

Étude des populations françaises de septorioses et recherche de sources de résistance chez le blé

Patrice HALAMA*¹, Daniel CARON², Volker LEIN³, Philippe REIGNAULT⁴, Jean SANSENE⁵

* Coordinateur : Patrice HALAMA, p.halama@isa-lille.fr, Tél. : 03 28 38 46 20

1 - ISA - 48 boulevard Vauban, 59046 Lille Cedex

2 - ARVALIS - Institut du végétal - Station Inter instituts, 6 chemin de Côte Vieille, 31450 Baziège

3 - CETAC - Saaten-Union Recherche Sarl, 163, avenue des Flandres, 60190 Estrées St Denis

4 - ULCO - 17, avenue Blériot, BP 699, 62228 Calais Cedex

5 - Instiut Polytechnique LaSalle Beauvais - rue Pierre Waguët, 60026 Beauvais Cedex

Deux parasites fongiques *Phaeosphaeria nodorum* (*Stagonospora nodorum*) et *Mycosphaerella graminicola* (*Septoria tritici*) sont à l'origine des septorioses du blé. Dans un contexte d'apparition et d'extension de résistances à certaines matières actives et de nécessité de diminution des intrants, la diversification des gènes de résistance apparaît comme une stratégie d'assurance, économe en intrants, pour limiter la progression des épidémies et augmenter la durabilité d'efficacité de résistances nouvellement introduites. La prise en compte de la variabilité parasitaire est essentielle dans les stratégies de sélection variétale ; celle-ci nécessite une collaboration étroite entre sélectionneurs et phytopathologistes.

L'objectif majeur de ce projet était de mettre en évidence chez les variétés actuelles et chez des lignées de blé, des résistances partielles, totales ou des tolérances aux septorioses dans la perspective de pouvoir intégrer ces génotypes dans les schémas de sélection. Si *S. nodorum* a longtemps été considérée comme préoccupante, il semble que depuis quelques années, *S. tritici* soit devenue en France l'espèce la plus fréquente. Les travaux réalisés à l'étranger mettent en évidence un rôle important de la phase sexuée dans la structure génétique des populations de ce parasite. En France, aucune étude récente de la population n'a été conduite au plan national. La première étape du projet a consisté à faire un inventaire des populations de septorioses rencontrées en France. A partir des souches collectées, une caractérisation a été entreprise ; celle-ci portant sur les types génétiques (microsatellites et PCR-SSCP), sur l'identification des *mating types* (espèces hétérothalliques) et sur l'évaluation du pouvoir pathogène. La recherche de résistance ou de tolérance s'est faite dès la première année dans le cadre d'essais multi-locaux sur une centaine de lignées au départ puis poursuivie avec les génotypes ayant exprimé des résistances ou des tolérances de bons niveaux. Pour les génotypes exprimant les résistances les plus élevées ou des tolérances, une étude des mécanismes impliqués a été réalisée par des approches cytologiques et physiologiques.

1. Échantillonnage et isolement des souches

► Matériel et méthodes

Durant avril-mai 2005 et avril 2006, un échantillonnage de feuilles de blé présentant des symptômes de type septoriose a été réalisé dans la plupart des grandes régions productrices de blé en France. Après réception au

laboratoire, une procédure d'identification et d'isolement des souches a été adoptée.

Des souches monosporiques ont été isolées puis conservées à -80 °C.

► Résultat

Seul *M. graminicola* (= *S. tritici*) a été identifié dans les échantillons prélevés. Au cours de la campagne 2005, 365 souches de *M. graminicola* ont été obtenues à partir des feuilles de blé échantillonnées. Ces feuilles avaient été récoltées dans 17 sites localisés en majorité dans la moitié nord de la France. Pour compléter cet échantillonnage et afin d'augmenter la représentativité au niveau de l'ensemble du territoire français, un autre prélèvement de 136 souches a été réalisé en 2006 sur 7 sites situés dans l'ouest et le sud de la France.

En 2005, la plupart des souches de *M. graminicola* collectées (303) ont été isolées à partir de cinq variétés de blé de référence : Apache, Caphorn, Orvantis, Charger et Soissons et 62 souches sont isolées à partir d'autres variétés : Robigus, Hammac, Calisto. En revanche, l'échantillonnage de toutes les souches de 2006 a été réalisé seulement sur les cinq variétés de référence dans la mesure où ce sont les variétés les plus représentatives de l'échantillonnage de 2005.

2. Caractérisation

► Aspects cultureux

Suite aux isollements, nous avons pu constater différents aspects cultureux lors de la croissance des souches sur le milieu PDA. Ces aspects cultureux sont conformes à ceux observés par Djerbi et al. (1974). Trois semaines après l'isolement, nous avons pu classer les phénotypes cultureux des souches lors de leur croissance sur PDA en 4 catégories : rose très clair, rose clair, rose foncé et brun noir.

