'Thlaspi' se caractérisent par une bande plus lente que celle du groupe B.

Deux protéinogrammes types permettent de distinguer les deux groupes de souches en utilisant les souches de référence des groupes A et B (Fig. 33). Les protéinogrammes caractérisés par les bandes majeures de Rf 0,1, 0,34 et 0,47 sont spécifiques du groupe A alors que ceux possédant les bandes de Rf 0,09 et 0,14 identifient le groupe B. Ces protéinogrammes montrent un nombre très important de bandes protéiques et des zones d'activité floues qui rendent difficile l'exploitation approfondie de ces profils. Par conséquent, il serait hasardeux, pour notre part, de tenter une analyse de la variabilité à l'intérieur de chaque groupe sur la base de protéines totales ainsi mises en évidence.

2) Les isoestérases (EST)

Au contraire des protéinogrammes, les zymogrammes se distinguent nettement par la variation dans la coloration des bandes enzymatiques et surtout par le nombre très faible de bandes révélées. La coloration des EST tient compte du substrat utilisé. Nous en avons utilisé deux : α - et

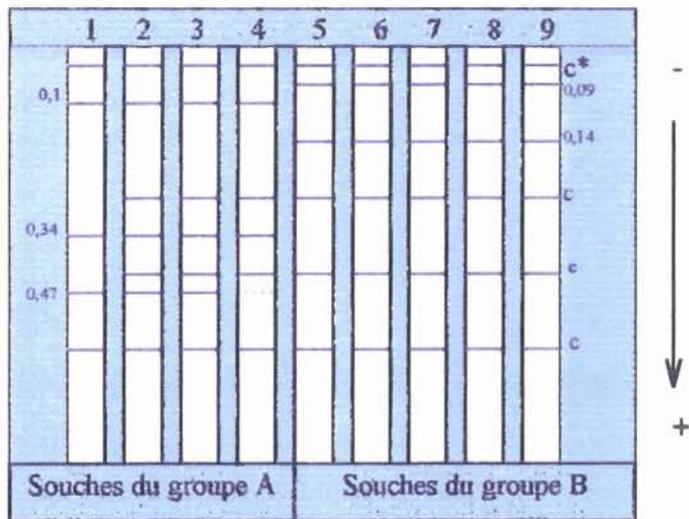


Figure 33: Protéinogrammes des souches du groupe A (puits 1 à 4) et du groupe B (puits 5 à 9). c : Bandes communes aux deux groupes de souches A et B.

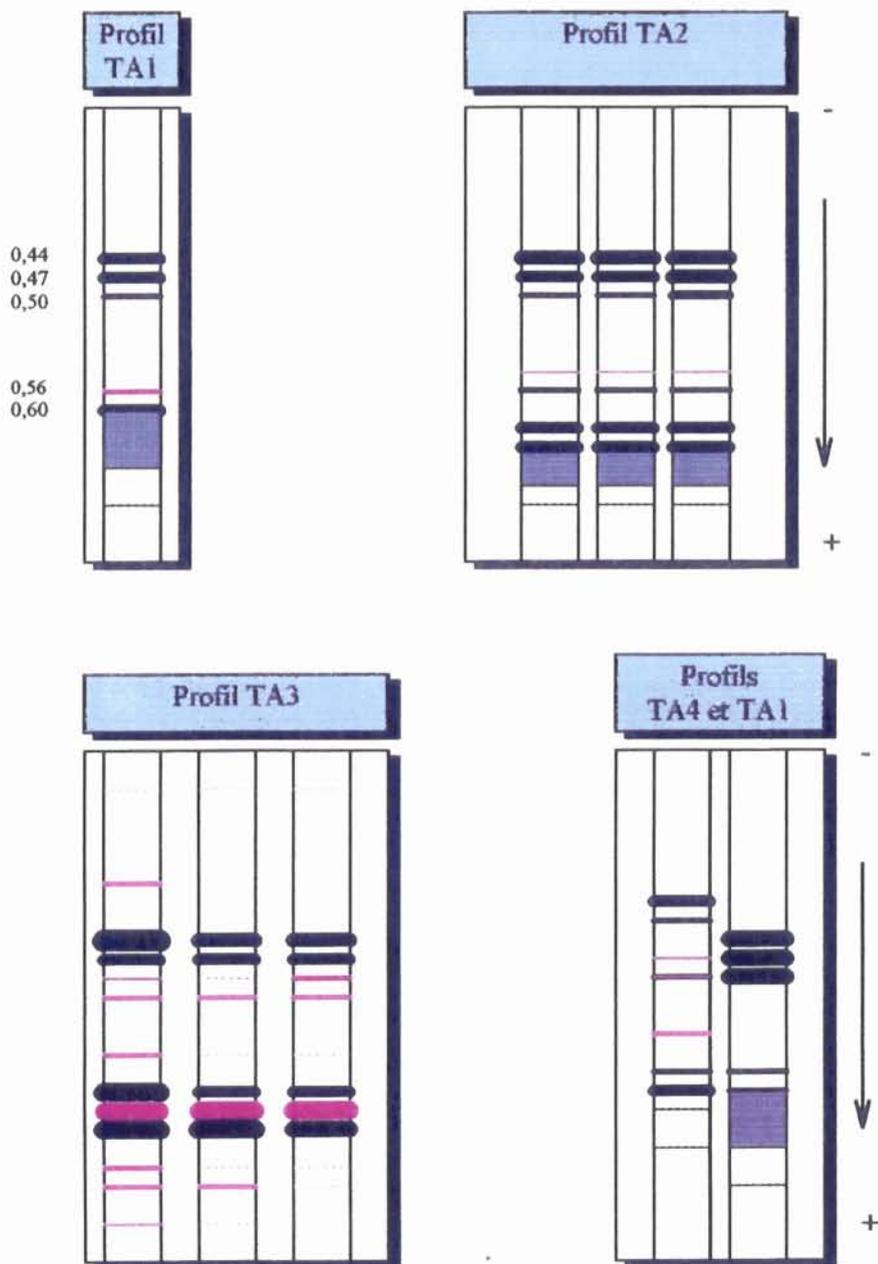


Figure 34 : Profils d'isoestérase caractéristiques des souches du groupe A

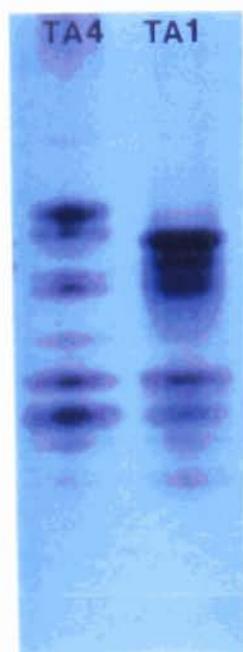
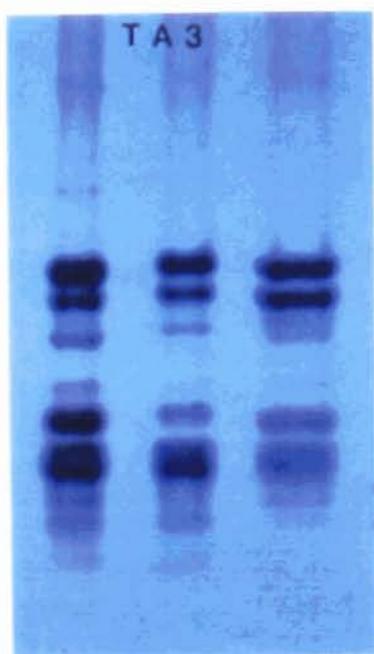
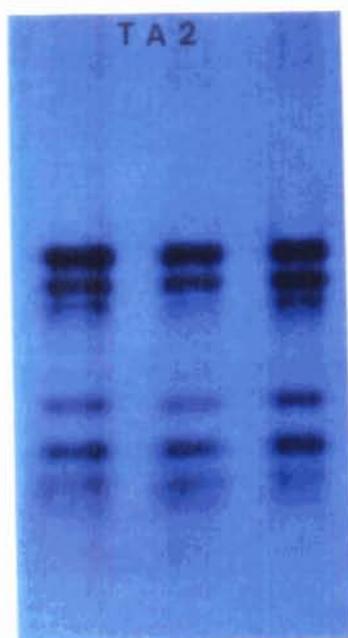
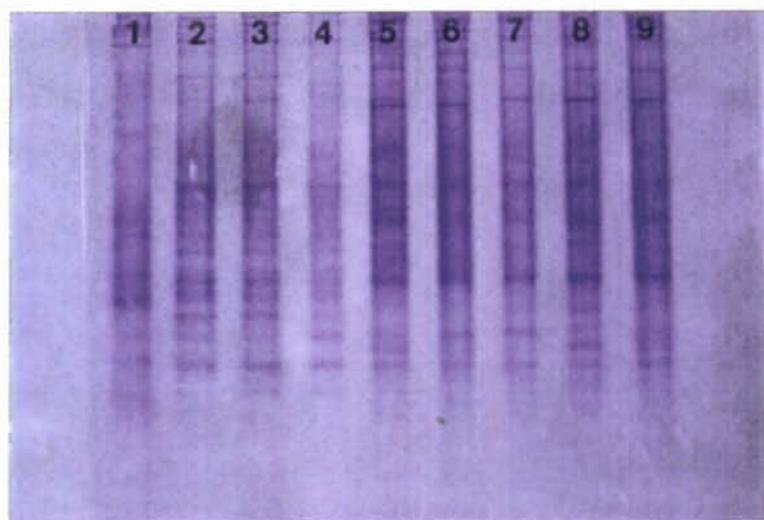


Tableau 20 : Phénotypes isoestérasiqes des souches et isolats du groupe A provenant de la lignée MX.

Codes d'identification	Année d'isolement	Phénotypes isoestérasiqes
Souches monoascosporeés		
R1	1992	TA1
R2	"	TA2
R3	"	"
R4	"	"
R5	"	"
R6	"	"
R7	"	TA1
R8	"	TA3
R9	"	TA2
R10	"	"
R11	"	TA3
R12	"	"
R13	"	"
R14	"	"
R15	"	TA2
R16	"	TA3
R17	"	TA2
R18	"	TA3
R19	"	"
R20	"	"
R21	"	"
R22	"	TA1
R23	"	TA2
R24	"	"
R25	"	"
MX-1	1993	TA3
MX-2	"	TA2
MX-3	"	"
MX1-2	"	"
MX1-3	"	"
MX1-5	"	TA3
MX1-6	"	TA2
MX1-7	"	"
MX1-8	"	"
MX1-9	"	"
MX1-10	"	"
MX1-11	"	"
MX1-12	"	"
MX1-13	"	"
MX1-14	"	"
MX2-1	"	"
MX2-2	"	"
MX2-4	"	"
MX2-5	"	"
MX2-6	"	TA3
MX2-7	"	TA3
MX2-8	"	TA2
MX3-1	"	"
MX3-2	"	"
MX3-3	"	"
MX3-4	"	TA3
MX3-6	"	TA2
MX3-7	"	TA3
MX3-8	"	TA3
MX4-1	"	"
MX4-2	"	TA2
MX4-3	"	TA3
MX4-7	"	"
MX4-8	"	TA2
MX4-9	"	TA3
Isolats pluriconidiens		
RT	1993	TA2
MXC1	1994	"
MXC2	"	"
MX-S	"	"
MX-T1	"	"

β -naphtyl acétates. La réaction entre les EST et le substrat α -naphtyl acétate se révèle par des bandes de coloration verdâtre (α -EST) alors que celle mettant en présence le substrat β -naphtyl acétate donne lieu à des bandes de coloration rose (β -EST). Les bandes de couleur intermédiaire résultent de la réaction simultanée avec les deux substrats (α,β -EST).

Pour les souches du groupe A, 3 à 15 bandes d'EST sont observées selon les souches. Les souches du groupe B produisent 4 à 18 bandes. Chaque groupe se distingue par un profil type commun à toutes les souches. Le profil type du groupe A (TA) comporte les α -EST de Rf 0,44; 0,47; 0,50; et 0,60 et la β -EST de Rf 0,56 (Fig. 34). Pour le groupe B, deux β -EST de Rf 0,37 et 0,58 sont communes à toutes les souches (Fig. 35). La position variable de la α,β -EST anodique permet d'identifier deux profils types B (TB) : TB1 (avec la bande de Rf 0,67) et TB2 avec la bande de Rf 0,63. En dehors des profils types, caractérisés par la stabilité et la reproductibilité des bandes majeures, des variations mineures peuvent affecter l'intensité de la coloration de certaines bandes pour une même souche d'un gel à l'autre. La présence d'EST spécifiques de certaines souches permet d'apprécier la variabilité à l'intérieur de chaque groupe.

● Polymorphisme à l'intérieur du groupe A

Les profils isoestérasiques des souches du groupe A (Fig. 34) présentent une très forte similitude entre eux (87-98 %). Quatre profils distincts sont observés en fonction de la présence et/ou de l'absence de certaines bandes EST. Les souches et isolats analysés peuvent montrer des zymogrammes identiques indépendamment de l'organe et de l'hôte d'origine (Tableaux 20 et 21). Toutefois, le profil TA3 (Tableau 20) est observé chez toutes les souches anglaises et canadiennes. Parmi les souches australiennes, en plus du profil TA2 observé chez quatre souches, nous mettons en évidence un profil particulier TA4 (Fig. 34) qui se distingue des autres profils par la présence de deux β -EST de Rf 0,39 et 0,42 et de deux α -EST de Rf 0,53 et 0,54. Les isolats issus de Crucifères adventices présentent un profil identique (TA2) (Tableau 21). La fréquence des types de profils A est calculée par génotype d'origine (Tableau 22). Dans les populations isolées de la lignée MX, le profil TA2 est le plus commun (63,07 %). Le profil TA1, faiblement représenté en 1992 (4,68 %) est absent des populations isolées à partir de la lignée MX en 1993 et 1994. Parmi les populations isolées de Colza, le profil TA2 est le type majoritaire (82,97 %); TA1 étant très faiblement représenté (4,26 %). La fréquence de TA3 est plus élevée dans les populations isolées de la lignée MX (32,30 %) que dans celles isolées de Colza (10,63 %).

L'analyse comparée des caractéristiques isoenzymatiques et du pouvoir pathogène des souches du groupe A isolées de la lignée MX ne montre aucune relation entre ces deux critères (Fig. 35).

Tableau 21 : Caractéristiques et phénotypes isoestérasiqes des souches et isolats provenant du Colza et d'autres Crucifères cultivées et adventices.

Codes d'identification	Types d'isolats	Origines géographiques	Années d'isolements	Phénotypes isoestérasiqes
Populations isolées du colza				
A290	Souche	Le Rheu	1985	TA2
A314	Isolat	Finistère	"	TA1
A447	"	Canada	1987	TA3
A759	Souche	Delmes	1990	TA2
A764	"	Demanges	"	"
A775	"	Le Rheu	"	"
A813	"	"	"	"
A824	"	Demanges	"	"
A827	"	SW (France)	"	"
A901	"	Allemagne	1992	TA1
A922	"	Deux villes	"	TA2
A923	"	Rigny	"	"
A924	"	Mairy	"	"
A925	"	Tressanges	"	"
A929	Isolat	Canada	1993	TA3
A930	"	"	"	"
A931	"	Angleterre	"	"
A932	"	"	"	"
DJB10	"	Australie	?	TA2
DJB11	"	"	"	"
DJB14	"	"	"	"
DJB18	"	"	"	"
DJB21	"	"	"	TA4
Co1	"	Le Rheu	1993	TA2
Co2	"	"	"	"
Co3	"	"	"	"
Co4	"	"	"	"
Co5	"	"	"	"
Co6	"	"	"	"
Co7	"	"	"	"
Co8	"	"	"	"
Co9	"	"	"	"
Co10	"	"	"	"
Co11	"	"	"	"
Co12	"	"	"	"
Co13	"	"	"	"
Co14	"	"	"	"
Co17	"	"	"	"
Co18	"	"	"	"
Co20	"	"	"	"
Co21	"	"	"	"
Co22	"	"	"	"
Co23	"	"	"	"
Co24	"	"	"	"
Co25	"	"	"	"
Co27	"	"	"	"
Co29	"	"	"	"
Populations isolées de Crucifères cultivées et adventices				
Es1	Isolat	"	1994	TA3
Rs1	"	"	"	TA2
Sa1	"	"	"	"

Tableau 22 : Fréquence des profils types des isoestérases dans les populations du groupe A de *L. maculans* isolées de la lignée MX et de différents génotypes de Colza.

Profils types	Populations isolées de différents génotypes de Colza (47)	Populations isolées de la lignée MX (65)
TA1	4,25	4,68
TA2	82,97	63,07
TA3	10,63	32,30
TA4	2,12	0,00

() : effectif des souches analysées

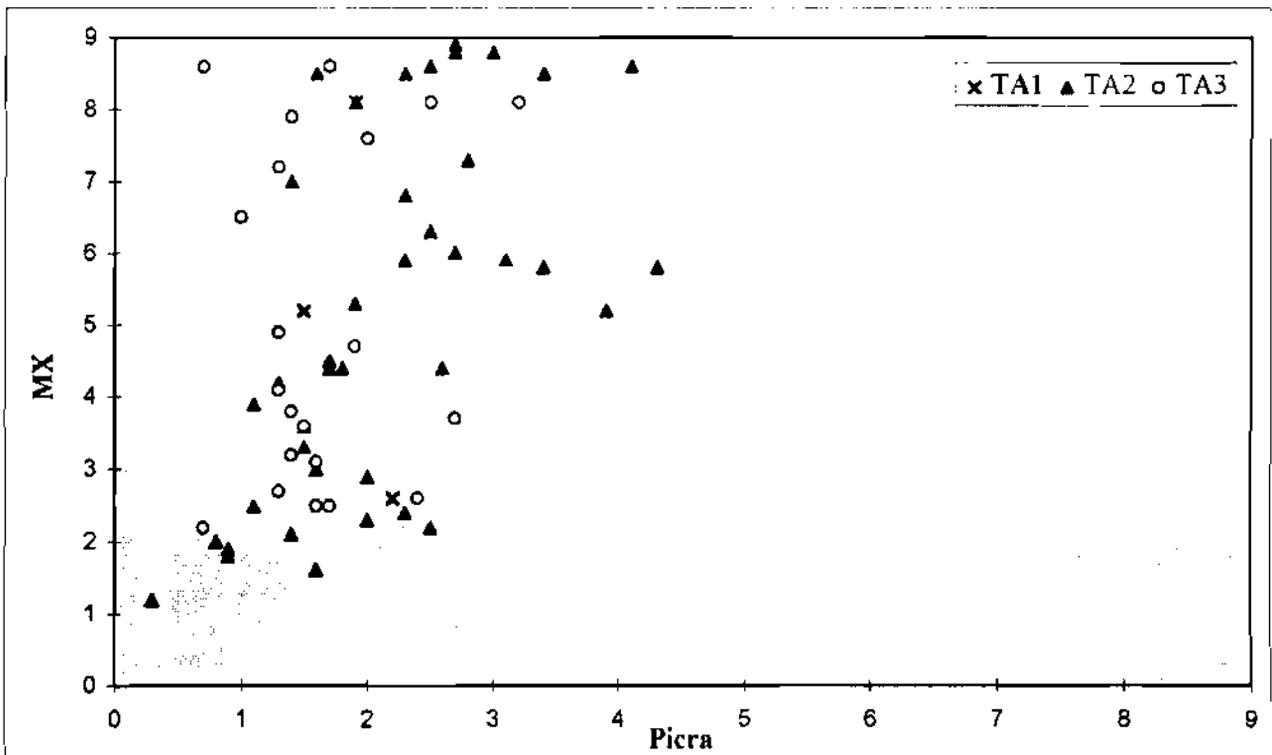


Figure 35 : Relations entre les différents types électrophorétiques (TA1, TA2 et TA3) et le pouvoir pathogène sur la lignée MX et le cv. Picra des souches isolées de la lignée MX.

Tableau 23 : Caractéristiques et phénotypes isoestérasiqes des populations du groupe B isolées de la lignée MX, du Colza et de différentes Crucifères cultivées et adventices.

Codes d'identification	Origines géographiques	Années d'isolement	Phénotypes isoestérasiqes
Souches monoasporées isolées de la lignée MX			
MX-4	Le Rheu	1993	TB7
MX-5	"	"	TB1
MX-6	"	"	"
MX-7	"	"	TB7
MX-8	"	"	"
Isolats pluriconidiens provenant de la lignée MX			
MX-F	Le Rheu	1993	TB7
NMX1-2 ^a	"	1994	TB4
NMX2-1	"	"	TB2
NMX3-2	"	"	TB4
NMX4-2	"	"	TB8
NMX5-1	"	"	TB2
NMX6-1	"	"	"
NMX8-1	"	"	TB5
NMX9-3	"	"	TB4
NMX10-2	"	"	"
NMX11-1	"	"	TB6
NMX13-1	"	"	TB4
NMX13-2	"	"	TB2
NMX13-3	"	"	"
NMX17-4	"	"	TB7
NMX21-1	"	"	TB1
NMX21-2	"	"	TB7
NMX23-3	"	"	TB1
NMX27-2	"	"	"
Isolats et souches monoasporées isolés du Colza			
B867	Dijon	1991	TB1
B908	Lyon	1992	TB7
B980	Pologne	1994	TB1
B981	"	"	"
Isolats et souches isolés de Crucifères cultivées et adventices			
Sa2	Le Rheu	1994	TB1
RBMN	"	"	"
Es2	"	"	"
Rs2	"	"	"
Th164	Canada	?	Th1'
Th165	"	"	"
PW	"	"	'W'
PHW 1270 (NA1)	USA	"	TB1
PHW 1268 (NA3)	"	"	TB3

^a les codes commençant par 'N' identifient des isolats obtenus de symptômes atypiques de noircissements sur les tiges de la lignée MX

② Polymorphisme à l'intérieur du groupe B

Pour les souches de ce groupe, nous observons une grande variabilité des zymogrammes pouvant affecter le nombre d'isoestérases révélées et leurs positions relatives. Par commodité, nous avons inclu les isolats 'Thlaspi' et l'isolat de *Phoma wasabiae* dans le groupe B sur la base de la diffusion de pigments. Ce groupe rassemble par ailleurs les souches de référence NA1 (PHW 1270) et NA3 (PHW 1268) ainsi caractérisées par Koch *et al.* (1991). Parmi toutes ces souches, huit profils isoestérasiques sont révélés (Fig. 36). Nous distinguons 4 sous-groupes :

- 1) les souches caractérisées par les zymogrammes TB1 à TB8
- 2) la souche NA3 caractérisée par le zymogramme TB3
- 3) les deux isolats 'Thlaspi' : Thl64 et Thl65 caractérisés par le zymogramme 'Thl'
- 4) l'isolat de *P. wasabiae* (PW) caractérisé par le zymogramme 'W'

L'analyse des zymogrammes des isolats obtenus à partir de symptômes atypiques (noircissements sur tiges) développés sur la lignée MX met en évidence des profils particuliers (TB2, TB4 à TB6 et TB8) qui semblent spécifiques à ce type de populations de *L. maculans* puisqu'ils ne sont révélés chez aucun isolat et souche monoascosporee isolés de la lignée MX ou du Colza (Tableau 23). Parmi les souches du groupe B, le profil TB1, TB2, TB4 et TB7 sont les plus fréquents sur la lignée MX alors que TB1 serait le seul profil caractérisant les isolats obtenus des autres Crucifères cultivées et adventices. Les isolats issus de Crucifères adventices montrent des profils isoestérasiques similaires à ceux observés pour certaines souches isolées de la lignée MX et du Colza (Tableau 23).

Les isolats 'Thlaspi' se distinguent par un profil 'Thl' qui, *de visu*, regroupe les profils type B1 et type A1 (Fig. 36). Au total, 11 bandes EST sont révélées dont trois β -EST cathodiques et une α -EST anodique. Les bandes EST intermédiaires rappellent le profil type A1 avec toutefois un décalage de la position relative des EST. Six bandes EST sont communes aux isolats 'Thlaspi' et au groupe B. Pour l'isolat PW, au total six bandes EST sont mises en évidence (Fig. 36).

③ Analyse comparée des différentes populations de *Phoma* spp.

Les deux paragraphes précédents ont permis de mettre en évidence un polymorphisme très important chez l'espèce *L. maculans*. Ce polymorphisme interfère-t-il avec certaines espèces du même genre décrites sur d'autres cultures? Une proximité taxinomique peut-elle être observée par les EST? C'est autant d'interrogations qui ont motivé l'acquisition des données analysées dans ce dernier paragraphe.

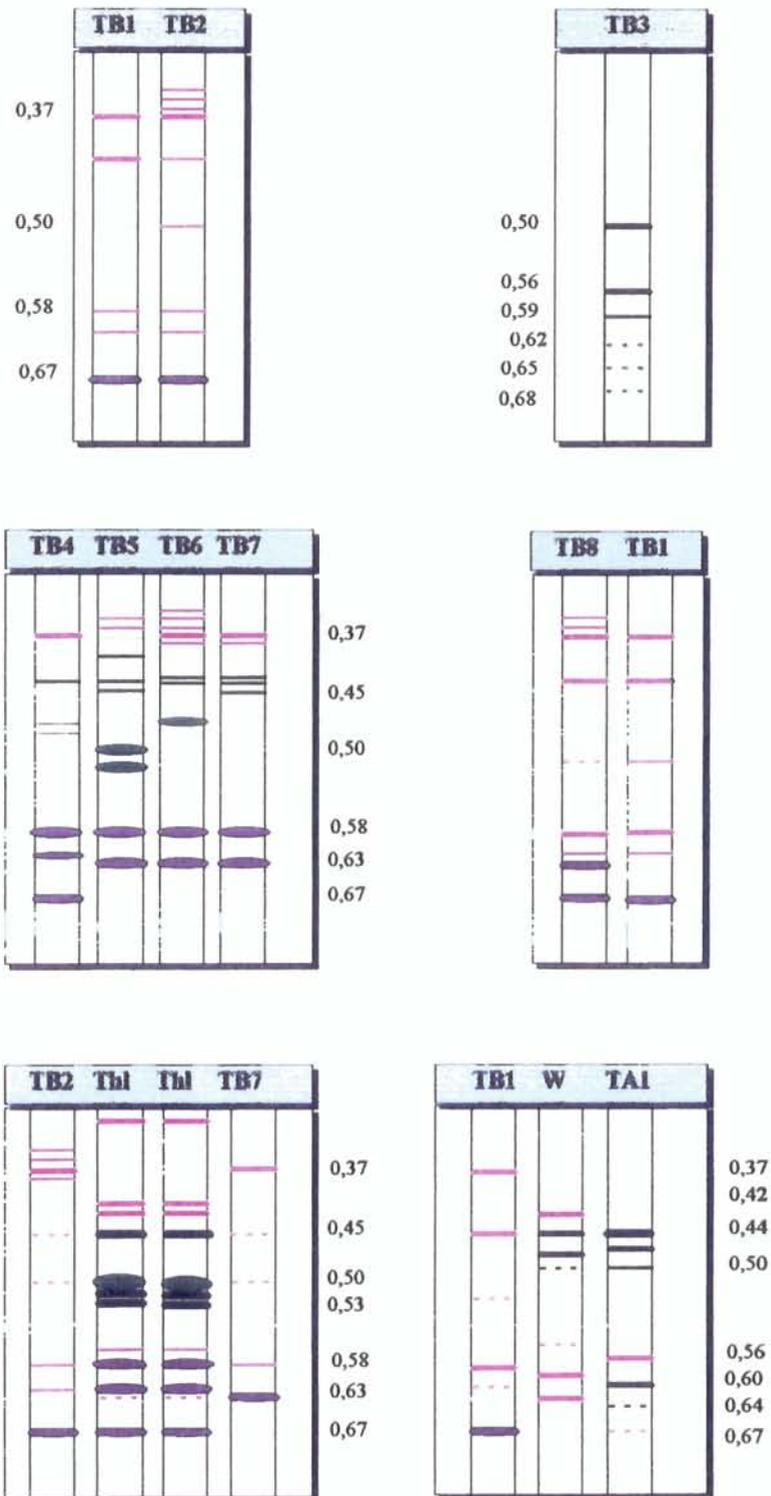
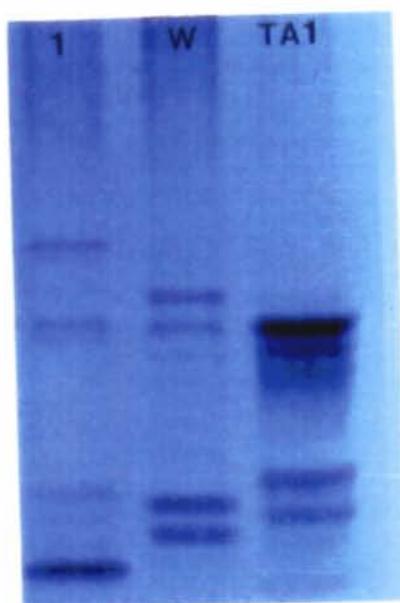
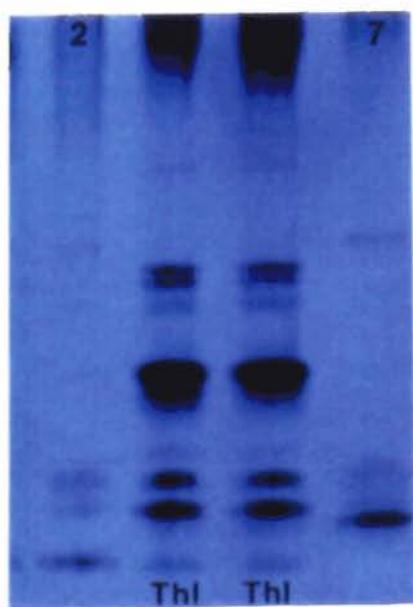
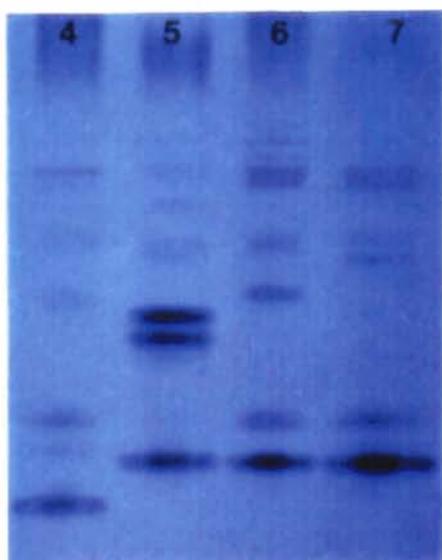
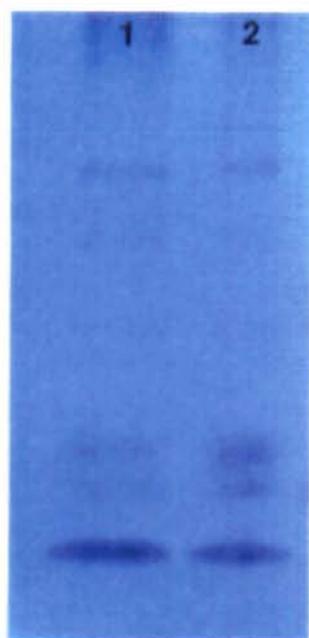


Figure 36 : Profils d'isoestérases caractéristiques des souches du groupe B (TB1 à TB8 et TB3), des isolats 'Thlaspi' (Th1) et de *Phoma wasabiae* (W).



1. *P. exigua* var. *exigua*
2. *P. exigua* var. *lilacis*
3. *Phoma* sp. du *Topinambour*
4. *P. macdonaldii*
5. *P. exigua* var. *foveata*
6. *P. exigua* var. *sambuci-nigrae*
7. *P. exigua* var. *linicola*
8. *P. exigua* var. *inoxydabilis*
9. *P. betae*

TA2 = Profil type du groupe A
 TB1 = Profil type du groupe B
 W = Profil type de *P. wasabiae*

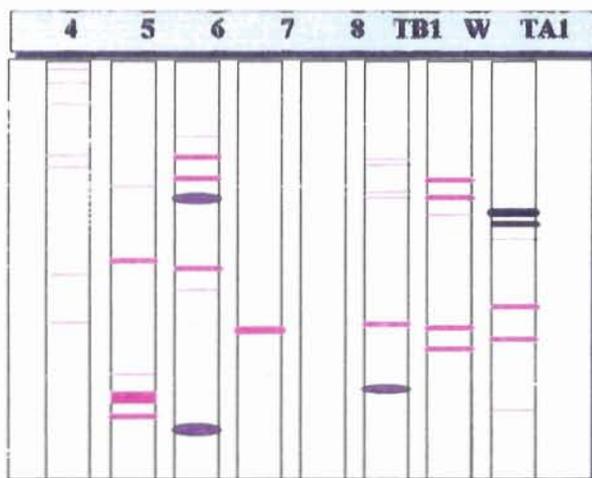
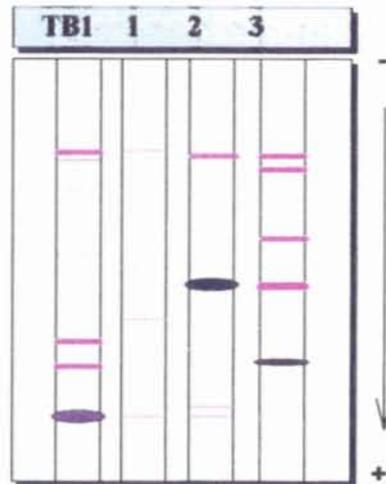
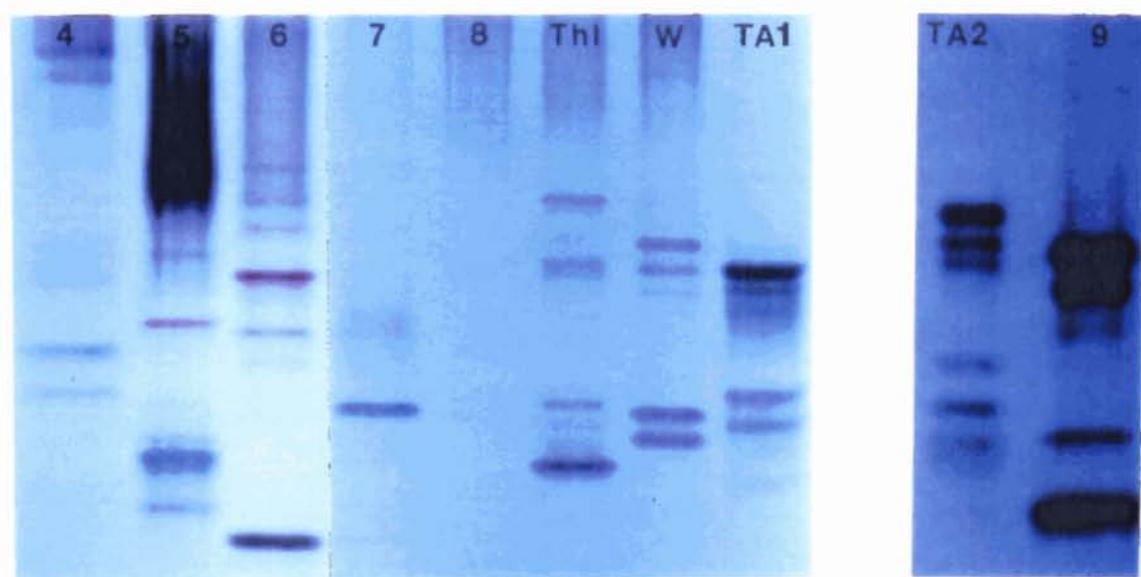
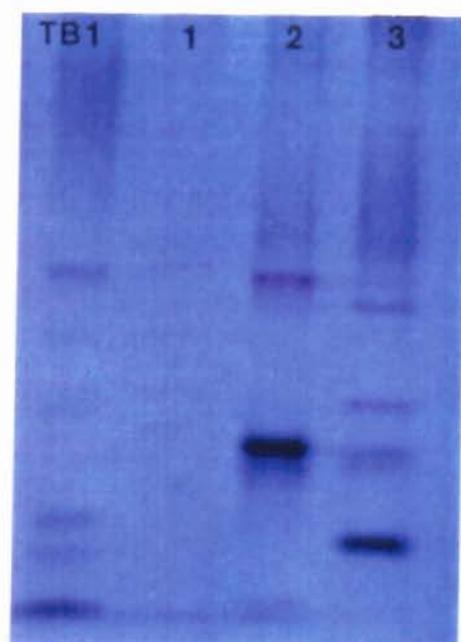


Figure 37 : Profils d'isoestérasés caractéristiques des souches de *Phoma* spp.



Les caractéristiques isoestérasiques des différents groupes évoqués dans les paragraphes ci-dessus sont analysées en comparaison avec des isolats de différentes espèces de *Phoma* :

- 1) *P. exigua* var. *exigua* isolée de la Pomme de terre
- 2) *P. exigua* var. *lilacis* isolée de *Syringa vulgaris*
- 3) *Phoma* sp. isolée du Topinambour
- 4) *P. macdonaldii* isolée du Tournesol (l'isolat nous est fourni par A. Pérez du CETIOM)
- 5) *P. exigua* var. *foveata* isolée de la pomme de terre
- 6) *P. exigua* var. *sambuci-nigrae* isolée de *Sambucus nigra*
- 7) *P. exigua* var. *linicola* isolée du lin
- 8) *P. exigua* var. *inoxidabilis* isolée de la Pervenche
- 9) *P. betae* isolée de la betterave

Chaque espèce de *Phoma* est caractérisée par un profil isoestérasique spécifique (Fig. 37). La présence de quelques bandes EST communes rend compte de la proximité taxinomique de ces espèces. Le profil de l'isolat de *P. betae* se caractérise par cinq β -EST dont la disposition rappelle celle des souches du groupe A avec cependant un décalage de la position relative des bandes.

c) Discussion

L'électrophorèse en conditions non dénaturantes et la révélation des protéines (Protéines totales, PGI et EST) permettent d'obtenir des électrophorégrammes dont l'analyse rend compte d'un certain polymorphisme des populations de *L. maculans*.

L'électrophorèse des protéines totales et des isozymes (PGI et EST) permettent une différenciation sans équivoque des profils caractéristiques des deux groupes de souches de *L. maculans*. Les zymogrammes des PGI sur gels d'amidon montrent une bande spécifique à chacun des deux groupes 'Brassica' (*sensu* Petrie, 1969) indépendamment de leurs origines biologiques ou géographiques. Ils sont corrélés à la diffusion de pigment dans le milieu de culture. La bande la plus rapide (cathodique) caractérise le groupe A alors que la plus lente (anodique) identifie les souches du groupe B. Le groupe 'Thlaspi' constitue une entité distincte des groupes A et B en ce qu'il montre une bande plus lente que celle du groupe B. Cette homogénéité apparente à l'intérieur de chaque groupe de souches n'est pas retrouvée lorsque l'on s'intéresse aux profils des protéines totales et des EST. Les PGI, tout comme le critère cultural (diffusion de pigments), assimilent l'isolat PW au groupe B.

Dans nos conditions expérimentales, et exception faite des nombreuses protéines faiblement colorées, deux et trois bandes protéiques, caractéristiques des deux groupes de souches, sont respectivement observées sur les profils des protéines totales. De nombreuses bandes protéiques communes aux deux groupes A et B confirment leur proximité taxinomique. Balesdent *et al.* (1992) utilisent l'isoélectrofocalisation (IEF) des protéines totales et déterminent des profils caractéristiques des deux groupes A et B. Cependant, le grand nombre de bandes révélées grâce à la capacité de résolution de l'IEF rend difficile l'exploitation des protéinogrammes (Gall *et al.*, 1995).

C'est l'analyse du polymorphisme isoestérasique qui nous a surtout permis d'identifier les profils caractéristiques des principaux groupes de souches composant l'espèce *L. maculans*. En outre ce système discrimine clairement les souches à l'intérieur des groupes.

Le nombre important de souches du groupe A analysées (126) souligne le faible polymorphisme des populations françaises de ce groupe. La situation australienne semble différente en témoigne la souche particulière DJB21. Ce résultat fait état du potentiel de variation phénotypique des souches du groupe A qui reste encore sous-estimé. L'analyse d'un échantillon plus important serait nécessaire pour nous renseigner sur la fréquence de ces phénotypes nouveaux en Australie.

L'examen des zymogrammes des souches du groupe B conforte les données de la littérature faisant état du très grand polymorphisme à l'intérieur de ce groupe. Sur la base des profils RFLP, Koch *et al.* (1991) définissent trois sous-groupes (NA1, NA2 et NA3) génétiquement distants à l'intérieur du groupe B. Parmi les populations que nous avons isolées de la lignée MX et du Colza, nous distinguons deux profils types dont les différences fondamentales reposent sur la position relative de la bande α,β -EST anodique. Aucune souche n'a manifesté le profil type du sous-groupe NA3 alors que le zymogramme de la souche NA1 est mis en évidence dans notre collection de souches. Des résultats similaires sont obtenus par Gall *et al.* (1995). Les auteurs analysent des souches d'origines géographiques diverses et démontrent que seul le sous-groupe NA1 est représenté en France et en Europe. L'apparition du phénotype TA3 (absent des populations isolées du Colza) parmi les populations isolées de la lignée MX serait le résultat d'une adaptation à cette nouvelle source de résistance. L'analyse des populations isolées en 1994 et 1995 permettraient de conforter cette hypothèse.

A l'opposé, une spécificité phénotypique est mise en évidence chez les isolats provenant de *Thlaspi arvense* et d'*Eutrema wasabiae*. Les caractéristiques isoenzymatiques des isolats 'Thlaspi' confirment leur position intermédiaire entre les groupes A et B. Morales *et al.* (1993a) parviennent à la même conclusion et montrent que les profils d'hybridation rapprochent le groupe 'Thlaspi' de l'un des deux groupes A ou B en fonction des sondes utilisées. Sur la base des analyses RFLP, Johnson et

Lewis (1990) parviennent à regrouper une souche 'Thlaspi' avec des souches du groupe A d'origine anglaise. En ce qui concerne nos travaux, les nombreuses EST communes mises en évidence rapprochent le groupe 'Thlaspi' du groupe B ainsi que le montrent Morales *et al.* (1993b). En séquençant les ITS, les auteurs démontrent que le groupe 'Thlaspi' est distinct des groupes A et B et serait plus proche du groupe B (90 et 95 % de similitude pour les ITS1 et 2 respectivement) que du groupe A.

En dépit du faible nombre d'isolats issus de Crucifères adventices, notre étude montre que ces populations sont identiques à celles isolées du Colza. Elle démontre pour la première fois que les plantes adventices constituent des 'réservoirs' potentiels pour les deux groupes de souches de *L. maculans* en France.

Nonobstant la grande variabilité révélée par de nombreuses études à l'intérieur du groupe B, nos travaux montrent que ce groupe forme une entité biologique distincte des autres *Phoma* spp. Une certaine spécificité phénotypique liée à l'hôte d'origine est ainsi mise en évidence chez certaines espèces de *Phoma* comme le montre l'analyse des populations issues de *Thlaspi arvense*, *Eutrema wasabi*, *Beta vulgaris* et d'autres espèces végétales cultivées.

La caractérisation isoestérasiq ue de différentes espèces de *Phoma* souligne l'intérêt de l'électrophorèse pour des études taxinomiques chez ce genre.

CONCLUSION DE LA PREMIERE PARTIE

L'analyse complémentaire des critères culturaux, biologiques et biochimiques s'est avérée une approche méthodologique intéressante pour l'étude des populations de *L. maculans* isolées de la lignée de recombinaison MX, du Colza, de la Moutarde brune et d'autres Crucifères adventices. La diffusion de pigments dans le milieu de culture par les jeunes colonies et le polymorphisme révélé par les PGI et les EST permettent une répartition fiable des souches de *L. maculans* en groupes A et B.

Sur la base de ces critères, nous montrons que les deux groupes de souches A et B sont présents en mélange sur la lignée MX avec une forte prédominance des souches du groupe A.

