



Traits de vie, adaptation et pouvoir invasif de lignées clonales de *Phytophthora infestans*, agent du mildiou de la pomme de terre

Nicolas Mariette

► To cite this version:

Nicolas Mariette. Traits de vie, adaptation et pouvoir invasif de lignées clonales de *Phytophthora infestans*, agent du mildiou de la pomme de terre. Sciences agricoles. Agrocampus Ouest, 2016. Français. NNT : 2016NSARA075 . tel-01589675

HAL Id: tel-01589675

<https://theses.hal.science/tel-01589675>

Submitted on 18 Sep 2017

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

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

AGRO CAMPUS

OUEST

Nicolas MARIETTE • 8 janvier 2016

Thèse AGROCAMPUS OUEST
sous le label de l'Université Bretagne Loire
pour obtenir le grade de
DOCTEUR D'AGROCAMPUS OUEST
Spécialité Biologie et Agronomie

ÉCOLE DOCTORALE • Vie-Agro-Santé (VAS)

LABORATOIRE D'ACCUEIL • UMR INRA - AGROCAMPUS OUEST -
Université de Rennes 1, Institut de génétique, environnement et
protection des plantes (IGEPP)

**Traits d'histoire de vie, adaptation et
pouvoir invasif de lignées clonales
de *Phytophthora infestans*, agent
du mildiou de la pomme de terre**

Yannick OUTREMAN

Professeur, AGROCAMPUS OUEST, UMR INRA-AO-UR1 IGEPP /
président

Marie-Laure DESPREZ LOUSTAU

Directrice de recherche, INRA UMR BIOGECO / *rapporteuse*

Frédéric SUFFERT

Ingénieur de recherche, INRA UMR BIOGER / *rapporteur*

Marc BARDIN

Chargé de recherche, INRA, UR Pathologie Végétale /
examineur

Pascal FREY

Directeur de recherche, INRA IAM / *examineur*

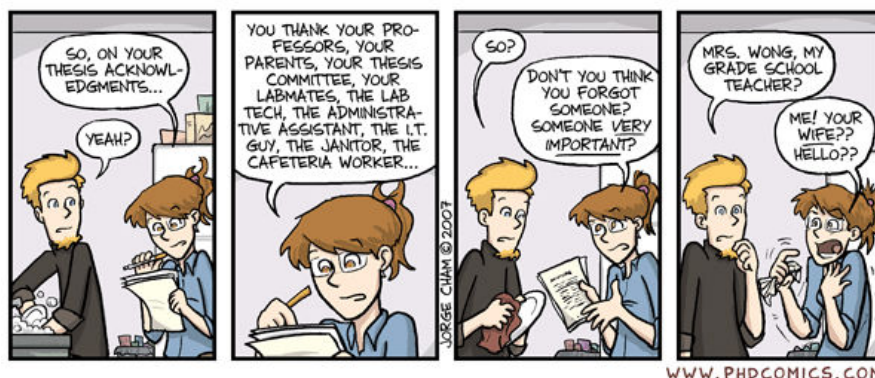
Didier ANDRIVON

Directeur de recherche, UMR INRA-AO-UR1 IGEPP /
directeur de thèse

Catherine CHATOT

Entreprise Germicopa, ACVNPT / *membre invitée*

- REMERCIEMENTS -



Après trois années de travail, comment remercier correctement tous les gens qui m'ont aidé à en voir le bout ? Je vais essayer de n'oublier personne, et je prie toutes les personnes qui n'apparaîtraient pas ici et s'en sentiraient lésées de m'excuser d'avance, tellement m'ont aidé qu'il est en effet difficile de ne pas en oublier.

Cette thèse a été financée, via une bourse CIFRE, par Bretagne-Plants en tant que représentant de l'ACVNPT (Association des Créateurs de Variétés Nouvelles de Pomme de Terre) et je tiens donc à remercier les différents membres de l'association, à savoir Bretagne-Plants, Comité Nord-SIPRE, Germicopa et Grocep, pour m'avoir permis de réaliser cette thèse. En particulier, je remercie Emmanuel Guillery, Catherine Chatot et Frédérique Aourousseau qui ont suivi le déroulement de mes travaux de thèse.

Merci également à l'équipe de direction de l'UMR IGEPP du centre INRA de Rennes, Denis Tagu en tête, pour m'avoir accueilli dans les murs de l'unité et permis de conduire ma thèse dans d'excellentes conditions de travail (si on excepte le nid de guêpe au-dessus de mon bureau cet été...).

Je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté d'examiner et juger mon travail de thèse : Marie-Laure Desprez Loustau, Frédéric Suffert, Marc Bardin, Pascal Frey, Yannick Outreman, Catherine Chatot et Didier Andrivon.

Merci à l'ensemble des personnes qui ont participé à mes comités de thèse - Ivan Sache, François Delmotte, Elisabeth Fournier, Catherine Chatot, Frédérique Aourousseau et Emmanuel Guillery - pour leurs précieux conseils m'ayant permis de mener à bien ce travail.

Je remercie bien sûr énormément les personnes qui m'ont encadré pendant cette thèse : mes deux directeurs de thèse, Didier Andrivon et Josselin Montarry, ainsi que Roselyne Corbière. Merci pour les connaissances et les compétences que j'ai pu acquérir à vos côtés, pour vos précieux conseils, votre disponibilité (l'avantage avec trois encadrants, c'est qu'il y en a toujours au moins un de présent), vos corrections lors de la rédaction des articles et du manuscrit. Merci aussi pour la grande confiance et la liberté que vous m'avez accordée tout au long de ces trois années.

Je tiens également à adresser ma plus vive reconnaissance à Romain, Bruno et Annabelle pour m'avoir accompagné dans mes manip pendant cette thèse. Celle-ci n'aurait bien entendu pas été possible sans votre participation aux étapes d'échantillonnage, isolement, phénotypage, génotypage... C'était vraiment un grand plaisir de travailler avec des personnes à la fois aussi sympathiques, motivées, drôles et efficaces que vous trois. Même quand les manip étaient parfois longues et fastidieuses comme toutes ces journées que vous avez passées, « à cause » de moi, à récolter, compter, mesurer les spores... vous aviez toujours la patate (sans vouloir faire de jeu de mot douteux), et donc mille mercis à vous trois ! Bien sûr, je remercie aussi Claudine, Emmanuelle, Eric, Marie, Quentin de m'avoir filé des coups de main bien utiles dans mes manip et notamment pour les fameuses journées « récolte de spores » (un pur régal, je crois que ça va me manquer). Merci aussi à Mathilde Bodiou (SYNTEC) pour sa précieuse aide lors des échantillonnages.

Concernant les manip toujours, merci aux serristes, et notamment à Laurent C, d'avoir toujours pu accéder à mes requêtes (parfois un peu contraignantes et pas toujours demandées en temps et en heure) concernant les réservations de serre et d'enceintes climatiques.

Merci également à Roland Pellé et Jean-Eric Chauvin pour leur super accueil toutes les fois où j'ai eu l'occasion de me rendre à la station expérimentale de Ploudaniel.

Pendant cette thèse, j'ai eu l'occasion de participer à l'organisation d'un colloque, les Journées de Doctorants SPE, dont les participants semblaient très satisfaits. Ce fut une expérience enrichissante et je tenais donc à remercier les autres membres de l'équipe d'organisation : Delphine, Alexia, Laurence, Mélanie, Yoan, Nathan.

Je remercie l'ensemble des membres de l'équipe « Résistance et Adaptation », et en particulier ceux du groupe « Bactérie-Mildiou-Nématode », pour nos échanges scientifiques et pour votre sympathie. Merci aussi à l'équipe de m'avoir permis de participer à des congrès aussi intéressants que sympathiques en France et à l'étranger. D'ailleurs, je tiens à remercier Patrick Herpin, au nom du centre INRA de Rennes, et la SFP pour m'avoir octroyé une bourse m'ayant permis de me rendre à la réunion annuelle de l'APS à Pasadena cet été. Merci aussi à Martine Launay, notre gestionnaire, pour sa précieuse aide dans l'organisation de ces différents déplacements.

Les bons souvenirs que je garde de ces trois années de thèse sont dus aux qualités humaines de tous ceux que j'ai pu côtoyer au sein de l'unité pendant ces trois années. Par exemple, je sens que les debriefs footballistiques du lundi matin, notamment en compagnie de Lionel R, Gaël, Sylvain, Lionel L, Romain, Gaëtan..., vont me manquer. Une pensée également à celles et ceux qui ont dû me supporter lors des repas du midi à la cantine, d'abord les nématologues (Charline, Cécile, Didier, Catherine, Eric, Josselin, Sylvie) puis ensuite Fred, Laurent, Maryse, Melen, Antonin et les filles, Emilie, Angélique, Laure (lorsqu'on ne les oubliait pas !). Merci aux nématologues de m'avoir permis de m'améliorer au billard (étant d'ailleurs devenu trop fort, j'ai préféré ensuite me retirer pour ne faire de l'ombre à personne !).

Une pensée aussi aux footeux et notamment ceux du FC Celtic INRA, Laurent, Gaël, Saïd, Fred, LeGrand, Fred, Romain, Gaëtan, Yoan, Sylvain, Hugues...et beaucoup d'autres, que j'ai eu le plaisir de retrouver tous les mercredis (ou presque) sur le terrain ou bac à sable (selon la saison) du stade Charles Géniaux. Ces entraînements acharnés du mercredi nous ont notamment permis de ramener la coupe des champions lors de la dernière édition des Adayades (les Jeux Olympiques des centres INRA). Il faudra donc remettre notre titre en jeu lors de la prochaine édition, en recrutant de nouveaux thésards ! De plus, sous l'impulsion de Gaëtan, le FC Celtic INRA est engagé depuis le début de l'année dans le championnat de foot entreprise. Malgré un départ quelque peu poussif, les victoires commencent maintenant à s'enchaîner, notamment depuis le passage du 4-4-2 à un 5-3-2 révolutionnaire inspiré du génie P. Montanier. A ce rythme, nul doute que l'objectif du début de saison, à savoir la première moitié de tableau, sera atteint.

Pour continuer dans le foot, je remercie Gaël de m'avoir fait découvrir et partager les joies mais aussi (et surtout) les peines des supporters du Stade Rennais FC. Parmi les souvenirs de ces années rouges et noires, je retiendrai les galette-saucisse, l'hymne d'avant-match (que je n'ai toujours pas compris), la soirée épique au stade de France, la folie « mesurée » du Roazhon Park, mais aussi les chevauchées fantastiques de Ntep et les caviars d'Ilunga...

Une pensée aussi à tous les potes rencontrés à Bayeux (Thibault, Donas, Jérèm', Simon, Chouk8, Joakim...), Caen (Yenyen, Swan, Quentin, Flavie...), Angers (Ariane, Coco, Chloé...), Rennes (Simon, Jérèm, Erwan, Alexia, Pierre, Marion, Briec, Nolwenn, Solenn, Romain, Valérie, Kaba, Bérengère ...) ou encore à Wageningen (Sara, Nerea, Dimitris).

Un grand merci aussi à ma famille (et belle-famille), en particulier mes parents, Emilie, Benji, Brigitte, Serge, Anthony ainsi que qu'à celle de Soizic (Bruno, Françoise, Céline, Basile, Ivonne) pour votre soutien pendant ces trois années de thèse.

Et pour finir, j'adresse un remerciement tout particulier à Soizic pour ton soutien de tous les instants, merci pour ton humour dévastateur, merci de supporter mon sale caractère parfois (si si je le reconnais), et aussi pour tes supers talents de dessinatrice que tu as bien voulu mettre à contribution pour cette thèse. Bref, merci pour tout ma chérie !

- TABLE DES MATIERES -

<u>Introduction générale</u>	1
1. Pourquoi et comment protéger les cultures ?	2
1.1. Un contexte exigeant de sécurité alimentaire	2
1.2. Un arsenal de méthodes pour limiter les pertes	2
1.3. L'écologie évolutive pour une meilleure gestion des résistances végétales	6
2. Les principaux acquis et connaissances à mobiliser	7
2.1. Les traits d'histoire de vie des champignons et oomycètes parasites de cultures	8
2.1.1. Traits d'histoire de vie liés à la phase infectieuse	8
2.1.2. Traits d'histoire de vie liés à l'étape de survie	13
2.2. Evolution des traits d'histoire de vie	17
2.2.1. Compétition et fitness	17
2.2.2. Trade-off entre traits d'histoire de vie conditionnant la phase infectieuse	19
2.2.3. Trade-off entre agressivité et survie	20
2.3. Modulation de l'expression des traits de vie par la température	22
2.3.1. Impact de la température sur les traits d'histoire de vie	22
2.3.2. Impact de la température dans la compétition intra-spécifique	25
3. Un cas d'étude : le pathosystème <i>P. infestans</i> – pomme de terre	27
3.1. La pomme de terre : une culture importante	27
3.2. Le mildiou, une maladie dévastatrice et difficile à contrôler	29
3.3. <i>Phytophthora infestans</i> : un parasite polycyclique avec différentes stratégies de survie	32
3.4. Des changements fréquents mais mal compris au sein des populations ouest-européennes de <i>P. infestans</i>	35
3.5. <i>P. infestans</i> : un parasite qu'on peut élever, génotyper et phénotyper au laboratoire	36

4. Questions de recherches	37
 <u>Chapitre 1</u>	 40
Les lignées clonales invasives sont-elles les plus agressives dans les populations de <i>P. infestans</i>?	
1. Objectifs de travail	41
2. Article 1	42
Phenotypic and genotypic changes in French populations of <i>Phytophthora infestans</i> : are invasive clones the most aggressive?	
 <u>Chapitre 2</u>	 72
Agressivité et dynamiques locales chez <i>P. infestans</i>	
1. Objectifs de travail	73
2. Article 2	75
Aggressiveness and local temporal dynamics of <i>Phytophthora infestans</i> clones: consequences of the trade-off between epidemic fitness and survival	
 <u>Chapitre 3</u>	 107
Trade-off entre nombre et taille des descendants asexués chez <i>P. infestans</i>	
1. Objectifs de travail	108
2. Article 3	109
The trade-off between sporangia number and size in the potato late blight pathogen <i>Phytophthora infestans</i> is not altered by host resistance	
 <u>Chapitre 4</u>	 124
Patrons d'adaptation à la température chez <i>P. infestans</i>	
1. Objectifs de travail	125
2. Article 4	126
Local adaptation to temperature in populations and clonal lineages of the Irish potato famine pathogen <i>Phytophthora infestans</i>	
 <u>Discussion générale</u>	 155
1. Agressivité et fitness	156
1.1. Comment évaluer correctement la fitness ?	156

1.1.1. Extrapoler la fitness à partir de mesures sur monocycle épidémique	156
1.1.2. A partir de quels traits d'histoire de vie ?	157
1.2. L'hypothèse du 'toujours plus agressif' : une explication trop simple	160
2. La température, un autre facteur d'adaptation des populations	161
3. Perspectives et nouvelles questions de recherche	163
3.1. Suivre les phases cryptiques des épidémies: une démarche expérimentale difficile	163
3.2. Quelles inférences tirer des données génotypiques pour la prédiction des phénotypes ?	165
3.3. Les patrons d'adaptation observés ici sont-ils connectés aux stratégies solitaires/solidaires lors d'infections multiples ?	166
4. Quelles conséquences pour la gestion des variétés résistantes ?	167
 <u>Références bibliographiques</u>	 169
 <u>Annexe 1</u>	 189
Souches de <i>Phytophthora infestans</i>, que nous apprennent les marqueurs microsatellites ?	
 <u>Annexe 2</u>	 193
Mildiou en France : <i>P. infestans</i> sous surveillance	

Introduction générale

1. Pourquoi et comment protéger les cultures ?

1.1. Un contexte exigeant de sécurité alimentaire

La population mondiale est en constante augmentation : passée de 2,5 à plus de 7 milliards depuis le milieu du XXème siècle, elle pourrait même dépasser les 9 milliards d'habitants en 2050 d'après l'étude World Population Prospects de l'ONU. Dans ce contexte, et en raison des modifications dans les habitudes alimentaires des êtres humains, on estime que la demande en production agricole va ainsi augmenter de 60 à 110% d'ici 2050 (Tilman *et al.* 2011). Or celle-ci est fortement menacée par les maladies et ravageurs agricoles, notamment ces dernières décennies avec l'augmentation des invasions épidémiques liée à la globalisation (Crowl *et al.* 2008). Les champignons et oomycètes, responsables de maladies ayant parfois été à l'origine de tragédies qui ont marqué l'histoire (Encadré 1), représentent donc une menace de plus en plus sérieuse pour la sécurité alimentaire mondiale (Anderson *et al.* 2004). Chaque année, les pertes de récoltes causées par les maladies fongiques dépassent les 200 milliards d'euros, et suffiraient à nourrir 8.5% de la population mondiale actuelle (Fisher *et al.* 2012). C'est pourquoi le maintien d'une production agricole de qualité passera nécessairement par une bonne gestion de ces parasites.

1.2. Un arsenal de méthodes pour limiter les pertes

Une des méthodes de lutte classiquement utilisées contre les agents phytopathogènes repose sur l'application répétée de produits phytosanitaires. Contrairement à ce qu'on pourrait penser, l'utilisation de la lutte chimique n'est pas récente, puisque par exemple, dès l'antiquité, on recommandait l'usage de l'arsenic en tant qu'insecticide. Elle s'est cependant généralisée au XIXème siècle avec les progrès de la chimie minérale. C'est à cette époque qu'ont été mis au point les premiers fongicides à base de sulfate de cuivre, comme la célèbre bouillie bordelaise initialement destinée à lutter contre le mildiou de la vigne (Mondot & Ruiz 1995). Bénéficiant par la suite de l'apport de la chimie organique, l'usage des produits phytosanitaires en agriculture a connu un grand essor à partir du milieu du XXème siècle en

permettant une production de qualité, les rendant ainsi quasi-incontournables dans la plupart des filières agricoles (Aktar *et al.* 2009).

Encadré 1. Impact sociétal d'une maladie des cultures, le mildiou de la pomme de terre en Irlande.

Le mildiou de la pomme de terre, causé par l'oomycète *Phytophthora infestans*, fut à l'origine de la Grande Famine qu'a connue l'Irlande entre 1845 et 1851. Au XIX^{ème} siècle, la culture de la pomme de terre était très importante en Europe en raison de son excellent rendement calorique, en particulier en Irlande où près du tiers de la population était entièrement dépendant de la culture de ce tubercule. A titre d'exemple, on estime qu'en moyenne, un paysan irlandais se nourrissait de 5,4 kg de pommes de terre par jour lorsque les pommes de terre étaient disponibles, c'est-à-dire pendant la période allant de novembre à mai (Zadoks 2008). L'arrivée de *P. infestans* sur le continent européen en 1844, *via* des cargaisons de pommes de terre importées d'Amérique, a provoqué des épidémies de mildiou les années suivantes qui ont ravagé les cultures de pommes de terre (Zadoks 2008). Ainsi en Irlande, la maladie détruisit la moitié des récoltes de pommes de terre de 1845 ainsi que la quasi-totalité de celles de 1846, et si les rendements étaient moins affectés l'année suivante, les épidémies de mildiou furent à nouveau dévastatrices en 1848 et 1849 (Woodham-Smith 1991). Ces mauvaises récoltes ont inévitablement conduit à la famine dans le pays avec des décès liés à la malnutrition constatés dès les premiers mois de l'année 1846 (Ross 2002), un phénomène aggravé par différents facteurs politiques, sociaux et culturels qui font encore débat à l'heure actuelle (Kinealy 1994; Woodham-Smith 1991). Cette famine fût rapidement accompagnée par des épidémies de fièvre récurrente, de typhus ou encore de choléra, ce qui contribua à alourdir le bilan (Ross 2002). Outre les décès liés à la famine et aux maladies, de nombreux Irlandais quittèrent le pays dès 1845, notamment vers les Etats-Unis (dont, pour l'anecdote, la famille Kennedy), le Canada, l'Angleterre ou encore l'Ecosse, dans des conditions qui augmentèrent encore davantage le nombre de victimes (Kinealy 1994). L'Irlande paya ainsi un lourd tribut à la Grande Famine avec un bilan s'élevant entre 600 000 et 1 000 000 de morts et de 1 000 000 à 1 300 000 d'émigrés sur la période 1846-1851, soit une diminution d'au moins 20% de la population (Kinealy 1994; Zadoks 2008). Aujourd'hui encore, le niveau de population en Irlande n'a pas retrouvé le niveau qui était le sien au début des années 1840, autour de 8 millions d'habitants (Ross 2002). Par ailleurs, si l'Irlande fût particulièrement touchée par les épidémies de mildiou dans les années 1840, celles-ci ont également eu d'importantes répercussions dans le reste de l'Europe avec pas moins de 750 000 morts liés à la famine et furent l'un des facteurs conduisant aux révolutions de 1848 (Zadoks 2008).

L'utilisation de ces intrants en agriculture est cependant aujourd'hui de plus en plus controversée, en raison de son coût souvent élevé mais surtout de ses effets néfastes constatés aussi bien sur les producteurs, les consommateurs et l'environnement (Savary & Teng 1994 ; Elbaz *et al.* 2004). De plus, si les produits phytosanitaires ont longtemps été loués pour leurs capacités à contrôler les épidémies, des exemples de plus en plus nombreux d'apparition, et de sélection dans les populations, de résistances face à de diverses molécules chimiques sont aujourd'hui rapportés. Outre les exemples de résistance aux pesticides rapportés chez certains insectes comme le doryphore *Leptinotarsa decemlineata* (Alyokhin *et al.* 2008), cette méthode de lutte peut ainsi notamment s'avérer particulièrement inefficace face aux champignons et oomycètes. En effet, certaines caractéristiques de leur cycle de vie, en particulier des régimes de reproduction mixtes, de grandes capacités de dispersion et des temps de génération courts, confèrent à ces derniers un fort potentiel adaptatif (McDonald & Linde 2002). Par conséquent, l'utilisation massive de fongicides dans les agrosystèmes a fréquemment conduit à l'émergence de souches résistantes, et ce, parfois rapidement. Bien que certaines stratégies d'utilisation des pesticides semblent pouvoir ralentir la sélection des résistances (REX Consortium 2013), de nombreux cas de résistance aux fongicides ont été observés (Hollomon 2015). Pour ces raisons, les pesticides, et en particulier les fongicides, font face à une défiance accrue de la part de l'opinion publique et leur utilisation est également soumise à une réglementation de plus en plus restrictive conduisant ainsi les industriels à privilégier des méthodes de lutte alternatives. La France a par exemple lancé le plan Ecophyto qui prévoit notamment des actions de généralisation des systèmes de production intégrée, le développement de l'agriculture biologique et l'évolution des pratiques agricoles pour réduire à moyen terme de 50% l'utilisation des produits phytosanitaires.

L'utilisation de variétés résistantes à leurs bio-agresseurs est une des solutions privilégiées pour maintenir une efficacité de lutte satisfaisante sans avoir recours aux produits phytosanitaires. En effet, l'amélioration des connaissances en génétique a permis aux sélectionneurs d'introduire des facteurs de résistance dans les variétés cultivées, notamment grâce à des croisements avec des espèces sauvages apparentées (Durel *et al.* 2007). Deux principaux types de résistance ont été décrits chez les plantes : la résistance qualitative et la résistance quantitative. La première, aussi appelée résistance spécifique

(Vanderplank 1968), est basée sur des interactions gène-pour-gène entre la plante-hôte et la parasite au moment de la reconnaissance par l'hôte de l'envahisseur (Flor 1971) et elle est associée à une réaction d'hypersensibilité qu'on peut assimiler à un suicide des cellules situées autour du point de pénétration du parasite (Agrios 2005). Elle empêche ainsi complètement l'infection par le parasite, et offre donc une résistance totale (Parlevliet 1979). A l'inverse, la résistance quantitative (ou résistance non-spécifique) est caractérisée par l'absence d'interactions spécifiques entre les génotypes de l'hôte et du parasite (Vanderplank 1968). La résistance quantitative est généralement gouvernée par plusieurs gènes ou régions génomiques appelées QTL (Quantitative Trait Loci) qui entraînent une réduction de la sévérité des symptômes de la maladie (Lindhout 2002 ; St Clair 2010). Cette résistance est partielle car elle n'empêche pas l'infection par l'agent pathogène, mais limite son développement, sa croissance et/ou sa reproduction (VanderPlank 1968 ; Parlevliet 1979).

Pendant longtemps, les phytopathologistes se sont focalisés sur la composante qualitative de la relation hôte-parasite, plus simple à étudier empiriquement et dont le mécanisme mis en jeu, le modèle gène-pour-gène, avait été très tôt mis en évidence par Flor (1971). De plus, comparées aux résistances quantitatives, les résistances qualitatives sont d'une grande efficacité car elles empêchent totalement l'infection de l'agent pathogène (Thrall & Burdon 2002). Cependant, sauf quelques rares exceptions, ces résistances qualitatives ont été souvent rapidement contournées, parfois après seulement quelques années d'utilisation en pratique (Wolfe 1993 ; Zeigler *et al.* 1994 ; Bayles *et al.* 2000 ; Brown 2015). Face à ce constat d'échec, les sélectionneurs se sont alors de plus en plus tournés vers les mécanismes de résistance quantitative. La base génétique plus complexe de ces résistances rend en effet a priori leur contournement par les agents pathogènes plus difficile, car il nécessite de nombreux événements de recombinaison et/ou mutations (van den Berg *et al.* 2014). De ce fait, et parce qu'elles exerceraient une pression de sélection moins forte sur les populations d'agents pathogènes, les résistances quantitatives des plantes sont supposées être plus durables que les résistances qualitatives (Brun *et al.* 2010 ; Fabre *et al.* 2012), c'est-à-dire peuvent rester efficaces après une utilisation prolongée sur de grandes surfaces, en présence de l'agent pathogène et dans un environnement propice à son développement (Johnson 1984).

A la différence des connaissances acquises sur la durabilité des résistances qualitatives, celles concernant les résistances quantitatives restent toutefois encore assez limitées (Mundt 2002). Il a été montré que certains champignons et oomycètes pouvaient s'adapter à des résistances quantitatives, généralement *via* des expériences d'inoculations croisées (Bjor & Mulelid 1991 ; Andrivon *et al.* 2007 ; Delmotte *et al.* 2014) menées en conditions contrôlées à partir de populations naturelles. Cependant, ces expériences utilisent généralement un faible nombre d'isolats, qui ne représentent donc probablement pas toute la variabilité des niveaux d'agressivité existant au sein des larges populations naturelles (Mundt 2014). D'autre part, elles ne prennent pas en compte les interactions entre les différents génotypes d'une population d'agents pathogènes et en particulier, la compétition pour l'hôte, phénomène pourtant couramment observé dans les agrosystèmes (Koskella *et al.* 2006). La compétition pour l'hôte, qui a lieu lorsque des plantes sont attaquées simultanément par des agents pathogènes de différents génotypes (Zhan & McDonald 2013), revêt pourtant un aspect capital lorsqu'on s'intéresse à l'évolution de l'agressivité au sein d'une population d'agents pathogènes. En particulier, si les isolats les plus agressifs s'avèrent être les plus compétitifs et supplantent ainsi leurs congénères, comme cela avait notamment été montré dans les populations de l'agent de la rouille jaune du blé, *Puccinia striiformis* (Hovmøller *et al.* 2008), cela pourrait conduire à une érosion plus rapide des résistances quantitatives.

1.3. L'écologie évolutive pour une meilleure gestion des résistances végétales

Une meilleure compréhension du caractère invasif dans les populations de champignons et oomycètes phytopathogènes pourrait donc avoir une importance capitale lorsqu'on souhaite prédire la durabilité des résistances (Zhan & McDonald 2013). Cela nécessite de bien identifier les traits d'histoire de vie¹ de ces parasites qui sont impliqués dans la compétition entre génotypes, en particulier ceux intervenant dans le processus d'infection de l'hôte (Cooke *et al.* 2012). Il convient également de comprendre les éventuels compromis, ou trade-offs, entre ces traits d'histoire de vie car ils pourraient aider à prédire leurs trajectoires évolutives dans les populations (Zhan & McDonald 2013). Par ailleurs, lorsqu'on s'intéresse à la compétition au sein des populations de champignons et oomycètes phytopathogènes, on

¹traits d'histoire de vie : traits biologiques du cycle de vie d'un organisme

a naturellement tendance à se focaliser uniquement sur la phase infectieuse de ces parasites (Newton *et al.* 1997 ; Lebreton *et al.* 1999 ; Karaoglanidis *et al.* 2001), en négligeant par conséquent l'impact de la phase de survie. Cette dernière est pourtant une étape essentielle dans le cycle de vie des parasites, en particulier ceux évoluant dans les agrosystèmes car ils doivent faire face à l'absence prolongée de leurs plantes hôtes, parfois durant la majeure partie de l'année. Par conséquent, un génotype compétitif lors de la phase infectieuse (présentant par exemple un haut niveau d'agressivité) mais se transmettant mal d'une épidémie à l'autre pourrait alors avoir une fitness² globale considérablement réduite. Il apparaît donc également nécessaire de bien identifier les traits d'histoire de vie impliqués dans la transmission inter-épidémique des champignons et oomycètes phytopathogènes, et notamment leurs liens avec les traits d'histoire de vie liés à la phase intra-épidémique. Enfin on sait que la température est un des facteurs climatiques qui agit fortement sur les traits d'histoire de vie de ces parasites (Mizubuti & Fry 1998 ; Mboup *et al.* 2012) et qu'il peut exister une grande variabilité de réponse à ce facteur au sein des populations (Stefansson *et al.* 2013). Il est par conséquent probable que la température puisse également influencer la compétition au sein d'une population. Etudier la sensibilité à la température des isolats présents dans une population pourrait donc permettre de prédire l'évolution de la structure des populations en fonction du climat, ce qui paraît particulièrement opportun dans le contexte actuel de changement climatique (IPCC 2013).

C'est dans ce contexte scientifique que se positionne le présent travail de thèse. Il visait en effet à analyser les dynamiques invasives au sein des populations européennes de l'agent du mildiou de la pomme de terre *Phytophthora infestans*, en vue de prédire le caractère invasif des différents groupes génétiques présents ou émergents dans ces populations, les déterminants de ce caractère invasif et, à terme, leurs conséquences pour une gestion plus durable des stratégies de lutte.

2. Les principaux acquis et connaissances à mobiliser

Après avoir présenté les principaux traits d'histoire de vie des champignons et oomycètes phytopathogènes, je présenterai leurs interactions et en particulier les éventuels trade-offs

²Fitness : capacité d'un individu à se reproduire et survivre

ainsi que leurs conséquences sur la compétition entre isolats, avant de discuter de la modulation de ces traits de vie par la température. Je fournirai enfin les éléments clés justifiant le choix de conduire cette étude sur le couple Pomme de terre/*Phytophthora infestans*, avant d'explicitier rapidement les questions de recherche sous-jacentes à chacune des parties de la thèse.

2.1. Les traits d'histoire de vie des champignons et oomycètes parasites de cultures

L'histoire de vie d'un organisme est le récit des événements qui ponctuent son existence, ainsi que leur place dans le temps, de sa naissance à sa mort (Michalakis *et al.* 2010). Les traits d'histoire de vie se définissent alors comme des traits biologiques du cycle de vie de cet organisme, contribuant à sa reproduction et à sa survie (Roff 1992). Ces traits d'histoire de vie peuvent être physiologiques, morphologiques ou comportementaux, et leur variation va directement déterminer la valeur sélective (ou fitness) de l'organisme, à savoir sa performance en termes de contribution aux générations suivantes (Thomas *et al.* 2010).

Dans le cas des champignons et oomycètes phytopathogènes, les traits d'histoire de vie, ou traits de vie, seront notamment déterminants dans leurs capacités de colonisation, de dispersion, et de survie. De plus, ces parasites doivent également pouvoir survivre sur de longues périodes face à des conditions environnementales parfois très hostiles, notamment lorsque leur plante hôte est absente, ce qui est fréquent dans les agrosystèmes. Le cycle de vie des agents pathogènes présente donc typiquement une phase infectieuse, ou épidémique, lorsque l'hôte est présent, et une phase de survie correspondant à la phase inter-épidémique, lorsque l'hôte est absent. Je présenterai donc ici successivement les traits d'histoire de vie impliqués dans chacune de ces deux phases.

2.1.1. Traits d'histoire de vie liés à la phase infectieuse

La phase infectieuse des champignons et oomycètes phytopathogènes est l'étape durant laquelle ils colonisent leur hôte, puis se dispersent sur un nouvel hôte (**Figure 1**). Plusieurs

traits d'histoire de vie sont impliqués, à savoir le taux de germination, l'efficacité d'infection, la germination des spores, la période de latence, la taille des lésions (ou taux de croissance), la production de spores ainsi que la taille des spores.

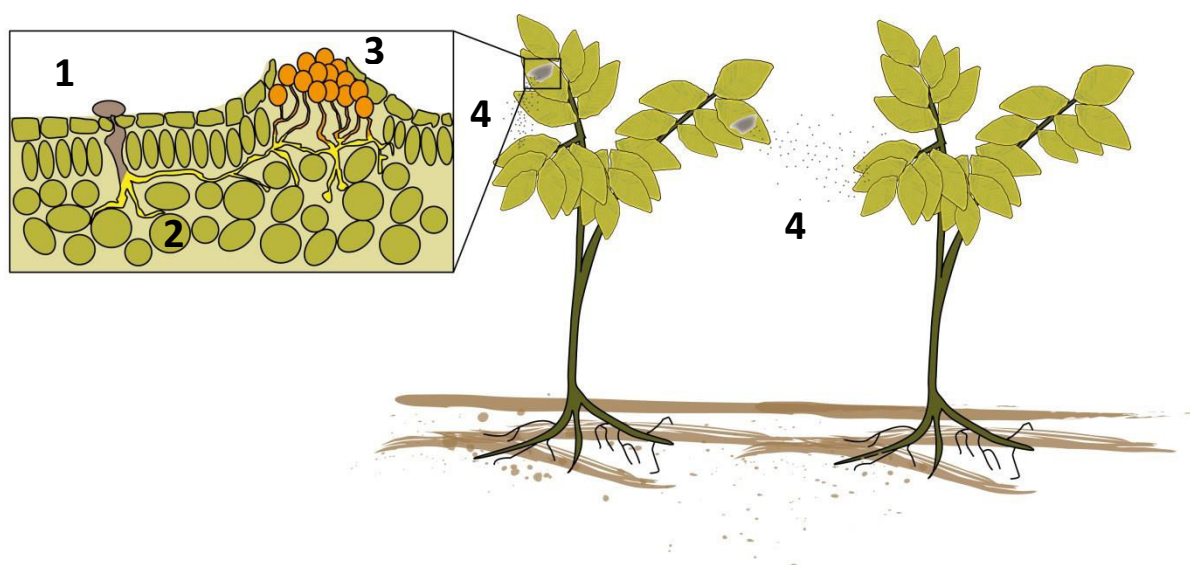


Figure 1. Etapes successives de la phase infectieuse des champignons et oomycètes phytopathogènes. **1** : Arrivée d'une spore sur l'hôte, germination et pénétration dans l'hôte ; **2** : Développement du mycélium dans l'hôte ; **3** : Le parasite donne naissance à des lésions sporulantes ; **4** : Les spores sont transportées vers d'autres hôtes (S. Martineau, d'après Hahn 2000).

Germination des spores

La germination d'une spore correspond à l'émission d'un tube germinatif, permettant ainsi la pénétration du parasite dans le tissu hôte lorsque l'interaction est compatible (Lepoivre 2003). Chez la grande majorité des champignons, cette étape obligatoire pour l'infection de l'hôte est réalisée à partir des réserves stockées dans la spore, c'est-à-dire sans substances nutritives externes ; ceci explique la faculté des spores à germer dans de l'eau ou des supports simples (Gottlieb 1950). La germination des spores est souvent accompagnée de la formation d'un appressorium, structure plus ou moins différenciée du tube germinatif qui adhère à la surface du tissu hôte et facilite ainsi la pénétration (Staples & Hoch 1997). Alors que chez les champignons, la germination des spores est uniquement directe (émission d'un

tube germinatif infectieux), elle peut également être indirecte chez les oomycètes. En effet, leurs spores, appelées sporanges, forment et libèrent des zoospores, qui sont des spores sans paroi mais munies de deux flagelles (Hardham & Hyde 1997). Les zoospores sont capables de se déplacer dans l'eau vers un hôte potentiel, et plus particulièrement vers les sites les plus propices à l'infection (Hardham 2007 ; Widmer 2009), attirées par chimiotactisme (Islam & Tahara 2001). Les zoospores s'enkystent alors (perte des flagelles et de la mobilité), émettent un tube germinatif et pénètrent dans les cellules hôtes. Par ailleurs, si beaucoup d'oomycètes tels que *Plasmopara viticola* ou *Pythium aphanidermatum* germent exclusivement, ou presque, de manière indirecte (Erwin & Ribeiro 1996 ; Al-Sheikh 2010), d'autres comme *Phytophthora ramorum*, *Phytophthora infestans* ou *Aphanomyces euteiches* peuvent germer directement (comme les champignons) ou bien indirectement (Widmer 2009 ; Erwin & Ribeiro 1996). Le taux de germination des spores, et le type de germination dans certains cas, sont donc deux traits d'histoire de vie essentiels pour un champignon ou oomycète, traits dont l'expression, parfois très affectée par les conditions environnementales, peut influencer sa capacité à coloniser son hôte (Barhoom & Sharon 2007).

Efficacité d'infection

L'efficacité d'infection correspond à la probabilité qu'un agent pathogène infecte son hôte lorsque l'interaction est compatible. Dans le cas des champignons et oomycètes phytopathogènes, elle se définit donc comme la probabilité qu'une spore déposée sur la surface d'un hôte sensible produise une lésion (Pariaud *et al.* 2009 ; Lannou 2012). Chez ces organismes, ce trait de vie est rarement étudié, car difficile à estimer avec précision. En effet, cette mesure nécessite idéalement la réalisation d'un nombre très important d'inoculations monosporangiales (Pernaci 2015).

Période de latence

La période de latence est l'intervalle de temps entre la contamination et l'apparition de la sporulation (Pariaud *et al.* 2009). Déterminant le nombre de générations au cours du cycle

infectieux des agents pathogènes polycycliques, la période de latence influence énormément la dynamique épidémique des agents pathogènes, ce qui en fait ainsi un paramètre capital pour l'estimation de leur potentiel invasif (Clément 2011). Cependant, à l'instar de l'efficacité d'infection, si la définition de la période de latence est simple lorsqu'elle est appliquée à une seule lésion, elle n'est pas forcément facile à estimer. En effet, les inoculations artificielles utilisées pour évaluer ce trait d'histoire de vie résultent souvent en un grand nombre d'infections par feuille, et la variation dans la période de latence entre ces infections n'est pas négligeable (Shaner 1980). Deux approches sont alors généralement utilisées pour estimer la période de latence: la première, qui consiste à estimer le temps au bout duquel la moitié des lésions auront sporulé (T50), a par exemple été utilisée chez *Puccinia triticina*, le champignon basidiomycète responsable de la rouille chez le blé (Pariaud *et al.* 2012); la seconde, à savoir une estimation du temps écoulé entre l'inoculation et la première sporulation, est notamment fréquemment utilisée chez l'oomycète *Phytophthora infestans* (e.g. Montarry *et al.* 2010a ; Lehtinen *et al.* 2009).

Taille des lésions/taux de croissance

La taille des lésions est généralement définie comme la surface sporulante de l'organe infecté (Robert *et al.* 2004), et indique donc la capacité de l'agent pathogène à coloniser le tissu hôte (Lannou 2012). La taille des lésions peut être relativement limitée pour certains champignons et oomycètes phytopathogènes, tels que *Puccinia triticina* (Pariaud *et al.* 2012), alors qu'à l'inverse, d'autres espèces causent de larges lésions comme c'est le cas pour *Puccinia striiformis* (Emge *et al.* 1975) ou *Phytophthora infestans* (Clément *et al.* 2010). Pour cette seconde catégorie de parasites, la taille des lésions est donc un trait de vie qui peut grandement influencer le développement des épidémies et représenter un facteur clé dans la compétition pour le tissu hôte disponible (Pariaud *et al.* 2009).

Si la taille des lésions est souvent utilisée, les phytopathologistes utilisent également le taux d'accroissement de la surface d'une lésion, considérée comme un proxy de la vitesse de croissance de l'agent pathogène. Celui-ci peut notamment être mesuré en divisant la taille des lésions par la durée écoulée depuis l'inoculation (Lehtinen *et al.* 2009) ou bien par la durée écoulée depuis le début de la sporulation (Clément *et al.* 2010). Cette seconde

méthode semble d'ailleurs plus cohérente, car c'est alors bien le taux de croissance de la lésion sporulante qui est estimé. De plus, il est possible depuis quelques années de quantifier ces parasites dans leurs hôtes à l'aide d'outils moléculaires tels les PCR quantitatives (Clément 2011 ; Lees *et al.* 2012). Ces outils sont de plus en plus fiables et se révèlent particulièrement intéressants pour quantifier différents isolats lors d'infections multiples (Clément *et al.* 2012), mais restent tout de même plus coûteux et moins rapides que les méthodes classiques fondées sur la simple observation de l'évolution des symptômes.

Production de spores/taux de sporulation

La production de spores d'un champignon ou oomycète phytopathogène représente le nombre de spores produites par unité de surface (Andrison *et al.* 2007) ou de fructification. L'aspect temporel peut également être pris en compte et la production de spores sera par exemple exprimée en nombre de spores produites par unité de surface et unité de temps (Sache 1997). En pratique, les spores sont soit pesées (Kardin & Groth 1989 ; Pariaud *et al.* 2012), soit dénombrées (Montarry *et al.* 2008 ; Delmotte *et al.* 2014). Il peut être également judicieux de prendre en compte la capacité de sporulation, à savoir la production de spores par unité de surface sporulante (Montarry *et al.* 2010a ; Pariaud *et al.* 2012), pour s'affranchir, au moins partiellement, des effets de densité-dépendance (Robert *et al.* 2004). Etant donné l'importance capitale des spores dans le cycle infectieux des champignons et oomycètes phytopathogènes (initiation de l'infection, propagation), la production de spores, qui peut atteindre des ordres de grandeur très importants, est un des traits d'histoire de vie les plus fréquemment regardés par les phytopathologistes (Hardham & Hyde 1997 ; Hovmøller *et al.* 2008 ; Lehtinen *et al.* 2009).

Taille des spores

Alors que les spores jouent un rôle crucial dans le cycle infectieux des champignons et oomycètes phytopathogènes, on porte peu d'attention à leur morphologie et en particulier à leur taille (Delmotte *et al.* 2014). La taille des spores pourrait pourtant influencer deux

étapes clés du cycle infectieux de ces pathogènes : la dispersion et la germination de l'inoculum.

D'une part, les spores permettent la dissémination par l'air ou par l'eau (le splashing permettant la dispersion de gouttelettes pouvant contenir des spores de nombreux ascomycètes ; *e.g.* Travadon *et al.* 2007) des champignons et oomycètes phytopathogènes, parfois sur des distances importantes (Aylor 2003). S'il est généralement admis que chez les plantes, la taille des propagules disséminées par l'air (pollen, graines) est négativement corrélée à la distance de dispersion (Willbur 1977 ; Sera 2008), cette relation est plus incertaine pour les spores produites par les champignons et oomycètes phytopathogènes. Des modèles de simulation ont d'ailleurs montré que toutes les spores d'un diamètre inférieur à 40 μm (ce qui est généralement le cas chez les champignons et oomycètes) avaient une dispersion similaire, dépendant uniquement des mouvements d'air (Kuparinen *et al.* 2007). Cependant, de récents travaux de Norros *et al.* (2014) tendent à prouver le contraire, leur modèle prédisant que la dispersion des spores de 1 à 10 μm de diamètre serait fortement influencée par leur taille.

D'autre part, comme on l'a vu précédemment, le cycle infectieux des champignons et oomycètes phytopathogènes est initié par la germination des spores. Lors de cette étape, l'agent pathogène utilise ses propres réserves nutritives et il est donc probable que, là aussi, la taille des spores puisse avoir son importance. En effet, on peut penser que des spores de plus grande taille pourraient contenir davantage de réserves nutritives et donc avoir un meilleur taux de germination, à l'instar de ce qui est observé pour les graines des plantes (Westoby *et al.* 1992 ; Sadeghi *et al.* 2011 ; Larios *et al.* 2014). De plus, comme l'ont montré Delmas *et al.* (2014) chez *Plasmopara viticola*, responsable du mildiou de la vigne, la taille des sporanges chez les oomycètes pourrait être corrélée avec le nombre de zoospores produites, les grands sporanges ayant ainsi une plus grande probabilité d'infecter l'hôte.

2.1.2. Traits d'histoire de vie liés à l'étape de survie

Lorsqu'ils ne sont plus sur ou dans leurs plantes hôtes, les champignons et oomycètes doivent survivre dans des environnements qui leur sont majoritairement défavorables. La

difficulté de la survie dépend donc de deux paramètres principaux : l'intervalle de temps séparant la présence locale de tissus hôtes (plante cultivée, repousse sensible, hôte alternatif ou alternant) et le niveau d'hostilité de l'environnement (Lucas 1998). Si pendant une épidémie, le temps mis par ces parasites pour passer d'un hôte à l'autre est généralement court, cela peut être très différent à d'autres moments de leur cycle de vie. En effet, de nombreux champignons et oomycètes phytopathogènes doivent faire face, de façon périodique, à l'absence totale ou partielle de leurs plantes hôtes. Cela augmente donc considérablement la durée pendant laquelle le parasite doit survivre avant de pouvoir infecter un nouvel hôte, ce qui est d'autant plus problématique que l'absence de l'hôte coïncide généralement avec des périodes où l'environnement est peu favorable aux parasites (sécheresse, forte humidité, températures extrêmes...). Aussi les champignons et oomycètes ont développé deux grands types de stratégies d'adaptation à la survie : les stratégies de survie active (parasitisme d'hôte alternatif ou survie saprophyte) et les stratégies de survie passive (structures de conservation ou repos végétatif) (**Figure 2**).

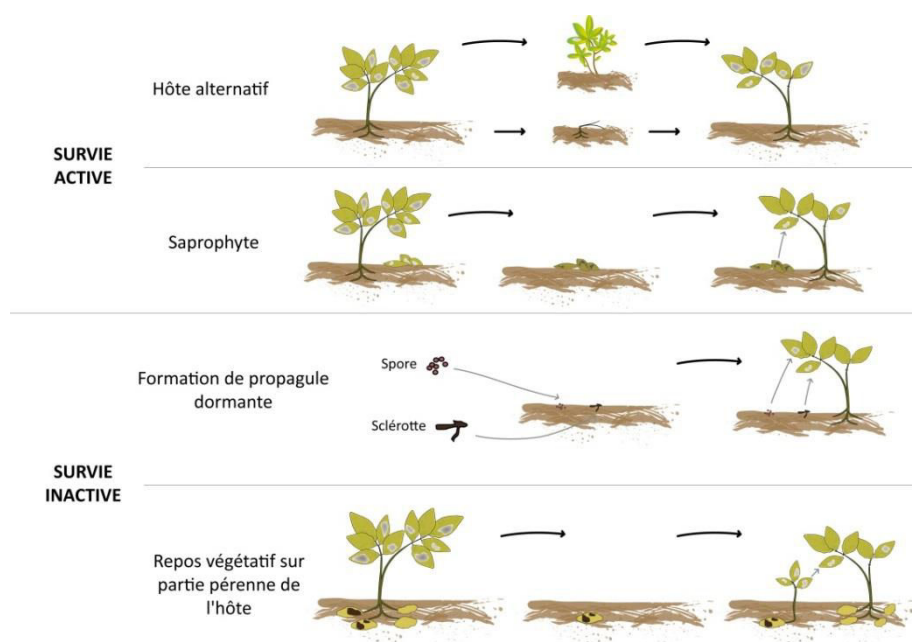


Figure 2. Stratégies de survie des champignons et oomycètes phytopathogènes lors de l'absence prolongée de leur hôte (S. Martineau).