► Hétérothallisme

Matériel et méthodes

Les *mating types* des souches isolées sont déterminés par amplification par PCR des deux *mating types* (MAT1-1 et MAT1-2) (Waalwijk et al., 2002). Les séquences des amorces utilisées pour l'amplification de MAT1-1 sont : F (5'-CCGTTTCTGGCTTCTCGACTG-3', position des nucléotides entre 5.494 et 5.517 sur le locus *mat1-1*, numéro d'accès à Genbank : AF440399) et R (5'-TGGACACCATGGTGAGAGAACCT-3',

position des nucléotides entre 5.812 et 5.834). Les séquences des amorces utilisées pour l'amplification de MAT1-2 sont : F (5'-GGCGCTCCGAAGCAACT-3', position des nucléotides entre 10.048 et 10.065 sur le locus *mat1-2*, numéro d'accès à Genbank : AF440398) et R (5'-GATGCGTTCTGGACTGGAG-3', position des nucléotides entre 10.685 et 10.704).

La répartition des deux *mating types* est analysée avec le test de χ^2 au risque $\alpha = 5\%$. Afin d'augmenter la fiabilité du test statistique appliqué, certains départements à partir desquels moins de 10 souches ont été isolées sont regroupés avec les départements les plus proches géographiquement. Afin de caractériser des variations de séquences, les amplicons *mat1-1* et *mat1-2* obtenus sont analysés par PCR-SSCP.

Résultats

Les 2 types hétérothalliques sont présents dans chacune des localités françaises, y compris dans les localités où les tailles des échantillons sont faibles. Parmi les 510 souches testées, 228 (45 %) sont de type MAT1-1 et 282 (55 %) sont de type MAT1-2. Le test statistique de χ^2 a révélé une légère différence significative sur cette répartition globale des 2 *mating types* ($P = 0.017 < 0.05$). Par ailleurs, l'application du même test statistique au sein de chacune des localités a montré qu'à l'exception d'une localité où une différence significative est observée ($P = 0.02 < 0.05$), les 2 *mating types* se répartissent en fréquence équivalente dans toutes les localités à partir desquelles l'échantillonnage a été effectué. Après l'élimination des souches originaires de cette localité, la distribution globale au sein de la population française de *M. graminicola* devient équivalente à $P = 0.05$ ($P = 0.09 > 0.05$). Sur les feuilles où deux souches ou plus ont été isolées, 42 % contenaient les 2 *mating types*, 28 % contenaient seulement MAT1-1 et 30 % contenaient seulement MAT1-2. L'application du test de χ^2 a montré que les 2 types hétérothalliques se répartissent en fréquence équivalente entre les différentes variétés de blé à partir desquelles l'échantillonnage a été réalisé. L'analyse statistique n'a montré aucune différence significative entre les phénotypes des colonies et les types hétérothalliques des souches testées.

En ce qui concerne le polymorphisme, l'analyse des fragments par PCR-SSCP a montré que sur les 228 amplicons *mat1-1* analysés, un seul a présenté un profil différent du profil commun observé sur le gel SSCP. En revanche, sur les 282 amplicons *mat1-2* testés, 6 profils différents sont observés. Chaque polymorphisme est présenté seulement par une seule souche, sauf 2 des 6 profils observés chez les *mat1-2*, qui sont présentés respectivement par 2 et 4 souches différentes. Les 2 *mat1-1* et *mat1-2* des isolats de référence IPO323 et IPO94269 ont présenté un profil identique aux 2 profils communs observés chez les souches MAT1-1 et MAT1-2 respectivement. Le séquençage a révélé que tous les polymorphismes observés sur le gel SSCP sont dus à des variations d'un seul nucléotide. De plus, les souches MAT1-2 qui ont présenté les mêmes profils sur le gel SSCP ont montré la même variation nucléotidique. Parmi les 7 variations nucléotidiques obtenues, seules 2 d'entre elles ne sont pas silencieuses. Chez la souche T0629, une transition d'une thymine par une cytosine à la position 5.627 sur le locus *mat1-1* (numéro d'accès Genbank : AF440399) induit une substitution d'une phénylalanine par une sérine à la

position 202 de la protéine *mat1-1*. Tandis que pour la souche T0146, une transition d'une guanine par une adénine à la position 10.680 sur le locus *mat1-2* (numéro d'accès Genbank : AF440398) induit une substitution d'une méthionine par une isoleucine à la position 321 de la protéine *mat1-2*.