Quelles que soient leurs origines biologique ou géographique, les souches du groupe B sont agressives sur la lignée MX au stade cotylédonaire. D'une manière générale, il ressort de nos travaux que les souches du groupe A agressives sur la lignée MX sont plus fréquentes et présentent une agressivité plus importante dans les populations isolées de la lignée MX que dans celles isolées du Colza. La mise en évidence de souches agressives sur la lignée MX parmi les souches isolées du Colza apporte la preuve que ces pathotypes préexistent dans les populations du groupe A. *Ces résultats semblent indiquer que les populations de L. maculans évoluent sous la pression de sélection exercée par la résistance d'origine Moutarde brune introduite dans le Colza. Sous réserve que ces souches puissent induire la nécrose du collet (voir troisième partie), il semblerait donc que cette nouvelle source de résistance pourrait ne pas être durable dans des conditions pédoclimatiques favorables à la maladie.*

La mise en évidence exclusive de souches du groupe B dans les populations isolées du cv. Picra est en accord avec nos résultats concernant la sensibilité de ce génotype au stade cotylédonaire vis-à-vis de certaines souches de ce groupe.

La résistance de type hypersensible de la Moutarde brune, mise en évidence au stade cotylédonaire vis-à-vis du groupe A, est corrélée à la résistance totale de ce génotype manifestée au champ pendant la campagne 1992-1993. Cette observation est confortée par l'absence de ce groupe de souches, dans les populations isolées du cv. Picra, lors de la première campagne d'expérimentation au champ (1992-1993).

L'électrophorèse des protéines constitue un outil fiable pour la discrimination entre et à l'intérieur des deux groupes de souches. Les zymogrammes d'isoestérases, de par le faible nombre de bandes révélées et la netteté de celles-ci, différencient efficacement les sous-groupes B. Elles

montrent que les populations isolées des espèces de *Brassica* forment une entité similaire au sous-groupe NA1. Cependant, des isolats foliaires provenant de la Moutarde brune, ainsi que certaines autres souches, présentent des profils enzymatiques particuliers qui laissent supposer que d'autres sous-groupes B sont sélectionnés par cette espèce. Des analyses RFLP pourraient étayer cette hypothèse. Au contraire du groupe B, le groupe A paraît plus homogène quel que soit l'hôte d'origine. Le profil isoestérasique particulier de la souche australienne, non observé parmi les souches européennes et canadiennes, témoignerait du polymorphisme encore sous-estimé à l'intérieur du groupe A. Des analyses complémentaires en utilisant un échantillon plus important de souches australiennes apporteraient des informations sur la fréquence de ce phénotype particulier.

L'observation de phénotypes nouveaux parmi les populations des deux groupes isolées en 1993 et 1994 à partir des résidus de la lignée MX semble également témoigner d'une évolution des populations sur ce génotype.

Notre étude sur les populations de *L. maculans* isolées des Crucifères adventices concernent un nombre limité d'isolats d'origines canadiennes et françaises. Néanmoins, nous montrons que les isolats français sont identiques aux populations inféodées aux espèces de *Brassica* cultivées au regard de leurs caractéristiques culturelles, biologiques et électrophorétiques. L'importance des Crucifères adventices dans l'épidémiologie de la Nécrose du collet est ainsi soulignée. Ces populations apparaissent agressives sur la lignée MX et pourraient compromettre l'efficacité et la durabilité de sa résistance. Prendre en compte la diversité de ces biotypes est indispensable dans la perspective de la sélection du Colza pour une résistance à *L. maculans* efficace et durable. Toutefois, leur rôle effectif dans la manifestation de la nécrose du collet au stade adulte reste à évaluer.

Les isolats 'Thlaspi' et l'isolat de *P. wasabiae* s'apparentent au groupe B par la diffusion de pigments dans le milieu MG et présentent des caractéristiques isoestérasiques spécifiques et distinctes de celles des groupes A et B. Cependant, les isolats 'Thlaspi' combinent les profils types des groupes A et B. Sous réserve du nombre d'isolats analysés, nous n'avons pas obtenu ces types d'isolats parmi les isolats français provenant des Crucifères adventices. Au vu de ces résultats, il serait intéressant d'analyser un échantillon d'isolats plus diversifié afin d'évaluer l'existence éventuelle de ces différents groupes de souches dans les populations françaises adaptées aux Crucifères adventices.

Les critères morphologiques, biologiques et électrophorétiques et d'autres résultats rapportés par ailleurs, confortent l'hypothèse que les deux groupes de *L. maculans* constituent au moins deux espèces différentes. Cependant, des échanges génétiques semblent possibles entre les deux groupes de souches (Taylor *et al.*, 1995).

.....

A l'issue de l'analyse de la variabilité de *L. maculans*, il convient de s'interroger sur le rôle de la reproduction sexuée dans la manifestation de cette grande diversité du champignon. Par ailleurs, les différences génétiques entre les deux groupes de souches correspondent-elles à un isolement sexuel? La réponse à ces questions passe par des études génétiques qui nécessitent de disposer de protocoles adéquats permettant de reproduire la forme sexuée *in vitro* afin d'analyser les tétrades. Pour les souches du groupe A, l'obtention de la forme parfaite est maîtrisée *in vitro*. A l'opposé, pour le groupe B aucune équipe n'est parvenue à reproduire la forme sexuée dans les conditions de laboratoire bien que celle-ci se manifeste en conditions naturelles.

C'est dans ce contexte d'absence totale de connaissances sur la biologie sexuelle du groupe B que nous nous sommes proposé de mettre au point un protocole de croisements des souches de ce groupe et d'étudier le déterminisme génétique de sa forme parfaite.

.....

DEUXIEME PARTIE :
DETERMINISME GENETIQUE DE LA REPRODUCTION SEXUEE
ET CARACTERISATION DE TETRADES NATURELLES DES
GROUPES A ET B DE *L. MACULANS*

INTRODUCTION

Afin de mieux comprendre la biologie de *L. maculans*, de nombreux auteurs ont depuis longtemps cherché à reproduire la forme sexuée *in vitro*. Lacoste (1965) détermine les conditions favorables à la production de périthèces chez de nombreuses espèces du genre *Leptosphaeria* et montre que le milieu 'pailles de graminées' est le milieu le plus adéquat pour la reproduction sexuée chez le groupe A. Il obtient ainsi en un mois des périthèces matures à 18 °C et sous lumière blanche fluorescente alternant avec l'obscurité.

Venn (1979) en Australie puis Boudart (1981) en France démontrent que l'hétérothallisme bipolaire est le déterminisme génétique qui contrôle la reproduction sexuée chez les souches du groupe A. Le premier auteur utilise des souches isolées au hasard qu'il croise deux à deux sur un milieu eau gélosée contenant des fragments de tiges de Colza. Les cultures sont ensuite incubées à 20° C sous lumière fluorescente pendant cinq à sept semaines. Boudart (1981) est le premier auteur à avoir utilisé des tétrades complètes pour déterminer les groupes de compatibilité sexuelle (+ et -) chez *L. maculans*. En s'inspirant des résultats de Lacoste (1965), l'auteur réalise les croisements sur le milieu pailles de blé. Les cultures ainsi réalisées sont incubées à 18 °C sous lumière blanche à raison de 12 h d'éclaircissement par jour pendant 21 jours.

A la suite de ces travaux originaux, Bonman *et al.* (1981) aux USA et Petrie et Lewis (1985) au Canada étudient la compatibilité sexuelle entre des souches de diverses origines biologiques et géographiques et parviennent à démontrer que les mêmes allèles de compatibilité sont présents chez les souches du groupe A indépendamment de leurs origines. La maîtrise de la reproduction sexuée chez le groupe A a permis d'engager des études génétiques du pouvoir pathogène (Ansan-Melayah *et al.*, 1995).

Au contraire des souches du groupe A, les études réalisées *in vitro* sur les souches du groupe B portent essentiellement sur la forme asexuée, bien que des souches du groupe B soient isolées à partir de périthèces développés au champ. Les nombreuses tentatives de reproduire *in vitro* la forme sexuée chez ce groupe se sont soldées par des échecs. Des exemples nous viennent des travaux de Bonman *et al.* (1981), Petrie et Lewis (1985) et Gall (1994). Par ailleurs, ces auteurs ne parviennent pas à croiser *in vitro* les souches du groupe A avec celles du groupe B et en infèrent que ces deux groupes seraient des espèces différentes.

L'obtention de tétrades naturelles du groupe B a motivé l'ensemble de nos investigations visant à :

- déterminer les conditions favorables à la manifestation de la forme sexuée et à analyser le déterminisme génétique impliqué dans la reproduction sexuée de ce groupe (Article 2).

- étudier la variabilité culturelle et biologique à l'intérieur des tétrades dans le but de trouver des marqueurs utilisables pour des études génétiques ultérieures (Chapitre 2).

Chapitre 1 : HETEROTHALLISME BIPOLAIRE ET POLYMORPHISME ESTERASIQUE A L'INTERIEUR ET ENTRE DES TETRADES DU GROUPE B (NON-AGRESSIF) DE *LEPTOSPHAERIA MACULANS*.

Article soumis pour publication dans Mycological Research le 28 février 1996

INTRODUCTION

A l'instar des souches du groupe A, celles du groupe B accomplissent leur cycle sexuel au champ. Les deux groupes de souches peuvent coexister sur le même résidu de Colza. Cependant, le groupe A y est fortement majoritaire. L'absence de différences morphologiques entre les organes sexuels (périthèces, asques et ascospores) rend impossible une identification *a priori* des groupes A et B. Cette situation constitue un frein à l'analyse génétique des tétrades naturelles du groupe B.

A partir de périthèces formés sur la Moutarde brune, nous avons prélevé des asques matures à la loupe binoculaire puis isolé séparément les huit ascospores (tétrade). Quatre tétrades non ordonnées sont ainsi obtenues : trois tétrades du groupe B et une tétrade du groupe A.

Disposant de ce matériel fongique, nous nous sommes investi dans la recherche de conditions favorables à l'obtention des périthèces in vitro à l'intérieur du groupe B. Nous avons par ailleurs étudié le déterminisme génétique de la reproduction sexuée chez ce groupe et cherché à appréhender ses interactions avec le groupe A.

RESUME DE L'ARTICLE 2

Les croisements deux à deux des souches de *L. maculans* isolées de trois asques du groupe B sont réalisés sur des pailles de blé et incubés à 18 °C sous la lumière noire avec une photopériode de 12 h. Dans ces conditions, des souches compatibles produisent des périthèces matures. La culture d'une souche monoascosporee ne produit pas de périthèces. Nous rapportons pour la première fois l'obtention *in vitro* de la reproduction sexuée chez le groupe B. La ségrégation de type 1 : 1 des groupes de compatibilité sexuelle montre que les souches du groupe B sont hétérothalliques avec deux allèles de compatibilité *MAT2-1* et *MAT2-2* au locus *MAT2*. A l'intérieur de deux tétrades du groupe B sur les trois analysées, les zymogrammes d'isoestérases ségrégent de façon mendélienne.

Dans les mêmes conditions d'expérimentation, nous avons également obtenu des périthèces en croisant des souches isolées d'un asque du groupe A avec deux souches de référence (+ et -) du groupe A. Les croisements effectués entre cette tétrade du groupe A et deux souches du groupe B (MAT2-1 et MAT2-2) sont infructueux. Notre étude démontre l'hétérothallisme bipolaire, jusqu'alors supposé, chez le groupe B de *L. maculans*. Elle montre, en outre, que le locus de compatibilité sexuelle est indépendant de celui des isoestérases. L'intérêt de ces deux marqueurs dans des études génétiques des souches du groupe B et les conséquences de ce travail sur la taxinomie de *L. maculans* sont discutés.

Bipolar heterothallism and esterase banding pattern polymorphism within and between B-Group (non-aggressive) tetrads of *Leptosphaeria maculans*

Irénée Somda, Samar Harkous and Hortense Brun

INRA, Station de Pathologie Végétale, Domaine de la Motte, BP 29, F-35650 Le Rheu, France

Heterothallism in B-Group isolates of *L. maculans*

SUMMARY

Pair-wise combinations between three tetrads of the B-Group of *Leptosphaeria maculans* were performed on wheat straws incubated at 18 °C under 12h-photoperiod of black light radiation. Under these conditions, compatible isolates produced mature pseudothecia. This is the first report of the *in vitro* sexual mating within this group. The B-Group tetrads displayed a 1:1 segregation of mating types, indicating that this group is heterothallic with two mating type alleles *MAT2-1* and *MAT2-2* at the locus *MAT2*. Within all the B-Group tetrads but one, the isoesterase electrophoretic types segregated in a 1:1 pattern which was consistent with the Mendelian inheritance. Crosses between individual isolates of an A-Group ascus and two A-Group testers were possible under the same conditions. However, attempts to mate these single-ascus isolates with two B-Group isolates of opposite mating type remained unsuccessful. This work provides evidence for bipolar heterothallism in B-Group isolates of *L. maculans*, and demonstrates that mating type and isoesterase genes are independent. The implications of both markers in genetic studies of B-Group isolates and the consequences of this work in the taxonomy of *L. maculans* are discussed.

Key words: *Brassica*, *Phoma lingam*, weakly virulent isolates, mating types, isozymes.

INTRODUCTION

Blackleg, caused by the filamentous ascomycete *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et de Not., the teleomorph of *Phoma lingam* (Tode ex. Fr.) Desm. is an economically important disease of cruciferous crops throughout the world (CMI, 1991). Populations of *L. maculans* recovered from *Brassica* species fall into two groups referred to as aggressive (A-Group) or non-aggressive (B-Group) isolates. They may be differentiated on the basis of cultural traits (Pound, 1947), pathogenicity (Johnson & Lewis, 1994), isozyme (Hanacziwskyj & Drysdale, 1984; Balesdent *et al.*, 1992), production of sirodesmin (Koch, Badawy & Hoppe, 1989) as well as electrophoretic karyotyping (Taylor, Borgmann & Séguin-Swartz, 1991) and molecular analyses (Johnson & Lewis, 1990; Morales, Pelcher & Taylor, 1993). These results along with the impossibility of intercrossing the isolates (Bonman *et al.*, 1981) provided evidence for considerable genetic differences between the two groups of isolates, leading to the hypothesis that they may constitute two different species (Koch *et al.*, 1991).

The sexual stage of both groups of isolates develop on infected stem stubbles in field conditions (Humpherson-Jones, 1983). The sexual stage of A-Group isolates has been induced in the laboratory, while attempts to cross B-Group isolates *in vitro* has remained up to now unsuccessful (Petrie & Lewis, 1985). The development of a method allowing *in vitro* mating of B-Group isolates is a prerequisite for genetic analysis in this group.

This paper reports a protocol for mating B-Group isolates under laboratory conditions using tetrads (i.e. eight ascospore isolates from an ascus). The present study aimed to 1) determine the genetic control of the sexual mating in B-Group isolates, 2) study the mating relationships between A- and B-Group isolates, and 3) evaluate the within-tetrad variability with respect to isoesterase banding patterns. The significance and relevance of isoesterase and mating type markers for further genetic studies are discussed.

MATERIALS AND METHODS

Fungal material

Three B-Group tetrads designated B1 to B3 and one A-Group tetrad termed A1 were recovered from *B. juncea* cv. Picra and used in this experiment. Tetrads were characterized as belonging to A- and B-Groups according to their cultural traits. The B-Group tetrads originated from different pseudothecia. Asci were dissected and single ascospores were recovered according to the technique described by Mengistu, Rimmer & Williams (1993). Isolates from a single ascus were

assigned a number from 1 to 8 with the prefix indicating the ascus number. These tetrads were not ordered. Two other A-Group isolates recovered from *B. napus* stubbles, and characterized as Mat- (isolate 290) and Mat+ (isolate 827) by Gall *et al.* (1994), were also used as testers in some of the crosses. In our study, the opposite mating type of A-Group isolates were designated *MAT1-1* (290) and *MAT1-2* (827), respectively, according to Yoder, Valent & Chumley (1986).

Mating Protocols

Prior to pairing, isolates were grown separately on V8-juice agar supplemented with streptomycin sulphate ($250 \mu\text{g ml}^{-1}$) for seven days at 20 °C. Agar plugs (5 mm) were then cut from the margin of the colonies and placed about 5 mm apart from the other isolate on the culture medium.

A first experiment aimed to determine the conditions capable of inducing the sexual stage within the tetrad B1 by comparing V8-juice agar and wheat straw media under different environmental conditions. On V8-juice agar, sterilized stem pieces of *B. napus* cv. Westar were placed between the paired isolates. The conditions of incubation were those of Mengistu *et al.* (1993). Autoclaved wheat straws cut into pieces of 40 mm long were inoculated with mycelium plugs of paired isolates as described by Boudart (1981). One set of the isolate combinations was incubated at 18 °C under a 12-h photoperiod of fluorescent light (Sylvania 40 W tubes placed 18 cm above the cultures), while the other was incubated at 18 °C under a 12-h photoperiod of black light radiation with ultraviolet screen (300-400 nm provided by OSRAM L40W/75 lamps placed 40 cm above the tubes). On both media, attempts were made to self the isolate B1.1 and to cross it separately with each of the seven other isolates (B1.2 to B1.8). A pairing of the A-Group testers was included as control.

A second experiment, based exclusively on the wheat straw / black light protocol described above, was performed in order to study the sexual relationships both within and between A- and B-Group isolates. In the first step, each B1 isolate was paired with each of the four following isolates (B1.1, B1.3, B1.4 and B1.7) and pair-wise combinations were performed within the tetrads B2 and B3. In addition, the isolates B3.5 and B3.6 with opposite mating type were paired with each of the eight B2 isolates. In the second step, each isolate from the ascus A1 was paired with the A-Group testers and the B-Group testers (B3.5 and B3.6).

Three replicates were made for all crosses. Crosses were considered fertile when pseudothecia, asci and ascospores were observed in slide preparations of 4-week old cultures under a binocular microscope.

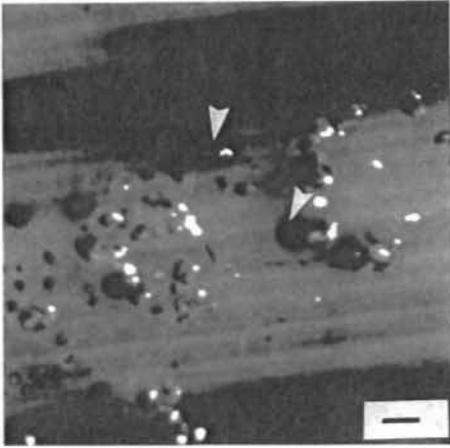


Fig. 38

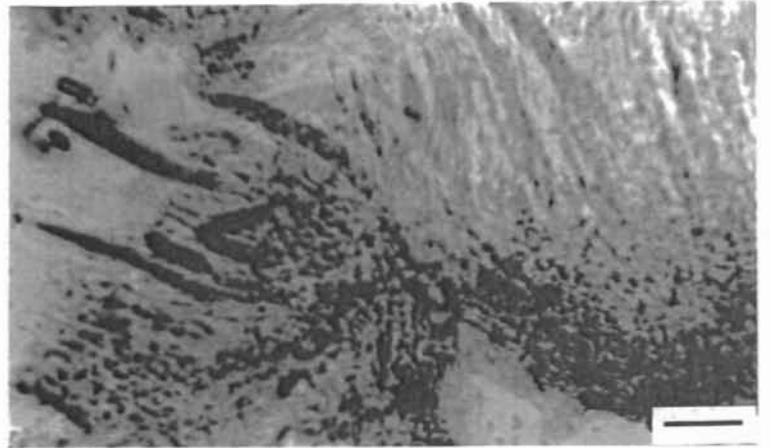


Fig. 39

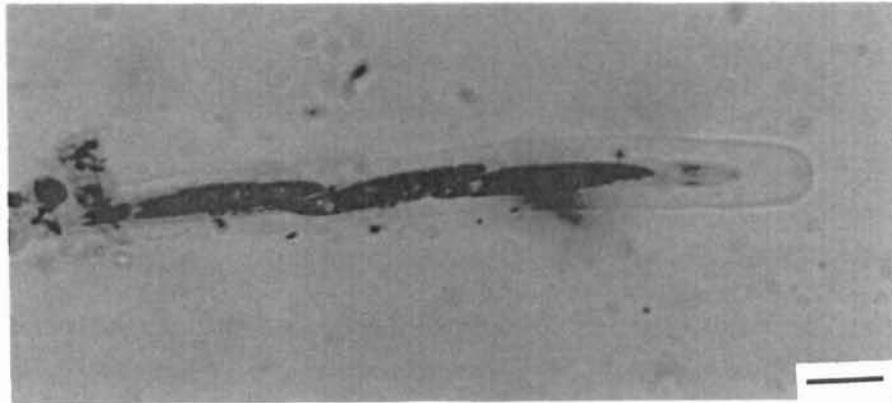


Fig. 40

Figures 38-40 : Sexual organs of B-Group isolates of *Leptosphaeria maculans*.

Figures 38 : Pseudothecia on wheat straws (arrows) (bar, 500 μm).

Figures 39 : Immature asci with paraphyses (bar, 32 μm).

Figures 40 : Ascus containing ascospores (bar, 16 μm).

Photos : I. Somda

Preparation of protein extracts

Five agar plugs were aseptically transferred in a sterile flask containing 100 ml Czapek liquid medium. After 12 days of stationary incubation at 20 °C in the dark, the mycelial mats were collected by vacuum filtration through a Whatman 5.5-cm glass microfibre (GF/A) filter paper, well rinsed with sterile water, frozen and freeze-dried. Proteins were extracted according to the method described by Somé & Tivoli (1993), and stored at -20 °C.

Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

One-way vertical polyacrylamide gel electrophoresis was performed according to Laemmli (1970). The separating gel consisted of 10 % polyacrylamide solution in 1.5 M Tris/HCl buffer (pH 8.8). The stacking gel composition was 3.75 % polyacrylamide solution in 0.5 M Tris/HCl buffer (pH 6.8). After loading each well with 20 µl protein extract, the gels were run at 200 V and 4 °C for 2 h. The α - and β -isoesterase (EST) bands were stained as described by Somé & Tivoli (1993).

RESULTS

Comparison of mating protocols

Crossings performed on the V8-juice agar / stem portion medium did not produce pseudothecia. Only A-Group testers produced mature pseudothecia on wheat straws incubated under white light radiation. Under black light radiation, both A-Group tester cross and some pairings involving B-Group isolates produced mature pseudothecia on wheat straw medium. Crosses B1.1xB1.3, B1.1xB1.4 and B1.1xB1.5 produced mature pseudothecia, asci and ascospores (Figs 38-40). The mating types *MAT2-1* and *MAT2-2* were assigned to the B-Group compatible isolates.

Crossings between B-Group isolates

Pseudothecia were not found in single isolate cultures. Mating between B1 isolates yielded 11 fertile crosses and enabled two groups of four isolates to be distinguished (Table 24, a). Of the 36 pair-wise combinations within each tetrad B2 and B3, only eight crosses produced pseudothecia (Table 24, b & c). Such sexual organs were also produced when the isolates B3.5 and B3.6 with opposite mating type were crossed with B2 isolates (Table 24, b). This result supported the occurrence of identical mating groups in two tetrads from two pseudothecia.

Table 24. Mating type determination between isolates from asci B1, B2, B3 and A1

a) B1

Isolates	B1.1	B1.2	B1.3	B1.4	B1.5	B1.6	B1.7	B1.8
B1.1	-	-	+	+	+	+	-	-
B1.3		+	-	-	-	-	+	-
B1.4		+		-	-	-	+	+
B1.7		-			+	+	-	-
Σ fc	0	2	1	1	2	2	2	1

b) B2

Isolates	B2.1	B2.2	B2.3	B2.4	B2.5	B2.6	B2.7	B2.8
B2.1	-	+	+	-	+	-	+	-
B2.2		-	-	+	-	+	-	-
B2.3			-	-	-	-	-	-
B2.4				-	+	-	+	-
B2.5					-	-	-	-
B2.6						-	-	-
B2.7							-	-
B2.8								-
Σ fc	0	1	1	1	2	1	2	0
B3.5	+	-	-	+	-	+	-	-
B3.6	-	+	+	-	-	-	+	-

c) B3

Isolates	B3.1	B3.2	B3.3	B3.4	B3.5	B3.6	B3.7	B3.8
B3.1	-	-	-	-	+	-	-	-
B3.2		-	+	-	-	+	-	+
B3.3			-	+	+	-	-	-
B3.4				-	-	-	-	-
B3.5					-	+	-	-
B3.6						-	-	-
B3.7							-	+
B3.8								-
Σ fc	0	0	1	1	2	2	0	2

d) A1

Isolates	A1.1	A1.2	A1.3	A1.4	A1.5	A1.6	A1.7	A1.8
290	-	-	+	+	+	-	+	-
827	-	+	-	-	-	-	-	+
B3.5	-	-	-	-	-	-	-	-
B3.6	-	-	-	-	-	-	-	-

+, - = fertile, sterile cross, Σ fc = sum of fertile crosses

Crossings within A-Group isolates and between A- and B-Group isolates

Of 16 crosses involving the tetrad A1 and the two A-Group testers, six crosses were fertile, on the other hand attempts to cross A1 isolates with the isolates B3.5 and B3.6 remained unsuccessful (Table 24, d).

Mature pseudothecia of B-Group isolates were dark and globose (Fig. 38) with sometimes shorter necks as reported by Mengistu *et al.* (1993) in A-Group. They were hard to the touch while pycnidia were soft and brown to black with longer necks. Asci and ascospores were morphologically identical to those of A-group isolates. The number of pseudothecia formed could vary from one to 20 per replicate and per cross (data not shown). Moreover, different levels of maturity of pseudothecia could be observed within a given cross. In some crosses, isolates expected to mate did not.

Esterase polymorphism

Seven to eight EST bands per isolate were observed in B-Group tetrads (Fig. 41). Since EST polymorphism only affected the anodal bands, the electrophoretic type with the faster anodal band was designated ETB1, while that characterized by the slower anodal band was termed ETB2 (Fig. 41). The tetrad A1 displayed a single EST pattern termed ETA (Fig. 42).

The tetrads B2 and B3 segregated in 4:4 ratio of ETB1:ETB2, but the tetrad B1 segregated in 5:3 ratio (Table 25). In the tetrad B1, 2:2 and 1:3 re-partition of ETB1:ETB2 were observed in MAT2-1 and MAT2-2 groups, respectively. The unequal re-partition was also found in both mating groups of the tetrad B2, whereas a 2:2:2:2 segregation of the ETB was observed in the tetrad B3 (Table 25). The combination of the mating type and EST markers allowed the identification of twin isolates in the tetrads B1 and B3.

DISCUSSION

Pairings between B-Group single-ascus isolates of *Leptosphaeria maculans* produced mature pseudothecia on the wheat straw medium under black light radiation as did those between A-Group tester isolates. The light conditions may be a key factor for the induction of the perfect stage in B-Group, since the B-Group isolates did not mate under the fluorescent light. In some instances, crosses involving compatible isolates failed to mate or produced various amounts of pseudothecia.

This variation in fertility of crosses was also observed in the A-Group isolates (Venn, 1979; Petrie & Lewis, 1985). In *Pyrenopeziza brassicae* (Ilott, Ingram & Rawlinson, 1984) and *Phaeosphaeria nodorum* (Halama & Lacoste, 1991) unexpected sterile crosses were also reported.

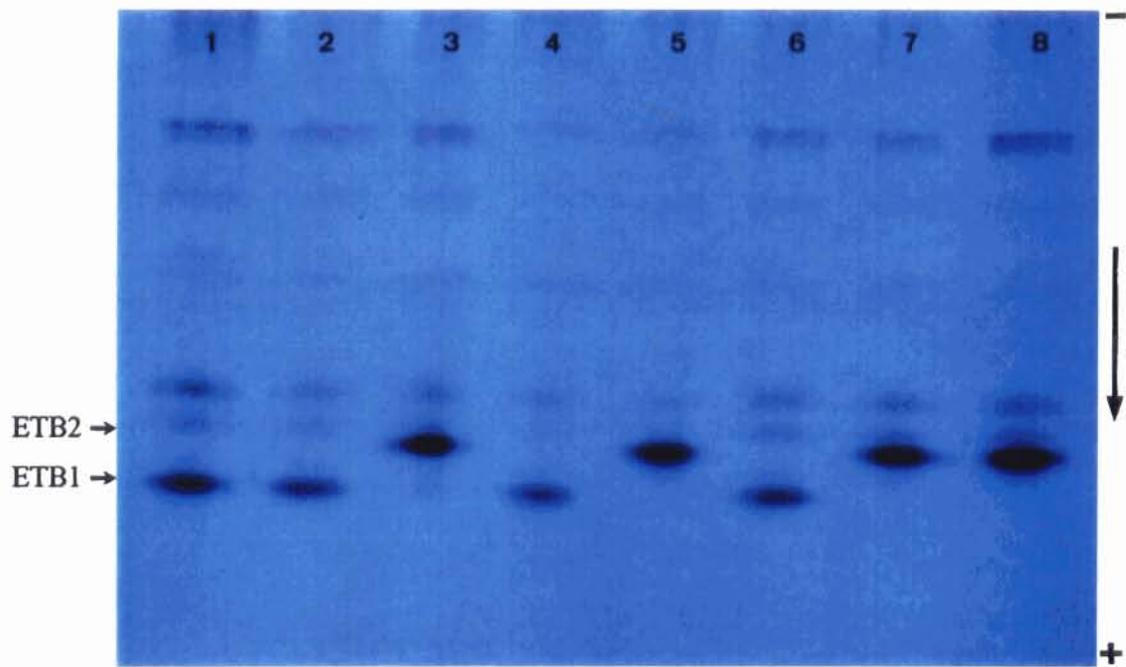


Figure 41 : Isoesterase banding patterns of B-Group tetrad B2.

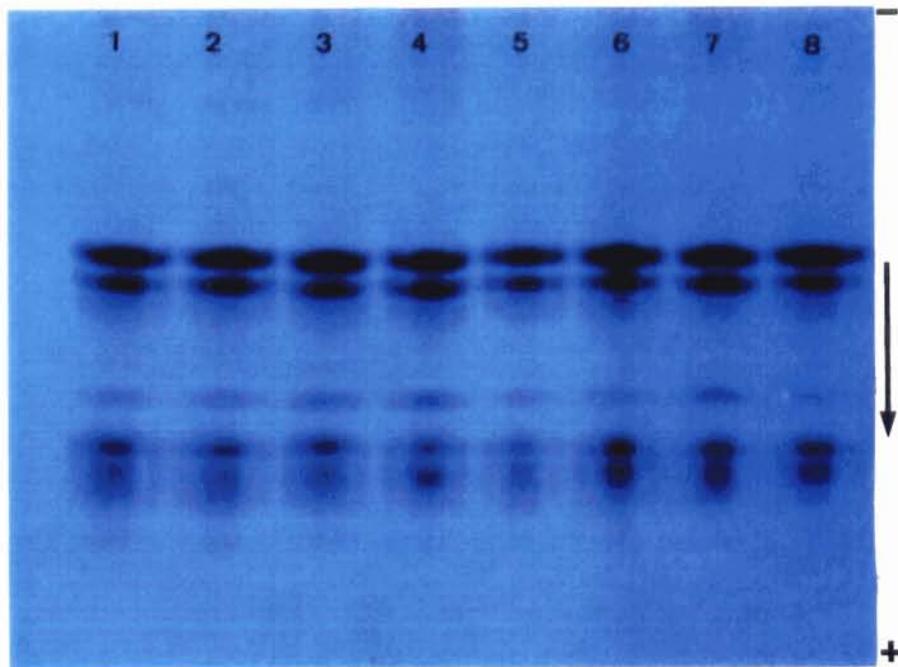


Figure 42 : Isoesterase banding patterns of the A-Group tetrad A1. (Photos : I. Somda)

Table 25. Mating types and isoesterase (EST) banding patterns of *Leptosphaeria maculans* isolates

Isolates	Mating types	EST patterns ^a	Twin ascospores ^b
A-Group isolates			
A1.1	<i>MAT1-1</i>	ETA	?
A1.2	<i>MAT1-1</i>	ETA	?
A1.3	<i>MAT1-2</i>	ETA	?
A1.4	<i>MAT1-2</i>	ETA	?
A1.5	<i>MAT1-2</i>	ETA	?
A1.6	<i>MAT1-1</i>	ETA	?
A1.7	<i>MAT1-2</i>	ETA	?
A1.8	<i>MAT1-1</i>	ETA	?
290	<i>MAT1-1</i>	ETA	
827	<i>MAT1-2</i>	ETA	
B-Group isolates			
B1.1	<i>MAT2-1</i>	ETB2	1
B1.2	<i>MAT2-1</i>	ETB2	1
B1.3	<i>MAT2-2</i>	ETB2	?
B1.4	<i>MAT2-2</i>	ETB2	?
B1.5	<i>MAT2-2</i>	ETB2	?
B1.6	<i>MAT2-2</i>	ETB1	?
B1.7	<i>MAT2-1</i>	ETB1	2
B1.8	<i>MAT2-1</i>	ETB1	2
B2.1	<i>MAT2-2</i>	ETB1	?
B2.2	<i>MAT2-1</i>	ETB1	?
B2.3	<i>MAT2-1</i>	ETB2	?
B2.4	<i>MAT2-2</i>	ETB1	?
B2.5	<i>MAT2-1</i>	ETB2	?
B2.6	<i>MAT2-2</i>	ETB1	?
B2.7	<i>MAT2-1</i>	ETB2	?
B2.8	<i>MAT2-2</i>	ETB2	?
B3.1	<i>MAT2-2</i>	ETB1	1
B3.2	<i>MAT2-1</i>	ETB2	3
B3.3	<i>MAT2-2</i>	ETB2	2
B3.4	<i>MAT2-1</i>	ETB1	4
B3.5	<i>MAT2-1</i>	ETB2	3
B3.6	<i>MAT2-2</i>	ETB2	2
B3.7	<i>MAT2-1</i>	ETB1	4
B3.8	<i>MAT2-2</i>	ETB1	1

^aETA is the electrophoretic type of A-Group isolates and ETB1 and 2 represent those of B-Group isolates

^bTwin ascospores share the same numeral, ? indicates that twin ascospores cannot be identified.

This lack of fertility may be due to the presence of other compatibility factors (Venn, 1979; Halama & Lacoste, 1991), or a longer delay before mating.

Single isolate cultures and crossing isolates from the same mating group did not produce pseudothecia nor pseudothecia-like structures. This result along with the 1:1 segregation of the mating type provide strong evidence for bipolar heterothallism as the mating system in B-Group isolates of *L. maculans*. Successful crosses involving the tetrad B2 and the B3 isolates with the opposite mating type suggest that the same mating alleles may occur in different B-Group tetrads recovered from the same host. Owing to the extensive genetic diversity within B-Group isolates as revealed by molecular markers (Koch *et al.*, 1991), mating tests are important to determine whether the isolates originating from different regions and different cruciferous crops may constitute different mating populations, as found in *Gibberella fujikuroi* (Leslie, 1991).

The successful sexual mating between the A-Group isolates originating from *B. juncea* and *B. napus* observed in this study indicates that identical mating groups do occur in these populations. Therefore, the potential for sexual recombination to generate novel pathotypes with increasing level of pathogenic variation cannot be overlooked.

Finally, the failure of A- and B-Group isolates to intercross in our mating experiments is in agreement with previous reports of Bonman *et al.* (1981) and Gabrielson (1983). This result may suggest that mating loci and alleles are distinct and corroborates assignation of loci *MAT1* and *MAT2* to these groups, respectively, according to the genetic nomenclature proposed by Yoder *et al.* (1986). The failure to obtain hybrid organs between the two groups of isolates with opposite mating type even though sexual matings were observed within each group is likely to be due to genetic factors, since both groups produce pseudothecia under the same environmental conditions. The inter-group mating failure together with the specific isoesterase and cultural phenotypes obtained in this study could be an additional argument supporting the hypothesis that A- and B-Groups do represent different species, since considerable genetic differences were also reported by Koch *et al.* (1991). Similar intersterility was reported between single-ascospore isolates of the two varieties *acuformis* and *herpotrichoides* of *Pseudocercospora herpotrichoides* (Moreau & Maraite, 1995). The authors postulated that these varieties could be expected to be genetically isolated. Due to the limited number of the crosses analysed, our study does not provide an absolute demonstration of this hypothesis. Therefore, many more mating experiments are needed, in particular between isolates originating from different regions and different crucifer species, in order to check the possibility of additional mating groups. Indeed, among isolates of the heterothallic ascomycete *Magnaporthe grisea*, Notteghem & Silué (1992) identified the two mating types in two African locations and failed

to mate these isolates of opposite mating type. It is likely that other incompatibility genes occur in these pathogen populations.

In addition to mating type markers, EST were used to study the extent of genetic variation both within and between A-Group and B-Group tetrads. The polymorphism of EST banding patterns corroborates previous reports on the great variation of B-Group isolates as revealed by isozyme markers (Balesdent *et al.*, 1992) and supports the distinction between A- and B-Group isolates. The 4:4 re-partition of ETB1 and ETB2 in the tetrads B2 and B3 was consistent with a Mendelian segregation and suggests that EST are controlled by a single gene. Within an ascus, the two ETB occurred in the isolates from the same mating group indicating that mating type and EST loci are independently segregated. This finding was also reported in A-Group isolates by Gall *et al.* (1994) using acid phosphatase analysis. The abnormal 3:1 re-partition of ETB in tetrads B1 and B2 might be due to a mutation, which may have affected an EST allele of one of the twin isolates after meiosis. Crosses between well characterized isolates and analyses of progenies will enable this hypothesis to be confirmed. Using pulsed-field gel electrophoresis, Plummer & Howlett (1993) identified the twin ascospores within A-Group tetrads according to their electrokaryotypes, indicating that chromosome length polymorphism occurs in *L. maculans*. Further studies are needed to prove the reliability of this technique for genetic studies of the B-Group isolates of *L. maculans*.

Since B-Group sexual organs are commonly isolated from field stubbles, then sexual reproduction may play an important role in the generation of new pathotypes which could become abundant and damaging for rapeseed crops. This first report of a procedure for crossing the B-Group isolates in the laboratory will hopefully contribute to an assessment of the occurrence of such pathogenic variation.

We wish to express our sincere acknowledgements to Dr A. M. Chèvre, Dr D. Andrivon, Dr M. Renard and Dr J. Brace for their critical reading of this manuscript. We thank A. Buisson and S. Levivier for their assistance in taking some of the photographs. This study is supported partially by a grant from CETIOM, and AIP-INRA "Etude de la co-évolution des populations végétales domestiquées face à leurs agents pathogènes ou ravageurs".

REFERENCES

- Balesdent, M. H., Gall, C., Robin, P. & Rouxel, T. (1992). Intraspecific variation in soluble mycelial protein and esterase patterns of *Leptosphaeria maculans* French isolates. *Mycological Research* **96**, 677-684.
- Bonman, J. M., Gabrielson, R. L., Williams, P. H. & Delwiche, P. A. (1981). Virulence of *Phoma lingam* to cabbage. *Plant Disease* **65**, 865-867.

- Boudart, G. (1981). Modalités de l'attaque parasitaire des crucifères par *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et de Not. (f.c. *Phoma lingam*) agent de la nécrose du collet. Déterminisme moléculaire du pouvoir pathogène. Thèse de Docteur en Sciences Naturelles, Université Science et Technologie de Lille, France.
- CAB International Mycological Institute. (1991). Map 73 in : Distribution maps of plant diseases. 5th ed.
- Gabrielson, R. L. (1983). Blackleg disease of crucifers caused by *Leptosphaeria maculans* (*Phoma lingam*) and its control. *Seed Science Technology* **11**, 749-780.
- Gall, C., Balesdent, M. H., Robin, P. & Rouxel, T. (1994). Tetrad analysis of acid phosphatase, soluble protein patterns, and mating type in *Leptosphaeria maculans*. *Phytopathology* **84**, 1299-1305.
- Halama, P. & Lacoste, L. (1991). Déterminisme de la reproduction sexuée de *Phaeosphaeria* (*Leptosphaeria*) *nodorum*, agent de la septoriose du blé. I. Hétérothallisme et rôle des microspores. *Canadian Journal of Botany* **69**, 95-99.
- Hanacziwskyj, P. & Drysdale, R. B. (1984). Cultural and biochemical characterization of isolates of *Leptosphaeria maculans* varying in pathogenicity. *Aspects of Applied Biology* **6**, 387-397.
- Humpherson-Jones, F. M. (1983). Pathogenicity studies on isolates of *Leptosphaeria maculans* from Brassica seed production crops in south-east England. *Annals of Applied Biology* **103**, 37-44.
- Illott, T. W., Ingram, D. S. & Rawlinson, C. J. (1984). Heterothallism in *Pyrenopeziza brassicae*, cause of light leaf spot of Brassicas. *Transactions of British Mycological Society* **82**, 477-483.
- Johnson, R. D. & Lewis, B. G. (1990). DNA polymorphism in *Leptosphaeria maculans*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **37**, 417-424.
- Johnson, R. D. & Lewis, B. G. (1994). Variation in host range, systemic infection and epidemiology of *Leptosphaeria maculans*. *Plant Pathology* **43**, 269-277.
- Koch, E., Badawy, H. M. & Hoppe, H. H. (1989). Differences between aggressive and non-aggressive single sporelines of *Leptosphaeria maculans* in cultural characteristics and phytotoxin production. *Journal of Phytopathology* **124**, 52-62.
- Koch, E., Song, K., Osborn, T. C. & Williams, P. H. (1991). Relationship between pathogenicity and phylogeny based on restriction fragment length polymorphism in *Leptosphaeria maculans*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **4**, 341-349.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Leslie, J. F. (1991). Mating populations in *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* section *Liseola*). *Phytopathology* **81**, 1058-1060.
- Maraite, H. & Moreau, J. M. (1995). Bipolar heterothallism in *Tapesia yallundae* for the two varieties of the anamorph *Pseudocercospora herpotrichoides*. *Mycological Research* **99**, 76-80.
- Mengistu, A., Rimmer, R. & Williams, P. H. (1993). Protocols for *in vitro* sporulation, ascospore release, sexual mating, and fertility in crosses of *Leptosphaeria maculans*. *Plant Disease* **77**, 538-540.
- Morales, V. M., Pelcher, L. E. & Taylor, J. L. (1993). Comparison of the 5.8s rDNA and internal transcribed spacer sequences of isolates of *Leptosphaeria maculans* from different pathogenicity groups. *Current Genetics* **23**, 490-495.
- Notteghem, J. L. & Silué, D. (1992). Distribution of the mating type alleles in *Magnaporthe grisea* populations pathogenic on rice. *Phytopathology* **82**, 421-424.

- Petrie, G. A. & Lewis, P. A. (1985). Sexual compatibility of isolates of the rapeseed blackleg fungus *Leptosphaeria maculans* from Canada, Australia, and England. *Canadian Journal of Plant Pathology* **7**, 253-255.
- Pound, G. S. (1947). Variability in *Phoma lingam*. *Journal of Agricultural Research* **75**, 113-133.
- Plummer, K. M. & Howlett, B. J. (1993). Major chromosome length polymorphisms are evident after meiosis in the phytopathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. *Current Genetics* **24**, 107-113.
- Somé, A. & Tivoli, B. (1993). *Fusarium* spp. from potato : polymorphism of esterase phenotypes on polyacrylamide gel electrophoresis. *Agronomie* **13**, 637-649.
- Taylor, J. L., Borgmann, I. & Séguin-Swartz, G. (1991). Electrophoretic karyotyping of *Leptosphaeria maculans* differentiates highly virulent from weakly virulent isolates. *Current Genetics* **19**, 273-277.
- Venn, L. A. (1979). The genetic control of sexual compatibility in *Leptosphaeria maculans*. *Australian Journal of Plant Pathology* **8**, 5-6.
- Yoder, O. C., Valent, B. & Chumley, F. (1986). Genetic nomenclature and practice for plant pathogenic fungi. *Phytopathology* **76**, 383-385.

