

DEFENSE DES CULTURES La nécrose du collet du colza : analyse de la distribution du champignon dans la plante à l'aide d'outils moléculaires

Crop Protection Stem canker in oilseed rape. Analysis of the distribution of the fungus in the plant using molecular tools

Oléagineux, Corps Gras, Lipides. Volume 9, Numéro 2, 79-85, Mars - Juin 2002, La filière

Auteur(s) : Jacques SCHMIT, Jonathan WEST, Jean-Paul NARCY, Jacqueline ROUX, Marie-Hélène BALESSENT, Thierry ROUXEL, Lilian GOUT, Inra, PMDV, CR de Versailles, route de Saint-Cyr, 78026 Versailles Cedex, France.

Author(s) : Jacques SCHMIT, Jonathan WEST, Jean-Paul NARCY, Jacqueline ROUX, Marie-Hélène BALESSENT, Thierry ROUXEL, Lilian GOU

Résumé : Les composantes (Tox+ et Tox0) du complexe impliqué dans la nécrose du collet du colza ont été suivies au cours du temps et dans la plante, à l'aide d'outils moléculaires (ITS, ISSR), afin de clarifier leurs rôles respectifs dans les dégâts de nécrose, de préciser les relations entre les symptômes foliaires précoces et les nécroses du collet tardives et d'évaluer l'étendue de la colonisation de la plante, en conditions naturelles, pendant deux cycles culturaux successifs. Les deux composantes, présentes en permanence, varient en proportion selon la période de culture et l'organe considérés. La composante Tox+, qui prédomine aux deux extrêmes du cycle cultural, sur feuille en automne et au collet en fin de végétation, est responsable des dégâts de nécrose. L'analyse topographique de la région du collet indique que tous les tissus, fortement colonisés par de nombreuses souches Tox+ distinctes, constituent un site privilégié de confrontation entre souches différentes, favorable à la reproduction sexuée du champignon.

Summary : Tox+ and Tox0 isolates of *Leptosphaeria maculans* complex causing stem canker of winter oilseed rape were surveyed with the help of molecular tools (ITS, ISSR), in selected plants over two growing seasons. The aim was: (i) to clarify respective contribution of Tox+ and Tox0 to disease severity; (ii) to link primary foliar symptoms to late crown canker; (iii) to compare Tox+ and Tox0 colonisation in natural environment. Both types of isolates were permanently present with variable ratios according to plant organs and period in the growing season. Tox+ isolates, prevalent at both ends of the growing season, leaves in autumn, crown in June, are primarily responsible for stem canker. All tissues of crown area were heavily colonised by numerous Tox+ individuals. The crown area represents a favourable location for interactions between isolates and for sexual reproductive phases of the fungus lifecycle.

Mots-clés : nécrose du collet, verse parasitaire, Phoma, *Leptosphaeria*, colza, colonisation, ITS, ISSR.

Keywords : stem canker, blackleg, Phoma, *Leptosphaeria*, oilseed rape, colonization, ITS, ISSR.

ARTICLE

La nécrose du collet due à *Leptosphaeria maculans* (Phoma) est une maladie majeure du colza en France et dans d'autres pays européens. Les pays d'Europe de l'Ouest produisent essentiellement du colza d'hiver, semé, selon les régions, de fin août à fin septembre. Le cycle épidémique classique de la maladie sur colza d'hiver [1] commence à l'automne, avec la dissémination aérienne d'ascospores émises par des périthèces formés sur les débris des cultures précédentes (*figure 1*). Ces ascospores provoquent les lésions primaires (macules) sur les feuilles, points d'infection initiaux de la maladie. Les premières feuilles porteuses de macules deviennent sénescentes et tombent, tandis que de nouvelles feuilles restent susceptibles d'être atteintes tant que des vols abondants d'ascospores se produisent. Plusieurs observations et travaux anciens indiquent que le pathogène chemine à travers les tissus vers la tige, à partir de ces macules [2, 3]. Alors que les macules constituent un symptôme aisément repérable, la progression interne du champignon ne s'accompagne pas de manifestations visibles. Cette présence discrète se prolonge communément durant l'élongation, la floraison et les stades suivants. En fin de cycle cultural, on observe dans la zone du collet des nécroses évolutives, souvent ceinturantes, qui altèrent la solidité de la tige et sont à l'origine d'une verse parasitaire grave. Ce déroulement de la maladie peut présenter des variations selon les conditions climatiques et/ou le cultivar concernés.

Leptosphaeria maculans est en fait un complexe composé d'au moins deux espèces, décrites en des termes variables selon les auteurs : groupe A et groupe B [4], Tox⁺ et Tox⁰ [5, 6]. *Leptosphaeria maculans* et *L. biglobosa* [7]. Les souches Tox⁺ sont considérées comme responsables des dégâts sur colza dans les régions productrices d'Europe de l'Ouest, alors que les Tox⁰ sont supposées y jouer un rôle mineur, mais occupent en revanche une place prépondérante dans les dégâts observés en Europe de l'Est.

Suivre le développement du champignon dans la plante au cours du temps constitue une difficulté importante lorsqu'il s'agit d'établir un lien entre les symptômes foliaires précoces et la nécrose terminale sur tige. La présence de deux espèces dont les contributions respectives dans l'infection sont encore imprécises, complique encore la détermination de l'origine des dégâts de nécrose.