► Structure génétique

Matériel et méthodes

Les départements ayant moins de 10 isolats ont été regroupés suivant les distances géographiques ; ainsi 12 localités ont été retenues. Les amorces PCR des 4 marqueurs microsatellites ST1A4, ST1E3, ST1E7 et ST1D7 (Owen *et al.* 1998) ont été retenues après une étude préliminaire car ils montraient le plus haut degré de polymorphisme. L'amplification des produits PCR des microsatellites sur le thermocycleur MJResearch PTC 200 et l'ajout du tampon ont été réalisés comme décrit par Razavi et Hughes (2004a). Deux types de gels sont utilisés pour la technique de microsatellites : un gel de résolution et un gel de concentration. Pour la révélation des profils au nitrate d'argent, le protocole de Bassam *et al.* (1991) a été appliqué.

Les deux amorces des séquences partielles de gènes, β -tubuline et actine (Banke *et al.*, 2004) étudiées par PCR-SSCP ont été synthétisées par Invitrogen®. L'amplification de la PCR-SSCP a été accomplie dans le même thermocycleur cité précédemment. Le gel de polyacrylamide non dénaturant (MDE 2x concentrate, FMC Bioproducts) a été préparé selon les instructions du fabricant. La coloration est réalisée au nitrate d'argent en appliquant une technique modifiée du protocole de Bassam *et al.* (1991).

La fraction clonale a été calculée suivant la formule de Jürgens *et al.* (2006). Pour éliminer tout risque d'erreur dû à la sur-représentation, les fréquences d'allèles des clones ont été corrigées, et le programme PopGene (Version 1.32; 2000, Yeh *et al.*, Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada, URL <http://www.ualberta.ca/~fyeh/index.htm>) a été utilisé pour évaluer les paramètres génétiques suivants : la fraction clonale (CF), l'indice de Nei, l'indice de Shannon, le GST, le flux de gène (Nm), le déséquilibre gamétique et la distance génétique de Ney.

Résultats

Sur les 363 souches, 305 haplotypes (84 %) sont analysés, car 16 % des souches de la population formaient des clones. L'index de diversité génique a une moyenne de 0,70 ; le marqueur de microsatellite ST1E7 (0,38) était le moins polymorphe tandis que le gène d'actine (0,88) présentait le plus haut degré de polymorphisme parmi les 4 marqueurs microsatellites et les 2 séquences partielles des gènes étudiés.

En ce qui concerne la diversité génétique globale, les tests du déséquilibre gamétique entre chacun des allèles des marqueurs microsatellites et des gènes d'actine et de β -tubuline analysés par SSCP ont montré que des 1264 comparaisons d'allèles entre elles, seuls 136 tests (environ 18 %) sont statistiquement significatifs ($P \leq 0,05$). Ceci prouve que la majorité des allèles des marqueurs microsatellites et des allèles des 2 gènes étudiés sont aléatoirement associés. Au niveau de la localité, aucun test de déséquilibre gamétique n'était significatif. Un haut degré de diversité génique pour l'indice de Nei (0,71) et l'index de Shannon (1,58) confirment le faible taux de

clonalité entre les localités. Le nombre moyen d'allèles observés est de 4,42 avec un minimum pour le marqueur de ST1E7 (1,66) et un maximum pour le gène d'actine (9,05).

En comparant les 12 localités entre elles, le nombre moyen d'allèles a varié entre 2.32 et 3.73. Les diversités géniques sont de 0,45 pour la valeur la plus faible et de 0,68 pour la valeur la plus élevée; tandis que pour l'index de Shannon, les valeurs extrêmes sont de 0,82 et de 1,36. Les valeurs du déséquilibre gamétique varient de 1.10^{-3} à 36.10^{-3} .

La différenciation des populations (G_{ST}) entre toutes les localités présente une valeur minimale de 0,12 pour le gène d'actine et une valeur maximale de 0,36 pour le marqueur ST1A4. Tandis que pour le flux des gènes (N_m), la valeur minimale est de 0,88 pour le marqueur ST1A4 avec une valeur maximale de 3,75 pour le gène d'actine. La moyenne de G_{ST} est de 0,18 avec un N_m de 2,25. En comparant les localités entre elles, la G_{ST} varie entre 0,44 et 0,19, les valeurs du N_m se situant entre 2,10 et 11,52.

La comparaison de l'identité génétique et de la distance génétique entre les différentes localités françaises décrites montre 3 groupes génétiques (Figure 1).