Chapitre 2 : VARIABILITE CULTURALE ET BIOLOGIQUE DES TETRADES DES GROUPES A ET B ISOLEES DE *BRASSICA JUNCEA* CV. PICRA

I-INTRODUCTION

La recherche de marqueurs fiables permettant l'analyse des descendances constitue un préalable aux études génétiques. Chez *Phaeosphaeria nodorum*, Halama et Lacoste (1991) montrent que le groupe de compatibilité sexuelle présente une corrélation avec la vitesse de croissance mycélienne des souches. Les auteurs parviennent également à identifier les souches jumelles sur la base de leurs aspects culturels.

*Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés de savoir si les caractéristiques culturelles peuvent constituer un marqueur génétique des populations de *L. maculans* en général et du groupe B en particulier.*

Nous avons observé une grande variabilité du pouvoir pathogène chez les souches du groupe B en utilisant un grand nombre de souches monoascospores et des isolats d'origines très diversifiées. Cependant, l'amplitude de variation de la pathogénie des souches provenant d'un même asque de ce groupe n'a jamais été appréciée. *C'est pourquoi nous nous sommes attachés à étudier la variabilité pour ce caractère à l'intérieur d'un même asque du groupe B. Les travaux réalisés sur une gamme de cinq génotypes visent à mettre en évidence des interactions différentielles pouvant servir de base à des études génétiques du pouvoir pathogène. En outre, l'analyse de la tétrade du groupe A, obtenue pour la première fois sur la Moutarde brune, permet d'appréhender les caractéristiques de ce groupe après passage sur cette espèce.*

II-MATERIELS ET METHODES

a) Variabilité culturelle

L'analyse de la vitesse de croissance mycélienne et de la morphologie des huit souches, issues d'un même asque, a été réalisée sur le milieu malt gélosé à différentes températures (5, 10, 15, 20, 25 et 30 °C) et à l'obscurité. Les méthodes de mesure de la croissance mycélienne et d'appréciation de la morphologie des colonies sont décrites dans la partie Matériels et Méthodes (page 33).

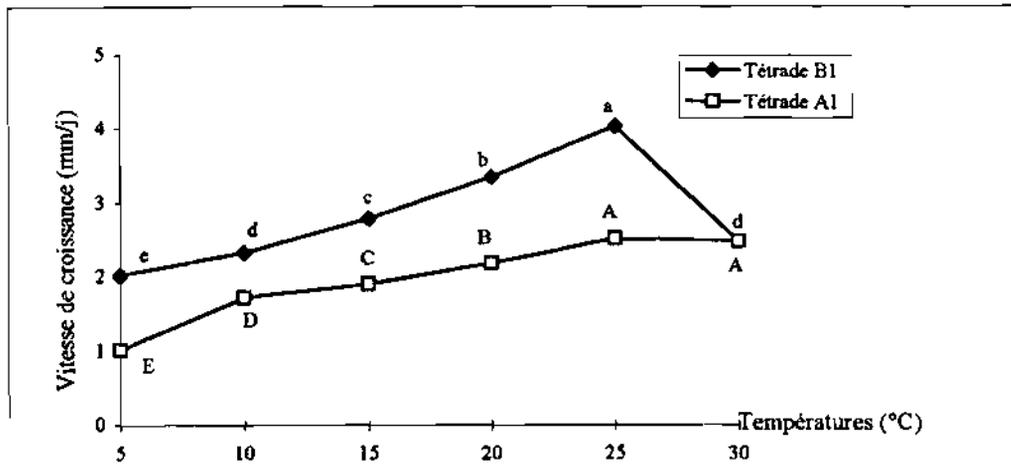


Figure 43 : Evolution de la vitesse de croissance journalière en fonction de la température et après 14 jours d'incubation à l'obscurité.

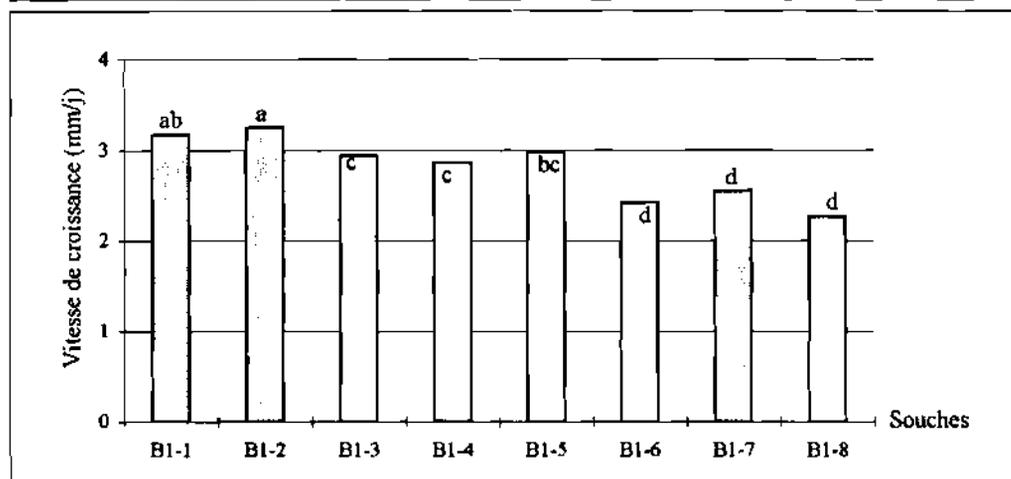


Figure 44 : Vitesse de croissance journalière des souches de l'asque B1 (vitesse moyenne aux six températures après 14 jours d'incubation à l'obscurité).

□ Mat2-1 ▨ Mat2-2

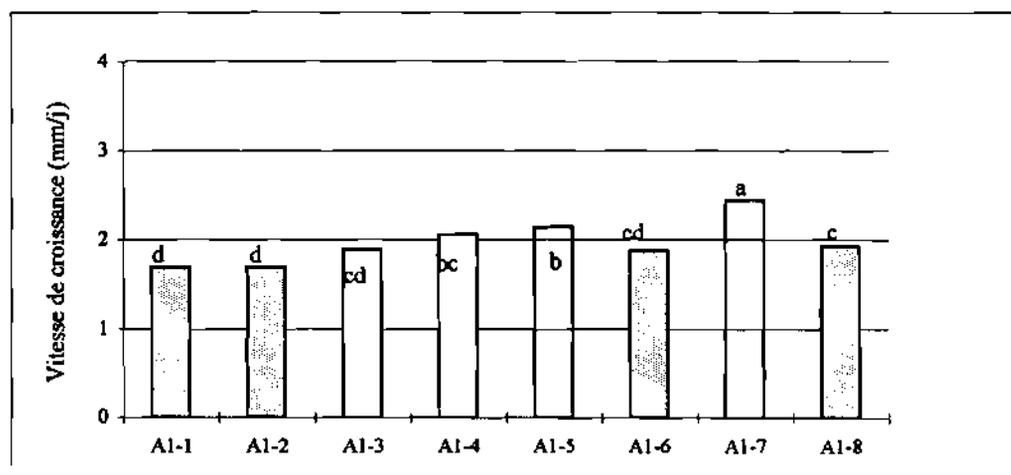


Figure 45 : Vitesse de croissance journalière des souches de l'asque A1 (vitesse moyenne aux six températures après 14 jours d'incubation à l'obscurité).

□ Mat1-1 ▨ Mat1-2

Les vitesses de croissance suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil 5 % suivant le test de Tukey

b) Pouvoir pathogène des tétrades

Le matériel végétal se compose des lignées MX et MXS, des cvs. Samourai, Westar et Picra. L'évaluation de la maladie est réalisée dix jours (pour la tétrade B1) et 14 jours (pour la tétrade A1) après l'inoculation au stade cotylédonaire.

c) Résultats

1) Variabilité culturale des tétrades

● La vitesse de croissance mycélienne

D'une manière générale, les vitesses de croissance mycélienne sont significativement différentes à l'intérieur de chacune des tétrades (Tableau 26). Les diamètres des colonies augmentent régulièrement avec la température pour atteindre un optimum à 25 °C pour la plupart des souches des groupes A et B. Dans la tétrade B1, la croissance est cependant fortement ralentie à 30 °C d'une valeur de 1,46 à 2,5 mm/j en fonction des souches alors que les souches provenant de l'asque A1 ne semblent pas inhibées à cette température.

Globalement, la tétrade B1 a une croissance moyenne significativement plus rapide (2,81 mm/j) que celle de la tétrade A1 (1,97 mm/j) (Fig. 43). Toutefois, ce critère culturel ne permet pas une distinction entre les souches des deux groupes à cause de la grande variabilité à l'intérieur de chaque asque. Par exemple à 20 °C, la souche B1.1 présente la même vitesse de croissance que la souche A1-5.

Les souches appartenant au même groupe de compatibilité varient fortement pour leurs vitesses de croissance. Ces variations parfois très significatives ne permettent pas, dans tous les cas, l'identification des souches jumelles. A l'intérieur de la tétrade B1 par exemple, deux groupes homogènes de souches sont mis en évidence par le test de Tukey, dans le groupe de compatibilité qui renferme les souches B1.1, B1.2, B1.7 et B1.8 (voir chapitre 1). En effet, les deux premières souches sont statistiquement identiques. Il en est de même pour les deux dernières souches (Fig. 44). Dans le second groupe de compatibilité ce regroupement paraît par contre impossible à réaliser. La même analyse peut être appliquée à la tétrade A1 avec le groupe de compatibilité contenant les souches A1.1, A1.2, A1.6 et A1.8 (Fig. 45). Dans les deux tétrades, il n'y a pas de corrélation entre les groupes de compatibilité et la vitesse de croissance. De même, ce critère seul ne permet pas d'identifier les souches jumelles.

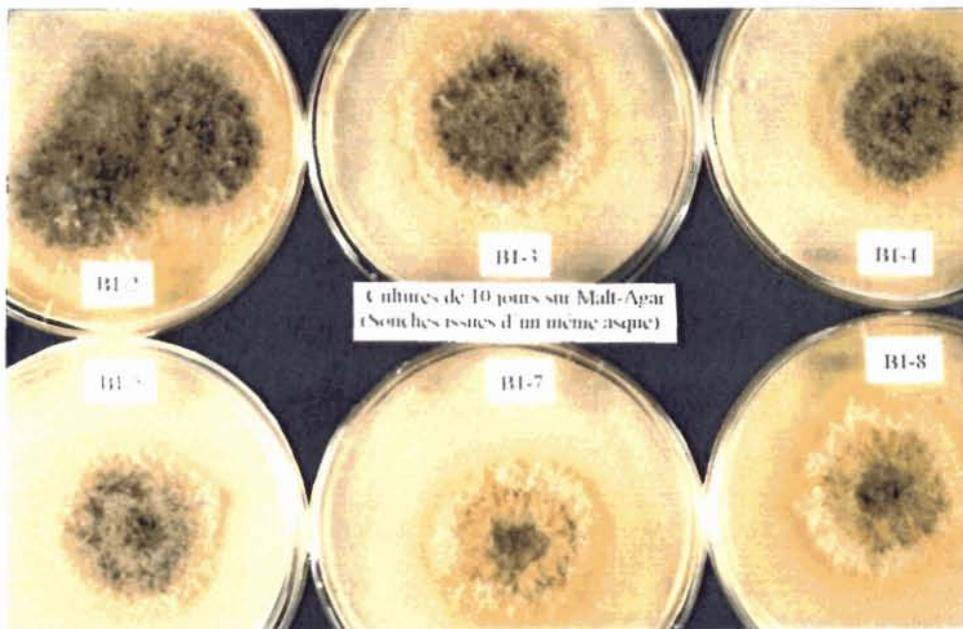


Figure 46 : Variabilité culturelle de six souches issues d'un même asque (B1) du groupe B.

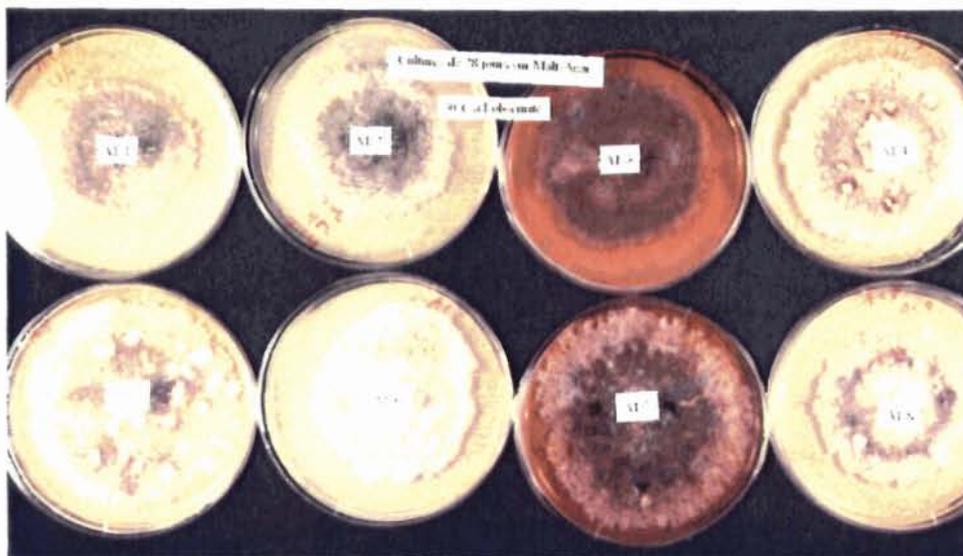


Figure 47 : Variabilité culturelle de huit souches issues d'un même asque (A1) du groupe A.

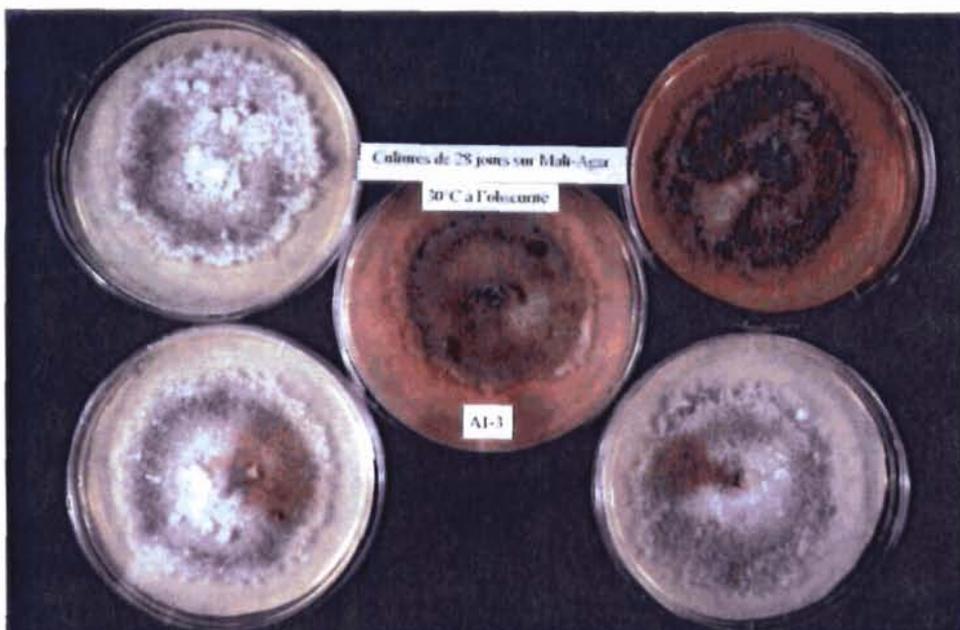


Figure 48 : Variabilité entre répétitions pour la diffusion de pigments chez une souche monoascosporee (A1-3) du groupe A.

(Photos : I. Somda)

② Caractéristiques du mycélium (Tableau 27)

A l'intérieur de la tétrade B1, les caractères morphologiques et culturels varient suivant les souches et en fonction des températures. Majoritairement jaune et aérien à très aérien, le mycélium devient gris rasant à 30 °C. Ce type mycélien n'est pas observé aux autres températures. L'aspect des colonies de la tétrade A1 est très peu variable et ne semble pas influencé par la température.

Les différents types mycéliens ainsi mis en évidence dans les deux tétrades ne distinguent pas les groupes de compatibilité sexuelle. Toutefois dans la tétrade B1, les aspects culturels des souches B1.1 et B1.2 sont identiques à toutes les températures. Il en est de même pour les souches B1.7 et B1.8. La différence des aspects morphologiques entre les deux paires de souches à l'intérieur du même groupe de compatibilité permet de reconnaître les souches jumelles (Fig. 46), identifiées par ailleurs grâce aux profils d'isoestérases (voir chapitre 1).

③ Diffusion de pigments et formations de secteurs (Tableau 28)

L'analyse de ces deux caractères vise à étudier l'influence de la température sur leur manifestation et leur intensité.

A l'intérieur de la tétrade B1, la pigmentation jaune du milieu de culture est présente à presque toutes les températures. L'intensité de la pigmentation augmente avec la température; et certaines souches diffusent un pigment brun rouge aux températures élevées. La production de pigment brun-rouge, non habituelle chez les souches du groupe A, est également observée dans la tétrade A1 (Fig. 47). Elle est inconstante pour une souche donnée (Fig. 48). Absent à 5 et 10 °C, le pigment brun-rouge apparaît chez deux souches à 15 °C. Sept souches produisent ce type de pigment à 20 °C.

Les souches de l'asque B1 produisent des secteurs uniquement à 15 et 20 °C (Tableau 28). Quant à la tétrade A1, l'instabilité se manifeste à partir de 10 °C. La souche A1-5 est la seule souche stable quelle que soit la température.

2) *Variabilité du pouvoir pathogène de huit souches issues d'un même asque*

● La tétrade B1

Toutes les souches de l'asque B1 sont agressives sur les lignées MX et MXS et les cultivars de Colza et de Moutarde brune (Fig. 49, Annexe 12). Le niveau d'agressivité des souches varie en fonction des génotypes testés. Les huit souches sont fortement agressives sur la lignée MX et le cv. Westar. Des

Tableau 26 : Vitesse de croissance mycélienne en mm/jour des tétrades B1 et A1 à différentes températures et à l'obscurité.

Souches	GCS.	Températures d'incubation					
		5 °C	10 °C	15 °C	20 °C	25 °C	30 °C
B1-1	MAT2-1	2,21 a	2,69 a	3,36 a	3,74 ab	4,77 a	2,26 cde
B1-2	MAT2-1	1,96 bc	2,41 b	3,31 a	4,41 a	4,78 a	2,65 abc
B1-3	MAT2-2	2,12 ab	2,34 bc	2,79 b	3,06 bc	4,25 b	3,08 a
B1-4	MAT2-2	1,93 bc	2,30 bc	2,74 b	3,46 b	3,99 b	2,74 ab
B1-5	MAT2-2	2,26 a	2,24 bc	2,62 bc	3,74 ab	4,24 b	2,79 ab
B1-6	MAT2-2	1,93 bc	2,22 bc	2,23 c	3,02 bc	3,28 c	1,86 e
B1-7	MAT2-1	1,89 c	2,14 c	2,44 bc	3,07 bc	3,41 c	2,36 bcd
B1-8	MAT2-1	1,84 c	2,25 bc	2,71 b	2,31 c	3,49 c	2,03 de
<hr/>							
A1-1	MAT1-1	0,99 ab	1,54 b	2,00 ab	1,75 bc	2,16 cd	1,78 c
A1-2	MAT1-1	0,99 ab	1,34 b	1,36 c	2,23 ab	1,71 d	2,54 b
A1-3	MAT1-2	0,78 b	1,54 b	1,69 bc	2,65 a	2,11 cd	2,54 b
A1-4	MAT1-2	1,01 ab	2,08 a	1,81 bc	2,34 a	2,56 bc	2,57 b
A1-5	MAT1-2	1,18 a	1,69 ab	1,91 b	2,33 a	3,09 ab	2,65 b
A1-6	MAT1-1	0,96 ab	1,74 ab	2,50 a	2,11 abc	1,73 d	2,23 bc
A1-7	MAT1-2	1,17 a	2,20 a	1,96 b	2,49 a	3,55 a	3,29 a
A1-8	MAT1-1	1,03 a	1,68 ab	1,93 b	1,62 c	3,14 ab	2,15 bc

GCS = groupe de compatibilité sexuelle

Les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil 5 % selon le test de Tukey.

Tableau 27 : Morphologie des colonies des tétrades B1 et A1 à différentes températures et à l'obscurité, après 28 jours d'incubation.

Souches	GCS	Températures d'incubation					
		5 °C	10 °C	15 °C	20 °C	25 °C	30 °C
B1-1	MAT2-1	Gris jaune aérien	Gris jaune aérien	Jaune aérien	Gris jaune très aérien	Gris jaune aérien	Gris rasant
B1-2	MAT2-1	Gris jaune aérien	Gris jaune aérien	Jaune aérien	Gris jaune très aérien	Gris jaune aérien	Gris rasant
B1-3	MAT2-2	Gris jaune mi-aérien	Gris mi-aérien	Jaune aérien	Jaune aérien	Jaune aérien	Gris rasant
B1-4	MAT2-2	Gris jaune mi-aérien	Gris mi-aérien	Jaune aérien	Gris jaune très aérien	Jaune aérien	Gris rasant
B1-5	MAT2-2	Gris jaune mi-aérien	Gris mi-aérien	Jaune aérien	Gris jaune aérien	Jaune aérien	Gris rasant
B1-6	MAT2-2	Gris jaune mi-aérien	Gris mi-aérien	Gris jaune aérien	Gris jaune mi-aérien	Gris jaune aérien	Gris rasant
B1-7	MAT2-1	Jaune aérien	Jaune aérien	Jaune très aérien	Gris jaune aérien	Gris jaune aérien	Gris mi-aérien
B1-8	MAT2-1	Jaune aérien	Jaune aérien	Jaune très aérien	Gris jaune mi-aérien	Gris jaune aérien	Gris mi-aérien
<hr/>							
A1-1	MAT1-1	Gris mi-aér.	Gris aérien	Gris mi-aér.	Gris mi-aér.	Blanc aérien	Blanc mi-aér.
A1-2	MAT1-1	Blanc mi-aér.	Blanc rasant	Gris mi-aér.	Gris rasant	Gris mi-aér.	Gris aérien
A1-3	MAT1-2	Gris mi-aér.	Blanc rasant	Gris rasant	Gris mi-aér.	Gris aérien	Gris aérien
A1-4	MAT1-2	Blanc aérien	Blanc aérien	Gris rasant	Gris rasant	Gris aérien	Blanc aérien
A1-5	MAT1-2	Gris mi-aér.	Gris mi-aér.	Gris mi-aér.	Gris mi-aér.	Blanc mi-aér.	Gris aérien
A1-6	MAT1-1	Blanc rasant	Blanc rasant	Gris rasant	Gris mi-aér.	Blanc rasant	Blanc aérien
A1-7	MAT1-2	Blanc aérien	Blanc rasant	Gris mi-aér.	Gris mi-aér.	Gris mi-aér.	Gris aérien
A1-8	MAT1-1	Gris mi-aér.	Gris mi-aér.	Gris mi-aér.	Gris mi-aér.	Gris aérien	Blanc aérien

GCS = groupe de compatibilité sexuelle

Tableau 28 : Morphologie des colonies (Pigmentation du milieu / secteurs) issues des tétrades B1 et A1 à différentes températures et à l'obscurité.

Souches	GCS	Températures d'incubation					
		5 °C	10 °C	15 °C	20 °C	25 °C	30 °C
B1-1	MAT2-1	Jaune / -	Jaune / -	Jaune / -	Jaune / -	Jaune / -	Jaune / -
B1-2	MAT2-1	Jaune / -	Jaune / -	Jaune / -	Jaune / -	Jaune / -	Jaune / -
B1-3	MAT2-2	Jaune / -	Jaune / -	Jaune / -	Jaune / -	Jaune / -	Jaune / -
B1-4	MAT2-2	Jaune / -	Jaune / -	Jaune / +	Jaune / -	Jaune / -	Jaune / -
B1-5	MAT2-2	Jaune / -	Jaune / -	Jaune / +	Jaune / -	Jaune / -	Jaune / -
B1-6	MAT2-2	Jaune / -	Jaune / -	Jaune / +	Brun rouge / -	Brun rouge / -	Brun rouge / -
B1-7	MAT2-1	Jaune / -	Jaune / -	Jaune / -	Brun rouge / +	Jaune / -	Brun rouge / -
B1-8	MAT2-1	Jaune / -	Jaune / -	Jaune / -	Brun rouge / +	Jaune / -	Brun rouge / -
Nombre de souches avec des secteurs		0	0	3	2	0	0
A1-1	MAT1-1	- / -	- / -	- / +	Brun rouge / -	Brun rouge / -	- / -
A1-2	MAT1-1	- / -	- / -	- / +	Brun rouge / -	Brun rouge / -	- / -
A1-3	MAT1-2	- / -	- / +	Brun rouge / +	Brun rouge / +	Brun rouge / -	Brun rouge / -
A1-4	MAT1-2	- / -	- / -	- / -	Brun rouge / +	- / -	- / -
A1-5	MAT1-2	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -
A1-6	MAT1-1	- / -	- / -	- / -	Brun rouge / +	- / -	- / -
A1-7	MAT1-2	- / -	- / +	Brun rouge / +	Brun rouge / +	Brun rouge / -	Brun rouge / +
A1-8	MAT1-1	- / -	- / +	- / +	Brun rouge / +	Brun rouge / -	- / -
Nombre de souches produisant des pigments / Secteurs		0 / 0	0 / 3	2 / 5	7 / 5	5 / 0	2 / 1

GCS = groupe de compatibilité sexuelle, + = présence, - = absence

Souches	B1-1	B1-2	B1-3	B1-4	B1-5	B1-6	B1-7	B1-8
	1	2	3	4	5	6	7	8
Lignée MX	9	9	9	9	9	8,97	8,4	8,75
Lignée MXS	4,82	4,8	4,79	4,57	6,58	5,25	5,95	5,33
cv. Picra	5,67	6,37	6,98	6,98	7,03	5,26	4,84	3,7
cv. Samourai	4,87	5,31	6,54	6,32	6,97	5,83	4,5	5,36
cv. Westar	8,53	8,87	8,75	8,97	8,89	7,63	8,15	8,5

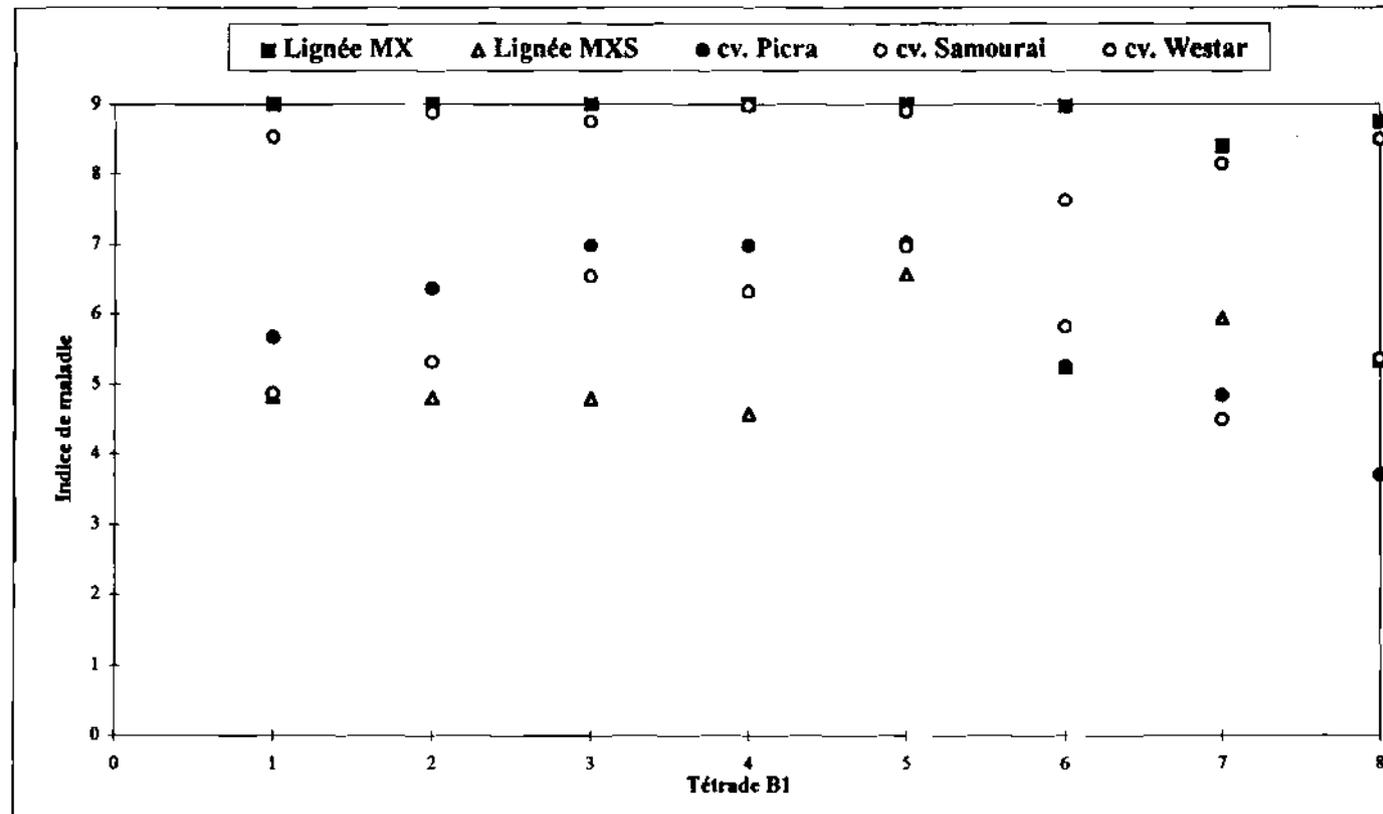


Figure 49 : Pouvoir pathogène de la tétrade B1 sur les cotylédons des cinq génotypes. Les indices de maladie sont obtenus 14 jours après l'inoculation.

variations importantes de pouvoir pathogène sont observées sur le cv. Picra, le cv. Samourai et la lignée MXS. Des niveaux plus faibles d'agressivité se manifestent sur la lignée MXS avec les souches B1.1, B1.2, B1.3 et B1.4. Sur un même génotype, nous observons un continuum d'agressivité qui ne nous permet pas d'identifier les groupes de compatibilité et *a fortiori* les quatre produits de la méiose (Annexe 12).

Les souches ne classent pas de la même manière certains génotypes (Fig. 49, Annexe 12). Ces différences de classement suggèrent l'existence d'interactions quantitatives et significatives entre les souches et les génotypes testés. Sur la base des classements consignés dans la figure 50, nous distinguons trois groupes à l'intérieur desquels les souches classent les génotypes de la même manière. Les souches B1.1, B1.2, B1.5, B1.7 et B1.8 distinguent deux groupes de génotypes statistiquement distincts alors que les deux souches B1.3 et B1.4 permettent d'identifier quatre groupes de génotypes. La souche B1-6 discrimine trois groupes.

Le pouvoir pathogène seul ne permet pas de reconnaître les deux groupes de compatibilité sexuelle déterminés dans le chapitre 1. Cependant, en tenant compte des allèles de compatibilité sexuelle, les classements des génotypes permettent de regrouper les souches B1.3, B1.4 et les souches B1.5 et B1.6 à l'intérieur du groupe de compatibilité MAT2-2. Dans le groupe MAT2-1, les quatre souches se comportent de manière identique.

② La tétrade A1

Toutes les souches sont faiblement agressives sur le cv. Picra (Fig. 51, Annexe 13) et induisent, dans la plupart des cas, des réactions de type hypersensible. D'une façon générale, le pouvoir pathogène de la tétrade est très variable sur les autres génotypes. Les niveaux d'agressivité les plus élevés sont observés avec la souche A1.8 ($IM = 7,28 \pm 1,13$). Les souches A1.5 et A1.7 se révèlent les moins agressives sur les deux lignées et les deux cultivars de Colza. La variabilité de réponse révélée par des écarts types importants ne permet pas d'observer, dans tous les cas, des différences significatives entre les souches sur un génotype donné (Annexe 13). L'agressivité des huit souches sur chacun des quatre génotypes ne permet pas d'identifier les groupes de compatibilité ni les quatre paires de souches jumelles. En considérant simultanément les groupes de compatibilité et l'annexe 13, nous parvenons à regrouper deux à deux les souches du groupe MAT1-2 sur la base de leur agressivité sur la lignée MXS.

A l'instar de la tétrade B1, les souches de l'asque A1 interagissent avec les lignées et les cultivars de Colza (Fig. 52). A l'exception des souches A1.6 et A1.7, les autres souches classent les lignées MX et MXS dans le même groupe. Dans la majorité des cas, la réaction des lignées n'est pas statistiquement différente de celle des cultivars de Colza (Annexe 13).

	B1.1		B1.2		B1.3		B1.4		B1.5		B1.6		B1.7		B1.8	
MX			1		1		1		1		1		1		1	
Westar				2	2		2		2		2		2		2	
Picra					3		3		3		3		3		3	
MXS			4		5		5		5		4		4		4	
Samourai			5		4		4		4		5		5		3	

Figure 50 : Représentation graphique du classement des cinq génotypes vis-à-vis des huit souches issues d'un même asque B1. Les colonnes en gris identifient les souches du groupe MAT 2.1. Les autres souches sont du groupe MAT2.2

	A1-1	A1-2	A1-3	A1-4	A1-5	A1-6	A1-7	A1-8
	1	2	3	4	5	6	7	8
Lignée MX	5,84	5,75	4,56	5,97	3,03	5,23	3,32	6,7
Lignée MXS	5,77	5,56	5,87	6,82	4,34	6,13	4,59	6,75
cv. Picra	1,53	2,44	1,23	1,35	1,14	1,59	1,19	2,94
cv. Samourai	6,31	5,25	4,92	5,86	3,69	5,41	4,45	5,62
cv. Westar	6,56	6,17	5,1	6,15	3,51	6,51	4,51	7,28

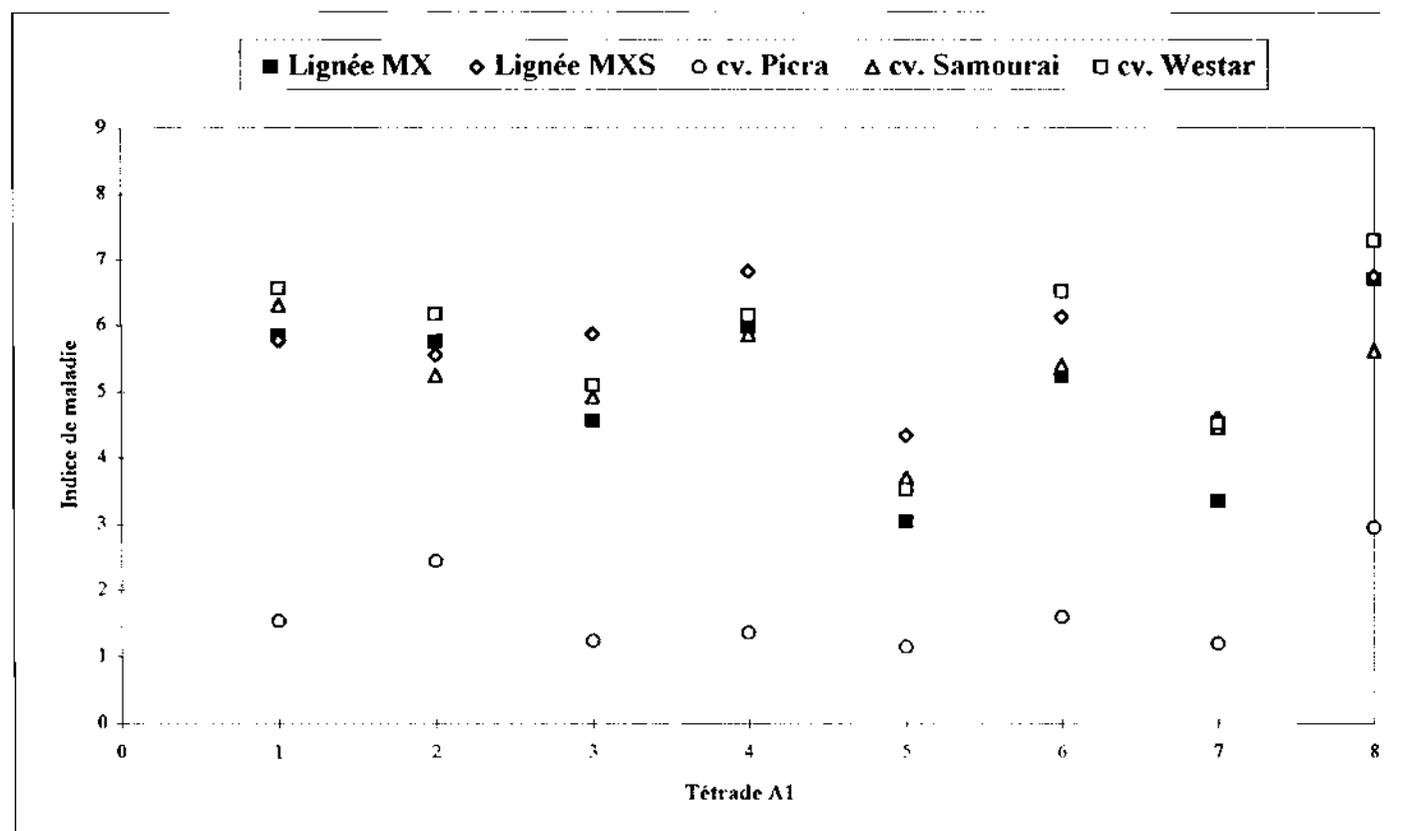


Figure 51 : Pouvoir pathogène de la tétrade A1 sur les cotylédons des cinq génotypes. Les indices de maladie sont obtenus dix jours après l'inoculation.

	A1.1	A1.2	A1.3	A1.4	A1.5	A1.6	A1.7	A1.8
Westar			2	2	2	1	2	1
Samourai			3	4	1	3	3	4
MX			4	3	4	4	4	2
MXS			1	1	3	2	1	3
Picra			5	5	5	5	5	5

Figure 52 : Représentation graphique du classement des cinq génotypes vis-à-vis des huit souches issues d'un même asque A1. Les colonnes en gris identifient les souches du groupe MAT1.1. Les autres souches sont du groupe MAT1.2

⑥ Analyse comparée des classements des génotypes par les deux tétrades

Le classement de cinq génotypes par les souches B1 est fondamentalement différent de celui obtenu avec la tétrade A1. Si le cv. Westar, le cv. Samourai et dans certains cas la lignée MXS se partagent le groupe des génotypes sensibles vis-à-vis des huit souches A1, la lignée MX et le cv. Westar se révèlent les plus sensibles à la tétrade B1. Il ressort également de cette analyse que le niveau de résistance de la lignée MXS à la tétrade B1 semble plus important que celui du cv. Samourai.

d) Discussion

Notre travail montre que les huit souches isolées au hasard à partir d'un asque du groupe A et d'un asque du groupe B de *L. maculans* apparaissent hétérogènes pour leurs caractéristiques culturelles et pour leur agressivité sur le Colza et les génotypes portant la résistance d'origine Moutarde brune.

1) Polymorphisme cultural et variabilité du pouvoir pathogène de la tétrade B1

La culture de la tétrade B1, sur le milieu malt gélose, à différentes températures met en évidence des différences significatives de vitesse de croissance mycélienne. Les variations des caractéristiques culturelles ne sont pas corrélées aux groupes de compatibilité sexuelle. Cependant, les différences fortement marquées entre deux paires de souches du groupe MAT2-1 permettent de les identifier comme étant des souches jumelles. En outre, la morphologie des colonies à certaines températures permet également l'identification des paires d'ascospores. Cet appariement trouve une confirmation dans l'analyse simultanée des signes de compatibilité et des profils d'isoestérases déterminés dans l'article 2. Par contre, dans le second groupe, la faible amplitude de variation rend vaine toute tentative de regroupement par paires. Le regroupement des ascospores deux à deux dans le groupe MAT2-1 suggérerait une hérédité nucléaire de la vitesse de croissance. L'analyse d'autres tétrades pourrait apporter des éléments de réponse sur l'efficacité de ce marqueur cultural chez ce groupe de souches. Chez *Phaeosphaeria nodorum*, la coloration du mycélium permet à Halama (1991) d'identifier les souches jumelles contrairement à la vitesse de croissance des thalles. Ce dernier critère semble cependant lié aux allèles de compatibilité sexuelle. Chez ce champignon nécrotrophe, la pigmentation du mycélium constitue le seul marqueur fiable utilisé pour des études génétiques (Halama, 1991).

Si les huit souches de l'asque B1 sont très agressives sur la lignée MX et le cv. Westar, les niveaux d'agressivité variables observés sur la lignée MXS, le cv. Samourai et le cv. Picra montrent que la tétrade B1 n'est pas homogène pour ce caractère. L'analyse simultanée des allèles de compatibilité

sexuelle et la pathogénie indique que les souches jumelles se comportent de manière similaire sur l'ensemble de la gamme d'hôtes. Ce résultat suggère que l'agressivité des souches aurait un support nucléaire chez le groupe B. Toutefois, les différences entre le pouvoir pathogène des huit souches sont relativement faibles et montrent que leur signification biologique pourrait être mal estimée. Au regard de la variabilité de la pathogénie observée sur le cv. Picra, il serait intéressant de tester d'autres cultivars de Moutarde brune en vue de mettre en évidence des interactions spécifiques dans la perspective d'études génétiques de la pathogénie des souches du groupe B.

L'absence de différences qualitatives du pouvoir pathogène entre les souches B1 et sur l'ensemble de la gammes d'hôtes serait liée aux conditions du test qui seraient très favorables aux souches du groupe B. La diminution de la concentration en spores de l'inoculum, l'inoculation sur des plantes plus âgées et sur les jeunes feuilles et enfin la baisse de la température d'incubation sont autant de voies d'investigations qui permettront de définir un protocole adapté à l'étude des souches du groupe B.

2) Polymorphisme cultural et variabilité du pouvoir pathogène de la tétrade A1

Les résultats obtenus avec la tétrade A1 révèlent que les caractères culturaux varient indépendamment des signes de compatibilité. Boudart (1981) parvient à la même conclusion en utilisant deux tétrades naturelles du groupe A isolées du Chou qu'il cultive sur les milieux pomme de terre et V8 gélosé. Dans la tétrade A1 et à l'intérieur d'un même groupe de compatibilité, les souches peuvent être regroupées deux à deux. Cependant, nous ne disposons pas de marqueurs complémentaires nous permettant de conclure sur leur identité nucléaire. La tendance observée mérite d'être confirmée en élargissant l'analyse à d'autres tétrades du groupe A et en prospectant d'autres milieux (PDA, V8 gélosé,...) et conditions de culture (lumière blanche, noire, ...). Gall (1994) utilise simultanément le signe de compatibilité sexuelle et la vitesse de croissance des thalles et réussit à appairer les souches dans trois asques du groupe A. Cependant, dans une tétrade, l'auteur constate que l'identification des souches jumelles en utilisant les caractères culturaux ne correspond pas à celle obtenue avec l'analyse simultanée du marqueur isoenzymatique (ACP) et des allèles de compatibilité sexuelle. Ce contre-exemple met en doute l'efficacité des critères culturaux comme marqueurs génétiques chez le groupe A.