Stratégies de survie active

La survie hors de l'hôte principal peut passer par l'infection d'hôtes alternatifs (Agrios 2005). En effet, certains parasites ont su tirer parti de la présence de plantes pérennes, naturelles ou cultivées, constituant pour eux un refuge. Par exemple, l'ascomycète *Exserohilum turcicum*, responsable de l'helminthosporiose du maïs, est également observé sur une plante pérenne, la canne à sucre roseau (*Saccharum arundinaceum*), notamment en l'absence de son hôte principal (Harlapur *et al.* 2007). L'agent de la rouille asiatique du soja, *Phakopsora pachyrhizi*, est aussi connu pour avoir de nombreux hôtes alternatifs tels que le trèfle (*Trifolium* sp) ou le lupin (*Lupinus* sp), lui permettant de survivre en l'absence de son hôte principal (Nunkumar *et al.* 2008). Une distinction doit être faite entre ces hôtes alternatifs et les hôtes qu'infectent les rouilles hétéroïques, alternativement à leur hôte principal, et qualifiés d'hôtes alternants. En effet, ces champignons ont des cycles de vie complexes, alternant une phase de multiplication asexuée sur leur hôte principal et une phase de reproduction sexuée sur leur hôte alternant. C'est par exemple le cas de *Melampsora larici-populina* qui se reproduit asexuellement sur le peuplier (*Populus* sp) et sexuellement sur le mélèze (*Larix* sp) (Gérard *et al.* 2006). Dans ce cas, l'hôte alternant sera donc requis pour boucler le cycle de vie complet du parasite, mais ne sera indispensable à la survie du parasite que dans les régions où les spores asexuées ne peuvent se maintenir durant l'hiver.

L'autre moyen actif de survivre à l'absence de leur hôte est de se nourrir de la matière organique morte, dans le sol ou les débris de plantes, c'est-à-dire sous forme saprophyte (Ravichandra 2013). C'est notamment le cas des parasites infectant les racines de plantes/cultures annuelles qui survivent saprophytiquement dans les débris de leurs hôte lorsque celui-ci meurt (naturellement ou à cause de la maladie), jusqu'à l'arrivée de nouvelles plantes. Parmi ces parasites, on trouve par exemple de nombreuses espèces de *Fusarium*, *Pythium* et *Rhizoctonia* parasites de graminées (Lucas 1998). En plus de devoir résister aux conditions climatiques parfois très défavorables, les parasites survivant de manière saprophyte sont aussi en compétition avec la microflore du sol.

Stratégies de survie passive

Les champignons et oomycètes sont aussi capables de former toute une variété de structures de conservation pouvant résister à des conditions environnementales extrêmes, souvent pendant de longues périodes (Lucas 1998). Ces structures peuvent être des spores résistantes comme les chlamydospores produites par certains ascomycètes et basidiomycètes (Agrios 2005), les oospores chez les Oomycètes (Drenth *et al.* 1995), ou encore les téliospores des Pucciniomycetes (Milus *et al.* 2006). Pour d'autres, il s'agit de fructifications résistantes contenant les spores telles que les cleistothèces, perithèces ou les pseudothèces, ces dernières renfermant les ascospores chez de nombreux Ascomycètes comme *Leptosphaeria maculans* (Williams 1992). Enfin, il peut aussi s'agir de structures résistantes sans spores comme les sclérotés chez de nombreux genres d'Ascomycètes (*Botrytis*, *Sclerotinia*, etc.) et de Basidiomycètes (*Rhizoctonia*) (Ryley *et al.* 2004). Les sclérotés sont des structures dans lesquelles l'hyphe végétatif devient agrégé et déshydraté (Ayers & Adams 1979). Les structures de survie des champignons et oomycètes sont généralement caractérisées par une période de dormance durant laquelle il leur est impossible de germer, la germination sera ensuite stimulée par des facteurs externes, en particulier par les exsudats racinaires de leurs plantes hôtes (Lucas 1998). Certaines de ces structures de survie peuvent ainsi germer plusieurs années après leur formation, par exemple jusqu'à 15 ans dans le cas des chlamydospores de certains *Fusarium* ou pour les sclérotés des *Verticillium* (Ravichandra 2013).

Certains parasites peuvent également survivre dans un état de repos végétatif au sein des tissus pérennes de leurs plantes hôtes, dont ils pourront réinfecter les parties nouvellement formées lors de la saison suivante (Lucas 1998). Si certains survivent notamment dans les racines ou les tiges de leurs plantes-hôtes, d'autres peuvent se maintenir dans leurs tubercules, à l'image d'*Alternaria solani*, responsable de l'alternariose chez la pomme de terre (Jones 1991). Les parasites d'arbres pérennes à feuillage caduque peuvent, quant à eux, survivre au sein de l'écorce ou des bourgeons dormants de leurs hôtes comme c'est le cas de *Taphrina deformans*, responsable de la cloque du pêcher (Ravichandra 2013 ; Rossi *et al.* 2006). D'autre part, la survie des champignons et oomycètes peut également se faire *via* les graines de leurs plante-hôtes, que ce soit à l'extérieur de celles-ci

comme pour *Pyrenophora graminea* ou bien à l'intérieur (sous forme de mycélium) comme *Rhynchosporium secalis*, tous deux parasites de l'orge (Mathre 1997), et ainsi se transmettre verticalement à la descendance de leurs plante-hôtes.

2.2. Evolution des traits d'histoire de vie

2.2.1. Compétition et fitness

Au sein d'une population, la contribution des individus aux générations ultérieures définit la fitness (Thomas *et al.* 2010). La fitness, aussi appelée valeur sélective, est donc directement déterminée par les traits d'histoire de vie impliqués dans la survie et le succès reproducteur des individus (Day & Otto 2001). Chez les champignons et oomycètes phytopathogènes, on estime généralement que les individus les plus performants lors du cycle infectieux auraient une grande fitness. En effet, pour ces parasites, avoir par exemple de grandes capacités de sporulation ou des taux de croissance élevés devrait permettre d'être plus compétitif, et donc d'avoir un plus grand succès reproductif (Day & Shattock 1997). D'ailleurs, plusieurs exemples chez des parasites importants de cultures suggèrent que les isolats les plus agressifs, c'est-à-dire ceux induisant le plus de quantité de maladie sur un hôte sensible (Andrison 1993), seraient plus compétitifs que leur congénères et présenteraient donc des niveaux de fitness supérieurs (Miller *et al.* 1998 ; Hovmøller *et al.* 2008). Par conséquent, on peut supposer que si les isolats les plus performants lors de la phase infectieuse ont les plus hauts niveaux de fitness, on devrait assister à une augmentation, au cours du temps, de la valeur des traits d'histoire de vie liés à la phase infectieuse (Andrison *et al.* 2007 ; Suffert *et al.* 2015).

Cependant, l'agressivité est fortement liée à la transmission du parasite. L'augmentation de la fitness du parasite due à la maximisation de la transmission est rapidement balancée par la disparition de l'hôte. L'agressivité doit donc être contrebalancée pour ne pas augmenter sans limite et se stabiliser autour d'une valeur intermédiaire : c'est le modèle du trade-off entre agressivité et transmission (Anderson & May 1982 ; Frank 1996 ; Ebert & Bull 2003 ; Alizon *et al.* 2009) schématisé sur la **Figure 3**. Cette relation entre agressivité et transmission a été confirmée dans plusieurs systèmes hôtes-parasites (Lipsitch

& Moxon 1997). Toutefois, elle n'est pas généralisable à toutes les associations hôtes-parasites (Ebert & Bull 2003). Par exemple, dans les cas où la transmission a eu lieu avant la mort de l'hôte, la contrainte est relâchée, et l'agressivité peut augmenter (Ebert & Weisser, 1997).

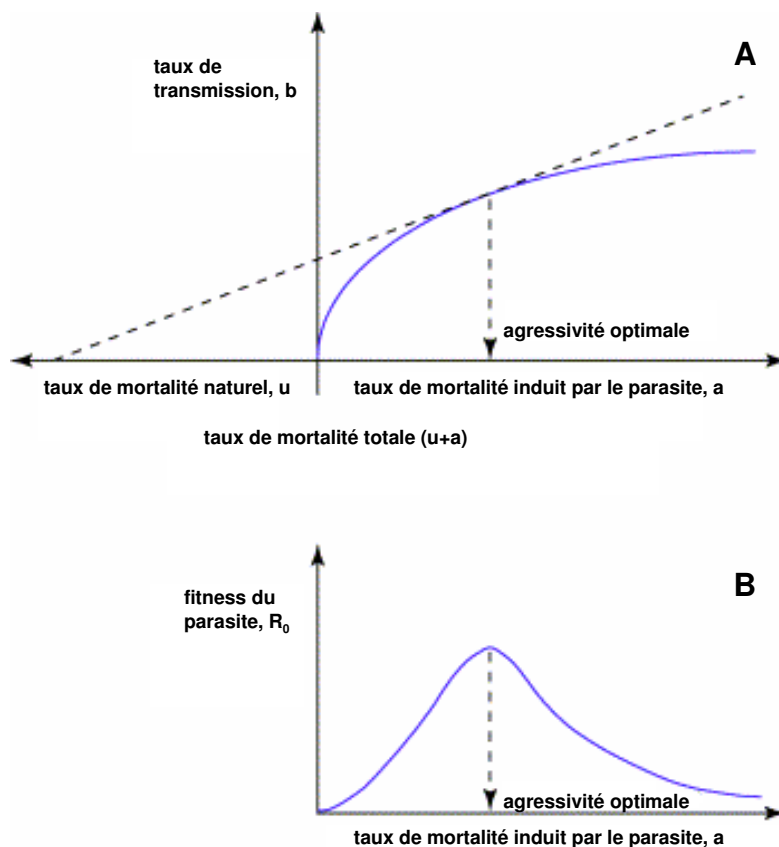


Figure 3 : Modèle du trade-off entre agressivité et transmission. D'après Ebert & Bull (2003). A : Le modèle suppose une relation décélérante entre le taux de transmission b et la mortalité induite par le parasite a .

B : Comme la mort prématurée de l'hôte réduit la transmission du parasite, l'efficacité de transmission cumulée R_0 (le nombre total d'infections secondaires produites à partir d'une infection primaire dans une population hôte sensible) d'un parasite est maximale aux niveaux intermédiaires de a .

Ce modèle s'écrit $R_0 = b/(u+a)$, où u est le taux de mortalité de l'hôte indépendant du parasite.

2.2.2. Trade-off entre traits d'histoire de vie conditionnant la phase infectieuse

L'évolution des traits d'histoire de vie est cependant conditionnée par différentes contraintes qui réduisent la gamme des valeurs possibles qu'ils peuvent prendre (Michalakis *et al.* 2010). En particulier, il existe des contraintes physiologiques lors du partage inévitable des ressources dont dispose un organisme, l'énergie allouée à une fonction étant indisponible pour d'autres (Stearns 1992). L'organisme doit ainsi faire face à des « dilemmes » dans l'allocation des ressources, qui peuvent alors conduire à des trade-offs (ou compromis) entre deux traits : tout changement bénéfique pour un trait se fera alors au détriment de l'autre (Stearns 1989; Anderson and May 1982). En empêchant l'évolution simultanée de tous les traits d'histoire de vie vers des valeurs maximales (Law 1979 ; Hall *et al.* 2010), les trade-offs favoriseraient leur variabilité au sein des populations (Héraudet *et al.* 2008). Par conséquent, les trade-offs joueraient un rôle majeur dans l'adaptation des populations car ils permettraient l'émergence de différentes stratégies d'histoire de vie (Rausher 1984; Roff 1992).

Parmi les trade-offs ayant reçu le plus d'attention dans la littérature, on retrouve notamment ceux entre reproduction et survie, taille corporelle et durée de développement ou encore entre quantité et qualité des descendants (Begon *et al.* 2006). Ce dernier avait été initialement observé chez les oiseaux (Lack 1947) avant d'être généralisé à d'autres espèces animales (Charnov & Ernest 2006 ; Walker *et al.* 2008) et végétales (Werner & Platt 1976). Chez les champignons et oomycètes phytopathogènes, des trade-offs entre traits d'histoire de vie ont aussi été démontrés, en particulier ceux liés à la phase épidémique. De nombreuses études se sont notamment focalisées sur les « coûts » de virulence chez ces parasites, c'est à dire une réduction de la fitness induite par une mutation de l'avirulence vers la virulence comme défini dans le contexte du modèle gène-pour-gène (Flor 1971). Par exemple, chez le basidiomycete *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, responsable de la rouille jaune du blé, les isolats virulents produisent moins de descendants (urediospores) sur un hôte sensible que ne le font des isolats avirulents (Bahri *et al.* 2009). Une observation analogue a également été faite chez *P. infestans* (Montarry *et al.* 2010a). Outre ces coûts de virulence, des trade-offs ont également été observés entre des traits d'histoire de vie liés à la phase infectieuse par exemple entre la période de latence et la production de spores chez

Puccinia triticina (Pariaud *et al.* 2013) ou bien entre la période de latence et la transmission de spores chez *Hyaloperonospora parasitica*, un oomycete qui infecte *Arabidopsis thaliana* (Héraudet *et al.* 2008). Cependant, alors que la relation négative entre le nombre et la taille de descendants est un exemple classique de trade-off reportée chez les espèces animales et végétales, elle n'est que très peu connue chez les champignons et oomycètes phytoparasites. En effet, à notre connaissance, le seul exemple est celui de l'oomycete *Plasmopara viticola*, responsable du mildiou de la vigne, chez qui l'augmentation de la production de sporanges est corrélée avec une réduction de la taille de ceux-ci (Delmas *et al.* 2014; Delmotte *et al.* 2014).

2.2.3. Trade-off entre agressivité et survie

On se focalise souvent sur la phase infectieuse des champignons et oomycètes pour expliquer leur succès évolutif, alors que la phase de survie est également importante. En effet, les isolats les plus performants pendant la phase épidémique pourraient avoir des aptitudes réduites lors de la phase de survie, ce qui limiterait ainsi leur fitness globale. Carson (1998) avait notamment observé que chez un parasite du maïs, *Cochliobolus heterostrophus*, les isolats agressifs (*i.e.* causant de grandes lésions) survivaient mal pendant l'hiver sur les feuilles de leurs hôtes tombées au sol, comparés aux isolats moins agressifs. L'auteur avait ainsi supposé que l'aptitude à la survie saprophyte était une force sélective dans les populations de ce parasite qui pouvait, en partie, expliquer le maintien d'isolats peu agressifs. Par ailleurs, on peut supposer que la pression de sélection imposée par la phase de survie sur les isolats agressifs pourrait être encore plus forte chez des champignons ou oomycètes parasitant le feuillage de leurs hôtes et survivant au sein de leurs parties pérennes. D'une part, les isolats agressifs pourraient limiter la formation des parties pérennes de leurs hôtes et d'autre part, le développement de ces isolats à l'intérieur de ces parties pérennes pourrait limiter la formation de nouveaux tissus indispensable à la transmission du parasite. On peut supposer l'existence de trade-offs similaires entre agressivité et survie pour des parasites se transmettant *via* les tubercules de leurs hôtes, tels que *Alternaria solani* ou *Phytophthora infestans* chez la pomme de terre. En effet, la transmission de ces parasites entre deux épidémies requiert trois événements successifs : (1)

l'infection des tubercules-fils par les spores produites sur le feuillage de la plante-hôte ; (2) la survie des tubercules infectés ; enfin (3) l'émergence de tiges/repousses infectées. On peut donc faire l'hypothèse que les isolats très agressifs sur feuillage limitent le nombre et la taille des tubercules produits par leur plante-hôte, et que ces tubercules seront alors plus sévèrement attaqués (en raison de la grande quantité d'inoculum présent sur le feuillage et tombant ensuite sur les tubercules) (**Figure 4**). Par conséquent, les probabilités de survie de ces petits tubercules très attaqués seraient fortement limitées, réduisant donc le nombre de tiges produites par ces derniers, et par conséquent la transmission hivernale du parasite (**Figure 4**).

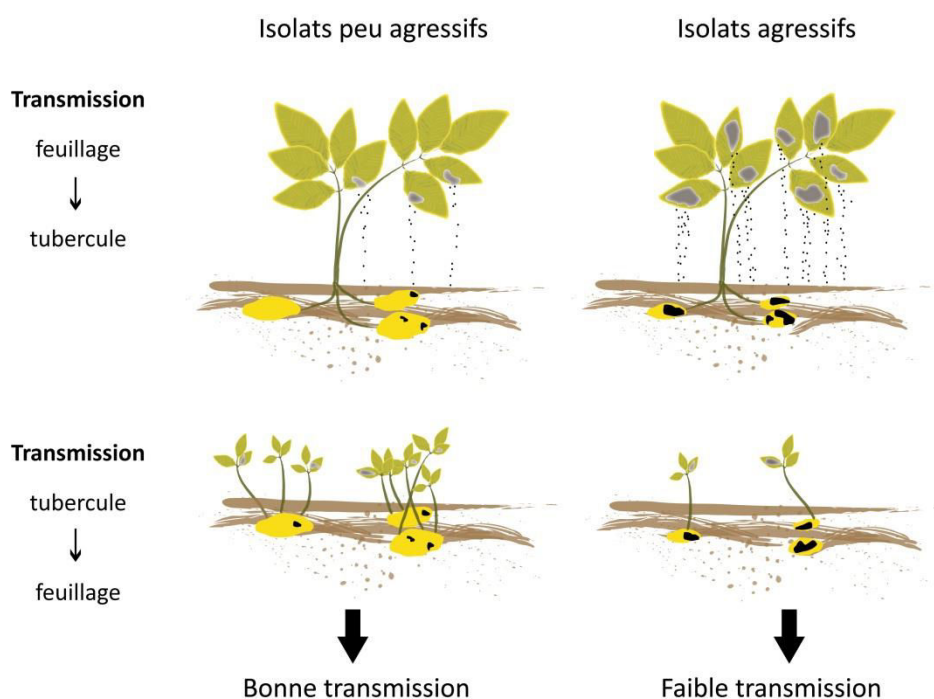


Figure 4. Conséquences hypothétiques du niveau d'agressivité foliaire sur la transmission du feuillage au tubercule et du tubercule au feuillage chez des champignons et oomycètes parasites d'espèces tubéreuses dont la survie inter-épidémique est permise grâce aux tubercules de leurs hôtes (S. Martineau)

L'existence d'un trade-off entre agressivité et survie inter-épidémique signifierait donc que chez de tels parasites, les populations seraient soumises à des pressions sélectives

de direction opposée (sélection balancée) pour l'agressivité au cours de l'année. En effet, alors que les isolats agressifs seraient favorisés lors de la phase épidémique, ils seraient en revanche contre-sélectionnés lors de la phase de survie. Un tel trade-off pourrait donc se traduire par une certaine stabilité de l'agressivité au cours du temps et non une augmentation continue de ce trait. En outre, de récents travaux théoriques basés sur l'hypothèse de ce trade-off prédisent que l'absence périodique de l'hôte pourrait générer la coexistence au sein des mêmes populations d'isolats possédant différentes stratégies d'histoire de vie (Hamelin *et al.* 2011 ; Castel *et al.* 2014). D'après ces modèles, à la fois des isolats agressifs, qui allouent leurs ressources dans la transmission intra-épidémique, et des isolats moins agressifs, investissant dans la transmission inter-épidémique, pourraient coexister au sein d'une même population. Toujours d'après ces modèles, les fréquences relatives de ces deux morphes pourraient varier au cours du temps : les isolats les moins agressifs devraient être prédominants au début des épidémies, en raison de leur bon niveau de transmission inter-épidémique, mais ils devraient ensuite diminuer au profit des isolats agressifs qui possèdent une meilleure fitness épidémique.

2.3. Modulation de l'expression des traits de vie par la température

2.3.1. Impact de la température sur les traits d'histoire de vie

La température est l'un des facteurs abiotiques qui affecte le plus les processus physiologiques impliqués dans le développement des organismes vivants (Campbell & Norman 1998). Chaque espèce peut tolérer une gamme limitée de températures, appelée zone de tolérance thermique, qui est généralement corrélée à l'environnement thermique dans lequel elle évolue (Chown & Terblanche 2007 ; Clusella-Trullas *et al.* 2011). A l'intérieur de cette zone de tolérance thermique, les performances d'une espèce augmentent généralement à mesure que les températures s'élèvent, jusqu'à devenir maximales à une température qualifiée d'optimale pour l'espèce, puis diminuent rapidement lorsque les températures s'élèvent encore (**Figure 5**; Angilletta 2009 ; Schulte *et al.* 2011). Cette sensibilité asymétrique à la température est classiquement observée tant au niveau de l'organisme entier (*e.g.* fécondité, croissance) que pour les niveaux physiologiques et

biochimiques sous-jacents (e.g. activité enzymatique) (Hochachka & Somero 2002 ; Angilletta 2009 ; Schulte *et al.* 2011).

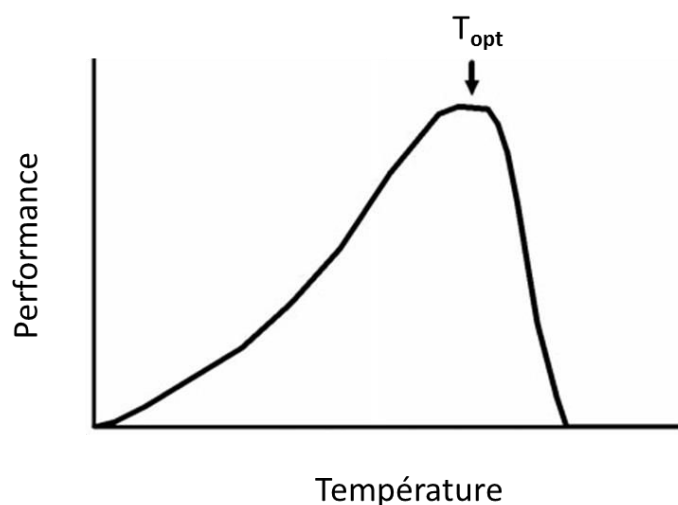


Figure 5. Hypothétique courbe de réponse à la température. La température à laquelle la performance est maximale est nommée température optimale (T_{opt}). Les points auxquels la performance est nulle correspondent aux températures critiques (minimale et maximale). D'après Schulte *et al.* 2011.

La plupart des champignons et oomycètes parasites de plantes sont des organismes mésophiles avec des températures optimales généralement autour de 20°C (Peetz *et al.* 2009 ; Orozco-Avitia *et al.* 2013). Il existe néanmoins des exceptions comme le basidiomycète *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici* dont le développement est favorisé par des températures plus faibles, avec un optimum thermique situé autour de 10-15°C (Mboup *et al.* 2012). La sensibilité asymétrique à la température est observée pour de nombreux traits d'histoire de vie de la phase infectieuse des parasites, en particulier la période de latence, la croissance et la sporulation dont les exemples sont nombreux. Ainsi, les ascomycètes *Zymoseptoria tritici* et *Botrytis cinerea* ont des périodes de latence qui se réduisent à mesure que les températures augmentent, jusqu'à des valeurs minimales atteintes autour de 18-20°C, puis elles s'allongent rapidement lorsque les températures s'élèvent davantage (Sosa-Alvarez *et al.* 1995 ; Bernard *et al.* 2013). De même, *Alternaria alternata* et *Rhizoctonia solani*, deux champignons pathogènes (entre autres) de la pomme de terre, ont des croissances qui sont maximales lorsque les températures sont comprises entre 25 et 30°C

mais ne se développent presque plus une fois exposés à des températures supérieures à 35°C (Hubballi *et al.* 2010 ; Orozco-Avitia *et al.* 2013). Enfin, la sporulation de l'agent responsable de l'oïdium notamment chez la fraise ou la mûre, *Podosphaera macularis*, illustre parfaitement la réponse classique à la température : très faible à 5°C, elle atteint son niveau maximal à 25°C mais chute rapidement au-delà de cet optimum thermique puisque dès 30°C, son niveau est équivalent à celui enregistré à 5°C et qu'à 35°C la sporulation est quasi-nulle (Peetz *et al.* 2009).

La germination des spores est également très influencée par la température. A l'instar de la sporulation ou du taux de croissance, le taux de germination des champignons est généralement limité aux faibles températures, atteint un niveau maximal à une température intermédiaire puis diminue rapidement au-delà, comme c'est le cas chez *Puccinia hemerocallidis* (Mueller & Buck 2003) ou *Colletotrichum gloeosporioides* (Hartung *et al.* 1981). Par ailleurs, pour les oomycètes capables de germination directe et indirecte (cf §2.1.1), la température conditionne directement le type de germination. En effet, chez des espèces comme *P. infestans*, l'exposition des sporanges à de faibles températures (*i.e.* inférieures à 15°C) entraîne une germination indirecte, alors qu'à des températures plus élevées, la germination sera très majoritairement directe (Harrisson 1992 ; Mizubuti & Fry 1998 ; Danies *et al.* 2013). De plus, la mobilité des zoospores des oomycètes est aussi très influencée par la température, avec des déplacements généralement limités à mesure que les températures augmentent (Ho & Hickman 1967 ; Sato 1979; Carlile 1986). L'effet néfaste des hautes températures sur les zoospores des oomycètes pourrait donc expliquer pourquoi la germination directe chez *P. infestans* est majoritaire aux hautes températures, malgré les avantages procurés par les zoospores en termes de pouvoir infectieux.

Si les effets de la température sur des traits d'histoire de vie tels que la germination ou la sporulation sont bien connus chez les champignons et oomycètes, l'influence de ce facteur sur la taille des spores n'a, en revanche, pas été étudiée. On sait pourtant que la température peut énormément influencer la taille des organismes. Bergmann (1847; cité dans James 1970) avait ainsi prédit que chez les endothermes, les individus devaient être moins grands dans des environnements chauds que dans des environnements froids afin de maximiser leur rapport surface/volume et donc favoriser les pertes de chaleur. Si ces

prédictions ont été confirmées pour de nombreux endothermes, notamment les mammifères (Ashton *et al.* 2000) ou les oiseaux (Ashton 2002), il semble que les organismes ectothermes suivent eux aussi une règle similaire en ayant une plus petite taille corporelle adulte dans des environnements plus chauds (Angilletta 2009 ; Ohlberger 2013). Cette plasticité, observée aux échelles intra- et inter-spécifique, est connue sous le terme de règle taille-température (“temperature-size rule” ; Atkinson 1994), et suggère donc que les arguments thermodynamiques avancés par Bergmann ne seraient probablement pas les seuls à conduire à une réduction de la taille corporelle en environnement chaud (Edeline *et al.* 2013). Dès lors, cela laisse supposer qu’on pourrait aussi observer cette règle pour les spores produites par microorganismes, avec des tailles plus réduites aux températures élevées. De plus, chez certains oomycètes tels que *P. infestans*, les sporanges pourraient être de grande taille pour une autre raison : favoriser la zoosporogénèse. En effet, étant donné que chez cette espèce, la zoosporogénèse n’a lieu qu’en dessous de 15°C, des sporanges de grande taille produits aux faibles températures devraient permettre la formation d’un plus grand nombre de ces spores mobiles (Delmas *et al.* 2014).

2.3.2. Impact de la température dans la compétition intra-spécifique

Si chaque espèce possède ses propres exigences écologiques, il existe cependant une variabilité dans la réponse à la température au sein d’une espèce, et même entre les isolats d’une même population (Milus *et al.* 2006). De fait, cette variabilité peut impacter la compétition. Des différences dans les exigences thermiques ont notamment été l’un des facteurs avancés pour expliquer le remplacement de la lignée clonale US-1 par les lignées clonales US-7 et US-8 dans les populations américaines de *P. infestans* dans les années 1990 : germination plus rapide à des températures inférieures à 15°C pour les sporanges des isolats US-7 et US-8 par rapport aux isolats US-1 (Mizubuti & Fry 1998) ; meilleure tolérance aux faibles températures pour les isolats US-8 comparés aux isolats US-1 (Kirk 2003). De même, les changements de populations observés au sein des populations américaines de *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* dans les années 2000 ont, en partie, été attribués à des meilleures performances aux hautes températures pour les isolats des nouvelles populations (Milus *et al.* 2006). Ces exemples montrent la nécessité de connaître la sensibilité à la

température des isolats présents au sein d'une population afin de pouvoir prédire l'impact de variations thermiques sur la dynamique des populations (Lavergne *et al.* 2010). Cela s'avère d'autant plus important dans le contexte actuel de changement climatique. Les derniers travaux du Groupe d'experts Intergouvernemental sur l'Évolution du Climat (GIEC) prédisent en effet une augmentation de la température moyenne à la surface du globe d'au moins 2°C d'ici à la fin du siècle (IPCC 2013), ce qui pourrait favoriser les génotypes/isolats plus performants aux hautes températures (Hoffmann & Sgrò 2011).

Face à l'augmentation des températures, les populations locales devront aussi (et doivent déjà) faire face aux isolats/génotypes provenant de régions plus chaudes et donc potentiellement pré-adaptés à des températures plus élevées (Hickling *et al.* 2006 ; Bebber *et al.* 2013). Pour évaluer le risque d'un tel scénario, il est nécessaire de savoir à quel point les différentes populations au sein d'une espèce sont adaptées localement à leurs climats respectifs (Mitchell & Lampert 2000). L'adaptation locale se produit en réponse à des pressions de sélection hétérogènes, résultant en une plus grande fitness relative des populations dans leurs environnements locaux que dans d'autres environnements (DeWitt & Scheiner 2004). L'existence de patrons d'adaptation locale est généralement testée par des expériences de transplantation entre les environnements des populations d'agents pathogènes (Blanquart *et al.* 2013) : on utilise alors soit le critère « Home vs. Away », qui consiste à comparer la performance d'une population dans son environnement d'origine et dans d'autres environnements, ou bien le critère « Local vs. Foreign », où on compare cette fois la performance d'une population dans son environnement d'origine à celle de populations provenant d'autres environnements (**Figure 6** ; Kawecki & Ebert 2004). Les parasites des grandes cultures constituent de bons modèles d'étude pour tester l'adaptation locale à la température, en raison de leur distribution dans des agrosystèmes aux climats variés (Stefansson *et al.* 2013). Différents patrons d'adaptation locale à la température ont ainsi été observés pour les populations de *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* présentes dans le nord et le sud de la France (Mboup *et al.* 2012), ou de *Rhynchosporium commune* provenant de climats contrastés (Stefansson *et al.* 2013). Cependant, dans la plupart de ces études, l'adaptation locale à la température résulte d'une différenciation génétique des isolats selon les zones climatiques (Zhan & McDonald 2011). Nous ne connaissons pas d'exemple d'adaptation locale à la température au sein d'une même lignée clonale chez des

champignons ou oomycètes phytopathogènes, alors que beaucoup d'entre eux se reproduisent pourtant principalement de manière asexuée.

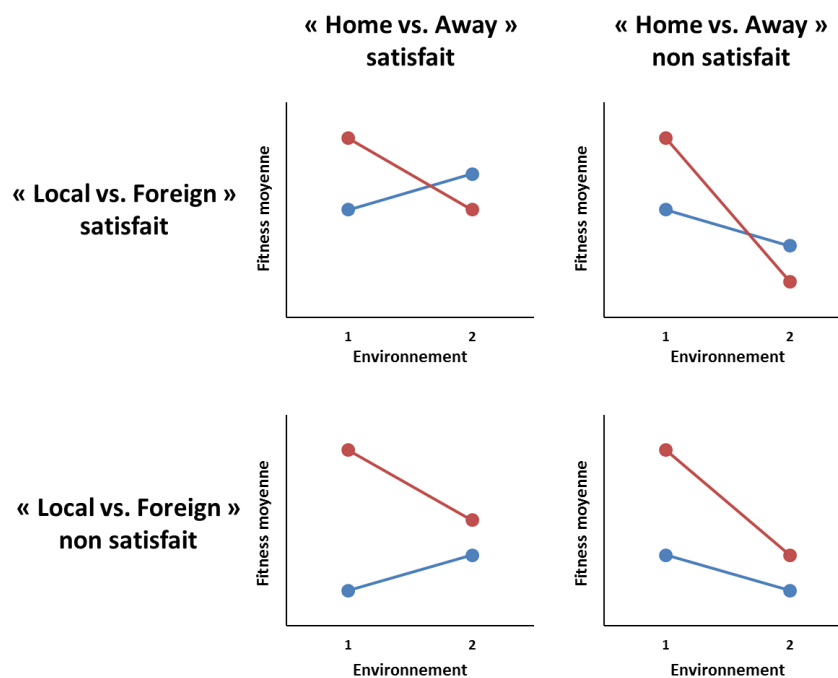


Figure 6. Patrons hypothétiques d’une interaction entre populations et environnement. Les points rouges représentent la fitness de la population provenant de l’environnement 1 ; les points bleus représentent la fitness de la population provenant de l’environnement 2. (R. Mabon, d’après Kawecki & Ebert 2004).

3. Un cas d’étude : le pathosystème *P. infestans* – pomme de terre

3.1. La pomme de terre : une culture importante

La pomme de terre (*Solanum tuberosum*) est une espèce tubéreuse à multiplication végétative de la famille des Solanacées (Spire & Rousselle 1996). Cette plante a un cycle de développement qui comprend trois phases principales : croissance, tubérisation, repos végétatif (**Figure 7**). La première consiste en la croissance des germes du tubercule (présent dans le sol) qui se transforment soit en tiges feuillées dans la partie aérienne, soit en stolons dans la partie souterraine (Madec 1966). L’arrêt de l’élargissement des stolons marque le début de la phase de tubérisation. Les tubercules se forment alors à l’extrémité des stolons et vont ensuite grossir en emmagasinant des substances de réserve produites à partir des

métabolites synthétisés par la plante au niveau du feuillage (Jolivet 1969). A la sénescence de la plante (dessèchement total du système aérien), les tubercules arrêtent de grossir, deviennent matures et rentrent en repos végétatif. Pendant cette période qui dure généralement plusieurs semaines, les tubercules sont incapables de germer, même lorsqu'ils sont placés dans des conditions favorables de température et d'humidité. A la fin du repos végétatif, s'il n'y a pas de dormance induite par les conditions du milieu, les tubercules peuvent alors germer, ce qui marque le début d'un nouveau cycle (Jolivet 1969).

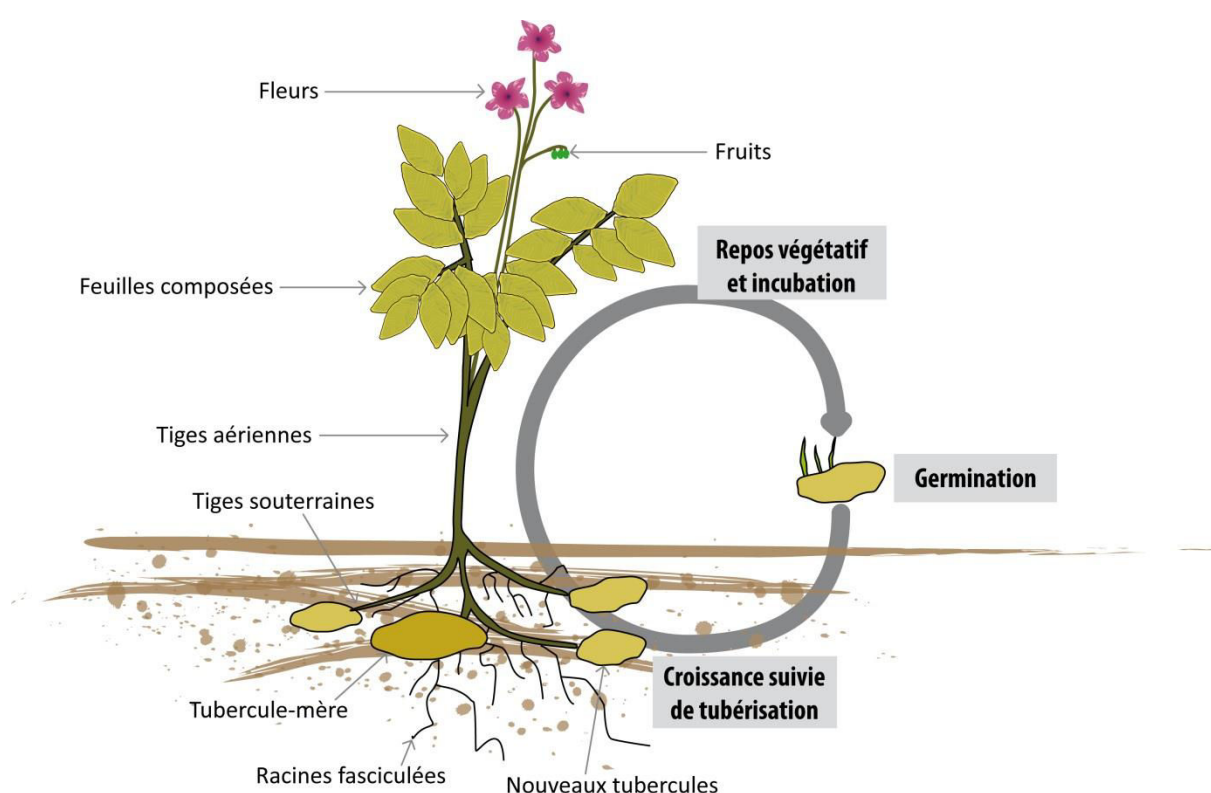


Figure 7. Cycle végétatif de la pomme de terre (S. Martineau, d'après Soltner 1999).

La pomme de terre est originaire de la Cordillère des Andes, dans le Sud-Ouest de l'Amérique du Sud, où elle est cultivée pour ses tubercules très riches en glucides depuis au moins 8000 ans (Spire & Rousselle 1996). Elle fut introduite en Europe au milieu du XVI^{ème} siècle par les conquistadors espagnols, mais il fallut néanmoins attendre près de deux siècles pour qu'un véritable engouement accompagne son développement dans la plupart des pays

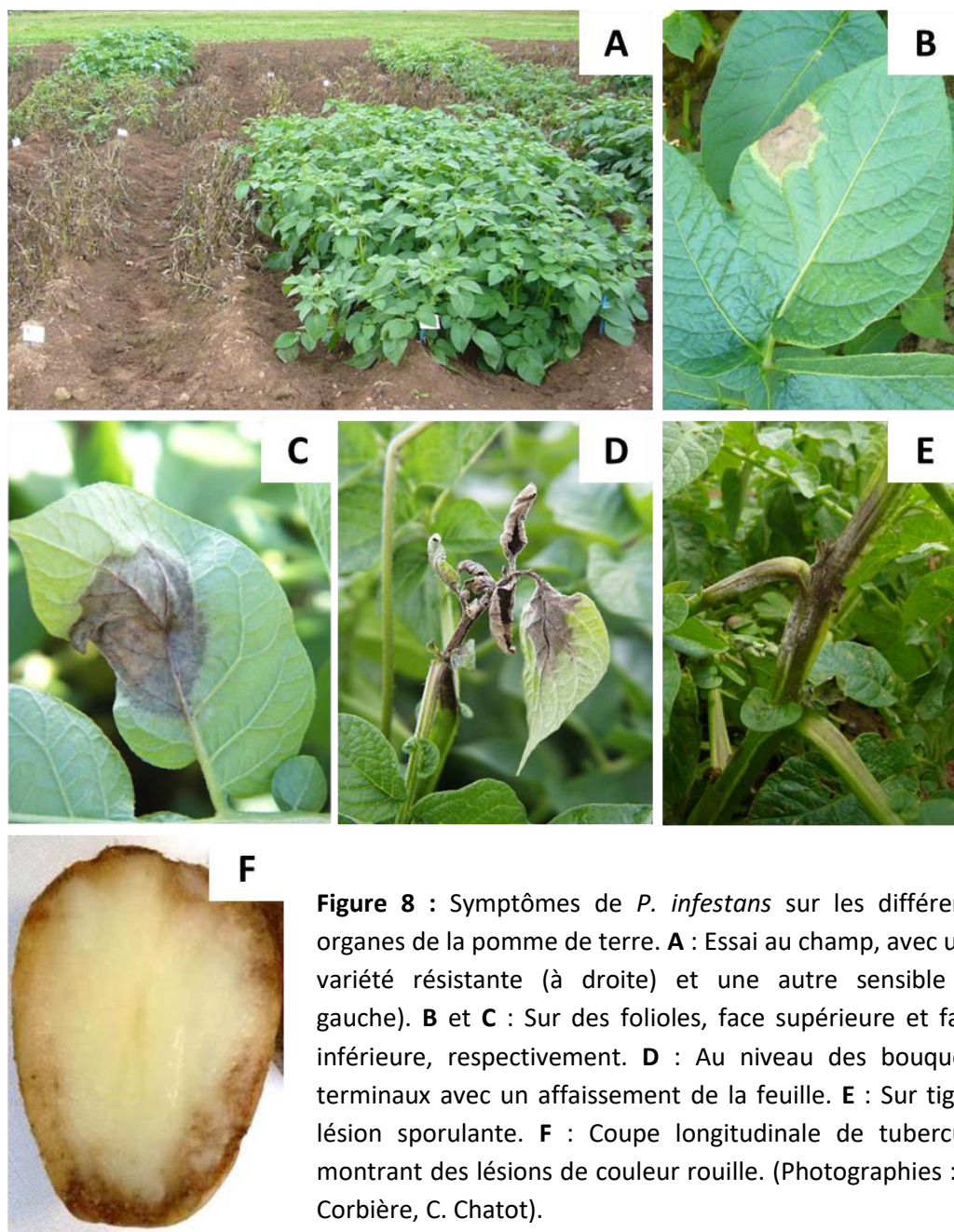
européens. En France, sa démocratisation a été notamment permise grâce aux efforts d'Antoine-Augustin Parmentier, précurseur de la filière pomme de terre, de la production à la consommation (Spire & Rousselle 1996). Par la suite, l'implantation de la pomme de terre n'a fait que progresser en Europe et dans le monde entier, et elle est aujourd'hui cultivée dans plus de 150 pays.

Il existe aujourd'hui trois grands types de production de pomme de terre (consommation, féculière et plant) pour diverses utilisations, principalement alimentaires. La pomme de terre de consommation (primeurs et conservation) est destinée au marché du frais ou aux industries alimentaires (frites, chips, flocons). A noter que si la grande majorité des pommes de terre de consommation est produite pour l'alimentation humaine, une autre est cependant destinée à l'alimentation animale. La pomme de terre féculière est destinée à la transformation industrielle en fécule dont les propriétés gélifiantes permettent de multiples applications (chimie, pharmacie, biocarburants, cosmétique, papeterie, additifs alimentaires...). Enfin, la pomme de terre de plant permet de disposer des semences pour les plantations suivantes. Avec environ 375 millions de tonnes produites chaque année, la pomme de terre occupe le cinquième rang des productions agricoles au niveau mondial derrière la canne à sucre, le maïs, le riz et le blé (données 2013, FAOSTAT). A elle seule, l'Europe concentre plus de 30% de la production mondiale, et six pays européens font notamment partie des dix plus grands producteurs mondiaux. Classée au 8^{ème} rang de ce classement, la France produit chaque année près de 7 millions de tonnes de pommes de terre sur une surface d'environ 160 000 hectares (données 2013, FAOSTAT) et est le premier exportateur mondial de pommes de terre de consommation devant l'Allemagne.

3.2. Le mildiou, une maladie dévastatrice et difficile à contrôler

Le mildiou, causé par l'oomycète *Phytophthora infestans*, est une des plus sérieuses menaces pour la production de pomme de terre (Kamoun *et al.* 2015). Cette maladie peut toucher la plupart des organes de la plante (jeunes pousses, feuilles et pétioles, bouquets terminaux, tiges et tubercules) sur lesquels elle provoque des nécroses (**Figure 8**). Le mildiou peut engendrer des pertes de rendement qui peuvent atteindre l'ensemble des récoltes : une culture de pomme de terre peut ainsi être entièrement détruite en moins de trois semaines (Gaucher *et al.* 1998 ; Fry, 2008). Chaque année, cette maladie entraînerait ainsi

des pertes pour les producteurs de pomme de terre estimées à plus de trois milliards d'euros à travers le monde (Fry 2008), dont 900 millions d'euros en Europe (Haverkort *et al.* 2008).



Outre l'utilisation de plants sains, la lutte prophylactique face au mildiou consiste à limiter autant que possible les sources d'inoculum primaire *via* les rotations culturales et l'élimination des tas de déchets, issus de la récolte précédente, qui sont parfois laissés aux

abords des parcelles (Andrivon 1995). Ces derniers peuvent en effet constituer la source principale d'inoculum primaire des épidémies dans les régions au climat tempéré (Cooke *et al.* 2011 ; Rakotonindrainana *et al.* 2011). Par ailleurs, la destruction des fanes avant la récolte par des traitements thermiques, mécaniques ou chimiques permet de diminuer les risques de contamination des tubercules au moment de la récolte (Jensen 1887).

Les mesures de prophylaxie n'étant malheureusement pas suffisantes (et pas toujours respectées) pour lutter contre le mildiou de la pomme de terre, on a depuis longtemps eu recours à l'application de fongicides de contact, pénétrants ou systémiques (Gisi & Cohen 1996). A l'heure actuelle, c'est encore la principale méthode de lutte face à cette maladie, avec parfois plus de vingt traitements par saison culturale dans les régions où la pression est forte, en particulier sous des climats océaniques favorables aux épidémies (Cooke *et al.* 2011). Toutefois, l'utilisation massive de fongicides systémiques face au mildiou, notamment ceux appartenant au groupe des phénylamides (*e.g.* métalaxyl, méfénoxam, béalaxyl), a conduit à la sélection de souches résistantes à ces matières actives, rendant alors les traitements inefficaces (De Waard *et al.* 1993 ; Gisi & Cohen 1996 ; Duvauchelle & Andrivon 1996). De plus, il est maintenant avéré que les fongicides ont des effets néfastes sur la santé des utilisateurs ainsi que sur l'environnement (Savary & Teng 1994), ce qui incite donc à une utilisation plus raisonnée. La fréquence des traitements fongicides peut notamment être rationalisée grâce aux systèmes de prévision des risques basés sur des modèles épidémiologiques. En France, c'est l'outil Mileos®, porté par Arvalis-Institut du Végétal et la Direction Générale de l'Alimentation (Ministère de l'Agriculture), qui est utilisé dans le cadre de la lutte contre le mildiou de la pomme de terre. Basé sur le modèle épidémiologique Milsol qui modélise le cycle épidémique du parasite *P. infestans* (Duvauchelle 1991), cet outil évalue le niveau de pression de la maladie dans une parcelle en fonction de différents paramètres (météo, variété cultivée, date de plantation etc.) et permet ainsi de guider l'application des traitements fongicides.