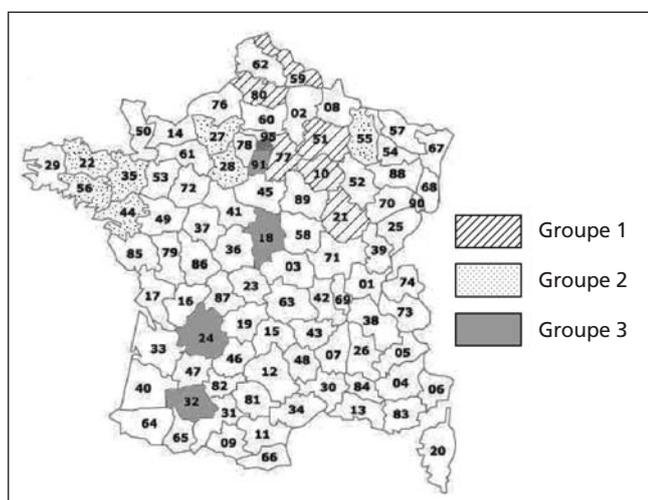


Figure 1 : Distribution géographique des groupes génétiques. Chaque groupe est formé de départements qui sont relativement proches suivant la distance génétique de Nei (1978) pour les loci de microsatellite et les séquences d'actine et de β -tubuline analysées par SSCP.

► Pouvoir pathogène

Le pouvoir pathogène a été évalué par les symptômes observés, la fréquence des pycnides accompagnée par des observations cytologiques (germination des spores, pénétration, invasion du mésophile) ainsi que la production des xylanases (Douaiher et al., 2007a et b).

Matériel et méthodes

Des plantules de blé au stade 3 feuilles (4^{ème} feuille émergente) sont inoculées en serre. L'évaluation a été effectuée sur la variété de blé SCORPION. Six pots à raison de 12 plantules/pot sont utilisés pour chaque souche ainsi que pour le témoin pour chaque jour d'étude. Les symptômes et la sporulation, exprimés par le pourcentage des nécroses foliaires contenant les pycnides, sont notés tous les 2 jours jusqu'à 22 jours post-inoculation sur les 3^{èmes} feuilles des mêmes plantes utilisées pour les dosages enzymatiques. A partir des plantules de blé utilisées pour le dosage des activités enzymatiques, des segments de 2 cm sont coupés à partir des 3^{èmes} feuilles inoculées et non inoculées (témoin). Pour évaluer la germination des spores et la pénétration des tissus foliaires, une coloration au Calcofluor a été effectuée. La colonisation du mésophile, quant à elle, a été évaluée par une coloration au bleu Trypan. Les protéines totales sont extraites suivant le protocole de Magro (1984) et sont quantifiées selon la méthode de Bradford (1976). Les activités enzymatiques ont été dosées suivant la méthode modifiée du 3,5-DNS (acide 3,5-dinitrosalicylique) (Miller, 1959).

Résultats

La pathogénicité de 22 souches représentatives de 22 groupes génétiques identifiés, suite à la caractérisation génétique ainsi que les 2 souches de référence, a été évaluée en serre sur le cultivar de blé SCORPION. Une variation très importante du niveau du pouvoir pathogène a été observée entre les souches appartenant aux groupes génétiques différents (Figure 2). En effet, aucun symptôme (chlorose ou nécrose) contenant des pycnides n'a été observé sur les plantules inoculées par certaines souches (ex. T0262, T0441...). En revanche, d'autres souches provoquent d'importants symptômes présentant des pycnides (ex. T049, T0491...). Une corrélation élevée a été observée entre ce dernier critère et l'activité xylanase mesurée *in vitro*.