Par ailleurs, les souches de l'asque A1 sont particulières. En effet, la majorité d'entre elles produit un pigment brun rouge qui apparaît à 15 °C et persiste chez certaines souches à 30 °C. Avant de tenter une explication de ce phénomène, il convient de considérer l'hôte d'origine de la tétrade : la Moutarde brune. Nous montrons dans les chapitres précédents que cette espèce sélectionne exclusivement les souches diffusant des pigments (groupe B). La capacité à s'adapter à la résistance de la Moutarde brune et à y accomplir son cycle biologique serait-elle associée à la production de pigments

in vitro? En l'état actuel de nos connaissances sur ce pathosystème, il est difficile de répondre par l'affirmative. Toutefois, nous faisons remarquer que certaines souches isolées de la lignée MX produisent également de manière inconstante ce pigment brun-rouge alors que les souches de référence du groupe A n'en produisent pas. Balesdent *et al.* (1992) signalent également la production de ce type de pigment chez une souche isolée de débris de Colza provenant de Le Rheu. De même M. L. Pilet (comm. pers.) obtient à partir du Colza des souches du groupe A produisant le pigment brun rouge. Il est possible que ce type de souches, présent en faible proportion sur le Colza, provienne des essais conduits à l'INRA-Le Rheu sur les génotypes portant la résistance d'origine moutarde brune.

Contrairement à la tétrade B1, des différences significatives d'agressivité entre certaines souches de l'asque A1 sont révélées sur les deux lignées de recombinaison et les deux cultivars de Colza. Il apparaît alors que les souches issues d'un même asque peuvent varier fortement pour leur pouvoir pathogène sur les lignées. L'aviorulence de la tétrade A1 sur son hôte d'origine confirme une fois de plus la résistance de type hypersensible de la moutarde brune vis-à-vis de ce groupe de souches. Ce résultat appelle les hypothèses suivantes :

★ après une colonisation post-récolte de la tige du cv. Picra, des souches non agressives auraient accompli leur cycle sexuel donnant des périthèces matures au champ.

★ les souches bien que non agressives auraient colonisé les tissus de la tige et auraient développé les périthèces sur le résidu au cours de l'automne.

Les caractéristiques culturales et pathogéniques de la tétrade A1 demandent des investigations plus approfondies des populations du groupe A isolées de la Moutarde brune en vue de démontrer l'effet éventuel de la résistance de cette espèce sur la diffusion de pigments chez ce groupe.

CONCLUSION DE LA DEUXIEME PARTIE

Dans un premier temps, les croisements réalisés au laboratoire en utilisant la tétrade du groupe B ont permis de démontrer pour la première fois, l'hétérothallisme bipolaire chez ce groupe de souches et de confirmer le mécanisme génétique de la reproduction sexuée chez le groupe A. Nous avons mis au point un protocole permettant la production des périthèces aussi bien chez le groupe A que chez le groupe B. Les premières tentatives de croiser les souches du groupe A avec les souches du groupe B ont été infructueuses et suggèreraient que les deux groupes constituent deux entités biologiques sexuellement isolées.

Dans un second temps, afin d'évaluer la variabilité à l'intérieur d'une tétrade, les analyses électrophorétiques, culturales et biologiques ont été réalisées avec les deux tétrades. Les zymogrammes d'isoestérases montrent un polymorphisme plus important chez la tétrade B1 (deux profils types sont observés) que chez la tétrade A1 (un seul profil). Pour la tétrade B1, il apparaît alors qu'un gène avec au moins deux allèles contrôle les deux profils types d'isoestérases observés. Nos résultats montrent que ce gène est indépendant de celui gouvernant le signe de compatibilité. L'analyse simultanée de ces deux marqueurs a permis d'identifier les ascospores jumelles dans certaines tétrades du groupe B.

La caractérisation du pouvoir pathogène des huit souches d'origine monoascale permet de mettre en évidence :

★ un continuum d'agressivité des souches de l'asque B1 sur chaque génotype testé avec toutefois de légères variations sur la lignée MXS, le cv. Samourai et le cv. Picra. Ces différences quantitatives rendent impossibles l'identification des paires de souches jumelles.

★ des différences de pouvoir pathogène significatives dans la tétrade A1. Les niveaux d'agressivité similaires des deux souches A1-5 et A1-7, quels que soit la lignée ou le cultivar testé, semblent indiquer un support nucléaire du pouvoir pathogène chez ce groupe de souches.

L'analyse des caractéristiques culturales des tétrades des groupes A et B révèle que les souches issues d'un même asque sont très hétérogènes. Les caractères culturaux des souches de l'asque B1 permettraient de distinguer les mêmes souches jumelles identifiées par ailleurs par les profils d'isoestérases. Pour les deux tétrades analysées, l'absence de marqueurs permettant la distinction des quatre paires de génotypes jumeaux nécessite l'analyse d'autres tétrades et l'optimisation des critères utilisés.

.....

L'intérêt des analyses de diversité des populations d'agents pathogènes est d'autant plus grand quand les résultats de ces analyses peuvent être reliés à des facteurs d'importance agronomique : augmentation de la gravité de la maladie et/ou baisse de rendement par exemple.

Les populations de *L. maculans* isolées de la lignée de recombinaison Colza-Moutarde brune MX présentent une grande diversité. De plus, le pouvoir pathogène des souches s'accroît sur cette lignée, au stade cotylédonaire, sous l'effet de la pression de sélection exercée par la résistance d'origine moutarde brune sur les populations naturelles du champignon (Chapitre 1).

Dans l'objectif de connaître l'impact de la variabilité phénotypique observée chez l'agent pathogène sur l'importance des symptômes induits à différents stades des plantes, des expérimentations sont réalisées en serre et au champ respectivement vis-à-vis de souches caractérisées et de populations naturelles de L. maculans.

.....

TROISIEME PARTIE :
ANALYSE DE LA RESISTANCE DES LIGNEES DE
RECOMBINAISON COLZA-MOUTARDE BRUNE VIS-A-VIS DE
LEPTOSPHAERIA MACULANS

INTRODUCTION

Les méthodes de sélection du Colza pour la résistance à la Nécrose du collet au champ utilisées actuellement, reposent en partie sur le test cotylédonaire en conditions contrôlées. Si ce test miniaturisé permet la prospection de nouvelles sources de résistance (Williams et Delwiche, 1979; Sjödin et Glumelius, 1988), sa fiabilité pour la sélection de résistance efficace au champ est controversée. De nombreux travaux ont en effet montré de faibles corrélations entre la réaction au stade jeunes plantes et celle observée au champ en conditions d'infestation naturelles (Alabouvette *et al.*, 1974; Cargeeg et Thurling, 1980; Newman et Bailey, 1987; Gugel *et al.*, 1990), certains auteurs préconisent donc l'évaluation de la résistance à l'aide de tests plus tardifs et/ou au champ (Gugel *et al.*, 1990; Salisbury et Ballinger, 1993). Par contre, d'autres auteurs observent une corrélation positive des réactions variétales en conditions contrôlées et au champ (Cargeeg et Thurling, 1979; Newman et Bailey, 1987; Bansal *et al.*, 1994). Compte tenu du fait que les conditions expérimentales et le matériel biologique (types de résistance, structure des populations au champ...) sont le plus souvent très différents, les résultats ainsi rapportés ne peuvent être considérés qu'avec réserves.

En conditions contrôlées, Salisbury et Ballinger (1993) ne mettent pas en évidence de relations entre la résistance des plantes aux stades cotylédonaire et adulte vis-à-vis de différentes souches. Ils soulignent l'extrême complexité des interactions *L. maculans*-Crucifères en décrivant tous les cas de figure d'interactions souche-stade, avec en particulier des souches agressives sur les cotylédons qui ne le sont pas au stade adulte et vice versa.

Nous avons montré que la majorité des souches qui composent les populations isolées de la lignée de recombinaison Colza-Moutarde brune MX présente une agressivité importante sur les cotylédons de cette lignée, il est donc important d'évaluer leur agressivité sur les différents organes de la plante. *En utilisant des souches bien caractérisées, en particulier pour leur pathogénie au stade cotylédonaire, cette étude pourrait nous aider à déterminer si la réaction des différents organes en serre est corrélée à celle observée sur les cotylédons en chambres climatisées. Elle devrait également permettre de préciser et de comparer les divers types de symptômes provoqués par les souches des groupes A et B de L. maculans sur les différents organes.*

Nous nous sommes par ailleurs attaché à étudier l'efficacité de la résistance à la Nécrose du collet de plusieurs lignées de recombinaison Colza-Moutarde brune en conditions d'infestation semi-naturelles au champ. Cette étude, conduite pendant deux campagnes de culture (1993-94 et 1994-95), a pour objectif d'évaluer la durabilité potentielle de cette nouvelle source de résistance face à des populations naturelles de L. maculans sélectionnées sur ces lignées et dont les résidus de culture ont servi d'inoculum.



Figure 53 : Types de symptômes causés par les souches du groupe A (a) et du groupe B (b) sur les cotylédons.

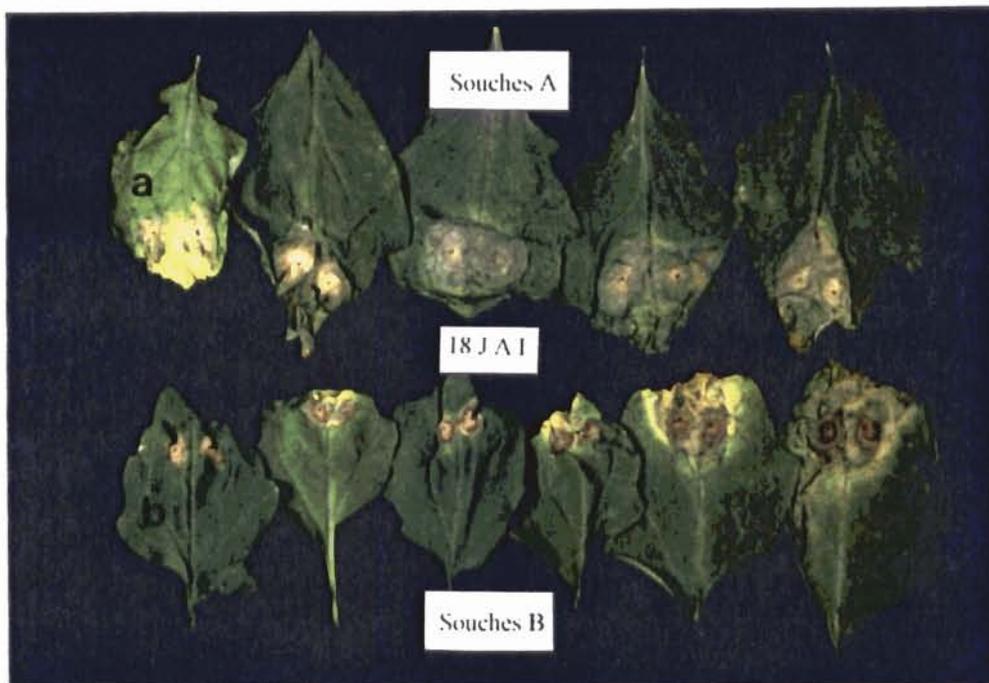


Figure 54 : Types de symptômes causés par les souches du groupe A et du groupe B sur les feuilles.

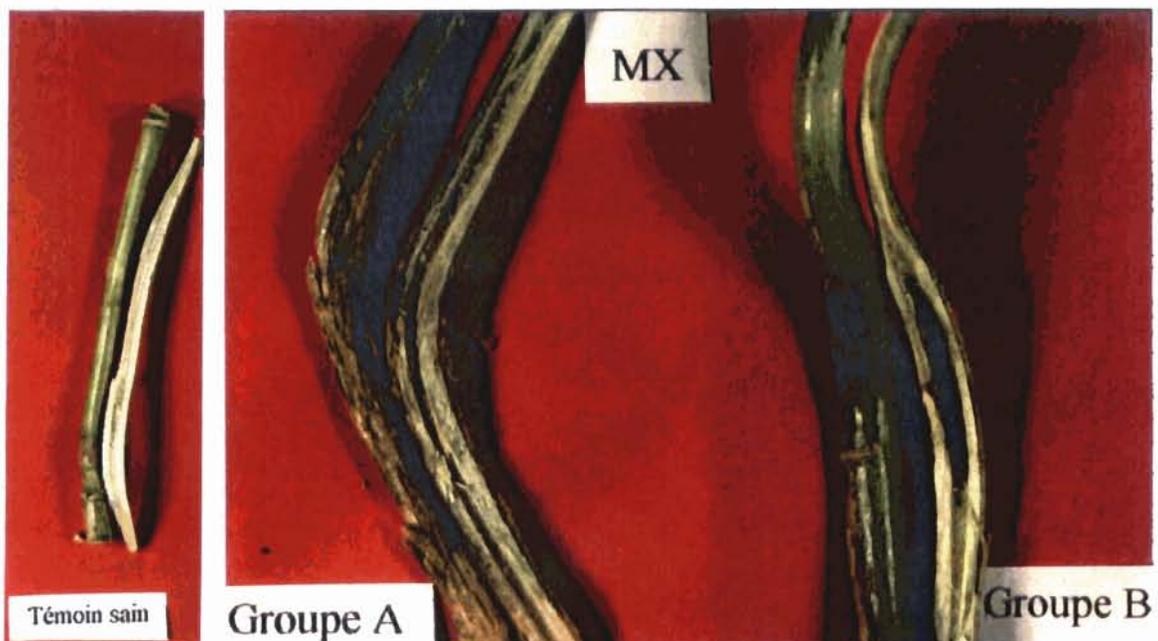


Figure 55 : Types de symptômes causés par les souches du groupe A et du groupe B (Photos : I. Somda) sur les tiges.

Chapitre 1 : CARACTERISATION DE LA RESISTANCE DE DEUX LIGNEES DE RECOMBINAISON COLZA-MOUTARDE BRUNE, EN SERRE

I-INTRODUCTION

Les expérimentations conduites en serre, ont pour but de caractériser la résistance de deux lignées de recombinaison Colza-Moutarde brune vis-à-vis de quelques souches des groupes A et B de *L. maculans*, comparativement à des cultivars de Colza et de Moutarde brune. Etant donné que les deux groupes de souches peuvent co-exister sur la même plante, il nous a paru intéressant d'évaluer le rôle de chaque groupe, inoculé séparément et en association, dans la manifestation des symptômes sur les différents organes végétatifs de la plante. Cette étude devrait également permettre de préciser les différents types de symptômes provoqués par les groupes A et B sur les différents organes des cultivars de Colza.

Le matériel biologique et la méthodologie d'étude figurent dans la partie Matériel et Méthodes (pages 38 à 40).

II-RESULTATS

Le niveau de résistance de deux lignées de recombinaison Colza-Moutarde brune (MX et MXS), de deux cultivars de Colza (Samourai et Westar) et d'un cultivar de Moutarde brune (Picra) est testé vis-à-vis de deux souches et un isolat du groupe A, de trois souches et un isolat du groupe B et de différentes combinaisons de mélanges de souches.

a) Evaluation de la résistance au stade cotylédonnaire

Les deux groupes de souches A et B induisent des symptômes quasiment identiques sur les cotylédons (Fig. 53).

	Groupe A				Groupe B					
	MXC1 1	MX1-13 2	A942 3	Mélange A 4	B945 5	MX-6 6	B867 7	P3-1 8	Mélange B 9	Mélange A+B 10
Lignée MX	5,01 c ¹	3,73 b	2,95 b	3,71 c	6,58 ab	8,15 a	8,68 a	8,88 a	6,59 b	4,78 b
Lignée MXS	6,88 a	3,83 b	3,13 b	4,29 b	4,99 c	6,38 b	7,3 b	6,68 c	3,91 c	4,96 b
cv. Picara	2,08 d	1,63 c	0,3 c	1,91 d	6,24 ab	7,83 a	6,8 c	6,88 c	6,19 b	5,2 b
cv. Samourai	5,74 b	6,05 a	4,66 a	6,81 a	5,85 b	6,53 b	7,43 b	8,03 b	8,3 a	7,1 a
cv. Westar	5,9 b	6,59 a	5,76 a	6,58 a	6,93 a	8,11 a	7,85 b	6,97 c	6,93 b	7,2 a

¹ Les indices suivis de la même lettre ne sont pas significativement différents au seuil de 1%. (A lire uniquement verticalement)

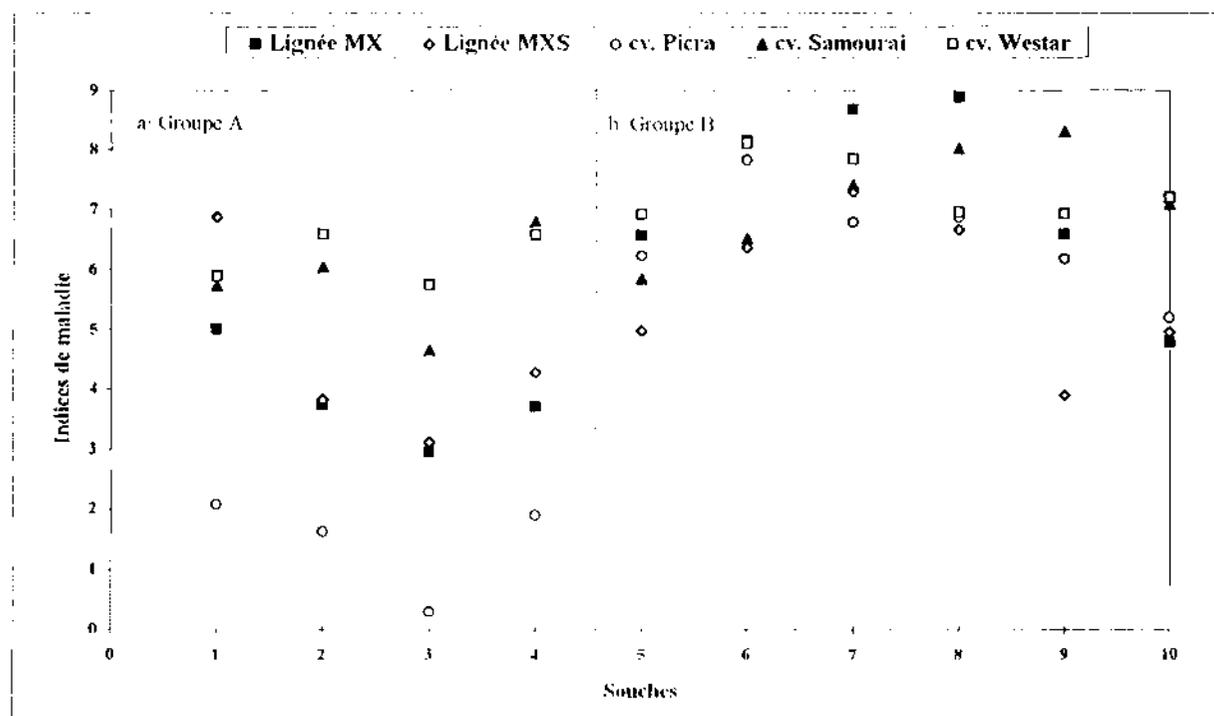


Figure 56 : Comparaison en serre de la réaction cotylédonaire de cinq génotypes vis-à-vis de quelques souches et isolats des groupes A et B et de leurs mélanges

1) *Vis-à-vis des souches du groupe A.*

① Inoculées individuellement

Les lignées MX et MXS inoculées avec les trois souches du groupe A manifestent des indices de maladie sur les cotylédons variant de 2,95 à 6,88 (Fig. 56a). Les deux lignées sont plus résistantes aux souches MX1-13 et A942 qu'à l'isolat MXC1. La résistance du cv. Picra s'exprime par une réaction de type hypersensible vis-à-vis des deux souches et de l'isolat. Les cvs. Samourai et Westar sont sensibles quelle que soit la souche testée. La lignée MXS est plus sensible à l'isolat MXC1 que la lignée MX et les cvs. Samourai et Westar.

② Inoculées en mélange

Les génotypes diffèrent significativement pour leur sensibilité au mélange des trois souches du groupe A (Fig. 56a). Le cv. Picra est résistant, les deux lignées sont moyennement résistantes et les cvs. Samourai et Westar sont sensibles. Les lignées MX et MXS présentent un comportement intermédiaire vis-à-vis du mélange comparativement à l'isolat le plus agressif sur les deux lignées.

2) *Vis-à-vis des souches du groupe B*

① Inoculées individuellement

Les lignées MX et MXS sont sensibles à toutes les souches et à l'isolat (Fig. 56b). Toutefois, quelle que soit la souche testée, la lignée MX est plus sensible que la lignée MXS. Les cvs. Samourai, Westar et Picra varient significativement pour leur sensibilité aux souches du groupe B.

② Inoculées en mélange

Les indices de maladie varient de 3,91 à 8,3 (Fig. 56b). Le classement des génotypes montre trois groupes statistiquement distincts. Le cv. Samourai est le plus sensible alors que la lignée MXS se montre très résistante. La lignée MX, le cv. Westar et le cv. Picra forment un groupe homogène de sensibilité moyenne. Les différents génotypes s'avèrent plus résistants au mélange de souches qu'à certaines souches inoculées individuellement. En particulier, la lignée MXS est la moins sensible.

3) *Vis-à-vis du mélange de souches des groupes (A + B).*

Les lignées MX et MXS se comportent de manière similaire vis-à-vis du mélange des souches du groupe A et du mélange des souches des groupes (A + B) (Fig. 56b, Annexe 14). Le cv. Picra se révèle plus sensible au mélange des souches des groupes (A + B) qu'à celui des souches du groupe A. Les cvs. Samourai et Westar sont sensibles à tous les mélanges.

	Groupe A				Groupe B					Mélange A+B
	MXCI 1	MX1-13 2	A942 3	Mélange A 4	B945 5	MX-6 6	B867 7	P3-1 8	Mélange B 9	
Lignée MX	2.72 b ¹	1.44 b	1.28 b	1.76 c	0.96 a	1.54 a	1.61 a	1.68 b	1.09 a	1,15 a
Lignée MXS	2.45 b	1.65 c	0,88 c	1.14 d	0,23 d	0,99 b	1.31 a	1.64 b	0,68 b	1,31 a
cv. Picra	0,93 c	1,14 d	1,07 bc	1,43 c	1,09 a	1,14 a	0,86 b	1,29 b	1,2 a	1,15 a
cv. Samourai	2,51 b	2,48 a	2,7 a	2,6 b	0,69 b	1,06 ab	1,33 a	1,46 b	1,01 a	0,84 b
cv. Westar	3,13 a	3a	2,81 a	4a	0,4 c	1,5 a	1,54 a	2,26 a	1,16 a	1,63 a

¹ Les indices suivis de la même lettre ne sont pas significativement différents au seuil de 1 %. (A lire uniquement verticalement)

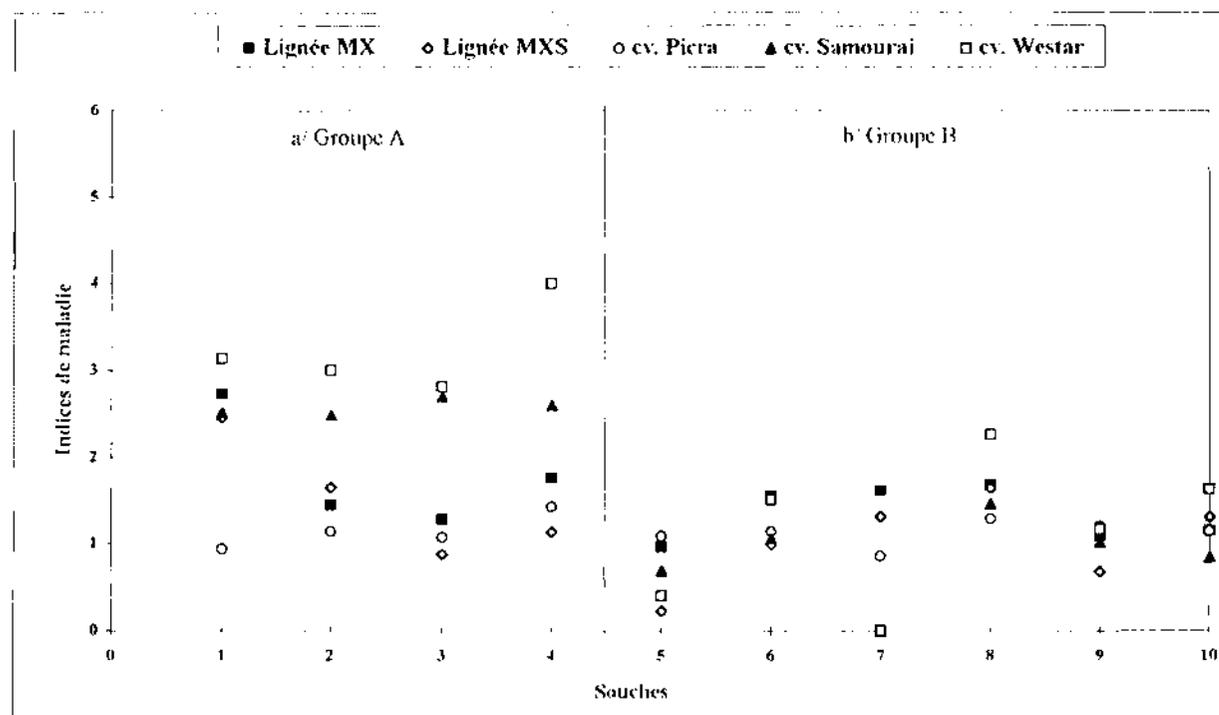


Figure 57 : Comparaison en serre de la réaction foliaire de cinq génotypes vis-à-vis de quelques souches et isolats des groupes A et B et de leurs mélanges.

b) Evaluation de la résistance des feuilles

Les groupes A et B sont capables de provoquer des symptômes foliaires (Fig. 54). Les macules induites par certaines souches du groupe A (Fig. 54a) se distinguent de celles causées par le groupe B (Fig. 54b) par la forte chlorose (groupe B) et la production abondante de pycnides (groupe A).

1) Vis-à-vis de chaque souche du groupe A et de leur mélange

Les cinq génotypes testés varient pour leur réaction foliaire à l'inoculation par chacune des souches du groupe A (Fig. 57a). Les deux lignées sont très résistantes aux souches MX1-13 et A942 et mais sont moyennement résistantes à l'isolat MXC1. Le cv. Picra et les cultivars de Colza sont respectivement résistants et sensibles à l'ensemble des souches. Le comportement des différents génotypes vis-à-vis du mélange de souches est similaire à celui observé avec chacune des souches inoculées individuellement sauf pour le cv. Westar qui se montre très sensible avec un IM = 4.

2) Vis-à-vis de chaque souche du groupe B et de leur mélange

Comparativement aux souches du groupe A, le niveau de maladie causé par le groupe B est très faible sur les feuilles (Fig. 57b). A l'exception de la souche P3-1 sur le cv. Westar, la gravité des symptômes foliaires ne dépassent guère un IM = 2. Les lignées, le cv. Picra, le cv. Samourai et dans une certaine mesure le cv. Westar sont résistants à chaque souche et à leur mélange.

3) Vis-à-vis du mélange des souches des groupes (A + B)

Les lignées et le cv. Picra possèdent une bonne résistance foliaire à tous les mélanges de souches et les indices de maladie induits par ces mélanges ne sont pas significativement différents les uns des autres sur ces génotypes (Fig. 57b, Annexe 15). Cependant, les cvs. Samourai et Westar sont plus sensibles au mélange des souches du groupe A qu'à celui des souches (A + B).

c) Evaluation de la résistance des tiges

Le groupe A provoque à la base des tiges des symptômes externes qui se distinguent par la dégradation des tissus du cortex. Des lésions chancreuses d'aspect liégeux, quelquefois profondes, sont observées sur les génotypes sensibles. Dans certains cas des pycnides sont présentes. A l'opposé, les symptômes induits par le groupe B se caractérisent par un noircissement plus ou moins intense de la

	Groupe A					Groupe B					
	MXC1	MX1-13	A942	Mélange A	Mélange A+B ²	B945	MX-6	B867	P3-1	Mélange B	Mélange A+B ³
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Lignée MX	4,35 b ¹	2,79 c	2,3 c	3,6 b	2,3 b	2,5 a	2,1 b	2,9 b	2,37 b	2,2 a	0,9 b
cv. Picra	3,47 c	4 b	3,58 b	3,45 b	1,05 c	2,8 a	3,25 a	3,6 a	3,2 a	2,6 a	2,25 a
cv. Westar	5,68 a	5,8 a	4,9 a	5,4 a	3,8 a	2,65 a	2,75 a	2,11 c	2 b	2,2 a	0,35 c

¹ Les indices suivis de la même lettre ne sont pas significativement différents au seuil de 1 %. (A lire uniquement verticalement)

² Symptômes notés selon l'échelle appliquée aux souches du groupe A

³ Symptômes notés selon l'échelle appliquée aux souches du groupe B

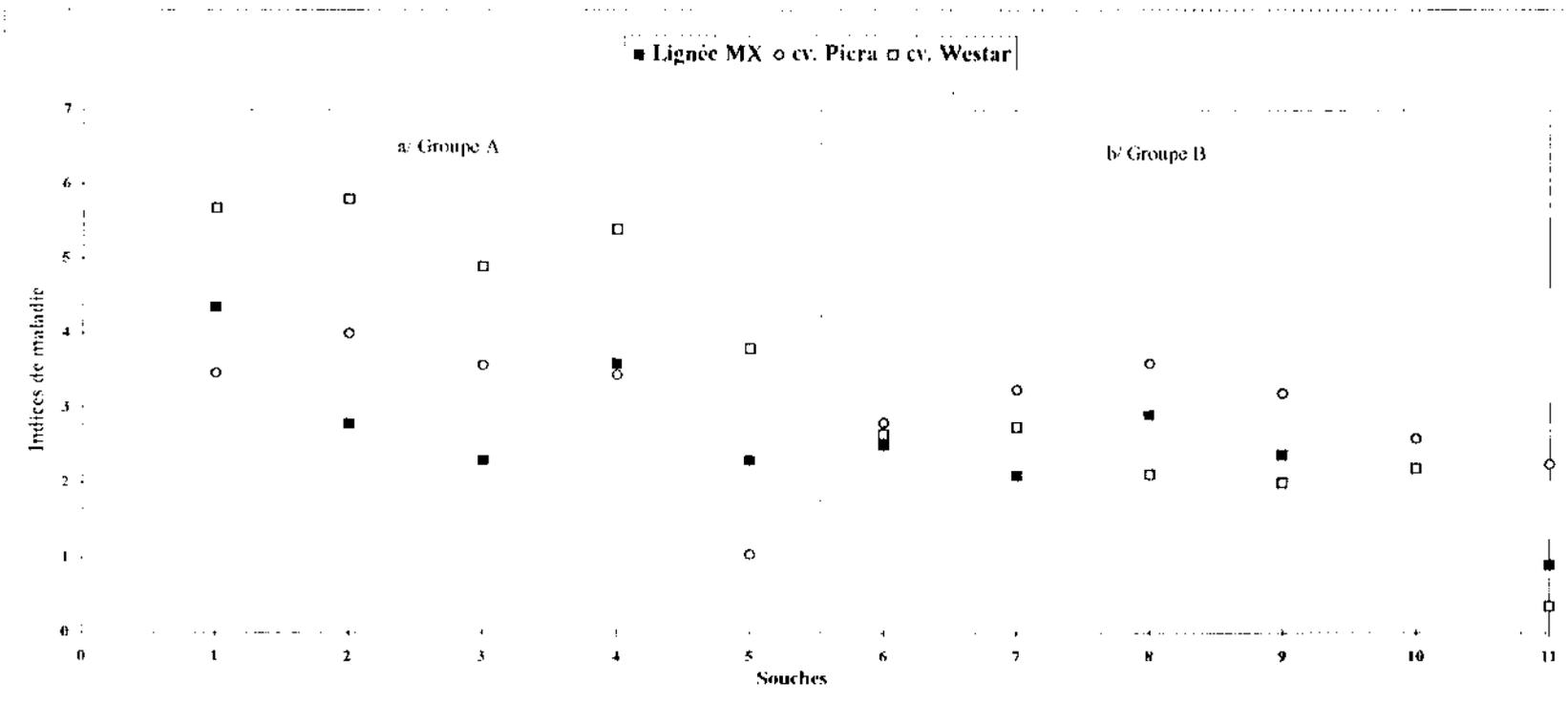


Figure 58 : Comparaison, en serre, de la réaction au niveau de la tige de trois géotypes de type printemps vis-à-vis de quelques souches des groupes A et B et de leurs mélanges, 58 jours après l'inoculation.

moelle de la tige. Dans certains cas, les tissus ligneux peuvent présenter des noircissements sans dégradation liégeuse (Fig. 55).

Le groupe A et le groupe B induisant des symptômes différents sur les tiges, la réaction des génotypes vis-à-vis du mélange des souches A et des souches B est évaluée simultanément suivant deux échelles différentes (Annexes 3 et 3b).

1) Des génotypes de type printemps

❶ Vis-à-vis des souches du groupe A

Les indices de maladie (IM) causés par les souches du groupe A sur les tiges des génotypes de printemps varient de 2,3 (résistance) à 5,8 (sensibilité) (Fig. 58a). La lignée MX, sensible à l'isolat MXC1 (IM=4,35) montre une forte résistance aux souches MX13 (IM=2,79) et A942 (IM=2,3). Le cv. Westar est fortement sensible à l'ensemble des souches du groupes A alors que le cv. Picra s'avère moyennement sensible.

❷ Vis-à-vis des mélanges des souches du groupe A et des groupes (A+B)

Tous les génotypes sont sensibles au mélange des souches du groupe A ($3,45 \leq IM \leq 5,4$) (Fig. 58a). La lignée MX et le cv. Picra ont un comportement intermédiaire comparativement aux souches inoculées individuellement. Les génotypes diffèrent significativement entre eux quand ils sont inoculés avec le mélange de souches des groupes (A + B) et leur résistance est accrue.

❸ Vis-à-vis des souches du groupe B et de leur mélange

Les différences significatives dans le classement des génotypes soulignent l'existence de légères variations de leur niveau de résistance à certaines souches du groupe B (Fig. 58b). L'indice de maladie le plus élevé (IM=3,6) est obtenu sur le cv. Picra confronté à l'isolat B867. D'une manière générale, la lignée MX est résistante à l'ensemble des souches du groupe B ainsi qu'au mélange des souches du groupes B.

❹ Vis-à-vis du mélange des souches des groupes (A + B)

La résistance de certains génotypes peut être plus élevée vis-à-vis du mélange associant les souches des groupes (A + B) que vis-à-vis du mélange des souches du groupe A ou du mélange des souches du groupe B (Annexe 16). Par exemple, sur la lignée MX et le cv. Westar, la gravité des symptômes induits par le mélange des souches des groupes (A + B) est très fortement atténuée comparativement aux symptômes causés par les souches du groupe A.

	Groupe A					Groupe B					Mélange A+B ³
	MXC1 1	MX1-13 2	A942 3	Mélange A 4	Mélange A+B ² 5	B945 6	MX-6 7	B867 8	P3-1 9	Mélange B 10	
Lignée MXS	4,22 b ¹	5,05 a	4,53 a	4,2 a	0,63 b	3,11 a	2,63 a	1,84 b	3b	3,15 a	2,5 a
cv. Samouraï	5,37 a	4,65 a	4a	4,5 a	2,37 a	3,27 a	2,45 a	2,5 a	3,84 a	3,6 a	0,74 b

¹ Les indices suivis de la même lettre ne sont pas significativement différents au seuil de 1 %. (A lire uniquement verticalement)

² Symptômes notés selon l'échelle appliquée aux souches du groupe A

³ Symptômes notés selon l'échelle appliquée aux souches du groupe B

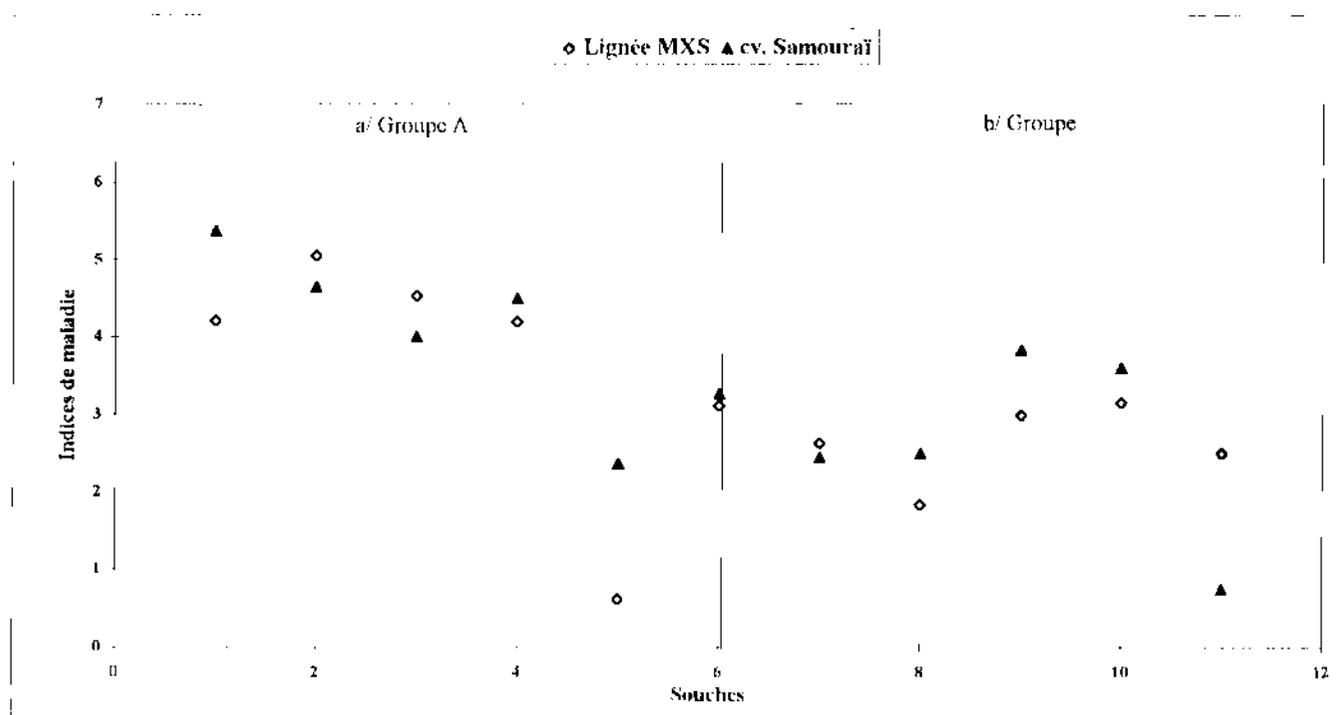


Figure 59 : Comparaison en serre de la réaction au niveau des tiges de deux génotypes d'hiver vis-à-vis de quelques souches et isolats des groupes A et B et de leurs mélanges. Agressivité de quelques souches et isolats des groupes A et B, en serre, sur les tiges des génotypes de type hiver, 58 jours après l'inoculation.

2) Des géotypes de type hiver

❶ Vis-à-vis des souches du groupe A et des mélanges de souches

La lignée MXS et le cv. Samourai sont plus sensibles aux souches du groupe A et à leur mélange (Fig. 59a) qu'aux souches du groupe B (Fig. 59b). Les deux géotypes diffèrent légèrement par rapport à leur réaction à certaines souches du groupe B.

Le mélange des souches du groupe A et le mélange des souches du groupe B sont respectivement agressifs et moyennement agressifs sur la lignée MXS et le cultivar Samourai (Annexe 17). Lorsque les deux groupes de souches sont associés, deux cas de figure sont possibles :

-l'évaluation de la maladie effectuée suivant l'échelle appliquée au groupe A révèle que la maladie est moins importante sur la lignée MXS que sur le cv. Samourai.

-une situation inverse est observée si l'on s'intéresse au type de symptômes provoqué par le groupe B (notation suivant l'échelle appliquée au groupe B) : la lignée MXS s'avère plus sensible que le cv. Samourai.

Il ressort de cette analyse que les deux types de symptômes sont induits par le mélange des souches des groupes (A + B) sur la lignée MXS et le cv. Samourai. Les différences significatives observées entre les mélanges A et (A+B) sur la lignée MXS d'une part, et entre le mélange B et (A+B) sur le cv. Samourai d'autre part, pourraient être le résultat de la compétition entre les souches des deux groupes dans le mélange.

d) Conclusion

Vis-à-vis des souches du groupe A, la résistance des lignées MX et MXS et du cv. Picra au stade cotylédonaire est également observée sur les feuilles. A l'inverse, les cultivars de Colza manifestent une forte sensibilité des cotylédons et des feuilles. Si la réaction des organes foliaires montre une corrélation avec celle des tiges chez le Colza, il n'en est pas de même pour la Moutarde brune. Ce géotype présente une bonne résistance foliaire mais est moyennement sensible aux attaques sur les tiges. Chez la lignée MX, une bonne corrélation pour la réaction des différents organes est mise en évidence, ce qui n'est pas le cas pour la lignée MXS. Par contre, la sensibilité au niveau des tiges de la lignée MXS contraste avec la résistance des cotylédons et des feuilles.

Pour les souches du groupe B, tous les géotypes sont sensibles au stade cotylédonaire et résistants au stade foliaire. Des variations mineures sont cependant observées sur les tiges des différents géotypes : les cvs. Picra et Samourai sont les plus sensibles à ce groupe de souches.

III-DISCUSSION

Disposer d'une méthode d'évaluation de la résistance qui soit efficace et reproductible constitue un préalable à la sélection pour la résistance à la Nécrose du collet. Celle-ci sera d'autant plus utile qu'elle permettra à la plante d'exprimer tous ses mécanismes de défense.

EFFET DU GROUPE DE SOUCHES SUR L'EXPRESSION DE LA MALADIE

Les résultats obtenus en serre montrent que les deux groupes de souches sont capables de causer des symptômes plus ou moins importants sur les différents organes des lignées de recombinaison Colza-Moutarde brune, des cultivars de Colza et de Moutarde brune.

Cependant, les souches des groupes A et B diffèrent par le type de symptômes induits et par leur agressivité sur les différents organes analysés. Contrairement aux souches du groupe A, les symptômes foliaires provoqués par les souches du groupe B sur les génotypes sensibles présentent très peu ou pas de pycnides et se caractérisent par une marge régulière. Ces résultats sont en accord avec la description de Johnson et Lewis (1994). Cependant, la variabilité de la réponse des génotypes aux attaques des groupes A et B entraîne des difficultés dans la distinction entre les deux types de symptômes.

La description des symptômes causés sur les tiges par les souches de *L. maculans* soulignent l'existence d'une certaine spécialisation des deux groupes de souches dans la manifestation de la maladie. De plus, notre méthode d'inoculation montre que la nécrose du collet et les symptômes de noircissement de la moelle peuvent résulter de la pénétration du champignon à travers des blessures qui, au champ, pourraient se réaliser par l'intermédiaire des insectes (Newman, 1984) ou par des microblessures causées par des variations brusques de température et/ou par des vents forts. Les dégradations de la moelle sont moins visibles et moins spectaculaires que les lésions chancreuses du collet si bien que leur importance est généralement sous-estimée dans les études réalisées au champ (Johnson et Lewis, 1994). Il convient alors de prendre en compte les différents types de symptômes foliaires et caulinaires provoqués par les deux groupes de souches si l'on veut évaluer efficacement la résistance des génotypes vis-à-vis des populations de *L. maculans*.

EFFET DES DIFFERENTS ORGANES DE LA PLANTE SUR L'EXPRESSION DE LA RESISTANCE

La manifestation de la Nécrose du collet et l'importance des dégâts causés par cette maladie sont tributaires en partie du niveau de résistance des organes d'accueil. En effet, l'épidémie démarre à partir des organes foliaires (Hammond *et al.*, 1985) qui deviennent les sites de multiplication de

l'inoculum secondaire. De ce fait, la résistance foliaire est une composante essentielle de la résistance globale de la plante de Colza dans la mesure où elle contribuerait à restreindre l'efficacité des infections (Mithen *et al.*, 1987), la restriction du développement des lésions et de la phase systémique dans la tige (Hammond et Lewis, 1987 a,b).

Nos résultats montrent que l'intensité de la maladie sur un génotype donné dépend de l'organe concerné et du groupe de souches.