Les propriétés de plusieurs outils issus des progrès de la biologie moléculaire ont été mis à profit pour tenter de répondre aux questions ci-dessus. L'amplification par PCR (*polymerase chain reaction*) des séquences des ITS (*internal transcribed spacers*) permet de différencier les différentes composantes du complexe d'espèce. Les marqueurs ISSR (*inter simple sequence repeats*) amplifient des zones du génome situées entre des microsatellites et permettent de descendre à un niveau de discrimination infraspécifique.

L'objectif principal des études menées à l'aide de ces outils vise à lever les zones d'ombre qui subsistent sur le rôle respectif des composantes du complexe, sur les relations entre les symptômes précoces et les nécroses tardives et, plus généralement, sur la colonisation de la plante (*figure 1*).

Présentation des outils utilisés pour caractériser le Phoma

Différentes méthodes faisant appel à des propriétés physiologiques (production de toxines ou de pigments en culture), biologiques (pouvoir pathogène différentiel, par exemple) ou moléculaires, ont été mises au point dans la dernière décennie pour caractériser le complexe appelé Phoma, aux

niveaux spécifique et infraspécifique. Les méthodes récentes, fondées sur la biologie moléculaire, ont amélioré l'identification des composantes rencontrées dans le complexe Phoma et offrent la possibilité de traiter des échantillons nombreux. Nous décrivons brièvement ici les outils moléculaires que nous avons utilisés pour distinguer les composantes Tox⁺ et Tox⁰ chez le Phoma, et pour suivre des souches de la composante Tox⁺ au cours du cycle cultural.

Le polymorphisme de taille des ITS ¹

Cette région de petite taille (ITS1-5,8S-ITS2) de l'ADN ribosomique (ADNr), située entre des séquences codant pour des constituants des ribosomes, est connue pour sa variabilité, contrairement aux zones très conservées qui les encadrent. Cette variabilité est couramment utilisée pour distinguer les espèces au sein d'un même genre. En outre, de nombreuses copies de l'ADNr sont présentes dans le génome, d'où la possibilité d'amplifier les ITS par PCR à partir d'une quantité limitée d'ADN. Chez le Phoma, le polymorphisme de taille des ITS a permis de distinguer plusieurs groupes dans le complexe d'espèces [8] et notamment d'identifier les composantes Tox⁺ et Tox⁰, en une seule amplification réalisée sur ADN purifié ou sur suspension de conidies. Cette dernière possibilité permet de s'affranchir de l'étape d'extraction de l'ADN, ce qui autorise l'analyse de populations importantes (*figure 2*).

Une comparaison effectuée sur plusieurs centaines de souches [9] montre que l'amplification des ITS distingue les deux composantes Tox⁺ et Tox⁰ de façon plus sûre que l'observation du champignon en culture (5,5 % de cas mal identifiés ou douteux) et que l'aspect des macules sur feuilles.

Les marqueurs ISSR ²

Les marqueurs ISSR permettent l'amplification par PCR de régions du génome du champignon situées entre deux microsatellites voisins, en position inversée. Dès lors, une seule amorce, constituée du motif du microsatellite complété par des oligonucléotides dégénérés, peut s'hybrider avec les microsatellites cibles et amplifier la région comprise entre ces derniers (*figure 3*), sous réserve que l'éloignement entre les microsatellites voisins ne soit pas trop important [10].

Ainsi, par PCR, les marqueurs ISSR génèrent des profils d'amplification qui, une fois séparés sur gel et révélés, se caractérisent par des bandes multiples, de tailles généralement comprises entre 250 et 2 000 paires de bases. Le nombre et la disposition des bandes visibles permettent de différencier pour chaque ISSR de nombreux profils (*figure 4*), lesquels conduisent à regrouper les souches présentant un même profil, dans les populations étudiées à chaque prélèvement (*figure 5*).

Un (rarement), ou plusieurs profils (le plus souvent), considérés ensemble, constituent ainsi la « signature » unique d'une souche. On dispose alors de marqueurs « souche-spécifiques » qui, contrairement aux souches pourvues de gènes rapporteurs, ne nécessitent pas de construction préalable par transformation.

Les marqueurs ISSR permettent d'analyser des populations naturelles. L'amplification peut être réalisée sur une suspension de conidies (*c* 10⁸ spores/ml) avec un résultat convenable par rapport à l'amplification d'un ADN purifié. Cependant, ces marqueurs ne peuvent constituer actuellement un outil de suivi en routine, étant donné le volume du travail d'analyse requis lorsque la taille de la population augmente.

Les souches isolées dans le dispositif expérimental de Versailles ont été identifiées individuellement à l'aide de quatre marqueurs ISSR CA₈, ATG₅, TG₈ (T₃G₃)₃, retenus parmi huit marqueurs évalués en début de programme, en raison de leurs meilleures capacités de discrimination.

Un même individu, isolé à plusieurs stades de son interaction avec la plante, est représenté par autant de souches qu'il y a d'isolements positifs. Toutes ces souches vont présenter une même signature, laquelle va permettre de suivre cet individu au cours du temps. Pareillement, un même individu, isolé de plusieurs endroits contigus d'un même organe (le collet, par exemple), va être représenté par des souches présentant la même signature, ce qui permettra d'apprécier grossièrement l'étendue spatiale de la colonisation par cet individu.