La lutte génétique peut être une alternative intéressante à l'usage des fongicides pour contrôler les épidémies de mildiou, et de nombreux travaux de recherche ont été menés pour développer des variétés de pomme de terre moins sensibles à cette maladie. Pendant longtemps, les programmes de sélection se sont surtout focalisés sur l'introduction

de gènes de résistance totale issus de l'espèce sauvage *Solanum demissum* (Duvauchelle & Andrivon 1996). Cependant ces résistances totales furent rapidement contournées par les populations du parasite, et ne se sont pas révélées être un moyen de lutte durablement efficace contre cette maladie (Wastie 1991). Par conséquent, certains sélectionneurs s'orientent aujourd'hui vers le développement de variétés présentant des résistances quantitatives face au mildiou, censées être plus durables. D'autres favorisent des stratégies basées sur le pyramidage de gènes majeurs, avec ou sans le recours aux techniques du génie génétique (Haverkoort *et al.* 2009). L'utilisation des variétés résistantes reste toutefois encore limitée pour un ensemble de raisons tant agronomiques que techniques et d'organisation des marchés (Andrivon, 2009).

3.3. *Phytophthora infestans* : un parasite polycyclique avec différentes stratégies de survie

Phytophthora infestans est un oomycète de la famille des Pythiacées (Agrios, 2005), famille qui regroupe également de nombreux autres parasites de plantes tels que *Pythium aphanidermatum* (Cucurbitacés, piments, blé...) (Al-Sheikh 2010) ou *Phytophthora nicotianae* (tabac, pomme de terre, citrus...) (Timmer *et al.* 1998). Originaire du Mexique (Goss *et al.* 2014), *P. infestans* fut introduit en Europe au milieu du XIX^{ème} siècle (Andrivon 1996). Cette introduction fut suivie par plusieurs vagues de migration d'isolats du continent américain vers l'Europe, dont une majeure dans les années 1970 (Spielman *et al.* 1991). Outre la pomme de terre, ce parasite peut également attaquer d'autres Solanacées comme la tomate (*S. lycopersicum*) ou la morelle douce-amère (*S. dulcamara*) (Lima *et al.* 2009). *P. infestans* est une espèce hétérothallique, avec deux types de compatibilité sexuelle, A1 et A2. La rencontre de deux souches compatibles donne lieu à la formation de spores sexuées, les oospores (Andersson *et al.* 1998). Le cycle de vie de ce parasite peut donc se décomposer en une phase épidémique, alimentée par la succession de nombreux cycles de production de spores asexuées et une phase de survie, sous forme sexuée ou asexuée (**Figure 9**).

La phase épidémique du cycle de vie de *P. infestans* est initiée par les sporanges qui germent au contact de la plante hôte, soit de manière directe ou *via* la formation de zoospores biflagellées (entre 6 et 10 par sporange ; Judelson & Blanco 2005 ; Clément 2011) selon les conditions climatiques (Danieles *et al.* 2013 ; cf § 2.3.1). Sporangies et/ou zoospores (après enkystement pour ces derniers) émettent alors un tube germinatif leur permettant de pénétrer dans la plante hôte, soit par des ouvertures naturelles comme les stomates et les lenticelles, soit au travers des parois végétales par formation d'un appressorium (Coffey & Gees 1991). Par la suite, si l'interaction avec l'hôte est compatible, un haustorium³ est formé, puis un réseau d'hyphes intra- et intercellulaire envahit les tissus (Coffey & Gees 1991). Après une période de latence, d'au minimum 2-3 jours pour des températures comprises entre 17 et 25°C et une forte humidité relative (Robertson, 1991), des sporangiophores sont différenciés au travers des stomates. Ces structures arbusculaires portent de nouveaux sporanges à leurs extrémités (Judson & Blanco 2005; Fry 2008). Ces sporanges vont constituer l'inoculum secondaire : ils seront transportés par le vent ou l'eau jusqu'à d'autres organes du même hôte ou de nouveaux hôtes qu'ils pourront infecter, initiant alors de nouveaux cycles de reproduction. La brièveté du cycle asexué de *P. infestans* et la production d'importantes quantités de spores (sporangies et zoospores), qui peuvent être véhiculées sur de longues distances (Aylor 2003; Glais *et al.* 2014), expliquent le développement rapide de la maladie.

La survie de *P. infestans* hors de la période de culture de la pomme de terre peut avoir lieu sous forme sexuée grâce à leur structure de survie, les oospores, ou sous forme asexuée *via* le mycélium au sein de végétaux vivants (repousses) ou de tubercules (Andriveau 1995). Les événements de reproduction sexuée peuvent se produire lors d'un cycle épidémique, par exemple lorsque deux souches sexuellement compatibles se trouvent au même moment sur une foliole de leur hôte, conduisant ainsi à la formation d'oospores. Ces spores sexuées possèdent une paroi très épaisse (0,7-1,0 µm ; Drenth *et al.* 1995) leur permettant de survivre en absence d'hôte dans le sol pendant plusieurs années, même sous des conditions climatiques défavorables, tout en restant capable de réinfecter de nouvelles plantes (Andersson *et al.* 1998). Au contact ou à proximité d'un hôte, les oospores pourront alors germer, donnant un sporange qui pourra alors entamer un cycle asexué. D'autre part, les spores asexuées du parasite et en particulier les zoospores, produites sur le feuillage de

³haustorium : organe s'insérant dans les tissus de l'hôte pour y absorber eau et nutriments

leur hôte pendant une épidémie, peuvent tomber au sol et être entraînées par ruissellement vers les tubercules. Ces spores peuvent alors infecter les tubercules, à travers les lenticelles ou des blessures, pour former un mycélium. Le parasite peut survivre sous cette forme pendant plusieurs mois si les conditions climatiques sont clémentes (*e.g.* pas de périodes de gel prolongées). Par la suite, lorsque les tubercules infectés qui ne sont pas récoltés (ou laissés aux abords des champs sous forme de tas de déchets) germent à nouveau, les reposeses formées seront infectées par le mycélium. Cela conduira alors à la formation de sporangiophores portant des sporanges qui pourront alors redémarrer un nouveau cycle asexué.

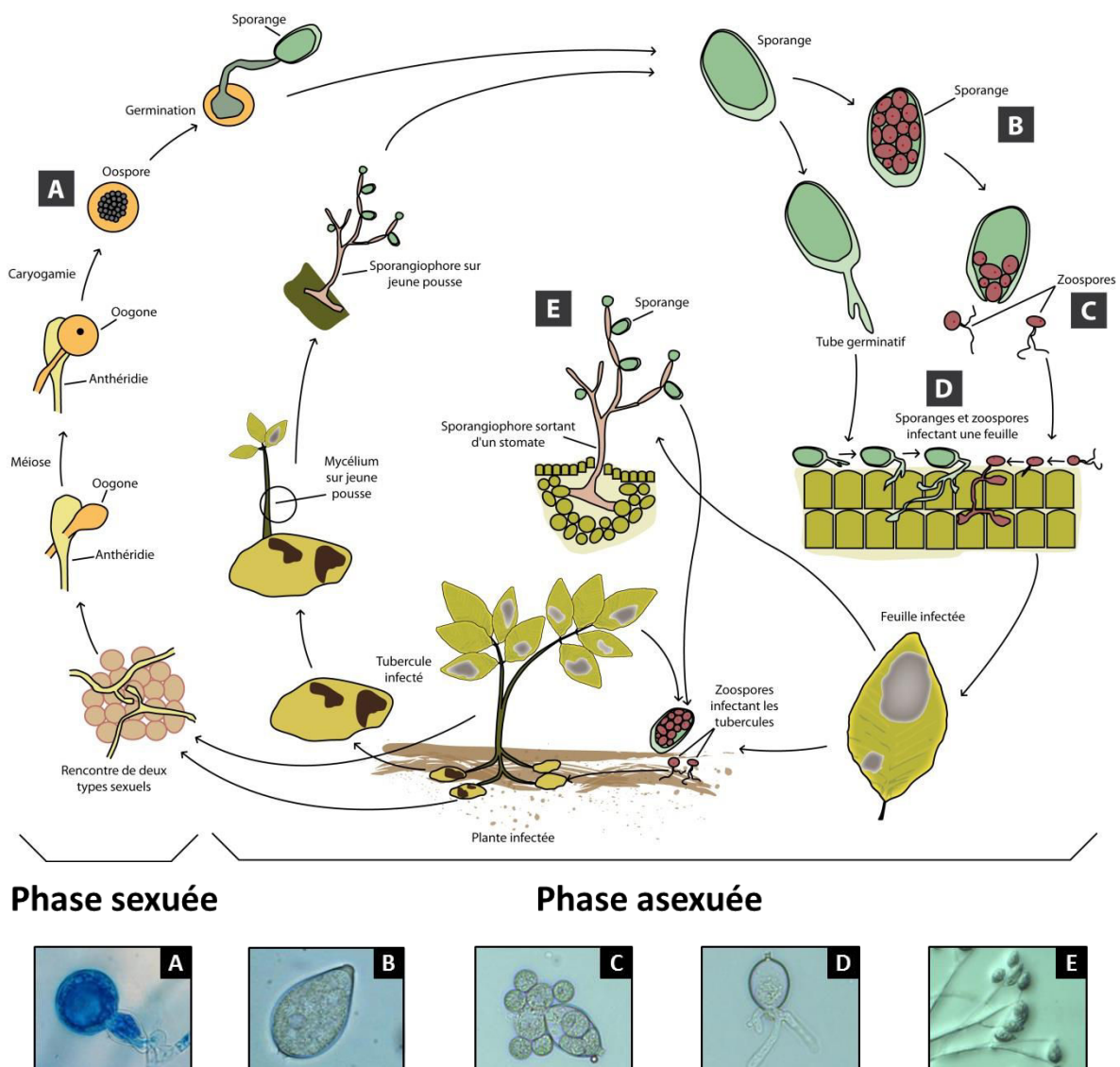


Figure 9. Cycle de vie de *Phytophthora infestans* (S. Martineau, adapté d'Agrios 2005). **A** : Oospore ; **B** : Sporange ; **C** : Zoospores sortant d'un sporange ; **D** : Germination d'un sporange ; **E** : Sporangioporteur. (Photographies : R. Corbière, R. Mabon, A. Androdias)

Dans les zones géographiques où les conditions climatiques limitent fortement la survie inter-épidémique de *P. infestans* sous forme de mycélium dans les tubercules infectés, les épidémies de mildiou sont principalement initiées à partir de sporanges issus d'oospores (Yuen & Anderson 2013), ou à partir de tubercules de semences infectés. C'est par exemple le cas en Europe du Nord où les hivers sont particulièrement rudes avec des périodes de gel prolongées. Dans cette région, les populations de *P. infestans* présentent ainsi de hauts niveaux de diversité génétique en raison du fait que l'inoculum primaire soit issu de la reproduction sexuée (Sjöholm *et al.* 2013 ; Yuen & Anderson 2013). A l'inverse, dans des régions où le climat est favorable à la survie du parasite sous forme de mycélium dans les tubercules, comme en Europe de l'Ouest, l'inoculum primaire est principalement issu de sporanges produits à partir de repousses et/ou de tas de déchets (Pasco *et al.* 2015). Dans ces régions, les populations de *P. infestans* sont caractérisées par des structures clonales avec la présence d'un faible nombre de clones dominants, avec par conséquent de faibles niveaux de diversité génétique (Montarry *et al.* 2010b ; Cooke *et al.* 2012 ; Li *et al.* 2012). Par ailleurs, deux autres facteurs sont parfois avancés pour expliquer la faible part des sporanges issus de la reproduction sexuée dans l'inoculum primaire des épidémies de mildiou en Europe de l'Ouest par rapport à l'Europe du Nord. Premièrement, les étés sont généralement plus frais en Europe du Nord, ce qui pourrait ralentir le processus infectieux et donc la détérioration des tissus (Erwin & Ribeiro 1996). De telles conditions seraient ainsi plus favorables à la rencontre d'isolats compatibles et donc à la formation d'oospores qu'en Europe de l'Ouest (Brurberg *et al.* 2011). Deuxièmement, le gel dans les sols en Europe du Nord pourrait permettre de synchroniser la germination des oospores avec la plantation des cultures de pommes de terre (Widmark *et al.* 2007), ce qui augmenterait donc la probabilité que les oospores puissent infecter leur hôte dans cette région.

3.4. Des changements fréquents mais mal compris au sein des populations ouest-européennes de *P. infestans*

Malgré la faible diversité génétique relevée au sein des populations ouest européennes de *P. infestans*, leur structure connaît de fréquents et importants changements (Lebreton *et al.* 1998 ; Fry 2008 ; Cooke *et al.* 2012). Alors qu'à la fin des années 1990-début des années

2000, ces populations étaient dominées par des lignées clonales telles que 2_A1, 8_A1 ou 5_A1, on a vu, à partir de 2003, l'émergence de la lignée clonale 13_A2 (Cooke *et al.* 2012). Cette lignée clonale, aussi appelée « Blue_13 », est alors devenue majoritaire en l'espace de deux ou trois années (Cooke *et al.* 2012 ; Li *et al.* 2012 ; Chmielarz *et al.* 2014). Par la suite, une autre lignée clonale, 6_A1 (ou « Pink_6 »), connut également une forte expansion démographique. Observés dès 2004, les isolats appartenant à cette lignée clonale restèrent cependant à de faibles effectifs jusqu'en 2010 avant de progresser rapidement (Cooke *et al.* 2012 ; Stroud *et al.* 2015). Ces dernières années, 13_A2 et 6_A1 sont ainsi les deux lignées clonales qui dominent les populations de *P. infestans* en Europe de l'ouest, même si une récente diminution de la fréquence de 6_A1 semble être observée dans certaines régions comme dans le Nord de la France (Euroblight.net).

Les facteurs qui conduisent à ces changements dans les populations ouest européennes de *P. infestans* sont assez mal compris : pour de nombreux auteurs, la fitness d'une lignée clonale dépendrait en grande partie de son niveau d'agressivité (Day & Shattock 1997 ; Cooke *et al.* 2012). Les lignées clonales présentant les meilleures performances lors du cycle infectieux (*e.g.* courte période de latence, haut niveau de sporulation) seraient alors plus compétitives et auraient donc un meilleur succès évolutif. Cependant, la fitness globale d'un clone est également déterminée par sa capacité à se transmettre d'une épidémie à une autre, c'est-à-dire à survivre en l'absence de l'hôte. Or, des travaux récents montrent l'existence d'un trade-off entre l'agressivité et la transmission inter-épidémique des isolats chez *P. infestans* (Pasco *et al.* 2015). Par conséquent, il convient de comprendre comment la fitness des lignées clonales est impactée par cette phase du cycle de vie du parasite.

3.5. *P. infestans* : un parasite qu'on peut élever, génotyper et phénotyper au laboratoire

Alors que dans la nature *P. infestans* se comporte comme un biotrophe obligatoire ne pouvant survivre saprophytiquement (Andrison 1995), ce parasite peut néanmoins être isolé à partir d'organes infectés (tige, feuille, tubercule) et être maintenu en culture axénique sur milieu artificiel (Corbière & Andrison 2003 ; **Figure 10a**). De plus, des tests miniaturisés sont

disponibles pour mesurer les traits de vie liés à la phase infectieuse de ce parasite comme la croissance ou la sporulation (Andrison *et al.* 2003; Montarry *et al.* 2006 ; Clément *et al.* 2010 ; **Figure 10b**). Enfin il est également possible d'extraire l'ADN des isolats de *P. infestans*, soit à partir de cultures une fois le parasite isolé ou directement à partir de lésions (par exemple en utilisant des cartes FTA Whatman® ; Meier-Runge *et al.* 2014). Une vingtaine de marqueurs microsatellites polymorphes récemment développés sont disponibles (Knapova & Gisi 2002 ; Lees *et al.* 2006 ; Li *et al.* 2013 ; cf Annexe), et donnent ainsi accès la caractérisation génétique du parasite sous formes d'empreintes génotypiques.

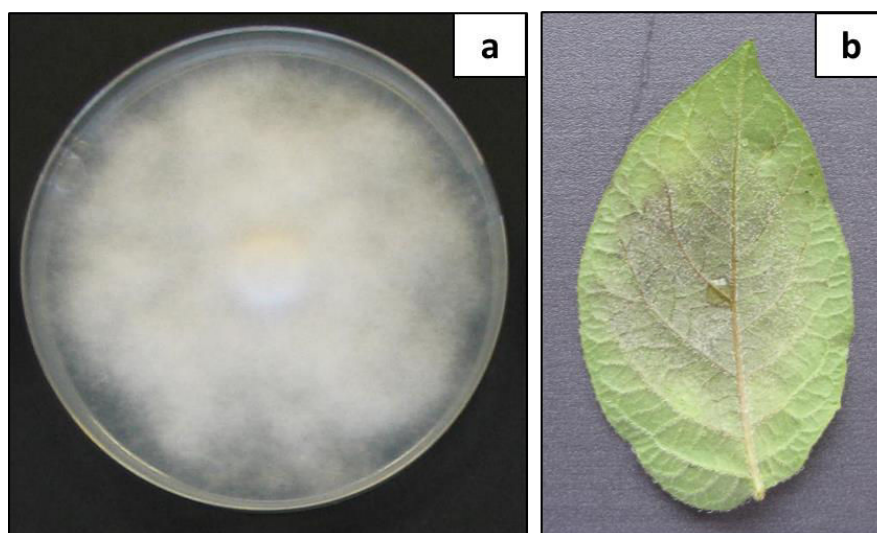


Figure 10 : *Phytophthora infestans* en condition *in vitro*. **a** : Sur milieu gélosé « Petit pois » ; **b** : Sur foliole de pomme de terre de la variété Bintje dans le cadre d'un test d'agressivité.

4. Questions de recherche

Comme le montre la synthèse précédente, l'enjeu crucial pour améliorer les stratégies de lutte, en particulier génétique, contre le mildiou de la pomme de terre est bien de comprendre, prédire et gérer les évolutions de populations du parasite. Ceci suppose donc d'identifier les déterminants écologiques, phénotypiques et évolutifs du caractère invasif des génotypes pathogènes, et d'analyser les conditions de leur expression. Comment expliquer

qu'en quelques années, certaines lignées clonales soient sélectionnées et deviennent dominantes puis se fassent elles-mêmes remplacer (*e.g.* 2_A1) ? Pourquoi observe-t-on aujourd'hui la coexistence à des niveaux similaires de deux lignées clonales (13_A2 et 6_A1) dans certaines régions telle que la Bretagne ? Quand surviendra le prochain bouleversement des structures génotypiques, et quelles seront les caractéristiques pathologiques et/ou écologiques des futurs envahisseurs ? C'est tout l'enjeu du travail entrepris lors de cette thèse que de fournir des éléments de réponse à ces questions.

Ce travail s'est appuyé sur deux hypothèses de départ fortes, que nous avons voulu mettre à l'épreuve :

- La théorie du 'toujours plus agressif', qui postule que chaque invasion est due à une augmentation relative du pouvoir pathogène des 'nouveaux envahisseurs' par rapport aux lignées qu'ils remplacent, est-elle vérifiée ? Au contraire, ne faisons-nous pas face à un scénario plus complexe de sélection balancée entre les phases épidémique et de survie, chacune sélectionnant un niveau d'agressivité différent (élevé durant la phase épidémique, bas durant la phase de survie) et amenant une coexistence dans les populations naturelles de clones possédant des stratégies de vie différentes ? Tester ces hypothèses, à la fois sur la base de données historiques collectées au laboratoire et d'un suivi longitudinal complet d'une population locale, durant deux années successives et incluant la phase de survie inter-épidémique, fait l'objet des deux premiers chapitres de cette thèse ;
- De plus, on a vu que des trade-offs pouvaient exister entre traits d'histoire de vie avec des conséquences évolutives potentiellement importantes sur les populations. Nous avons souhaité tester ici l'existence d'un trade-off entre le nombre et la taille de descendants asexués chez *P. infestans* (*i.e.* entre nombre et taille de sporanges), cette étude fait l'objet du troisième chapitre de cette thèse ;
- L'adaptation chez ce parasite essentiellement biotrophe est-elle uniquement la résultante d'une sélection par l'hôte, ou peut-elle s'effectuer également en réponse à des facteurs abiotiques comme la température ? Quelle variabilité existe-t-il au sein

des populations naturelles pour la réponse à ce facteur climatique, et comment est-elle structurée entre populations, entre lignées clonales et entre individus appartenant à une même lignée clonale ? Quelles conséquences cette variabilité a-t-elle sur les traits de vie liés au pouvoir pathogène ? Ceci fait l'objet du dernier chapitre de la thèse.

Chaque chapitre est traité sous forme d'un manuscrit d'article scientifique, accepté (chapitre 1), actuellement soumis pour publication (chapitres 2 et 3) ou ayant vocation à l'être très prochainement (chapitre 4). Une discussion générale en fin de document remet l'ensemble des résultats en perspective, et dégage des pistes ultérieures pour la poursuite des recherches en lien avec l'objectif initial : mieux comprendre pour mieux prédire les évolutions au sein des populations d'un parasite majeur des cultures, *P. infestans*.

Chapitre 1.

**Les lignées clonales
invasives sont-elles les plus
agressives dans les
populations de *P. infestans*?**

1. Objectifs de travail

Nous avons vu que la structure des populations ouest européennes de *P. infestans* connaissait de fréquents et importants changements avec une succession de différents lignées clonales dominantes. En effet, des lignées clonales peuvent devenir rapidement invasives et dominer les populations pendant plusieurs années avant d'être elles-mêmes remplacées par d'autres lignées clonales. Les facteurs qui conduisent à ces changements sont assez mal compris même si une hypothèse souvent avancée est celle d'une plus grande agressivité des clones invasifs. Cependant, si les clones agressifs pourraient effectivement se montrer compétitifs pendant les épidémies en infectant efficacement leurs hôtes, il est en revanche possible qu'ils soient contre-sélectionnés lors de la phase inter-épidémique.

Dans ce chapitre, nous avons souhaité tester l'hypothèse d'un plus grand pouvoir invasif pour les lignées clonales agressives chez *P. infestans* à l'aide d'un jeu de données de plus de 1200 isolats collectés en France sur une période de huit années (2001-2008). Ces isolats ont été génotypés à l'aide de marqueurs microsatellites, ce qui permettait de suivre les remplacements des clones, et phénotypés pour des traits liés à l'agressivité (taille de lésion et sporulation).

Nos résultats ont montré qu'il y a eu des successions de lignées clonales dominantes dans les populations françaises de *P. infestans* sur la période étudiée et que ces lignées clonales majoritaires qui se sont succédées, caractérisées d'« invasives », ne présentaient pas les hauts niveaux d'agressivité. Au contraire, ces derniers étaient généralement moins agressifs que leurs congénères. Ces résultats tendent donc à contredire l'hypothèse du 'toujours plus agressif' et laissent donc possible l'hypothèse d'une contre-sélection des clones agressifs lors de la transmission inter-épidémique.

Les résultats rapportés dans ce chapitre font l'objet d'une publication dans *Plant Pathology*. (Doi: 10.1111/ppa.12441).

2. Article 1

Phenotypic and genotypic changes in French populations of *Phytophthora infestans*: are invasive clones the most aggressive?

N. Mariette, R. Mabon, R. Corbière, F. Boulard, I. Glais, B. Marquer, C. Pasco, J. Montarry, D. Andrivon*

INRA, UMR1349 IGEPP (Institute of Genetics, Environment and Plant Protection), Domaine de la Motte, BP 35327, F-35653, Le Rheu Cedex, France.

*Corresponding author e-mail: didier.andrivon@rennes.inra.fr

Abstract

The main objective of this paper was to test the ‘always more aggressive’ hypothesis, often advocated to explain lineage replacements in clonal populations of the potato late blight oomycete *Phytophthora infestans*. To this end, we analysed genotypic and pathogenicity data on 1274 French isolates of *P. infestans* collected over the period 2001-2008. Overall, the populations sampled showed limited genetic diversity, with four multilocus lineages (1_A1, 2_A1, 8_A1 and 13_A2) accounting for over 80 % of the isolates collected. As in other West European countries, we observed drastic changes of these dominant clonal lineages along the course of the eight years, particularly with the appearance and propagation of the clone 13_A2. However, invasiveness of clones was not associated with higher aggressiveness; on the contrary, dominant clones were generally low or moderate aggressiveness relative to others present at the same time within the same populations. This finding challenges the link between invasive behavior and increased aggressiveness often assumed in this biotrophic pathogen, and could rather reflect the existence of a trade-off between intra-season and inter-season transmission. This would be consistent with the concept of inclusive fitness, which involves the abilities to both reproduce and survive.

Key words: fitness, invasion, pathogenicity, potato late blight, selection, trade-off.

Introduction

Since crop domestication 10,000 years ago, farmers have faced a large number of pests and diseases leading to major losses in production (Fisher *et al.*, 2012). Among crop diseases, those caused by fungi and oomycetes are increasingly recognized to present a serious threat to global food security: the annual losses in major crops induced by these pathogens would indeed suffice to feed 8.5% of the current world population (Fisher *et al.*, 2012). Among of these devastating pests is the oomycete *Phytophthora infestans*, which is responsible for one of the most severe diseases on potato production, late blight. This disease, sadly infamous to have caused the Great Irish Famine in the nineteenth century, is still responsible for massive economic losses, estimated at €900 million a year in Europe (Haverkort *et al.*, 2008).

P. infestans is a heterothallic, hemibiotrophic organism with two mating types, A1 and A2. Prior to the 1980s, only the A1 mating type was distributed worldwide (Fry *et al.*, 1992), whereas Central Mexico, the supposed center of origin of this pathogen (Goss *et al.*, 2014), was the only place where both mating types coexisted (Fry *et al.*, 1992). In the winter of 1976/1977, large cargoes of potatoes shipped from North America into Europe introduced new *P. infestans* populations, including strains of the A2 mating type. Since 1981, the presence of the A2 mating type has been reported in European *P. infestans* populations, first in Switzerland, England and Wales (Hohl & Iselin, 1984; Tantius *et al.*, 1986) and subsequently in all European countries where the pathogen has been monitored (Hermansen *et al.*, 2000). The arrival of the A2 mating type in Europe has raised many concerns about the epidemiology of potato late blight, mainly because the coexistence of both mating types makes sexual reproduction possible. This confers an evolutionary advantage for the pathogen population by increasing genotypic diversity (McDonald & Linde, 2002), as well as by the formation of long-living oospores which serve as a new source of primary inoculum in the soil (Sjöholm *et al.*, 2013). As predicted, a number of studies have demonstrated the occurrence of sexual reproduction in *P. infestans* populations of Northern Europe. In this area, oospores have been shown to survive several years in the soil and to cause early infections (Hermansen *et al.*, 2000); as a result, primary infections are now up to a month earlier than in the decades before (Hannukkala *et al.*, 2007). Moreover, a high

genetic diversity was reported in Nordic populations, confirming the implication of sexual reproduction (Sjöholm *et al.*, 2013).

The situation is markedly different in West Europe, where *P. infestans* populations remain clonal with rare sexual reproduction events (Flier *et al.*, 2007). For instance, despite the presence of both mating types, *P. infestans* populations from the UK, France and Switzerland are described as being clonal and dominated by a few genotypes (Montarry *et al.*, 2010; Gisi *et al.*, 2011; Cooke *et al.*, 2012; Glais *et al.*, 2014). However, frequent changes occur in the structure of these West European populations (Fry, 2008). Surveys conducted in the UK and the Netherlands in recent years have revealed drastic changes in the genetic structure of *P. infestans* populations, with a succession of different clonal lineages (Cooke *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012). These studies have notably shown the emergence since 2004 of 13_A2, also known as 'Blue_13'. This clonal lineage has rapidly displaced most others to become dominant within 2-3 years (Cooke *et al.*, 2012), and was then observed in several other European countries (*e.g.* Glais *et al.*, 2014; Chmielarz *et al.*, 2014) and even outside Europe (*e.g.* Chowdappa *et al.*, 2015). Interestingly, this clonal lineage has persisted over years and remains one of the most widely distributed in Western Europe, although the most recent surveys suggest that it is now in turn being displaced by other clonal lineages, such as 6_A1 (Euroblight.net).

The factors driving these population changes are still poorly understood (Cooke *et al.*, 2012; Andrivon *et al.*, 2013), namely why, within a few years, are some genotypes selected, becoming dominant, before being themselves displaced? Aggressiveness, defined as the quantity of disease induced by a pathogenic strain on a susceptible host (Andrivon, 1993), has been advocated as one of the most important factors explaining clonal dynamics in *P. infestans*. According to this hypothesis, called the 'always more aggressive' scenario, the invasive success of particular genotypes in the population is driven by incremental increases in life history traits conditioning aggressiveness (*e.g.* Day & Shattock, 1997; Cooke *et al.*, 2012). The high aggressiveness levels frequently reported in current populations of *P. infestans* (Kiezebrink & Shaw, 2006) could, therefore, explain the displacement of established clonal lineages by more aggressive ones. For instance, it is often advanced that 13_A2 is amongst the most aggressive clonal lineages in contemporary European

populations, and that this could explain its fast propagation (Cooke *et al.*, 2012; Chmielarz *et al.*, 2014). However, this hypothesis remains tentative, because aggressiveness comparison is technically challenging, intralineage variation is often ignored in such comparisons, and aggressiveness can be altered by prolonged axenic maintenance of the isolates. Moreover it also contradicts the widely accepted 'trade-off hypothesis' in host-pathogen co-evolution, proposed by Anderson & May (1982; see Alizon *et al.*, 2009 for a recent review), which assumes that increased damage to the host (*i.e.* aggressiveness) hinders pathogen transmission.

In this study, the genotypic and phenotypic (aggressiveness) changes in the French *P. infestans* population over an 8-year-period bridging the 13_A2 invasion were analysed. The main objective was to determine whether the most invasive clonal lineages, selected over the years from season to season, were the most aggressive ones. To this end, a large data set on isolates collected from French potato fields between 2001 and 2008 was exploited. Shortly after isolation, these isolates had been tested for aggressiveness on the susceptible potato cultivar Bintje and were genotyped with a set of 10 polymorphic microsatellite markers (or simple sequence repeats, SSRs).

Material and Methods

Isolate collection and maintenance

A total of 1274 *P. infestans* isolates were collected in French potato fields from 2001 to 2008 (Montarry *et al.*, 2006, 2008; Glais *et al.*, 2014). No isolates were sampled in 2003, the extremely hot and dry weather in that year having reduced the development of late blight epidemics. Sampled fields were mainly located in the two most important potato production areas: northern France and western France. Isolates were obtained from leaves with single lesions and were mainly sampled during the early-mid stages of the epidemics. Only one leaf per plant was taken, and plants were randomly sampled across the field. Single-lesion isolates of *P. infestans* were then established and maintained as axenic cultures on pea agar as previously described (Montarry *et al.*, 2006).

Data collection

This analysis exploits both genotypic (SSR) and phenotypic (mating types and aggressiveness) data collected shortly after isolate collection. Part of these data sets have been included in earlier papers by the authors' group (Montarry *et al.*, 2006, 2008, 2010; Glais *et al.*, 2014) while others (mainly SSR profiles on the earliest isolates within the collection) were generated specifically for this work. Some phenotyping protocols have slightly changed over the period, making direct comparisons on the whole data set problematic. Therefore, we describe in the following sections the protocols and their differences, but also indicate to which isolate collections (years) each of them applies, so as to justify which comparisons are legitimate (Figure S1).

Mating type determination

Mating types were determined through pairing tests. A mycelium plug obtained from a growing colony of each isolate was transferred to pea agar medium on one side of a Petri dish and a similar agar plug of an A1 or A2 tester isolate was placed in the other side. The plates were incubated in the dark at 15°C for 10-14 days and we observed under a microscope for the presence of oospores at the contact zone of the two colonies. When oospores were formed in the Petri dish with the A1 tester, the isolate was rated as A2 mating type, and vice versa.

Molecular characterization

DNA extraction

Pure cultures of isolates were grown separately in liquid pea broth previously autoclaved for 20 min at 120°C and cooled to room temperature. After three weeks of incubation in the dark at 15°C, mycelium was harvested, washed three times in sterile water, dried on sterile paper and lyophilized. DNA was then extracted from lyophilized mycelium using the NucleoSpin® Tissue kit (Macherey-Nagel GmbH and Co, Düren, Germany) according to the manufacturer's instructions. DNA concentration and purity were estimated using a Nanodrop® ND-1000 (Fisher Scientific, Illkirch, France).

SSR amplification

For allele detection, 10 polymorphic microsatellite loci: PiG11, Pi4B, Pi4G (Knapova & Gisi, 2002) and Pi02, Pi04, Pi16, Pi33, Pi56, Pi63, Pi70 (Lees *et al.*, 2006) were amplified using PCR. Amplifications were performed using the Type-it Microsatellite PCR kit from Qiagen (Hilden, Germany) in reaction volumes of 5 µL containing 10 ng of *P. infestans* DNA and 2.5 µL of master mix using the same primer sets. Reactions were performed in a BioRad C1000 thermocycler under the following conditions: each reaction started with a denaturation step of 5 min at 95°C; 30 cycles of 30 s at 95°C, 90 s at 58°C and 30 s at 72°C; and finally one elongation step of 30 min at 60°C. In order to detect simultaneously the alleles at several loci, the primers used were labeled with one of four fluorescent dyes: FAM (Pi63), NED (PiG11, Pi02 and Pi4G), VIC (Pi04, Pi70 and Pi16) and PET (Pi4B, Pi33 and Pi56). Amplification products were pooled into two batches, based on expected allele sizes: Pi04, Pi70, PiG11, Pi02 and Pi4B (batch 1) and Pi63, Pi16, Pi4G, Pi33 and Pi56 (batch 2). Eight microlitre samples, comprising a loading buffer containing a mix of 5 µL Hi-Di™ deionized formamide (Applied Biosystems), a 500 LIZ size standard (Applied Biosystems) and 3 µL of 150-fold dilutions of the multiplexed PCR products, were loaded into an ABI prism 3130xl DNA sequencer, run according to manufacturer's instructions (Applied Biosystems). The GeneMapper™ v. 3.5 software was used to automatically size the labelled DNA fragments, and allele sizes were calibrated using reference isolates kindly supplied by Drs A.K. Lees and D.E.L. Cooke (James Hutton Institute, Dundee, Scotland). To minimize the risk of genotyping errors, a second round of PCR and electrophoresis was performed for approx. 10% of isolates. These replicate tests gave results consistent with the original identifications.

Aggressiveness tests

Plant material

Aggressiveness tests were performed on detached leaflets of the potato cultivar Bintje. Plants were grown from certified seed tubers in 13-cm pots (one tuber per pot) filled with 1: 1: 1 sand-peat-compost mixture placed in a glasshouse regulated at 15-20°C (night/day temperatures) with 16h of photoperiod. Once a week, plants were watered with a nutrient

solution (Hakaphos; NPK 15/10/15). For the inoculum preparation and aggressiveness tests, leaflets of similar size were picked from the median area of 6- to 8-week-old plants.

Inoculum preparation

Aggressiveness tests were performed 3-6 months after isolation. Sporangial suspensions of isolates sampled in 2001 and 2002 were directly prepared from 3- to 4-week-old cultures on Petri dishes. To this end, cultures were flooded with 5 mL sterile distilled water before the colony surface was gently scrapped with a small glass rod. Isolates collected since 2004 were previously multiplied separately on detached leaflets of cv. Bintje in order to restore pathogenicity possibly lost during axenic cultures (Jinks & Grindle, 1963). To achieve this, droplets of sporangia suspensions prepared from pea agar cultures (as described above) were then deposited on detached leaflets of potato cultivar Bintje. After 7 to 10 days of incubation in humid chambers under controlled conditions (18-15°C day/night temperature with 16 h of day length), newly formed sporangia were collected from the leaflets in sterile water. For both cases, with or without previous multiplication on potato leaflets, sporangial suspensions were adjusted to 5×10^4 sporangia per mL using a haemocytometer. Finally, before inoculation for aggressiveness determination, the suspensions were kept at 4°C for approximately 2-3 h to promote zoospore release.

Aggressiveness quantification

In total, 823 isolates among the full collection were tested for aggressiveness. Each isolate was inoculated separately onto six detached leaflets of cv. Bintje by depositing a 20 µL droplet of the prepared sporangial suspensions (about 1000 sporangia) at the leaflet center. Before inoculation, leaflets were placed, abaxial face up, onto the lids of inverted Petri dishes containing 10 gL⁻¹ water agar, which acted as humid chambers (two leaflets per dish). Dishes were kept in clear boxes and incubated in climatic chambers regulated at 18-15°C (day/night temperature) with 16 h of photoperiod. The isolates were tested for lesion area (LA), spore production (SP) and sporulation capacity (SC). These aggressiveness components were measured 7 days after inoculation for isolates sampled during the 2001-2005 period, and 6 days after inoculation for those collected since 2006. LA, expressed in cm², was calculated from the measurements with an electronic caliper of two diameters (one along

the midrib and one perpendicular to it) of each blight lesion, assuming an elliptic shape. Immediately after measuring the lesion diameters, sporangia were washed from leaflets in 10 mL Isoton II (saline buffer; Beckman Coulter). Suspensions were kept in glass tubes at -20°C until the counting of the sporangia with a Coulter Z2 counter (Beckman Coulter) equipped with a 100- μ m aperture tube, allowing the determination of the number of sporangia produced on the lesion (SP). SC, expressed in sporangia per cm^{-2} , was then calculated by dividing SP by the corresponding LA.

Data analysis

Genotypic data

The microsatellite data were used to define multilocus genotypes (MLGs) and multilocus lineages (MLL). Since *P. infestans* is a diploid organism, isolates are expected to possess a maximum of two alleles per locus. However, in our study, more than two alleles were found at one or more loci for a large number of *P. infestans* isolates (50.4%), which could result from aneuploidy or polyploidy (Delgado *et al.*, 2013). Similar observations were previously reported (Li *et al.*, 2012; Cooke *et al.*, 2012) and complicated the analysis because most of analysis tools assume haploid or diploid data. Therefore, a binary data matrix was prepared by scoring each allele at each locus as present (1) or absent (0) for each isolate.

Repeated MLGs, *i.e.* the isolates sharing the same alleles at all ten loci, and the number of copies of each MLG were identified using GENALEX v. 6.501 (Peakall & Smouse, 2006). Since a MLG may result from distinct sexual reproduction events or from clonal reproduction, we tested for random recombination between pairs of loci by calculating the index of association (I_A) and the index of multilocus linkage disequilibrium (r_d) using the Multilocus v. 3.1b (Agapow & Burt, 2001). These indexes compare the observed and expected variance of genetic distance between all pairs of individuals. Departure from the null hypothesis, *i.e.* no linkage disequilibrium ($I_A = 0$ or $r_d = 0$), was checked by permuting alleles between individuals independently for each locus (1000 permutations). These tests were performed both on data sets with (*i.e.* from all individuals) and without repeated MLGs (*i.e.* using one representative individual of each MLG).

Due to somatic mutations or scoring errors, distinct MLGs actually belonging to the same clone can be found. This bias may be confirmed by the presence of a peak at very low genetic distances in the frequency distribution of genetic distances among pairs of MLGs, making it bimodal rather than unimodal (Meirmans & Van Tienderen, 2004). Since this was observed in our microsatellite data sets, we screened each MLG pair presenting extremely low distance (*i.e.* 1-4 allelic differences; Figure 1), and grouped MLGs into ‘multilocus lineages’ (MLLs) which correspond to the best possible identification of clonal lineages (Arnaud-Haound *et al.*, 2007). MLLs were then named according to the classical European nomenclature (*e.g.* 13_A2, 2_A1, 8_A1) if their fingerprints matched those described by Cooke *et al.* (2012).

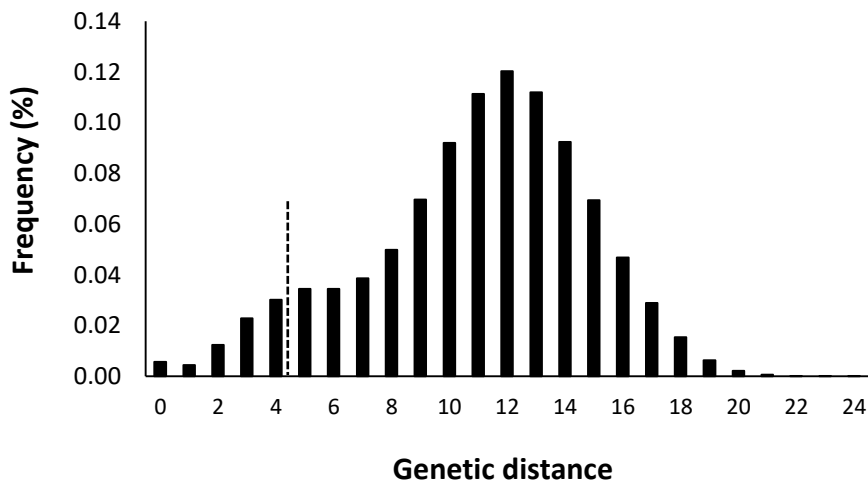


Figure 1. Frequency distribution of the pairwise genetic distances among the 351 multilocus genotypes (MLGs) of the 1274 French *Phytophthora infestans* isolates. The dashed line in the distribution represents the threshold below which different MLGs were grouped into the same multilocus lineage (MLL).

MLGs and MLLs richness within populations were estimated with the genotypic richness index $R = (M-1) / (N-1)$ proposed by Dorken & Eckert (2001), where M is the number of different MLGs (or MLLs) and N is the number of isolates. In addition, Nei’s (1978) gene diversity ($H = 1 - \sum_j x_j^2$, where x_j is the frequency of the j th allele at the locus) was calculated for each locus. To infer the evolutionary relationships amongst the *P. infestans* isolates, we first prepared a matrix of genetic distances based on the number of different alleles using

GENALEX. Minimum spanning networks were then calculated by MINSPNET (Excoffier & Smouse, 1994) from this matrix and visualized using the neato layout engine in the GRAPHVIZ package (<http://graphviz.org>).

Phenotypic data

Owing to the different methodologies used to measure the aggressiveness components, it was not possible to compare aggressiveness data of major clonal lineages for all the sampling years simultaneously (2001-2008). Instead, we grouped isolates into three periods: 2001-2002, 2004-2005 and 2006-2008, according to the protocol used. Because only major clonal lineages of each period were taken into account and compared, the final analysis included 639 of the 823 phenotyped isolates. Differences in LA, SC and SP between clonal lineages were analyzed with Student's t-tests when the number of clonal lineages to be compared (n) was 2 or with ANOVA models when $n > 2$. When significant effects were detected with ANOVA, mean values were compared with Tukey's HSD tests. Normality and homogeneity of variances were previously checked with the Shapiro-Wilk and the Bartlett tests, respectively. All the tests were done with the statistical software R, version 3.1.0 (R Development Core Team, 2014) and the threshold for all tests was 0.05.

Results

Mating type

Among the 1274 isolates collected from 2001 to 2008, 912 (72%) belonged to the A1 mating type and 362 (28%) were rated as A2 (Figure S2); no isolate was found to be self-fertile. The A1 isolates were observed in every sampling year, whereas A2 isolates were only reported since 2004. Nevertheless the frequencies of A2 were low (less than 15%) until a sharp rise in 2007 and 2008 (>75%).

Genotypic characteristics of the populations

All ten microsatellite markers tested were polymorphic in the collection of 1274 French *P. infestans* isolates. A total of 55 alleles were detected over the ten SSR loci, ranging from three (at loci Pi56 and Pi63) to 14 (at locus G11), and gene diversity ranged from 0.44 to 0.76 (Table S1). Moreover, all the r_d and IA tests made on individuals from each sampling year (with or without multicopies of MLG) rejected the null hypothesis of recombination ($P < 0.001$; Table 1). These analyses support a regime of clonal reproduction in French *P. infestans* populations during this period.

Table 1. Index of Association (IA) and multilocus linkage disequilibrium (r_d) within the *Phytophthora infestans* isolates sampled from 2001 to 2008. Tests were performed on data with and without multicopies. Values that differ significantly from 0 indicate a departure from linkage equilibrium.

	Index of Association (IA)				Index of multilocus linkage disequilibrium (r_d)			
	With multicopies		Without multicopies		With multicopies		Without multicopies	
	IA	P value	IA	P value	r_d	P value	r_d	P value
2001	5.2652	$P < 0.001$	3.6580	$P < 0.001$	0.2680	$P < 0.001$	0.1787	$P < 0.001$
2002	6.4184	$P < 0.001$	3.6730	$P < 0.001$	0.3168	$P < 0.001$	0.1699	$P < 0.001$
2004	3.7963	$P < 0.001$	1.0244	$P < 0.001$	0.1308	$P < 0.001$	0.0323	$P < 0.001$
2005	3.7963	$P < 0.001$	2.7044	$P < 0.001$	0.1308	$P < 0.001$	0.1019	$P < 0.001$
2006	5.2268	$P < 0.001$	1.9353	$P < 0.001$	0.1748	$P < 0.001$	0.0602	$P < 0.001$
2007	3.3020	$P < 0.001$	1.8886	$P < 0.001$	0.1185	$P < 0.001$	0.0640	$P < 0.001$
2008	3.4628	$P < 0.001$	1.8669	$P < 0.001$	0.1333	$P < 0.001$	0.0677	$P < 0.001$

The 1274 isolates genotyped split into 351 unique MLGs, and the screening of near pairs (*i.e.* 1-4 allelic differences) led to group the MLGs into 70 multilocus lineages (MLLs; see genotype networks in Figure S3). The fingerprints of 13 MLLs (1063 isolates) corresponded with those described by Cooke *et al.* (2012), which were therefore named according to the European nomenclature (*i.e.* 1_A1, 2_A1, 4_A1, 5_A1, 6_A1, 7_A1, 8_A1, 18_A1, 19_A1, 21_A1, 3_A2, 10_A2, and 13_A2,). On average, a MLL included 5 MLGs. The two most genetically diverse MLLs were 2_A1 and 13_A2 (79 and 76 MLGs, respectively); conversely, 42 MLLs were composed of a single MLG (Figure S3). The lowest genotypic richness indexes were observed in 2001 (2 MLLs, $R = 0.02$) and 2002 (3 MLLs, $R = 0.03$). In contrast, with 40

MLLs found among 279 isolates sampled, 2004 was the year with the highest genotypic richness ($R = 0.13$) ahead of year 2008 with 12 MLLs for 96 isolates ($R = 0.12$; Table 2). The genotypic diversity was also high in 2005 (25 MLLs and 93 MLGs), but decreased in the following years, as many of the MLGs encountered in 2004 and 2005 were not sampled again in subsequent years (Figure S3).

Table 2. Genotypic diversity for French *Phytophthora infestans* populations from 2001 to 2008. N, number of isolates; MLG, number of distinct multilocus genotypes; MLL, number of distinct multilocus lineages, R_{MLG} , genotypic richness of MLGs; R_{MLL} , genotypic richness of MLLs.

	2001	2002	2004	2005	2006	2007	2008	Overall
N	42	67	279	319	271	200	96	1274
MLG	17	15	96	93	61	69	40	351
R_{MLG}	0.39	0.21	0.34	0.29	0.22	0.34	0.41	0.27
MLL	2	3	40	25	14	12	12	70
R_{MLL}	0.02	0.03	0.13	0.07	0.04	0.06	0.12	0.05

Only 6 of the 70 MLLs (*i.e.* 1_A1, 2_A1, 5_A1, 6_A1, 8_A1 and 13_A2) were observed in more than two years, and only one (2_A1) was reported in all the years of the sampling period. Furthermore, 2_A1 was the MLL which grouped the highest number of isolates (503), ahead of 13_A2 (285 isolates), 1_A1 (118) and 8_A1 (83). Nearly 80% of the isolates collected in this study belonged to these four MLLs. Because the objective of this study was to describe the main changes that occurred in the French *P. infestans* population during the 2001-2008 period and the relation between invasive behaviour and aggressiveness, we focused on the four dominant MLLs (Figure 2; Figure S3).