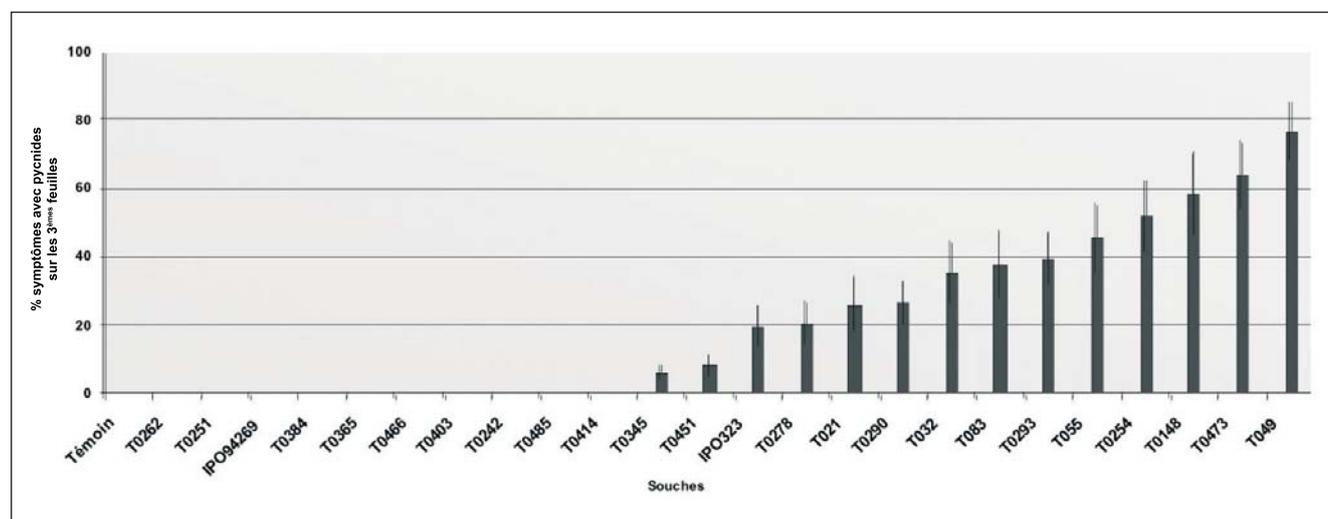


Figure 2 : Pourcentage des surfaces foliaires présentant des symptômes et des pycnides pour 22 souches représentatives de 22 groupes génétiques différents et les 2 souches de références (IPO).

3. Évaluation de la résistance et de la tolérance de génotypes de blé

► Évaluation de la résistance

Matériel et méthodes

Des essais multisites ont été réalisés par le CETAC en 2005, 2006 et 2007 avec respectivement 4, 3 et 5 sites.

Les expérimentateurs ont effectué 1 à 5 notations sur la septoriose, l'épiaison et les autres maladies foliaires (oïdium, rouille jaune et rouille brune). Les expérimentateurs se sont mis d'accord sur une notation avec une échelle linéaire allant de 1 (très résistante) à 9 (très sensible). (tableau 1).

NOTE	Échelle linéaire (%)	
1		0
2	> 0	12.5
3	> 12.5	25.0
4	> 25.5	37.5
5	> 37.5	50.0
6	> 50.0	62.5
7	> 62.5	75.0
8	> 75.0	87.5
9	> 87.5	100

Tableau 1 : Transformation de la notation en % surface présentant des symptômes.

Résultats

Sur la figure 3, on peut noter quelle que soit l'année, un bon comportement de résistance pour certains génotypes, en particulier pour Toisondor, Gen_25, Gen_49, Robigus, Gen-30.

► Évaluation de la tolérance

La tolérance peut être mesurée par la chute de rendement d'une variété inoculée par rapport à son statut sain. Comme le confirme Zuckerman et al. (1997) et Parker et al. (2004), les mécanismes de tolérance sont très peu étudiés et connus.

Afin de formaliser les déterminants de la tolérance du blé à la septoriose, nous avons évalué au champ le comportement de résistance et l'impact de la maladie sur le rendement et ses composantes pour vingt génotypes de blé d'hiver, au cours de deux années culturales (2005-2006 et 2006-2007).

Matériel et méthodes

Vingt génotypes, dont la plupart non encore inscrits, ont été implantés. Ces génotypes se caractérisent par leur différence de précocité (Précoces, 1/2 Précoces et Tardifs) et leur sensibilité à la septoriose. Les dates et densités de semis ont été adaptées à la classe de précocité de chacun des génotypes.

Un dispositif en blocs (répétitions) comprenant chacun les 20 génotypes pour chacune des 2 modalités Protégé/Inoculé (chacun des blocs comprenait 40 micro parcelles) a été mis en place. Les inoculations ont été faites à un volume de 300 L/ha pour des concentrations de 10⁶ spores/mL. Les inoculations ont été réalisées par temps calme, humide et doux, avec présence de rosée sur la végétation grâce à un pulvérisateur à dos (Pull Prex) en 2006 et avec un pulvérisateur tracté en 2007.

Pour chaque parcelle, les notations de stades de développement, les notations de maladies ainsi que les différents prélèvements, puis la récolte ont été réalisés.