Sur les cotylédons, les lignées de recombinaison Colza-Moutarde brune et la Moutarde brune sont résistantes aux souches du groupe A alors que le Colza est sensible. Le spectre de virulence des souches du groupe B est plus important lorsque l'inoculation a lieu sur les cotylédons : les lignées, le Colza et la Moutarde brune sont sensibles aux souches du groupe B. La gravité des attaques sur les cotylédons est toutefois plus importante en chambres climatisées qu'en serre. Cette différence pourrait être liée aux conditions environnementales. En effet, les taux d'humidité relative (Lacoste *et al.*, 1969) et les températures (Badawy *et al.*, 1992) interviennent sur l'expression de la maladie.

Sur les feuilles, la gravité des attaques dues aux souches du groupe A est variable suivant les génotypes avec toutefois un niveau de maladie plus faible que sur les cotylédons. Les génotypes portant la résistance d'origine Moutarde brune sont généralement moins attaqués que le Colza. Les souches du groupe B manifestent une très faible agressivité sur les feuilles quel que soit le génotype testé. Les cotylédons pourraient donc constituer un support nutritif plus favorable à la croissance et à la fructification du champignon que les feuilles. Les mécanismes de résistance sont encore mal élucidés. Après la pénétration dans les tissus foliaires, le champignon pourrait être restreint dans sa progression sur les génotypes résistants (Hammond *et al.*, 1985). Mithen *et al.*, (1987) montrent une bonne corrélation entre le taux de glucosinolates et la taille des macules foliaires chez des espèces voisines du Colza (*B. oleracea* et *B. rapa*). Sur ces espèces, les lésions localisées sont associées à une forte accumulation de glucosinolates alkénylés alors que les lésions plus importantes se caractérisent par une faible présence de ces composés. Par ailleurs, la formation de composés fongitoxiques synthétisés *de novo* (les phytoalexines) dans les tissus cotylédonaire et foliaires en réponse à une élicitation d'ordre parasitaire ou abiotique a été mise en évidence par Rouxel *et al.* (1991) chez des lignées de Colza ayant introgressé un gène de résistance de la Moutarde brune.

La gravité des attaques cotylédonaire causées par les souches du groupe A est corrélée à l'importance des dégâts provoqués sur les feuilles. Ce résultat est en accord avec ceux obtenus par Bansal *et al.* (1994) qui observent une bonne corrélation entre la réaction des cotylédons et des feuilles en évaluant la résistance de lignées haploïdes doublés de Colza vis-à-vis de huit souches canadiennes du groupe A

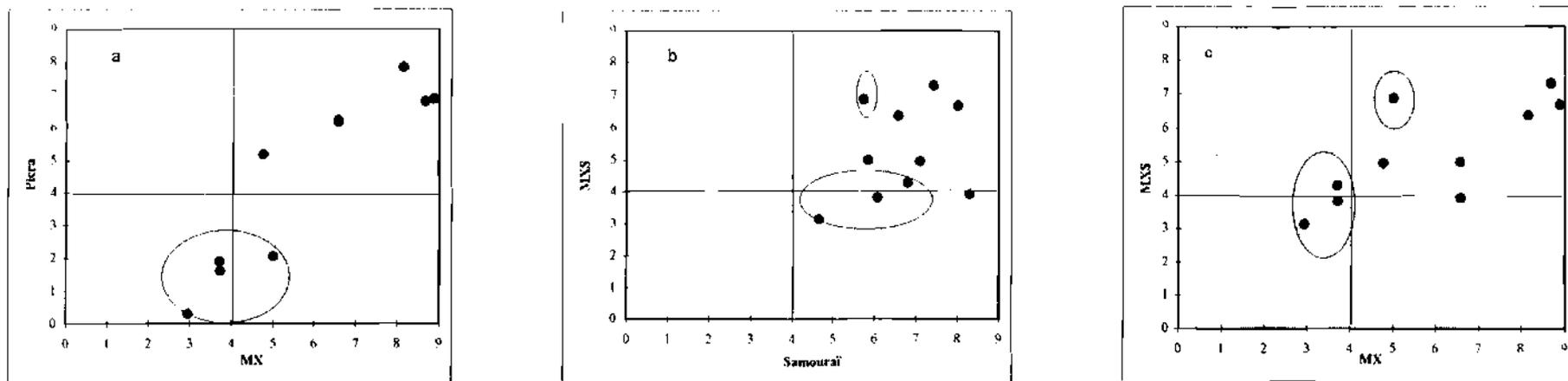


Figure 60 : Comparaison du pouvoir pathogène de quelques souches du groupe A (●) et du groupe B sur différents génotypes pris deux à deux, au stade cotylédonaire.

La réaction des tiges à l'inoculation par les souches du groupe A donne des résultats variables en fonction des génotypes. La résistance intermédiaire de la lignée MX aux deux premiers stades ainsi que la sensibilité des cultivars de Colza, sont corrélés à la réponse des tiges. Cette bonne corrélation de la réaction des différents organes est également obtenue sur le Colza par Kutcher *et al.* (1993). La sensibilité des tiges de la Moutarde brune au groupe A rejoint les résultats obtenus par Salisbury et Ballinger (1993) avec deux cultivars de *B. juncea*. Ces auteurs mettent en évidence qu'une souche du groupe A, non agressive sur les cotylédons, est pathogène sur les tiges.

Une grande sensibilité des tiges de la Moutarde brune vis-à-vis des souches du groupe B est observée dans nos conditions. Johnson et Lewis (1994) obtiennent les mêmes types de symptômes et montrent que *B. juncea* et *B. carinata* sont les espèces de Moutardes les plus sensibles à ce groupe de souches au stade cotylédonaire. La sensibilité de la Moutarde brune aux attaques de la tige par les souches du groupe B est en accord avec les résultats rapportés dans le chapitre I de la première partie concernant les populations isolées de cv. Picra (p. 44-54).

EFFET DU FOND GENETIQUE ET DU GENE DE RESISTANCE SUR L'EXPRESSION DE LA RESISTANCE

Au stade cotylédonaire, il semble, en comparant le pouvoir pathogène de l'ensemble des souches sur le couple MX et Picra ($\rho=0,91$) et le couple MX et MXS ($\rho=0,75$), que le fond génétique Moutarde (Fig. 60a) et le fond génétique Colza (Fig. 60c) interviennent peu sur l'expression du gène de résistance. Par contre, l'effet du gène dans un même fond génétique Colza (cv. Samourai) est important ($\rho=0,32$), certaines souches sont en effet plus agressives sur le cv. Samourai que sur la lignée MXS (Fig. 60b).

EFFET DES MELANGES DE SOUCHES SUR L'EXPRESSION DE LA RESISTANCE

En conditions naturelles, la situation la plus commune est la contamination des différents organes de la plante par des ascospores ou des pycniospores de plusieurs souches du groupe A et/ou du groupe B.

Les résultats obtenus avec le mélange de deux souches et un isolat du groupe A concordent quel que soit l'organe testé. Le mélange permet de distinguer nettement les différents niveaux de résistance des génotypes. De plus, comparativement aux souches inoculées individuellement, nous montrons un effet de synergie entre les souches dans le mélange. Dans certains cas, sur les cotylédons et les tiges, le niveau d'agressivité du mélange correspond à une valeur supérieure à l'agressivité de certaines souches inoculées individuellement. Un parallèle peut être fait avec un résultat similaire obtenu chez le Mildiou de la vigne dû à *Plasmopara viticola*. Li *et al.* (1986) montrent que le pouvoir pathogène d'un mélange

de clones différents utilisé en infection artificielle est supérieure à celui des clones utilisés séparément. Selon les auteurs, cette synergie peut s'expliquer par une complémentarité de codage génétique entre des noyaux différents. **Nos résultats indiquent l'intérêt du mélange de souches différant par leur niveau d'agressivité pour une évaluation efficace de la résistance à la Nécrose du collet. La même conclusion peut être retenue pour le mélange des souches du groupe B.**

L'inoculation du mélange des deux groupes de souches met en évidence un effet de compétition entre souches conduisant à la baisse importante du niveau d'agressivité sur certains génotypes par rapport au mélange A sur les feuilles et les tiges. Mahuku *et al.* cités par Thürwächter *et al.* (1995), en inoculant successivement des feuilles de Colza avec une souche du groupe B puis avec une souche du groupe A, montrent une réduction de la gravité de la maladie provoquée par la souche du groupe A. Nos travaux montrent également que l'inoculation du mélange des deux groupes de souches permet d'observer des symptômes typiques de chaque groupe sur les tiges, cependant leur gravité est généralement amoindrie par rapport à chaque souche prise séparément. **Le mélange de souches du groupe A et du groupe B ne serait pas à préconiser pour la sélection.**

Enfin, nos travaux soulignent toute la complexité de l'évaluation des symptômes sur la tige lorsque les plantes sont contaminées à la fois par des souches du groupe A et par des souches du groupe B, ce qui correspond, sans doute le plus souvent, au cas des plantes au champ.

Chapitre 2 : CARACTERISATION DE LA RESISTANCE DE LIGNEES DE RECOMBINAISON COLZA-MOUTARDE BRUNE, AU CHAMP

I-INTRODUCTION

L'utilisation de souches caractérisées pour évaluer la résistance de génotypes de Colza vis-à-vis de *L. maculans*, bien que pouvant présenter des avantages indéniables pour la sélection, ne reflète pas la situation complexe qui se produit dans les populations naturelles du champignon. De plus, les conditions contrôlées favorables au développement de la maladie, en chambre climatisée ou en serre, peuvent influencer sur la physiologie de la plante et modifier ses réactions, comparativement à ce qu'elles seraient dans les conditions environnementales très différentes rencontrées au champ. La caractérisation de la résistance au champ est donc toujours une étape indispensable. Notre objectif consistant à étudier la durabilité potentielle des lignées de recombinaison Colza-Moutarde brune, nous nous sommes donc placé dans des conditions d'inoculum naturel mais plus ou moins structuré par la résistance d'origine Moutarde brune. En effet, le dispositif expérimental que nous avons adopté (Annexe 1) permet de simuler le contexte parasitaire que pourrait créer la culture répétée de cette nouvelle source de résistance.

II-MATERIELS ET METHODES

Le matériel végétal utilisé est décrit dans le tableau 7. Deux expérimentations ont été effectuées (1993-1994 et 1994-1995) dont le principe et la conduite des essais sont expliqués dans la partie Matériels et Méthodes (p. 41-43).

Ne disposant pas des parents de la lignée MX, nous avons utilisé comme cultivars de référence le cv. Samourai comme Colza d'hiver sensible et le cv. Picra pour la Moutarde brune. En deuxième année, nous avons disposé d'une lignée de recombinaison Colza-Moutarde brune de type hiver MXS dont les parents sont la lignée MX et le cv. Samourai (Fig. 11).

En 1993-1994, la présence de macules foliaires a été notée sur trois génotypes, le 23 mars 1994. Le nombre de feuilles malades par plante, c'est-à-dire les feuilles portant au moins une macule, a été obtenu sur 30 plantes par répétition et quatre répétitions par génotype. Quinze jours avant la récolte, la notation de la nécrose du collet a porté sur l'ensemble des génotypes mis en place

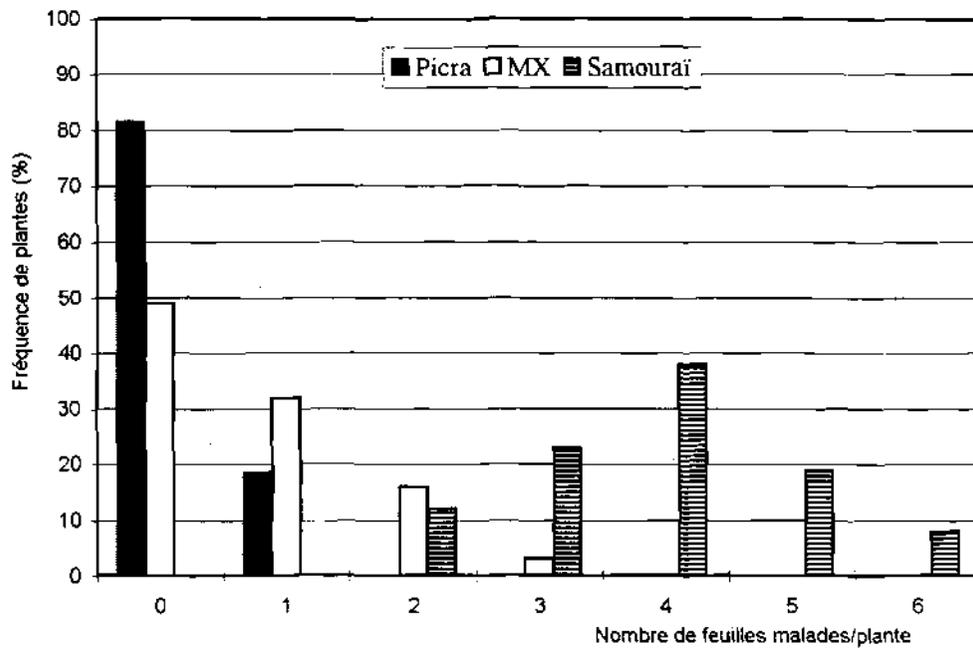


Figure 61 : Comportement au champ de la lignée MX, du cv. Samourai et du cv. Picra vis-à-vis des macules foliaires (Année 1993-1994).

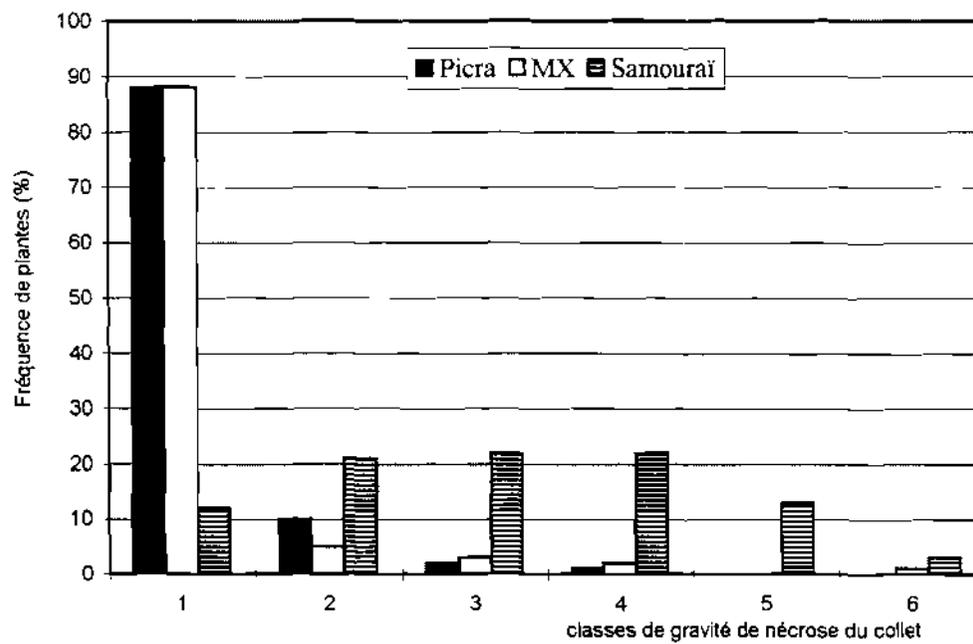


Figure 62 : Comportement au champ de la lignée MX, du cv. Samourai et du cv. Picra vis-à-vis de la nécrose du collet (Année 1993-1994).

Tableau 29 : Indices moyens de nécrose du collet de lignées de recombinaison Colza-Moutarde brune (MX, LR1 et LR3) comparativement à quelques cultivars de Colza et un cultivar de Moutarde brune (cv. Picra) cultivés au champ en 1993-1994.

Génotypes	Indice moyen de nécrose du collet	Groupes homogènes de Newman & Keuls (5%)	
cv. Shogun	6,34	A	
cv. Samourai	4,29	B	
cv. Falcon	3,31	B	
cv. Darmor	2,07	C	
Lignée MX	1,08	C	D
Lignée LR3	0,6	C	D
Lignée LR1	0,52	C	D
cv. Picra	0,24	D	

au champ, à raison de 30 plantes par répétition et de quatre répétitions par génotype (cf. Matériels et Méthodes, p. 41-42).

III-RESULTATS

a) Campagne 1993-1994

Cette campagne a été marquée par une pluviométrie faible au moment de l'apport des résidus de tiges contaminées, durant le mois de novembre. Ensuite, toute la période de décembre à mars est caractérisée par une pluviométrie relativement abondante (Fig. 15b). Les températures très basses au moment de l'inoculation (6°C) se sont radoucies à la reprise de végétation.

1) Evaluation de la résistance des feuilles.

Quatre mois après l'inoculation, toutes les plantes du cv. Samourai portent des macules. La lignée MX présente 51 % de plantes malades et le cv. Picra seulement 18,5 % (Fig. 61).

Pour le cv. Samourai, le nombre de feuilles malades par plante contaminée varie de deux à six. La lignée MX se caractérise par un nombre de feuilles malades par plante ne dépassant pas trois feuilles. Chez le cv. Picra, ce nombre se limite à une feuille malade par plante.

Des différences sont également observées dans le nombre moyen de macules par feuille malade qui varie d'une macule pour le cv. Picra, une à deux pour la lignée MX à plus de dix pour le cv. Samourai (résultats non présentés).

2) Evaluation de la résistance à la nécrose du collet.

La comparaison des indices moyens de nécroses du collet de l'ensemble des génotypes étudiés au champ (Tableau 29), distingue trois groupes de génotypes en fonction de leur niveau de résistance :

- Le génotype très sensible : cv. Shogun.
- Les génotypes moyennement sensibles : cv. Samourai et cv. Falcon
- Les génotypes résistants : cv. Darmor, les lignées MX, LR1, LR3 et le cv. Picra.

La distribution des plantes dans les classes d'intensité de maladie (Fig. 62) montre que les plantes du cv. Samourai sont représentées dans toutes les classes et qu'une proportion importante de plantes sont fortement nécrosées, démontrant la sensibilité de ce génotype. Les plantes de la lignée MX sont sèches au moment du prélèvement du fait de la précocité de ce génotype, mais présentent

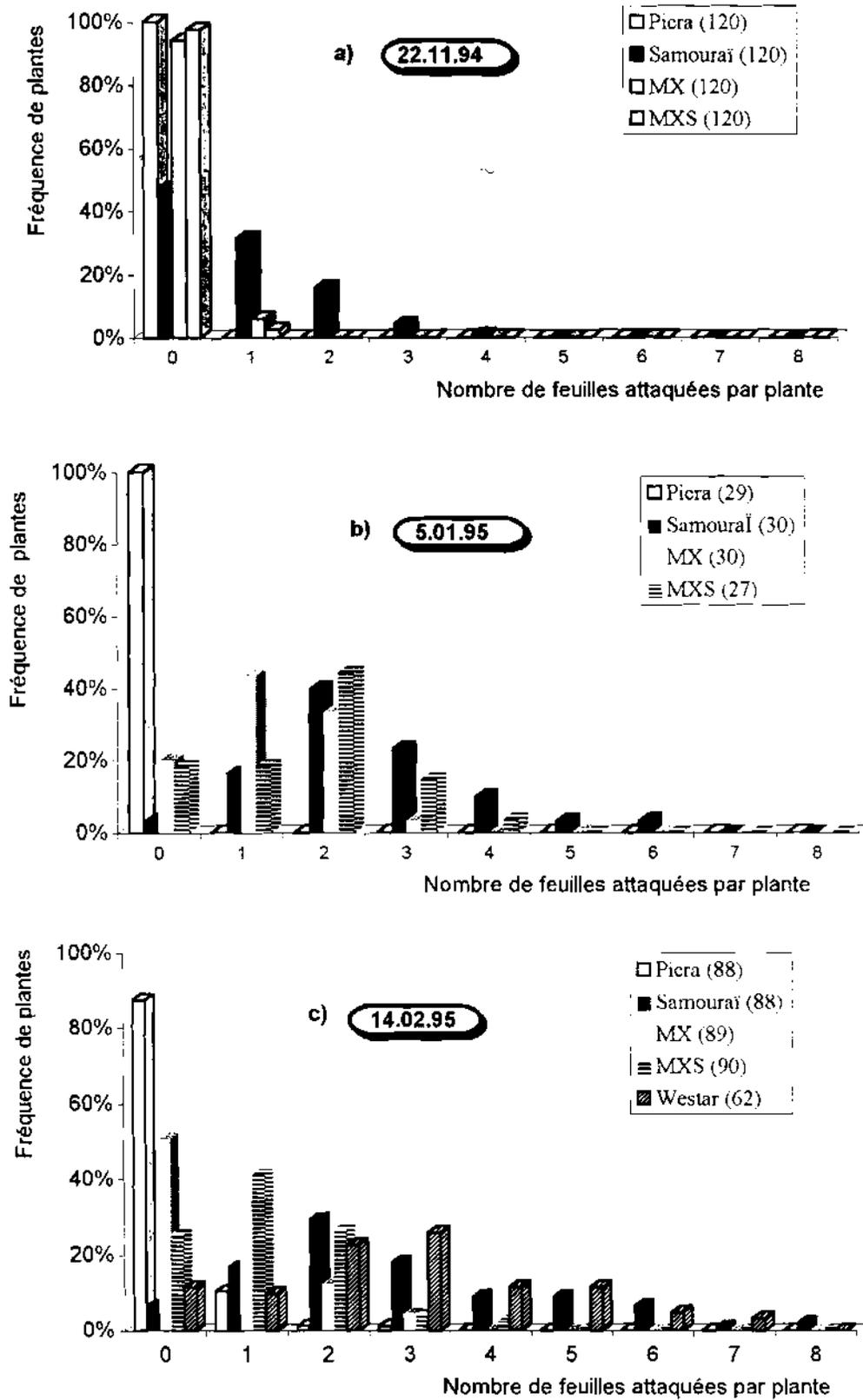


Figure 63 : Evolution pour chaque génotype de la fréquence de plantes dans chaque classe de gravité de maladie. () Effectif de plantes observées par génotype.

très peu de nécrose. Des noircissements intenses du collet et du pivot, à partir desquels des isolements de *L. maculans* ont été réalisés, sont cependant observés. Bien que la majorité des plantes du cv. Picra soient saines, quelques rares plantes peuvent présenter des nécroses typiques pouvant aller jusqu'à la note 4.

3) Conclusion

Les lignées de recombinaison Colza-Moutarde brune et la Moutarde brune présentent une très grande résistance aussi bien aux attaques foliaires qu'à la nécrose du collet, comparativement aux cultivars de Colza. Toutefois, elles ne sont pas indemnes de symptômes dans ce contexte parasitaire où les populations de *L. maculans* sont majoritairement sélectionnées par le Colza. Les deux critères d'évaluation de la résistance utilisés sont corrélés.

b) Campagne 1994-1995

Cette année a été marquée par une pluviométrie abondante après l'apport des résidus de culture contaminés provenant de l'essai précédant. Ces conditions, associées à des températures plus élevées (moyenne de 12 °C en novembre), ont été particulièrement favorables à l'établissement de la maladie. Les premiers symptômes sont observés deux semaines après l'épandage des résidus contaminés.

Afin de repérer certaines phases de l'épidémie pouvant apporter des informations intéressantes sur son déroulement sur les différents génotypes étudiés, nous avons cherché, en 1994-1995, à analyser l'évolution de la maladie aussi bien sur les feuilles que sur le collet par des notations répétées au cours du temps.

Le suivi épidémiologique des symptômes foliaires et du collet a porté sur les lignées MX et MXS et les cv. Picra et Samouraï. Le cv. Westar n'est pris en compte qu'à la dernière date de notation des macules et de la nécrose du collet. Les effectifs de plantes observées pour les symptômes foliaires varient en fonction des dates de notations. La première notation réalisée le 22/11/1994 porte sur 120 plantes par génotype, la deuxième notation (5/01/1995) concerne 30 plantes par génotypes et la dernière notation (14/02/1995) est effectuée sur 90 plantes par génotype.

1) Evaluation de la résistance des feuilles

Dès le 22/11/1994, le cv. Samouraï se distingue par un pourcentage élevé de plantes malades (42.5 %), avec un nombre maximal de quatre feuilles malades par plante (Fig. 63a). Par contre, les

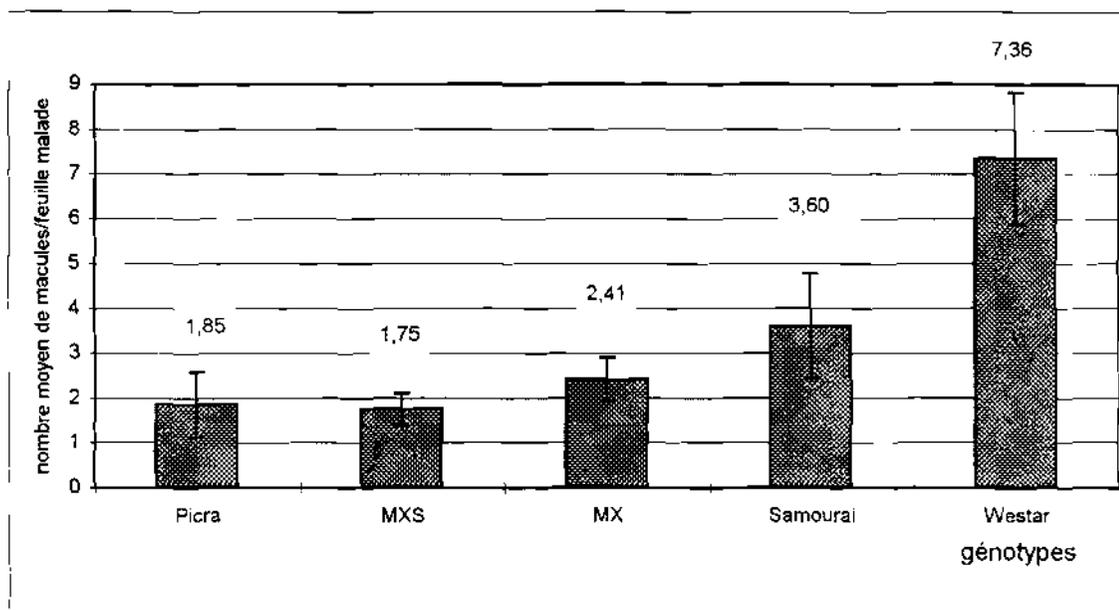


Figure 64 : Nombre moyen de macules par feuille malade, au champ, sur deux lignées de recombinaison Colza-Moutarde brune (MX et MXS), sur le cv. Picra (Moutarde brune), un cultivar de Colza d'hiver Samourai et un cultivar de Colza de printemps Westar. La notation a été effectuée le 14.02.95.

lignées MX et MXS présentent un très faible nombre de plantes malades, respectivement 5,8 % et 2,5 % avec seulement une feuille malade par plante. Toutes les plantes du cv. Picra sont saines.

Une quarantaine de jours plus tard (5/01/1995), la maladie s'est fortement développée sur le cv. Samourai (96,7 % de plantes malades avec six feuilles malades sur certaines plantes) (Fig. 63b). La maladie a également progressé sur les lignées MX et MXS qui ont à cette date respectivement 80 % et 81,5 % de plantes malades (avec un maximum de trois feuilles attaquées par plante pour MX et quatre feuilles attaquées par plante pour MXS). Les plantes du cv. Picra ne présentent toujours aucun symptôme.

Le 14/02/95, 93,2 % des plantes du cv. Samourai portent de une à huit feuilles malades (Fig. 63c). Le cultivar Westar a un comportement sensiblement voisin, avec 88,7 % de plantes malades qui ont de une à sept feuilles avec des macules. Les lignées MX et MXS présentent respectivement 49,5 % et 74,5 % de plantes malades. Le nombre de feuilles malades par plante est identique à la notation précédente. La chute des feuilles les plus âgées, fortement maculées, pourrait expliquer la régression de la maladie sur la lignée MX entre les deux dernières dates de notation.

Les cvs. Westar et Samourai sont les plus attaqués avec en moyenne respectivement 7.36 et 3.6 macules par feuille malade. La lignée MXS et le cv Picra ont en moyenne moins de deux macules par plante. La lignée MX se situe entre les cvs. Samourai et Picra avec en moyenne 2.41 macules par feuille malade (Fig. 64).

Conclusion : L'analyse des contaminations au champ montre que les génotypes varient pour leur résistance foliaire. Le classement des génotypes en fonction de leur résistance est maintenu au cours du temps. L'étude de la cinétique de l'épidémie basée sur le pourcentage de plantes malades et le nombre de feuilles malades par plante a permis de montrer que l'épidémie évolue plus lentement sur les deux lignées (MX et MXS) que sur les cultivars de Colza. L'évaluation du nombre moyen de macules par feuille malade montre également un taux de réussite des infections plus faible sur les lignées de recombinaison Colza-Moutarde brune que sur le Colza.

2) Evaluation de la résistance à la nécrose du collet

Nous avons cherché à étudier par des notations rapprochées (au nombre de six) l'évolution de la maladie sur cinq génotypes à raison de quatre répétitions par génotype. Aux deux dernières dates de notation (16 et 27/06), nous avons comparé les résultats que nous avons obtenus dans nos conditions expérimentales pour la lignée MXS et le cv. Samourai avec ceux obtenus sur ces mêmes génotypes dans un essai, également localisé au Rheu, dont la contamination a été assurée par de l'inoculum constitué uniquement par des résidus de Colza. Les six premières notations sont réalisées

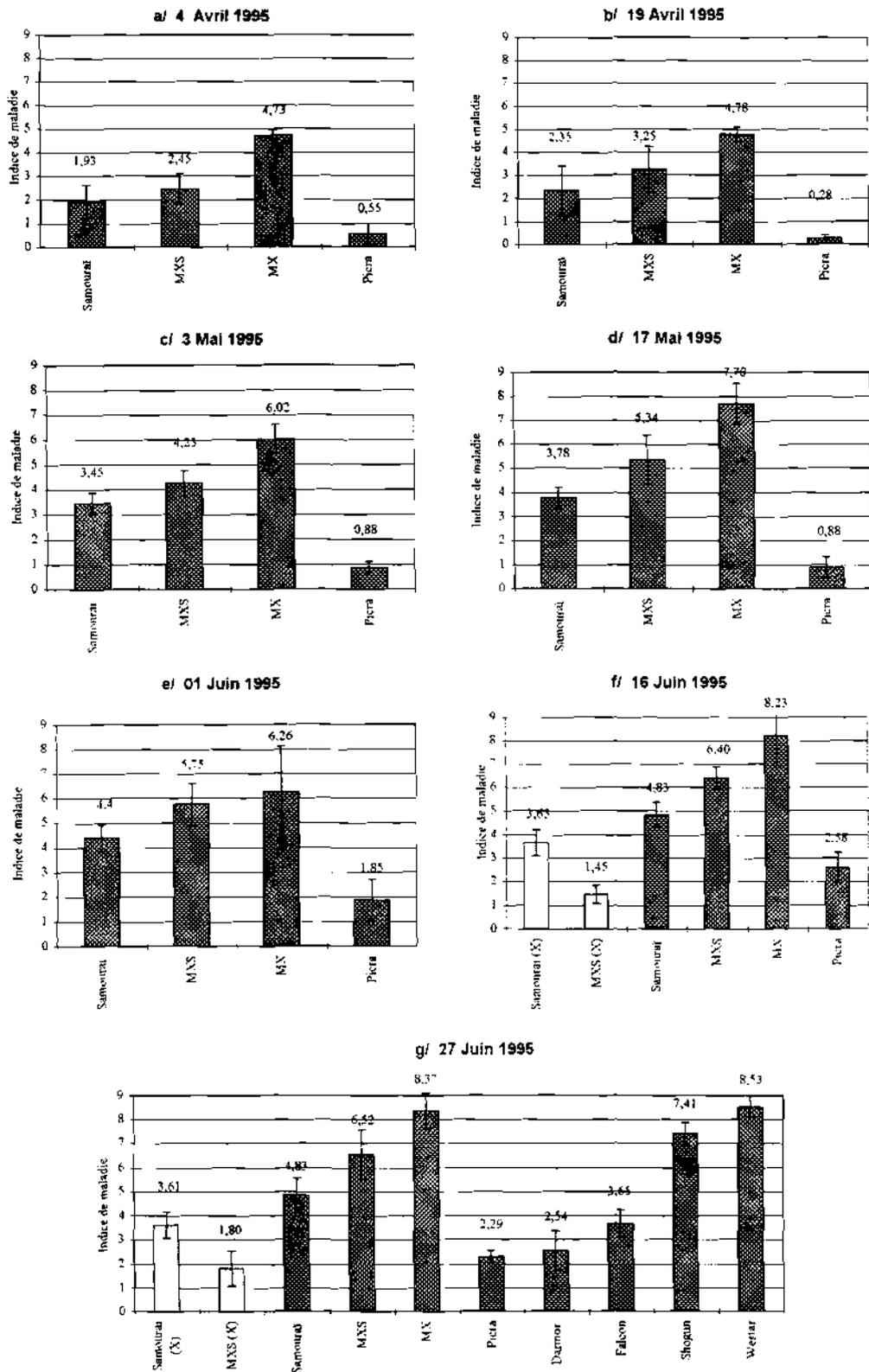


Figure 65 - Comportement au champ vis-à-vis de la Nécrose du collet, à différentes dates de prélèvement, de deux lignées de recombinaison Colza-Moutarde brune (MX et MXS), de quelques cultivars de Colza de référence et du cv. Picra (Moutarde brune). Les populations de *L. maculans* ont été majoritairement sélectionnées soit par la résistance d'origine Moutarde brune, soit par le Colza (X).

sur un effectif de 10 plantes par répétition et par génotype alors que 30 plantes par répétition et par génotype sont notées pour la dernière date.

Lors de la première notation (4/04/95), des nécroses au collet sont observées sur tous les génotypes (Fig. 65a). La lignée MX présente un indice de maladie (IM= 4,73) supérieur à celui du cv. Samourai. De très petites nécroses superficielles sont décelées sur le cv. Picra et des nécroses légèrement plus profondes (IM=2,45) se manifestent sur la lignée MXS, celles-ci ne sont pas significativement différentes de celles observées sur le cv. Samourai.

L'indice de maladie sur le cv. Samourai progresse d'un point tous les mois (Fig. 65), parallèlement à l'augmentation régulière de la température. C'est la lignée MX qui manifeste, et conserve au cours du temps, la plus grande sensibilité. En juin, alors que la gravité de la maladie s'intensifie sur les lignées MX et MXS, le cv. Samourai manifeste une sensibilité moyenne (Fig. 65g) et présente un indice de maladie du même ordre de grandeur que celui qui lui est généralement attribué. Le cv. Samourai et la lignée MXS se montrent sensibles dans nos conditions de populations structurées par la résistance de la Moutarde brune mais présentent un niveau de maladie plus faible lorsqu'ils sont confrontés aux populations structurées par le Colza (Fig. 65 f,g). Dans ce dernier cas, la lignée MXS diffère significativement du cv. Samourai.

L'évaluation de l'incidence de la nécrose du collet sur les huit génotypes étudiés (Fig. 65g) permet de distinguer trois groupes :

- les génotypes sensibles : lignées MX et MXS , cv. Shogun et cv. Westar
- le génotype moyennement sensible : cv. Samourai
- les génotypes résistants : cv. Picra, cv. Darmor et cv. Falcon.

Conclusion : Vis-à-vis des populations de *L. maculans* principalement structurées par la résistance d'origine Moutarde brune, les lignées MXS et surtout MX ont un niveau de sensibilité voisin de celui du cv. Westar, cultivar de printemps très sensible. Le cv. Picra se comporte de manière similaire au cv. Darmor.

L'influence de la structuration des populations de *L. maculans*, soit par le Colza soit par la résistance d'origine Moutarde brune, sur la résistance de lignées de recombinaison Colza-Moutarde brune est illustrée par le comportement de la lignée MXS comparativement au cv. Samourai. En effet, dans le premier cas, la lignée MXS est significativement plus résistante que le cv. Samourai alors que dans le deuxième cas elle ne l'est pas.

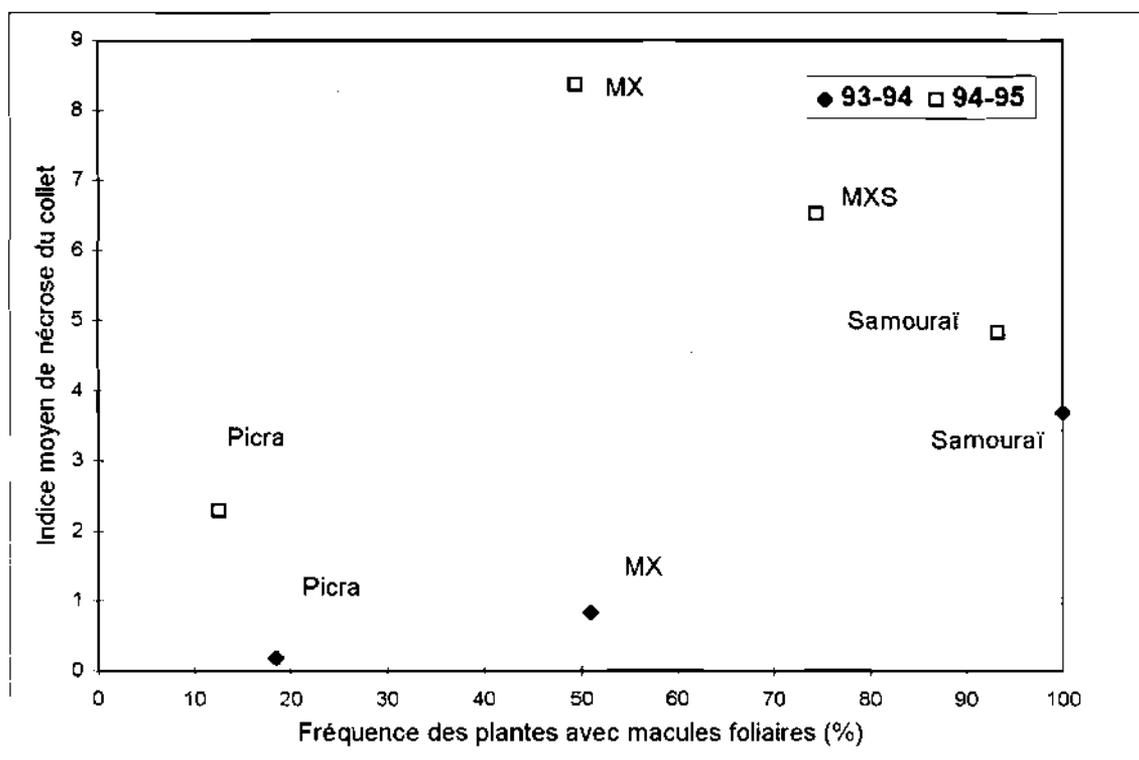


Figure 66 : Relations entre la fréquence des plantes ayant présenté des macules foliaires et l'indice moyen de nécrose du collet des lignées MX et MXS, du cv. Picra (Moutarde brune) et du cultivar de Colza Samouraï pour la campagne 1993-1994 et 1994-1995.

c) Analyse comparée des deux expérimentations au champ

La fréquence des plantes malades au niveau foliaire ne varie pas beaucoup entre les deux années d'expérimentation (Fig. 66) et c'est le cv. Samourai qui manifeste la plus forte proportion de plantes malades (93-100 %). Elle reste par contre très faible sur le cv. Picra (13-18 %) et moyenne à forte (50-74 %) sur la lignée MX. Néanmoins, le nombre moyen de macules par feuille malade est plus élevé la deuxième année sur les lignées résistantes et la Moutarde. Par ailleurs, si la gravité des attaques au collet n'est également pas très différente d'une année à l'autre pour les cultivars de Colza, elle est par contre fortement augmentée sur la lignée MX et le cv. Picra (Fig. 67).

d) Conclusion

Lors de la première année d'expérimentation au champ, dans des populations de *L. maculans* encore majoritairement structurées par le Colza, la résistance des lignées de recombinaison Colza-Moutarde brune s'est avérée efficace vis-à-vis des attaques foliaires et de la nécrose du collet comparativement aux cultivars de Colza de référence. Par contre, lors de la deuxième année de culture leur résistance est contournée. La résistance et la sensibilité manifestées par la lignée MXS, dans un contexte parasitaire respectivement dominé par les souches issues du Colza et des génotypes portant le gène de résistance, témoignent de l'adaptation des populations de *L. maculans* à la résistance des lignées dans notre dispositif expérimental. Malgré cette adaptation, la Moutarde brune exprime encore une résistance élevée aux attaques foliaires et à la nécrose du collet, même si des symptômes plus importants se sont manifestés sur ces différents organes la deuxième année.

IV-DISCUSSION

Les marqueurs du gène de résistance introgressé dans le Colza sont présents dans le génome du cv. Picra, ce qui nous permet d'émettre l'hypothèse que ce cultivar posséderait le gène introduit dans les lignées de recombinaison Colza-Moutarde brune que nous avons étudiées (A. M. Chèvre, comm. pers.).

EFFETS DU GÈNE DE RÉSISTANCE

Les lignées de recombinaison Colza-Moutarde brune et le cv. Picra (Moutarde brune) diffèrent des cultivars de Colza par leur faible taux d'attaque foliaire. La résistance des feuilles, mise en évidence durant les deux années d'expérimentation au champ, chez les lignées et la Moutarde

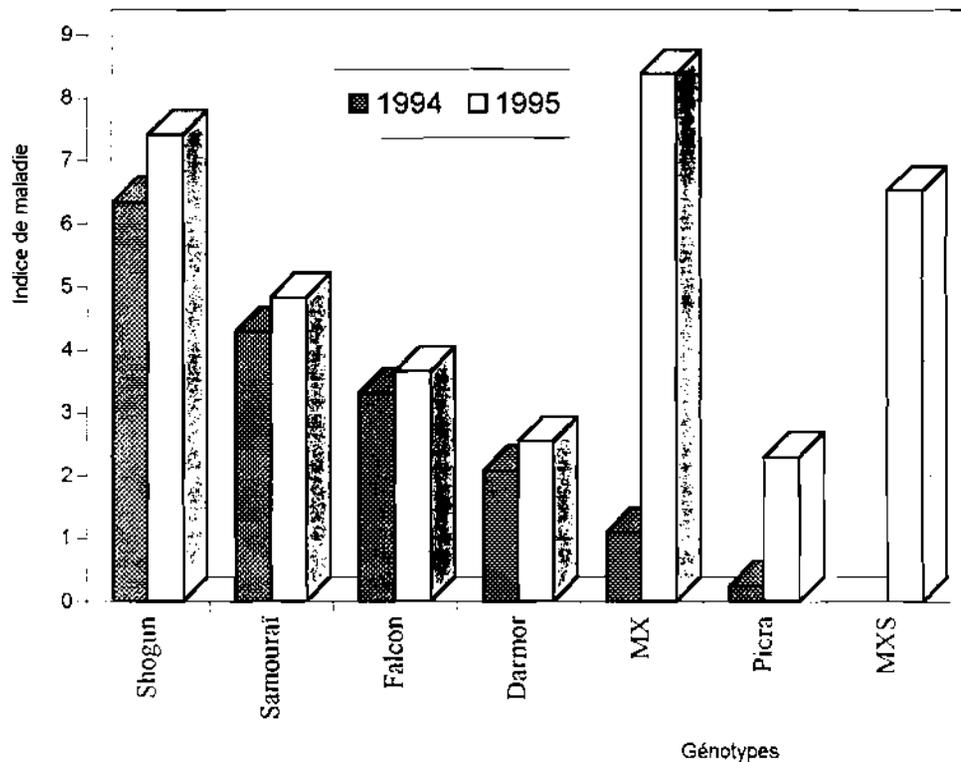


Figure 67 : Comparaison du comportement au champ de lignées de recombinaison Colza-Moutarde brune (MX et MXS), des cultivars de Colza de référence, sensibles et résistants, et d'un cultivar de Moutarde brune (Picra) vis-à-vis de populations de *L. maculans* majoritairement* sélectionnées par la résistance d'origine moutarde brune.