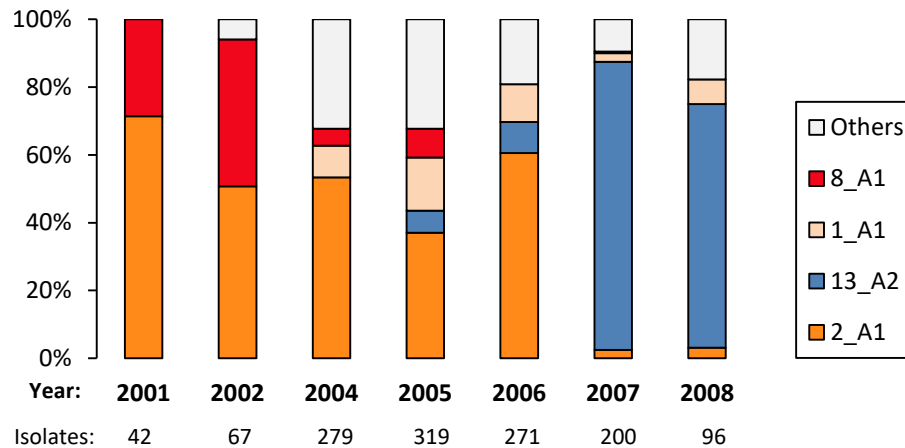


Figure 2. Frequency of major clonal lineages in French *Phytophthora infestans* populations from 2001 to 2008. Clonal lineages in low frequencies are grouped under the category termed ‘Others’. No isolate was sampled in 2003.

During the first two years, 2001 and 2002, most isolates sampled belonged to the 2_A1 and 8_A1 lineages. The 2_A1 isolates were also recorded at high frequencies during the following years (2004, 2005 and 2006) and represented at least 40% of the sampled isolates every year during this period. At the same time, the 8_A1 clonal lineage disappeared, representing less than 10% of French isolates in 2004-2005 and none of the isolates collected since 2006. It was displaced by the 1_A1 and 13_A2 clonal lineages. The last one was first observed in 2005 in Northern France, and it rapidly became the dominant lineage all over the country. In 2007 and 2008, 13_A2 isolates represented more than 70% of the isolates sampled. At the same time, the frequencies of 1_A1 and especially 2_A1 isolates drastically decreased (less than 7 % each; Figure 2).

Aggressiveness characterization

Three aggressiveness traits (*i.e.* lesion size, spore production and sporulation capacity) were compared between the four main MLLs. As explained before, owing to methodological differences between years, the comparisons were performed for three distinct periods (2001-2002, 2004-2005 and 2006-2008).

During the first period (Figure 3), no significant differences in lesion size were observed between the 2_A1 and 8_A1 MLLs ($t = 0.260$, $df = 97$, $P = 0.795$). By contrast, 8_A1

isolates produced more spores per lesion ($t = 2.323$, $df = 97$, $P = 0.022$) and had a higher sporulation capacity ($t = 2.558$, $df=97$, $P = 0.012$) than 2_A1 isolates. For the 2004-2005 period (Figure 4), significant differences between MLLs were found for lesion size ($F_{3,536} = 74.48$, $P < 0.0001$), with the largest lesions caused by 13_A2 isolates. ANOVAs also revealed differences in spore production ($F_{3,536} = 47.23$, $P < 0.0001$) and sporulation capacity ($F_{3,536} = 17.46$; $P < 0.0001$) with the highest levels for 8_A1, the lowest levels for 13_A2 and intermediate values for 2_A1 and 1_A1. During the third period (Figure 5), MLLs differed significantly in lesion size ($F_{2,206}=47.13$, $P < 0.0001$): 2_A1 caused the largest lesions, 1_A1 was intermediate while 13_A2 caused the smallest lesions. At the same time, 13_A2 isolates produced significantly fewer spores than the other two MLLs ($F_{2,206} = 17.81$, $P < 0.0001$). Nevertheless, the sporulation capacities of 13_A2, 1_A1 and 2_A1 did not differ statistically ($F_{2,206} = 1.24$; $P = 0.293$).

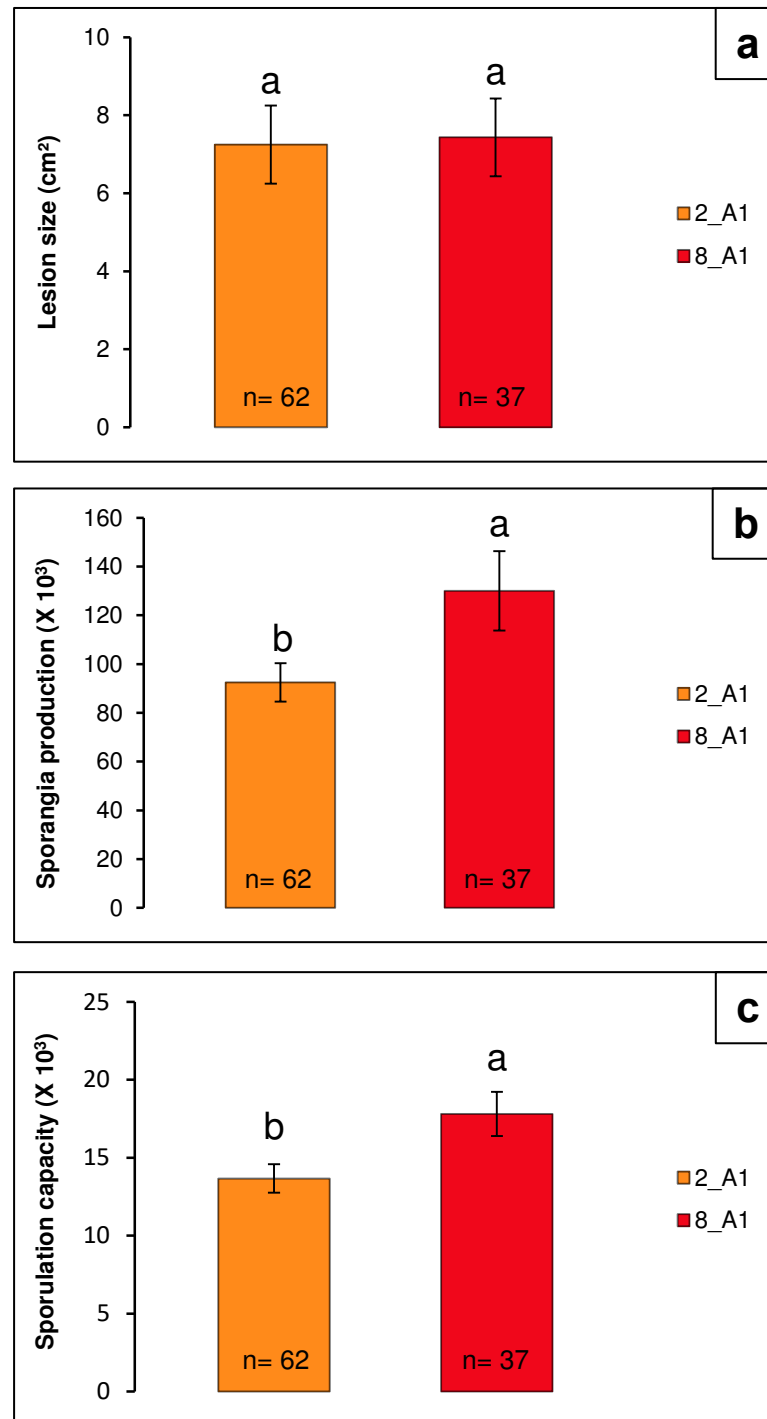


Figure 3. Aggressiveness on leaflets of the potato cultivar Bintje of the two multilocus lineages (MLLs 2_A1 and 8_A1) most frequent in French *Phytophthora infestans* population during the 2001-2002 period. Aggressiveness was estimated as lesion area (a), spore production (b) and sporulation capacity (c) (means $\pm$ SE). Different letters above the histograms indicate significant differences with the Student's t-test at the 5% threshold.

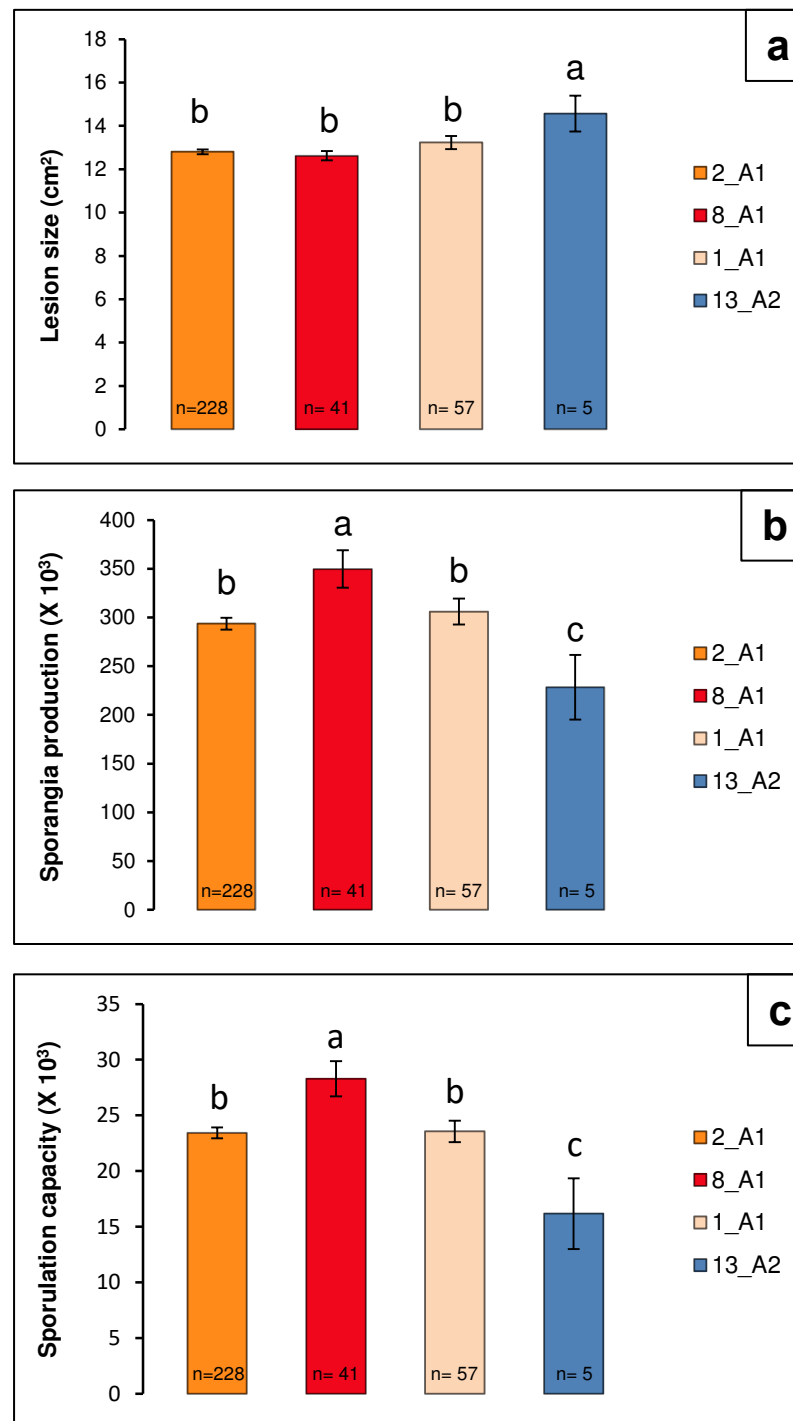


Figure 4. Aggressiveness on leaflets of the potato cultivar Bintje of the four multilocus lineages (MLLs 1_A1, 2_A1, 8_A1 and 13_A2) most frequent in French *Phytophthora infestans* population during the 2004-2005 period. Aggressiveness was estimated as lesion area (a), spore production (b) and sporulation capacity (c) (means $\pm$ SE). Different letters above the histograms indicate significant differences with the Tukey's HSD tests at the 5% threshold.

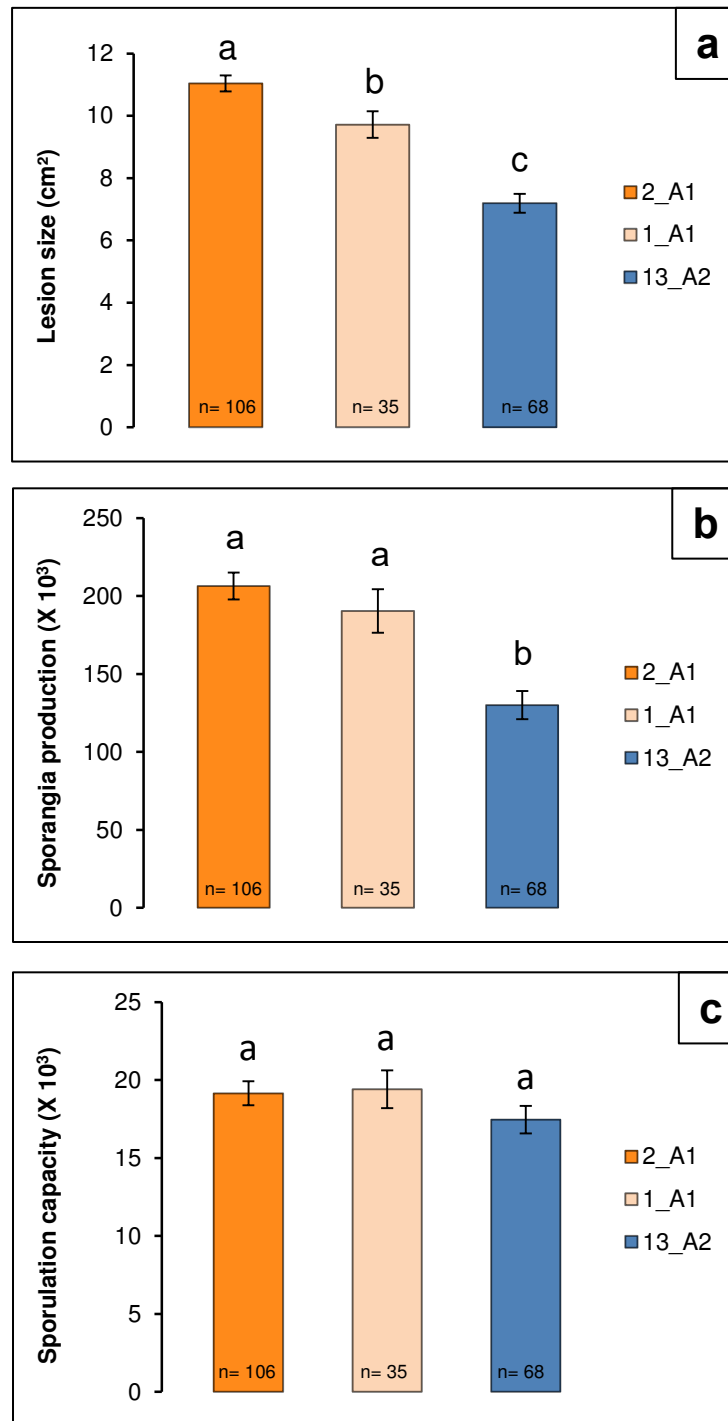


Figure 5. Aggressiveness on leaflets of the potato cultivar Bintje of the four multilocus lineages (MLLs 1_A1, 2_A1 and 13_A2) most frequent in French *Phytophthora infestans* population during the 2006-2008 period. Aggressiveness was estimated using lesion area (a), spore production (b) and sporulation capacity (c) (means $\pm$ SE). Different letters above the histograms indicate significant differences with the Tukey's HSD tests at the 5% threshold.

Discussion

This study analysed the genotypic changes occurring in French population of *Phytophthora infestans* over the course of eight successive years (2001–2008) and their relationships with pathogenicity characteristics. The main hypothesis to be tested was that increased aggressiveness explained clone replacement. It was decided to monitor the genotypic changes on a large scale because the French population of *P. infestans* does not display a regional genetic structure, notably due to the high dispersion abilities of this pathogen (Montarry *et al.*, 2010; Glais *et al.*, 2014). Throughout the 2001–2008 period, the genetic structure of French *P. infestans* populations was characterized by low to moderate levels of genetic diversity, a low level of recombination as suggested by the high index of association, and the dominance of a

few clonal lineages. These observations confirm the prevalence of clonal reproduction in West European populations of this pathogen, with little or no evidence of recombination (Montarry *et al.*, 2010; Gisi *et al.*, 2011; Cooke *et al.*, 2012; Glais *et al.*, 2014).

The ‘always more aggressive’ hypothesis, often advocated to explain lineage replacements in clonal populations of *P. infestans*, assumes that, as the individuals compete for a finite amount of substrate (potato foliage) during the cropping period, higher aggressiveness (*e.g.* short latency period, high spore production, high lesion growth rate) should provide a selective advantage. The clone distribution over time within the present collection of isolates, together with the availability of pathogenicity data on large numbers of isolates and the general adaptation pattern to the test cultivar Bintje within French *P. infestans* populations (Montarry *et al.*, 2008), allow a valid test of this hypothesis. However, these data do not show a selection of the most aggressive clones in the French *P. infestans* populations during the period considered, as clones with moderate or low levels of aggressiveness were the most invasive and the most aggressive clones tended to disappear from the population. For instance, 8_A1 was the MLL with the highest levels of spore production and sporulation capacity from 2001 to 2005, but its frequency sharply decreased during that time (from 28% to 8%). Conversely, 2_A1, the dominant clonal lineage from 2001 to 2005, was never the most aggressive for any of the traits measured. 13_A2 isolates, whose frequency rose from 9% in 2006 to 72% in 2008, caused smaller lesions and produced

fewer spores than the other two dominant clones from this period, 2_A1 and 1_A1. These results therefore contradict the idea that the invasive behaviour of dominant clonal lineages is a consequence of higher aggressiveness (Day & Shattock, 1997; Cooke *et al.*, 2012).

As the selection of highly aggressive isolates within the epidemic season has been previously demonstrated (Andriveau *et al.*, 2007; Gisi *et al.*, 2011), it can be supposed that these aggressive isolates do not bridge epidemic seasons well. This trade-off hypothesis (Andriveau *et al.*, 2013), consistent with the concept of fitness (involving the abilities to both reproduce and survive; Antonovics & Alexander, 1989), would explain why the highly aggressive clones were not selected during the years of the present study. In West Europe, *P. infestans* is mainly transmitted asexually between seasons, through volunteer or seed tubers (Johnson, 2010). Such transmission necessarily requires the infection of daughter tubers by sporangia produced on plant foliage, the survival of these infected tubers until the next season and, then, the emergence of diseased stems (Andriveau *et al.*, 2013). Because isolates aggressive to the foliage are expected to decrease the number and size of daughter tubers, and because these tubers should be severely blighted, the season-to-season transmission of these aggressive isolates through infected plants should be low. This prediction tends to be confirmed by the experiments of Pasco *et al.* (2015); plants infected by highly aggressive *P. infestans* isolates produced small tubers with low stem emergence rates. Such a trade-off between horizontal (plant to plant) and vertical (parent to offspring) transmission has been previously shown for several fungal, bacterial and virus species (Alizon *et al.*, 2009; van den Berg *et al.*, 2011). Coupled with the periodic absence of the host, this trade-off could generate polyphenism for aggressiveness in *P. infestans* populations, as predicted by simulation models (Castel *et al.*, 2014). This would account for the coexistence of highly pathogenic isolates, allocating resources to within-epidemic transmission (*e.g.* 8_A1 in this study), with isolates investing in between-epidemic transmission (*e.g.* 13_A2). Moreover, this trade-off model could also explain why clonal lineages of intermediate aggressiveness, such as 2_A1, can persist in populations over extended periods. Unfortunately, it was not possible to compare aggressiveness of isolates on cv. Bintje over all 8 years of the investigation owing to slight differences in phenotyping protocols during the study period. For example, isolates sampled in 2001–2002 were not compared to those from subsequent years because of differences in inoculum preparation.

The multiplication of inoculum on potato leaflets before inoculation, which was performed from 2004, had significant effects on aggressiveness of isolates; larger lesions formed and two to three times more spores were produced than previously for isolates belonging to the same clonal lineages. This confirms earlier observations of the restoration of pathogenicity to isolates that had been maintained as axenic cultures by multiplication on the host (Jinks & Grindle, 1963). However, the possibility of changes in aggressiveness within clonal lineages over time cannot be entirely excluded.

Although a complete comparison of aggressiveness over the whole investigation period could not be conducted, the data suggest selection for a lower aggressiveness between clones. Such a selection pattern is also likely to occur within clones. For example, among the isolates collected in 2004–2005, those belonging to lineage 13_A2 caused larger lesions than the other MLLs (but with a much lower spore production), whereas for the period 2006–2008, 13_A2 isolates gave the smallest lesions. It would be interesting to analyse the temporal evolution of aggressiveness within clones through the course of invasion/lineage replacement, in particular for the 13_A2 and 6_A1 MLLs, currently dominant in the West European populations. Surveys of French populations after 2008 have been continued, and isolates from these same MLLs have also been collected in other parts of Europe. The analysis of these temporal evolutions within clones will be the topic for another, companion study.

In the present investigation, 13_A2 isolates had low levels of aggressiveness, particularly those collected during the period 2006–2008; this may seem surprising because this clonal lineage is generally described as very aggressive (Cooke *et al.*, 2012). However, different testing conditions and host cultivars were used, making it difficult to make direct comparisons between the present data and those of Cooke *et al.* (2012). Nevertheless, there are several possible explanations of these differences. First, phenotypic variability is known to exist between isolates within the same clonal lineage, particularly when they are genetically diverse such as 13_A2; therefore it is necessary to test a high number of isolates to take into account this diversity. In the present study, more than 800 isolates were tested for pathogenicity on potato leaves, including 73 isolates belonging to the 13_A2 MLL. Thus, this collection may more fully represent the phenotypic variation within this lineage than the

six 13_A2 isolates included in the experiments of Cooke *et al.* (2012). It is also possible that isolates belonging to the same genotype but from different areas present phenotypic differences: for instance, French 13_A2 isolates could be less aggressive than British ones. A simple comparison of their respective levels of aggressiveness with the same protocol could test this hypothesis. Another difference is that the studies measured different traits; Cooke *et al.* (2012) were interested in latent period and lesion growth rate, whereas lesion size and spore production were measured in the present investigation. Even if lesion expansion and latent period are linked (Andrade Piedra *et al.*, 1998), measurement of the different parameters may lead to different conclusions. Finally, the conditions under which the experiments were conducted in the different studies, such as the incubation temperature or the tested hosts, will also have influenced the results obtained. It is indeed noteworthy that the aggressive advantage of 13_A2 over other dominant clonal lineages was especially evident at suboptimal temperatures, whereas all isolates and clones were tested at optimal temperatures during the present study. However, even using different temperatures with the present protocols led to observations of the lower aggressiveness of 13_A2 compared to other genotypes (N. Mariette *et al.*, unpublished data), so temperature may not have been the main reason for the contrasting results of the two studies.

This investigation focused on the link between aggressiveness levels of *P. infestans* clonal lineages and their evolutionary success in the pathogen population. Other traits, such as fungicide resistance or response to climatic factors, which may be important for fitness were not considered in this study. Late blight epidemics are mainly controlled by applying fungicides, with up to 10–15 sprays over the cropping season (Fry, 2008). This could exert a selection pressure on a pathogen's population and isolates with greater fungicide resistance may outcompete others. For example, 13_A2 isolates are generally phenylamide-resistant (Cooke *et al.*, 2014), suggesting a link between this resistance and the fast propagation of this clone from 2004. However, the use of phenylamide products is now very limited in France and the resistance of 13_A2 to these fungicides may be coincidental (Gisi *et al.*, 2011). No clear associations between fungicide resistance and major clonal lineages have been reported so far, making it difficult to know the importance of fungicide use on the evolutionary success of certain clones.

Several climatic factors, such as temperature and moisture, are known to impact the potato late blight epidemics and could also affect the composition of *P. infestans* populations. For instance, epidemics that are favoured by moderate temperatures and high humidity are greatly limited by high temperatures and drought (Harrison, 1992). A variability of response to climatic factors has been recently shown in *P. infestans*, notably between different clonal lineages (Shakya *et al.*, 2015). Therefore, some clones could be favoured (or disadvantaged) under certain climatic conditions. For example, if 8_A1 isolates were not adapted to high temperatures, this could explain the drastic diminution of their frequency after the hot year of 2003. Interestingly, this clone, which has nearly disappeared from France and Great Britain since 2006 (Cooke *et al.*, 2012), is still dominant in Northern Ireland (Cooke *et al.*, 2014), suggesting it performs better at milder temperatures. Conversely, 13_A2 isolates could be favoured by the high temperatures recorded in recent years in West Europe (<http://www.weatheronline.co.uk>); for example, in the high temperatures of 2007, this clone propagated rapidly in France. In addition, such an adaptation for high temperatures could explain the low spread of 13_A2 in East Europe, as suggested by Chmielarz *et al.* (2014). The quantification of the effects of temperature on current European clonal lineages of *P. infestans* would help to determine how dependent the population composition is on climatic sequences. Such information would be particularly important in the current context of global warming.

Acknowledgments

We thank J.E. Chauvin, D. Ellissèche, R. Pellé, D. Detourné, L. Dubois, S. Duvauchelle, J.M. Abiven, C. Masclez, J. Le Mouellic, J. Petton, Y. Pouliquen, P. Laty and C. Chatot for help with *P. infestans* sampling. We express our thanks to A. Viard and E. Lesné for their help with isolate maintenance and biological experiments. We are grateful to the INRA Genetic Ressources Center BrACySol (Ploudaniel, France) and the Experimental Unity of RGCO (Ploudaniel, France) for providing the plant material used in the tests. N. Mariette is supported by a PhD grant from Bretagne-Plants, acting on behalf of the ACVNPT (Association des Créateurs de Variétés Nouvelles de Pomme de Terre). Financial support from the projects Blight-Mop (EU QLK5-CT-2000-01065), BioExploit (EU FOOD-CT-2005-513959),

Emerfundis (ANR-07-BDIV-0003) and ARIMNET PoH-MED (ANR-12-AGRI-0009) for the collection of data are gratefully acknowledged.

References

- Agapow PM, Burt A, 2001. Indices of multilocus linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Notes* **1**, 101–102.
- Alizon S, Hurford A, Mideo N, Van Baalen M, 2009. Virulence evolution and the trade-off hypothesis: history, current state of affairs and the future. *Journal of Evolutionary Biology* **22**, 245–259.
- Anderson RM, May RM, 1982. Coevolution of hosts and parasites. *Parasitology* **85**, 411–426.
- Andrade Piedra JL, Forbes GA, Fry WE, Nelson R, 1998. Parasitic fitness and temperature response of new lineages of *Phytophthora infestans* from Peru. CIP Program Report 1997–98, 77–82.
- Andrison D, 1993. Nomenclature for pathogenicity and virulence: The need for precision. *Phytopathology* **83**, 889–890.
- Andrison D, Pilet F, Montarry J, Hafidi M, Corbière R, Achbani EH, Pellé R, Ellissèche D, 2007. Adaptation of *Phytophthora infestans* to partial resistance in potato: evidence from French and Moroccan populations. *Phytopathology* **97**, 338–343.
- Andrison D, Montarry J, Corbière R, Pasco C, Glais I, Marquer B, Clément JAJ, Castel M, Hamelin FM, 2013. The hard life of *Phytophthora infestans* : when trade-offs shape evolution in a biotrophic plant pathogen. *Plant Pathology* **62**, 28–35.
- Antonovics J, Alexander HM, 1989. The concept of fitness in plant-fungal pathogen systems. In Leonard KJ, Fry WE, eds. *Plant Disease Epidemiology: Genetics, Resistance, and Management*. New York, USA: McGraw-Hill, 185–214.
- Arnaud-Haond S, Migliaccio M, Diaz-Almela E, Teixeira S, van de Vliet MS, Alberto F, Procaccini G, Duarte CM, Serrão EA, 2007. Vicariance patterns in the Mediterranean Sea: east-west cleavage and low dispersal in the endemic seagrass *Posidonia oceanica*. *Journal of Biogeography* **34**, 963–976.

- Castel MK, Mailleret L, Andrivon D, Ravigné V, Hamelin FM, 2014. Allee effects and the evolution of polymorphism in cyclical parthenogens. *American Naturalist* **18**, E75-E88.
- Chmielarz M, Sobkowiak S, Dębski K, Cooke DEL, Brurberg MB, Śliwka J, 2014. Diversity of *Phytophthora infestans* from Poland. *Plant Pathology* **63**, 203–211.
- Chowdappa P, Kumar BJN, Madhura S, Kumar SPM, Myers KL, Fry WE, Cooke DEL, 2015. Severe outbreaks of late blight on potato and tomato in South India caused by recent changes in the *Phytophthora infestans* population. *Plant Pathology* **64**, 191–199.
- Cooke DEL, Cano LM, Raffaele S, Bain RA, Cooke LR, Etherington GJ, Deahl KL, Farrer RA, Gilroy EM, Goss EM, Grünwald NK, Hein I, MacLean D, McNicol JW, Randall E, Oliva RF, Pel MA, Shaw DS, Squires JN, Taylor MC, Vleeshouwers VGAA, Birch PRJ, Lees AK, Kamoun S, 2012. Genome analyses of an aggressive and invasive lineage of the Irish potato famine. *PLoS Pathogens* **8**, e1002940.
- Cooke LR, Quinn L, Nugent P, Walker E, 2014. The potato blight population in Northern Ireland in 2012: ongoing changes and fungicide performance. In: Schepers HTAM, ed. *Proceedings of the Fourteenth Euroblight Workshop*, PPO-Special Report 16, Limassol, Cyprus, 145–152.
- Day JP, Shattock RC, 1997. Aggressiveness and other factors relating to displacement of populations of *Phytophthora infestans* in England and Wales. *European Journal of Plant Pathology* **103**, 379–391.
- Delgado RA, Monteros-Altamirano AR, Li Y, Visser RGF, van der Lee TAJ, Vosman B, 2013. Large subclonal variation in *Phytophthora infestans* populations associated with Ecuadorian potato landraces. *Plant Pathology* **62**, 1081–1088.
- Dorken ME, Eckert CG, 2001. Severely reduced sexual reproduction in northern populations of a clonal plant, *Decodon verticillatus* (Lythraceae). *Journal of Ecology* **89**, 339–350.
- Excoffier L, Smouse PE, 1994. Using allele frequencies and geographic subdivision to reconstruct gene trees within a species-molecular variance parsimony. *Genetics* **136**, 343–359.
- Fisher MC, Henk DA, Briggs CJ, Brownstein JS, Madoff LC, McCraw SL, Gurr SJ, 2012. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* **484**, 186–194.

- Flier WG, Kroon LPNM, Hermansen A, van Raaij HMG, Speiser B, Tamm L, Fuchs JG, Lambion J, Razzaghian J, Andrivon D, Wilcockson S, Leifert C, 2007. Genetic structure and pathogenicity of populations of *Phytophthora infestans* from organic potato crops in France, Norway, Switzerland and the United Kingdom. *Plant Pathology* **56**, 562–572.
- Fry WE, Goodwin SB, Matuszak JM, Spielman LJ, Milgroom MG, Drenth A, 1992. Population genetics and intercontinental migrations of *Phytophthora infestans*. *Annual Review of Phytopathology* **30**, 107–129.
- Fry W, 2008. *Phytophthora infestans*: the plant (and R gene) destroyer. *Molecular Plant Pathology* **9**, 385–402.
- Gisi U, Walder F, Resheat-Eini Z, Edel D, Sierotzki H, 2011. Changes of genotype, sensitivity and aggressiveness in *Phytophthora infestans* isolates collected in European countries in 1997, 2006 and 2007. *Journal of Phytopathology* **159**, 223–232.
- Glais I, Montarry J, Corbière R, Pasco C, Marquer B, Magalon H, Andrivon D, 2014. Long-distance gene flow outweighs a century of local selection and prevents local adaptation in the Irish famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Evolutionary Applications* **7**, 442–452.
- Goss EM, Tabima JF, Cooke DEL, Restrepo S, Fry WE, Forbes GA, Fieland VJ, Cardenas M, Grünwald NJ, 2014. The Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans* originated in central Mexico rather than the Andes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 8791–8796.
- Hannukkala AO, Kaukoranta T, Lehtinen A, Rahkonen A, 2007. Late-blight epidemics on potato in Finland, 1933-2002; increased and earlier occurrence of epidemics associated with climate change and lack of rotation. *Plant Pathology* **56**, 167-176.
- Harrison JG, 1992. Effects of the aerial environment on late blight of potato foliage – a review. *Plant Pathology* **41**, 384–416.
- Haverkort AJ, Boonekamp PM, Hutten R, Jacobsen E, Lotz LAP, Kessel GJT, Visser RGF, van der Vossen EAG, 2008. Societal costs of late blight in potato and prospects of durable resistance through cisgenic modification. *Potato Research* **51**, 47–57.

- Hermansen A, Hannukkala A, Nærstad RH, Brurberg MB, 2000. Variation in populations of *Phytophthora infestans* in Finland and Norway: mating type, metalaxyl resistance and virulence phenotype. *Plant Pathology* **49**, 11-22.
- Hohl HR, Iselin K, 1984. Strains of *Phytophthora infestans* with A2 mating type behaviour. *Transactions of the British Mycological Society* **83**, 529–530.
- Jinks JL, Grindle M, 1963. Changes induced by training in *Phytophthora infestans*. *Heredity* **18**, 245–264.
- Johnson DA, 2010. Transmission of *Phytophthora infestans* from infected potato seed tubers to emerged shoots. *Plant Disease* **94**, 18–23.
- Kiezebrink DT, Shaw DS, 2006. Assessing resistance to late blight disease in new Sarpò clones. In: Westerdijk CE, Schepers HTAM, eds. *Proceedings of the Ninth Euroblight Workshop*, PPO-Special Report 11, Tallinn, Estonia, 29–34.
- Knapova G, Gisi U, 2002. Phenotypic and genotypic structure of *Phytophthora infestans* populations on potato and tomato in France and Switzerland. *Plant Pathology* **51**, 641–653.
- Lees AK, Wattier R, Shaw DS, Sullivan L, Williams NA, Cooke DEL, 2006. Novel microsatellite markers for the analysis of *Phytophthora infestans* populations. *Plant Pathology* **55**, 311–319.
- Li Y, van der Lee TAJ, Evenhuis A, van den Bosch GBM, van Bekkum PJ, Förch MG, van Gent-Pelzer MPE, van Raaij HMG, Jacobsen E, Huang SW, Govers F, Vleeshouwers VGAA, Kessel GJT, 2012. Population dynamics of *Phytophthora infestans* in the Netherlands reveals expansion and spread of dominant clonal lineages and virulence in sexual offspring. *G3; Genes/Genomes/Genetics* **2**, 1529–1540.
- McDonald BA, Linde C, 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* **40**, 349–379.
- Meirmans PG, Van Tienderen PH, 2004. Genotype and genodive: two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms. *Molecular Ecology Notes* **4**, 792–794.
- Montarry J, Andrivon D, Glais I, Corbiere R, Mialdea G, Delmotte F, 2010. Microsatellite markers reveal two admixed genetic groups and an ongoing displacement within the French population of the invasive plant pathogen *Phytophthora infestans*. *Molecular Ecology* **19**, 1965–1977.

- Montarry J, Corbiere R, Andrivon D, 2007. Is there a trade-off between aggressiveness and overwinter survival in *Phytophthora infestans*? *Functional Ecology* **21**, 603–610.
- Montarry J, Corbiere R, Lesueur S, Glais I, Andrivon D, 2006. Does selection by resistant hosts trigger local adaptation in plant-pathogen systems? *Journal of Evolutionary Biology* **19**, 522–531.
- Montarry J, Glais I, Corbiere R, Andrivon D, 2008. Adaptation to the most abundant host genotype in an agricultural plant-pathogen system - potato late blight. *Journal of Evolutionary Biology* **21**, 1397–1407.
- Nei M, 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* **89**, 583–590.
- Pasco C, Marquer B, Douchy H, Magalon H, Andrivon D, 2009. Aggressiveness and transmission: does a correlation exist in *Phytophthora infestans*? In: Schepers HTAM, ed. Proceedings of the 11th Euroblight Workshop, PPO- Special report 13, Hamar, Norway, 71–76.
- Peakall R, Smouse PE, 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* **6**, 288–295.
- R Core Team, 2014. R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing*, Vienna, Austria.
- Shakya SK, Goss EM, Dufault NS, van Bruggen AH, 2015. Potential effects of diurnal temperature oscillations on potato late blight with special reference to climatic change. *Phytopathology* **105**, 230–238.
- Sjöholm L, Andersson B, Högborg N, Widmark A-K, Yuen J, 2013. Genotypic diversity and migration patterns of *Phytophthora infestans* in the Nordic countries. *Fungal Biology* **117**, 722–730.
- Tantius PH, Fyfe AM, Shaw DS, Shattock RC, 1986. Occurrence of the A2 mating type and self-fertile isolates of *Phytophthora infestans* in England and Wales. *Plant Pathology* **35**(4), 578–581.
- van den Berg F, Bacaer N, Metz JAJ, Lannou C, van den Bosch F, 2011. Periodic host absence can select for higher or lower parasite transmission rates. *Evolutionary Ecology* **25**, 121–137.

Supporting Information

Table S1. Allele frequencies for microsatellite markers in 1274 French isolates of *Phytophthora infestans* collected from 2001 to 2008.

SSR Locus	Allele	Allele frequency								Gene diversity (H)
		2001 (n=42)	2002 (n=67)	2004 (n=279)	2005 (n=319)	2006 (n=271)	2007 (n=200)	2008 (n=96)	Overall (n=1274)	
Pi02	152	0.417	0.417	0.309	0.370	0.245	0.366	0.064	0.263	0.62
	158	0.000	0.000	0.000	0.004	0.000	0.000	0.000	0.001	
	160	0.000	0.000	0.073	0.068	0.156	0.191	0.467	0.214	
	162	0.583	0.583	0.609	0.555	0.591	0.442	0.469	0.518	
	164	0.000	0.000	0.000	0.002	0.007	0.000	0.000	0.003	
	168	0.000	0.000	0.009	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
Pi33	198	0.000	0.000	0.000	0.015	0.003	0.003	0.000	0.027	0.59
	200	0.000	0.000	0.000	0.861	0.899	0.177	0.012	0.486	
	203	0.778	0.778	0.705	0.123	0.099	0.720	0.782	0.404	
	206	0.222	0.222	0.295	0.000	0.000	0.100	0.206	0.083	
Pi04	162	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.026	0.000	0.006	0.56
	166	0.488	0.488	0.477	0.469	0.474	0.461	0.446	0.465	
	168	0.024	0.024	0.015	0.055	0.043	0.052	0.000	0.035	
	170	0.488	0.488	0.508	0.476	0.483	0.461	0.444	0.470	
	174	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.051	0.009	
	176	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.060	0.014	
Pi4B	205	0.214	0.214	0.302	0.070	0.121	0.088	0.465	0.207	0.63
	209	0.018	0.018	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	
	213	0.000	0.000	0.000	0.231	0.304	0.301	0.473	0.316	
	217	0.750	0.750	0.698	0.698	0.575	0.611	0.062	0.476	
Pi16	219	0.018	0.018	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.5
	170	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.003	0.001	
	174	0.084	0.084	0.000	0.017	0.006	0.000	0.000	0.008	
	176	0.410	0.410	0.485	0.406	0.357	0.448	0.486	0.430	
PiG11	178	0.506	0.506	0.515	0.577	0.637	0.550	0.512	0.561	0.76
	140	0.011	0.011	0.035	0.002	0.000	0.124	0.018	0.037	
	142	0.000	0.000	0.000	0.068	0.099	0.000	0.000	0.037	
	148	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.005	0.001	
	150	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.018	0.000	0.004	
	152	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000	
Pi56	154	0.312	0.312	0.123	0.372	0.439	0.399	0.455	0.394	0.49
	156	0.301	0.301	0.298	0.333	0.193	0.310	0.013	0.214	
	158	0.086	0.086	0.000	0.024	0.012	0.010	0.016	0.016	
	160	0.000	0.000	0.026	0.088	0.091	0.073	0.470	0.174	
	162	0.043	0.043	0.246	0.111	0.166	0.067	0.018	0.097	
	164	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.002	
	166	0.000	0.000	0.018	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	
	206	0.194	0.194	0.237	0.000	0.000	0.000	0.000	0.020	
	220	0.054	0.054	0.018	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	
	174	0.373	0.373	0.337	0.421	0.339	0.452	0.486	0.421	
Pi63	176	0.627	0.627	0.663	0.579	0.653	0.548	0.514	0.578	0.66
	178	0.000	0.000	0.000	0.000	0.008	0.000	0.000	0.002	
	148	0.263	0.263	0.207	0.310	0.330	0.381	0.041	0.265	
Pi70	151	0.368	0.368	0.384	0.295	0.236	0.355	0.471	0.335	0.44
	157	0.368	0.368	0.409	0.395	0.433	0.264	0.488	0.400	
	189	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.002	0.000	0.001	
	192	0.592	0.592	0.638	0.581	0.709	0.597	0.935	0.677	
Pi4G	195	0.408	0.408	0.362	0.399	0.291	0.400	0.065	0.317	0.61
	198	0.000	0.000	0.000	0.018	0.000	0.000	0.000	0.004	
	155	0.069	0.069	0.240	0.049	0.064	0.000	0.005	0.043	
	157	0.207	0.207	0.240	0.303	0.419	0.209	0.036	0.227	
	159	0.724	0.724	0.521	0.624	0.453	0.715	0.501	0.559	
	161	0.000	0.000	0.000	0.006	0.042	0.070	0.449	0.158	
	163	0.000	0.000	0.000	0.018	0.007	0.000	0.000	0.006	
	165	0.000	0.000	0.000	0.000	0.015	0.006	0.008	0.006	

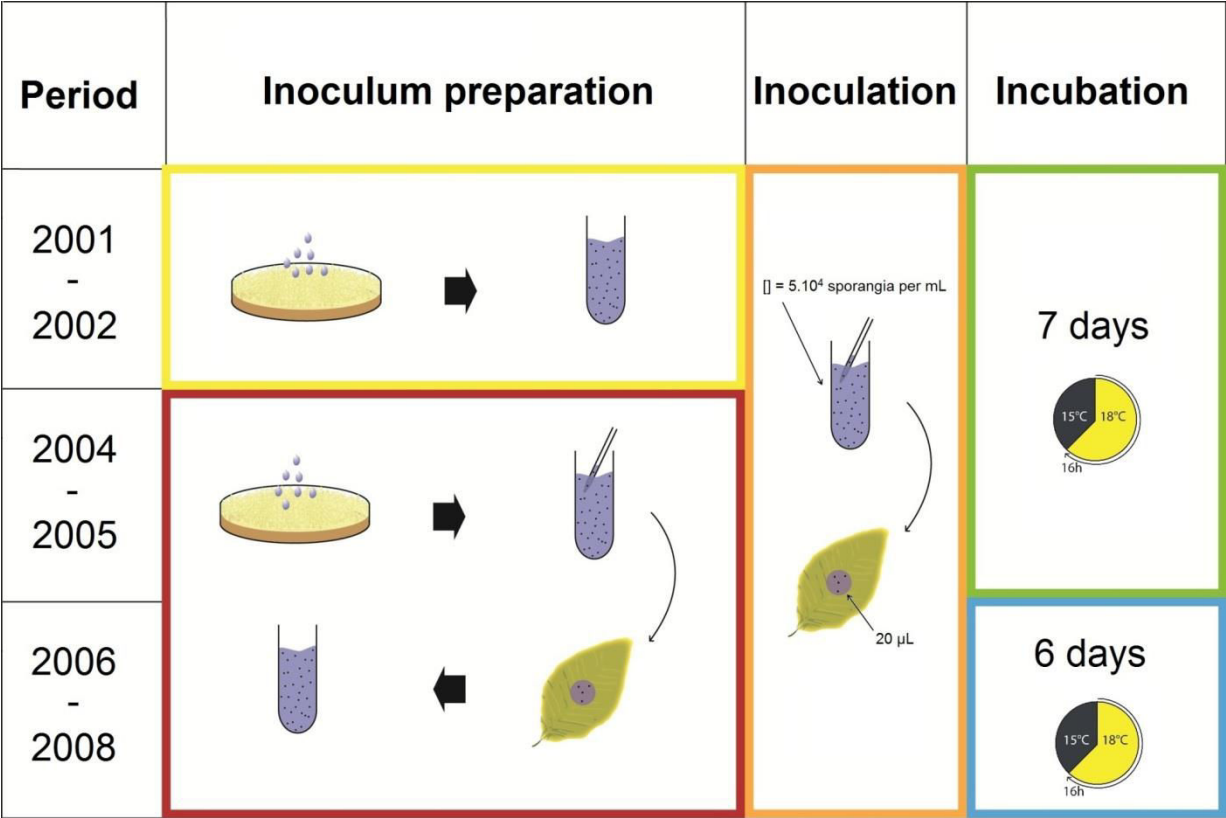


Figure S1. Schematic description of protocols used for assessment of aggressiveness of *Phytophthora infestans* isolates collected from 2001 to 2008.

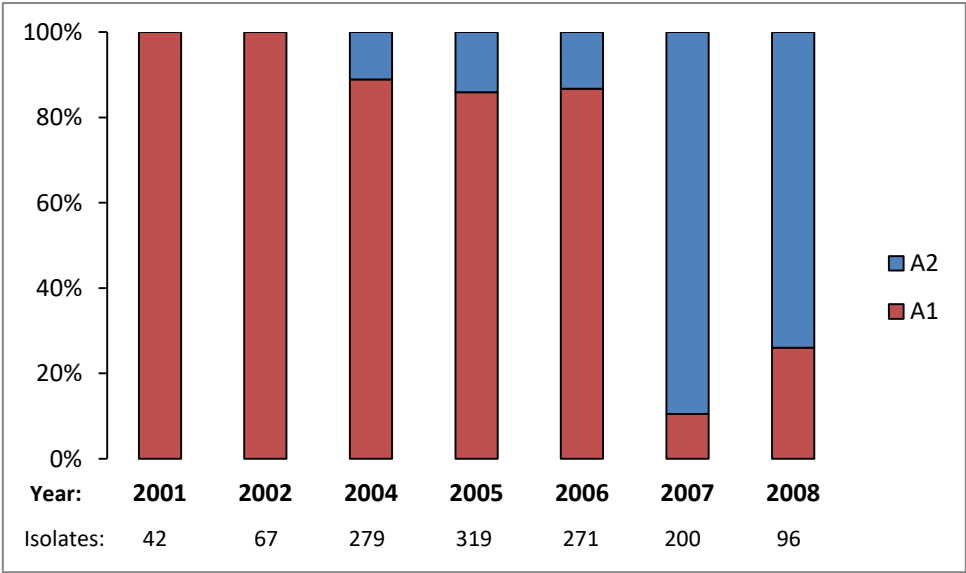


Figure S2. Figure S2. Mating type frequencies of *Phytophthora infestans* isolates collected in France from 2001 to 2008.