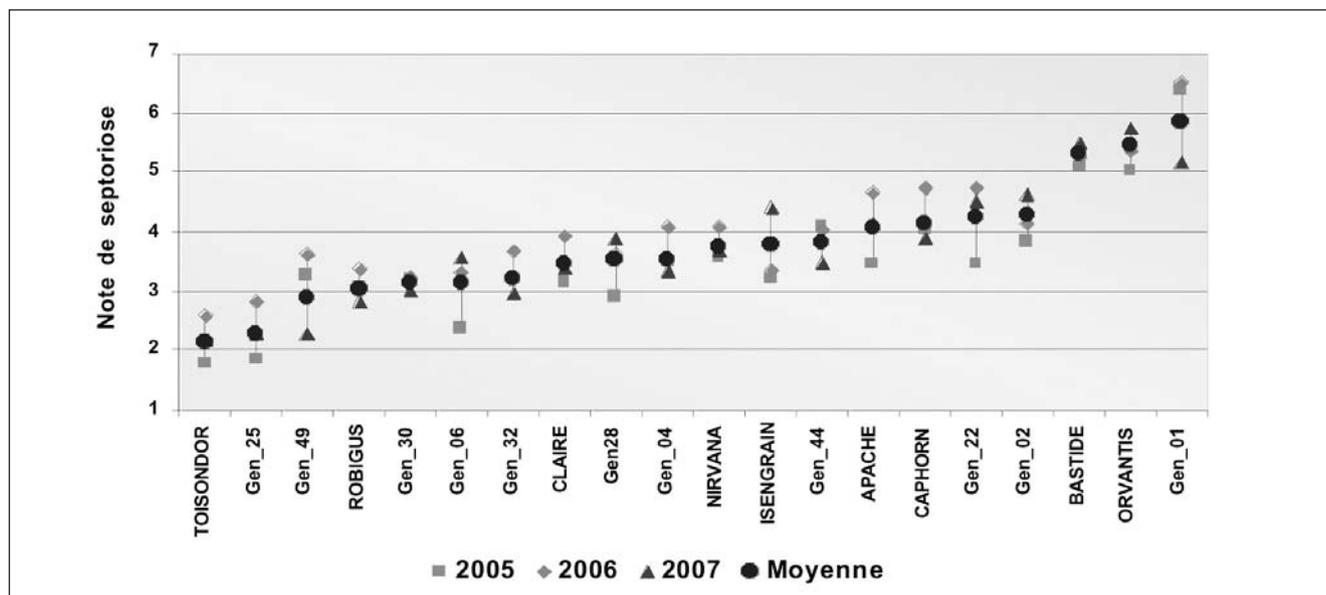


Figure 3 : Synthèse des notations sur la résistance de génotypes face à la septoriose pour 2005, 2006 et 2007.

Résultats

En 2007, les pertes de rendement enregistrées entre les plantes protégées avec des fongicides et les plantes non protégées ayant été inoculées par *M. graminicola* vont de 2 à 24 % selon les génotypes. La perte de rendement n'est pas directement liée à l'intensité de la septoriose, ni à l'intensité des autres maladies résiduelles. On peut constater un bon comportement de résistance pour Toisondor, Parador, Gen-17, Gen-25, Gen-35 ou Gen-48 (Figure 4).

Pour Gen-12 et Gen-4, si nous observons une même intensité de septoriose, on peut remarquer une baisse de rendement pour Gen-12 mais par contre un faible impact de la maladie pour Gen-4. La tolérance n'est donc pas liée à la résistance. Elle dépend du fonctionnement général de la culture sous l'effet de l'interaction du milieu et de la maladie. Il existe chez le blé des génotypes tolérants qui constituent des sources intéressantes pour la sélection. L'étude approfondie de 3 génotypes montre que la redistribution d'azote dans la plante est fortement corrélée à la tolérance. L'identification des différents mécanismes de tolérance nécessitera des travaux complémentaires.