*1994 : Faible proportion, *1995 : Forte proportion

brune pourrait relever de la capacité de ces génotypes à produire des phytoalexines. En effet, Rouxel *et al.* (1990) montrent que la présence du gène de résistance confère aux lignées de recombinaison Colza-Moutarde brune la capacité d'accumuler rapidement et en grande quantité de la brassilexine dans les feuilles. Cette phytoalexine est produite en très faible quantité dans les espèces de *Brassica* dépourvues du génome B dont fait partie le Colza. Ce composé fongitoxique s'opposerait à la réussite des contaminations foliaires. L'épidémie serait donc ainsi limitée dans son évolution sur les génotypes étudiés.

Les observations réalisées au cours de la première année d'expérimentation au champ montrent une bonne corrélation entre la résistance foliaire et la résistance à la nécrose du collet. Cependant, nous avons observé à l'automne 1994, que de nombreux périthèces s'étaient formés sur les résidus de culture des lignées MX, LR1 et LR3 et dans une moindre mesure de la Moutarde brune attestant que le champignon a pu se développer dans les tissus de l'hôte sans que la plante extériorise des symptômes importants. Ce résultat est en accord avec celui de Keri cité par Rimmer et Van den Berg (1992). En effet, l'auteur parvient à isoler *L. maculans* des racines de lignées de *B. juncea* sans aucune manifestation extérieure préalable de la maladie sur les tiges.

Les résidus de culture de la Moutarde brune et surtout des lignées ont constitué l'inoculum principal de l'essai 1994-1995. Le suivi de l'évolution de la maladie sur les différents génotypes durant cette nouvelle campagne, nous permet de montrer que la résistance à la nécrose du collet des lignées de recombinaison Colza-Moutarde brune est contournée. Ces lignées présentent, juste avant la récolte, le même niveau de sensibilité que le cultivar de Colza particulièrement sensible Westar. Il n'existe donc plus de corrélation entre la résistance foliaire et la résistance à la nécrose sur ces génotypes. En effet, le niveau important de la résistance des feuilles contraste avec la très forte sensibilité des plantes à la nécrose du collet.

La comparaison de la réaction de la lignée MXS avec celle du cv. Samourai permet de rendre compte de l'effet du gène sur la gravité de l'épidémie. Dans une population de *L. maculans* structurée par le Colza, la lignée MXS manifeste en effet un très haut niveau de résistance aux attaques du collet attestant de l'efficacité du gène dans le fond génétique Samourai.

Toutefois, dans le contexte parasitaire structuré par la résistance d'origine Moutarde, la résistance monogénique de la lignée MXS est contournée. Cependant, l'évolution et la gravité des symptômes sont significativement différentes de celles de la lignée MX qui reste la plus sensible. Cette différence de réaction entre ces deux lignées pourrait être expliquée par :

- le fond génétique de la lignée MX dont le géniteur Colza (non connu) pourrait posséder une résistance horizontale moins importante que le cv. Samourai.
- la plus grande précocité de la lignée MX qui est de type printemps sachant qu'il existe une relation entre précocité et la sensibilité variétale.

- une meilleure adaptation à la lignée MX des populations de *L. maculans* majoritairement issues de cette lignée.

La moindre sensibilité du cv. Samourai par rapport à la lignée MXS témoignerait de l'efficacité de la résistance horizontale du Colza vis-à-vis des populations agressives sur la résistance d'origine Moutarde brune.

L'ensemble de nos résultats confirme l'hypothèse de Kéri cité par Rimmer et Van den Berg (1992) et Rimmer *et al.* (1995) selon laquelle la résistance de *B. juncea* ne serait pas absolue. Ces résultats vont également dans le même sens que ceux obtenus par Ballinger *et al.* (1991) et Salisbury et Ballinger (1993) qui rapportent l'existence de souches virulentes sur *B. juncea* dans les populations de *L. maculans* en Australie.

Le déterminisme génétique de la résistance de la Moutarde brune est controversé. Kéri cité par Rimmer et Van den Berg (1992) et Rimmer *et al.* (1995) démontrent que deux gènes à effet épistatiques sont impliqués dans la résistance de type hypersensible de *B. juncea* aux stades cotylédonaire et adulte alors que Hill (1991) montre qu'il s'agirait de deux gènes dominants au stade cotylédonaire.

Dans nos conditions expérimentales, il apparaît que l'introgession d'un gène de la Moutarde brune dans le génome du Colza lui confère une résistance spécifique alors que l'action conjuguée des deux gènes serait à l'origine de la résistance générale chez la Moutarde brune s'exprimant par une réaction de type hypersensible comme ce serait le cas chez le couple Mildiou/Pomme de terre. Gees et Hohl (1988) montrent en effet que des plantes de Pomme de terre possédant un niveau élevé de résistance horizontale au Mildiou peuvent développer une réaction morphologiquement semblable à la réaction hypersensible des plantes dont la résistance est verticale.

LA RESISTANCE DU COLZA

L'utilisation de cultivars de Colza dépourvus de la résistance d'origine Moutarde brune et ayant des niveaux de résistance très différents est intéressante à plusieurs titres parce qu'elle permet :

- de comparer le niveau de résistance des lignées avec celui des cultivars de Colza résistants.
- d'évaluer l'effet des conditions climatiques sur la gravité de l'épidémie.

- d'évaluer le comportement du Colza dans les populations structurées par la nouvelle source de résistance. En effet, la stabilité du comportement des cultivars de Colza au cours des deux dernières années d'expérimentation au champ souligne l'efficacité de la résistance partielle de certains génotypes tels que cv. Darmor et cv. Falcon. Les changements opérés dans les populations du champignon, avec l'augmentation de la fréquence de pathotypes nouveaux, semblent sans effet sur la résistance partielle du Colza.

Selon Van der Plank (1968), l'acquisition de la virulence qui permet à l'agent pathogène de surmonter une résistance verticale se produit sans accroissement du pouvoir pathogène sur les cultivars sensibles dépourvus du gène correspondant. Cette acquisition peut même se faire au prix d'une diminution de l'aptitude du nouveau pathotype à survivre sur ces derniers hôtes. Les conséquences de ces résultats sont intéressantes au niveau épidémiologique et au niveau de la gestion des résistances oligogéniques d'origine Moutarde brune. En effet, les lignées apparaissent très résistantes lorsqu'elles sont confrontées à des souches provenant du Colza et vice-versa. Dans ce contexte, on pourrait imaginer une rotation de génotypes qui permettrait de maintenir la population des pathotypes virulents sur les lignées en dessous d'un certain seuil de nuisibilité, qui reste à définir.

ORIGINE DE LA VARIATION POUR LA PATHOGENIE SUR LES LIGNEES DE RECOMBINAISON

Si des mécanismes tels que la mutation, la recombinaison mitotique, l'hétéropléidie pourraient expliquer l'évolution des populations de *L. maculans*, la pression de sélection exercée par l'introduction des gènes de résistance a sans doute contribué à l'accroissement de la fréquence de pathotypes préexistants dans les populations. En effet, nous avons montré à travers les études réalisées en conditions contrôlées, que des pathotypes aptes à contourner la résistance des lignées existent sur des Crucifères adventices avant même que les cultivars résistants ne soient commercialisés. Cette virulence non nécessaire n'a pas empêché ces souches de survivre également sur le Colza en l'absence du gène complémentaire. Un cas d'espèce est signalé chez le couple *Brassica lactuca* - *Bremia lactucea*. Gustafsson et Larsson (1984) observent une augmentation régulière de la fréquence des facteurs de virulence permettant de contourner trois gènes de résistance bien que ces derniers ne soient pas utilisés dans des cultivars de laitue. Ces auteurs suggèrent alors l'absence du coût de la "fitness" associé à la virulence superflue. Cette hypothèse pourrait s'appliquer à notre modèle d'étude, cependant des études complémentaires sont nécessaires pour la conforter.

La mutation est supposée être la principale source de variation, cependant la démonstration formelle de sa manifestation chez les agents phytopathogènes n'est pas aisée (Barrett, 1987).

L'hypothèse de la mutation comme source de variation chez *L. maculans* est évoquée par Gugel *et al.* (1990) et Xi *et al.* (1991). Chez ce champignon, une phase de reproduction sexuée intervient obligatoirement sur les débris de récolte à l'automne sous nos climats. De nouvelles combinaisons de gènes de virulence peuvent apparaître *via* la recombinaison sexuelle. La fréquence des nouveaux pathotypes recombinés est d'autant plus importante que des mutations peuvent affecter le champignon pendant son évolution systémique dans les génotypes résistants (Gugel *et al.*, 1990; Xi

et al., 1991). La mutation de la dominance (avirulence) vers la récessivité (virulence) (Kiyosawa, 1982; Nelson, 1973) pourrait être incriminée dans l'apparition de gènes de virulence aptes à contourner les gènes de résistance correspondants. La sélection de phénotypes particuliers à partir de souches monospores inoculées sur les génotypes résistants en conditions contrôlées constitue une méthode efficace pour mettre en évidence des phénomènes de mutation (Barrett, 1987). Cependant, à l'issue de cinq séries d'inoculations-réisollements d'une souche monoascosporee du groupe A sur la Moutarde brune, nous n'avons pas réussi à obtenir des réisolats très différents de la souche de départ pour leur pathogénie. Cette expérimentation dont les résultats ne sont pas rapportés dans le présent document mériterait d'être reconduite en utilisant un isolat ou un mélange de souches bien caractérisées. Ces types d'inoculum présentent l'avantage de permettre aussi l'évaluation la pression de sélection exercée par le génotype sur une population connue du champignon.

La mutation seule ne paraît pas rendre compte de la grande variabilité de *L. maculans* puisqu'il peut se produire des recombinaisons parasexuelles (Petrie, 1969). L'hétérocaryose est une cause possible de variation puisqu'elle pourrait associer par anastomose des noyaux génétiquement différents dans un même cytoplasme (Petrie *et al.*, 1995). Enfin, les variations du nombre de chromosomes et le polymorphisme de longueur des chromosomes sont fréquents chez *L. maculans* (Morales *et al.*, 1993; Plummer et Howlett, 1993). Si l'hétéropléidie peut être associée à des modifications de pouvoir pathogène chez les champignons en général (Meulemans, 1989), son importance dans la variabilité chez *L. maculans* reste à démontrer.

CONCLUSION DE LA TROISIEME PARTIE

Dans la dernière partie de notre étude, nous avons tenté de caractériser la résistance des lignées de recombinaison Colza-Moutarde brune en serre et d'évaluer la durabilité potentielle de la résistance de ces lignées au champ.

Les résultats obtenus à partir des expérimentations conduites en serre montrent une variabilité de la réaction des plantes en fonction des génotypes analysés, des organes inoculés et du groupe de souches considéré.

Comparativement aux génotypes de Colza, la présence du gène de résistance chez les lignées leur confère un bon niveau de résistance sur tous les organes vis-à-vis de deux souches du groupe A et du mélange de souches du groupe A étudiés. Cependant, la lignée MXS semble plus sensible que les autres génotypes à l'ensemble des souches et au mélange du groupe A.

Nous observons une forte résistance des feuilles vis-à-vis des souches du groupe B quel que soit le génotype étudié. Cependant, les tiges de la Moutarde brune et dans une certaine mesure celles du cv. Samourai sont plus sensibles aux souches du groupe B.

Le pouvoir pathogène du mélange de souches à l'intérieur de chaque groupe de *L. maculans* semble indiquer des interactions synergiques. Cette tendance apparaît encore plus nettement avec le mélange des souches du groupe A inoculées sur les cotylédons et les feuilles des cultivars de Colza. A l'opposé, des phénomènes de compétition, ou autres, entre souches des groupes A et B semblent s'opérer lorsque les deux groupes de souches sont associés.

Cette caractérisation de la résistance en serre est complétée par deux expérimentations au champ.

Lors de la première campagne de culture, les lignées de recombinaison manifestent une résistance voisine de celle de la Moutarde brune. Cependant, au cours de la deuxième campagne la résistance des lignées est contournée. Nos travaux démontrent que l'utilisation d'un seul gène de la Moutarde brune entraîne le risque potentiel de sélectionner à plus ou moins long terme des pathotypes aptes à le contourner.

La résistance des génotypes de Colza tel que le cv. Darmor vis-à-vis de cette nouvelle virulence atteste du bon niveau de résistance horizontale chez cette espèce qu'il conviendrait d'associer aux gènes de résistance de la Moutarde brune pour assurer une protection complète (feuilles et collet) vis-à-vis de *L. maculans*.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les données bibliographiques concernant *Leptophaeria maculans*, parasite très dommageable aux cultures de Colza, témoignent de la variabilité importante de ce champignon. En l'absence d'autres mesures efficaces contre les épidémies de Nécrose du collet, l'utilisation de variétés résistantes est actuellement la seule méthode susceptible d'assurer la régularité des rendements du Colza. La variabilité intraspécifique pour la résistance au stade adulte (résistance au niveau du collet) est utilisée depuis de nombreuses années dans les schémas de sélection. Par contre, il existe très peu, ou pas, de variabilité dans l'espèce Colza pour la résistance au stade jeunes plantes et au niveau foliaire.

Dans l'objectif d'assurer une protection de la culture, à tous les stades de son développement, les sélectionneurs se sont investis dans l'exploitation de la résistance totale des Moutardes brune et noire. La connaissance de la durabilité potentielle de ces nouvelles sources de résistance est un élément essentiel à prendre en compte pour la gestion optimale des gènes de résistance issus de ces espèces. C'est dans ce contexte que s'inscrivent nos travaux sur l'étude de la durabilité potentielle de la résistance de lignées de recombinaison Colza-Moutarde brune.

Conformément à la définition de Johnson (1984), la durabilité prend en compte les notions d'espace et de temps. Par conséquent, la durabilité d'une résistance variétale ne peut être déterminée qu'après plusieurs années de commercialisation de cette variété, c'est donc une connaissance *a posteriori*. Pour contourner cette difficulté, nous avons élaboré un dispositif expérimental au champ favorable à l'expression de **la durabilité potentielle** du matériel que nous étudions.

Fondée sur ce dispositif, la démarche globale de notre travail a consisté en :

1) - Une analyse de l'effet de la pression de sélection exercée par les génotypes résistants sur la structure des populations naturelles du champignon. Cette étude du polymorphisme du champignon nous a également fourni l'opportunité d'élargir notre recherche à une gamme de souches très diversifiées et d'aborder l'étude de la forme sexuée des souches du groupe B.

2) - Une caractérisation de la résistance de ces génotypes dans différents contextes parasitaires (souches caractérisées et populations naturelles).

Nous rappellerons tout d'abord quelques points importants des résultats que nous avons acquis pour en dégager les conséquences agronomiques et/ou fondamentales et pour proposer les perspectives de recherche qui en découlent.

VARIABILITE CULTURALE, ENZYMATIQUE ET PATHOGENIQUE

Variabilité culturelle et enzymatique

Nous montrons que les souches des groupes A et B de *L. maculans* peuvent être distinguées, après une semaine de culture, sur la base de la diffusion de pigments dans le milieu de culture Malt Gélose. Cependant, certaines souches du groupe A, qui ne diffusent normalement pas de pigments, en produisent de façon inconstante sur les colonies âgées, nécessitant dans ce cas de recourir à l'analyse des profils des PGI. Cette analyse, réalisée sur gel d'amidon, différencie d'une manière fiable les deux groupes de souches. En adoptant, après avoir vérifié sa validité pour l'étude de *L. maculans*, le protocole utilisé pour l'analyse des isozymes des plantes de Colza, nous avons amélioré la rapidité et la facilité d'utilisation de cette technique simple, décrite dans la bibliographie.

L'analyse des isoestérases mycéliennes, réalisée dans des conditions rigoureusement standardisées, s'est avérée un outil efficace, non seulement pour distinguer sans équivoque les groupes A et B, mais également pour une étude taxinomique à l'intérieur du genre *Phoma*. De plus, nous sommes parvenus, avec les analyses d'isoestérases, à montrer un polymorphisme plus important à l'intérieur du groupe B qu'à l'intérieur du groupe A, mis en évidence par ailleurs avec des outils moléculaires. L'efficacité de ce système enzymatique, pour l'analyse de la diversité des populations de *L. maculans*, s'est révélée avec l'analyse des isolats "Thlaspi". En effet, nous montrons que les profils esterasiques de ce groupe, distinct des groupes A et B par l'analyse des PGI, seraient intermédiaires entre les deux groupes. Toutefois, la forte similitude de certaines isoestérases le rapproche plus du groupe B que du groupe A. Ce critère enzymatique, couplé à l'analyse des PGI sur gel d'amidon, présente donc un intérêt certain dans les études de structure des populations naturelles de *L. maculans* en termes de types de souches prévalant sur des génotypes particuliers.

À l'intérieur de chaque groupe, nos études, bien que préliminaires, montrent que le polymorphisme culturel contraste avec le monomorphisme enzymatique chez des souches monopycniospores issues d'un isolat ou d'une souche monoascosporee.

L'analyse des populations isolées en 1993 à partir de la Moutarde brune (cv. Picra), des lignées de recombinaison Colza-Moutarde brune et du Colza, en utilisant l'ensemble des critères précédemment évoqués, montre que le cv. Picra sélectionne exclusivement des souches du groupe B alors que plus de 95% de souches du groupe A sont isolées à partir de la lignée de recombinaison Colza-Moutarde brune et du Colza.

Variabilité du pouvoir pathogène

L'étude de la variabilité biologique des souches d'origines diverses est réalisée en conditions contrôlées, au stade cotylédonaire, sur une gamme de trois génotypes incluant une lignée de recombinaison Colza-Moutarde brune (MX).

Dans les interactions parasitaires impliquant les souches du groupe A, deux situations sont observées, selon que les souches sont isolées du Colza ou de la lignée MX. Les souches isolées du Colza sont majoritairement non agressives sur la lignée de recombinaison MX. Aucune virulence n'est décelée parmi ces souches vis-à-vis du cv. Piera. Pour les souches provenant de la lignée MX, plus de la moitié d'entre elles induisent des symptômes de sensibilité sur leur hôte d'origine. Parmi ces souches, trois sont d'agressivité moyenne sur la Moutarde brune.

A l'instar des travaux récents rapportés par Jonhson et Lewis (1994) et Gall (1994), nous montrons que les souches du groupe B sont capables de causer de graves symptômes sur les cotylédons de différentes espèces de *Brassica*, en conditions contrôlées. Toutes les souches de ce groupe, quelles que soient leurs origines (Moutarde brune, Colza, Crucifères adventices) sont agressives sur le Colza et la lignée de recombinaison Colza-Moutarde brune alors que des variations sont observées sur la Moutarde brune.

Par ailleurs, l'analyse d'isolats obtenus de Crucifères adventices indique que les deux groupes de souches sont présents sur ces dernières. Certaines souches du groupe A et les souches du groupe B, hébergées par ces hôtes, s'avèrent aptes à contourner la résistance de la lignée MX.

Les résultats ainsi obtenus indiquent que les souches agressives sur la lignée de recombinaison Colza-Moutarde brune existent déjà dans les populations structurées par le Colza et sur des Crucifères adventices. Leur fréquence peut s'accroître sous l'effet de la pression de sélection exercée par la résistance monogénique de la lignée MX.

Une des conséquences agronomiques de nos résultats réside dans la gestion des Crucifères adventices, telles que la Sanve, et les repousses de Colza qui constituent des hôtes transitoires potentiels des populations de *L. maculans*. Toutefois, nos travaux ayant porté sur un nombre limité d'isolats, il serait intéressant d'analyser un nombre plus important de souches isolées d'une large gamme de Crucifères adventices rencontrées dans les champs. Ce travail permettra d'appréhender toute l'ampleur du problème ainsi évoqué par notre étude.

La recherche de marqueurs moléculaires, caractéristiques des souches virulentes sur les lignées de recombinaison, devrait permettre d'initier des études génétiques ayant pour objectif d'identifier le(s) gène(s) d'avirulence impliqué(s) dans le pouvoir pathogène sur ces lignées et sur la Moutarde brune. Ces marqueurs pourraient constituer, par ailleurs, des outils de détection de ces souches dans les populations naturelles structurées par le Colza ou par la résistance d'origine Moutarde brune.

REPRODUCTION SEXUÉE DU GROUPE B

De nombreuses études montrent que les souches des groupes A et B ne peuvent se croiser *in vitro*. Ce résultat, couplé aux nombreux critères qui les différencient et que nous avons confirmés pour certains d'entre eux, suggérerait que ces deux groupes constituent des espèces différentes. Cependant, nous n'en sommes qu'à des hypothèses car :

- des échanges génétiques seraient possibles entre les deux groupes (Borgman et Taylor, 1994)
- la reproduction sexuée *in vitro* des souches du groupe B n'est pas maîtrisée.

Dans le domaine de l'amélioration des connaissances sur les souches du groupe B, une des originalités de notre travail repose sur l'isolement de plusieurs tétrades naturelles, non ordonnées, à partir de périthèces du groupe B isolés du cv. Pica. La mise au point d'un protocole, en conditions contrôlées, a permis d'obtenir, pour la première fois, l'accomplissement du cycle de reproduction sexuée *in vitro* des souches du groupe B. Les souches du groupe A sont également capables de produire des périthèces dans ces conditions. Toutefois, il existe des différences importantes dans la capacité des différentes combinaisons de souches compatibles, à l'intérieur d'une tétrade, à former plus ou moins de périthèces *in vitro*. Ce résultat devrait permettre d'orienter le choix des souches à utiliser pour des études génétiques des populations du groupe B. Il indique aussi qu'il serait nécessaire d'affiner les conditions (milieu, température et photopériode) afin d'optimiser la production périthéciale.

L'analyse du déterminisme génétique de la reproduction sexuée, à partir de l'étude de la compatibilité sexuelle à l'intérieur de trois tétrades complètes, nous a permis de démontrer l'hétérothallisme des souches du groupe B. Ce hétérothallisme est sous contrôle génétique simple (un locus à deux allèles). Contrairement aux tétrades du groupe A, deux profils EST ségrégeant de façon mendélienne, caractérisent les tétrades du groupe B. La ségrégation du locus EST est indépendante de celle du locus de compatibilité. Ainsi, nous avons pu identifier les souches jumelles dans certaines tétrades. Toutefois, il convient d'analyser un nombre plus important de tétrades afin de confirmer ce dernier point.

Compte tenu des limites des EST pour l'identification des souches jumelles, d'autres systèmes enzymatiques, l'électrophorèse bidimensionnelle des protéines, l'électrophorèse en champs pulsés, devront être prospectés dans le but de trouver des marqueurs fiables pour des études génétiques. Ainsi, l'analyse des cariotypes de tétrades du groupe A a permis à Plummer et Howlett (1993) d'identifier les quatre paires de souches jumelles.

Les croisements entre des souches du groupe A avec des souches du groupe B appartenant à des groupes de compatibilité différents que nous avons réalisés, n'ont pas abouti à la formation de périthèces. Cet échec conforte l'hypothèse d'un isolement sexuel entre les deux groupes de souches. Toutefois, notre étude ayant porté sur un nombre limité de souches, il serait nécessaire d'analyser des souches d'origines biologiques et géographiques diverses afin de s'assurer de l'absence d'autres allèles de compatibilité à l'intérieur de ces groupes de souches.

L'analyse de la variabilité du pouvoir pathogène au stade cotylédonaire est réalisée avec les huit souches issues respectivement d'un même asque du groupe A et du groupe B. Une variation continue de l'agressivité est observée à l'intérieur de chaque tétrade sur les cinq géotypes testés. Les résultats rapportés ne concernent qu'une tétrade de chaque groupe, par conséquent l'analyse d'autres tétrades, avec éventuellement une autre gamme différentielle, serait nécessaire pour confirmer cette tendance.

Sur le plan fondamental, les résultats de nos travaux ouvrent des voies de recherche dans différents domaines d'investigation touchant à la génétique et à la taxinomie des souches du groupe B. A moyen terme, des analyses biométriques fines comparatives de la morphologie des organes sexués (périthèces, asques et ascospores) des deux groupes devront être engagées, pour permettre éventuellement de clarifier la position taxinomique des populations du groupe B. Par ailleurs, les analyses génétiques devraient être orientées de manière à préciser les relations entre les sous-groupes B et le groupe 'Thlaspi'. S'agit-il de différentes sous-populations isolées sexuellement les unes des autres? La position intermédiaire, pour certains critères, du groupe 'Thlaspi' résulterait-elle d'un croisement entre les souches du groupe A et celles du groupe B? Les réponses à ces questions seront, sans conteste, d'un apport substantiel pour une meilleure connaissance du pathosystème *L. maculans*/Crucifères.

CARACTERISATION PHENOTYPIQUE DE LA RESISTANCE EN SERRE

Les études en conditions contrôlées nous ont permis de mettre en évidence des pathotypes virulents sur les cotylédons d'une lignée de recombinaison Colza-Moutarde brune. Nous avons cherché à valider ce résultat, en caractérisant la résistance de différents organes de deux lignées de recombinaison Colza-Moutarde brune (MX et MXS) vis-à-vis de quelques souches des groupes A et B comparativement à d'autres géotypes. Cette étude a permis de montrer que les souches du groupe B, quelles que soient leurs origines, ne sont pas impliquées dans la formation de la nécrose du collet. Elles sont en revanche spécialisées dans la colonisation de la moelle de la tige. Une diversité de réactions est obtenue à l'intérieur de chaque groupe, en fonction des géotypes et des organes testés. D'une manière générale, le niveau de maladie causé par le groupe B sur les cotylédons est plus élevé que celui induit par le groupe A sur les géotypes de Colza. Les feuilles et les tiges se montrent plus sensibles au groupe A. A l'exception d'un isolat du groupe A provenant de la lignée MX, les lignées de recombinaison sont

résistantes vis-à-vis des deux groupes de souches sur les différents organes analysés. La résistance de la Moutarde brune (cv. Picra) aux stade cotylédonaire et foliaire contraste avec sa sensibilité au niveau des tiges vis-à-vis des deux groupes de souches.

Nos résultats portant sur les mélanges de souches du groupe A, du groupe B et des groupes (A+B) utilisés pour inoculer les différents génotypes démontrent qu'il ne faut pas mélanger les deux groupes de souches pour sélectionner pour la résistance à *L. maculans* du fait des phénomènes de compétition entre les souches.

Nous avons confirmé que les souches du groupe B ne sont pas impliquées dans la formation du symptôme typique de nécrose du collet. Cependant, la nuisibilité des symptômes que ces souches induisent sur la plante n'est pas connue. Des études devraient être engagées dans ce domaine afin de savoir si les efforts de sélection pour la résistance à *L. maculans* doivent également porter sur ce groupe de souches.

DURABILITE POTENTIELLE DE LA RESISTANCE DES LIGNEES DE RECOMBINAISON

Le dispositif expérimental que nous avons élaboré au champ pour étudier la durabilité potentielle de la résistance des lignées de recombinaison Colza-Moutarde brune s'est avéré adapté à cet objectif.

La première année d'expérimentation a révélé l'efficacité du gène d'origine Moutarde brune introgressé dans le colza vis-à-vis des différents symptômes de la Nécrose du collet. Cependant, la deuxième année d'expérimentation réalisée sous une forte pression d'inoculum principalement structuré par la résistance d'origine Moutarde brune a montré que la résistance des lignées de recombinaison est contournée.

Notre étude montre que la sensibilité aux attaques du collet est supérieure à la résistance foliaire dans le cas des lignées alors qu'il existe une relation pour ces deux caractères chez la Moutarde brune. Si les analyses réalisées en conditions contrôlées et en serre ont permis de montrer que les pathotypes virulents sur cette source de résistance existaient dans la population de Colza, il semble que leur fréquence ait augmenté à l'issue de la première expérimentation au champ. Différentes hypothèses ont été émises et discutées à propos de l'origine de la variation observée.

Par ailleurs, la sélection des pathotypes nouveaux ne semble pas avoir de conséquences épidémiologiques dangereuses pour le colza. En effet, la résistance partielle des cultivars Darmor et Falcon est restée inchangée au cours des deux années d'expérimentation. Néanmoins, ce résultat doit être confirmé sur une plus longue période et par des essais particuliers en serre.

Si nous avons démontré que la résistance des lignées de recombinaison Colza-Moutarde brune est potentiellement non durable, le résultat le plus intéressant de ce qui pourrait être leur durabilité en culture. En effet, dans toute la disposition expérimentale drastique que nous avons utilisée, nous ne pouvons pas prédire dans quelle mesure cette résistance risque d'être contournée dans la pratique. Des expérimentations plus amples de multiplication dans les zones de production du Colza sont donc nécessaires.

Parallèlement à nos études, les mêmes investigations sont réalisées avec la résistance d'origine Moutarde noire. La caractérisation biochimique des souches de *I. maculans*, isolées de ces deux Moutardes (Article 3 en annexe 18), montre que la Moutarde noire et la Moutarde brune sélectionnent respectivement des souches du groupe A et des souches du groupe B. Ce résultat qui suggère l'existence de mécanismes de résistance différents dans ces deux espèces est conforté par ceux obtenus par A. M. Chèvre (comm. pers.). Elle montre que les marqueurs RAPD du gène de résistance, identifié sur le chromosome 4 de la Moutarde noire, sont différents de ceux du gène introgressé dans les lignées de recombinaison Colza-Moutarde brune: ces derniers sont localisés sur un autre chromosome de la Moutarde noire.

Sur la base de ces résultats, différentes stratégies d'utilisation de la résistance des Moutardes peuvent être proposées :

1/ La résistance monogénique de la Moutarde brune pourrait être associée à la résistance partielle du cv. Darmor, en vue de créer des cultivars résistants tout au long du cycle de la culture

2/ Le cumul des deux gènes de résistance dans un même génotype de Colza : des lignées cumulant les deux gènes de résistance sont déjà en cours de sélection à la Station d'Amélioration des Plantes de l'INRA-Rennes-Le Rheu (A. M. Chèvre, comm. pers.)

3/ La rotation des cultures de cultivars de Colza portant des gènes de résistance différents pourrait être appliquée au modèle *I. maculans*-Colza. En effet, nous montrons que la résistance des lignées est efficace à court terme dans les populations sélectionnées par le Colza. La résistance d'origine Moutarde noire semble plus durable (H. Brun, comm. pers.). Il reste à préciser les modalités et la faisabilité de cette stratégie.

En conclusion, nos travaux ont permis d'apporter de nouvelles connaissances sur le polymorphisme de *I. maculans* en général et sur sa biologie sexuelle en particulier. Les conséquences de la diversité des populations de l'agent pathogène se manifestent par le contournement de la résistance monogénique des lignées de recombinaison Colza-Moutarde brune au champ. Les résultats acquis ouvrent de nouvelles perspectives concernant la dynamique et la génétique des populations, la nuisibilité des souches du groupe B et les stratégies de gestion de cette nouvelle source de résistance potentiellement non durable.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alabouvette C., Brunin B., 1970.** Recherches sur la maladie du colza due à *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. & de Not. I. - Rôle des restes de culture dans la conservation et la dissémination du parasite. *Annales de Phytopathologie* **2**, 463-475.
- Alabouvette C., Brunin B., Louvet J., 1974.** Recherches sur la maladie du colza due à *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. & de Not. IV. - Pouvoir infectieux des pycniospores et sensibilité variétale. *Annales de Phytopathologie* **6**, 265-275.
- Annis S.L., Goodwin P.H., 1991.** Pectinase genes and isozymes of *Leptosphaeria maculans* isolates from Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology* **13**, 271 (résumé).
- Annis S.L., Goodwin P.H., 1993.** The role of polygalacturonidases in blackleg of canola. *Blackleg News* **1**, 5-6.
- Ansan-Melayah D., Balesdent M.H., Buée M., Rouxel T., 1995.** Genetic characterization of *AvrLm1*, the first avirulence gene of *Leptosphaeria maculans*. *Phytopathology* **85**, 1525-1529.
- Badawy H.M.A., Hoppe H.H., 1989.** Production of phytotoxic sirodesmins by aggressive strains of *Leptosphaeria maculans* differing in interactions with oilseed rape genotypes. *Journal of Phytopathology* **127**, 146-157.
- Badawy H.M.A., Hoppe H.H., Koch E., 1991.** Differential reactions between the genus *Brassica* and aggressive single spore isolates of *Leptosphaeria maculans*. *Journal of Phytopathology* **131**, 109-119.
- Badawy H.M.A., Kakau J., Hoppe H.H., 1992.** Temperature and ageing of host tissue affect the interactions between different oilseed rape cultivars and pathotype groups of *Leptosphaeria maculans*. *Journal of Phytopathology* **134**, 255-263.
- Balesdent M.H., Gall C., Robin P., Rouxel T., 1992.** Intraspecific variation in soluble mycelial protein and esterase patterns of *Leptosphaeria maculans* french isolates. *Mycological Research* **96**, 677-684.
- Ballinger D.J., Salisbury P.A., Dennis J.I., Kollmorgen J.F., Potter T.D., 1988a.** Evaluation of fungicides, applied at sowing, for control of blackleg in rapeseed. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **28**, 511-515.
- Ballinger D.J., Salisbury P.A., Kollmorgen J.F., Potter T.D., Coventry D.R., 1988b.** Evaluation of rates of flutriafol for control of blackleg of rapeseed. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **28**, 517-519.
- Ballinger D.J., Salisbury P.A., Kadkol G.P., 1991.** Race variability in *Leptosphaeria maculans* and the implications for resistance breeding in Australia. *GCIRC 1991 Congress*, 226-231.
- Bansal V.K., Kharbanda P.D., Stringam G.R., Thiagarajah M.R., Tewari J.P., 1994.** A comparison of greenhouse and field screening methods for blackleg resistance in doubled haploid of *Brassica napus*. *Plant Disease* **78**, 276-281.
- Barbetti M.J., 1978.** Infection of oilseed rape and cruciferous weeds with *Leptosphaeria maculans* isolates from oilseed rape and wild radish. *Australian Plant Pathology Society Newsletter* **7**, 3-5.
- Barrett J.A., 1987.** The dynamics of genes in populations. In *Population of Plant Pathogens : their dynamics and genetics*. M.S. Wolfe, C.E. Caten, (Eds). Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Boerema G.H., 1976.** The *Phoma* species studied in culture by Dr R. W. G. Dennis. *Transactions of British Mycological Society* **67**, 289-319.
- Bonman J.M., Gabrielson R.L., Williams P.H., Delwiche P.A., 1981.** Virulence of *Phoma lingam* to cabbage. *Plant Disease* **65**, 865-867.

- Bonman J.M., Gabrielson R.L., 1981.** Localized infections of siliques and seed of cabbage by *Phoma lingam*. *Plant Disease* **65**, 868-869.
- Bonnet E., 1994.** Le colza victime de sa mauvaise image. *Cultivar* **357**, 46-48.
- Boudart G., 1978.** Phytotoxine et nécrose des hypocotyles de Crucifères infectées par *Leptosphaeria maculans* (forme imparfaite *Phoma lingam*). *Phytopathologische Zeitschrift* **92**, 76-82.
- Boudart G., 1981.** Modalités de l'attaque parasitaire des Crucifères par *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. & de Not. (f.c. *Phoma lingam*), agent de la Nécrose du collet. Déterminisme du pouvoir pathogène. Thèse de docteur en sciences naturelles de l'Université des sciences et techniques de LILLE. 147p.
- Bousquet J.F., Férézou J.P., Devys M., Barbier M., 1977.** Sur une toxine produite par le champignon *Phoma lingam* Tode, parasite du colza ; isolement et propriétés. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris, Serie D* **284**, 927-928.
- Brown A.G.P., Barbetti M.J., Wood P. McR., 1976.** Effect of benomyl on 'blackleg' disease of rape in western Australia. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry* **16**, 276-279.
- Brun H., Renard M., Tribodet M., Plessis J., Tanguy X., 1989.** Apport de la lutte génétique dans le contrôle des maladies du colza d'hiver (*Brassica napus* L. var. *oleifera*). *Phytoma* **404**, 36-41.
- Brun H., Jacques M.A., 1990.** Le dessèchement prématuré des pieds de colza. Quelques symptômes et agents pathogènes associés. *La défense des Végétaux* **262**, 7-12.
- Brunin B., 1970.** La nécrose du collet du colza : rôle étiologique de l'infection. Thèse de doctorat de l'Université de LILLE, 72p.
- Brunin B., 1972.** Recherches sur la maladie du colza due à *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. & de Not., III. Aspects anatomiques de la nécrose du collet. *Annales de Phytopathologie* **4**, 87-96.
- Brunin B., Lacoste L., 1970.** Recherches sur la maladie du colza due à *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. & de Not. II. Pouvoir pathogène des ascospores. *Annales de Phytopathologie* **2**, 477-488.
- Burdon J.J., 1993.** Genetic variation in pathogen populations and its implications for adaptation to host resistance. In : *Durability of disease resistance*. Th. Jacobs and J.E. Parlevliet (Eds). Kluwer Academic Publishers, 41-56.
- Cargeeg L.A., Thurling N., 1979.** Seedling and adult plant resistance to blackleg (*Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. & de Not.) in spring rape (*Brassica napus* L.). *Australian Journal of Agricultural Research* **30**, 37-46.
- Cargeeg L.A., Thurling N., 1980.** Contribution of host-pathogen interactions to the expression of the blackleg disease of spring rape (*Brassica napus* L.) caused by *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. & de Not. *Euphytica* **29**, 465-476.
- Caten C.E., 1996.** The mutable and treacherous tribe revisited. *Plant Pathology* **45**, 1-12.
- Caten C.E., Jinks J.L., 1968.** Spontaneous variability of single isolates of *Phytophthora infestans*. I. Cultural variation. *Canadian Journal of Botany* **46**, 329-348.
- Cauderon A., 1986.** Quelques succès anciens de la sélection végétale. In : 40 ans de recherche agronomique 1946-1986. INRA (Ed), 60-77.
- CETIOM, 1991.** La culture du colza d'hiver. Qualité des graines. CETIOM. Paris 36 p.
- CETIOM, 1992.** Les maladies du colza. *Phoma* : la maladie du chancre du collet 79 p.
- CETIOM, 1995.** Colza d'hiver : le colza d'hiver et l'environnement. CETIOM. Paris 36 p.
- Chèvre A.M., This P., Eber F., Deschamps M., Renard M., Delseny M., Quiros C.F., 1991.** Characterization of disomic addition lines *Brassica napus*-*Brassica nigra* by isozyme, fatty acid and RFLP markers. *Theoretical Applied Genetic* **81**, 43-49.

- Chèvre A.M., Eber F., This P., Barret P., Brun H., Tanguy X., Renard M., 1995. Establishment of a chromosomal map and blackleg resistance analyses from *Brassica napus*-*Brassica nigra* addition and recombinant lines. *Proceedings of the 9th international Rapeseed Congress*. Cambridge, UK, July 4-7, 1995, 1217-1219.
- Chèvre A.M., Eber F., This P., Barret P., Tanguy X., Brun H., Delseny M., Renard M., 1996. Characterization of *Brassica nigra* chromosomes and of blackleg resistance in *Brassica napus* - *Brassica nigra* addition lines. *Plant Breeding* 115, 113-118.
- Crouch J., Lewis B., Mithen R., 1993. A new source of resistance to stem canker. *Blackleg News* 1, 3.
- Cruickshank I.A.M., Palmer T.P., 1954. Resistance of swede varieties to dry-rot (*Phoma lingam* (Tode) Desm.). *New Zealand journal Science and Technology Series A* 36, 122-128.
- Cunningham G.H., 1927. Dry-rot of swedes and turnips : its cause and control. *New-Zealand Department of Agriculture Bulletin* n° 133.
- Decognet V., 1994. *Phoma exigua* var. *linicola*, agent du mort-lin. Variabilité et mode d'infection du parasite. Expression de la maladie. Thèse de Doctorat de l'université de RENNES I. 112p.
- Delourme R., Chèvre A.M., Eber F., Foisset N., Pilet M.L., Barret P., Tanguy X., Renard M., 1995. Mapping of blackleg resistance genes. *Blackleg News* 5, 4-6.
- Delwiche., 1980. Genetic aspects of blackleg (*Leptosphaeria maculans*) resistance in rapeseed (*Brassica napus*). Ph D Thesis. University of Wisconsin. Madison, WI, USA, 44p.
- Desmazières J.-B.-H.-J., 1849. Dix-septième notice sur les plantes cryptogames récemment découvertes en France : Coniomycètes. *Annales des Sciences de la Nature et de la Botanique* 11, 273-285.
- Dion Y., Landry B.S., Gugel R.K., Seguin-Swartz G., 1994. RFLP mapping of blackleg resistance on the canola genome. *Blackleg News* 2, 1-3.
- Downey R.K., Röbbelen G., 1989. *Brassica species*. In Oil crops of the world. R.K. Downey. A. Ashri, (eds) Mc Graw-Hill, New York. 339-362.
- Durand N., 1995. Guide Colza : la rentabilité du desherbage *Cultivar (hors série)*, 18-25.
- Fairbanks G., Steck T.L., Wallach D. F. H., 1971. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* 10, 2606-2607.
- Ferreira M.E., Williams P.H., Osborn T.C., 1994. RFLP mapping of *Brassica napus* using doubled haploid lines. *Theoretical Applied Genetic* 89, 615-621.
- Ferreira M.E., Rimmer S.R., Williams P.H., Osborn T.C., 1995. Mapping loci controlling *Brassica napus* resistance to *Leptosphaeria maculans* under different screening conditions. *Phytopathology* 85, 213-217.
- Gabrielson R.L., Blackleg disease of Crucifers caused by *Leptosphaeria maculans* (*Phoma lingam*) and its control. *Seed Science and Technology* 11, 749-780.
- Gall C., 1994. *Recherches sur la nécrose du collet des crucifères due à Leptosphaeria maculans*. Polymorphisme des populations, analyse de tétrades et interaction avec le colza. Thèse de l'Université de Paris-Sud. 136p.
- Gall C., Balesdent M.H., Desthieux I., Robin P., Rouxel T., 1995. Polymorphism of Tox^c *Leptosphaeria maculans* isolates as revealed by soluble protein and isozyme electrophoresis. *Mycological Research* 99, 221-229.
- Gees R., Hohl H.R., 1988. Cytological comparison of specific (23) and general resistance to late blight in potato leaf tissue. *Phytopathology* 78, 350-357

- Gladders P., 1995.** Canker on winter oilseed rape : occurrence in Eastern England 1977-1995 and prospects for forecasting and control. *Blackleg News* **5**, 7-8.
- Gladders P., Musa T.M., 1980.** Observations on the epidemiology of *Leptosphaeria maculans* stem canker in winter oilseed rape. *Plant Pathology* **29**, 28-37.
- Gogels P., 1994.** L'industrie de la trituration et du raffinage en Europe : quelles perspectives après la crise ? *Oléagineux Corps Gras Lipides (OCL)* **3**, 197-199.
- Goodwin P.H., Annis S.L., 1991.** Rapid identification of genetic variation and pathotype of *Leptosphaeria maculans* by Random Amplified Polymorphic DNA assay. *Applied of Environmental Microbiology* **57**, 2482-2486.
- Gottlieb D., Hepden P.M., 1966.** The electrophoretic movement of proteins from various *Streptomyces* species as taxonomy criterium. *Journal of Genetic microbiology* **44**, 95-104.
- Gretenkort M.A., Ingram D.S., 1993.** A comparison of the disease reactions of stems and detached leaves of soil and *in vitro* grown plants and regenerants of oilseed rape to *Leptosphaeria maculans* and protocols for selection for novel disease resistance. *Journal of phytopathology* **137**, 89-104.
- Grezes-Besset B., Grison R., Villegier M.J., Nicolas C., Toppan A., 1995.** Field testing against four fungal pathogens of transgenic *Brassica napus* plants constitutively expressing a chitinase gene. *Proceedings of the 9th International Rapeseed Congress. Cambridge, UK. July 4-7. 1995*: 781-783.
- Guerche P., Renard M., Pelletier G., 1994.** Le colza : un support d'étude privilégié de biologie des végétaux. *Oléagineux Corps Gras Lipides (OCL)* **1**, 29-33.
- Gugel R.K., Seguin-Swartz G., Petrie G.A., 1990.** Pathogenicity of three isolates of *Leptosphaeria maculans* on *Brassica* species and other crucifers. *Canadian Journal of Plant Pathology* **12**, 75-82.
- Gugel R.K., Petrie G.A., 1992.** History, occurrence, impact, and control of blackleg of rapeseed. *Canadian Journal of Plant Pathology* **14**, 36-45.
- Gurtler J.L., 1994.** Production et consommation dans le monde : caractéristiques et enseignements. *Oléagineux Corps Gras Lipides (OCL)* **1**, 185-188.
- Gustafsson M., Larsson C., 1984.** Variation in the patterns of virulence and relative fitness of virulence phenotypes in Swedish populations of *Bremia lactucae*. *Hereditas* **101**, 9-17.
- Hall R., 1992.** Epidemiology of blackleg of oilseed rape. *Canadian Journal of Plant Pathology* **14**, 46-55.
- Halama P., 1991.** *Phaeosphaeria nodorum* (Müll.) Hedj. (ex. *Leptosphaeria nodorum* Müll.) téléomorphe de *Septoria nodorum* Berk. Déterminisme et ontogénie-Hérédité du pouvoir pathogène. Thèse de doctorat de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres Artois. 193p.
- Hall R., Peters R.D., Assabgui R.A., 1993.** Occurrence and impact of blackleg on oilseed rape in Ontario. *Canadian Journal of Plant Pathology* **15**, 305-313.
- Hall R., Chigogora J.L., Phillips L.G., 1996.** Role of seedborne inoculum of *Leptosphaeria maculans* in development of blackleg on oilseed rape. *Canadian Journal of Plant Pathology* **18**, 35-42.
- Hammond K.E., Lewis B.G., Musa T.M., 1985.** A systemic pathway in the infection of oilseed rape plants by *Leptosphaeria maculans*. *Plant Pathology* **34**, 557-565.
- Hammond K.E., Lewis B.G., 1987a.** Variation in stem infections caused by aggressive and non aggressive isolates of *Leptosphaeria maculans* on *Brassica napus* var. *oleifera*. *Plant Pathology* **36**, 53-65.
- Hammond K.E., Lewis B.G., 1987b.** The establishment of systemic infection in leaves of oilseed rape by *Leptosphaeria maculans*. *Plant Pathology* **36**, 135-147.