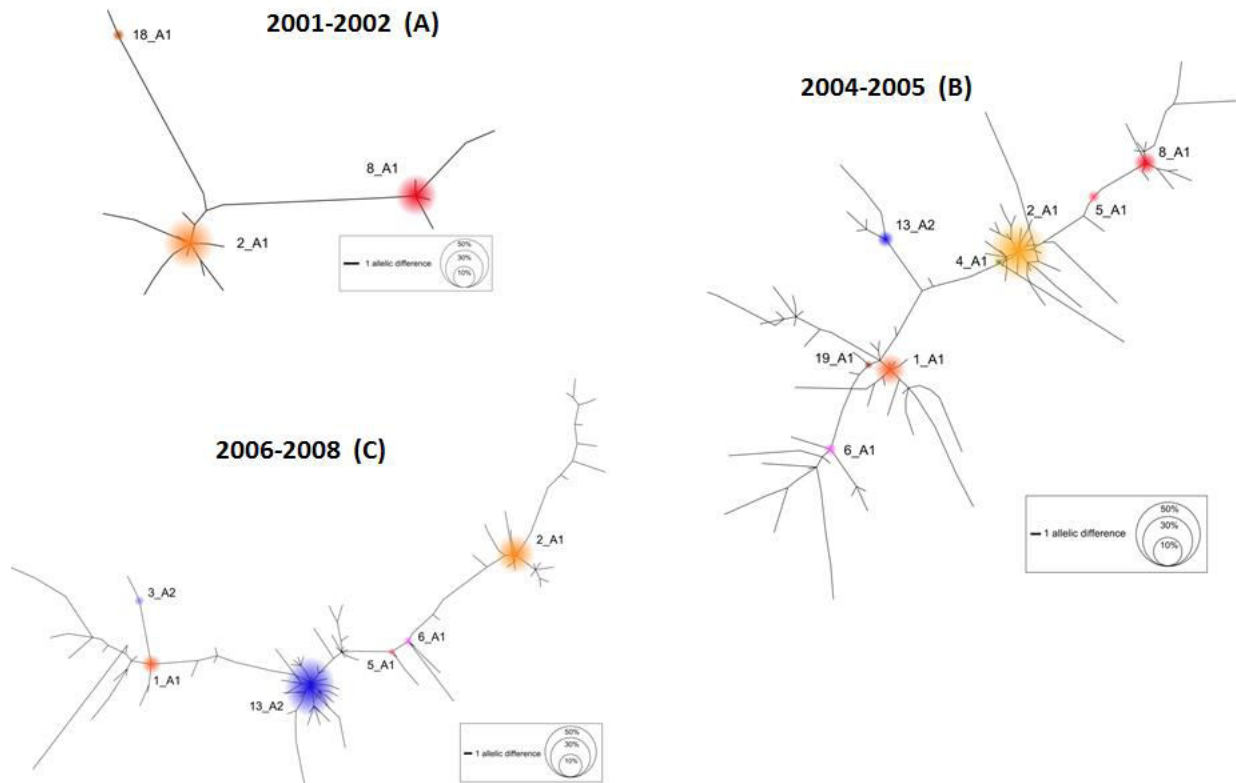


Figure S3. Minimum-spanning networks based on the alleles at 10 SSR loci, indicating the relatedness of the main MLLs of *Phytophthora infestans* for three periods; 2001–2002 (a), 2004–2005 (b) and 2006–2008 (c).

Chapitre 2

Agressivité et dynamiques locales chez *P. infestans*

1. Objectifs de travail

Nous avons vu, dans le chapitre 1, avec un suivi à long terme de populations françaises de *P. infestans* que l'hypothèse du 'toujours plus agressif' n'était pas vérifiée : les clones invasifs n'étaient en effet pas ceux qui étaient les plus agressifs. Etant donné que les clones agressifs devraient être favorisés pendant les épidémies, leur faible fitness pourrait donc s'expliquer par une contre-sélection de ces clones lors de la phase inter-épidémique. Cette hypothèse est d'autant plus probable que des travaux récents ont montré une plus faible transmission asexuée des isolats agressifs entre deux saisons de culture de la pomme de terre (Pasco *et al.* 2015). Par ailleurs, des modèles de simulation ont montré que l'existence d'un tel compromis évolutif (ou trade-off) chez *P. infestans*, cumulée avec l'absence périodique de son hôte, devait entraîner du polyphénisme pour l'agressivité au sein des populations de ce parasite (Hamelin *et al.* 2011 ; Castel *et al.* 2014). D'après ces modèles, certains isolats investiraient dans la transmission inter-épidémique (peu agressifs et présents au début des épidémies) tandis que d'autres investiraient dans la transmission intra-épidémique (agressifs et sélectionnés au cours des épidémies).

L'objectif du travail présenté dans ce chapitre était de déterminer si les deux patrons décrits par ces modèles étaient observés dans la nature, à travers un suivi d'une population locale de *P. infestans* pendant deux années successives dans un bassin de production situé dans les Côtes d'Armor (deux épidémies et la phase inter-épidémique). Les isolats, collectés tout au long de l'année, étaient génotypés à l'aide de marqueurs microsatellites et phénotypés pour des traits liés à l'agressivité.

Si nous avons observé la présence de deux clones ultra-majoritaires (6_A1 et 13_A2), d'effectifs comparables, avec des évolutions de fréquences semblables à celles prédites par les modèles de simulation (Hamelin *et al.* 2011 ; Castel *et al.* 2014), leurs niveaux d'agressivité ne correspondaient pas aux prédictions. Par ailleurs, il s'est avéré que ces deux clones avaient des stratégies de reproduction opposées, les isolats 6_A1 produisaient de nombreux sporanges de petite taille tandis que les isolats 13_A2 en produisaient des grands sporanges en plus faible quantité. Enfin, la présence de clones minoritaires, trouvés uniquement sur les repousses de pomme de terre mais pas dans les champs cultivés,

pourrait suggérer que les repousses jouent un rôle de réservoir de diversité en plus de représenter une source d’approvisionnement de l’inoculum primaire.

Les résultats rapportés dans ce chapitre font l’objet d’une publication, soumise à *Phytopathology* en novembre 2015.

2. Article 2

Aggressiveness and local temporal dynamics of *Phytophthora infestans* clones: consequences of the trade-off between epidemic fitness and survival

Nicolas Mariette, Romain Mabon, Josselin Montarry, Roselyne Corbière, Bruno Marquer, Annabelle Androdias and Didier Andrivon*

INRA, UMR1349 IGEPP (Institute of Genetics, Environment and Plant Protection), Domaine de la Motte, BP 35327, F-35653, Le Rheu Cedex, France.

*Corresponding author e-mail: didier.andrivon@rennes.inra.fr

Abstract

Trade-offs between pathogenicity and transmission are an essential assumption in the modern theory of pathogen evolution. Such trade-offs should have strong effects on the temporal changes in pathogenicity in pathogen populations polyphenic for aggressiveness, both within epidemics (selection for increased aggressiveness during epidemics) and between epidemic seasons. We attempted to prove the existence of such patterns through a two-year survey of a single *P. infestans* population from western France. Microsatellite profiles showed that this population was composed of two prevalent clonal lineages, 6_A1 and 13_A2, and of several minor clones present almost exclusively between epidemics on potato volunteers. 6_A1 isolates were sampled repeatedly throughout the survey period, from both crops and volunteers, whereas 13_A2 isolates appeared later and were present only during epidemics. However, contrary to expectations, 6_A1 isolates were more aggressive than 13_A2 ones, producing larger lesions and more sporangia per infected unit area. Interestingly, 6_A1 isolates also had significantly smaller spores than their 13_A2 counterparts, suggesting that 6_A1 isolates might be r-strategists whereas 13_A2 might be K-strategists. The presence of minor clones only on volunteers suggests that these plants could serve both as a carry-over source for primary infections and as a diversity reservoir.

Introduction

The oomycete *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, which causes late blight in several Solanaceous species, is regarded as one of the most serious plant pathogens (Kamoun *et al.* 2015). Late blight indeed represents a great threat for potato production worldwide (Fisher *et al.* 2012; Haverkort *et al.* 2008) and has notably been at the origin of the Great Irish Famine in the nineteenth century (Zadoks 2008). With seven countries classified in the world's top ten producers of potatoes (FAOSTAT), Europe is very impacted by this devastating disease. Late blight annually costs over \$900 million to European potato production, counting both crop losses and management costs (Haverkort *et al.* 2008).

P. infestans is a diploid, hemibiotrophic, and heterothallic organism with two mating types (A1 and A2). Originating from Central Mexico (Goss *et al.* 2014), this pathogen was introduced into Europe in 1844. This introduction was followed by several waves of migration, notably in the 1940–1950s (Gómez-Alpizar *et al.* 2007; Ristaino *et al.* 2001) and in the 1970s following the import of large cargoes of potatoes from Mexico and North America (Flier and Turkensteen 1999). This last migration wave has caused major changes in the genetic structure of European populations of *P. infestans*, as the newly introduced genotypes quickly displaced the then dominant clone, US-1 (Day and Shattock 1997; Goodwin *et al.* 1994; Spielman *et al.* 1991). Moreover, this migration wave into Europe included isolates with the A2 mating type (Drenth *et al.* 1995), making possible the sexual reproduction of the pathogen in an area where only isolates with the A1 mating type were present before. While evidences of an active sexual reproduction within the *P. infestans* populations of Northern Europe are now available, with notably high genetic diversities and the observed presence of oospore formation in the field (Sjöholm *et al.* 2013; Yuen and Andersson 2013), the situation is markedly different in Western Europe where the populations still remain clonal with rare sexual events (Cooke *et al.* 2012; Mariette *et al.* in press; Montarry *et al.* 2010). The use of powerful microsatellite markers (Knapova and Gisi 2002; Lees *et al.* 2006; Li *et al.* 2013) revealed that these clonal populations are subject to frequent selective sweeps. While different clonal lineages such as 2_A1, 8_A1 or 5_A1 dominated at the end of 1990's-beginning of 2000's (Cooke *et al.* 2012; Mariette *et al.* in press), the past few years have seen the emergence and expansion of two other lineages, 6_A1 and 13_A2, in the potato production regions of Western Europe (Cooke *et al.* 2012; Li

et al. 2012). First observed in 2003-2004, these clonal lineages made up the majority (*i.e.* 77%) of late blight isolates sampled in Western Europe in 2014 (Euroblight.net), suggesting a high fitness of 6_A1 and 13_A2 isolates.

Fitness is the measure of reproductive success (Antonovics and Alexander 1989). In plant pathogens, it can be defined as the ability of the parasite to survive, reproduce and cause disease (Agrios, 2005). Aggressiveness, which represents the quantity of disease induced to the host after infection with a compatible pathogen (Andrison 1993), is therefore thought to be significant in the epidemic fitness of particular *P. infestans* isolates or clonal lineages (Day and Shattock 1997). Indeed, in a polycyclic disease, high sporulation capacity or high lesion growth rate should lead to a high reproductive success of the pathogen. Earlier work reported the selection of aggressive *P. infestans* isolates during a late blight epidemic (Andrison *et al.* 2007; Gisi *et al.* 2011), which seems to validate the positive correlation between aggressiveness and epidemic fitness. Nevertheless, the survey of French populations of *P. infestans* over eight years (2001-2008) has shown that the invasiveness of clonal lineages was not associated with higher aggressiveness (Mariette *et al.* in press). To explain these results, we hypothesized that the most aggressive isolates could be disadvantaged at some point of their life cycle, for instance by suffering a lower transmission rate from one epidemic to the next.

In temperate areas like Western Europe, where *P. infestans* behaves as a fully biotrophic pathogen because it is mainly transmitted asexually between epidemics through volunteer or seed tubers (Govers *et al.* 1997; Zwankhuizen *et al.* 2000), a trade-off between aggressiveness and inter-epidemic transmission is hence likely. To ensure the pathogen's transmission, tubers infected during an epidemic must survive until the next cropping period and produce diseased stems (Andrison *et al.* 2013). One can thus suppose that highly aggressive isolates would exhaust their host tubers too quickly and kill them before sprout (Montarry *et al.* 2007). In a set of experiments where two critical phases in epidemic carry-over through asexual transmission of the pathogen-tuber infection from foliage lesions and production of diseased stems from infected tubers were investigated, the most aggressive isolates had indeed a lower transmission rate than less aggressive ones, primarily because they increased stem mortality before emergence and reduced the weight of infected tubers (Pasco *et al.* in press). This confirms the existence of a trade-off between aggressiveness and transmission in *P. infestans*.

Recent theoretical work, based on the assumption of a trade-off between aggressiveness and inter-epidemic survival, predicts that the periodic absence of hosts could generate the coexistence of isolates with different life-history strategies within a single pathogen population (Castel *et al.* 2014; Hamelin *et al.* 2011). According to these models, both highly aggressive isolates allocating their resources to within-epidemic transmission and less aggressive isolates investing in between-epidemic transmission can coexist within populations provided the trade-off shape is convex. The models also indicated that the relative frequencies of both morphs should vary over time: the less aggressive isolates would be expected to predominate at the start of epidemics (because of their good inter-epidemic transmission rate) but would then decrease in frequency in favour of the highly aggressive isolates selected during the epidemics (due to lower epidemic fitness and increased competition with highly aggressive isolates).

Here, we aimed to test in a natural population the predictions of models formulated from the trade-off between aggressiveness and inter-epidemic in *P. infestans*. To this end, we monitored a population during two successive years in a small potato production area, taking into account the full pathogen's life cycle. Isolates were thus sampled both during the epidemic stages, on cultivated potatoes, and during the survival stage on potato volunteers. All isolates were genetically characterized using a set of polymorphic microsatellite markers, and phenotyped for traits linked to aggressiveness to potato. We expected to sample less aggressive isolates in the early stages of epidemics and on volunteers, and increasingly aggressive isolates as the epidemics progress.

Materials and Methods

P. infestans isolates

We monitored during two consecutive years (2013 and 2014) the *P. infestans* population in a small potato production area located in Côtes d'Armor (Brittany, France; Fig. 1). This sampling area was chosen because potato is grown there for a large part of the year (from February to August) as both early and ware potato crops. Moreover, the oceanic climate of this area, marked by mild temperatures and relatively abundant rainfall throughout the year (Fig. S1), is generally favourable to late blight and allows the winter survival of tubers

remaining in the soil. We were thus able to continuously monitor late blight over the two years thanks to frequent samplings during and between the potato cropping periods, on cultivated potatoes and on volunteers. At each sampling date, up to 10 leaflets with a single late blight lesion each, haphazardly chosen, were collected in each field. This number could nevertheless not be reached on every visit, especially when sampling volunteers or early potato crops during the first half of 2013, as the low temperatures and precipitations during this period (Fig. S1) limited late blight development. Overall, 313 samples were collected in 28 different potato fields (Fig. 1; Table 1).

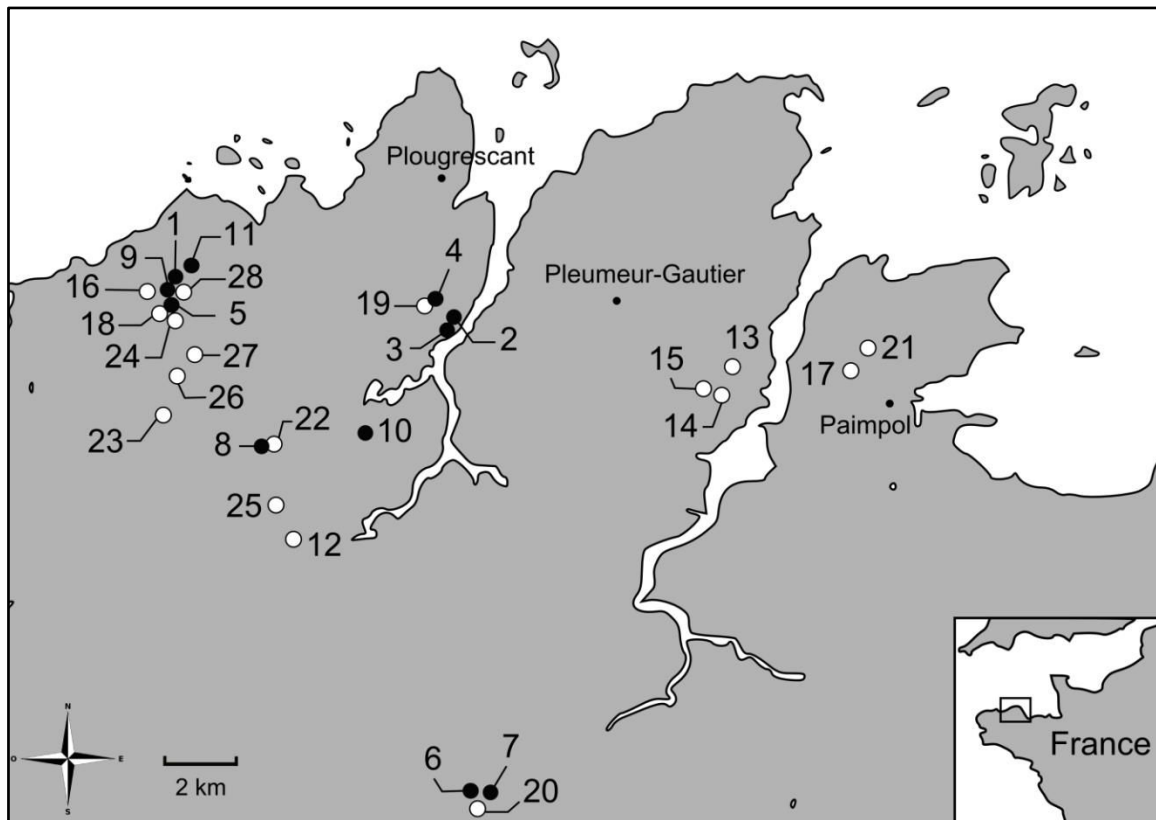


Fig. 1 Geographic locations of potato fields sampled during this study. Fields in which *P. infestans* isolates were sampled in both 2013 and 2014 (on cultivated potatoes and volunteers, respectively) are shown as black dots; fields in which *P. infestans* isolates were sampled in 2014 only (on cultivated potatoes) are shown as white dots.

Table 1. Potato fields sampled during the study period (2013-2014) in the potato production area of Côtes d'Armor (Brittany, France). Potato category, potato cultivar planted and its correspondent level of late blight susceptibility are indicated for each field. Numbers of isolates collected are indicated for each field and each year (2013 and 2014).

Field	Potato category	Variety	Foliage late blight susceptibility	GPS position		No. Isolates		
				Lat.°N	Long. °W	2013	2014	Total
1	Early potato	Charlotte	Moderately susceptible*	48.8156	-3.33131	10	–	10
2	Ware potato	Nicola	Fairly susceptible*	48.80584	-3.22325	8	–	8
3	Ware potato	Nicola	Fairly susceptible*	48.80569	-3.22297	12	–	12
4	Ware potato	Nicola	Fairly susceptible*	48.8099	-3.22782	11	2	13
5	Ware potato	Bintje	Susceptible*	48.81008	-3.33192	16	2	18
6	Ware potato	Annabelle	Susceptible*	48.68603	-3.21464	2	3	5
7	Ware potato	Galante	Susceptible*	48.68573	-3.20931	2	–	2
8	Ware potato	Nicola	Fairly susceptible*	48.77452	-3.29527	15	–	15
9	Ware potato	Up to date	Susceptible**	48.81409	-3.33205	23	–	23
10	Ware potato	Vitelotte noire	Susceptible*	48.77786	-3.25529	5	–	5
11	Ware potato	Bintje	Susceptible*	48.82027	-3.32319	27	1	28
12	Early potato	Amandine	Fairly susceptible*	48.75814	-3.28333	–	2	2
13	Early potato	Lady Christl	Fairly susceptible*	48.79155	-3.11624	–	9	9
14	Early potato	Lady Christl	Fairly susceptible*	48.78988	-3.11748	–	4	4
15	Early potato	Lady Christl	Fairly susceptible*	48.79035	-3.12064	–	15	15
16	Early potato	Lady Christl	Fairly susceptible*	48.81233	-3.33912	–	2	2
17	Early potato	Amandine	Fairly susceptible*	48.79271	-3.06701	–	3	3
18	Early potato	Amandine	Fairly susceptible*	48.81002	-3.33261	–	25	25
19	Ware potato	Nicola	Fairly susceptible*	48.80995	-3.22779	–	22	22
20	Ware potato	Nicola	Susceptible*	48.68337	-3.21221	–	17	17
21	Early potato	Lady Christl	Fairly susceptible*	48.79959	-3.05996	–	19	19
22	Ware potato	Nicola	Fairly susceptible*	48.77458	-3.29479	–	1	1
23	Early potato	Corolle	Moderately susceptible*	48.78654	-3.33813	–	1	1
24	Ware potato	Cherie	Susceptible*	48.80887	-3.33077	–	14	14
25	Ware potato	Charlène	Susceptible*	48.75839	-3.29037	–	14	14
26	Ware potato	Up to date	Susceptible**	48.79239	-3.32909	–	18	18
27	Ware potato	Annabelle	Susceptible*	48.79703	-3.32271	–	7	7
28	Ware potato	Nicola	Fairly susceptible*	48.78984	-3.05867	–	1	1

Single-lesion isolates were obtained by placing a fragment of infected leaf tissue on tuber slices of the susceptible potato cultivar Bintje. After incubation for four to eight days at 15°C in growth chambers, pure cultures were established by transferring the hyphal tips growing through the slices onto dishes of pea agar supplemented with 200 mg.L⁻¹ ampicillin, 30 mg.L⁻¹ rifamycin, and 0.4 mL.L⁻¹ pimarinic. After about 10 days, growing colonies were transferred to fresh pea agar without antibiotics, and subsequently maintained at 15°C, in darkness. The cultures were transferred to fresh medium every five weeks until phenotypic characterization or DNA extraction.

Genotyping

DNA extraction

Pure cultures were grown separately in liquid pea broth, previously autoclaved for 20 min at 120°C and cooled to room temperature. After three weeks of incubation at 15°C in darkness, mycelium was harvested, washed three times in sterile water, dried on sterile paper and lyophilized. DNA was then extracted from lyophilized mycelium using the NucleoSpin® Tissue kit (Macherey-Nagel GmbH and Co, Düren, Germany) according to the manufacturer's instructions. DNA concentration and purity were estimated using a Nanodrop® ND-1000 (Fisher Scientific, Illkirch, France).

SSR amplification

Sixteen polymorphic microsatellite loci were analysed among a total of 17 amplified for allele detection. The markers PiG11, Pi4B, Pi4G (Knapova and Gisi 2002), D13, Pi04, Pi16, Pi56, Pi63, Pi70 (Lees *et al.* 2006), PinfSSR2, PinfSSR3, PinfSSR4, PinfSSR6a, PinfSSR7, PinfSSR8 and PinfSSR11 (Li *et al.* 2013) were polymorphic, whereas the microsatellite locus Pi33 (Lees *et al.* 2006) was monomorphic across all isolates. PCR amplifications were performed using the Type-it Microsatellite PCR kit from Qiagen (Hilden, Germany) in reaction volumes of 5 µL containing 10 ng of *P. infestans* DNA and 2.5 µL of master mix using the same primer sets. Reactions were performed in a BioRad C1000 thermocycler under the following conditions: each reaction started with a denaturation step of 5 min at 95°C; 30 cycles of 30 s at 95°C, 90 s at 58°C and 30 s at 72°C; and finally one elongation step of 30 min at 60°C. In order to detect simultaneously the alleles at several loci, the primers used were

labelled with one of the four fluorescent dyes: FAM (D13, PinfSSR8, Pi63, and PinfSSR7), NED (PiG11, PinfSSR3, PinfSSR11, Pi4G, and PinfSSR4), VIC (Pi04, Pi70, Pi16 and PinfSSR6a) and PET (PinfSSR2, Pi4B and Pi56). Amplification products were pooled into two multiplex panels, based on expected allele sizes: D13, PinfSSR8, Pi04, Pi70, PiG11, PinfSSR3, PinfSSR11, PinfSSR2 and Pi4B (panel 1) and PinfSSR7, Pi63, Pi16, PinfSSR6a, Pi4G, PinfSSR4 and Pi56 (panel 2). Eight μL samples comprising a loading buffer containing a mix of 5 μL Hi-Di™ deionized formamide (Applied Biosystems), a 500 LIZ size standard (Applied Biosystems) and 3 μL of 150-fold dilutions of the multiplexed PCR products were loaded into an ABI prism 3130xl DNA sequencer, run according to manufacturer's instructions (Applied Biosystems). The GeneMapper™ 3.5 software was used to automatically size the labelled DNA fragments, and allele sizes were calibrated using reference isolates kindly supplied by Drs A.K. Lees and D.E.L. Cooke (James Hutton Institute, Dundee, Scotland). To minimize the risk of genotyping errors, a second round of genotyping was performed for about 10% of randomly chosen isolates. These replicate tests gave results consistent with the original identifications.

Mating type characterization

Mating types were determined using pairing tests with known testers (*e.g.* Montarry *et al.* 2010). Briefly, an agar plug obtained from the edge of an actively growing colony of each isolate was transferred to pea agar on one side of a Petri dish and a similar agar plug of a known A1 or A2 tester isolate was placed on the other side. The plates were incubated in the dark at 15°C for 10–14 days and the contact zone of the two colonies was observed under a microscope for the presence of oospores. When oospores were formed in the Petri dish with the A1 tester, the isolate was rated as A2 mating type, and vice-versa.

Aggressiveness characterization

Plant material

As the *P. infestans* isolates were all sampled from potato cultivars susceptible to foliage late blight (Table 1), and given the general adaptation in French populations of the pathogen to the susceptible cv. Bintje (Montarry *et al.* 2008b), inoculum preparation and aggressiveness quantification were performed on detached leaflets of this cultivar. Plants were grown from certified seed tubers in 13-cm pots (one tuber per pot) filled with 1:1:1 sand-peat-compost

mixture placed in a glasshouse regulated at 15-20°C (night/day temperatures) with 16h of photoperiod. Once a week, plants were watered with a nutrient solution (Hakaphos; NPK 15/10/15). For inoculum preparation and aggressiveness quantification, leaflets of similar size were picked from the median area of 5- to 7-week-old plants.

Inoculum preparation

Maintaining isolates as axenic cultures can alter their pathogenicity, which can however be restored by re-infecting leaf tissue (Jinks and Grindle 1963). Each isolate was therefore multiplied separately on detached leaflets to produce the inoculum used for aggressiveness tests. For this purpose, droplets of sporangial suspensions, prepared by flooding with sterile water and scrapping the colony surface from 3- to 4-week-old pea agar cultures, were deposited on the abaxial side of detached leaflets of potato cv. Bintje. Before inoculation, sporangial suspensions were kept at 4°C for approximately 2 h to promote zoospore liberation. Inoculated leaflets were incubated in humid chambers for seven days under controlled conditions (15-20°C night/day temperatures, 16 h daylight). Subsequently, newly formed sporangia were washed from the leaflets in sterile water and the resulting suspensions were adjusted to a concentration of 5.10^4 sporangia.mL⁻¹ using a haemocytometer.

Aggressiveness quantification

For each isolate tested, six leaflets were placed in pairs, abaxial face up, onto the empty lids of inverted Petri dishes containing 10 g.L⁻¹ water agar and acting as humid chambers. A 20-μL droplet of sporangial suspension (about 1000 sporangia), prepared as described above, was deposited on the middle of each leaflet. The Petri dishes were kept in clear boxes and incubated in climatic chambers regulated at 15°C/20°C (night/day temperature) with a 16 h photoperiod.

Three aggressiveness components (latent period, lesion area and sporulation capacity) were quantified. In 2014, we also measured the width of sporangia as a proxy to sporangia size. The latent period (LP), which corresponds to the time separating inoculation from the first sporulation, was assessed by observing the leaflets daily under a magnifying glass to check the presence of sporangia. Six days after inoculation, we measured the two

diameters (one along the midrib and one perpendicular to it) of the sporulating lesion on each leaflet. The lesion area (LA) was then calculated from these measurements assuming an elliptic shape. Immediately after measuring the lesion diameters, sporangia were washed from leaflets in 10 mL Isoton II (saline buffer; Beckman Coulter, Villepinte, France). Suspensions were kept in glass tubes at -20°C until sporangia counting in a Coulter Z2 counter (Beckman Coulter) equipped with a 100-µm aperture tube, allowing the determination of the number of sporangia produced on the lesion (SP). The sporulation capacity (SC), expressed in sporangia.mm⁻², was then calculated by dividing SP by the corresponding LA. SC is a better measure of aggressiveness than SP, which depends not only on isolate but also on leaflet size. Sporangia size (SS) was measured as the mean width of sporangia when they penetrate through the hole of the aperture tube, obtained from the size distribution data displayed by the Coulter Z2 counter. Aggressiveness tests were carried out in two batches: the first one took place in September 2013 and included the isolates sampled in 2013; whereas the second one, in September 2014, involved the isolates collected in 2014.

Data analyses

Genotypic data

The analysis of the variation in microsatellite loci (Table 2) revealed that, for some loci, a large number of *P. infestans* isolates showed more than the two alleles expected in a diploid species. This could result from aneuploidy or polyploidy (Delgado *et al.* 2013) and has been repeatedly reported in *P. infestans* (Cooke *et al.* 2012; Li *et al.* 2012; Mariette *et al.* in press). Due to this variation in allele numbers among individuals, we used the package Poppr 2.0.2 (Kamvar *et al.* 2014) in the software R 3.2.2 (R Core Development Team 2014) to analyse the microsatellite data, as it can accommodate polyploid genetics. Basic measures of genetic diversity such as the observed number of alleles, the Shannon's information index per locus (Lewontin 1972) and the gene diversity per locus (Nei 1978) were performed on the global dataset using Poppr. Poppr was also served used to identify the repeated MLGs, *i.e.* the isolates sharing the exact same alleles at all 16 microsatellite loci, and the number of copies of each MLG. MLG richness (R) within sampling year was estimated as the genotypic richness index proposed by Dorken and Eckert (2001). In order to eliminate the bias imposed by the

large asexual reproductive capacity and to avoid redundancy in the collection (Kumar *et al.* 1999), we constructed a “clone-corrected dataset” in which only one representative isolate per MLG was included. This data subset was used to analyse linkage disequilibrium, draw minimum spanning networks amongst the MLGs and analyse the population genetic structure. To detect signs of linkage disequilibrium across the microsatellite loci, we calculated the standardized index of association (r_D). This index compares the observed and expected variance of genetic distance between all pairs of individuals and has been evaluated using Poppr with 2,000 permutations from the clone-corrected dataset. In order to create minimum spanning networks amongst the MLGs, we prepared, using Poppr, a matrix of genetic distances based on Bruvo’s distances. Minimum spanning networks were then calculated from this matrix by MINSPNET (Excoffier and Smouse 1994) and visualized using the NEATO layout engine in the GRAPHVIZ package (<http://graphviz.org>). The genetic structure of the population was inferred using a principal component analysis (PCA) with the R package FactoMineR 1.24 (Lê *et al.* 2008). Indeed, compared to other methods such as the Bayesian clustering algorithm implemented in STRUCTURE (Pritchard *et al.* 2000), PCA does not require strong assumptions about an underlying genetic model, such as the Hardy–Weinberg equilibrium or the absence of linkage disequilibrium between loci (Jombart *et al.* 2009). Following the PCA, we performed a clustering analysis using Ward’s method, as this hierarchical method optimizes minimum variance within clusters (Ward 1963).

Phenotypic data

All statistical analyses were carried out using the software R 3.2.2 (R Core Development Team, 2014). We performed comparisons of aggressiveness both (i) between isolates belonging to the clonal lineages identified in the Brittany population and (ii) among isolates sampled at different dates of an epidemic (2013 or 2014). Differences in LP were tested using the rank sum tests of Kruskal-Wallis and Wilcoxon because assumptions of homoscedasticity and normal distribution were not met, even after data transformation. Differences in LA, SC and SS were analysed with Student’s t-tests when the number of modalities to be compared (n) was 2 or with ANOVA models when $n > 2$. When significant effects were detected with ANOVA, mean values were compared with Tukey’s HSD tests. SC was square-root transformed to satisfy assumptions of homoscedasticity and normality.

Normality and homogeneity of variances were previously checked with the Shapiro–Wilk and the Bartlett tests, respectively.

Results

Microsatellite polymorphism across loci

In total, 70 alleles were detected over the 16 polymorphic loci with an average of 4.31 alleles per locus, ranging from 2 for Pi16, Pi56, PinfSSR2, Pi70 and PinfSSR7 to 14 for D13 (Table 2). G11 has the largest range of allele sizes (66 bp) whereas Pi16, Pi56 and SSR7 had the smallest range (2 bp). D13 was the most informative locus with the highest value of the Shannon's information index ($I = 1.63$). D13 had also the highest gene diversity ($H = 0.75$) with SSR4 ($H = 0.74$), whereas Pi16 and SSR6a were the loci with the lowest gene diversity ($H = 0.35$ and $H = 0.37$, respectively).

Table 2. Microsatellite polymorphism across loci within the dataset of 313 *P. infestans* isolates.

	Dye color	Size range	No. Alleles	H*	I**	L3-4***
Pi16	VIC	176-178	2	0.35	0.54	0
PinfSSR8	FAM	260-266	3	0.51	0.72	3
PinfSSR6a	VIC	236-244	4	0.37	0.60	3
G11	NED	140-206	9	0.47	1.02	6
Pi56	PET	174-176	2	0.50	0.69	0
PinfSSR2	PET	173-175	2	0.39	0.58	0
PinfSSR3	NED	258-268	3	0.65	1.06	164
Pi04	VIC	166-170	3	0.51	0.73	0
Pi63	FAM	148-157	3	0.51	0.74	3
Pi4B	PET	205-229	4	0.63	1.05	1
D13	FAM	132-168	14	0.75	1.63	129
Pi70	VIC	192-195	2	0.46	0.65	0
PinfSSR11	NED	331-356	3	0.41	0.62	3
PinfSSR4	NED	284-306	9	0.74	1.45	233
Pi4G	NED	157-163	4	0.53	0.81	0
PinfSSR7	FAM	196-198	2	0.50	0.69	0
Mean			4.31	0.52	0.85	

*H: Gene diversity (Nei 1978)

**I: Shannon's information index (Lewontin 1972)

***L3-4: number of isolates having the locus with three or four alleles

Population structure

The 313 *P. infestans* isolates split into 57 unique multilocus genotypes (MLGs). With 43 MLGs detected among 182 isolates, the genotypic diversity was higher in 2014 ($R = 0.23$) than in 2013, where 22 MLGs were found among the 131 isolates sampled ($R = 0.16$). The standardized index of association (r_D) rejected the hypothesis of an absence of linkage disequilibrium among loci ($P < 0.001$; Fig. 2b), supporting a clonal mode of reproduction in the population. Moreover, the PCA analysis indicated the presence of five distinct genetic clusters (Figs. 2a, S2). Cluster 1 included 36 MLGs, all with the A2 mating type and sharing profiles close to those previously reported in MLGs from the 13_A2 clonal lineage (Lees *et al.* 2009; Cooke *et al.* 2012; Mariette *et al.* in press). Cluster 2 included 17 MLGs with the A1 mating type and belonging to the 6_A1 clonal lineage (Lees *et al.* 2009; Cooke *et al.* 2012). Cluster 3 was composed of only one MLG which corresponded to the 1_A1 clonal lineage (Cooke *et al.* 2012). Cluster 4 also included only one MLG, A2 mating type, and with a microsatellite profile which did not match those of known clonal lineages. Finally, cluster 5 included two MLGs with the A1 mating type and which belonged to the 2_A1 clonal lineage (Lees *et al.* 2009; Cooke *et al.* 2012). The minimum spanning networks confirmed the distinction between the clonal lineages and also showed the genetic variation existing within them, especially for the 13_A2 clonal lineage (Fig. S3).

Clonal lineages frequencies over time

The 6_A1 and 13_A2 clonal lineages represented the vast majority ($> 90\%$) of isolates sampled (Fig. 3a). These clonal lineages dominated the Brittany population both in 2013 and 2014, with slightly higher frequencies of 6_A1 isolates in the first year and of 13_A2 isolates in the second year (Fig. 3b). 6_A1 isolates were sampled throughout the year, in late spring and summer on cultivated potatoes and in winter and early spring, mainly on volunteers (Fig. 3c; Fig. 4). By contrast, 13_A2 isolates were primarily recovered from cultivated potatoes during late spring and summer, but were not among those found at the very beginning of epidemics (Fig. 3c; Fig. 4). The only 13_A2 isolate obtained from volunteers was sampled in mid June 2014 (Fig. 4). Finally, the seven isolates not belonging to 6_A1 or 13_A2 were observed in 2014 only, and mainly in the beginning of epidemic, on volunteers (2_A1 and the unknown profile from cluster 4) or on cultivated potatoes (1_A1) (Fig. 3c; Fig. 4).

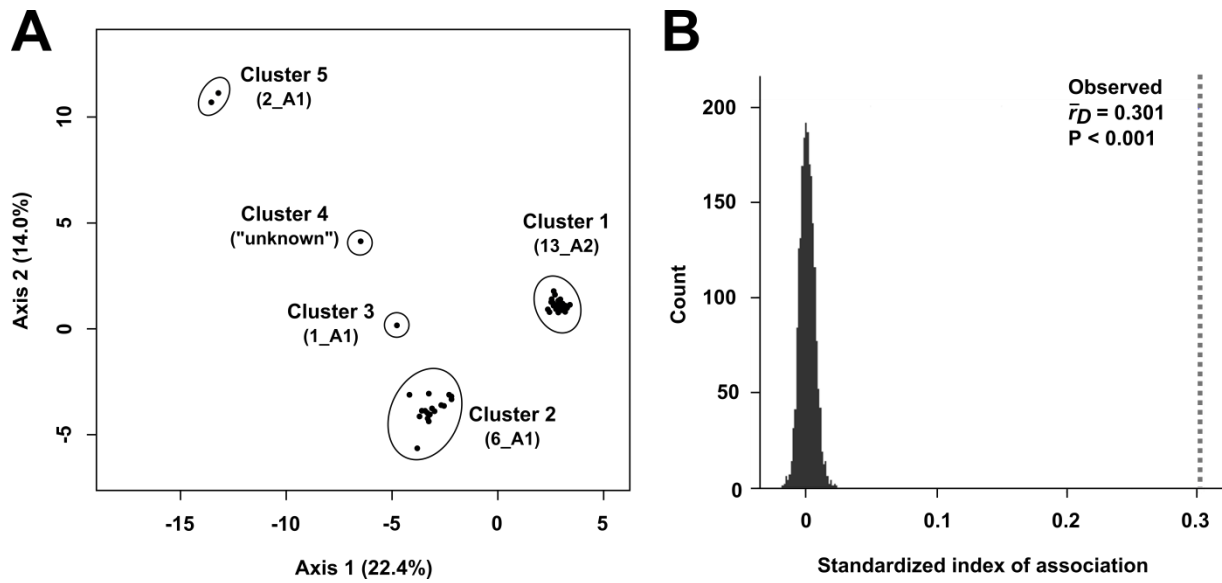


Fig. 2. Population structure of Brittany populations of *P. infestans* in 2013-2014. **(A)** Principal component analysis (PCA) on the 57 unique multilocus genotypes showing five distinct genetic clusters; **(B)** Standardized index of association (r_D) calculated from the clone-corrected dataset, rejecting the absence of linkage disequilibrium among microsatellite loci ($P < 0.001$).

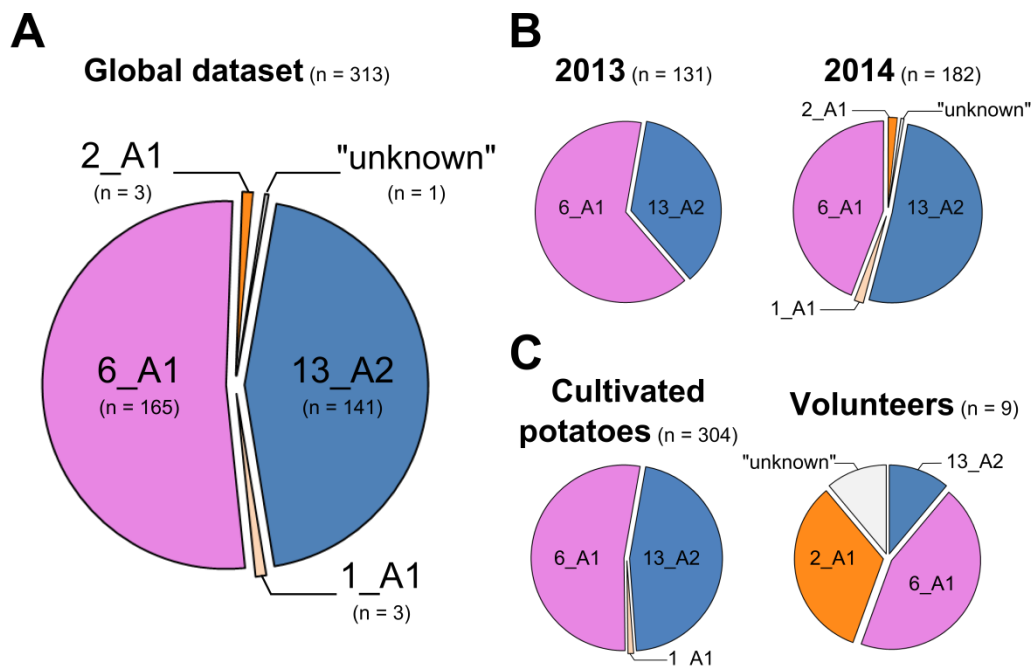


Fig. 3. Clonal lineage frequencies within the 313 *P. infestans* isolates sampled. **(A)** overall frequencies, **(B)** frequencies in each sampling year and **(C)** frequencies on the different sources (crops or volunteers).

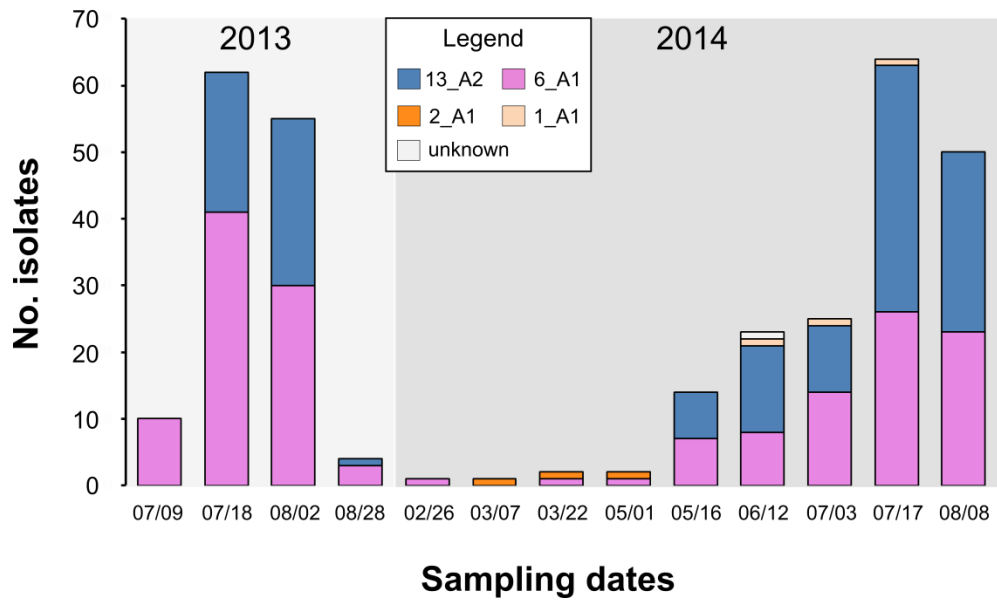


Fig. 4. Occurrence of clonal lineages across the sampling dates during the 2013-2014 period.

Aggressiveness comparison of the dominant clones, 6_A1 and 13_A2

Due to the high predominance prevalence of 6_A1 and 13_A2 isolates in the Brittany population, we restricted the aggressiveness comparisons between clones to the 139 6_A1 and 118 13_A2 isolates. Most isolates had a latent period (LP) of about 3 days, and no significant difference for this trait was observed between the two clonal lineages, either overall (Fig. 5a) or within each sampling year (Table 3). However, 6_A1 isolates caused significantly larger lesions (LA) than 13_A2 isolates (1234.6 mm² vs. 1126.0 mm²; Fig. 5b). This trend was also observed within each single year (Table 3). With an overall mean of 182.4 sporangia.mm⁻², 6_A1 isolates also had higher sporulation capacities (SC) than 13_A2 isolates (162.5 sporangia.mm⁻²), but this difference was only marginally significant (Fig. 5c). The lower SC of 13_A2 was observed in isolates sampled in 2013 and 2014, but was only significant in the second case (Table. 3). Interestingly, although 13_A2 isolates had a lower SC, they produced significantly larger sporangia than 6_A1 isolates (17.94 µm vs. 17.59 µm; Fig. 5d; Table 3).

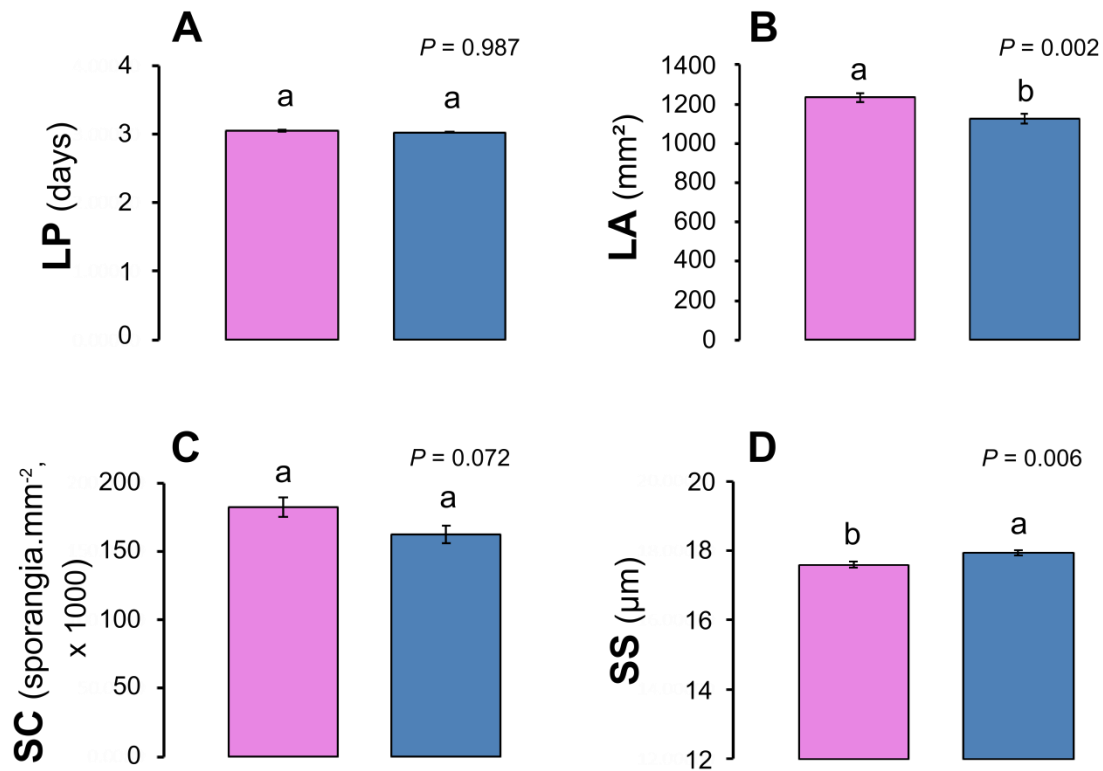


Fig. 5. Aggressiveness components (means $\pm$ SE) measured on potato cv. Bintje for the 6_A1 (pink histograms) and 13_A2 (blue histograms) isolates: **A**, latent period (LP); **B**, lesion area (LA); **C**, sporangia capacity (SC) and **D**, sporangia size (SS; 2014 only). In total, 257 isolates were tested (139 6_A1 and 118 13_A2). Different letters above the bars indicate significant differences detected at the 5% threshold (Wilcoxon rank sum tests for LP or the Student's t-tests for LA, SC and SS). *P* values are also indicated.