En outre, chacun des quatre marqueurs ISSR utilisés fournit des profils clairement différents selon que les souches de Phoma appartiennent à la composante Tox⁺ ou Tox⁰. On peut donc obtenir deux informations avec un seul outil ou encore vérifier la pertinence d'une discrimination entre Tox⁺ et Tox⁰ établie indépendamment par le polymorphisme des ITS ou une autre méthode. Dans ces derniers cas, l'intéressante capacité de discrimination des marqueurs ISSR peut suggérer la présence accidentelle d'un mélange des deux composantes chez une souche réputée pure [9].

La mise en œuvre de ces outils élargit nos possibilités d'étude des aspects spatiaux et temporels de la colonisation par le Phoma en conditions naturelles, domaines clés pour comprendre l'interaction entre le champignon et son hôte.

Colonisation du colza par le Phoma

Cinétique de la colonisation par les deux composantes du complexe d'espèces au cours du cycle cultural

La reconnaissance visuelle des symptômes dus aux souches Tox⁺ et Tox⁰ est entachée d'imprécision et le développement ultérieur de l'une ou l'autre composante dans les tissus du colza ne s'accompagne d'aucune manifestation particulière permettant l'identification. Cela complique l'étude des relations entre les lésions primaires et celles qui sont observées au collet et sur les tiges en fin de culture.

Afin de déterminer la proportion relative de chaque composante et connaître son évolution en conditions naturelles, au cours de l'interaction avec la plante hôte, nous avons recensé les Tox⁺ et Tox⁰ à plusieurs étapes du cycle cultural, sur des plantes porteuses de symptômes primaires, identifiées en début de culture.

Les essais s'inscrivent dans un dispositif expérimental pluriannuel mis en place sur le site de Versailles. Les observations ont été faites pendant deux années consécutives, de novembre à juin, dans deux parcelles mitoyennes (une par année) où les intrants sont minimaux, semées avec un seul cultivar de colza d'hiver (« Capitot ») et présentant les mêmes caractéristiques de dimensions, d'exposition et de sol.

À chaque prélèvement, les mêmes plantes, réparties dans la parcelle, ont été échantillonnées. Sur ces plantes, les prélèvements de novembre à mars ont été réalisés sur chaque macule visible, les

différentes macules d'une même feuille étant isolées indépendamment. En l'absence de macules sur les plantes sélectionnées, des prélèvements de surfaces équivalentes ont été réalisés sur les feuilles sans symptômes.

En fin de végétation, après disparition des feuilles, une analyse topographique approfondie des Tox^+ et Tox^0 de ces mêmes plantes (racine, collet haut et bas, plusieurs niveaux dans la tige) a été réalisée. En outre, plusieurs isollements ont été effectués dans les principaux tissus (cortex, bois et moelle) de chaque prélèvement sur collet. Au terme de deux années de culture, nous avons obtenu les principaux résultats suivants : la *figure 5* résume les données de deux campagnes successives (récoltées en 1999 et 2000) toutes deux marquées par une gravité modérée de la maladie sur le site expérimental.

Les deux composantes Tox^+ et Tox^0 apparaissent présentes sur les plantes à tous les stades de développement du colza. Cette présence continue s'exerce en proportions relatives variables au cours du temps.

Les proportions de chaque composante ont suivi les mêmes tendances au cours des deux campagnes, c'est-à-dire :

- faible présence de souches Tox^0 sur feuilles en automne (environ 5 % des souches isolées) et forte représentation de la composante Tox^+ ;
- rééquilibrage de chaque composante à des valeurs voisines de 50 %, sur les feuilles, en fin d'hiver. Remarquons que les fluctuations des proportions Tox^+ et Tox^0 observées jusqu'en fin d'hiver concernent les feuilles, mais on ignore si au cours de la même période de temps, collet, racines et tige hébergent aussi les deux composantes et dans quelles proportions. Ce point n'a pas été déterminé puisque le protocole prévoyait des prélèvements non destructifs sauf en fin de culture ;
- prédominance nette des souches Tox^+ en fin de végétation. La proportion globale de cette composante dans l'ensemble de la plante avoisine 90 %. À ce stade, les feuilles ont disparu et l'analyse porte sur l'axe principal de la plante, de la partie haute de la racine jusqu'à une hauteur moyenne de 35 cm au-dessus du collet.

La prédominance numérique globale des souches Tox^+ sur les plantes ne semble pas évoluer significativement entre mai et juin. Mais, à ce stade, chaque composante est-elle répartie de façon homogène sur les plantes ou concentrée dans certains organes ?

Distribution du Phoma dans la plante en fin de culture

Une analyse topographique des plantes en fin de culture (*figure 6*) a permis de connaître la distribution des deux composantes dans la tige, la racine et les principaux tissus de ces organes.

La zone du collet héberge une très forte majorité de souches Tox^+ . La proportion des souches de cette composante atteint 92 % et reste comparable au cours des deux campagnes. Une faible proportion (8 %) de souches Tox^0 parvient à se maintenir à ce niveau.

Une proportion significative de Tox^0 est isolée dans la tige, en particulier dans la partie basse (1 à 13

cm au-dessus du collet) où la composante Tox⁰ représente 48 % des isolats. Contrairement au collet, on observe dans l'ensemble de la tige des fluctuations plus importantes des proportions de Tox⁺ et de Tox⁰. Ces fluctuations sont observées au cours des deux campagnes.

La colonisation massive du collet concerne-t-elle tous les types de tissus ou certains sont-ils plus réfractaires à l'envahissement par le champignon ?