- Hanacziwskyj P., Drysdale R.B., 1984.** Cultural and biochemical characteristics of isolates of *Leptosphaeria maculans* varying in pathogenicity. *Aspects of Applied Biology* **6**, 387-397.
- Hansen E.M., Brasier C.M., Shaw D.S., Hamm P.B., 1986.** The taxonomic structure of *Phytophthora megasperma* : evidence for emerging biological species groups. *Transaction of British Mycological Society* **4**, 557-573.
- Hassan A.K., Schultz C., Sacristan M.D., Wöstemeyer J., 1991.** Biochemical and molecular tools for the differentiation of aggressive and non-aggressive isolates of the oilseed rape pathogen. *Phoma lingam*. *Journal of Phytopathology* **131**, 120-136.
- Henderson M.P., 1918.** The blackleg disease of cabage caused by *Phoma lingam* (Tode) Desmaz. *Phytopathology* **8**, 379-431.
- Hill C.B., 1991.** Inheritance of seedling blackleg resistance in canola. *Proceedings of the 8th International Rapessed Congress, Saskatoon, July 9-11 1991* **1**, 286-291.
- Hill C.B., Hua X.X., Williams P.H., 1984.** Correlations of virulence, growth rate, pigment production and allozyme banding patters which differentiate virulent and avirulent isolates of *Leptosphaeria maculans*. *Cruciferae Newsletter* **9**, 79 (résumé).
- Hogenboom N.G., 1993.** Economic importance of breeding for disease resistance. In : Durability of disease resistance. **Th. Jacobs and J.E. Parlevliet** (Eds) Kluwer Academic Publishers : 5-9.
- Humpherson-Jones F.M., 1983.** The occurrence of *Alternaria brassicicola*, *Alternaria brassicae* and *Leptosphaeria maculans* in Brassica crops in south-east England between 1976 and 1980. *Plant Pathology* **32**, 33-39.
- Humpherson-Jones F.M., 1986.** The occurrence of virulent pathotypes of *Leptosphaeria maculans* in Brassica seed crops in England. *Plant Pathology* **35**, 224-231.
- Hott T.W., Ingram D.S., Rawlinson C.J., 1984.** Heterothallism in *Pyrenopeziza brassicae*, cause of light leaf spot of Brassicas. *Transaction of British Mycological Society* **82**, 477-483.
- Johnson R., 1979.** The concept of durable resistance. *Phytopathology* **69**, 198-199.
- Johnson R., 1984.** A critical analysis of durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* **22**, 309-330.
- Johnson R., 1993.** Durability of disease resistance in crops : Some closing remarks about the topic and the symposium. In : Durability of disease resistance. **Th. Jacobs and J.E. Parlevliet** (Eds) Kluwer Academic Publishers, 283-300.
- Johnson R., Law C.N., 1975.** Genetic control of durable resistance to yellow rust (*Puccinia striiformis*) in the wheat cultivar Hybride de Bersée. *Annals of Applied Biology* **81**, 385-391.
- Johnson R.D., Lewis B.G., 1990.** DNA polymorphism in *Leptosphaeria maculans*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **37**, 417-424.
- Johnson R.D., Lewis B.G., 1994.** Variation in host range, systemic infection and epidemiology of *Leptosphaeria maculans*. *Plant Pathology* **43**, 269-277.
- Kimber D.S., Mc Gregor D.I., 1995.** The species and their origin, cultivation and world production. In : Brassica oilseeds - production and utilization. **Kimber D., Mc Gregor D.I.** (Eds) CAB International, wallingford, UK pp 1-7.
- Kistler H.C., Miao V.P.W., 1992.** New modes of genetic change in filamentous fungi. *Annual Review of Phytopathology* **30**, 131-152.
- Kiyosawa S., 1982.** Genetics and Epidemiological Modeling of breakdown of plant disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* **20**, 93-112.
- Kleckner N., 1981.** Transposable elements in prokaryotes. *Annual Review of Genetics* **15**, 341-404.

Koch E., Badawy H.M.A., Hoppe H.H., 1989. Differences between aggressive and non-aggressive single spore lines of *Leptosphaeria maculans* in cultural characteristics and phytoalexin production. *Journal of Phytopathology* **124**, 52-62.

Koch E., Song K., Osborn T.C., Williams P.H., 1991. Relationship between pathogenicity and phylogeny based on restriction fragment length polymorphism in *Leptosphaeria maculans*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **4**, 341-349.

Kuswinanti T., Sock J., Hoppe H.H., 1995. Variation in virulence of aggressive isolates of *Leptosphaeria maculans* based on cotyledon reactions on an extended differential set. *Proceedings of the 9th International Rapeseed Congress, Cambridge U.K* pp 1248-1250.

Kutcher H.R., Van den Berg C.G.J., Rimmer S.R., 1993. Variation in pathogenicity of *Leptosphaeria maculans* on *Brassica* spp. based on cotyledon and stem reactions. *Canadian Journal of Plant Pathology* **15**, 253-258.

Lacoste L., 1965. Biologie naturelle et culturale du genre *Leptosphaeria* Cesati & de Notaris. Déterminisme de la reproduction sexuelle. Thèse de doctorat de l'Université des sciences de Toulouse. 234 p.

Lacoste L., Louvet J., Anselme C., Alabouvette C., Brunin B., Pierre J.G., 1969. Rôle de *Phoma lingam* (Tode) Desm. et de sa forme parfaite *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. & de Not. dans les épidémies de nécrose du collet du colza (*Brassica napus* L. var. *oleifera* Metz.) *Compte rendus de l'académie d'agriculture de France* **55**, 981-989.

Laemmli U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Lefebvre V., Chèvre A.M., 1995. Tools for marking plant disease and pest resistance genes : a review. *Agronomie* **15**, 3-19.

Le Hir H., 1996. *D'une cuisine à l'autre. Mémoire de Maîtrise. Université de Rennes II*. 157p.

Leonard K.J., 1993. Durable resistance in the pathosystems. Maize-Northern and Southern leaf blights. In : Durability of disease resistance. Th. Jacobs and J.E. Parlevliet (Eds). Kluwer Academic Publishers, 99-114.

Li H., Doazan J.P., Clerjeau M., 1986. Etude de la variabilité du pouvoir pathogène de *Plasmopara viticola* à l'égard de la vigne. I. - Comparaison de clones monosporocystes: rôle de l'hétérocaryose du parasite. *Agronomie* **6** (2), 187-194

McGee D.C., 1973. Losses in rapeseed caused by blackleg in Victoria, Australia. *Second International Congress of Plant Pathology. Abstracts of Papers. Minneapolis, Minnesota USA*. Abstract 0825.

McGee D.C., Emmett R.W., 1977. Blackleg (*Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. & de Not.) of rapeseed in Victoria : crop losses and factors which affect disease severity. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **28**, 47-51.

McGee D.C., Petrie G.A., 1978. Variability of *Leptosphaeria maculans* in relation to blackleg of oilseed rape. *Phytopathology* **68**, 625-630.

McNabb W.M., Van Den Berg C.G.J., Rimmer S.R., 1993. Comparison of inoculation methods for selection of plant resistant to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *Canadian Journal of Plant Science* **73**, 1199-1207.

Mengistu A., Rimmer S.R., Koch E., Williams P.H., 1991. Pathogenicity grouping of isolates of *Leptosphaeria maculans* on *Brassica napus* cultivars and their disease reaction profiles on rapid-cycling Brassicas. *Plant Disease* **75**, 1279-1282.

Mengistu A., Rimmer S.R., Williams P.H., 1993. Protocols for *in vitro* sporulation, ascospore release, sexual mating, and fertility in crosses in *Leptosphaeria maculans*. *Plant Disease* **77**, 538-540.

- Mesquida J., Renard M., 1989. Etude de l'aptitude à germer *in vitro* du pollen de colza (*Brassica napus* L) récolté par l'abeille domestique (*Apis mellifica* L.) *Apidologie* **20**, 197-205.
- Messiaen C.M., 1981. Les variétés résistantes : méthode de lutte contre les maladies et ennemis des plantes. INRA, Paris pp 374.
- Meulemans M., 1989. Les champignons phytopathogènes. In : Traité de la phytopathologie végétale, ouvrage collectif sous la direction de J. SEMAL. Presses Agronomiques de Gembloux. 179-233
- Meyer W., Lieckfeldt E., Wöstemeyer J., Börner T.H., 1992. DNA fingerprinting for differentiating aggressivity groups of the rape seed pathogen *Leptosphaeria maculans*. *Mycological Research* **96**, 651-657.
- Micales J.A., Bonde M.R., Peterson G.L., 1992. Isozyme analysis in fungal taxonomy and molecular genetics. In : Handbook of Applied Mycology. Arora D.K., Elander R.P., Mukerji K.G., (Eds). Dekker, New York **4**, 57-59.
- Mithen R.F., Lewis B.G., Heaney R.K., Fenwick G.R., 1987. Resistance of leaves of *Brassica* species to *Leptosphaeria maculans*. *Transactions of British Mycological Society* **88**, 525-531.
- Mithen R.F., Magrath R., 1992. Glucosinolates of resistance to *Leptosphaeria maculans* in wild and cultivated *Brassica* species. *Plant Breeding*. **108**, 60-68.
- Morales V.M., Pelcher L.E., Taylor J.L., 1993a. Comparison of the 5.8s rDNA and internal transcribed spacer sequences of isolates of *Leptosphaeria maculans* from different pathogenicity groups. *Current Genetics*. **23**, 490-495.
- Morales V.M., Seguin-Swartz G., Taylor J.L., 1993b. Chromosome size polymorphism in *Leptosphaeria maculans*. *Phytopathology* **83**, 503-509.
- Morice J., 1992. Colza oléagineux. In : Amélioration des espèces végétales cultivées - objectifs et critères de sélection. Gallais A. et Bannerot H. (Eds). INRA Editions.
- Nathaniels N.Q.R., Taylor G.S., 1983. Latent infection of winter oilseed rape by *Leptosphaeria maculans*. *Plant Pathology* **32**, 23-31.
- Newman P.L., 1984. Screening for disease resistance in winter oilseed rape. *Aspect of Applied Biology* **6**, 371-380.
- Newman P.L., Bailey D.J., 1987. Screening for resistance to canker (*Leptosphaeria maculans*) in winter oilseed rape (*Brassica napus* ssp. *oleifera*). *Plant Pathology*. **36**, 346-354.
- Nelson R.R., 1973. Breeding plants for disease resistance : concept and applications. Pennsylvania State University Press, University Park pp 401.
- Ornstein L., 1964. Disc electrophoresis : I - background and theory. *Annals of New York Academic Science* **121**, 321-349.
- Palleau J.P., 1995. Bilan de campagne colza 1994-1995. Les rencontres du CETIOM. 5-8 décembre 1995. 4-7.
- Parlevliet J.E. 1993. What is durable resistance, a general outline. In : Durability of disease resistance. Jacobs Th. and Parlevliet J.E. (Eds). Kluwer Academic Publishers, 23-39.
- Pasteur N., Pasteur G., Bonhomme F., Catalan J., Britton-Davidian J., 1987. Manuel technique de génétique par électrophorèse des protéines. Lavoisier Tec et Doc. pp 217.
- Pedras M.S.C., Traylor J., Morales V.M., 1995. Phomaligin A and other yellow pigments in *Phoma lingam* and *P. wasabiae*. *Phytochemistry* **38**, 1215-1222.
- Perny A., Krouti M., Quinsac A. et Ribaillet D., 1991. Les Crucifères adventices du colza. Incidence sur la qualité des récoltes. *Phytoma* **426**, 43-45.

- Petrie G.A., 1969.** Variability in *Leptosphaeria maculans* (Desm) Ces. & de Not., the cause of blackleg of rape. These, University of Saskatchewan, Canada, pp 215.
- Petrie G.A., 1973.** Herbicide damage and infection of rape by the blackleg fungus *Leptosphaeria maculans*. *Canadian Plant Disease Survey* **53**, 26-28.
- Petrie G.A., 1978.** Occurrence of a highly virulent strain of blackleg (*Leptosphaeria maculans*) on rape in Saskatchewan (1975-77). *Canadian Plant Disease Survey* **58**, 21-25.
- Petrie G.A., 1982.** Blackleg of rapeseed (canola) caused by *Leptosphaeria maculans* : interactions of virulent and weakly virulent strains and implications for biological control. *Canadian Journal of Plant Pathology* **4**, 309.
- Petrie G.A., 1985.** Yield losses in Saskatchewan rapeseed/canola crops from basal stem cankers of blackleg (*Leptosphaeria maculans*) in 1982, with notes on other diseases. *Canadian Plant Disease Survey* **65**, 43-46.
- Petrie G.A., 1986.** Blackleg and other diseases of canola in Saskatchewan in 1984 and 1985. *Canadian Plant Disease Survey* **66**, 51-53.
- Petrie G.A., 1988.** The rapid differentiation of virulent and weakly virulent strains of *Leptosphaeria maculans* (blackleg or stem canker) and related pycnidial fungi from *Brassica* seeds and stems. *Canadian Journal of Plant Pathology* **10**, 188-190.
- Petrie G.A., 1994.** Effects of temperature and moisture on the number, size and septation of ascospores produced by *Leptosphaeria maculans* (blackleg) on rapeseed stubble. *Canadian Plant Disease Survey* **74**, 141 - 151.
- Petrie G.A., Vanderpool T.C., 1974.** Infestation of crucifer seed in western Canada by the blackleg fungus *Leptosphaeria maculans*. *Canadian Plant Disease Survey* **54**, 119-123.
- Petrie G.A., Lewis P.A., 1985.** Sexual compatibility of isolates of the rapeseed blackleg fungus *Leptosphaeria maculans* from Canada, Australia and England. *Canadian Journal of Plant Pathology* **7**, 253-255.
- Petrie G.A., Seguin-Swartz G., Gugel R.K., 1995.** Latent infection of Brassicaceae in the field by *Leptosphaeria maculans* (blackleg). *Canadian Journal of Plant Pathology* **17**, 75-81.
- Pinochet X., 1994.** La marche vers les hybrides : premiers bilans. *Oléagineux Corps Gras Lipides (OCL)* **3**, 166-168.
- Plummer K.M., Howlett B.J., 1993.** Major chromosomal length polymorphisms are evident after meiosis in the phytopathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. *Current Genetics* **24**, 107-113.
- Plummer K.M., Dunse K., Howlett B.J., 1994.** Non-aggressive strains of the blackleg fungus, *Leptosphaeria maculans*, are present in Australia and can be distinguished from aggressive strains by molecular analysis. *Australian Journal of Botany* **42**, 1-8.
- Pound G.S., 1947.** Variability in *Phoma lingam*. *Journal of Agricultural Research* **75**, 113-133.
- Puninthalingam E., Holliday P., 1972.** *Leptosphaeria maculans*. In : Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. *Commonwealth Mycological Institute Association of Applied Biology*, Kew England **34** (331).
- Quiros C.F., 1995.** Brassica diversity and wide hybridization. Proceedings of the 9th International Rapeseed Congress, Cambridge UK, pp. 1057-1062.
- Rapilly F., Richard H., Skajennikoff M., Cauderon Y., Roussel J., 1989.** Pressions de sélection exercées par le noyau ou le cytoplasme de l'hôte sur l'agressivité d'un parasite nécrotrophe du blé (*Septoria nodorum* Berk). *Agronomie* **9**, 703-718.
- Rasmussen U., Giese H, Mikkelsen J.D., 1992a.** Induction and purification of chitinase in *Brassica napus* L. ssp. *oleifera* infected with *Phoma lingam*. *Planta* **187**, 328-334.

Rasmussen U., Kirsten B., Collinge B., 1992b. Cloning and characterization of a pathogen-induced chitinase in *Brassica napus*. *Plant Molecular Biology* **20**, 277-287.

Raymond G., Marquier C., 1995. La graine de cotonnier et ses produits. *Oléagineux Corps Gras Lipides (OCL)* **1**, 422-424.

Régnauld Y., Laville J., Penaud A., 1987. Cahiers techniques. Les maladies du colza d'hiver. CETIOM, Paris.

Reynaud B., 1984. Etude de quelques aspects de la biologie d'*Ascochyta fabae* et des relations hôte-parasite en vue de l'appréciation de la résistance de la fêverole à l'antracnose. Rapport de DEA. Université de Rennes I, 31p.

Renard M., Pelletier G., 1995. Adapter le colza à l'industrie. *Biofutur* **148**, 20-23.

Renard M., Brun H., Chèvre A.M., Delourme R., Guerche P., Mesquida J., Morice J., Pelletier G., Primard C., 1992. Colza oléagineux. In : Amélioration des espèces végétales cultivées - objectifs et critères de sélection. Gallais A. et Bannerot H. (Eds). INRA Editions, 135-145.

Rieux H.G., 1994. Tendances du marché mondial des huiles et graisses alimentaires. *Oléagineux Corps Gras Lipides (OCL)* **1**, 4-8.

Rimmer S.R., Van Den Berg C.G.J., 1992. Resistance of oilseed *Brassica* spp. to blackleg caused by *Leptosphaeria maculans*. *Canadian Journal of Plant Pathology* **14**, 56-66.

Rimmer S.R., Searth R., McVetly P.B.E., Woods D., Gugel R., Seguin-Swartz G., 1995. Breeding for resistance to blackleg (stem canker) in western Canada. *Blackleg News* **5**, 11-15.

Robinson R.A., 1976. Plant pathosystems. Advanced series in agricultural Sciences 3. Springer. Verlag Berlin Heidelberg, New York pp. 184.

Rouxel T., Renard M., Kollmann A., Bousquet J.F., 1990. Brassilexin accumulation and resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica* spp. and progeny of an interspecific cross *B. juncea* x *B. napus*. *Euphytica* **46**, 175-181.

Rouxel T., Kollman A., Bouldard L., Mithen R.F., 1991. Abiotic elicitation of indole phytoalexins and resistance to *Leptosphaeria maculans* within *Brassicaceae*. *Planta* **184**, 271-278.

Rouxel T., Gall C., Balesdent M.H., 1994. Du polymorphisme au complexe d'espèces : combien d'agents pathogènes sont impliqués dans la nécrose du collet du colza ? *Agronomie* **14**, 413-432.

Roy N., Reeves J., 1975. Breeding better rape and linseed for western Australia. *Journal of Agriculture. Western Australia* **16**, 93-97.

Roy N.N., 1978. A study on disease variation in the populations of an interspecific cross of *Brassica juncea* L. x *Brassica napus* L. *Euphytica* **27**, 145-149.

Roy N.N., 1984. Interspecific transfer of *Brassica juncea*-type high blackleg resistance to *Brassica napus*. *Euphytica* **33**, 295-303.

Sacristan M.D., 1982. Resistance responses to *Phoma lingam* of plants regenerated from selected cell and embryogenic cultures of haploid *Brassica napus*. *Theoretical Applied Genetics* **61**, 193-200.

Sacristan M.D., Gerdemann M., 1986. Different behavior of *Brassica juncea* and *Brassica carinata* as sources of *Phoma lingam* resistance in experiments of interspecific transfer to *Brassica napus*. *Plant Breeding* **97**, 304-314

Salisbury P., Ballinger D., 1993. Race variability in *Leptosphaeria maculans*. *Blackleg News* **1**, 3-4.

Scherrer B., 1984. Biostatistique. Morin G. (Ed) pp 850.

Schramm H., Hoffmann G.M., 1987. Infektionszeit und Befallsentwicklung der Phoma-Wuzelhals- und Stengeläule (*Phoma lingam*, Perf-stadium *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. & de Not.) an Winterraps, Auswirkungen von Fungizidbehandlungen. *Gesunde Pflanzen* 39, 338-344.

Shäfer C., Wöstemeyer J., 1992. Random primer dependent PCR differentiates aggressive from non-aggressive isolates of the oilseed rape pathogen *Phoma lingam* (*Leptosphaeria maculans*). *Journal of Phytopathology* 136, 124-136.

Sharma H.S.S., Brown A.E., 1983. Temperature enhanced sectoring in barley isolates of *Septoria nodorum* and the possible relationship with varying pathogenicity. *Transactions of the British Mycological Society* 81, 263-267.

Siciliano M.J., Schaw C.R., 1976. Separation and visualization of enzymes on gels. In Smith, I. (ed), *Chromatographic and electrophoretic techniques*, London, U.K., William Heinemann Medical Books Ltd 11, 185-209.

Sippell D.W., Patel J.D., McNabb W.M., Hall R., 1991. Inheritance of resistance to *Leptosphaeria maculans* in spring *Brassica napus*. *Proceeding of the 8th International Rapessed Congress*, Saskatoon, July 9-11 1991 1, 232-237.

Sippell D.W., Wong R.S.C., Hall R., 1988. Isozyme polymorphisms differentiate isolates of *Leptosphaeria maculans* virulent and weakly virulent to *Brassica napus*. *Phytopathology* 78, 1511 (résumé).

Sjödin C., Glimelius K., 1988. Screening for resistance to blackleg *Phoma lingam* (Tode ex Fr.) Desm. within *Brassicaceae*. *Journal of Phytopathology* 123, 322-332.

Skajennikoff M., Rapilly F., 1983. Etudes sur l'agressivité de *Septoria nodorum* Berk. Effet des hôtes (triticale et blé) et des organes attaqués. *Agronomie* 3 (2), 131-140.

Smith H.C., Sutton B.C., 1964. *Leptosphaeria maculans*, the ascogenous state of *Phoma lingam*. *Transactions of British Mycological Society*, 47 : 159-165.

Somé A., Tivoli B., 1993. *Fusarium* spp. from potatoe : polymorphism of esterase phenotypes on polyacrylamid gel electrophoresis. *Agronomie* 13, 637-649.

Stringam G.R., Bansal V.K., Thiagarajah M.R., Tewari J.P., 1992. Genetic analysis of blackleg (*Leptosphaeria maculans*) resistance in *Brassica napus* L. using the doubled haploid method. *Thirteen Eucarpia Congress*, July 6-11, 1992, Angers, Posters Abstracts 213-214.

Struss D., Bellin V. et Röbbelen G., 1991. Development of B Genome chromosome addition lines of *B. napus* using different interspecific *Brassica* hybrids. *Plant Breeding* 106, 209-214.

Struss D., Quiros C.F., Röbbelen G., 1992. Mapping of molecular markers on *Brassica* B-genome chromosomes. *Plant Breeding* 108, 320-323.

Subrahmanyam P., Mc. Donald D., Reddy L.J., Nigam S.N., Smith D.H., 1993. Origin and utilization of Rust resistance in groundnut. In : Durability of disease resistance. Th. Jacobs and J.E. Parlevliet (Eds). Kluwer Academic Publishers, 147-158.

Taylor J.L., Borgmann I.E., 1994. An unusual repetitive element from highly virulent isolates of *Leptosphaeria maculans* and evidence of its transfer to a weakly virulent isolate. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 7, 181-188.

Taylor J.L., Borgmann I.E., Seguin-Swartz G., 1991. Electrophoretic karyotyping of *Leptosphaeria maculans* differentiates highly virulent from weakly virulent isolates. *Current Genetics* 19, 273-277.

Taylor J.L., Pedras M.S.C., Porales V.M., 1995. Horizontal transfer in the phytopathogenic fungal genus *Leptosphaeria* and host range expansion. *Trends in Microbiology* 3, 202-206.

Thurling N., Venn L.A., 1977. Variation in the responses of rapeseed (*Brassica napus* and *B. campestris*) cultivars to blackleg (*Leptosphaeria maculans*) infection. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry* 17, 445-451.

- Thürwächter F., Garbe V., Hoppe H.H., 1995.** Are non-aggressive isolates of *Leptosphaeria maculans* able to induce resistance to aggressive isolates ? *Blackleg News* **5**, 16-17.
- U N., 1935.** Genome-analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *Japanese Journal of Botany* **7**, 389-448.
- Van der Plank J.E., 1968.** Disease resistance in plants Academic Press Inc., New York and London.
- Venn L., 1979.** The genetic control of sexual compatibility in *Leptosphaeria maculans*. *Australasian Plant Pathology* **8**, 5-6.
- Vial A., 1995.** Guide Colza : Zoom sur sept ravageurs. *Cultivar (hors série)*, 34-41.
- Williams P.H., Delwiche P.A., 1979.** Screening for resistance to blackleg of crucifers in the seedling stage. *Cruciferae Newsletter* **4**, 24.
- Wood P.M., Barbetti M.J., 1977.** A study on the inoculation of rape seedlings with ascospores and pycnidiospores of the blackleg disease causal agent *Leptosphaeria maculans*. *J. Austr. Int. Agric. Sci.* **43**, 79-80.
- Wratten N., Salisbury P.A., Ballinger D.J., 1995.** Breeding for blackleg resistance in Australia. *Blackleg News* **5**, 10-11.
- Xi K., Morrall R.A.A., Verma P.R., Westcoot N.D., 1989.** Efficacy of seed treatment and fertilizer coating with flutriafol against blackleg of canola. *Canadian Journal of Plant Pathology* **11**, 199. (Abstr.)
- Xi K., Morrall R.A.A., Gugel R.K., Verma P.R., 1991.** Latent infection in relation to the epidemiology of blackleg of spring rapeseed. *Canadian Journal of Plant Pathology* **13**, 321-331.
- Zhu J.S., Struss D., Röbbelen G., 1993.** Studies on resistance to *Phoma lingam* in *Brassica napus*-*Brassica nigra* addition lines. *Plant Breeding* **111**, 192-197.

ABREVIATIONS ET DEFINITIONS

ABREVIATIONS ET DEFINITIONS DES TERMES UTILISES

I-ABREVIATIONS

ADN	Acide Désoxyribonucléique
BWYV	Bect Western Yellow Viruse
CaMV	Cauliflower Mosaic Viruse
CETIOM	Centre Technique Interprofessionnel des Oléagineux Métropolitains
Cv(s)	Cultivar(s)
EDTA	Ethylenediamine-Tetraacetic Acid
EST	Estérase
G-6-PD	Glucose-6-Phosphate-Déshydrogénase
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
ITS 1 et 2	Internal Transcribed Space 1 and 2
J.A.I.	Jours après l'inoculation
MG	Malt-gélose
MTT	Méthyl Thiazolyl Blue
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
PCR	Polymerase Chain Reaction
PGI	Phosphoglucose isomérase
PMS	Phénazine Méthosulfate
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
Rf	Référence frontale
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
TEMED	N,N-tétraméthyléthylènediamine
Tris	Trishydroxyméthylaminométhane
TuMV	Turnip Mosaic Viruse
UPGMA	Unweighted Paired-Group Method Analysis

II-DEFINITIONS

Souche : entité biologique génétiquement homogène.

Tétrade (du grec "tetras" : groupe de quatre) : elle désigne le groupe de quatre cellules produit par la méiose de la cellule mère. Chez de nombreux Ascomycètes dont *L. maculans*, une mitose

supplémentaire aboutit à la formation de huit cellules, jumelles deux à deux. Le terme "tétrade" correspond à l'ensemble des huit ascospores issues d'un même asque.

Isolat : c'est un mélange pluriconidien obtenu à partir d'organes malades. Il est considéré *a priori* comme étant génétiquement hétérogène.

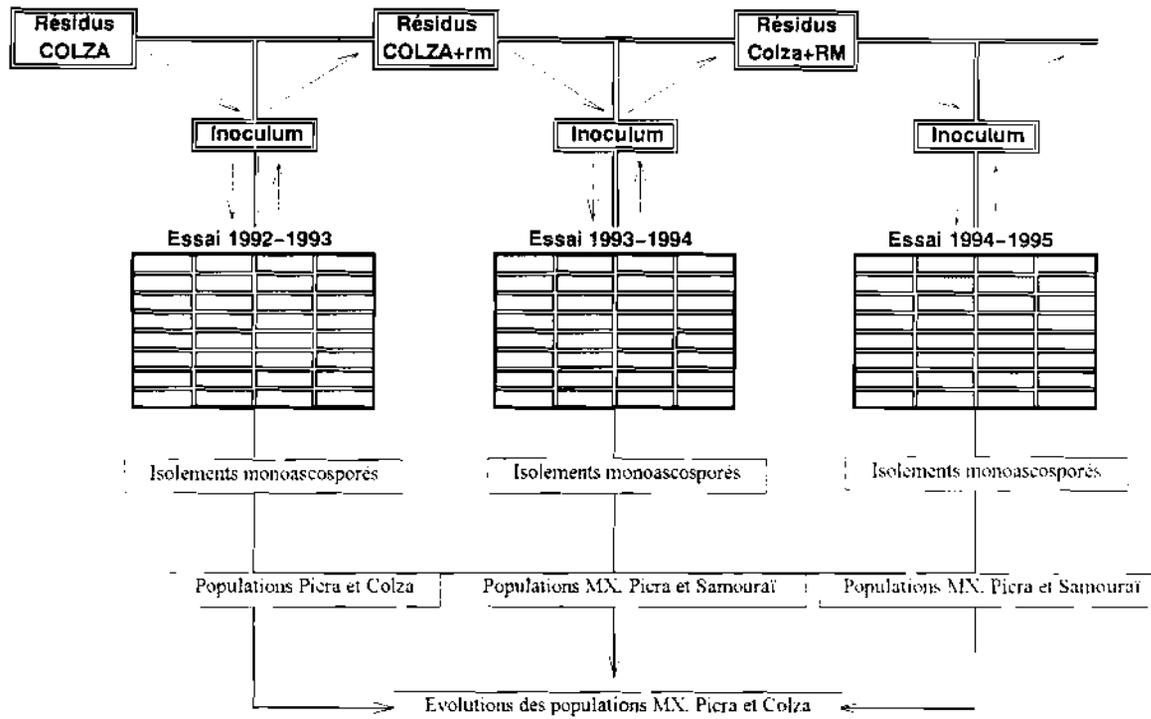
Population : c'est un ensemble de souches ou isolats ayant en commun une origine biologique donnée. Par exemple le terme population isolée du colza se réfère à l'ensemble de souches et isolats provenant de ce génotype.

Virulence : c'est la capacité que possède un agent pathogène de surmonter une résistance verticale (ou spécifique) qui est de nature oligo ou monogénique.

Agressivité : c'est l'importance des dégâts que l'agent pathogène peut causer sur la plante-hôte qui lui oppose une résistance horizontale (ou générale), souvent de nature polygénique. Cette résistance est dite partielle et agit contre toutes les races de l'agent pathogène.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Dispositif expérimental au champ destiné à analyser l'évolution des populations de *Leptosphaeria maculans* par accroissement de la pression de sélection exercée par la résistance d'origine Moutarde brune sur les populations du pathogène.



COLZA : Inoculum constitué exclusivement de résidus de Colza.

COLZA + rm : Forte proportion de résidus de Colza.

rm : faible proportion de résidus provenant des lignées de recombinaison, de la Moutarde brune et portant des périthèces.

Colza + RM : Faible proportion de résidus de Colza

RM : forte proportion de résidus du matériel résistant.

ANNEXE 2 : Milieux de culture

1. Milieu V8-juice agar

Juice V8 (Campbell's) (jus de légumes)	180 ml
Agar	25 g
Eau	725 ml
Autoclavé 25 mn à 110°C	

2. Milieu liquide Czapek

Saccharose	30 g
NaNO ₃	3 g
KH ₂ PO ₄	1 g
KCl	0,5 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5 g
Fe ₂ (SO ₄) ₃	0,01 g
Extrait de levure (Difco)	2 g
Eau	1000 ml

3. Eau gélosée

Agar	50 g
Eau	1000 ml

4. Malt-agar

Agar	20 g
Malt	20 g
Eau	1000 ml

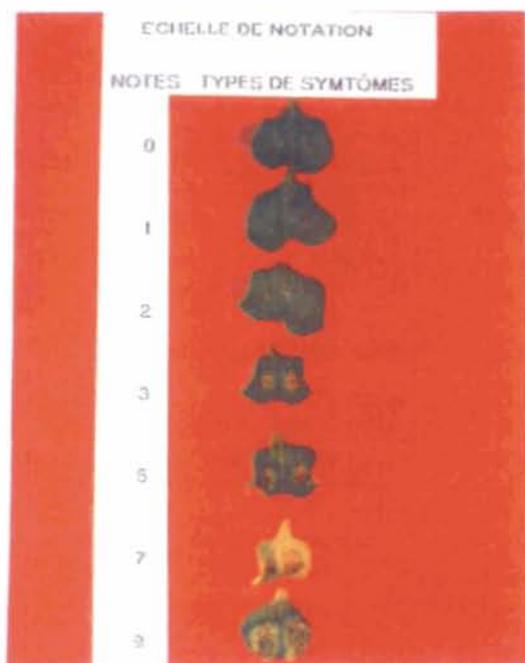
Le milieu Czapek et les deux milieux gélosés sont autoclavés à 120°C pendant 20 mn.

Une solution mère de streptomycine à 10 % est additionnée aux milieux gélosés à raison de 2.5 mg/l de milieu soit une concentration de 250 µg/ml.

ANNEXE 3 : Echelles de notation des symptômes sur cotylédons, feuilles et tiges

Notes de maladie	Description des symptômes
<i>Test cotylédonaire</i>	
0	Pas de symptôme
1	Noircissement limité au point d'inoculation
2	Noircissement limité autour de la blessure, diamètre des lésions de 0,5 à 1,5 mm. quelquefois un halo faiblement chlorotique est présent, pas de sporulation.
3	Lésions nécrotiques noires de 1,5 à 3 mm. présence d'un halo chlorotique. pas de sporulation.
5	Lésions de 3 à 6 mm délimitées par une marge nécrotique foncée avec quelquefois une déformation des tissus gris-vert, pas de sporulation.
7	Lésions gris-vert bien délimitées, de diamètre 5 à 7 mm, pas de marge nécrotique foncée.
9	Flétrissement des tissus, lésions à marges diffuses. présence de sporulations.
<i>Test sur feuilles</i>	
0	Pas de symptôme
1	Noircissement limité au point d'inoculation
2	Macule gris vert de 1-2 mm avec une marge nette. présence d'une chlorose.
3	Macule gris vert de 2-3 mm avec une marge diffuse
4	Macule gris vert de 3-6 mm avec une marge diffuse
5	Macule gris vert avec une marge diffuse. diamètre supérieur à 6 mm.
6	Macule de note 5 couverte de nombreuses pycnides.
<i>Test sur tiges : symptômes induits par les souches du groupe A</i>	
0	Pas de symptôme extérieur. Moelle saine.
1	Noircissement de l'épiderme limité aux points d'inoculation. Moelle saine.
2	Noircissement limité à l'épiderme. n'atteignant pas les tissus du cortex. Symptôme couvrant une surface inférieure à la demi-périphérie de la tige sur 6 à 10 mm de longueur. Moelle saine.
3	Epiderme liégeux. Symptôme inférieur à la demi-périphérie de la tige. Longueur supérieure à 10 mm. Tissus du cortex sains. Moelle légèrement noircie au niveau des points d'inoculation.
4	Epiderme liégeux. Symptôme supérieur à la demi-périphérie de la tige. Tissus du cortex légèrement atteints.
5	Tissus du cortex liégeux couvrant une surface supérieure à la demi-périphérie de la tige. Brunissement des tissus ligneux du collet et du pivot. Plante verte.
6	Nécrose profonde portant quelques pycnides. Collet et pivot très atteints. Plante affaiblie à la récolte.
7	Nécrose profonde. Plante morte à la récolte. Présence de nombreuses pycnides.
<i>Test sur tiges : symptômes induits par les souches du groupe B</i>	
0	Pas de symptôme extérieur. Pas de noircissement de la moelle.
1	Noircissement de l'épiderme limité à la surface de la pastille. Moelle saine.
2	Noircissement de l'épiderme. Longueur : 6 à 10 mm Supérieur à la demi-périphérie de la tige Noircissement de la moelle : 6 à 10 mm
3	Symptôme de note 2 avec un léger noircissement des tissus du cortex sur la demi-périphérie de la tige. Noircissement de la moelle : > 10 mm.
4	Symptôme de note 3 avec noircissement très important des tissus ligneux.
5	Noircissement très intense de l'épiderme, de la moelle et des tissus ligneux.

Annexe 3a : Echelles de notation des symptômes cotylédonaire et foliaires causés pour les souches des groupes A et B.



Cotylédons



Feuilles
Groupe A



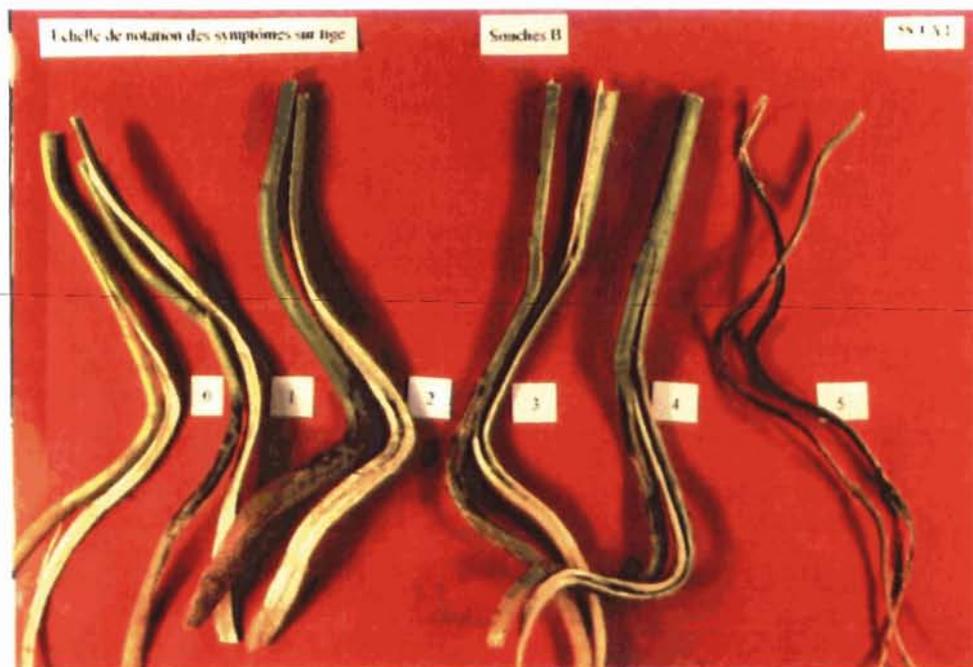
Feuilles
Groupe B

(Photos : I. Somda).

Annexe 3b : Echelles de notation des symptômes sur tige causés par les souches des groupes A et B.



Groupe A



Groupe B

(Photos : I. Somda).

ANNEXE 4 : Préparation des tampons et des gels

1) Tampon d'extraction (pH7)

Tris HCl	10 mM
EDTA	1 mM
β -mercaptoéthanol	3 mM
H ₂ O	1000 ml
Cystéine	1 mM

2) Solution d'acrylamide-bisacrylamide

Acrylamide	30 g
Bisacrylamide	0.8 g
Eau	100 ml

Filtrer et stocker à 4°C à l'abri de la lumière.

3) Tampon du gel de séparation (Tris HCl 1,5M; pH 8,8)

Tris	18,15g
Eau	100 ml

Ajuster à pH 8,8 avec du HCl. filtrer et stocker à 4°C

4) Tampon du gel de concentration (Tris HCl 0,5M; pH 6,8)

Tris	6,09 g
Eau	100 ml

Ajuster à pH 6,8 avec du HCl. filtrer et stocker à 4°C

5) Tampon de migration

Tris	3 g
Glycine	14,4 g
Eau	1000 ml

Conserver à 4°C

6) Préparation des gels

	gel de concentration 3,75% acrylamide	gel de séparation 10% acrylamide
Acrylamide-bisacrylamide	1,25 ml	5 ml
Tampon/gel de concentration	2,50 ml	(-)
Tampon/gel de séparation	(-)	3,75 ml
Eau	5,75 ml	5,5 ml
Dégazer le mélange pendant 10 mn		
Persulfate d'ammonium	500 μ l	750 μ l
TEMED	10 μ l	20 μ l

ANNEXE 5 : Révélation des protéines et des estérases

1) Coloration des protéines totales au bleu de Coomassie

1.1. Colorant:

Coomassie blue brillant R	400 mg
Ethanol	400 ml
Acide acétique	50 ml
Eau	1000 ml

1.2. Décolorant:

Méthanol	200 ml
Acide acétique	50 ml
Glycérol	25 ml
QSP Eau	1000 ml

2) Révélation des estérases

1. Tampon phosphate 0,1 M pH 6,0

Solution A: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	15,6 g/1000ml d' H_2O
Ajuster à pH 6,0 avec NaOH 1M	
Solution B: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3,65 g/1000ml d' H_2O
Ajuster à pH 6.0 avec HCl 1M	

2. Mode opératoire:

- Mélanger à l'obscurité
 - Tampon phosphate 50 ml (44ml A + 6ml B)
 - Fast Blue RR salt 50 mg

- Dissoudre complètement le colorant et filtrer la solution

- Dissoudre dans 1 ml d'acétone

α -Naphthyl acétate	20 mg
β -Naphthyl acétate	20 mg

- Immerger le gel dans la solution de colorant additionnée de la solution de substrat

- Incuber à 37 °C à l'obscurité pendant 20 à 40 mn, rincer le gel plusieurs fois à l'eau puis le conserver dans l'acide acétique à 10 %.