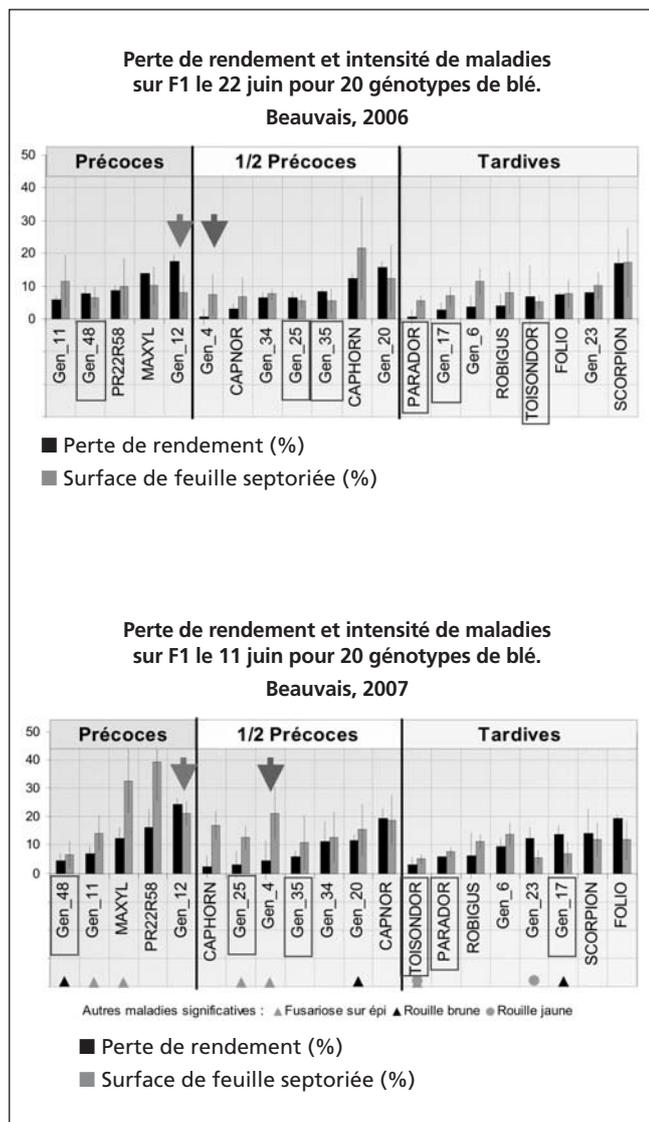


Figure 4 : Perte de rendement et intensité de maladies sur F1 pour 20 génotypes de blé (2006 et 2007).

4. Étude des mécanismes impliqués dans la résistance

Pour cette étude, des cultivars de blé à niveaux de résistance différents sont comparés. Pour évaluer les mécanismes d'interaction plante/hôte, nous nous sommes intéressés à la vague oxydative consécutive à l'attaque d'une plante par un pathogène. Parmi les formes activées de l'oxygène produites, le peroxyde d'hydrogène est connu pour son effet antifongique direct, mais aussi pour son implication dans les mécanismes de renforcement de la paroi des cellules végétales et pour son rôle de messenger dans les processus débouchant sur l'expression des gènes de défense chez la plante. Ainsi pour évaluer la réaction de la plante vis-à-vis de l'invasion du tissu cellulaire par le champignon, nous étudions des activités impliquées dans le processus de production ou de consommation du peroxyde d'hydrogène. Les activités Peroxydase (PO), Glutathion-S-Transférase (GST), la Lipoxygénase (LOX) ont été étudiées par des méthodes spectrophotométriques 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 et 21 jours post inoculation pour des cultivars inoculés par *M. graminicola* et des plantes témoins. La relation entre les différentes activités peut être schématisée comme dans la figure 5.

Ces activités seront corrélées à la capacité du champignon de pénétrer, d'envahir et de nécroser les tissus, capacité mesurée par des observations microscopiques après coloration du matériel fongique au lacto-glycérol bleu Trypan. Nous avons déterminé 49 critères d'observations microscopiques liés au mode de pénétration du champignon et à son développement. Les résultats sont actuellement en cours d'analyses.

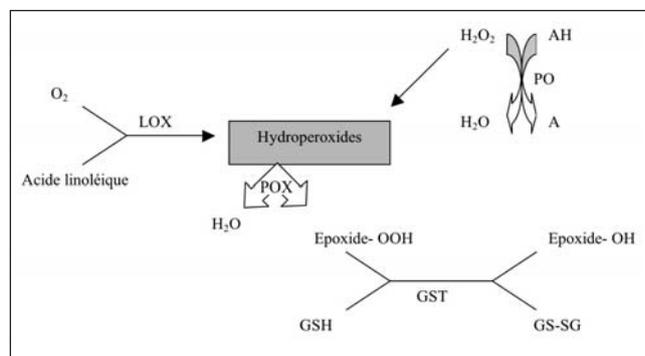


Figure 5 : Relations entre les différentes activités étudiées.

5. Conclusion

Le projet FSOV (2004-2007) intitulé "Étude des populations françaises de septorioses et recherche de sources de résistance chez le blé" a consisté dans un premier temps à mieux connaître la structure des populations de septorioses en France qui jusque là n'avait pas été étudiée. Ceci a été réalisé par une étude terrain à l'échelle nationale et la constitution d'une collection de souches isolées à partir des réseaux d'expérimentation d'ARVALIS-Institut du végétal et des sélectionneurs du CETAC. Ce travail de terrain a permis de confirmer l'importance de la fréquence de *S. tritici*. La collection qui compte environ 500 souches a été l'objet d'une caractérisation. Celle-ci s'est faite à plusieurs niveaux sur une partie, voire la totalité des souches isolées : identification des *mating types* (espèce hétérothallique), types génétiques et pouvoir pathogène.

La distribution et la répartition des *mating types* à différentes échelles mettent en évidence le potentiel élevé de recombinaison sexuée chez cette espèce en France. En effet, nous avons pu constater que les deux *mating types* sont non seulement présents et représentés équitablement au niveau d'une même localité, à l'échelle de la parcelle mais également à l'échelle de la feuille de blé.