Une dissection des trois principaux tissus rencontrés dans les échantillons de collet (cortex, bois et moelle) montre que la composante Tox⁺, largement majoritaire, attaque tous les tissus. Sur la moyenne de deux années, la moelle apparaît un peu plus colonisée, mais sans différence vraiment marquée avec les autres tissus. La proportion de Tox⁰ du collet décroît de la zone corticale externe vers la moelle interne. Cette observation a été vérifiée à chaque campagne. Plusieurs hypothèses pourraient rendre compte de cette observation (arrivée plus tardive dans la zone basale, moindre aptitude à la compétition que les Tox⁺) mais le protocole expérimental ne permet pas de trancher. Des expérimentations comparant la colonisation de souches Tox⁺ et Tox⁰ en conditions contrôlées seraient nécessaires pour préciser l'origine de cette observation (*figure 7*).

L'abondance des souches Tox⁺ et leur localisation majoritaire dans la zone du collet invitent à s'interroger sur l'identité des individus fongiques impliqués. Y a-t-il colonisation par une seule souche, individu fongique unique, capable d'envahir l'ensemble des tissus, ou par plusieurs souches distinctes ? Une même souche est-elle capable de coloniser plusieurs tissus ou se limite-t-elle préférentiellement à un tissu ?

Les marqueurs souches-spécifiques tels que ceux utilisés ici contribuent à apporter une réponse à ces questions relatives à la densité et à la diversité des souches rencontrées dans la nécrose du collet.

Densité et diversité des souches de *Phoma* colonisant la zone du collet

En début de végétation, la très grande majorité des souches isolées des macules foliaires présentent des « signatures » différentes, c'est-à-dire qu'elles constituent des individus distincts. L'observation d'une telle diversité illustre bien l'efficacité de la reproduction sexuée chez le *Phoma* [11] et concorde avec le rôle essentiel des ascospores dans la formation des macules primaires.

Plus tard, en fin de culture, nous avons montré à l'aide des marqueurs ISSR que dans la plupart des plantes analysées, plusieurs souches Tox⁺ colonisaient le collet et la partie haute de la racine mais que le nombre d'individus distincts en présence différait sensiblement selon les plantes. La région du collet se présente donc comme un site privilégié de colonisation, d'interactions et de confrontations entre individus fongiques différents.

Dans cette région, nous avons observé qu'un même individu peut coloniser des tissus adjacents, mais anatomiquement différents (cortex, bois et moelle). Si l'on rapproche les dénombrements des souches Tox⁺ dans les différents tissus du collet (*figure 7*) avec l'identification d'un même individu dans des isollements proches pratiqués dans des tissus différents, on en conclut que les différences anatomiques entre tissus ne semblent pas constituer un obstacle à la colonisation par *Phoma*, du moins pour tout individu appartenant à la composante Tox⁺.

La détermination du signe de compatibilité sexuelle des souches en confrontation au collet des plantes permet de relier la colonisation systémique à la reproduction sexuée et à la formation des

périthèces sur les organes basaux, futurs points de départ du cycle infectieux sur les semis de la campagne suivante. En effet, la juxtaposition de zones du collet et de la proche racine colonisées par des souches différentes de *Phoma* permet ultérieurement la reproduction sexuée si les souches sont de signes compatibles.

Une analyse effectuée sur l'ensemble des souches isolées d'un nombre limité de plantes indique que les deux signes sexuels peuvent être en déséquilibre si l'on considère les souches présentes dans un seul organe (collet, racine, tige basse), mais sont bien présents en proportions égales à l'échelle de la plante entière.

Origine des souches identifiées au collet des plantes

Toutes les souches isolées d'une même plante en fin de culture ont été comparées à l'aide des marqueurs ISSR. Les différentes « signatures », c'est-à-dire une même combinaison de profils pour les quatre marqueurs ISSR, permettent tout d'abord d'identifier et de dénombrer les différents individus fongiques présents (*figure 8*).

Assez couramment, plusieurs souches issues d'isolements contigus dans un même organe d'une plante présentaient des « signatures » identiques, ce qui indique une colonisation d'un volume significatif de tissus par un même individu. Dans un cas, un individu initialement isolé de macule foliaire en novembre, a été retrouvé dans trois prélèvements rapprochés de moelle et de bois, au collet de la même plante, en juin. Cela suggère fortement que le *Phoma* développe en conditions naturelles une invasion systémique de longue durée à partir des contaminations foliaires précoces.

La *figure 9* illustre et résume, dans le cas d'une plante, la diversité et la densité des confrontations dans la région du collet et suggère la précocité et la durée de la colonisation par le champignon.

CONCLUSION

Ces études cinétiques et topographiques ont permis de suivre les composantes Tox^+ et Tox^0 , sans ambiguïté d'identification, et de préciser leur rôle respectif dans les dégâts de nécrose du collet sur colza d'hiver en Europe de l'Ouest.

Les souches Tox^+ qui prédominent fortement en fin de végétation et colonisent massivement la zone du collet sont responsables des dégâts de nécrose. De plus, la présence très majoritaire de cette même composante dans les macules foliaires en début de végétation, suggère fortement une relation directe entre les symptômes primaires et la nécrose terminale. La possibilité de repérer les individus au cours du temps et dans la plante à l'aide des outils utilisés, permet, sous réserve de répétitions et de contrôle des observations, de relier les contaminations primaires à la nécrose terminale et d'illustrer la précocité de l'attaque sur la zone critique du collet, en conditions naturelles.