ANNEXE 6 : Protocoles pour l'électrophorèse sur les gels d'amidon

1) Tampon du gel (pH 7)

DL Histidine	0.31 g
Eau qsp	300 ml
Ajuster à pH 7 avec du NaOH 1N	

2) Tampon d'extraction (Tris HCl à 1 % de glutathion, pH 7,5)

Glutathion réduit	0.8 g
Ajuster à pH 7,5 avec du Tris 2 M	
Eau qsp	40 ml

3) Tampon de migration (Tris 0,135 M, pH 7)

Tris	16.35 g
Titrer avec de l'acide citrique anhydre	

4) Révélation des Phosphoglucose isomérases

Solution de révélation par gel d'amidon :	PMS	4 mg
	NADP	5 mg
	MTT	7,5 mg
	Fructose 6 phosphate	20 mg
	Tampon Tris HCl 0.1M. pH 7,5	50 ml
Ajouter en dernier le Glucose-6-phosphate déhydrogénase	25 U	

Incuber à 30 °C à l'obscurité jusqu'à la coloration des bandes en bleu.

Annexe 7 : Stades repères du Colza

Légende : les jeunes plantes marquent la tige							
B - Formation de la rosette. Apparition des feuilles. pas d'entre-nœuds entre les pétioles. Absence de vraie tige.	A - Stade en éléonores	C - Montaison	C1	Reprise de la végétation Apparition de jeunes feuilles	F - Floraison	F1	Premières fleurs ouvertes
	Pas de feuilles "vraies" Seuls les 2 cotylédons sont visibles		C2	Entre-nœuds visibles. On voit un étranglement vert clair à la base des nouveaux pétioles. c'est la tige		F2	Allongement de la hampe florale Nombreuses fleurs ouvertes
	B1 - 1 feuille vraie étalée ou déployée	D - Boutons accolés	D1	Boutons accolés encore cachés par les feuilles terminales.	G - Formation des siliques	G1	Chute des premiers pétales. Les dix premières siliques ont une longueur inférieure à 2 cm.
	B2 - 2 feuilles vraies étalées ou déployées		D2	Inflorescence principale dégagée Boutons accolés. Inflorescences secondaires visibles		G2	Les dix premières siliques ont une longueur comprise entre 2 et 4 cm.
	B3 - 3 feuilles vraies étalées ou déployées		E	Boutons séparés Les pedoncules floraux s'allongent en commençant par ceux de la périphérie	G3	Les dix premières siliques ont une longueur supérieure à 4 cm.	
B4 - 4 feuilles vraies étalées ou déployées	G5 - Grains colorés			G4	Les dix premières siliques sont bosselées		
B5 - 5 feuilles vraies étalées ou déployées, etc							

A. Girardot

Groupe de travail CETIOM, I.N.R.A., P.V.

Les stades représentés correspondent à des repères végétatifs permettant de normaliser les observations phénologiques.

Un stade est atteint dans une culture lorsque 50 % des plantes sont à ce stade.

La définition et la représentation de ces stades ont été élaborées à la suite de nombreuses observations faites par les techniciens de la culture du Colza.

ANNEXE 8 : Echelle de notation de la nécrose du collet au champ

Notations

Classer les collets en fonctions du degré de gravité de la nécrose.

- 1 Plante saine.
- 2 Petite nécrose superficielle.
- 3 Nécrose un peu plus profonde et inférieure à la demi-périphérie du collet.
- 4 Attaque superficielle supérieure à la demi-périphérie du collet ou nécrose plus profonde d'un seul côté du collet. Le collet ne casse pas à la flexion.
- 5 Attaque supérieure à la demi-périphérie, le collet casse à la flexion.
- 6 Plante cassée au moment de l'observation.
- 7 Plante sèche avec présence d'une nécrose du collet de note 6 au moment de l'observation.

NB : la nécrose observée se situe au niveau du collet et jusqu'à 3 à 4 cm en dessous. La classe 7 est indicative et entre dans le calcul de l'indice de maladie ajoutée à la classe 6.

Calcul de l'indice de maladie (IM) :

Appliquer à chaque classe de notation un indice de maladie de 0, 1, 3, 5, 7, 9.

$$IM = (n_1 \times 0 + n_2 \times 1 + n_3 \times 3 + n_4 \times 5 + n_5 \times 7 + n_6 \times 9) / N$$

où n est le nombre de plantes dans chaque classe de maladie et N le nombre total de plantes dans l'échantillon observé.



(Photo : H. Brun)

Illustration de l'échelle de notation de la nécrose du collet

ANNEXE 9 : Agressivité des souches du groupe A isolées de la lignées de recombinaison MX sur chacun des trois genotypes

Lignée MX		cv. Westar		cv. Picra	
Souches	IM \pm E. T. ^a	Souches	IM \pm E. T. ^a	Souches	IM \pm E. T. ^a
MX-T1	8,9 \pm 0,5	R10	9,0 \pm 0,0	MX1-13	4,3 \pm 1,8
MX-S	8,8 \pm 0,7	R19	9,0 \pm 0,0	MXC1	4,1 \pm 1,5
MX2-4	8,8 \pm 0,8	R23	9,0 \pm 0,0	MX1-8	3,9 \pm 1,8
MX4-7	8,6 \pm 0,9	R13	9,0 \pm 0,0	MXC2	3,4 \pm 1,4
MX4-3	8,6 \pm 1,0	R8	9,0 \pm 0,0	R23	3,4 \pm 1,8
MXC1	8,6 \pm 1,2	R22	9,0 \pm 0,0	MX4-9	3,2 \pm 1,9
MX4-2	8,6 \pm 1,1	MX3-8	9,0 \pm 0,0	MX2-5	3,1 \pm 1,8
MXC2	8,5 \pm 1,1	R11	9,0 \pm 0,0	MX-S	3,0 \pm 1,7
R2	8,5 \pm 1,5	MX-S	9,0 \pm 0,3	R9	2,8 \pm 1,3
R6	8,5 \pm 1,5	R16	9,0 \pm 0,3	MX-T1	2,7 \pm 1,3
MX4-9	8,1 \pm 2,0	R5	9,0 \pm 0,3	MX2-4	2,7 \pm 1,1
R7	8,1 \pm 1,6	MX2-4	8,9 \pm 0,4	MX3-7	2,7 \pm 1,5
R4	8,1 \pm 1,7	MX1-13	8,9 \pm 0,4	MX4-8	2,7 \pm 1,5
R8	8,1 \pm 1,5	R7	8,9 \pm 0,6	R10	2,6 \pm 1,3
R13	7,9 \pm 1,8	R25	8,9 \pm 0,5	MX-3	2,5 \pm 1,3
MX-1	7,6 \pm 1,6	MX2-8	8,9 \pm 0,5	MX4-2	2,5 \pm 1,4
R9	7,3 \pm 2,2	MX4-2	8,9 \pm 1,0	MX1-3	2,5 \pm 1,4
R14	7,2 \pm 2,5	MX1-8	8,9 \pm 1,1	R8	2,5 \pm 1,4
RT	7,0 \pm 2,1	R24	8,9 \pm 1,1	MX3-4	2,4 \pm 1,7
MX2-2	6,8 \pm 2,5	MX3-7	8,8 \pm 1,1	MX2-8	2,3 \pm 1,1
R18	6,5 \pm 1,8	R12	8,8 \pm 0,8	MX2-2	2,3 \pm 1,4
MX-3	6,3 \pm 2,1	R18	8,7 \pm 1,1	MX1-2	2,3 \pm 1,0
MX4-8	6,0 \pm 2,6	MX-C1	8,7 \pm 1,1	R6	2,3 \pm 1,0
MX2-8	5,9 \pm 2,4	R9	8,7 \pm 1,3	R22	2,2 \pm 1,0
MX2-5	5,9 \pm 2,1	MX1-10	8,7 \pm 1,3	MX3-1	2,0 \pm 1,1
MX1-13	5,8 \pm 1,8	MX4-1	8,7 \pm 1,6	MX3-3	2,0 \pm 0,9
R23	5,8 \pm 1,6	R6	8,6 \pm 1,1	MX-1	2,0 \pm 1,3
MX1-11	5,3 \pm 2,1	R3	8,6 \pm 1,1	MX1-11	1,9 \pm 1,2
R1	5,2 \pm 2,3	MX1-9	8,6 \pm 1,0	R4	1,9 \pm 1,0
MX1-8	5,2 \pm 1,8	MX-1	8,6 \pm 1,5	MX3-8	1,9 \pm 1,1
R21	4,9 \pm 2,0	R4	8,6 \pm 1,3	R7	1,9 \pm 0,5
MX3-8	4,7 \pm 1,7	MX1-11	8,6 \pm 1,1	MX1-14	1,8 \pm 1,1
MX1-9	4,5 \pm 1,9	MX2-5	8,5 \pm 1,4	MX3-2	1,7 \pm 1,2
R10	4,4 \pm 2,2	MX4-9	8,5 \pm 1,2	MX1-9	1,7 \pm 1,0
MX3-2	4,4 \pm 1,8	MX4-7	8,5 \pm 0,9	R12	1,7 \pm 0,9
MX1-14	4,4 \pm 2,2	MX-C2	8,5 \pm 1,2	MX4-7	1,7 \pm 1,0
MX-2	4,2 \pm 3,7	MX-T1	8,5 \pm 1,3	MX1-7	1,6 \pm 1,1
R20	4,1 \pm 1,4	MX3-4	8,5 \pm 1,2	R2	1,6 \pm 0,9
MX1-12	3,9 \pm 1,5	R2	8,4 \pm 1,3	R24	1,6 \pm 0,9
MX4-1	3,8 \pm 1,3	MX3-2	8,3 \pm 1,1	R11	1,6 \pm 0,9
MX3-7	3,7 \pm 1,8	MX3-1	8,2 \pm 1,9	R16	1,6 \pm 0,9
R5	3,6 \pm 1,8	MX-2	7,9 \pm 2,9	R1	1,5 \pm 0,8
MX2-7	3,6 \pm 1,5	RT	7,9 \pm 1,7	MX2-7	1,5 \pm 0,6
MX1-10	3,3 \pm 1,6	R21	7,8 \pm 1,7	MX1-10	1,5 \pm 1,0
MX2-6	3,2 \pm 1,5	MX2-2	7,7 \pm 1,7	R5	1,5 \pm 0,7
R16	3,1 \pm 2,2	MX4-3	7,6 \pm 1,9	MX2-6	1,4 \pm 0,8
R24	3,0 \pm 1,4	MX-3	7,5 \pm 1,9	R3	1,4 \pm 0,8
MX3-1	2,9 \pm 1,7	R14	7,5 \pm 2,3	R13	1,4 \pm 0,6
MX1-5	2,7 \pm 2,6	MX3-3	7,3 \pm 2,3	RT	1,4 \pm 0,4
MX3-4	2,6 \pm 0,9	MX1-14	7,1 \pm 2,0	MX4-1	1,4 \pm 0,9
R22	2,6 \pm 1,2	MX3-6	7,0 \pm 2,6	R14	1,3 \pm 0,9
R25	2,5 \pm 1,2	MX1-12	7,0 \pm 2,1	R21	1,3 \pm 0,7
R12	2,5 \pm 1,5	R1	6,5 \pm 1,9	R20	1,3 \pm 0,5
R11	2,5 \pm 2,0	MX2-6	6,4 \pm 1,7	MX1-5	1,3 \pm 1,1
MX1-2	2,4 \pm 1,6	MX4-8	6,3 \pm 1,4	MX-2	1,3 \pm 0,8
MX3-3	2,3 \pm 0,8	MX2-7	6,2 \pm 1,3	R25	1,1 \pm 0,4
R19	2,2 \pm 0,8	MX1-2	6,2 \pm 1,5	MX1-12	1,1 \pm 0,7
MX1-3	2,2 \pm 2,0	MX1-3	5,8 \pm 1,9	R18	1,0 \pm 0,6
R3	2,1 \pm 1,0	R17	5,7 \pm 1,3	MX1-6	0,9 \pm 0,8
MX3-6	2,0 \pm 1,2	MX1-6	5,7 \pm 1,8	MX2-1	0,9 \pm 0,5
R15	1,9 \pm 1,7	R20	5,4 \pm 1,7	R15	0,9 \pm 0,3
MX2-1	1,9 \pm 0,9	MX1-5	5,3 \pm 1,5	MX3-6	0,8 \pm 0,8
MX1-6	1,8 \pm 1,5	MX1-7	5,2 \pm 1,6	R19	0,7 \pm 0,6
MX1-7	1,6 \pm 1,6	MX2-1	5,0 \pm 1,3	MX4-3	0,7 \pm 0,7
R17	1,2 \pm 1,0	R15	2,1 \pm 1,8	R17	0,3 \pm 0,4

^aIM \pm E. T. = Indice moyen de maladie \pm Ecart type.

ANNEXE 10 : Agressivité des souches et isolats du groupe A provenant du colza sur 3 génotypes.

Lignée MX		cv. Westar		cv. Picra	
Souches	I.M.±E.T.	Souches	I.M.±E.T.	Souches	I.M.±E.T. ^a
Co12	7,0±2,8	Co23	9,0±0,0	A942	3,2±1,3
A923	6,8±2,0	A775	9,0±0,0	Co23	3,1±1,6
Co4	6,6±2,1	Co13	9,0±0,0	A940	3,0±1,2
Co18	6,3±1,8	A447	9,0±0,0	Co7	2,8±1,5
A942	6,2±2,1	A764	9,0±0,0	A941	2,7±1,2
Co13	6,1±2,8	A759	9,0±0,0	A759	2,5±1,1
Co22	6,0±1,6	Co7	9,0±0,0	Co22	2,4±1,2
Co17	5,8±3,0	A923	9,0±0,0	Co2	2,2±1,1
Co11	5,6±2,3	Co17	9,0±0,0	Co18	2,2±1,1
A759	5,5±1,5	Co9	9,0±0,0	A923	2,0±1,4
A940	4,6±1,7	A901	8,9±0,4	Co4	1,9±0,8
Co24	4,4±2,0	A813	8,9±0,5	Co27	1,8±0,8
A941	4,0±1,6	A940	8,9±0,5	Co3	1,7±0,9
Co1	3,4±1,7	A290	8,8±0,6	Co12	1,7±0,7
A447	3,4±1,2	A824	8,8±1,2	A447	1,7±0,7
Co2	3,3±1,2	Co21	8,8±0,9	Co9	1,7±1,2
Co14	3,2±1,4	Co18	8,8±0,7	Co17	1,6±1,2
A925	3,1±1,1	A931	8,8±0,8	Co25	1,6±0,8
A764	3,0±1,3	A925	8,8±1,0	A932	1,5±0,9
Co3	3,0±1,4	A941	8,4±1,5	Co24	1,5±1,0
A932	2,9±1,3	Co25	8,4±1,3	Co11	1,5±0,7
Co21	2,8±1,4	A932	8,4±2,0	Co13	1,5±0,6
A824	2,8±1,0	A924	8,1±1,6	Co1	1,3±0,7
Co25	2,7±1,2	A942	8,0±1,7	A764	1,2±0,5
A290	2,6±1,0	Co12	8,0±2,0	A931	1,1±0,5
A813	2,6±1,1	Co11	7,9±1,9	A813	1,1±0,4
Co23	2,4±0,7	Co22	7,9±1,3	A924	1,0±0,5
A775	2,4±1,1	A827	7,6±1,6	A901	1,0±0,5
A924	2,2±0,9	A929	7,1±2,1	A824	1,0±0,3
Co29	2,2±1,1	Co1	7,0±2,8	A929	0,9±0,2
Co27	2,2±1,2	Co4	7,0±2,1	A775	0,9±0,4
Co9	2,1±0,6	Co2	7,0±2,2	A827	0,9±0,3
A929	2,0±0,9	Co3	6,8±2,5	A290	0,9±0,4
A931	2,0±0,9	A922	6,8±2,1	A925	0,9±0,8
Co7	1,9±0,4	A314	6,6±2,3	A314	0,8±0,6
A827	1,8±1,0	Co24	6,3±1,7	Co29	0,8±0,8
A922	1,8±1,1	Co14	5,7±2,5	Co21	0,8±1,0
A314	1,5±0,9	A930	5,6±2,3	A922	0,7±0,4
A930	0,2±0,4	Co29	5,3±2,4	Co14	0,6±0,7
A901	NT ^b	Co27	4,7±2,3	A930	0,0±0,0

^a Indice de maladie ± Ecart-type

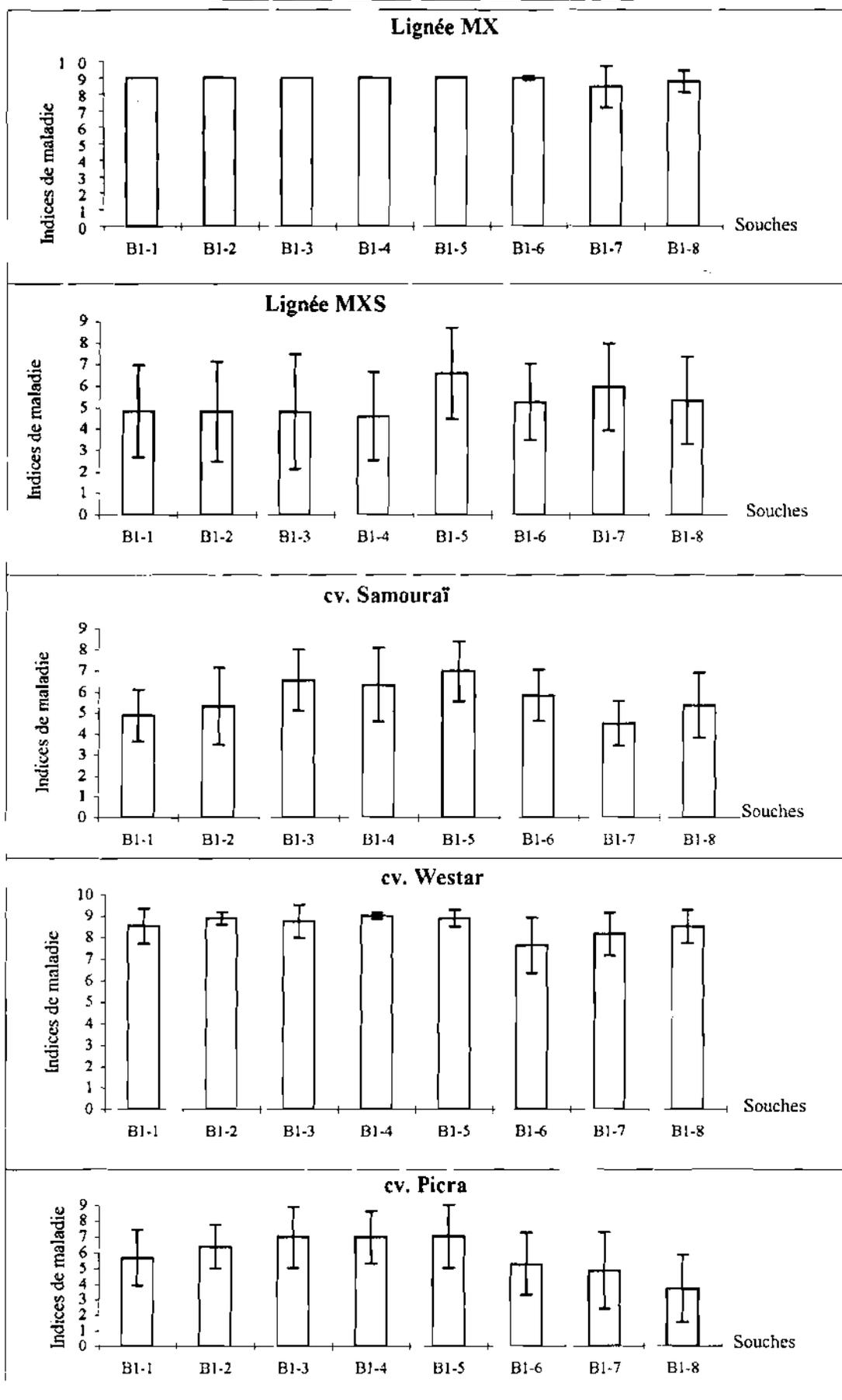
^b Non testée

ANNEXE 11 : Agressivité des souches du groupe B sur les trois génotypes analysés.

Lignée MX		cv. Westar		cv. Picra	
Souches	Indice de maladie ± E.T.	Souches	Indice de maladie ± E.T.	Souches	Indice de maladie ± E.T.
MX5	9,0 ± 0,0	MX6	9,0 ± 0,0	MX4	8,5 ± 1,6
MX6	9,0 ± 0,0	MX7	9,0 ± 0,0	B981	7,8 ± 2,3
B981	9,0 ± 0,0	MX4	9,0 ± 0,0	MX7	7,4 ± 2,5
MX4	9,0 ± 0,0	MX5	9,0 ± 0,0	MX8	7,3 ± 2,8
B980	9,0 ± 0,0	B981	9,0 ± 0,0	MX6	7,2 ± 3,2
B867	9,0 ± 0,0	B867	8,7 ± 0,8	B980	6,8 ± 3,0
B908	8,9 ± 0,5	RF	8,1 ± 1,5	MX5	6,7 ± 2,4
RF	8,8 ± 1,1	MX8	7,8 ± 2,6	B944	6,6 ± 1,9
MX7	8,7 ± 1,5	B980	7,6 ± 2,2	B908	4,8 ± 2,1
MX8	8,4 ± 1,7	B944	6,5 ± 1,7	RF	4,6 ± 2,7
B943	8,0 ± 1,3	B943	6,3 ± 1,9	B945	4,4 ± 2,3
B944	7,9 ± 1,2	B945	4,9 ± 1,7	B943	3,8 ± 1,5
B945	7,2 ± 2,2	B908	NT	B867	2,6 ± 1,4

E.T. = Ecart type; NT = Non testé

ANNEXE 12

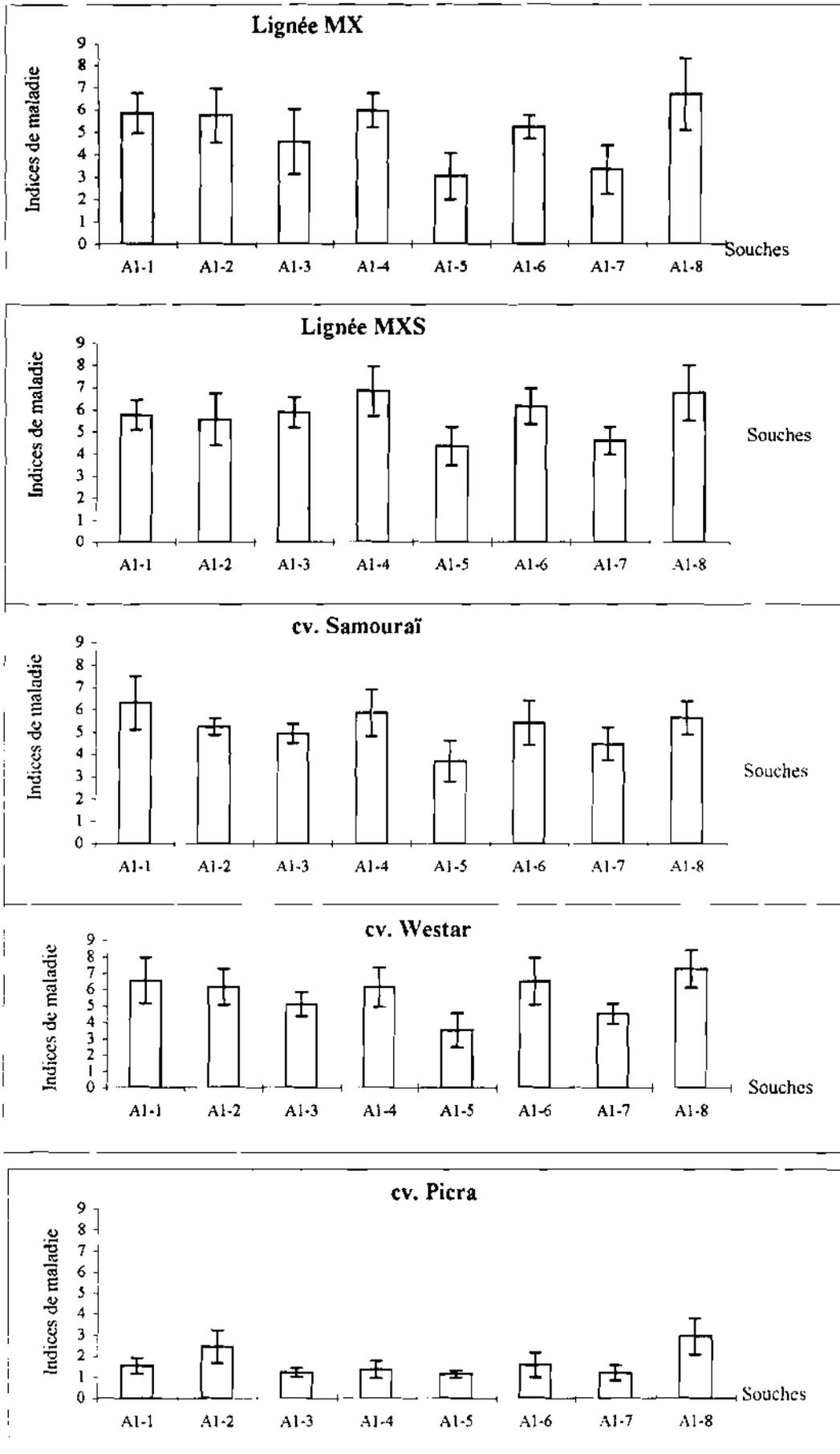


Pouvoir pathogène de la tétrade B1 sur les cotylédons des 5 génotypes hôtes.

Les indices de maladie sont obtenus 10 jours après l'inoculation.

□ Mat2-1 □ Mat2-2

ANNEXE 13

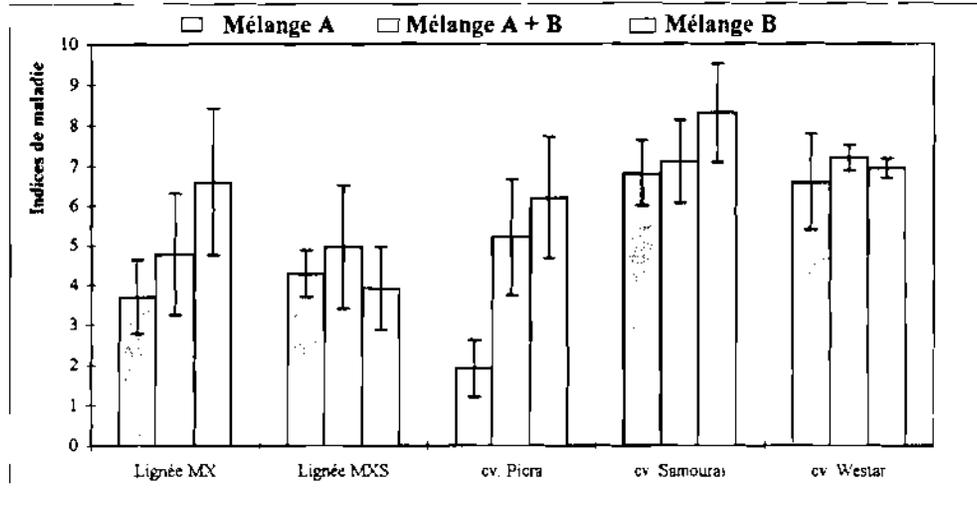


Pouvoir pathogène de la tétrade A1 sur les cotylédons des 5 géotypes .

Les indices de maladie sont obtenus 14 jours après l'inoculation.

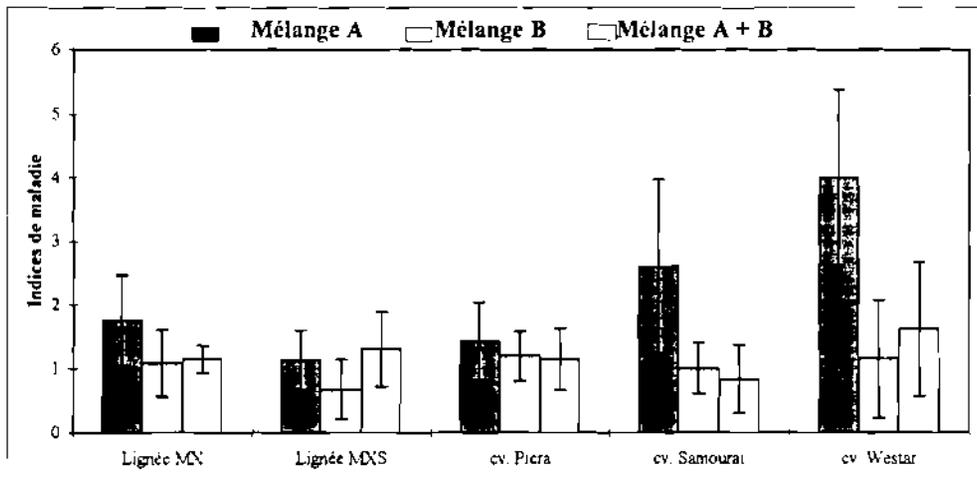
□ Mat1-1 □ Mat1-2

ANNEXE 14



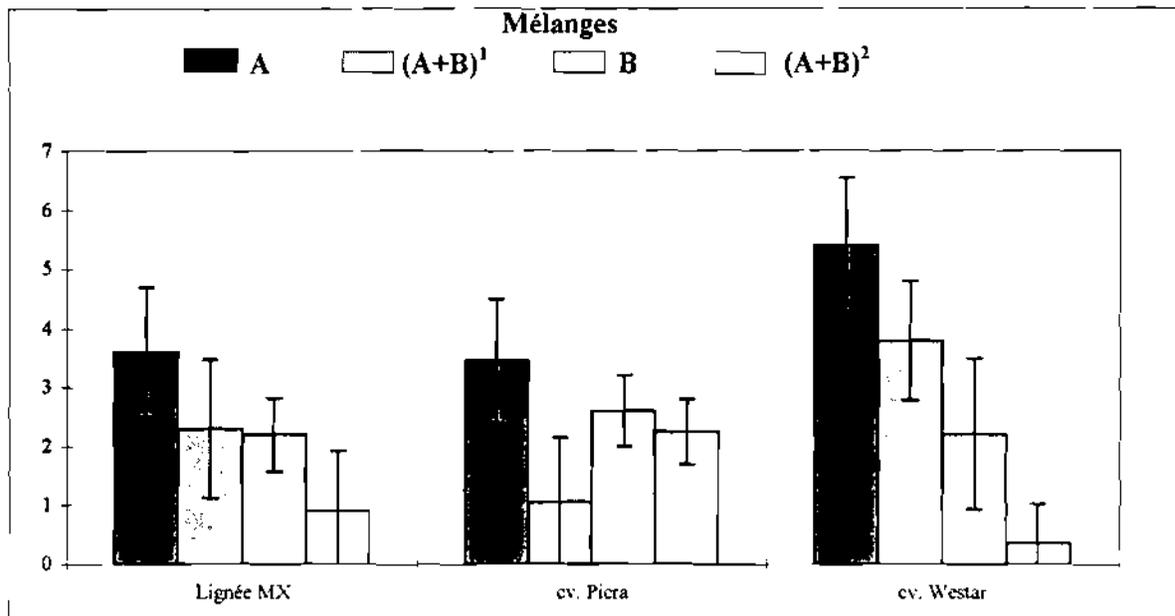
Comparaison de la réaction cotylédonaire, de cinq génotypes vis-à-vis des mélanges des souches du groupe A, du groupe B et des groupes (A + B).

ANNEXE 15



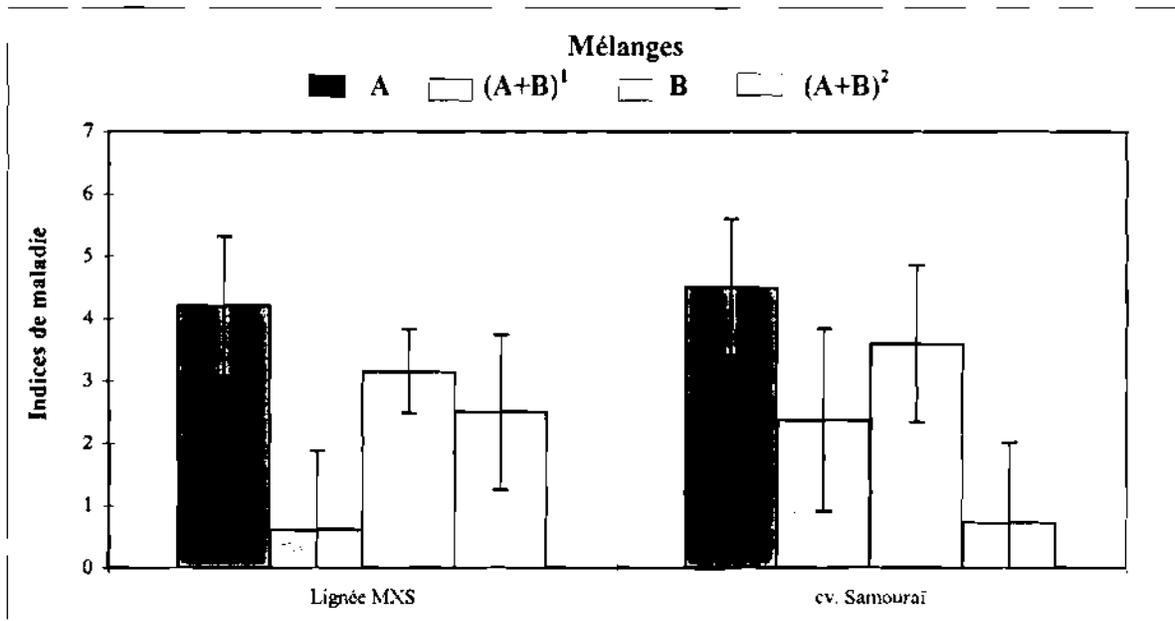
Comparaison de la réaction foliaire de cinq génotypes vis-à-vis des mélanges de souches du groupe A, du groupe B et des groupes (A + B).

ANNEXE 16



Comparaison de la réaction des tiges de trois génotypes de type printemps vis-à-vis des mélanges de souches du groupe A, du groupe B et des groupes (A + B).

ANNEXE 17



Comparaison de la réaction des tiges de deux génotypes de type hiver vis-à-vis des mélanges des souches du groupe A, du groupe B et des groupes (A + B).

¹ Symptômes évalués selon l'échelle appliquée aux souches du groupe A

² Symptômes évalués selon l'échelle appliquée aux souches du groupe B

OCCURRENCE OF *LEPTOSPHERIA MACULANS* ON MUSTARDS IN BRITTANY,
FRANCE

I. SOMDA and H. BRUN

INRA, Station de Pathologie Végétale, Domaine de la Motte, B.P. 29, F 35650, Le Rheu, France.

Plant Disease, 79 : 7, 754

Mustards, such as *Brassica juncea* L. and *B. nigra* L., usually develop a hypersensitive reaction at the cotyledon stage to infection by *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et De Not. (anamorph *Phoma lingam* (Tode ex Fr.) Desm.), the cause of blackleg of crucifers. *B. juncea* cv Picra and *B. nigra* cv Junius, sown with other crucifers in experimental fields in Brittany, were surveyed for blackleg canker occurrence from October 1992 to June 1993. Rare, tiny leaf lesions were observed on cv Picra in March 1993, while cv Junius remained symptomless. Although no external, typical stem or canker symptoms were found, blackening of stem tissues and fungal pseudothecia were observed on both mustard species. Isolations from blackened stems and pseudothecia yielded ca. 200 isolates, that sporulated on V8 juice-agar and were identified as *P. lingam* based on conidium morphology and size. In the autumn of 1993, a few pseudothecia, identical to those developed on susceptible oilseed rape (*B. napus*) were observed on both mustard species, and produced asci and ascospores morphologically identical to typical *L. maculans*. Single ascospore lines and pycnidiospore mass isolates established from cv Picra produced a yellow to brown-red pigment on malt-agar, whereas ascospore isolates recovered on cv Junius failed to produce such a pigment. The pathogenicity of isolates obtained from cv Picra was evaluated with a cotyledon test on sets of *B. juncea* and *B. napus* cvs. The majority of isolates were highly virulent on both species. Analysis of variability for glucose phosphate isomerase activity yielded two different, one-banded patterns corresponding to the two groups of isolates, each obtained from cv Picra and cv Junius, respectively. To our knowledge, this is the first report of *L. maculans* occurrence on mustards.

**STEM CANKER OF CRUCIFERS CAUSED BY LEPTOSPHAERIA MACULANS
POLYMORPHISM OF THE PATHOGEN AND ITS CONSEQUENCES FOR EFFICIENCY AND POTENTIAL DURABILITY OF
RESISTANCE OF RECOMBINANT LINES BETWEEN OILSEED RAPE AND BROWN MUSTARD**

Current schemes for resistance breeding to *L. maculans* in oilseed rape (*B. napus*) rely on different strategies, including the use of total resistance present in mustards species. Resistant oilseed rape lines, in which a gene from *B. juncea* has been introgressed, are now available and may be proposed for registration in the near future. However, an optimal management of this new source of resistance, both for breeding and agricultural purposes, requires that its efficiency and potential durability be assessed. Based on the setup and implementation of a field trial increasing the possibility for selection of resistance-breaking pathotypes, our work aimed at providing a better knowledge of the potential durability of the resistance of *B. napus*-*B. juncea* recombinant lines.

The first part of this work deals with the effect of mustard-derived resistance on *L. maculans* population structure, analysed by means of cultural, isozyme and pathogenicity tests. Both groups of isolates (A and B) described in *L. maculans* were isolated from the *B. napus*-*B. juncea* recombinant lines (MX), with A-Group isolates predominating, whereas only B-Group isolates were isolated from *B. juncea* in autumn 1993. The two groups were clearly differentiated by the presence/absence of pigment diffusion in agar medium and by banding patterns for the phosphoglucose isomerase and esterase systems. Furthermore, isoesterase patterns allowed to differentiate A- and B-Groups of *L. maculans* from other *Phoma* species. The majority of A-Group isolates obtained from oilseed rape caused a hypersensitive reaction on the MX recombinant line. In our field trial, the frequency and aggressiveness of isolates virulent on this line increased. These isolates were also found on several weed crucifers such as wild mustard (*Sinapis arvensis*).

The second part deals with the characteristics of the sexual form of B-Group isolates. We devised experimental procedures that allows the formation of pseudothecia *in vitro* for both A- and B-Group isolates. These protocols, new for the B-Group, showed that sexual reproduction is heterothallic and under simple genetic control (one gene with two alleles) in both A- and B-Groups. Isozyme analysis of tetrads, revealed two esterase banding patterns (ETB1 and ETB2) within B-Group tetrads, the A-Group tetrad being monomorphic for this trait. B-Group banding patterns are monogenically inherited, and the EST alleles segregated independantly of the mating types alleles. Crosses between A- and B-Group isolates characterized for mating type did not produce pseudothecia. These results are in agreement with the hypothesis that A- and B-Groups could constitute at least two separate species. Cultural, biological and biochemical polymorphisms observed within A- and B-Group tetrads might explain the extensive variability found in the populations analysed in the first part.

The third part is dedicated to the study of the resistance of recombinant lines. Under controlled conditions, those lines show a high level of resistance on stems and leaves against A- and B-Group isolates previously characterized. In the field, the resistance of recombinant lines proved efficient in 1993-1994, against natural populations of *L. maculans* selected mainly by oilseed rape. Confronted with populations of the pathogen mainly selected by the resistance derived from brown mustard, the resistance of recombinant lines was overcome in 1994-1995.

These results are discussed, particularly in terms of prospects for genetic analysis of the pathogen and for management of this potentially non durable source of resistance.

Key words : *Phoma lingam*, electrophoresis, isozymes, cultural characteristics, pathogenicity, sexual reproduction, A-Group, B-Group.

**LA NECROSE DU COLLET DES CRUCIFERES DUE A *LEPTOSPHAERIA MACULANS*
POLYMORPHISME DE L'AGENT PATHOGENE ET CONSEQUENCES SUR L'EFFICACITE ET LA DURABILITE
POTENTIELLE DE LA RESISTANCE DES LIGNEES DE RECOMBINAISON COLZA-MOUTARDE BRUNE**

Actuellement, les schémas de sélection du Colza pour la résistance à *Leptosphaeria maculans* mettent en oeuvre différentes stratégies comportant notamment l'exploitation de la résistance totale des Moutardes. Des lignées de Colza résistantes, ayant introgressé un gène de la Moutarde brune, sont disponibles et pourraient être proposées à l'inscription. Toutefois, l'optimisation de la gestion, en sélection et en pratique, de cette nouvelle source de résistance repose sur la caractérisation de son efficacité et de sa durabilité. Fondés sur l'élaboration d'un dispositif expérimental au champ, favorable à la sélection éventuelle de pathotypes capables de surmonter cette résistance, nos travaux visent à améliorer nos connaissances sur la durabilité potentielle de la résistance de lignées de recombinaison Colza-Moutarde brune.

La première partie de notre travail porte principalement sur l'étude de l'impact de la résistance d'origine Moutarde brune sur la structure des populations de *L. maculans*, analysée à l'aide de critères culturels, isoenzymatiques et de pouvoir pathogène au stade cotylédonaire. Les deux groupes de souches A et B décrits chez *L. maculans* sont présents sur la lignée de recombinaison Colza-Moutarde brune avec une prédominance des souches du groupe A alors que seules des souches du groupe B sont isolées de la Moutarde brune à l'automne 1993. Les deux populations sont clairement différenciées par la diffusion ou non de pigment dans le milieu de culture Malt gélose et par le polymorphisme des profils des Phosphoglucose isomérases et des estérases. De plus, les profils révélés à partir des estérases permettent de différencier les groupes A et B de *L. maculans* des autres espèces de *Phoma*. La majorité des souches du groupe A isolées du Colza induisent une réaction de type hypersensible chez la lignée de colza ayant introgressé le gène de résistance. Cependant, dans notre dispositif expérimental au champ, les souches virulentes sur cette lignée augmentent en fréquence et en agressivité dans les populations isolées à partir de cette lignée. Elles sont également présentes sur certaines crucifères adventices telles que la Sanve.

La deuxième partie concerne l'étude de la forme sexuée des souches du groupe B. Nous avons défini des conditions expérimentales permettant la production des périthèces *in vitro*, aussi bien chez les souches du groupe A que du groupe B. Ces résultats, originaux pour les souches du groupe B, nous permettent de préciser que chez ce groupe la reproduction sexuée est hétérothallique, sous contrôle génétique simple (un gène à deux allèles), tout comme chez le groupe A. La caractérisation isoestérasiqque de tétrades naturelles des deux groupes montre deux profils d'estérase (EST) distincts ETB1 et ETB2 à l'intérieur du groupe B, le groupe A étant monomorphe. Les profils du groupe B sont sous contrôle monogénique. Le gène EST ségrège indépendamment de celui des groupes de compatibilité. Les croisements réalisés, à l'aide de souches caractérisées pour leur signe de compatibilité, entre les groupes A et B, n'ont pas produit de périthèces. Ces résultats confortent l'hypothèse que ces deux groupes constitueraient au moins deux espèces différentes. Le polymorphisme culturel, biologique et biochimique observé à l'intérieur des tétrades des groupes A et B pourraient expliquer la grande variabilité constatée dans les populations analysées dans la première partie.

La troisième partie est consacrée à l'étude de la résistance des lignées de recombinaison. En conditions contrôlées, ces lignées présentent un niveau de résistance élevé sur les feuilles et sur les tiges vis-à-vis de souches caractérisées des groupes A et B. Au champ, la résistance des lignées de recombinaison s'est avérée efficace en 1993-1994, dans des populations naturelles sélectionnées principalement par le Colza. Confrontées à des populations majoritairement sélectionnées par la résistance d'origine Moutarde brune, la résistance des lignées de recombinaison est contournée en 1994-1995.

Ces résultats sont discutés, en particulier, en termes de perspectives d'analyse génétique du pathogène et de gestion de cette source de résistance potentiellement non durable.

Mots clés : *Phoma lingam*, électrophorèse, isoenzymes, critères culturels, pouvoir pathogène, reproduction sexuée, groupe A, groupe B