Table 3. Aggressiveness components (means $\pm$ SE) on potato cv. Bintje of the 6_A1 and 13_A2 isolates within each sampling year. N, number of tested isolates; LP, latent period; LA, lesions area; SC, sporangia capacity and SS, sporangia size. Different letters beside the values indicate significant differences between clonal lineages within each sampling detected with the Wilcoxon rank sum test (for LP) or the Student's t-tests (for LA, SC and SS) at the 5% threshold.

		N	LP		LA		SC		SS
2013	6_A1	78	3.04 (0.02)	a	1067.0 (19.5)	a	174.0 (11.0)	a	
	13_A2	44	3.05 (0.03)	a	838.3 (31.2)	b	156.1 (14.4)	a	
2014	6_A1	61	3.06 (0.03)	a	1448.8 (25.0)	a	193.1 (8.1)	a	17.59 (0.09) b
	13_A2	74	3.01 (0.01)	a	1297.0 (19.6)	b	166.2 (6.2)	b	17.94 (0.08) a

Aggressiveness changes across epidemics

Due to the high differences in aggressiveness observed between the 6_A1 and 13_A2 clonal lineages, the hypothesis of aggressiveness change was tested by comparing the aggressiveness of isolates sampled at different dates during each epidemic (2013 and 2014) within each clonal lineage (6_A1 and 13_A2). The sampling dates with low numbers of isolates ($n < 6$) were excluded from the comparisons. We thus compared two and three dates for 13_A2 and 6_A1, respectively, for the 2013 epidemic, and five dates for both clonal lineages for the 2014 epidemic.

No significant difference in LP or LA was detected among isolates collected at different dates, whether in 2013 or 2014, within each clonal lineage (Figs. 6 and 7). The SC of 6_A1 isolates did not change significantly over the 2013 epidemic, despite a slight decrease at the last sampling date (08/02; Fig. 6). By contrast, SC significantly increased within the 13_A2 clonal lineage between the two dates of the 2013 epidemic (Fig. 7). In 2014, the 6_A1 isolates sampled at the start of the epidemic had a high SC, especially those from the second date (06/12) which had a significantly higher SC than isolates sampled later (Fig. 6). SC tended to decrease over the epidemic in 2014 within the 13_A2 clonal lineage, but the only significant differences were observed between the second (06/02) and the last (08/02) sampling dates (Fig. 7). The size of sporangia (SS), only measured for the isolates sampled in 2014, slightly increased during the epidemic within the 13_A2 clonal lineage, but no significant difference was detected (Fig. 7). In 6_A1 isolates, SS changed during the epidemic opposite to SC, with low values for early isolates. Therefore, the isolates sampled on the two first dates had a significantly lower SS than isolates sampled on the last date (Fig. 6).

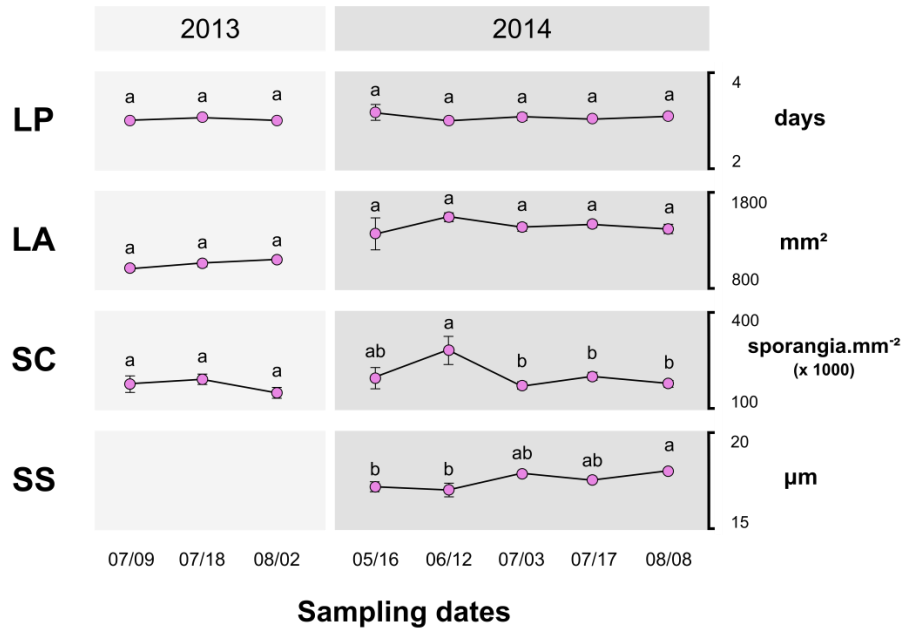


Fig. 6. Aggressiveness components (means $\pm$ SE) measured on potato cv. Bintje for the 6_A1 isolates sampled in 2013 and 2014. LP, latent period; LA, lesions area; SC, sporangia capacity and SS, sporangia size. Different letters above the points within each year indicate significant differences detected with Wilcoxon rank sum tests (for LP) or the Student's t-tests (for LA, SC and SW) at the 5% threshold.

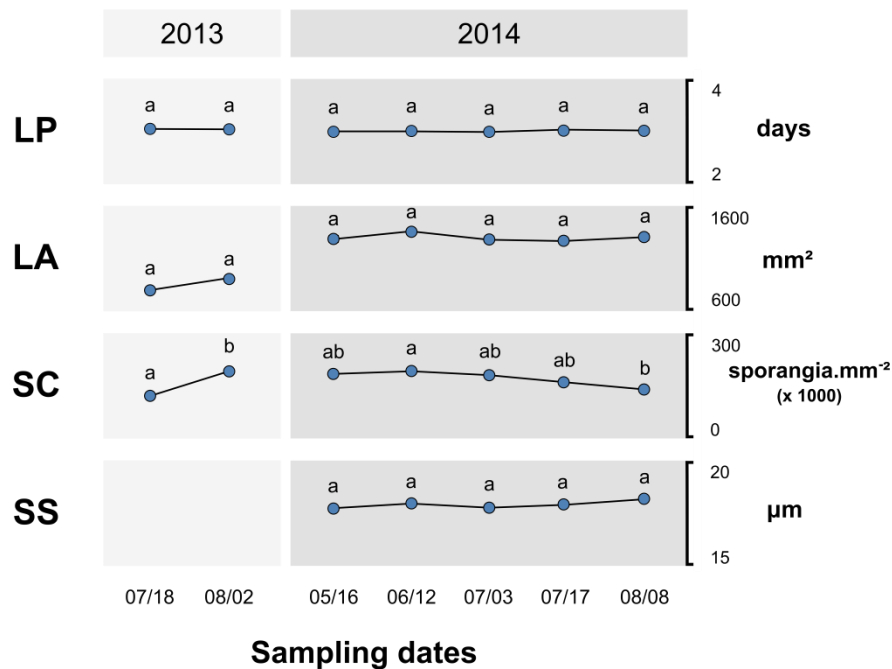


Fig. 7. Aggressiveness components (means $\pm$ SE) measured on potato cv. Bintje for the 13_A2 isolates sampled in 2013 and 2014. LP, latent period; LA, lesions area; SC, sporangia capacity and SS, sporangia size. Different letters above the points within each year indicate significant differences detected with Wilcoxon rank sum tests (for LP) or the Student's t-tests (for LA, SC and SW) at the 5% threshold.

Discussion

Our two year, cross-epidemic survey of a single *P. infestans* population in Brittany showed the predominance of two clonal lineages, 6_A1 and 13_A2, which represented more than 90% of the sampled isolates. This was expected, as they have been reported to be the main clonal lineages in Western European populations for several years (Cooke *et al.* 2012; Li *et al.* 2012). While 6_A1 isolates were sampled in potato fields from the start of both epidemics and during the inter-season (on volunteers), most of the 13_A2 isolates were sampled from potato crops during the mid and late stages of epidemics. This leads us to assume that these two clonal lineages could be morphs with different resource allocation strategies, investing primarily either in inter-epidemic transmission (6_A1) or in intra-epidemic transmission (13_A2). The co-existence of two such morphs would be consistent with adaptive dynamics simulation models based on the existence of trade-offs and the occurrence of seasonality in host availability (Castel *et al.* 2014; Hamelin *et al.* 2011).

However, under this hypothesis, 6_A1 isolates would be expected to be less aggressive than 13_A2 ones, a prediction that our *in vitro* pathogenicity tests failed to support. The phenotypic characterization indeed showed that 6_A1 isolates caused larger lesions and sporulated more than 13_A2 ones. The high inter-epidemic transmission rate of 6_A1 isolates despite a high foliar aggressiveness (and conversely for 13_A2 isolates), could result from the lack of correlation between pathogenicity to foliage and tubers, as previously shown in *P. infestans* (Flier *et al.* 2001; Pasco *et al.* in press). 6_A1 isolates might thus be rather aggressive on potato foliage but not on tubers, allowing them to overwinter and produce diseased stems. Conversely, 13_A2 isolates could be less aggressive on foliage but more on tubers, thus limiting their own inter-epidemic transmission. The absence of 13_A2 isolates in early epidemic stages could also be due to their poor adaptation to the low temperatures prevailing at this time of year. Mariette *et al.* (unpublished data) have indeed shown that the pathogenicity gap between 13_A2 and 6_A1 isolates is highest at the lowest tested temperatures (*i.e.* 10 and 14 °C). The hypothesis is supported by the higher frequencies of 13_A2 in the Brittany population in 2014 than in 2013, a trend also noticed throughout late blight isolates sampled in France (Euroblight.net), as 2014 was characterized

by high temperatures, making it the hottest year on record in Europe according to Climate Indicator Bulletin.

While we did not observe a general trend for different aggressiveness strategies related to clone dynamics, the 13_A2 isolates had a lower sporulation capacity (SC) than the 6_A1 isolates but produced larger sporangia. This could indicate different strategies of resource allocation between these clonal lineages, with 6_A1 investing in a high number of small sporangia and 13_A2 investing in a low number of large sporangia. These two strategies could match the r and K reproductive strategies of the evolutionary model developed by Mac Arthur and Wilson (1967). This model, based on the trade-off between quantity and quality of offspring, describes a r-strategy characterized by the production of a high number of low quality offspring and a K-strategy with the production of a limited number of high quality offspring (Reznick *et al.* 2002). If the concept of r-/K-selection was originally applied across species, studies have since shown that both strategies can be encountered within a species (Richardson 1975; Sinervo *et al.* 2000). It thus seems possible that opposite reproductive strategies can be adopted by the two predominant clonal lineages in the *P. infestans* population of Brittany. This hypothesis was also put forward to explain the coexistence of two genetically differentiated groups in the causal ascomycete of grapevine powdery mildew, *Erysiphe necator* (Montarry *et al.* 2008a). Similarly, the presence in natural *P. infestans* populations of isolates exploiting their hosts and reacting to multiple infections in opposite ways (Clément *et al.* 2012) could be consistent with the coexistence of isolates with opposite resource allocation patterns.

The late sampling of the low aggressive 13_A2 isolates suggested the absence of a directional selection for an increased aggressiveness throughout epidemics in the Brittany *P. infestans* populations. The same trend was observed when we focused on the evolution of aggressiveness during epidemics within each predominant clonal lineage, 6_A1 and 13_A2. Indeed, we did not observe an increase of aggressiveness (*e.g.* increase of LA or SC, decrease of LP) during epidemics, except within the 13_A2 clonal lineage in 2013 where only two sampling dates were compared. This contradicts previous data reporting a selection of aggressive isolates during a late blight epidemic (Andrison *et al.* 2007). Nevertheless, different spatial scales were considered in both studies, which could explain the divergent

conclusions. On one hand, late blight isolates sampled repeatedly from a single untreated potato field were included in the aggressiveness comparisons in experiments of Andrivon *et al.* (2007). On the other hand, our isolates were sampled from sprayed potato fields at a “landscape” scale. As a consequence, the epidemic could have been at different stages among the sampled fields.

Instead of the expected selection for increased aggressiveness during late blight epidemics, we observed that the sporulation capacity (SC) was generally high for isolates sampled in the early epidemics and then decreased for isolates collected later, within both the 6_A1 and 13_A2 clonal lineages. By contrast, if the latent period (LP) and the lesion area (LA) did not vary over time, the sporangia size (SS) tended to increase during an epidemic. A shift of the resource allocation strategies described above (r and K) may therefore occur in the *P. infestans* population during an epidemic: in early stages, isolates producing large quantities of sporangia (r-strategy) would be selected as this allows a quick invasion of vacant ecological niches; by contrast, there would be a selection of K-isolates in latter stages because this strategy is efficient to be competitive in occupied niches (Lodge 1993). Similar seasonal variations in life-history traits have been previously described in salt marsh planthoppers (*Prokelisia* spp.). During the growing season of their host (cordgrass), the short-winged individuals with low dispersal abilities and high fecundity (referring to the r-strategy) are predominant, whereas as the food supply decreases, long-winged morphs highly dispersive but with lower fecundity are selected (Denno 1994). Likewise, Pernaci (2015) reported that a selection for isolates with a bigger spore volume occurred during epidemics of the poplar rust fungi *Melampsora larici-populina*.

Besides 6_A1 and 13_A2 isolates, we also sampled at very low frequencies 1_A1, 2_A1 and “Unknown” isolates during our survey. The 1_A1 and 2_A1 clonal lineage were observed at relatively high frequencies several years ago, before the expansion of 6_A1 and 13_A2 (Cooke *et al.* 2012; Mariette *et al.* in press). In Belgium and Northern France, 1_A1 isolates still represent 10 to 20% of the samples collected from potato fields (Euroblight data). One might hence wonder why, nowadays, these clonal lineages are rare in Brittany. They may suffer from the competition with 6_A1 and 13_A2 isolates, possibly because of a lower aggressiveness. Unfortunately we collected and phenotyped too few 2_A1 and

“Unknown” isolates to perform valid aggressiveness comparisons of with the predominant 6_A1 and 13_A2 and therefore validate this hypothesis. Moreover, in the case of 2_A1 and “Unknown” isolates, only sampled on volunteers, we could suppose that they are absent on cultivated potatoes because of a high susceptibility to the chemical treatments applied to potato crops, the unsprayed volunteers would thus providing a refuge for susceptible pathogen genotypes. It is also possible that these isolates may survive by infecting alternative hosts like *S. lycopersicum*, *S. sisymbriifolium* or *S. nigrum* (Flier *et al.* 2003; Lima *et al.* 2009). Interestingly, the genotypic profile of the “Unknown” isolate is similar to that of isolates sampled from tomato in Brittany and in Southern France (Corbière *et al.* in press), which tends to corroborate this hypothesis of niche partitioning.

Our survey encompassed the full life cycle of *P. infestans*, whereas studies conducted on plant parasites generally focus only on the epidemic phase, *i.e.* the time when they infect and damage their hosts. A similar tracking of late blight isolates during and between potato cropping seasons was performed in a field trial in Sweden (Widmark *et al.* 2011). There, all isolates collected outside the cropping period were from oospores in the soil and were genetically different from isolates sampled on potato the previous year, confirming the sexual reproduction of the pathogen in Northern Europe (Sjöholm *et al.* 2013). By contrast, in our study, we sampled the inter-epidemic *P. infestans* isolates as asexual clones on volunteers. Moreover, some of these isolates shared the same genotypic profile as those collected during epidemics, such as the 6_A1 isolates, stressing a possible carry over-role of volunteers in the inter-epidemic transmission of *P. infestans* in temperate areas (Govers *et al.* 1997; Zwankhuizen *et al.* 2000). Previous observations (Rakotonindrainy *et al.* 2012) may nevertheless suggest that the primary inoculum of late blight epidemics does not always originate from volunteers, but rather from cull piles left in or around the fields. Moreover, conversely to the 6_A1 isolates sampled both on volunteers and cultivated potatoes, there were clonal lineages never recorded within epidemics but present between epidemics. Without volunteers, it may be possible that a clonal lineage such as 2_A1, which was predominant some years ago in Brittany (Mariette *et al.* in press), would be not be present anymore. Overall, volunteers probably play a dual role for the survival of *P. infestans* populations: in addition to allow the transmission of isolates between epidemics or, at least,

act as a relay within epidemics (Cooke *et al.* 2011), volunteers may also serve as a reservoir of diversity.

Aknowledgments

The authors gratefully acknowledge the financial support by INRA ACCAF Metaprogramme (CLIF project) and ARIMNET (PoH-MED project; KBBE 219262). The authors also warmly thank Mrs M. Bodiou (SYNTEC, Pleumeur-Gautier, France) and MM Y. Bocher, P. Lec'Hvien, X. Lec'Hvien P. Adam, Y. Loutrage, C. Le Flem, E. Guyhomar for help with the sampling of isolates. We are grateful to the INRA Genetic Ressources Center BrACySol of Ploudaniel for providing the plant material used in the tests. N. Mariette is supported by PhD project cofunded by INRA and ACVNPT (Association des Créateurs de Variétés Nouvelles de Pomme de Terre) through a CIFRE grant (Conventions Industrielles de Formation par la Recherche).

Litterature cited

- Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology (5th edition). Elsevier, San Diego, CA.
- Andrивon, D. 1993. Nomenclature for pathogenicity and virulence: The need for precision. *Phytopathology* 83:889-890.
- Andrивon, D., Pilet, F., Montarry, J., Hafidi, M., Corbière, R., Achbani, E. H., Pellé, R., and Ellissèche, D. 2007. Adaptation of *Phytophthora infestans* to partial resistance in potato: evidence from French and Moroccan populations. *Phytopathology* 97:338-343.
- Andrивon, D., Montarry, J., Corbière, R., Pasco, C., Glais, I., Marquer, B., Clément, J. A. J., Castel, M., and Hamelin, F. M. 2013. The hard life of *Phytophthora infestans*: when trade-offs shape evolution in a biotrophic plant pathogen. *Plant Pathol.* 62:28-35.
- Antonovics, J., and Alexander, H. M. 1989. The concept of fitness in plant-fungal pathogen systems. Pages 185-201 in: *Plant Disease Epidemiology Vol. 2*. K. J. Leonard, and W. E. Fry, eds. McGraw-Hill, New York.
- Castel, M. K., Mailleret, L., Andrивon, D., Ravigné, V., and Hamelin, F. M. 2014. Allee effects and the evolution of polymorphism in cyclical parthenogens. *Am. Nat.* 18:E75-E88.

- Clément, J. A. J., Magalon, H., Glais, I., Jacquot, E., and Andrivon, D. 2012. To be or not to be solidary: *Phytophthora infestans*' dilemma for optimizing its reproductive fitness in intra- and intergenotype multiple infections. PLoS One, 7, e37838.
- Cooke, D. E. L., Cano, L. M., Raffaele, S., Bain, R. A., Cooke, L. R., Etherington, G. J., Deahl, K. L., Farrer, R. A., Gilroy, E. M., Goss, E. M., Grünwald, N. K., Hein, I., MacLean, D., McNicol, J. W., Randall, E., Oliva, R. F., Pel, M. A., Shaw, D. S., Squires, J. N., Taylor, M. C., Vleeshouwers, V. G. A. A., Birch, P. R. J., Lees, A. K., and Kamoun, S. 2012. Genome analyses of an aggressive and invasive lineage of the Irish potato famine. PLoS Pathogens 8:e1002940.
- Cooke, L. R., Schepers H. T. A. M., Hermansen A., Bain R. A., Bradshaw N. J., Ritchie F., Shaw D. S., Evenhuis A., Kessel G. J. T., Wander J. G. N., Andersson B., Hansen J. G., Hannukkala A., Naerstad R., and Nielsen B. J., 2011. Epidemiology and integrated control of potato late blight in Europe. Potato Res. 54:183-222.
- Corbière, R., Beninal, L., Belkhiter, S., Mabon, R., Mariette, N., Andrivon, D., and Bouznad Z. In press. Do the Algerian *Phytophthora infestans* populations show genotypic structuration on potato and tomato? in: Proc. 15th EuroBlight Workshop, Brasov, Romania, 10-13 May 2015, PPO-Special Report 17, H.T.A.M. Schepers, ed. Applied Plant Research B.V., Wageningen, the Netherlands.
- Day, J. P., and Shattock, R. C. 1997. Aggressiveness and other factors relating to displacement of populations of *Phytophthora infestans* in England and Wales. Eur. J. Plant Pathol. 103:379-391.
- Delgado, R. A., Monteros-Altamirano, A. R., Li, Y., Visser, R. G. F., van der Lee, T. A. J., and Vosman, B. 2013. Large subclonal variation in *Phytophthora infestans* populations associated with Ecuadorian potato landraces. Plant Pathol. 62:1081-1088.
- Denno, R. F. 1994. Life history variation in planthoppers. Pages 163-215 in: Planthoppers, Their Ecology and Management. R. F. Denno, and T. J. Perfect, eds. Chapman & Hall, New York.
- Dorken, M. E., and Eckert, C. G. 2001. Severely reduced sexual reproduction in northern populations of a clonal plant, *Decodon verticillatus* (Lythraceae). J. Ecol. 89:339-350.
- Drenth, A., Janssen, E. M., and Govers, F. 1995. Formation and survival of oospores of *Phytophthora infestans*. Plant Pathol. 44:86-94.

- Excoffier, L., and Smouse, P. E. 1994. Using allele frequencies and geographic subdivision to reconstruct gene trees within a species-molecular variance parsimony. *Genetics* 136:343-359.
- Fisher, M. C., Henk, D. A., Briggs, C. J., Brownstein, J. S., Madoff, L. C., McCraw, S. L., and Gutt, S. J. 2012. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* 484:186-94.
- Flier, W. G., and Turkensteen, L. J. 1999. Foliar aggressiveness of *Phytophthora infestans* in three potato growing regions in the Netherlands. *Eur. J. Plant Pathol.* 105:381-388.
- Flier, W. G., Turkensteen, L. J., van den Bosch, G. B. M., Vereijken, P. F. G., and Mulder, A. 2001. Differential interaction of *Phytophthora infestans* on tubers of potato cultivars with different levels blight resistance. *Plant Pathol.* 50:292-301.
- Flier, W. G., van den Bosch, G. B. M., and Turkensteen, L. J. 2003. Epidemiological importance of *Solanum sisymbriifolium*, *S. nigrum* and *S. dulcamara* as alternative hosts for *Phytophthora infestans*. *Plant Pathol.* 52:595-603.
- Gisi, U., Walder, F., Resheat-Eini, Z., Edel, D., and Sierotzki, H. 2011. Changes of genotype, sensitivity and aggressiveness in *Phytophthora infestans* isolates collected in European countries in 1997, 2006 and 2007. *J. Phytopathol.* 159:223-232.
- Goodwin, S. B., Cohen, B. A., and Fry, W. E. 1994. Panglobal distribution of a single clonal lineage of the Irish potato famine fungus. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 91:11591-11595.
- Gómez-Alpizar, L., Carbone, I., and Ristaino, J. B. 2007. An Andean origin of *Phytophthora infestans* inferred from mitochondrial and nuclear gene genealogies. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 104:3306-3311.
- Goss, E. M., Tabima, J. F., Cooke, D. E. L., Restrepo, S., Fry, W. E., Forbes, G. A., Fieland, V. J., Cardenas, M., and Grunwald, N. J. 2014. The Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans* originated in central Mexico rather than the Andes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 111:8791-8796.
- Govers, F., Drenth, A., and Pieterse, C. M. 1997. The potato late blight pathogen *Phytophthora infestans* and other pathogenicoomycota. Pages 17-33 in: *The Mycota V Part B. Plant Relationships*. G. C. Carrol, and P. Tudzynsky, eds. Springer-Verlag, Berlin.

- Hamelin, F. M., Castel, M., Poggi, S., Andrivon, D., and Mailleret, L. 2011. Temporal heterogeneity in host availability can cause evolutionary branching of plant parasites. *Ecology* 92:2159-2166.
- Haverkort, A. J., Boonekamp, P. M., Hutten, R., Jacobsen, E., Lotz, L. A. P., Kessel, G. J. T., Visser, R. G. F., and van der Vossen, E. A. G. 2008. Societal costs of late blight in potato and prospects of durable resistance through cisgenic modification. *Potato Res.* 51:47-57.
- Jinks, J. L., and Grindle, M. 1963. Changes induced by training in *Phytophthora infestans*. *Heredity* 18:245-264.
- Jombart, T., Pontier, D., and Dufour, A. B. 2009. Genetic markers in the playground of multivariate analysis. *Heredity* 102:330-341.
- Kamoun, S., Furzer, O., Jones, J. D. G., Judelson, H. S., Ali, G. S., Dalio, R. J. D., Roy, S. G., Schena, L., Zambounis, A., Panabieres, F., Cahill, D., Ruocco, M., Figueiredo, A., Chen, X-R., Hulvey, J., Stam, R., Lamour, K., Gijzen, M., Tyler, B. M., Grunwald, N. J., Mukhtar, M. S., Tome, D. F. A., Tor, M., Van den Ackerveken, G., McDowell, J., Daayf, F., Fry, W. E., Lindqvist-Kreuzer, H., Meijer, H. J. G., Petre, B., Ristaino, J., Yoshida, K., Birch, P. R. J., and Govers, F. 2015. The top 10 oomycete pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 16:413-434.
- Kamvar, Z. N., Tabima J. F. and Grünwald N. J. 2014. Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ* 2: e281
- Kumar, J., Nelson, R. J., and Zeigler, R. S. 1999. Population structure and dynamics of *Magnaporthe grisea* in the Indian Himalayas. *Genetics* 152:971-984.
- Knapova, G., and Gisi, U. 2002. Phenotypic and genotypic structure of *Phytophthora infestans* populations on potato and tomato in France and Switzerland. *Plant Pathol.* 51:641-653.
- Lê, S., Josse, J., and Husson, F. 2008. FactoMineR: An R package for multivariate analysis. *J. Stat. Software* 25:1-18.
- Lees, A. K., Cooke, D. E. L., Stewart, J. A., Sullivan, L. Williams N. A., and Carnegie, S. F. 2009. *Phytophthora infestans* population changes: implications. Pages 55-60 in Proc 11th Euroblight Workshop, Hammar, Norway, 28-31 October 2008, PPO-Special Report 13 H.T.A.M. Schepers, ed. Applied Plant Research B.V., Wageningen, the Netherlands.

- Lees, A. K., Wattier, R., Shaw, D. S., Sullivan, L., Williams, N. A., and Cooke, D. E. L. 2006. Novel microsatellite markers for the analysis of *Phytophthora infestans* populations. *Plant Pathol.* 55:311–319.
- Lewontin, R. C. 1972. The apportionment of human diversity. *BMC Evol. Biol.* 6:381-398.
- Li, Y., Cooke, D. E. L., Jacobsen, E., and van der Lee, T. 2013. Efficient multiplex simple sequence repeat genotyping of the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans*. *J. Microbiol. Meth.* 92:316-322.
- Li, Y., van der Lee, T. A. J., Evenhuis, A., van den Bosch, G. B. M., van Bekkum, P. J., Förch, M. G., van Gent-Pelzer, M. P. E., van Raaij, H. M. G., Jacobsen, E., Huang, S. W., Govers, F., Vleeshouwers, V. G. A. A., and Kessel, G. J. T. 2012. Population dynamics of *Phytophthora infestans* in the Netherlands reveals expansion and spread of dominant clonal lineages and virulence in sexual offspring. *G3* 2:1529-1540.
- Lima, M. A., Maffia, L. A., Barreto, R. W., and Mizubuti, E. S. G. 2009. *Phytophthora infestans* in a subtropical region: survival on tomato debris, temporal dynamics of airborne sporangia and alternative hosts. *Plant Pathol.* 58:87-99.
- Lodge, D. M. 1993. Biological invasions: lessons for ecology. *Trends Ecol. Evol.* 8:133–137.
- MacArthur, R. H., and Wilson, E. O. 1967. The theory of island biogeography. Princeton University Press, Princeton, NJ.
- Mariette, N., Mabon, R., Corbière, R., Boulard, F., Glais, I., Marquer, B., Pasco, C., Montarry, J., and Andrivon, D. In press. Phenotypic and genotypic changes in French populations of *Phytophthora infestans*: are invasive clones the most aggressive? *Plant Pathol.* DOI: 10.1111/ppa.12441.
- Montarry, J., Andrivon, D., Glais, I., Mialdea, G., Corbière, R., and Delmotte, F. 2010. Microsatellite markers reveal two genetic groups in the French population of the invasive plant pathogen *Phytophthora infestans*. *Mol. Ecol.* 19:1965-1977.
- Montarry, J., Cartolaro, P., Jolivet, J., and Willocquet, L. 2008a. Genetic structure and aggressiveness of *Erysiphe necator* populations during Grapevine powdery mildew epidemics. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:6327-6332.

- Montarry, J., Corbiere, R., and Andrivon, D. 2007. Is there a trade-off between aggressiveness and overwinter survival in *Phytophthora infestans*? *Funct. Ecol.* 21:603-610.
- Montarry, J., Glais, I., Corbiere, R., and Andrivon, D. 2008b. Adaptation to the most abundant host genotype in an agricultural plant-pathogen system - potato late blight. *J. Evol. Biol.* 21:1397-1407.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583-590.
- Pasco, C., Montarry, J., Marquer, B., and Andrivon, D. In press. And the nasty ones lose in the end: foliar pathogenicity trades off with asexual transmission in the Irish famine pathogen *Phytophthora infestans*. *New Phytol.* DOI: 10.1111/nph.13581.
- Pernaci, M. 2015. Etude des traits d'histoire de vie de *Melampsora larici-populina*, agent de la rouille du peuplier : de leur déterminisme génétique à leurs conséquences évolutives. PD thesis, University of Lorraine, Nancy, France.
- Pritchard, L. K., Stephens, M. and Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959.
- R Core Development Team, 2014. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rakotonindrainana, T., Corbière, R., Chatot, C., Pinchon, V., Dubois, L., Aurousseau, F., Chauvin, J. E., and Aubertot, J. N. 2012. Analysis of volunteer density under the influence of cropping practices: a contribution to the modelling of primary inoculum of *Phytophthora infestans* in potato crops. Pages 67-73 in: Proc. 13th Euroblight Workshop, St Petersburg, Russia, 9-12 October 2011, PPO-Special Report 15, H.T.A.M. Schepers, ed. Applied Plant Research B.V., Wageningen, the Netherlands.
- Reznick, D., Bryant, M. J., and Bashey, F. 2002. r- and K-selection revisited: The role of population regulation in life-history evolution. *Ecology* 83:1509-1520.
- Richardson, B. J. 1975. r and k selection in kangaroos. *Nature* 255:323-324.
- Ristaino, J. B., Groves, C. T., and Parra, G. R. 2001. PCR amplification of the Irish potato famine pathogen from historic specimens. *Nature* 411:695-697.

- Sinervo, B., Svensson, E., and Comendant T. 2000. Density cycles and an offspring quantity and quality game driven by natural selection. *Nature* 406:985-988.
- Sjöholm, L., Andersson, B., Högberg, N., Widmark, A. K., and Yuen, J. 2013. Genotypic diversity and migration patterns of *Phytophthora infestans* in the Nordic countries. *Fungal Biol.* 117:722-730.
- Spielman, L. J., Drenth, A., Davidse, L. C., Sujkowski, L. J. Gu, W., Tooley, P. W., and Fry, W. E. 1991. A 2nd worldwide migration and population displacement of *Phytophthora infestans*. *Plant Pathol.* 40:422-430.
- Yuen, J. E., and Andersson, B. 2013. What is the evidence for sexual reproduction of *Phytophthora infestans* in Europe? *Plant Pathol.* 62:485-491
- Ward, J. H. 1963. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *J. Am. Stat. Assoc.* 58:236-244.
- Widmark, A. K., Andersson, B., Sandström, M., and Yuen, J. E. 2011. Tracking *Phytophthora infestans* with SSR markers within and between seasons – a field study in Sweden. *Plant Pathol.* 60:938-45.
- Zadoks, J. C. 2008. The potato murrain on the European continent and the revolutions of 1848. *Potato Res.* 51:5-45.
- Zwankhuizen, M. J., Govers, F., and Zadoks, J. C. 2000. Inoculum sources and genotypic diversity of *Phytophthora infestans* in Southern Flevoland, the Netherlands. *Eur. J. Plant Pathol.* 106:667-680.

Supporting information

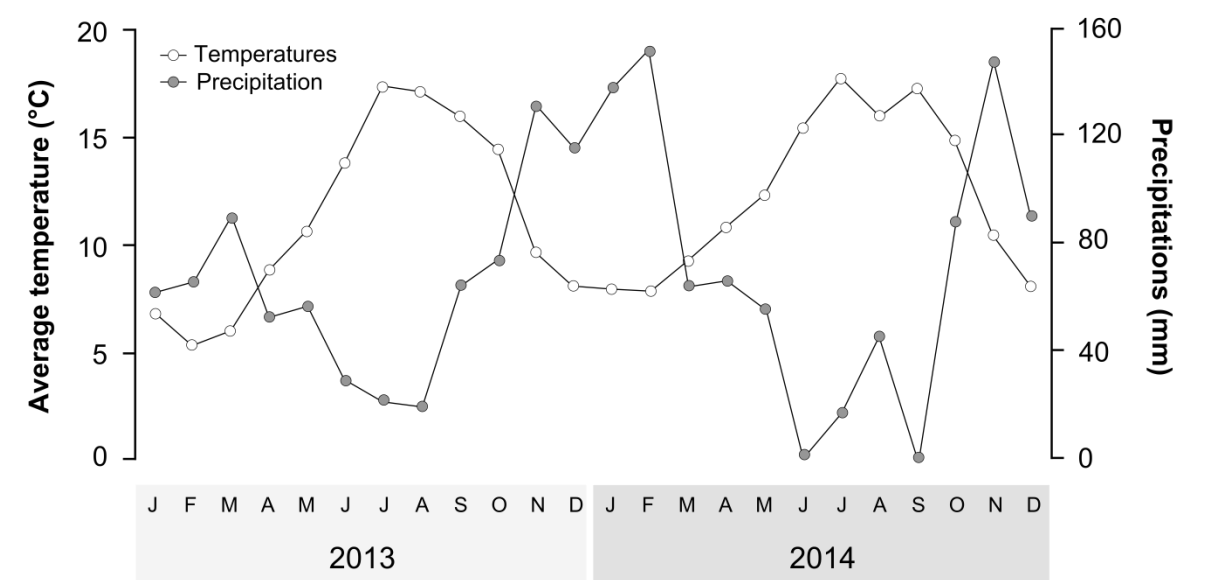


Fig. S1. Monthly average temperatures and precipitations recorded in the study area during the period 2013-2014. Data were obtained from the weather station of Lannion (Côtes d’Armor, Brittany) and are available on <http://www.infoclimat.fr>.

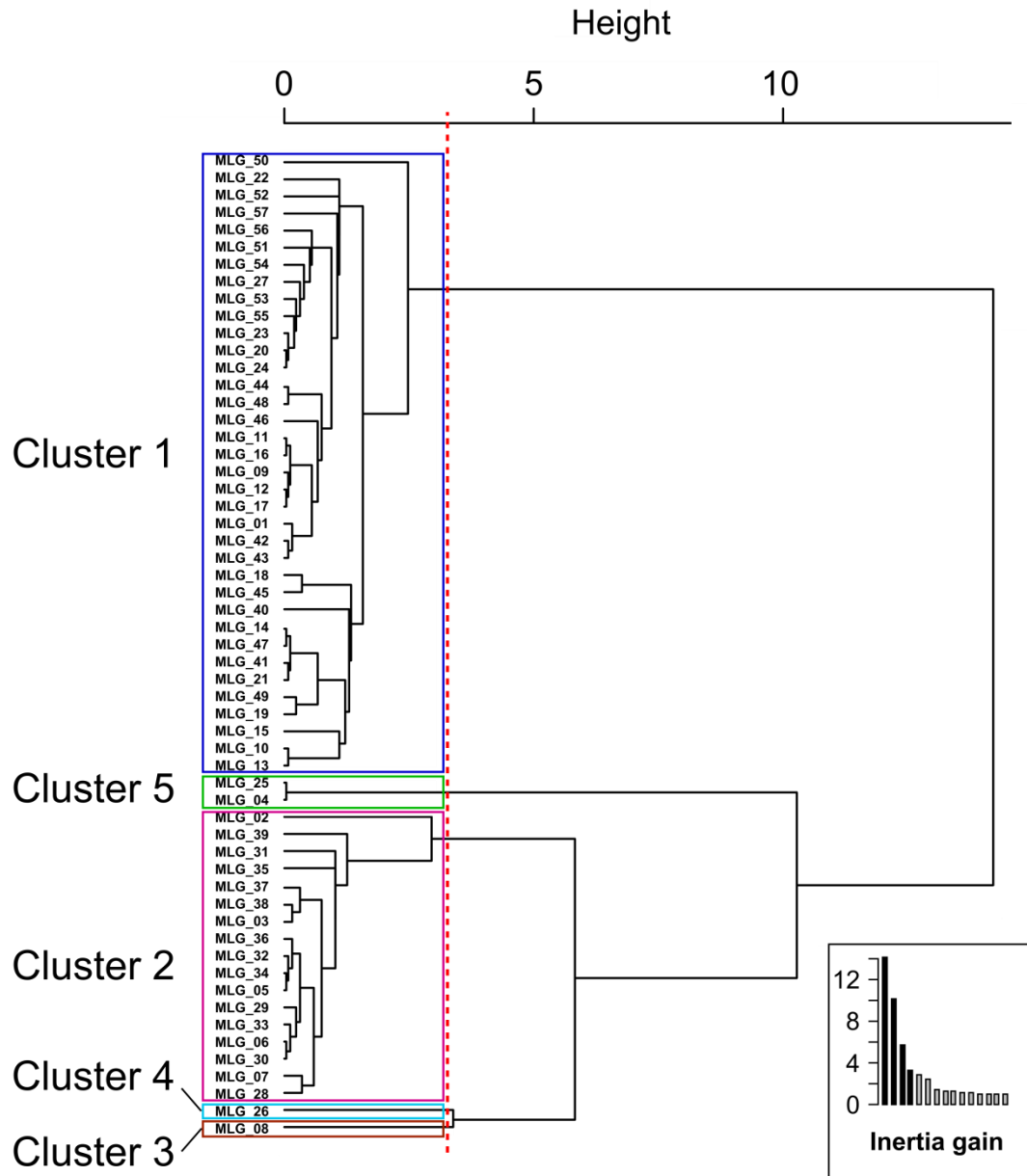


Fig. S2. Hierarchical clustering analysis using the Ward's method established from the principal component analysis (PCA) revealed the presence of five genetic clusters in the Brittany population of *P. infestans*.

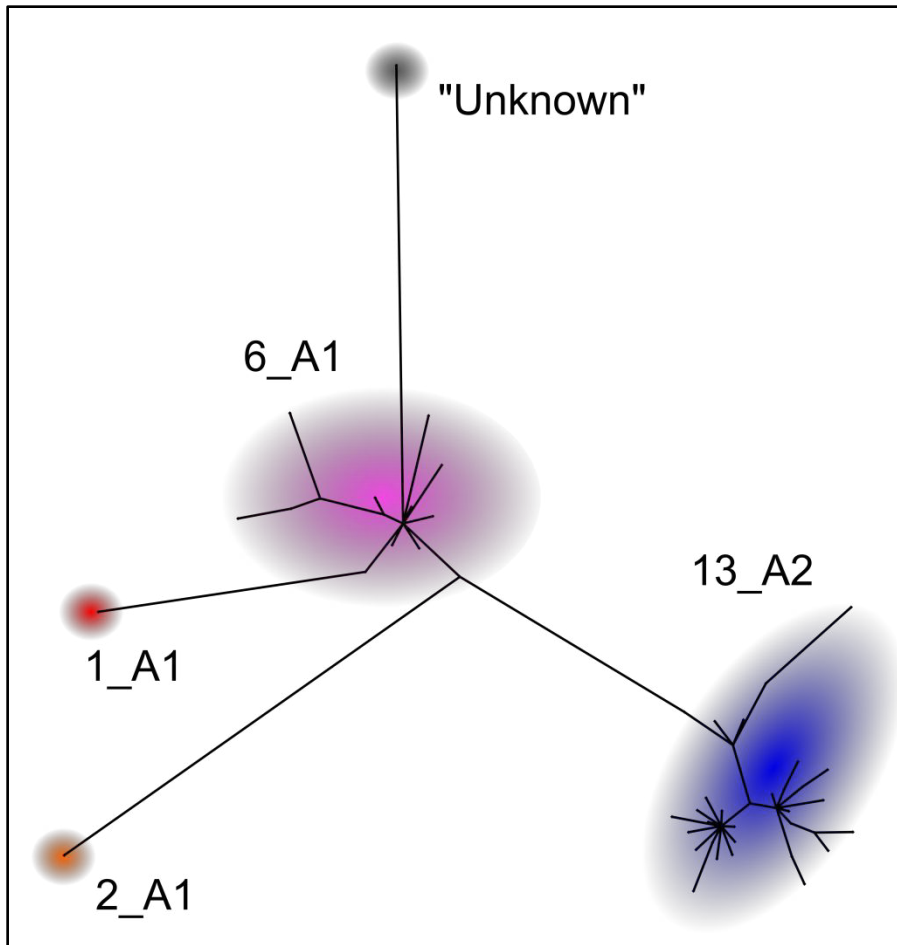


Fig. S3. Minimum Spanning Tree based on the 16 SSR loci showing the evolutionary relationships among the multilocus genotypes of the Brittany population of *P. infestans*.

Chapitre 3

Trade-off entre nombre et taille des descendants asexués chez *P. infestans*

1. Objectifs de travail

Le suivi d'une population de *P. infestans* en Bretagne pendant deux années successives a montré que les deux clones majoritaires, 6_A1 et 13_A2, avaient des stratégies de reproduction opposées en termes de nombre et de taille des sporanges produits.

Nous avons donc souhaité en savoir davantage sur la relation entre ces deux traits chez ce parasite et en particulier s'ils étaient liés par un trade-off, pouvant notamment être à l'origine de ces différentes stratégies de reproduction. De plus, étant donné que la reproduction de *P. infestans* peut être grandement impactée par le niveau de résistance de l'hôte, nous avons étudié la relation entre nombre et taille de sporanges produits sur différents hôtes.

Nous avons observé des relations négatives entre nombre et taille des sporanges, et ce sur les trois hôtes testés, suggérant l'existence d'un trade-off entre ces deux traits. De plus, la relation entre ces deux traits ne différait pas entre les hôtes alors que ceux-ci avaient des effets différents sur ces deux traits de vie. Par ailleurs, l'effet de l'hôte sur la taille des sporanges n'avait, à notre connaissance, jamais été rapporté chez *P. infestans*.

Les résultats rapportés dans ce chapitre font l'objet d'une publication qui sera prochainement soumise à *Evolution*.

2. Article 3

The trade-off between sporangia number and size in the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans* is not altered by host resistance

Nicolas Mariette, Romain Mabon, Josselin Montarry, Bruno Marquer, Roselyne Corbière, and Didier Andrivon*

INRA, UMR1349 IGEPP (Institute of Genetics, Environment and Plant Protection), Domaine de la Motte, BP 35327, F-35653, Le Rheu Cedex, France.

*Corresponding author e-mail: didier.andrivon@rennes.inra.fr

Abstract

The negative relationship between offspring number and size is a classic example of trade-off between life-history traits, reported many times in both animal and plant species. Here we wanted to know if such a trade-off occurred in the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans* and if it was impacted by host resistance. For this purpose, we measured, in controlled conditions, the number and the size of sporangia (asexual propagules) of *P. infestans* isolates produced on three potato cultivars characterized by different resistance levels to the pathogen. We observed negative relationships between sporangia number and size on all the host cultivars, confirming the existence of a trade-off. Its shape did not differ between host cultivars while they were found to differently affect the pathogen reproduction for both sporangia number and, more surprising, sporangia size. The trade-off between number and size of sporangia could maintain variability for these traits in *P. infestans* populations, from which different reproductive strategies may emerge. This work emphasizes the necessity to focus on the relationship between offspring number and size in other fungal plant pathogens to know if the trade-off found in *P. infestans* is common in those organisms.

Keywords: Fitness, Life-history traits, Plant pathogen, Reproductive strategies, *Solanum tuberosum*

Introduction

The widely accepted trade-off concept states that an organism cannot simultaneously maximise all traits involved in fitness, owing to dilemmas in resource allocation (Law 1979). According to this theory, any beneficial change in one trait will unavoidably have a detrimental effect in another trait (Anderson and May 1982; Stearns 1989). The trade-off concept has a prominent importance in evolutionary biology, as it can explain how adaptation of populations to new environments can be constrained and how life-history strategies can evolve (Rausher 1984; Roff 1992). Trade-offs between life-history traits receiving the most attention in the scientific literature include primarily those between reproduction and survival, body size and development time or offspring number and offspring size (Stearns 1989; Roff 2002; Begon *et al.* 2006). This later is based on the hypothesis that, within a given total reproductive investment, the reproductive allocation of an organism can be divided into fewer, larger offspring or more, smaller offspring (Begon *et al.* 2006). The trade-off between offspring number and size was first advocated by Lack (1947) with experiments on clutch-size in birds and has been subsequently confirmed in many animals (*e.g.* Charnov and Ernest 2006; Walker *et al.* 2008) and plants (Werner and Platt 1976).

In plant pathogens, trade-offs between fitness components are of central importance, as they could limit their evolutionary potential (Lannou 2012; Laine and Barres 2013) and may thus be exploited to engineer durable control strategies (Quenouille *et al.* 2013; Brown 2015). Besides, many studies focused on virulence costs in plant pathogens, namely a reduction in pathogen fitness induced by a mutation from avirulence to virulence, as defined in the context of the gene-for-gene model (Flor 1971). Evidence for virulence costs affecting different traits was obtained in several plant pathogens such as virus (Jenner *et al.* 2002; Sacristán *et al.* 2005), bacterial (Swarup *et al.* 1992), fungal (Barhi *et al.* 2009; Huang *et al.* 2010) or Oomycètes (Montarry *et al.* 2010). If virulence costs in plant pathogens are well documented (Sacristan and Garcia-Arenal 2008), trade-offs between other life-history stages also exist. For examples, there are reports of negative correlations between latent period and spore production in the Basidiomycete causing wheat stripe rust, *Puccinia triticina*, (Pariaud *et al.* 2013) or between latent period and spore transmission in

Hyaloperonospora parasitica, an oomycete infecting *Arabidopsis thaliana* (Héraudet *et al.* 2008). Furthermore, as the negative relationship between offspring number and size is a classic trade-off example with abundant empirical evidence reported in both plants and animals, it could also be expected in plant pathogens, especially in fungi and oomycetes. For such sporulating organisms (*i.e.* with spore as asexual propagules), the production of large spores should indeed be more energy costly than the production of small spores and this could lead to a compromise with the number of spore produced. Yet, very little is known about the existence of a such trade-off in these organisms since, to our knowledge, the only example has been reported in *Plasmopara viticola*, the oomycete causing grapevine downy mildew, in which an increase in sporangia production was correlated with a reduction in sporangia size (Delmas *et al.* 2014; Delmotte *et al.* 2014).