Les souches Tox^0 , numériquement minoritaires, co-colonisent la tige mais ne sont pas apparues capables de jouer un rôle majeur dans la nécrose du collet sur colza d'hiver dans nos conditions. L'absence de rôle de premier plan des souches Tox^0 n'exclut cependant pas une éventuelle implication qui reste à préciser. En effet, un autre intérêt des études entreprises est d'avoir montré la présence permanente des deux composantes Tox^+ et Tox^0 dans les plantes, ce qui confirme l'occupation d'une même niche écologique par le complexe à *Leptosphaeria* du colza. Ces études

mettent ainsi l'accent sur une donnée fondamentale de l'interaction entre la plante et son pathogène, c'est-à-dire une colonisation prolongée mais aussi partagée en proportions variables au cours du temps et selon l'organe colonisé.

Les données, obtenues indépendamment en Angleterre et en France [9], suggèrent que des différences dans la date d'émission des ascospores et/ou des exigences climatiques différentes peuvent expliquer la prédominance numérique des Tox^+ et leur localisation préférentielle dans les organes de la base de la plante.

La colonisation systémique du colza par de nombreux individus de la composante majoritaire Tox^+ aboutit à leur concentration massive dans la zone du collet et la partie haute de la racine, où s'exerce une confrontation favorable à la production de périthèces. Ces périthèces venues à maturité dans cette même zone, laissée comme débris de culture, émettent leurs ascospores qui vont contaminer les jeunes plantes semées pour la campagne suivante. L'interaction entre l'hôte et son parasite est donc continue, ce qui implique une adaptation remarquable du champignon à des conditions d'environnement et de nutrition très différentes au cours de son cycle, y compris dans les tissus du colza. Ainsi, le développement primaire du champignon se réalise à partir des macules foliaires dans des tissus vivants (conditions biotrophes) qui ont d'abord un métabolisme ralenti par les conditions automnales et hivernales puis une croissance très active au printemps. En fin de végétation, au contraire, le champignon se trouve progressivement confronté à des tissus sénescents, puis morts (conditions nécrotrophes), notamment dans la région du collet où la reproduction se produit et se prolonge sur les pailles et débris avec la différenciation des périthèces. Durant toute la phase de colonisation systémique, le Phoma doit donc assurer sa nutrition et déjouer les défenses du colza malgré l'évolution des conditions rencontrées. L'absence de réactions visibles durant cette phase suggère un « probable dialogue moléculaire », encore inconnu, entre le colza et le Phoma, permettant à ce dernier de « passer inaperçu ».

Les résultats que nous avons obtenus soulèvent par conséquent plusieurs questions, notamment sur le cheminement du champignon dans les tissus de la feuille, du pétiole, de la tige, sur les compétitions ou les synergies entre les composantes Tox^+ et Tox^0 du complexe pendant la colonisation, ainsi que sur l'adaptation aux conditions biotrophes et nécrotrophes.

Une prochaine étape sera d'approfondir ces résultats obtenus en conditions naturelles et de tenter de répondre aux questions qu'ils soulèvent grâce à un dispositif d'étude en conditions contrôlées où la panoplie des outils utilisés pourrait être complétée par l'usage de souches portant des gènes rapporteurs.

À plus long terme, la compréhension des interactions entre le Phoma et le colza au cours de la phase de colonisation systémique pourrait suggérer des moyens de lutte originaux fondés sur des résistances non conventionnelles, susceptibles de concourir à des résistances améliorées et plus durables.

Remerciements

Nous remercions vivement le Cetiom pour son soutien financier à ces travaux.

Notes :

¹ Ces zones de l'ADN ribosomique (ADNr), situées entre des séquences codant pour des constituants des ribosomes, sont connues pour leur variabilité, contrairement aux zones très conservées qui les encadrent. Cette variabilité est couramment utilisée pour distinguer les espèces au sein d'un genre. En outre, ces régions codant pour l'ADNr sont présentes à un grand nombre de copies dans le génome, d'où la possibilité de les amplifier par PCR à partir d'une quantité limitée d'ADN.

² Ces marqueurs mettent à profit l'existence de courts éléments répétés, les microsatellites, présents dans de très nombreux génomes. L'amplification par PCR à l'aide des amorces appropriées amplifient les régions d'ADN bordées par deux éléments répétés inversés. Les empreintes complexes obtenues permettent de révéler le polymorphisme au niveau spécifique et infraspécifique dans de nombreux organismes eucaryotes ribosomes, sont connues pour leur variabilité, contrairement aux zones très conservées qui les encadrent. Cette variabilité est couramment utilisée pour distinguer les espèces au sein d'un genre. En outre, ces régions codant pour l'ADNr sont présentes à un grand nombre de copies dans le génome, d'où la possibilité de les amplifier par PCR à partir d'une quantité limitée d'ADN.