Suite à l'étude des microsatellites et des séquences codant pour l'actine et la β -tubuline, les dendrogrammes basés sur la distance de Nei, la répartition des souches par CAH, les valeurs des indices de Nei, de la fraction clonale, du déséquilibre gamétique, du G_{ST} , du N_m ont permis d'une part de confirmer l'impact de la phase sexuée dans la structuration génétique de la population et d'autre part la mise en évidence de groupes génétiques au sein de la population de *S. tritici*.

Afin de compléter cette caractérisation, des tests de pathogénicité ont également été réalisés comparativement à des souches de référence utilisées par d'autres équipes. Ces tests (importance des symptômes, de la sporulation, des CWDE...) ont été effectués avec les souches représentatives des principaux groupes génétiques identifiés précédemment. Les critères basés sur l'importance des symptômes et sur la sporulation mettent en évidence une grande diversité du pouvoir pathogène au sein de la population du parasite.

Ces tests ont été complétés par l'étude d'activités enzymatiques impliquées dans la dégradation des parois cellulaires du blé (CWDE). Les résultats obtenus en conditions *in vivo* ont confirmé le rôle prépondérant de la xylanase.

Un autre volet du projet a consisté à mettre en évidence au champ des génotypes de blé résistants à la septoriose. Ceci a été réalisé durant les 3 années dans le cadre d'essais multi-locaux sur une centaine de lignées au départ puis poursuivi avec les génotypes ayant exprimé des résistances de bon niveau. La recherche de tolérance a également été réalisée sur une vingtaine de génotypes. Il existe parmi eux des génotypes très tolérants, qui bien que moyennement sensibles à la septoriose, ont un rendement grain peu affecté par la maladie. Enfin, parmi les génotypes de blé ayant présenté des résistances, une étude a été initiée afin de mettre en évidence les mécanismes impliqués. Cette étude comporte différentes approches : cytologique et physiologique (péroxydase, lipoxygénase et glutathion-S-transférase). En s'appuyant sur les résultats acquis lors de ce projet, celui-ci pourrait être poursuivi afin d'approfondir la connaissance de la population de *S. tritici* et d'en faire un suivi dans le temps, de réaliser une caractérisation phénotypique de la résistance chez le blé et de rechercher des marqueurs moléculaires utilisables en sélection.

Références bibliographiques

- Banke, S., Peschon, A., McDonald, B.A. (2004).** Phylogenetic analysis of globally distributed *Mycosphaerella graminicola* based on three DNA sequence loci. *Fungal Genet. Biol.* 41: 226-238.
- Bassam, B.J., Gaetano-Anolles, G., Gresshoff, P.M. (1991).** Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry.* 196: 80-83.
- Bradford, M.M. (1976).** A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-54.
- Douaiher, M.N., Nowak, E., Durand, R., Reignault, Ph., Halama, P. (2007a).** Correlative analysis of *Mycosphaerella graminicola* pathogenicity and cell wall degrading enzymes produced in vitro: the importance of xylanases and polygalacturonases. *Plant Pathology.* 56: 79-86.
- Douaiher, M.N., Nowak, E., Dumortier, V., Durand, R., Reignault, Ph., Halama P. (2007b)** *Mycosphaerella graminicola* produces *in vitro* a range of cell wall-degrading enzyme activities that vary with the carbon source. *European Journal of Plant Pathology.* 117: 71-79
- Jürgens, T., Linde, C.C., McDonald, B.A. (2006).** Genetic structure of *Mycosphaerella graminicola* populations from Iran, Argentina and Australia. *Eur. J. Plant Pathol.* 115: 223-233.
- Magro, P. (1984).** Production of polysaccharide-degrading enzymes by *Septoria nodorum* in culture and during pathogenesis. *Plant Science Letters* 37: 63-8.
- Miller, G.L. (1959).** Use of the dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31: 426-428
- Nei, M. (1978).** Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Owen, P.G., Pei, M., Karp, A., Royle, D.J., and Edwards, K.J. (1998).** Isolation and characterization of microsatellite loci in the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Mol. Ecol.* 7: 1611-1612.
- Parker, S.R., Welham, S.J., Paveley, N.D., Foulkes, J., Scott, R.K. (2004).** Tolerance of septoria leaf blotch in winter wheat. *Plant Pathology* 53 : 1-10.
- Razavi, M., and Hughes, G.R. (2004a).** Microsatellite markers provide evidence for sexual reproduction of *Mycosphaerella graminicola* in Saskatchewan. *Genome* 47: 789-794.
- Zuckerman, E., A. Eshel, and Z. Eyal, (1997).** Physiological aspects related to tolerance of spring wheat cultivars to *Septoria tritici* blotch. *Phytopathology*, 87: 60-65.