The development of a disease caused by a plant pathogen is strongly influenced by both abiotic environment and host genotype (Laine 2007; Wolinska and King 2009; Clément *et al.* 2010; Delmotte *et al.* 2014). As a consequence, these two factors can also have an impact on the shape and even the direction of the correlation between life-history traits in pathogens. Hence, fitness costs can differ among environments (*e.g.* temperature) as observed in the fungal pathogen *Podosphaera plantaginis* (Laine 2008). Likewise, some studies reported shifts of life-history correlations in plant pathogens, depending on the cultivars tested (Huang *et al.* 2010; Susi and Laine 2013). These results thus stress that it is crucial to take into account sufficient genetic variation in the host to draw conclusions on the status of a life-history trade-off in a plant pathogen.

Here, we aimed to investigate the impact of host resistance on offspring number and size produced by the potato late blight pathogen *P. infestans*. For this purpose, we carried out an experiment in which sporangia production and size were measured in 119 *Phytophthora infestans* isolates during infection of three potato cultivars with different resistance levels. Based on the trade-off theory between the energy allocated to offspring number and size in organisms, we hypothesized a negative correlation between sporangia production and size in *P. infestans*. We also expected that the shape of this relationship will be impacted by resistance level of the potato cultivar, especially those affecting sporangia production. As predicted, the experimental results revealed a linear negative correlation

between sporangia number and size, supporting the trade-off theory. This trade-off was observed on the different hosts tested, indicating a general negative relationship between these traits. Moreover the trade-off was not affected by potato cultivar despite of their different impact on the asexual reproduction of *P. infestans* isolates.

Materials and methods

Phytophthora infestans biology

P. infestans belongs to the oomycetes, a group of diploid filamentous protists classified within the taxon *Stramenopiles* with diatoms, chrysophytes, and brown algae (Kroon *et al.* 2004). This pathogen causes late blight in several Solanaceous species, especially potato (*Solanum tuberosum*) for which it represents a serious threat for production (Fisher *et al.* 2012). *P. infestans* is a heterothallic species: sexual reproduction requires the simultaneous presence of hyphae from opposite mating types (named A1 and A2). The pathogen is characterized by a life cycle primarily aerial, with polycyclic epidemics in which asexual sporangia containing infective zoospores are dispersed from host to host by water or wind, potentially over long distances (Aylor 2003; Glais *et al.* 2014). Between potato crop seasons, *P. infestans* can survive as asexual clones in potato tubers or *via* the long-lived oospores resulting from the sexual cycle wherever the two mating types coexist and mating occurs (Drenth *et al.* 1995, Andrivon *et al.* 2013).

Isolate collection

The experiment involved 119 *P. infestans* isolates, collected in commercial potato fields of Brittany (Western France) from April to August 2014, during late blight epidemics. Single lesion isolates were established and maintained as axenic cultures on pea agar medium as previously described (Montarry *et al.* 2010). To this end, leaflets bearing each a single late blight lesion were randomly sampled from each field. Each single-lesion isolate was obtained by placing a fragment of infected leaf tissue on tuber slices of the susceptible potato cultivar Bintje. After incubation at 15°C in growth chambers for four to eight days, pure cultures were established by transferring the hyphal tips growing through the slices to pea agar

(Corbière and Andrivon 2003) supplemented with 200 mg.L⁻¹ ampicillin, 30 mg.L⁻¹ rifamycin, and 0.4 mL.L⁻¹ pimarinic. After about 10 days, growing colonies were transferred to pea agar without antibiotics, and subsequently maintained at 15°C in darkness. Cultures were transferred to fresh medium every four weeks until phenotypic characterization.

Plant material

The potato cultivars used in this study were Bintje, Robijn and Möwe. All were bred in the 1910-1930's, that is before the use of *Solanum demissum* race-specific resistance R-genes in European potato breeding programs. Therefore, these cultivars do not bear race-specific resistance genes, but differ in levels and components of partial resistance to late blight (Clément *et al.* 2010): Bintje is the reference susceptible cultivar to *P. infestans* commonly used in European laboratories, whereas Robijn and Möwe possess high to very high partial resistance, not preventing infection but reducing lesion growth, spore production or increasing the duration of the latent period (time from inoculation to pathogen reproduction). Plants were grown from disease-free, certified seed tubers in pots (13 cm diameter; one tuber per pot) filled with 1:1:1 sand-peat-compost mixture placed in a glasshouse regulated at 15-20°C (night/day temperatures) with 16h of photoperiod. Once a week, plants were watered with a nutrient solution (Hakaphos; NPK 15/10/15).

Inoculum preparation and inoculation

Sporangial suspensions of each of the 119 isolates were prepared from 3- to 4-week-old pea agar cultures as earlier described by Clément *et al.* (2010) and adjusted to a concentration of 5.10⁴ sporangia.mL⁻¹ using a haemocytometer. Sporangial suspensions were kept at 4°C for approximately 2 hours to promote zoospore liberation, and then inoculated onto leaflets of each cultivar (Bintje, Robijn and Möwe) picked from the median area of 5- to 7-week-old plants. To this end, one leaflet per isolate x cultivar combination was placed, abaxial face up, onto the empty lids of inverted Petri dishes containing 10 g.L⁻¹ water agar and acting as humid chambers. A 20-μL droplet of the prepared sporangial suspension (about 1000 sporangia) was then deposited on the middle of the leaflet. The Petri dishes were kept in clear boxes and incubated in climate chambers regulated at 18°C/15°C (day/night temperature) with a 16 h photoperiod.

Life-history traits measurements

Six days after inoculation, the diameters of each lesion were measured in two perpendicular directions with a digimatic caliper (Mitutoyo, Kawasaki, Japan). The lesion area (LA), expressed in mm², was computed assuming an elliptic shape. Immediately after measuring the lesion diameters, sporangia were washed from each leaflet in 10 mL Isoton II (saline buffer; Beckman Coulter, Villepinte, France). Subsequently, the number of sporangia produced (SP) was assessed using a particle counter Coulter Z2™ (Beckman Coulter) equipped with a 100-μm aperture tube. The sporulation capacity (SC), expressed in sporangia.mm⁻², was then calculated by dividing SP by the corresponding LA. Afterwards, the surface of sporangia, rated as the size of sporangia (SS), was determined under a microscope fitted with a camera and using the image analysis software Histolab® v8.1.0 (Microvision Instruments, Evry, France). For each sample, a mean SS was calculated from the measurement of 100 randomly chosen sporangia.

Statistical analyses

All analyses were performed with the statistical software R v. 3.2.2 (R Development Core Team 2014). We first compared the sporulation capacity (SC) and sporangia size (SS) of *P. infestans* isolates on the different host cultivars using analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's honestly significant difference post hoc comparisons. SC was square-root transformed to achieve assumptions of homoscedasticity and normality. Secondly we investigated the relationship between SC and SS on each host cultivar using linear regressions in which SC was square-root-transformed. Furthermore, to test whether slopes of regression lines differed between host cultivars, variation in (square-root-transformed) SC was analysed by mean of analysis of covariance (ANCOVA) with SS as the covariate and host cultivar as the factor.

Results

Impact of potato cultivars on P. infestans life-history traits

A significant effect of host cultivar on the sporulation capacity (SC) of *P. infestans* isolates was detected (ANOVA, $F_{2,354} = 45.29$, $P < 0.001$). SC was significantly different on the three host cultivars as revealed by Tukey's HSD tests (Figure 1A): the highest values were observed on Bintje (206.5 ± 6.4 sporangia.mm⁻²; mean $\pm$ SE), intermediate values on Robijn (155.0 ± 5.4) whereas SC was the lowest on Möwe (132.1 ± 5.7). We also detected a significant effect of host cultivar on the sporangia size (SS) (ANOVA, $F_{2,231} = 4.40$, $P = 0.013$). Indeed, SS was significantly lower on Robijn (23.1 ± 2.7 μ m²; mean $\pm$ SE) than on Bintje (39.4 ± 4.5) as revealed by Tukey's HSD tests (Figure 1B).

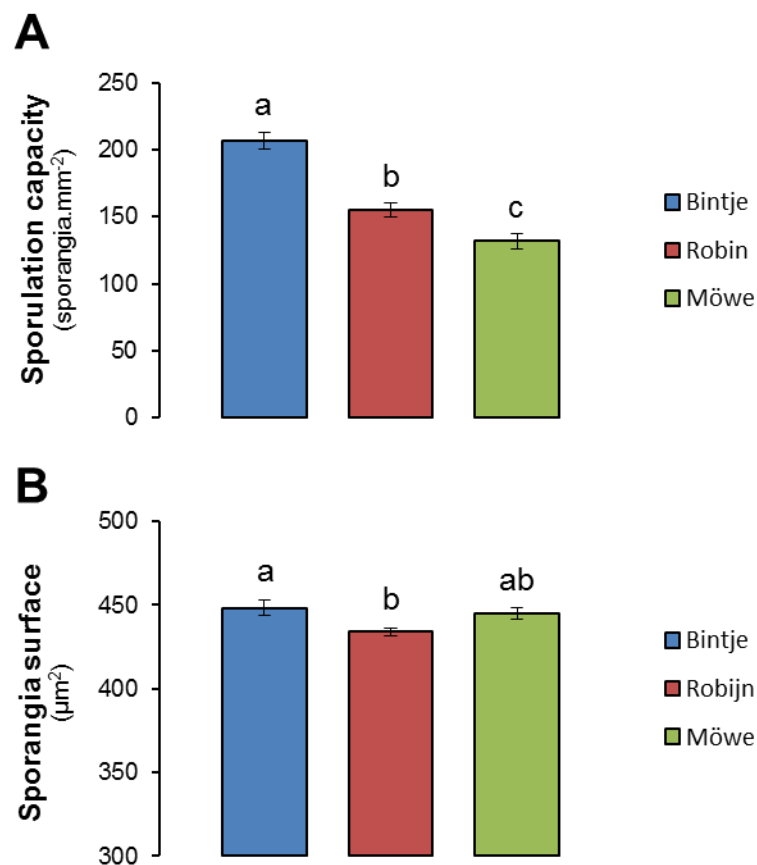


Figure 1. Means ($\pm$ SE) of sporulation capacity (A) and sporangia size (B) of 119 *P. infestans* isolates during infection on the potato cultivars Bintje, Möwe and Robijn. Different letters above the histograms indicate significant differences between the potato cultivars for a given clonal lineage at $P < 0.05$ (Tukey's HSD tests).

Relationship between life-history traits

We found a significant negative relationship between sporulation capacity (SC) and sporangia size (SS) in the three potato cultivars, namely Bintje ($r^2 = 0.10$; $P < 0.001$; Figure 2A), Robijn ($r^2 = 0.17$; $P < 0.001$; Figure 2B) and Möwe ($r^2 = -0.09$; $P < 0.001$; Figure 2C). Moreover, ANCOVA revealed no significant interaction between host cultivar and SS (Table 1), indicating that the relationship between SC and SS did not significantly differ among host cultivars.

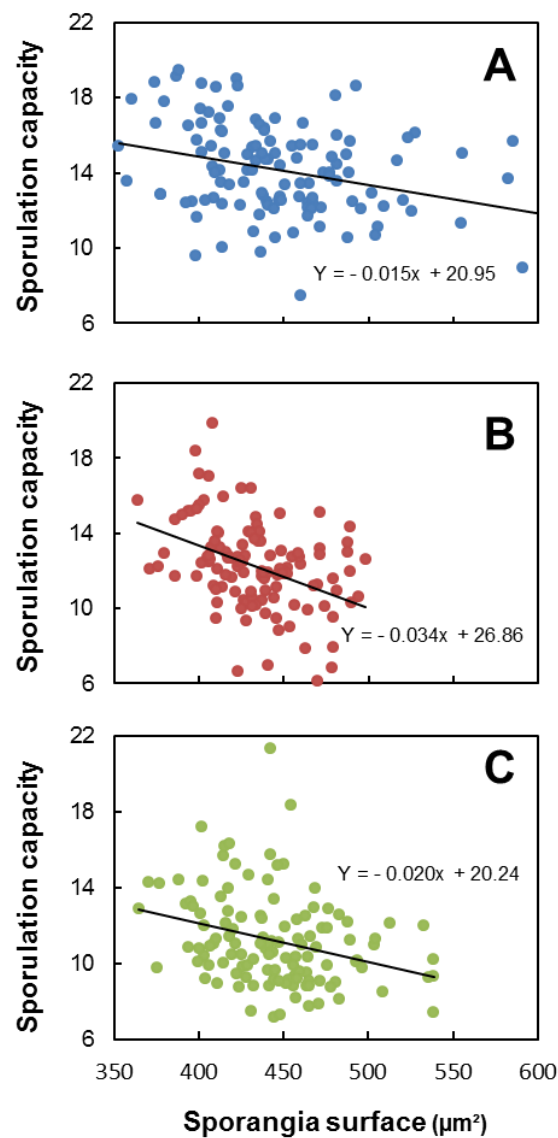


Figure 2. Relationship between sporangia surface and sporulation capacity (square-root transformed) in 119 *P. infestans* isolates during infection on the potato cultivars Bintje (A), Robijn (B) and Möwe (C). Regression lines and their correspondent equations are indicated on the graphs, all were significant (see text).

Table 1. Summary of analyse of covariance (ANCOVA) to test the effect of potato host cultivars on the relationship between sporulation capacity and sporangia size in 119 *P. infestans* isolates. In the model, host cultivar was rated as the factor, sporangia size as the covariate and (square-root transformed) sporulation capacity as the response variable.

Source of variation	df	MS	F	P
Host cultivar	2	265.64	50.84	<0.001
Sporangia size	1	216.57	41.45	<0.001
Host cultivar x Sporangia size	2	12.74	2.44	0.09
Error	351	5.23		

Discussion

The trade-off between offspring number and offspring size has been intensely studied and well characterised in animals and plant species (Werner and Platt 1976; Charnov and Ernest 2006; Walker *et al.* 2008). Here, we report that it also applies to microorganisms pathogenic to plants. We have indeed showed that, in the potato late blight oomycete pathogen *Phytophthora infestans*, higher offspring numbers (in this case, asexual sporangia) correlates with smaller offspring size. A similar finding was recently reported in another plant pathogenic oomycete, the grapevine downy mildew pathogen *Plasmopara viticola* (Delmas *et al.* 2014), supporting the generality of such a trade-off across species belonging to different reigns and possessing very different lifestyles.

Interestingly, the trade-off between sporulation capacity and sporangia size in *P. infestans* was observed in the three host cultivars tested and the ANCOVA results indicated that its slope was equal for all hosts. Therefore, this trade-off does not seem to be directly altered by host genotype as previously reported for other trade-offs such as between infectivity and transmission (Susi and Laine 2013) or between virulence and lesion size (Huang *et al.* 2010). Such a variation in the trade-off between sporangia number and size in *P. infestans* could have even so been possible among Bintje, Robijn and Möwe as we found that these potato cultivars differently affected both these two traits. Besides, if the differences of sporulation capacity observed among the potato cultivars were expected as this trait is known to be highly dependent to the host (Clément *et al.* 2010), the low size of

the sporangia produced on Robijn (especially compared to Bintje) was more surprising. Indeed, in *P. infestans*, the sporangia size is known to be highly dependent on abiotic factors such as temperature (Mariette *et al.* in prep) but this trait has never been reported to be affected by a biotic factor such as the host genotype. Such an impact of the plant host on the size of asexual spore was recently reported in *P. viticola* (Delmotte *et al.* 2014) and *Venturia inaequalis* (De Gracia 2015), which stress the need to better study this trait in fungal pathogens as it could be subject to selection by host.

By preventing an organism to simultaneously maximise all traits involved in fitness, trade-offs can equalize fitness across individuals, genotypes, or species, conducting to the maintenance of standing levels of diversity (Roff 1992). For instance, Héraudet *et al.* (2008) suggested that the trade-off between latent period and spore production in *H. arabidopsis* may explain why the latent period remained variable in nature and did not achieved a uniformly minimal value. The constraint of total reproductive effort imposing a trade-off in the size and number of sporangia in *P. infestans*, as observed in our study, could therefore maintain variability for these life-history traits within populations of this pathogens. This tends to be confirmed with the large range of sporangia production values generally reported amongst isolates of single *P. infestans* populations. Moreover, the polymorphism of life-history traits values imposed by trade-off can lead to the emergence of various life-history strategies (Roff 1992). This can be crucial as different life-history strategies can explain the coexistence of genetically differentiated clades, in complete or partial reproductive isolation, within single plant pathogen species (Montarry *et al.* 2008). In the case of *P. infestans*, Mariette *et al.* (unpublished data) suggested the existence of two different life-history strategies because the clonal lineage 6_A1 produced a lot of small spores whereas the clonal lineage 13_A2 produced few large spores. From a ecological point of view, the former could be a better invader of vacant ecological niches (r-strategy) and the later could be a better competitor in occupied niches (K-strategy) (Lodge 1993). This pattern is consistent with the observation that the frequency of 13_A2 increased over time (Mariette *et al.* (unpublished data).

Here we report that a trade-off between number and size of asexual spores occurred in an important fungal plant pathogen, *P. infestans*, and that its shape was not affected by

the host resistance. It would be interesting to know the relationship between asexual spore number and size in other fungal plant pathogens as trade-offs (and their shape) can play a key role in evolutionary outcomes of these organisms (Kamo *et al.* 2007). Nevertheless, it is far from being the case at present because if the production of the asexual propagules (spore or sporangia) is a trait considered as essential and extensively studied in fungal plant pathogens (Hardham and Hyde 1997; Montarry *et al.* 2010), their size is however often ignored. Yet, the size of fungal propagules may be an important trait for different aspects of their fitness, like survival or germination, as observed for the seeds of plants (Westoby *et al.* 1992; Sadeghi *et al.* 2011). Nevertheless, owing to the lack of empirical evidences, the link between asexual spore size and such fitness aspects remain uncertain (De Gracia *et al.* 2015) and we should thus increase our research efforts on this topic. Besides, a future way of research in plant pathogens could be to not only limit on the trade-off between number and size of offspring but, as recommended by Begon *et al.* (2006), to look for a trade-off between the number of offspring and their individual fitness.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support by INRA ACCAF Metaprogramme (CLIF project) and ARIMNET (PoH-MED project; KBBE 219262). The authors also warmly thank Mathilde Bodiou (SYNTEC, Pleumeur-Gautier, France) for help with the sampling of *P. infestans* isolates. We express our thanks to A. Androdias, E. Rolland and C. Piriou for their help with isolate maintenance and biological experiments. We are grateful to the INRA Genetic Resources Center BrACySol of Ploudaniel for providing the plant material used in the tests. N. Mariette is supported by PhD project cofunded by INRA and ACVNPT (Association des Créateurs de Variétés Nouvelles de Pomme de Terre) through a CIFRE grant (Conventions Industrielles de Formation par la Recherche).

Literature cited

- Anderson, R. M., and R. M. May. 1982. Coevolution of hosts and parasites. *Parasitology*. 85:411–26.
- Andrивon, D., J. Montarry, R. Corbière, C. Pasco, I. Glais, B. Marquer, J. A. J. Clément, M. Castel, and F. M. Hamelin. 2013. The hard life of *Phytophthora infestans*: when trade-offs shape evolution in a biotrophic plant pathogen. *Plant Pathol.* 62(S1):28–35.
- Aylor, D. E. 2003. Spread of plant disease on a continental scale: role of aerial dispersal of pathogens. *Ecology*. 84:1989–1997.
- Bahri, B., O. Kaltz, M. Leconte, C. de Vallavieille-Pope, and J. Enjalbert. 2009. Tracking costs of virulence in natural populations of the wheat pathogen, *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *BMC Evol. Biol.* 9:26.
- Begon, M., C. R. Townsend, and J. L. Harper. 2006. Life, Death and Life Histories. Pp 89-132 in *Ecology, from individuals to ecosystems* (4th edition). Blackwell Publishing, Oxford.
- Brown, J. K. M. 2015. Durable resistance of crops to disease: a Darwinian perspective. *Annu. Rev. Phytopathol.* 53:513–539.
- Charnov, E. L., and S. K. M. Ernest. 2006. The offspring-size/clutch-size trade-off in mammals. *Am. Nat.* 167:578–582.
- Clément J. A. J., H. Magalon, R. Pellé, B. Marquer, and D. Andrивon. 2010. Alteration of pathogenicity-linked life-history traits by resistance of its host *Solanum tuberosum* impacts sexual reproduction of the plant pathogenic oomycete *Phytophthora infestans*. *J. Evol. Biol.* 23:2668–76.
- Corbière, R., and D. Andrивon. 2003. Preparation of a simple pea medium for culturing *Phytophthora infestans*. <http://www.eucablight.org/EucaBlight.asp>.
- De Gracia, M., M. Cascales, P. Expert, M. N. Bellanger, B. Le Cam, and C. Lemaire. 2015. How did host domestication modify life history traits of its pathogens? *Plos One* 10(6): e0122909.
- Delmas, C. E. L., I. D. Mazet, J. Jolivet, L. Delière, and F. Delmotte. 2014. Simultaneous quantification of sporangia and zoospores in a biotrophic oomycete with an automatic particle analyzer: disentangling dispersal and infection potentials. *J. Microbiol. Meth.* 107:169–175.

- Delmotte F, P. Mestre, C. Schneider, H. H. Kassemeyer, P. Kozma, S. Richart-Cervera, M. Rouxel, and L. Delière. 2014. Rapid and multiregional adaptation to host partial resistance in a plant pathogenic oomycete: evidence from European populations of *Plasmopara viticola*, the causal agent of grapevine downy mildew. *Infect. Genet. Evol.* 27, 500–508.
- Drenth, A., E. M. Janssen, and F. Govers. 1995. Formation and survival of oospores of *Phytophthora infestans*. *Plant Pathol.* 44:86–94.
- Fisher, M. C., D. A. Henk, C. J. Briggs, J. S. Brownstein, L. C. Madoff, S. L. McCraw, and S. J. Gurr. 2012. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature.* 484:186–194.
- Flor, H. H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* 9:275–96.
- Glais, I., J. Montarry, R. Corbière, C. Pasco, B. Marquer, H. Magalon, and D. Andrivon. 2014. Long-distance gene flow outweighs a century of local selection and prevents local adaptation in the Irish famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Evol. Appl.* 7:442–452.
- Hardham, A. R., and G. J. Hyde. 1997. Asexual sporulation in the Oomycetes. *Adv. Bot. Res.* 24:353–398.
- Héraudet, V., L. Salvaudon, and J. A. Shykoff. 2008. Trade-off between latent period and transmission success of a plant pathogen revealed by phenotypic correlations. *Evol. Ecol. Res.* 10:913–924.
- Huang, Y. J., M. H. Balesdent, Z. Q. Li, N. Evans, T. Rouxel, and B. D. L. Fitt. 2010. Fitness cost of virulence differs between the AvrLm1 and AvrLm4 loci in *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker of oilseed rape). *Eur. J. Plant Pathol.* 126:279–91.
- Jenner, C. E., X. Wang, F. Ponz, and J. A. Walsh. 2002. A fitness cost for Turnip mosaic virus to overcome host resistance. *Virus. Res.* 86:1-6.
- Kamo, M., A. Sasaki, and M. Boots. 2007. The role of trade-off shapes in the evolution of parasites in spatial host populations: An approximate analytical approach. *J. Theor. Biol.* 244:588–596.
- Kroon L. P., F. T. Bakker, G. B. van den Bosch, P. J. Bonants, and W. G. Flier. 2004. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Fungal Genet. Biol.* 41:766–782.
- Lack, D. 1947. The significance of clutch size. *Ibis.* 89:302–352.

- Laine, A. L. 2007. Pathogen fitness components and genotypes differ in their sensitivity to nutrient and temperature variation in a wild plant-pathogen association. *J. Evol. Biol.* 20:2371–2378.
- Laine A. L. 2008. Temperature-mediated patterns of local adaptation in a natural plant-pathogen metapopulation. *Ecol. Lett.* 11:327–337.
- Laine, A. L., and B. Barres. 2013. Epidemiological and evolutionary consequences of life-history trade-offs in pathogens. *Plant Pathol.* 62(S1):96–105.
- Law, R. 1979. Optimal life histories under age-specific predation. *Am. Nat.* 114:399–417.
- Lannou, C. 2012. Variation and selection of quantitative traits in plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 50:319–38.
- Lodge, D. M. 1993. Biological invasions: lessons for ecology. *Trends Ecol. Evol.* 8:133-137.
- Montarry, J., P. Cartolaro, J. Jolivet, and L. Willocquet. 2008. Genetic structure and aggressiveness of *Erysiphe necator* populations during Grapevine powdery mildew epidemics. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:6327–6332.
- Montarry J., F. M. Hamelin, I. Glais, R. Corbière, and D. Andrivon. 2010. Fitness costs associated with unnecessary virulence factors and life history traits: evolutionary insights from the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans*. *BMC Evol. Biol.* 10:283.
- Pariaud, B., F. Berg, F. Bosch, S. J. Powers, O. Kaltz, and C. Lannou. 2013. Shared influence of pathogen and host genetics on a trade-off between latent period and spore production capacity in the wheat pathogen, *Puccinia triticina*. *Evol. Appl.* 6:303–12.
- Quenouille, J., J. Montarry, A. Palloix, and B. Moury. 2013. Farther, slower, stronger: how the plant genetic background protects a major resistance gene from breakdown. *Mol. Plant Pathol.* 14:109–18.
- R Development Core Team. 2012. R: a language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; doi: 10.1002/jcc.22917
- Rausher, M. D. 1984. Tradeoffs in performance on different hosts: evidence from within- and between-site variation in the beetle *Deloyala guttata*. *Evolution.* 38:582–595.

- Roff, D. A. 1992. The evolution of life histories: Theory and analysis. Chapman and Hall, New-York, NY.
- Roff D. A. 2002. Life History Evolution. Sinauer Associates, Inc, Sunderland.
- Sadeghi, H., F. Khazaei, S. Sheidaei, and L. Yari. 2011. Effect of seed size on seed germination behavior of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). ARPN J. Ag. & Bio. Sci. 6:5-8.
- Sacristán, S., A. Fraile, J. M. Malpica, and F. García-Arenal. 2005. An analysis of host adaptation and its relationship with virulence in Cucumber mosaic virus. Phytopathology. 95:827–833.
- Sacristan, S., and F. Garcia-Arenal. 2008. The evolution of virulence and pathogenicity in plant pathogen populations. Molecular Plant Pathol. 9:369–384.
- Stearns, S. C. 1989. Trade-offs in life-history evolution. Funct. Ecol. 3:259–268.
- Susi H, and A. L. Laine. 2013. Pathogen life-history trade-offs revealed in allopatry. Evolution. 67–11:3362–3370
- Swarup, S., Y. Yang, M. T. Kingsley, and D. W. Gabriel. 1992. A *Xanthomonas citri* pathogenicity gene, pthA, pleiotropically encodes gratuitous avirulence on nonhosts. Mol. Plant-Microbe Interact. 5:204–213.
- Walker, R. S., M. Gurven, O. Burger, and M. J. Hamilton. 2008. The trade-off between number and size of offspring in humans and other primates. Proc. R. Soc. B. 275:827–834.
- Werner, P. A., and W. J. Platt. 1976. Ecological relationship of co-occurring goldenrods (*Solidago Compositae*). Am. Nat. 110:959-971.
- Westoby, M., E. Jurado, and M. Leishman. 1992. Comparative evolutionary ecology of seed size. Trends Ecol. Evol 7:368–372.
- Wolinska, J, and K. C. King. 2009. Environment can alter selection in host–parasite interactions. Trends Parasitol. 25:236–44.

Chapitre 4

Patrons d'adaptation à la température chez *P.* *infestans*

1. Objectifs de travail

Dans ce chapitre, nous avons voulu savoir si l'adaptation chez *P. infestans* pouvait s'effectuer en réponse à un facteur abiotique comme la température. Si une variabilité inter-clonale a déjà été observée chez ce parasite, on dispose cependant de peu d'informations concernant les clones actuellement présents dans les populations européennes. De plus, *P. infestans* a une large distribution dans des zones climatiques variées et il est donc possible que les isolats de ces différentes populations soient localement adaptés à ces conditions climatiques spécifiques, en particulier à la température, ce qui n'a jamais été envisagé auparavant.

Ici, nous avons utilisé un dispositif expérimental en 'jardin partagé' ('common garden experiments') pour tester expérimentalement l'hypothèse de l'existence de patrons d'adaptation locaux à la température chez l'agent du mildiou de la pomme de terre *Phytophthora infestans*. Les isolats provenaient d'aires géographiques différentes et/ou appartenaient à des lignées génétiques différentes.

Ces travaux nous ont notamment révélé des patrons d'adaptation locale à la température chez *P. infestans* à trois niveaux : (i) entre isolats présents dans des zones climatiques contrastées, (ii) entre isolats appartenant au clone 13_A2 prélevés dans des zones climatiques différentes et (iii) entre des isolats de deux lignées clonales du parasite, 6_A1 and 13_A2, cohabitant et invasives dans une même région climatique (mal-adaptation de la lignée 13_A2 aux températures les plus basses). C'est à notre connaissance la première fois qu'une adaptation locale intra-clone à la température est mise en évidence. Elle pourrait notamment suggérer une sélection locale à l'intérieur d'un groupe génétiquement homogène mais phénotypiquement variable. Par ailleurs, nous avons également pu démontrer un impact de la température sur le nombre, mais aussi la taille des descendants produits par le parasite : aux faibles températures, les isolats produisaient de plus gros sporanges, favorisant probablement la zoosporogénèse.

Les résultats présentés dans ce chapitre font l'objet d'une publication soumise à *Ecology and Evolution*.

2. Article 4

Local adaptation to temperature in populations and clonal lineages of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*

Nicolas Mariette, Annabelle Androdias, Romain Mabon, Bruno Marquer, Roselyne Corbière, Josselin Montarry and Didier Andrivon*

INRA, UMR1349 IGEPP (Institute of Genetics, Environment and Plant Protection), Domaine de la Motte, BP 35327, F-35653, Le Rheu Cedex, France.

*Corresponding author e-mail: didier.andrivon@rennes.inra.fr

Abstract

Environmental factors such as temperature strongly impact microbial communities. In the current context of global warming, it is therefore crucial to understand the effects of these factors on human, animal or plant pathogens. Here we used a common-garden experiment to analyse the thermal responses of four life-history traits (latent period, lesion growth, spore number and spore size) in isolates of the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans* from different climatic zones. The experiments revealed patterns of local adaptation to temperature, both between populations and within clonal lineages. Local adaptation to temperature could result from selection for increased survival between epidemics, when isolates are exposed to more extreme climatic conditions than during epidemics. We also showed differential thermal response curves for two clonal lineages sympatric in Western Europe, 6_A1 and 13_A2, suggesting a maladaptation of the latter to low temperatures. Finally, we demonstrated an impact of temperature on both sporangia number and sporangia size. At low temperatures, the production of bigger sporangia, probably favoring infection, could compensate the lower spore numbers. Low temperatures would then be less detrimental for *P. infestans* than high temperatures, where both the number and the size of sporangia were low.

Keywords: Climate change, Life-history traits, Epidemic, Plant pathogen, Late blight, Temperature adaptation

Introduction

Temperature is a major abiotic factor impacting all levels of biological functions, from molecules to ecosystems (Hochachka & Somero, 2002); as such, it influences all ecological communities and interactions (Cossins & Bowler, 1987). In host-pathogen interactions, temperature can strongly affect epidemic development, notably by acting on key stages of the pathogen life cycle (Tooley *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2011). In the context of climate change, it is crucial to analyse and predict patterns of evolutionary adaptation of agronomically or medically relevant pathogens to different thermal environments (Bennett & Lenski, 1999; Mboup *et al.*, 2012). Indeed, the Earth's climate has warmed at an unprecedented rate since the last century, with a rise of global surface temperature by 0.74°C on average (IPCC 2007). This phenomenon seems to continue, and the temperature increase should reach at least 1.5 to 2.0°C by the end of the 21st century according to the most recent projections (IPCC 2013).

Climate change will probably modify ecological niches as well as the phenology and geographical ranges of species, leading to unavoidable modifications in the relationships between species (see reviews by Parmesan, 2006 & Bellard *et al.*, 2012). The fast elevation of temperatures is also expected to impact intraspecific interactions. For instance, the genetic composition of a local population may change due to the selection of genotypes performing better in the new climatic conditions (*i.e.* higher temperatures), as suggested by Hoffmann & Sgrò (2011). Local populations may also have to cope with warm-adapted genotypes migrating from lower latitudes (van Doorslaer *et al.*, 2009; Bebber *et al.*, 2013). The risk of such a displacement of the resident gene pool will depend upon the extent to which individual populations within a species are locally adapted to prevailing temperatures (Mitchell & Lampert, 2000). Local adaptation occurs in response to spatially heterogeneous selective pressures, resulting in a higher relative fitness for resident individuals in their local habitats than individuals from foreign habitats (DeWitt & Scheiner, 2004). The existence of local adaptive patterns is generally tested in common garden experiments (Kawecki & Ebert, 2004; Blanquart *et al.*, 2013) in which are compared either the performances of different populations within environments (the 'local vs. foreign' criterion) or the performances of a given population across environments (the 'home vs. away' criterion). To take into account

these possibilities, it is necessary to know the temperature responses of the different genotypes present in a population (Mizubuti & Fry, 1998).

In microorganisms, local adaptation to environmental factors such as salinity or pH has been reported many times (*e.g.* Weisse *et al.*, 2011; Rengefors *et al.*, 2015). Some studies showing local adaptive patterns to temperature are also present in the literature. For example, local thermal adaptation in the '*Spumella*-like' flagellates has been shown in an experiment including strains collected in warm, temperate and Antarctic regions (Boenigk *et al.*, 2007). Similarly, different thermal adaptation patterns were observed in Northern and Southern French isolates of *Puccinia striiformis*, the fungal pathogen causing stripe rust on wheat (Mboup *et al.*, 2012). Zhan & McDonald (2011) also found evidence of local adaptation to temperature in another fungal pathogen of wheat, *Mycosphaerella graminicola*, when comparing growth rates of isolates sampled across five continents. However, in most of these studies, adaptation results in a genetic differentiation of isolates/pathotypes according to climatic zones. We are not aware of reports of thermal adaptation within clonal lineages of pathogens, although many parasites multiply primarily asexually.

Pathogens of annual crops, generally found in agro-ecosystems distributed across a wide range of climates, provide good model systems for the study of local adaptation to temperature at different geographical and genetic scales (Stefansson *et al.*, 2013). This is for instance the case of *Phytophthora infestans*, which causes late blight, a serious threat to potato (*Solanum tuberosum*) and tomato (*Solanum lycopersicum*) production throughout the world (Kamoun *et al.*, 2015). Its life cycle is primarily aerial, with polycyclic epidemics in which asexual sporangia containing infective zoospores are dispersed from host to host by water or wind, potentially over long distances (Aylor, 2003; Glais *et al.*, 2014). *P. infestans* is a heterothallic organism with two mating types, A1 and A2. Between crop seasons, this pathogen can therefore survive as asexual clones in potato tubers or *via* the long-lived oospores resulting from the sexual cycle wherever the two mating types coexist and mating occurs (Drenth *et al.*, 1995, Andrivon *et al.*, 2013). Originally from Central Mexico (Goss *et al.*, 2014), *P. infestans* can be found wherever potato is grown, in a wide range of climates. This is the case in Europe, where the pathogen is present from Scandinavia to the

Mediterranean basin. The recent development of polymorphic microsatellite markers (Lees *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2013a) allowed to reveal marked differences in the genetic structure of *P. infestans* populations between these areas. Populations from Northern Europe display high levels of genetic diversity, a consequence of sexual reproduction (Sjöholm *et al.*, 2013). By contrast, and despite the coexistence of both mating types, *P. infestans* populations from Western Europe and the Mediterranean Basin are largely clonal and dominated by a few genotypes (Montarry *et al.*, 2010; Gisi *et al.*, 2011; Cooke *et al.*, 2012; Harbaoui *et al.*, 2014, Mariette *et al.*, *in press*). During the past few years, two clonal lineages, 13_A2 and 6_A1 have been reported at high frequencies in West European populations (Cooke *et al.*, 2012; Mariette *et al.*, *in press*). Isolates belonging to the 13_A2 clonal lineage are also found in other areas, such as the Mediterranean Basin or Asia (Corbière *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2013b, Chowdappa *et al.*, 2015).

Here, we conducted a common garden experiment in which 42 *P. infestans* isolates from different climatic areas were exposed to four temperatures (10°C, 14°C, 18°C and 24°C). Four life history traits were assessed, including the size of sporangia which could have an underestimated importance on the parasite's fitness. Thanks to this experimental design, we tested, for the first time in this species, the hypothesis of a local adaptation to temperature in *P. infestans*. The originality of this study also resides on the fact that we also tested if isolates belonging to a same clonal lineage but sampled in different climatic areas showed specific local adaptive patterns to temperature. This aspect is therefore generally not treated in this type of studies. The third objective of our work was to provide insights into the specific thermal sensitivity of European *P. infestans* clonal lineages, for which little information is available so far.

Materials and methods

Origin of Phytophthora infestans isolates

One hundred ninety nine *P. infestans* isolates were sampled in potato fields located in seven countries among three geographical areas: 45 isolates from Northern Europe (Denmark, Estonia, Latvia and Lithuania), 137 from Western Europe (Brittany, France) and 17 from Mediterranean Basin (Algeria and Cyprus) (Fig. 1; Table S1). The sampling took place during the mid and end-stages of late blight epidemics, from May to September 2013 depending on the area. The three geographical areas have been chosen for their climatic specificities, particularly temperatures encountered along the year. Northern Europe features severe winters and relatively brief, rather cool summers, whereas in Western Europe, the annual temperature range is relatively narrow with cool winters and summers. For its part, the climate of the Mediterranean Basin is characterized by mild winters and hot, dry summers. To describe the local thermal conditions, we used climatic variables available on the Climate-Data.org (<http://climate-data.org>); monthly temperature means were used to estimate annual mean, variance, minimum and maximum of each sampling area (Table S1).

Isolates were obtained from potato leaflets with single lesions (only one leaf per plant was taken), by placing a fragment of infected leaf tissue on tuber slices of a susceptible potato cultivar (Bintje, Spunta or Berber). After incubation for 5-7 days at 15-18°C in growth chambers, pure cultures were established by transferring the hyphal mats growing on top of the slices to pea or Rye B agar media supplemented with antibiotics (ampicillin, rifamycin, pimarinic). After about 10 days, growing colonies were transferred to agar media without antibiotics, and subsequently maintained at 15°C, in darkness.

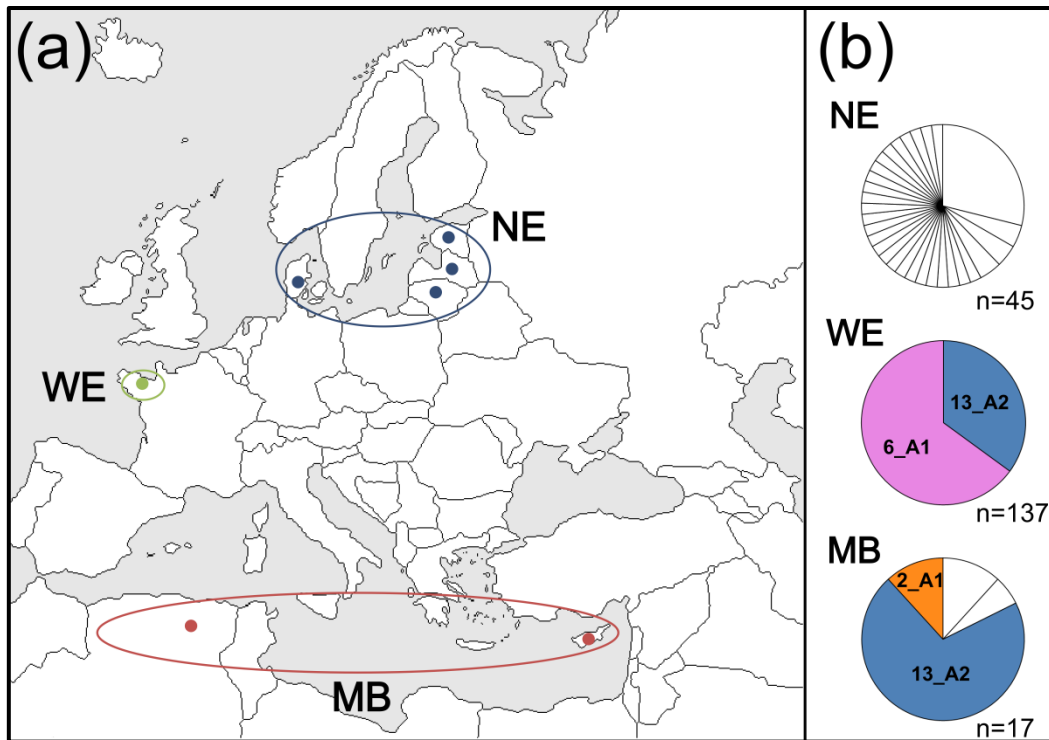


Fig. 1. Sampling characteristics with the location of source *Phytophthora infestans* populations (a) and clonal lineage distribution among the populations (b). Populations are coded as follows: NE, Northern Europe; WE, Western Europe; MB, Mediterranean Basin. The seven points on the map represent the main location of potato fields sampled in each country. Unknown genotypes are represented in white in the graphics.

Genetic characterization and selection of isolates for the experiments

All the 199 *P. infestans* isolates have been characterized both for their mating type through pairing tests (Montarry *et al.*, 2008) and their genotype using 17 polymorphic microsatellites markers: Pi02, PiG11, Pi4B, Pi4G (Knapova & Gisi, 2002), D13, Pi04, Pi16, Pi33, Pi56, Pi63, Pi70 (Lees *et al.*, 2006), PinfSSR2, PinfSSR4, PinfSSR6a, PinfSSR7, PinfSSR8 and PinfSSR11 (Li *et al.*, 2013a). This genetic characterization allowed to identify the multilocus genotypes (MLGs) and the corresponding clonal lineages among the 199 isolates (Mariette *et al.*, *in press*; Fig. 4). From this characterization, we have selected 42 isolates representing as faithfully as possible the genetic diversity of each area: 16 sampled in Northern Europe [NE], 17 in Western Europe [WE] and nine in the Mediterranean Basin [MB] (Fig. 1; Table S2). Besides, this selection of isolates have allowed treating our three research questions: Firstly, all the 42 isolates were used to test the hypothesis of a local thermal adaptation as we

compared the temperature responses of isolates from the three geographic areas, regardless the genotype characteristics. Secondly, fourteen 13_A2 isolates from both Western Europe and the Mediterranean Basin (eight from WE and six from MB) were therefore included in the selection with the aim to test the local adaptation hypothesis within a clonal lineage. Indeed, a same clonal lineage was never observed in all three areas but isolates belonging to the 13_A2 clonal lineage have been sampled in these two areas. Thirdly, nine West European isolates belonging to the 6_A1 clonal lineage were also selected with the aim to compare their pattern responses with those of the West European 13_A2 isolates.

Temperature response experiments

Four life-history traits linked to aggressiveness of the *P. infestans* isolates were measured in a range of four temperatures (10°C, 14°C, 18°C and 24°C) using a common garden experiment. This temperature range was chosen because it covers the biological activity of *P. infestans* (Mizubuti & Fry, 1998; Maziero *et al.*, 2009).

Aggressiveness tests were performed on detached leaflets of the potato cultivar Bintje, susceptible to late blight. Plants were grown from certified seed tubers in 13-cm pots (one tuber per pot) filled with 1: 1: 1 sand-peat-compost mixture placed in a glasshouse regulated at 15-20°C (night/day temperatures) with 16h of photoperiod. Once a week, plants were watered with a nutrient solution (Hakaphos; NPK 15/10/15). For the inoculum preparation and aggressiveness tests, leaflets of similar size were picked from the median area of 6- to 8-week-old plants.

Before their aggressiveness assessment, isolates were multiplied separately on detached leaflets of cv. Bintje in order to restore pathogenicity possibly lost during axenic cultures (Jinks & Grindle, 1963). To this end, droplets of sporangia suspensions prepared from 3- to 4-week-old pea agar cultures (by flooding with sterile water and scrapping the colony surface) were deposited on the underside of detached leaflets. After seven to 10 days of incubation in humid chambers under controlled conditions (18°C with 16 h of day length), newly formed sporangia were collected from the leaflets in sterile water. Sporangia were counted using a hemocytometer and diluted to a concentration of 5×10^4 sporangia per mL.

Finally, before inoculation for aggressiveness determination, the suspensions were kept at 4°C for approximately 2-3 h to promote zoospore release.

Each isolate was inoculated separately onto 24 detached leaflets of cv. Bintje by depositing a 20 µL droplet of the prepared sporangial suspensions (about 1000 sporangia) on the center of each leaflet. Before inoculation, leaflets were placed in pairs, abaxial face up, onto the lids of inverted Petri dishes containing 10 gL⁻¹ water agar and acting as humid chambers. Six leaflets (*i.e.*, three dishes) were kept in clear boxes and incubated in climatic chambers regulated at each temperature tested (*i.e.* 10°C, 14°C, 18°C and 24°C) with 16 h of day length. The temperature prevailing in each climatic chamber was recorded every hour using Thermo Tracer recorders (Oceasoft, Montpellier, France). This tracking has revealed that the temperature increased by 2°C during the diurnal period because of the heat generated by the lights. As a consequence, the diurnal temperatures within the chambers regulated at 10°C, 14°C, 18°C and 24°C actually were 12°C, 16°C, 20°C and 26°C, respectively (Fig. S1).

Four aggressiveness components were measured: the latent period (**LP**), the sporulating lesion growth rate (**LGR**), the sporangia production (**SP**) and the sporangia size (**SS**). The latent period, namely the elapsed time between inoculation and first sporulation, was assessed by observing daily the leaflets under a magnifying glass to check the appearance of sporangia. Three days after the observation of the first sporangia, we measured the two diameters (one along the midrib and one perpendicular to it) of the sporulating lesion expansion of each leaflet. The lesion area was then calculated from these measurements assuming an elliptic shape. The sporulating lesion growth rate (LGR), expressed in mm².day⁻¹ was calculated by dividing the sporulating lesion area by three (*i.e.*, the number of days since the onset of sporulation). Immediately after measuring the lesion diameters, sporangia were washed from leaflets in 10 mL Isoton II (saline buffer; Beckman Coulter, Villepinte, France). Suspensions were kept in glass tubes at -20°C until the counting of the sporangia with a Coulter Z2 counter (Beckman Coulter) equipped with a 100-µm aperture tube, allowing the determination of the number of sporangia produced on the lesion. The experiment was repeated twice, between March and May 2014. Afterwards, the size of sporangia (SS) was determined under a microscope fitted with a camera and using the

image analysis software Histolab® v8.1.0 (Microvision Instruments, Evry, France). For each sample, a mean SS was calculated from the measurement of 100 randomly chosen sporangia.