REFERENCES

1. CETIOM (1992). *Leptosphaeria maculans (Phoma)*. In : *Les maladies du colza*, Cetiom, ed. Paris : Les Points Techniques du Cetiom, 45.
2. HAMMOND KE, LEWIS BG (1986). The timing and sequence of events leading to stem canker disease in populations of *Brassica napus* var. *oleifera* in the field. *Plant Pathology*, 35 : 551-64.
3. HAMMOND KE, LEWIS BG (1987). Variation in stem infections caused by aggressive and non-aggressive isolates of *Leptosphaeria maculans* on *Brassica napus* var. *oleifera*. *Plant Pathology*, 36 : 53-65.
4. JOHNSON RD, LEWIS BG (1994). Variation in host range, systemic infection and epidemiology of *Leptosphaeria maculans*. *Plant Pathology*, 43 : 269-77.
5. ROUXEL T, GALL C, BALESSENT MH (1994). Du polymorphisme au complexe d'espèces : combien d'agents pathogènes sont impliqués dans la nécrose du collet du colza ? *Agronomie*, 14 : 413-32.
6. ROUXEL T, BALESSENT MH, CETIOM (1996). Phoma du colza. Un nom, plusieurs souches. *Oléoscope*, 35 : 13-4.
7. SHOEMAKER RA, BRUN H, (2001). The teleomorph of the weakly aggressive segregate of *Leptosphaeria maculans*. *Canadian J Botany*, 79 : 412-9.
8. BALESSENT MH, JEDRYCZKA M, JAIN L, MENDES-PEREIRA E, BERTRANDY J, ROUXEL T (1998). Conidia as a substrate for internal transcribed spacer-based PCR identification of members of the *Leptosphaeria maculans* species complex. *Phytopathology*, 88 : 1210-7.
9. WEST JS, BALESSENT MH, ROUXEL T, *et al.* (2002). Colonisation of winter oilseed rape tissues by

A/Tox⁺ and B/Tox⁰ *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) in France and England. *Plant Pathology*, 51 : 311-21.

10. ZIETKIEWICZ E, RAFALSKI A, LABUDA D (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20 : 176-83.

11. GOUT L (1999). *Diversité génétique et structure des populations européennes de Leptosphaeria maculans, agent de la nécrose du collet du colza*. Mémoire de Diplôme d'agronomie approfondie (DAA) Protection des plantes et environnement, ENSA-Rennes, 25 p.

Illustrations

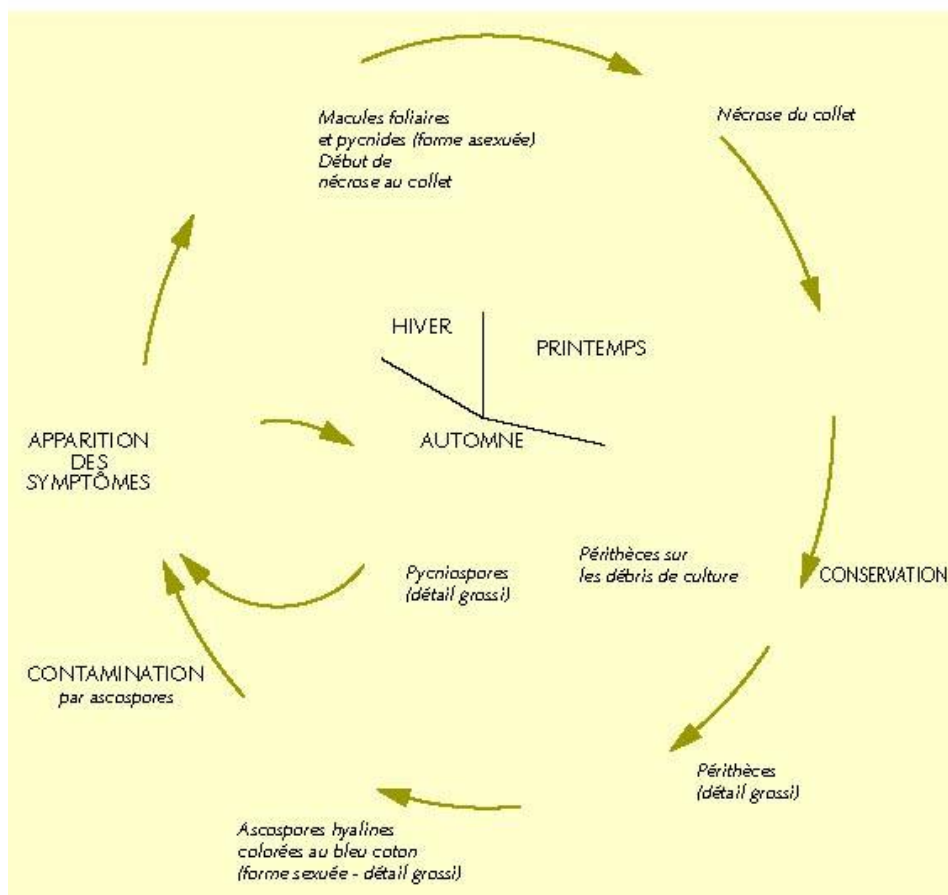


Figure 1. Cycle épidémique de la nécrose du collet due à *Leptosphaeria maculans* (Phoma) sur colza d'hiver (document Cetiom).

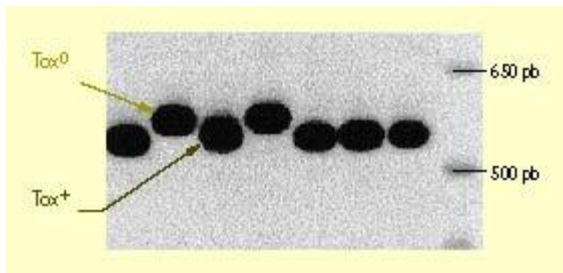


Figure 2. Identification des composantes Tox⁺ et Tox⁰ par polymorphisme de taille des ITS.

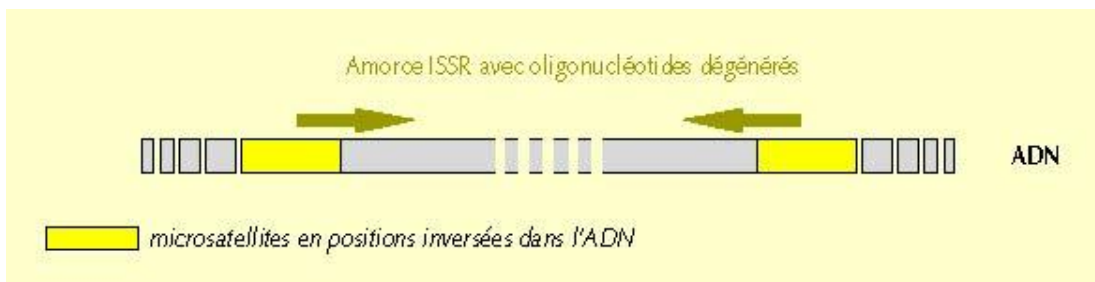


Figure 3. Principe de l'utilisation des marqueurs ISSR.

L'amorce ISSR s'hybride avec deux microsatellites en position répétée inversée, ce qui permet l'amplification par PCR de la région intermédiaire.

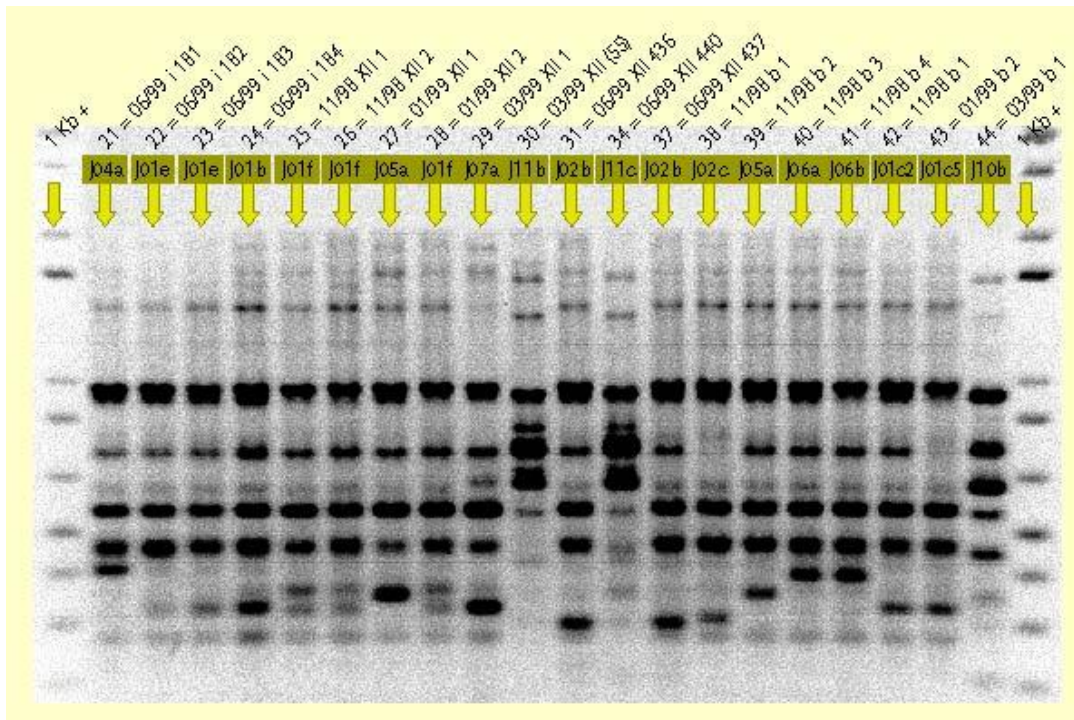


Figure 4. Exemple de profils générés par le marqueur ISSR atg5.

Image inversée d'un gel montrant différents profils générés par le marqueur atg5, avec les références de souches et les étiquettes différenciant chaque profil. Les pistes encadrant le gel indiquent l'échelle de poids moléculaire (Kb⁺). Les bandes des différents profils s'étagent entre les valeurs 200 et 2 000 de l'échelle.

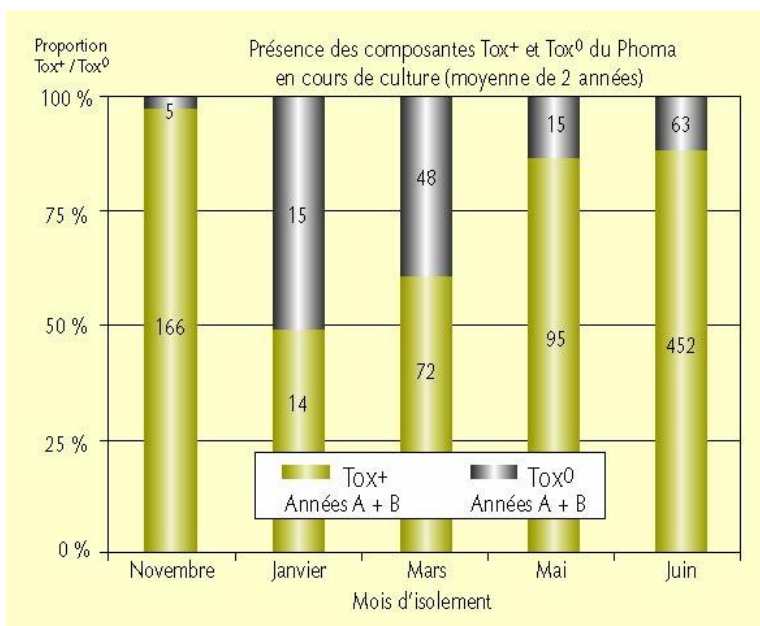


Figure 5. Proportions relatives des composantes Tox⁺ et Tox⁰ durant le cycle cultural.

Prélèvement de janvier : campagne 1999 seulement ; prélèvement de mai : campagne 2000 seulement. Le graphique indique les proportions relatives et les effectifs (chiffres figurant dans les barres d'histogrammes) des souches Tox^+ et Tox^0 du complexe fongique Phoma du colza.

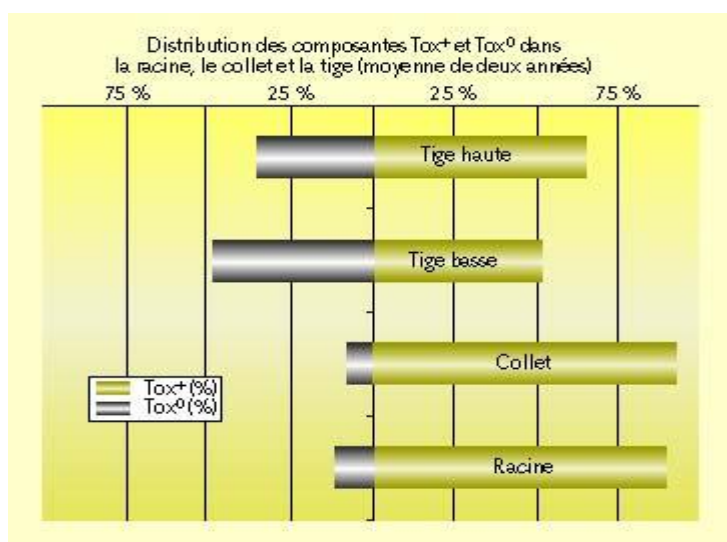


Figure 6. Analyse topographique des plantes en fin de culture.

Proportion relative de chaque composante dans les principaux organes encore présents en fin de cycle cultural.

Organe	Tissu	Total Tox^+	(%) Tox^+	Total Tox^0	(%) Tox^0
Collet	Cortex	125	83,9	24	16,1
	Bois	134	91,2	13	8,8
	Moelle	185	97,4	5	2,6
		444	91,4	42	8,6

Figure 7. Effectif et proportion des composantes Tox^+ et Tox^0 dans les tissus du collet (moyenne de deux années, 1999-2000).

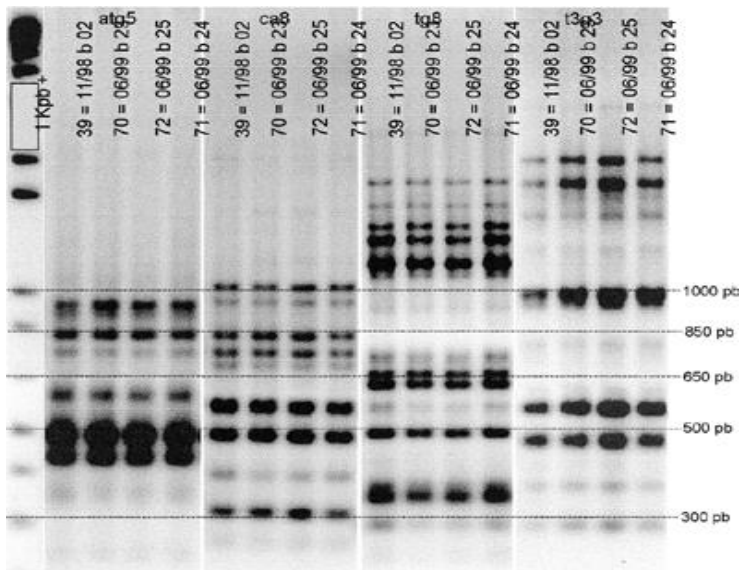


Figure 8. Comparaison des profils obtenus avec quatre marqueurs ISSR sur des souches isolées de la même plante sur macule en novembre 1998 et dans le collet en juin 1999 (image inversée des gels d'électrophorèse).

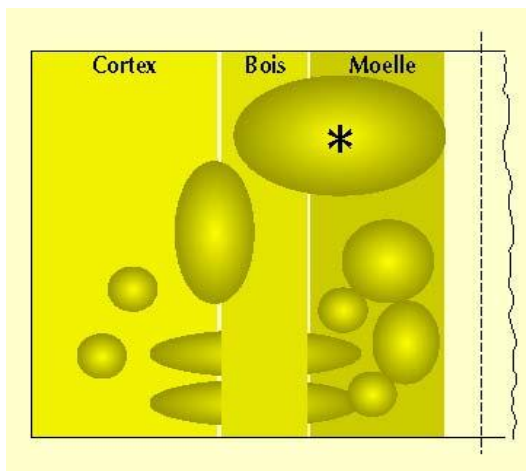


Figure 9. Coupe longitudinale schématisée d'un demi-collet colonisé par des souches Tox^+ de Phoma.

Le dessin schématise sur un demi-collet la situation observée sur une plante fortement colonisée en fin de culture. La plupart des plantes hébergent à ce stade de nombreux individus différents, en confrontation dans les tissus du collet. Un même individu peut coloniser un volume significatif englobant plusieurs tissus anatomiquement différents. Dans le cas de cette plante, un individu (*) a pu être repéré dans une macule foliaire en automne, ce qui met en lumière la précocité, l'étendue territoriale et la longueur de la colonisation.