Statistical analyses

All statistical analyses were carried out using the software R, version 3.1.0 (R Core Team, 2014) and the significance threshold was fixed at $\alpha = 0.05$. We compared thermal responses of *P. infestans* isolates at three levels: (1) between isolates coming from the three geographical areas, (2) between the 13_A2 isolates collected in two geographical areas (Western Europe and Mediterranean Basin) and (3) between the 13_A2 and 6_A1 isolates sampled in Western Europe. Normality and homogeneity of variances were checked with the Shapiro-Wilk and the Leven tests, respectively. For each level of comparison, the effects of temperature and origin (geographical or clonal) on LP were tested using the rank sum tests of Kruskal-Wallis and Wilcoxon because assumptions of homoscedasticity and normal distribution were not met to use parametric tests. The impact of temperature, origin (geographical or clonal) and their interactions on LGR, SP and SS were assessed with linear mixed models using the “lme4” package, version 3.0.3 (Bates *et al.*, 2011). In these models, temperature and population origin (geographical or clonal) were treated as fixed factors and the test repetition was rated as random factor. SP was square-root transformed to satisfy assumptions of homoscedasticity and normality. The effects of temperature, origin (geographical or clonal) and their interactions were tested with a Wald test. When needed, pairwise comparisons of least square means (LSMeans; the “lsmeans” package version 3.0.3) have been performed using the Tukey method for *P*-values adjustment.

Results

Temperature responses among populations from the three climate zones

The general shape of thermal reaction norms for latent period (LP), lesion growth rate (LGR) and sporangia production (SP) was consistent with expectations in all isolates, regardless of their geographical origin: low performances at 10°C, an increase in performance with temperature up to a maximum at 18°C, and then a decline at 24°C, especially for SP (Table

1). By contrast, sporangia size (SS) significantly decreased with increasing temperature (Table 1).

Table 1. Aggressiveness components of the 42 *Phytophthora infestans* isolates sampled in the three geographical areas (Northern Europe, Western Europe and Mediterranean Basin). LP = latent period (days); LGR = lesion growth rate (mm².day⁻¹); SP = sporangia production (no. sporangia/lesion); SS = sporangia size (µm²).

Component	Temp. (°C)	Value/ Populations*			
		Northern Europe	Western Europe	Mediterranean Basin	
LP	10	5.51 (0.08) a	5.11 (0.05) a	5.23 (0.08)	a
	14	4.10 (0.06) b	3.78 (0.04) b	4.01 (0.06)	b
	18	3.09 (0.04) d	2.93 (0.03) c	3.05 (0.03)	c
	24	3.29 (0.05) c	2.95 (0.03) c	2.99 (0.07)	c
LGR	10	260.6 (7.9) d	298.4 (7.0) c	240.1 (7.3)	c
	14	399.9 (8.2) c	468.4 (7.9) b	393.2 (9.5)	b
	18	602.2 (8.3) a	647.1 (8.3) a	634.6 (11.1)	a
	24	549.7 (11.7) b	622.2 (9.0) a	590.9 (11.4)	a
SP	10	105181 (5169) c	95092 (3977) c	82916 (4457)	c
	14	188760 (8299) b	216823 (7354) b	168150 (9100)	b
	18	302369 (12483) a	375911 (11118) a	388046 (14792)	a
	24	57733 (4671) d	84054 (4131) c	78888 (4897)	c
SS	10	477.0 (9.0) a	498.3 (8.9) a	501.1 (10.7)	a
	14	421.2 (9.1) b	447.7 (7.2) b	445.9 (12.4)	b
	18	382.3 (10.6) c	395.9 (5.6) c	392.0 (9.2)	c
	24	411.1 (21.9) bc	386.6 (4.9) c	383.4 (12.2)	c

* Mean (± standard error); Different letters beside the values indicate significant differences between the temperatures within each geographic area at $P < 0.05$ (Wilcoxon rank-sum tests or lsmeans).

Despite the similar reaction norms of *P. infestans* isolates, differences in temperature responses were detected between the three geographic areas (Fig. 2; Table 2). Nordic isolates had long latent periods (LP) at the four temperatures tested (Fig. 2a). At 24°C, their LP was significantly longer (*i.e.* 3.3 days) than that of isolates sampled in the other two areas (*i.e.* 2.9 days; Wilcoxon rank-sum tests, $P < 0.001$), whereas no significant differences between Nordic and Mediterranean isolates were detected at the other temperatures

(Wilcoxon rank-sum tests, $P > 0.05$). West European isolates showed the highest lesion growth rates (LGR) over the whole temperature range (Fig. 2b). They grew significantly faster than Nordic isolates at the four temperatures tested (Wald test, lsmeans post-hoc comparison; $P < 0.01$ to < 0.001) and than Mediterranean isolates at 10 and 14 °C (Wald test, lsmeans post-hoc comparison; $P < 0.001$). Moreover, if no significant difference was detected between isolates from Northern Europe and Mediterranean Basin at low temperatures (Wald test, lsmeans post-hoc comparison; $P > 0.05$), the Nordic isolates had a lower LGR at high temperatures (Fig. 2b). At 18°C, the difference was just above the significance threshold (Wald test, lsmeans post-hoc comparison; $P = 0.06$) and was significant at 24°C (Wald test, lsmeans post-hoc comparison; $P < 0.05$). At 10°C, the Nordic isolates had the highest sporangia production (SP) with 10.5×10^4 spores/lesion, significantly higher than the Mediterranean isolates (*i.e.* 8.3×10^4 spores/lesion; Wald test, lsmeans post-hoc comparison; $P < 0.05$; Fig. 2c). The opposite was true at high temperatures (18°C and 24°C), explaining the significant geographic origin x temperature interaction (Table 2). At 14°C, the West European isolates had the highest SP (Wald test, lsmeans post-hoc comparison; $P < 0.01$ to < 0.001), whereas no difference was observed between isolates from the two other areas (Wald test, lsmeans post-hoc comparison; $P > 0.05$). Moreover, no effect of the geographic origin was detected on the size of (SS) over the temperature range, which decreased from around $500 \mu\text{m}^2$ at 10°C to $400 \mu\text{m}^2$ at 18 and 24°C for all the isolates (Fig. 2d; Table 2).

Table 2. Linear mixed model analysis of the geographic origin effect (Northern Europe, Western Europe and Mediterranean Basin) and the temperature effect (10°C, 14°C, 18°C and 24°C) on the lesion growth rate (LGR), the sporangia production (SP) and the sporangia size (SS) of 42 *P. infestans* isolates. The origin and the temperature effects and their interaction were the fixed factors and the test repetition was included as a random factor.

Variable	Lesion growth rate (LGR)			Sporangia production (SP)			Sporangia size (SS)		
	df	Wald χ^2	$P > \chi^2$	df	Wald χ^2	$P > \chi^2$	df	Wald χ^2	$P > \chi^2$
Origin	2	97.83	<0.0001 ***	2	43.077	<0.0001 ***	2	2.6404	0.2671
Temperature	3	2915.3	<0.0001 ***	3	2429.5	<0.0001 ***	3	205.89	<0.0001 ***
Origin x Temperature	6	19.928	0.0029 **	6	64.273	<0.0001 ***	6	11.574	0.0722

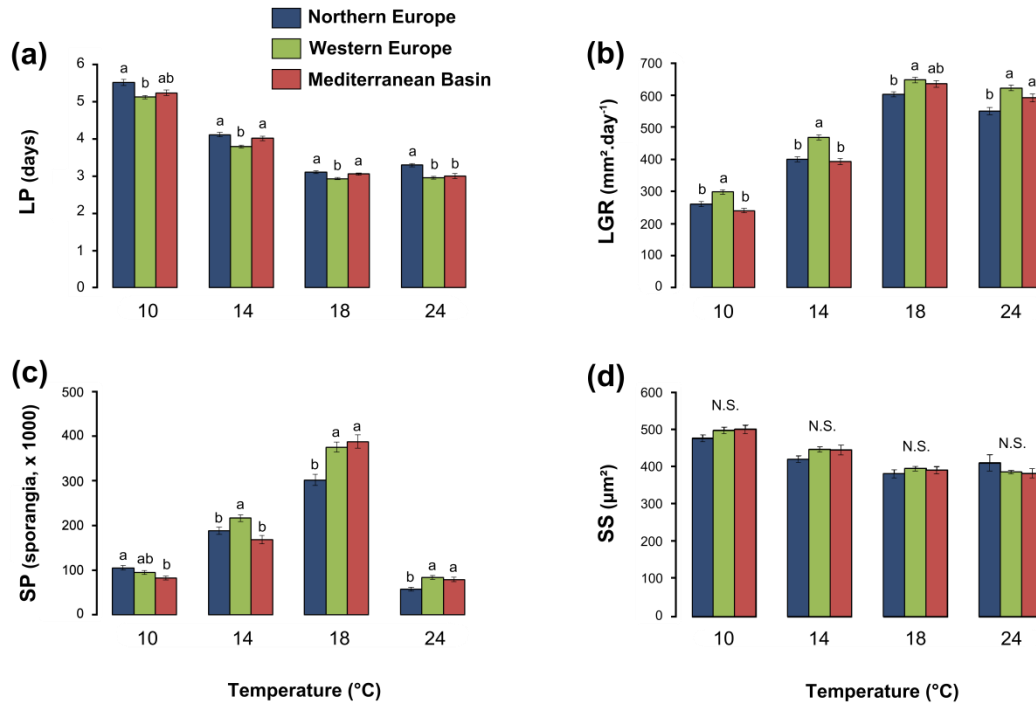


Fig. 2. Temperature responses of 42 *P. infestans* isolates sampled in three geographic areas for the latent period (a), the lesion growth rate (b), the sporangia production (c) and the sporangia size (d) (mean $\pm$ SE). Different letters above the histograms indicate significant differences between the geographic areas for a given temperature at $P < 0.05$ (Wilcoxon rank-sum tests or lsmeans).

Intra-clonal adaptation to temperature within the 13_A2 clonal lineage

The latent periods (LP) were generally similar among the 14 isolates tested belonging to the 13_A2 clonal lineage but coming from different geographic areas (Western Europe and Mediterranean Basin). This was true over the whole temperature range, except at 18°C where West European isolates had a significantly shorter LP (Wilcoxon rank-sum tests, $P < 0.05$; Fig. 3a). Significant effects of origin $\times$ temperature interaction were observed for the lesion growth rate (LGR) and the sporangia production (SP; Table 3). Indeed, West European isolates grew faster than Mediterranean isolates at low temperatures (10°C and 14°C; Fig. 3b), whereas Mediterranean isolates performed better at high temperatures, especially at 18°C (Wald test, lsmeans post-hoc comparison; $P < 0.05$; Fig. 3b). These temperature-dependent differences were also observed for SP with more sporangia produced by the West European isolates at 14°C compared to the Mediterranean isolates (Wald test, lsmeans post-hoc comparison; $P < 0.001$; Fig. 3c), while the opposite was observed at 18°C and 24°C

(Wald test, lsmeans post-hoc comparison; $P < 0.05$ to < 0.001 ; Fig. 3c). No difference in the sporangia size (SS) was detected between both origins over the range of temperatures (Wald test, lsmeans post-hoc comparison; $P > 0.05$; Fig. 3d).

Table 3. Linear mixed model analysis of the geographic origin (Western Europe and Mediterranean Basin) and the temperature effect (10°C, 14°C, 18°C and 24°C) on the lesion growth rate (LGR), the sporangia production (SP) and the sporangia size (SS) of 14 *P. infestans* isolates belonging to the 13_A2 clonal lineage. The origin and the temperature effects and their interaction were the fixed factors and the test repetition was included as a random factor.

Variable	Lesion growth rate (LGR)			df	Sporangia production (SP)		df	Sporangia size (SS)	
	df	Wald χ^2	$P > \chi^2$		Wald χ^2	$P > \chi^2$		Wald χ^2	$P > \chi^2$
Origin	1	1.3626	0.2431	1	5.3142	0.0212 *	1	2.2587	0.1329
Temperature	3	1517.5	< 0.0001 ***	3	1297.1	< 0.0001 ***	3	115.88	< 0.0001 ***
Origin x Temperature	3	12.506	0.0058 **	3	29.049	< 0.0001 ***	3	0.298	0.9604

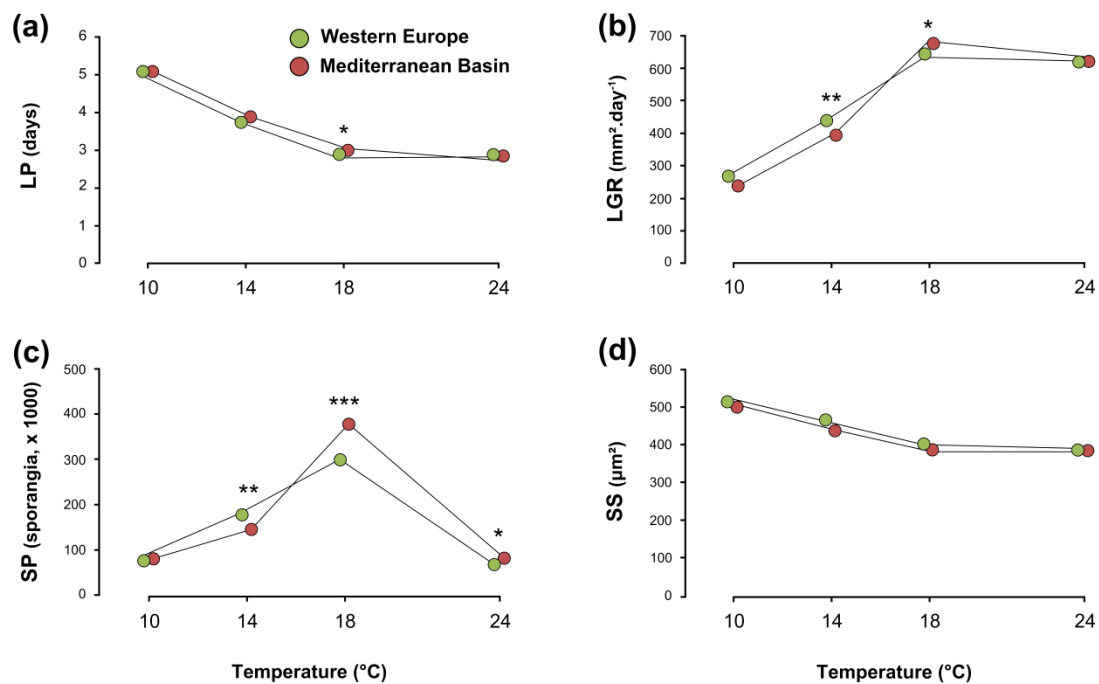


Fig. 3. Temperature responses of 14 *P. infestans* isolates belonging to the 13_A2 clonal lineage sampled in two geographical areas for latent period (a), lesion growth rate (b), sporangia production (c) and sporangia size (d). SE were omitted for clarity. *Significant differences between the geographical areas at a given temperature, as revealed by Wilcoxon rank-sum tests or lsmeans. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Adaptation patterns to temperature in sympatric clones: 13_A2 and 6_A1 isolates from Western Europe

Clonal lineages had strong effects on LGR, SP and SS of West European isolates (Fig. 4; Table 4). 6_A1 isolates had a significantly higher LGR at 10°C and 14°C (Wald test, lsmeans post-hoc comparison; $P < 0.001$; Fig. 4b) as well as a significantly higher SP at the four temperatures tested (Wald test, lsmeans post-hoc comparison; $P < 0.01$ to < 0.001 ; Fig. 4c) than 13-A2 isolates collected in the same area at the same time. 13_A2 isolates produced significantly larger sporangia at 10°C and 14°C than 6_A1 isolates (Wald test, lsmeans post-hoc comparison; $P < 0.05$ to < 0.01 ; Fig. 4d), whereas no significant difference in SS was detected at higher temperatures (Wald test, lsmeans post-hoc comparison; $P > 0.05$; Fig. 4d). Clonal lineages differed little for LP, which was only significantly shorter for 13_A2 at 24°C (Wilcoxon rank-sum tests, $P < 0.05$; Fig. 4a).

Table 4. Linear mixed model analysis of the clonal lineage (6_A1 and 13_A2) and the temperature effect (10°C, 14°C, 18°C and 24°C) on the lesion growth rate (LGR), the sporangia production (SP) and the sporangia size (SS) of 17 *P. infestans* isolates sampled in Western Europe. The clonal lineage and the temperature effects and their interaction were the fixed factors and the test repetition was included as a random factor.

Variable	Lesion growth rate (LGR)			Sporangia production (SP)			Sporangia size (SS)		
	df	Wald χ^2	$P > \chi^2$	df	Wald χ^2	$P > \chi^2$	df	Wald χ^2	$P > \chi^2$
Clonal lineage	1	17.106	<0.0001 ***	1	113.68	<0.0001 ***	1	10.74	0.001 **
Temperature	3	1219.5	<0.0001 ***	3	1431.3	<0.0001 ***	3	194.66	<0.0001 ***
Origin x Temperature	3	8.6928	0.0337 *	3	13.78	0.0032 **	3	4.569	0.206

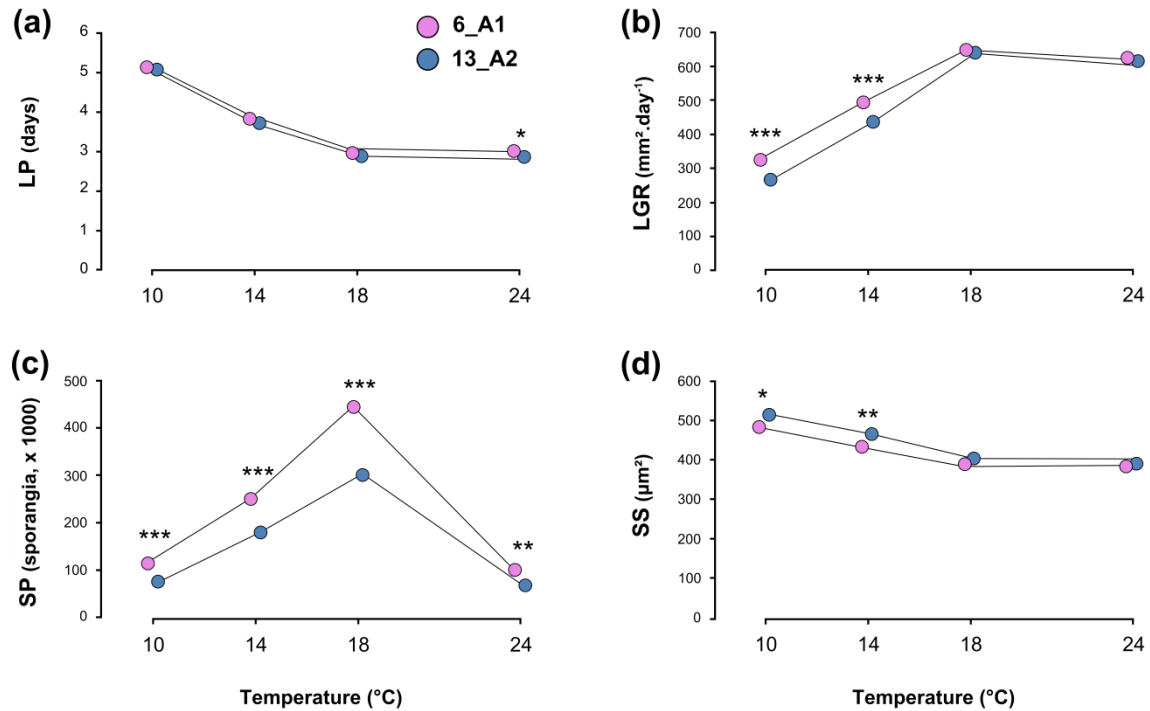


Fig. 4. Temperature responses of 17 West European *P. infestans* isolates belonging to two clonal lineages (6_A1 and 13_A2) for latent period (a), lesion growth rate (b), sporangia production (c) and sporangia size (d). SE were omitted for clarity. *Significant differences between the geographical areas at a given temperature, as revealed by Wilcoxon rank-sum tests or lsmeans. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Discussion

P. infestans is locally adapted to temperature, both at the population and at the clonal lineage level

One way of detecting local adaptation is through the 'local vs. foreign' test, *i.e.* by measuring higher performances within a given environment of a population native from this environment than of populations transplanted from other environments (Kawecki & Ebert, 2004). Here, this 'local vs. foreign' criterion was fulfilled for sporangia production, with the highest performance for the isolates from Northern Europe, Western Europe and Mediterranean Basin at 10°C, 14°C and 18°C, respectively. This indicates local adaptive patterns to temperature among the three populations. Nonetheless, the temperature responses for the other traits measured were not consistent with a local adaptation: the

Nordic isolates had the longest latent periods and the lowest lesion growth rates over the full temperature range and, in contrast, the isolates from Western Europe always showed high performances for these traits.

The other test for local adaptation is the 'home vs. away' test, where the performance of a given population is compared between native and non-native environments (Kawecki & Ebert, 2004). Here, the shapes of thermal response curves were quite similar for all isolates tested, regardless of their area of origin. We did not for instance observe a lower optimum temperature (*e.g.* 14°C) for Nordic isolates, or a higher optimum for Mediterranean isolates. However, the low performance of Nordic isolates at 24°C suggest a maladaptation to high temperatures in this population: it was the only population with a longer latent period and a lower lesion growth rate at 24°C than at 18°C, as well as a lower sporangia production at 24°C than at 10°C. Together, both tests for local adaptation indicate that *P. infestans* is locally adapted to temperature conditions prevailing in the areas where populations were sampled. Such patterns have previously been reported in other fungal pathogens of crops, such as *Rhynchosporium commune* on barley (Stefansson *et al.*, 2013) or *Puccinia striiformis* on wheat (Mboup *et al.*, 2012), but it is to our knowledge the first report of such a local adaptation to climate in *P. infestans*.

Our data also show that local adaptation to temperature can occur not only between populations, but also within a single clonal lineage. 13_A2 isolates indeed had different performances across the range of temperatures tested depending on the area of sampling. West European 13_A2 isolates caused larger lesions and produced more sporangia at low temperatures than their Mediterranean counterparts; the opposite was true at high temperatures. These observations, fulfilling the 'local vs. foreign' criterion of local adaptation (Kawecki & Ebert, 2004), are to our knowledge the first report of intraclonal local adaptation to temperature in any microbial pathogen.

Sympatric clones show no 'uniform' response to temperature

Local adaptation to temperature coupled with the similarity of response norms between isolates of *P. infestans* would lead to assume that sympatric isolates would share thermal

response patterns, even if they belonged to different clones. However, this is not the case. We indeed showed that two sympatric clonal lineages, 6_A1 and 13_A2, had distinctly different performance over the whole range of temperatures tested. 6_A1 isolates had indeed significantly higher lesion growth rates at low temperatures and produced more sporangia over the range of temperatures tested than 13_A2 isolates. Differences in thermal response between *P. infestans* clonal lineages have been reported previously, *e.g.* in an experiment with Brazilian isolates where BR-1 showed higher sporulation capabilities at low temperatures than US-1, and conversely at high temperatures (Maziero *et al.*, 2009). Other clonal lineages were found to have similar temperature responses, such as US-1 and US-8 (Miller & Johnson, 2014). In contrast to American clones, little information was available on the temperature responses of the current European clonal lineages. Cooke *et al.* (2012) have nonetheless tested the effect of two temperatures on nine clonal lineages from Great Britain. They have shown that at 13°C, both 13_A2 and 6_A1 were part of those which caused the largest lesions, whereas at 18°C, 6_A1 isolates caused the largest lesions. These results do not match with ours, where 13_A2 isolates were found to perform badly at low temperatures. The lower lesion growth rates and sporangia production levels of 13_A2 isolates at low temperatures compared to 6_A1 isolates, as well as their shorter latent period at 24°C, suggest a better adaptation of this lineage to warmer conditions. This could avoid the expansion of 13_A2 to cool climates, and therefore explain its absence from Northern Europe as hypothesized by Chmielarz *et al.* (2014).

High temperatures could be more penal than low temperatures to P. infestans fitness

We observed a strong effect of temperature on the four life-history traits measured, for isolates of each population. The optimal temperature range for the development of *P. infestans* was reported between 15°C and 22°C (Mizubuti & Fry, 1998; Maziero *et al.*, 2009; Shakya *et al.*, 2015) which is in line with our results as the isolates had best performances at 18°C, especially for sporangia production. Moreover, the isolates did not perform well at 10°C, also confirming the restricted development of this species at low temperatures (Mizubuti & Fry, 1998; Andrade Piedra *et al.*, 2005).

Nevertheless, we also showed that *P. infestans* isolates produced small sporangia at high temperatures but large sporangia at 10°C and, to a lesser extent, at 14°C. Sporangia size is likely a good proxy for offspring quality. Indeed, sporangia germination is a temperature-driven process in *Phytophthora*: at low temperatures (under 15°C), the formation of zoospores is predominant (indirect germination), whereas at higher temperatures, germination is mostly direct *via* the formation of germ tubes (Mizubuti & Fry, 1998; Maziero *et al.*, 2009; Danies *et al.*, 2013). The differences in sporangia size observed at low vs. high temperatures could thus represent a plastic response to environment: a larger size would allow a sporangium to produce more zoospores, which is particularly crucial at low temperatures; by contrast, a small size may less hinder direct germination at high temperatures. The relationship between sporangium size and zoospore production needs to be confirmed in *P. infestans* to accredit this hypothesis. However, recent investigations on *Plasmopara viticola*, the oomycete causing grapevine downy mildew, showed that smaller sporangia produced fewer zoospores (Delmotte *et al.*, 2014; Delmas *et al.*, 2014).

Assuming that sporangia size reflects offspring quality (number of infectious zoospores, ability to germinate...), isolate fitness would be less affected at low temperatures, where bigger sporangia would partly compensate for reduced spore production, than at high temperatures, where both sporangia number and sizes are sharply reduced. The detrimental effect on fitness of high temperatures is probably differential between populations, since Nordic populations could compensate low sporulation by bigger sporangia more than Mediterranean ones at low temperatures, whereas both sporulation and sporangia size are low at high temperature in almost all populations.

Is the response of life-history traits to temperature a consequence of survival strategies?

If the low performances of the Nordic isolates were expected at high temperatures, the fact that they also had the longest latent periods and the lowest lesion growth rate at low temperatures is more surprising. A maladaptation of these isolates to potato cv. Bintje used in our tests can be excluded, given the frequent and prolonged use of this cultivar in Northern Europe. We can thus suppose that Nordic isolates are selected for long latent

periods and low lesion growth rates. Such traits would favour co-inoculations by other isolates, and therefore increase the probability of finding a sexual partner and produce oospores (Clément *et al.*, 2012). Such 'slow' isolates would benefit then from increased inter-epidemic transmission in Northern Europe, where the climatic conditions allow overwintering survival primarily through the sexual oospores. Nevertheless, this hypothesis implies a high heritability of phenotypic characteristics, which was not always observed in previous studies (Knapova *et al.*, 2002; Klarfeld *et al.*, 2009).

While adaptation to sexual overwintering might explain the temperature response patterns in Nordic isolates, adaptation to asexual survival could be the clue for temperature response patterns in West European and Mediterranean isolates. Climatic conditions can be relatively close in Western Europe and in the Mediterranean Basin when potato is grown: April to September in Western Europe; December to May (spring crop) or September to January (winter crop) in the Mediterranean Basin. The local adaptive patterns to temperature observed within the 13_A2 clonal lineage could thus be shaped by thermal differences between Western Europe and the Mediterranean Basin throughout the entire year, notably during the periods when the potato is not cultivated. In both areas, *P. infestans* is primarily transmitted asexually between cropping seasons of its host, mainly *via* volunteer or infected seed tubers (Andrison, 1995; Zwankhuizen *et al.*, 2000). During this asexual survival stage, the pathogen can undergo severe climatic conditions, with low temperatures during West European winters or high temperatures during Mediterranean summers. This would lead to local adaptation to temperature, if selection occurs during survival rather than during epidemics. To confirm this hypothesis, it could be interesting to compare the survival of isolates from these two areas at extreme climatic conditions such as temperatures below 5°C or above 25°C which can be frequent during West European winters and Mediterranean Basin summers, respectively.

If local adaptation to temperature results from selection for increased survival between epidemics, it should influence the diffusion and invasion patterns by *P. infestans* lineages. For example, the 13_A2 lineage, first detected in the Netherlands and Germany in 2004 (Cooke *et al.*, 2012), has rapidly replaced other clonal lineages to become dominant in Western Europe within a few years, and it is still currently one of the more prevalent clonal

lineages in this area (Euroblight.net). Its high apparent fitness may appear surprising in view of its low performances for lesion growth rate and sporangia production compared to 6_A1, as both traits are directly involved in aggressiveness (*i.e.*, the quantity of disease induced by a pathogenic strain on a susceptible host; Andrivon, 1993) and thus thought to contribute to the epidemiologic fitness of *P. infestans* (Day & Shattock, 1997). Several assumptions can be put forward to explain the high frequencies of 13_A2 isolates despite their low relative aggressiveness. First, although less aggressive than 6_A1, 13_A2 may be more aggressive than the other clonal lineages present in West European populations, as suggested by Cooke *et al.* (2012). This hypothesis was however contradicted by the phenotypic characterization of French isolates over an eight-year period bridging the 13_A2 invasion, which revealed a lower aggressiveness of 13_A2 compared to all other prevalent clonal lineages, such as 8_A1 or 2_A1 (Mariette *et al.*, *in press*). A second possibility is that the low aggressiveness of 13_A2 isolates allows them to be better transmitted from epidemic to epidemic, and thus have a crucial advantage against other isolates. This trade-off between intra-epidemic transmission (*i.e.*, aggressiveness) and inter-epidemic transmission has been recently demonstrated (Pasco *et al.*, *in press*). Finally, a trade-off between the number of sporangia produced and their size could also be involved. 13_A2 isolates indeed produced fewer sporangia, but bigger ones than other clones (especially 6_A1), resulting in a probably lower fitness deficit than would be expected based on spore production alone, especially at low temperatures.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support by INRA ACCAF Metaprogramme (CLIF project) and ARIMNET (PoH-MED project; KBBE 219262). The authors also warmly thank Dr E. Runno-Paurson (Tartu University, Estonia), Dr B. Nielsen (Aarhus University, Denmark) and Prof Z. Bouznad (ENSA Algiers, Algeria) for the gift of some of the isolates included in this study, Mrs Mathilde Bodiou (SYNTEC, Pleumeur-Gautier, France) and Dr Loukas Kanetis (Cyprus University of Technology, Limassol) for help with the sampling of French and Cyprus isolates. We are grateful to the INRA Genetic Ressources Center BrACySol of Ploudaniel for providing the plant material used in the tests. N. Mariette is supported by

PhD project cofunded by INRA and ACVNPT (Association des Créateurs de Variétés Nouvelles de Pomme de Terre) through a CIFRE grant (Conventions Industrielles de Formation par la Recherche).

References

- Andrade-Piedra JL, Hijmans RJ, Forbes GA, Fry WE, Nelson RJ (2005) Simulation of potato late blight in the Andes. I: Modification and parameterization of the LATEBLIGHT model. *Phytopathology*, **95**, 1191–1199.
- Andrison D (1993) Nomenclature for pathogenicity and virulence: The need for precision. *Phytopathology*, **83**, 889–890.
- Andrison D (1995) Biology, ecology and epidemiology of the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans* in soil. *Phytopathology*, **85**, 1053–1056.
- Andrison D, Montarry J, Corbiere R *et al.* (2013) The hard life of *Phytophthora infestans*: when trade-offs shape evolution in a biotrophic plant pathogen. *Plant Pathology*, **62**, (Suppl. 1), 28–35.
- Aylor DE (2003) Spread of plant disease on a continental scale: role of aerial dispersal of pathogens. *Ecology*, **84**, 1989–1997.
- Bates D, Maechler M, Bolker B. (2011) lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and R syntax. R package version 0.999375-39. Available at: <http://CRAN.R-project.org/package=lme4>.
- Bebber DP, Ramotowski MAT, Gurr SJ (2013) Crop pest and pathogens move polewards in a warming world. *Nature Climate Change*, **3**, 985–988.
- Bellard C, Bertelsmeier C, Leadley P, Thuiller W, Courchamp F (2012) Impacts of climate change on the future of biodiversity. *Ecology Letters*, **15**, 365–377.
- Bennett AF, Lenski RE (1999) Experimental evolution and its role in evolutionary physiology. *American Zoologist*, **39**, 346–362.
- Blanquart F, Kaltz O, Nuismer S, Gandon S (2013) A practical guide to measuring local adaptation. *Ecology Letters*, **16**, 1195–1205.

- Boenigk J, Jost S, Stoeck T, Garstecki T (2007) Differential thermal adaptation of clonal strains of a protist morphospecies originating from different climatic zones. *Environmental Microbiology*, **9**, 593–602.
- Chowdappa P, Kumar BJN, Madhura S, Kumar SPM, Myers KL, Fry WE, Cooke DEL (2015) Severe outbreaks of late blight on potato and tomato in South India caused by recent changes in the *Phytophthora infestans* population. *Plant Pathology*, **64**, 191–199.
- Chmielarz M, Sobkowiak S, Dębski K, Cooke DEL, Brurberg MB, Śliwka J (2014) Diversity of *Phytophthora infestans* from Poland. *Plant Pathology*, **63**, 203–211.
- Clément JAJ, Magalon H, Glais I, Jacquot E, Andrivon D (2012) To be or not to be solidary: *Phytophthora infestans*' dilemma for optimizing its reproductive fitness in intra- and intergenotype multiple infections. *PLoS One*, **7**, e37838.
- Cooke DEL, Cano LM, Raffaele S *et al.* (2012) Genome analyses of an aggressive and invasive lineage of the Irish potato famine pathogen. *PLoS Pathogens*, **8**(10), e1002940.
- Corbière R, Rekad FZ, Galfout A, Andrivon D, Bouznard Z (2010) Phenotypic and genotypic characteristics of Algerian isolates of *Phytophthora infestans*. Proc. 12th Euroblight Workshop, Arras, France. PPO Spec. Rep. No. 14, 133–146.
- Cossins AR, Bowler K (1987) Temperature biology of animals. Chapman & Hall, New York, USA.
- Danies G, Small IM, Myers K, Childers R, Fry WE (2013) Phenotypic characterization of recent clonal lineages of *Phytophthora infestans* in the United States. *Plant Disease*, **97**, 873–881.
- Day JP, Shattock RC (1997) Aggressiveness and other factors relating to displacement of populations of *Phytophthora infestans* in England and Wales. *European Journal of Plant Pathology*, **103**, 379–391.
- Delmas CEL, Mazet ID, Jolivet J, Delière L, Delmotte F (2014) Simultaneous quantification of sporangia and zoospores in a biotrophic oomycete with an automatic particle analyzer: disentangling dispersal and infection potentials. *Journal of Microbiological Methods*, **107**, 169–175.
- Delmotte F, Mestre P, Schneider C (2014) Rapid and multiregional adaptation to host partial resistance in a plant pathogenic oomycete: evidence from European populations of *Plasmopara*

- viticola*, the causal agent of grapevine downy mildew. *Infection, Genetics and Evolution*, **27**, 500–508.
- DeWitt TJ, Scheiner SM (2004) Phenotypic plasticity; functional and conceptual approaches. Oxford University Press, New York, USA.
- Drenth A, Janssen EM, Govers F (1995) Formation and survival of oospores of *Phytophthora infestans*. *Plant Pathology*, **44**, 86–94.
- Gisi U, Walder F, Resheat-Eini Z, Edel D, Sierotzki H (2011) Changes of genotype, sensitivity and aggressiveness in *Phytophthora infestans* isolates collected in European countries in 1997, 2006 and 2007. *Journal of Phytopathology*, **159**, 223–232.
- Glais I, Montarry J, Corbière R, Pasco C, Marquer B, Magalon H, Andrivon D (2014) Long-distance gene flow outweighs a century of local selection and prevents local adaptation in the Irish famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Evolutionary Applications*, **7**, 442–452.
- Goss EM, Tabima JF, Cooke DEL *et al.* (2014) The Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans* originated in central Mexico rather than the Andes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **111**, 8791–8796.
- Harbaoui K, Hamada W, Li Y, Vleeshouwers VGAA, van der Lee T (2014) Increased difficulties to control late blight in Tunisia are caused by a genetically diverse *Phytophthora infestans* population next to the clonal lineage NA-01. *Plant Disease*, **98**, 898–908.
- Hochachka PW, Somero GN (2002) Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution. Oxford University Press, New York, USA.
- Hoffmann AA, Sgrò CM (2011) Climate change and evolutionary adaptation. *Nature*, **470**, 479–485.
- IPCC (2007) Fourth Assessment Report – climate change 2007: The physical science basis. Summary for policy makers. In: Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (eds Solomon S, Qin D, Manning M, Chen Z, Marquis M, Averyt KB, Tignor M, Miller HL), pp. 1–22. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 104 pp.
- IPCC (2013) Fifth Assessment Report – climate change 2013: The physical science basis. Summary for policy makers. In: Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working

- Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (eds Stocker TF, Qin D, Plattner G-K, Tignor M, Allen SK, Boschung J, Nauels A, Xia Y, Bex V, Midgley PM), pp. 1–30. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1535 pp.
- Jinks JL, Grindle M (1963) Changes induced by training in *Phytophthora infestans*. *Heredity*, **18**, 245–264.
- Kamoun S, Furzer O, Jones JDG *et al.* (2015) The Top 10 oomycete pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, **16**, 413–434.
- Kawecki TJ, Ebert D (2004) Conceptual issues in local adaptation. *Ecology Letters*, **7**, 1225–1241.
- Klarfeld S, Rubin AE, Cohen Y (2009) Pathogenic fitness of oosporic progeny isolates of *Phytophthora infestans* on late-blight-resistant tomato lines. *Plant Disease*, **93**, 947–953.
- Knapova G, Gisi U (2002) Phenotypic and genotypic structure of *Phytophthora infestans* populations on potato and tomato in France and Switzerland. *Plant Pathology*, **51**, 641–653.
- Knapova G, Schlenzig A, Gisi U (2002) Crosses between isolates of *Phytophthora infestans* from potato and tomato and characterization of F-1 and F-2 progeny for phenotypic and molecular markers. *Plant Pathology*, **51**, 698–709.
- Lees AK, Wattier R, Shaw DS, Sullivan L, Williams NA, Cooke DEL (2006) Novel microsatellite markers for the analysis of *Phytophthora infestans* populations. *Plant Pathology*, **55**, 311–319.
- Li Y, Cooke DEL, Jacobsen E, van der Lee T (2013a) Efficient multiplex simple sequence repeat genotyping of the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans*. *Journal of Microbiological Methods*, **92**, 316–322.
- Li Y, van der Lee T, Zhu J *et al.* (2013b) Population structure of *Phytophthora infestans* in China – geographic clusters and presence of the EU genotype Blue-13. *Plant Pathology*, **62**, 932–942.
- Mariette N, Mabon R, Corbière R *et al.* (in press) Phenotypic and genotypic changes in French populations of *Phytophthora infestans*: are invasive clones the most aggressive? *Plant Pathology*, DOI: 10.1111/ppa.12441.

- Maziero JMN, Maffia LA, Mizubuti ESG (2009) Effects of temperature on events in the infection cycle of two clonal lineages of *Phytophthora infestans* causing late blight on tomato and potato in Brazil. *Plant Disease*, **93**, 459–466.
- Mboup M, Bahri B, Leconte M, De Vallavieille-Pope C, Kaltz O, Enjalbert J (2012) Genetic structure and local adaptation of European wheat yellow rust populations: the role of temperature-specific adaptation. *Evolutionary Applications*, **5**, 341–352.
- Miller JS, Johnson DA (2014) Aggressiveness of *Phytophthora infestans* genotypes on potato stems and leaves at three temperatures. *American Journal of Potato Research*, **91**, 538–553.
- Mitchell SE, Lampert W (2000) Temperature adaptation in a geographically widespread zooplankter, *Daphnia magna*. *Journal of Evolutionary Biology*, **13**, 371–382.
- Mizubuti EGS, Fry WE (1998) Temperature effects on developmental stages of isolates from three clonal lineages of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology*, **88**, 837–843.
- Montarry J, Glais I, Corbiere R, Andrivon D (2008) Adaptation to the most abundant host genotype in an agricultural plant-pathogen system - potato late blight. *Journal of Evolutionary Biology*, **21**, 1397–1407.
- Montarry J, Andrivon D, Glais I, Mialdea G, Corbière R, Delmotte F (2010) Microsatellite markers reveal two genetic groups in the French population of the invasive plant pathogen *Phytophthora infestans*. *Molecular Ecology*, **19**, 1965–1977.
- Parmesan C (2006) Ecological and evolutionary responses to recent climate change. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **37**, 637–669.
- Pasco C, Montarry J, Marquer B, Andrivon D (*in press*) And the nasty ones lose in the end: foliar pathogenicity trades off with asexual transmission in the Irish famine pathogen *Phytophthora infestans*. *New Phytologist*, DOI: 10.1111/nph.13581.
- R Core Team (2014) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rengefors K, Logares R, Laybourn-Parry J, Gast RJ (2015) Evidence of concurrent local adaptation and high phenotypic plasticity in a polar microeukaryote. *Environmental Microbiology*, **17**, 1510–1519.

- Shakya SK, Goss EM, Dufault NS, van Bruggen AHC (2015) Potential effects of diurnal temperature oscillations on potato late blight with special reference to climate change. *Phytopathology*, **105**(2), 230–238.
- Sharma K, Gossen BD, McDonald MR (2011) Effect of temperature on cortical infection by *Plasmodiophora brassicae* and clubroot severity. *Phytopathology*, **101**, 1424–1432.
- Sjöholm L, Andersson B, Högberg N, Widmark AK, Yuen J (2013) Genotypic diversity and migration patterns of *Phytophthora infestans* in the Nordic countries. *Fungal Biology*, **117**, 722–730.
- Stefansson TS, McDonald BA, Willi Y (2013) Local adaptation and evolutionary potential along a temperature gradient in the fungal pathogen *Rhynchosporium commune*. *Evolutionary Applications*, **6**, 524–534.
- Tooley PW, Browning M, Kyde KL, Berner D (2009) Effect of temperature and moisture period on infection of *Rhododendron* 'Cunningham's White' by *Phytophthora ramorum*. *Phytopathology*, **99**, 1045–1052.
- van Doorslaer W, Vanoverbeke J, Duvivier C *et al.* (2009) Local adaptation to higher temperatures reduces immigration success of genotypes from a warmer region in the water flea *Daphnia*. *Global Change Biology*, **15**, 3046–3055.
- Weisse T, Berendonk T, Kamjunke N, Moser M, Scheffel U, Stadler P, Weithoff G (2011) Significant habitat effects influence protist fitness: evidence for local adaptation from acidic mining lakes. *Ecosphere*, **2**, art134.
- Zhan J, McDonald BA (2011) Thermal adaptation in the fungal pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Molecular Ecology*, **20**, 1689–1701.
- Zwankhuizen MJ, Govers F, Zadoks JC (2000) Inoculum sources and genotypic diversity of *Phytophthora infestans* in Southern Flevoland, the Netherlands. *European Journal of Plant Pathology*, **106**, 667–680

Supporting information

Table S1. Areas of sampling of the *Phytophthora infestans* isolates with their geographic characteristics (region, country, locations and coordinates) and climatic characteristics (MAT, the mean annual temperature in °C; Min and Max, the minimum and maximum monthly mean temperatures; varMAT, the variance in mean annual temperature). This weather data was collected between 1982 and 2012 (<http://climate-data.org>).

Region	Country	Location	Latitude	Longitude	MAT	Min	Max	varMAT
Northern Europe	Denmark	Aarhus	56.15°N	10.22°E	7.8	-0.7	16.4	40.0
	Estonia	Tartu	58.38°N	26.72°E	5.0	-7.0	16.9	80.5
	Latvia	Valmiera	57.55°N	25.40°E	5.5	-6.2	16.9	75.6
	Lithuania	Kaunas	54.89°N	23.89°E	6.6	-5.1	17.3	71.4
Western Europe	France	Paimpol	48.78°N	3.05°W	11.5	5.8	17.5	20.2
Mediterranean Basin	Algeria	Djendel	36.22°N	2.41°E	18.0	9.7	27.8	45.1
	Cyprus	Xylofagou	34.98°N	33.85°E	19.1	13.6	24.7	36.9

Table S2. Characteristics of the isolates of *Phytophthora infestans* used in the experiments with the country and the region of origin, the mating type and the clonal lineage of belonging.

Isolat	Country	Region	Mating type	Clonal lineage ^a
FR.13.P10.11	France	Western Europe	A2	13_A2
FR.13.P11.06	France	Western Europe	A2	13_A2
FR.13.P11.17	France	Western Europe	A2	13_A2
FR.13.P12.10	France	Western Europe	A2	13_A2
FR.13.P12.25	France	Western Europe	A2	13_A2
FR.13.P12.26	France	Western Europe	A1	6_A1
FR.13.P14.13	France	Western Europe	A1	6_A1
FR.13.P15.03	France	Western Europe	A2	13_A2
FR.13.P17.14	France	Western Europe	A1	6_A1
FR.13.P17.15	France	Western Europe	A1	6_A1
FR.13.P17.17A	France	Western Europe	A2	13_A2
FR.13.P18.05	France	Western Europe	A1	6_A1
FR.13.P18.08	France	Western Europe	A1	6_A1
FR.13.P19.03	France	Western Europe	A1	6_A1
FR.13.P20.08	France	Western Europe	A1	6_A1
FR.13.P20.12	France	Western Europe	A1	6_A1
FR.13.P20.19	France	Western Europe	A2	13_A2
CY.13.01B	Cyprus	Mediterranean Basin	A2	13_A2
CY.13.04B	Cyprus	Mediterranean Basin	A2	13_A2
CY.13.09	Cyprus	Mediterranean Basin	A2	13_A2
CY.13.14	Cyprus	Mediterranean Basin	A2	13_A2
DZ.12.P01	Algeria	Mediterranean Basin	A2	NA
DZ.12.P02	Algeria	Mediterranean Basin	A2	NA
DZ.13.P01	Algeria	Mediterranean Basin	A1	2A1
DZ.13.P03	Algeria	Mediterranean Basin	A2	13_A2
DZ.13.P05	Algeria	Mediterranean Basin	A2	13_A2
DA.13.8.37	Denmark	Northern Europe	A2	NA
DA.13.8.41	Denmark	Northern Europe	A2	NA
DA.13.8.47	Denmark	Northern Europe	A2	NA
DA.13.8.50	Denmark	Northern Europe	A1	NA
LT.AK24.13	Lithuania	Northern Europe	A1	NA
LT.SA1.13	Lithuania	Northern Europe	A2	NA
LT.SI.1.13	Lithuania	Northern Europe	A1	NA
LT.ST2.13	Lithuania	Northern Europe	A1	NA
LV.BI7.13	Latvia	Northern Europe	A2	NA
LV.GO12.13	Latvia	Northern Europe	A2	NA
LV.JA7.13	Latvia	Northern Europe	A2	NA
LV.RA4.13	Latvia	Northern Europe	A1	NA
EST.RE3.13	Estonia	Northern Europe	A1	NA
EST.SA.AS7.13	Estonia	Northern Europe	A2	NA
EST.VE3.13	Estonia	Northern Europe	A1	NA
EST.JO(I).4.13	Estonia	Northern Europe	A1	NA

^a Clonal lineages were determined by comparing the isolates fingerprints with those described by Cooke *et al.* (2012). NA signifies a non-belonging to a referenced clonal lineage.

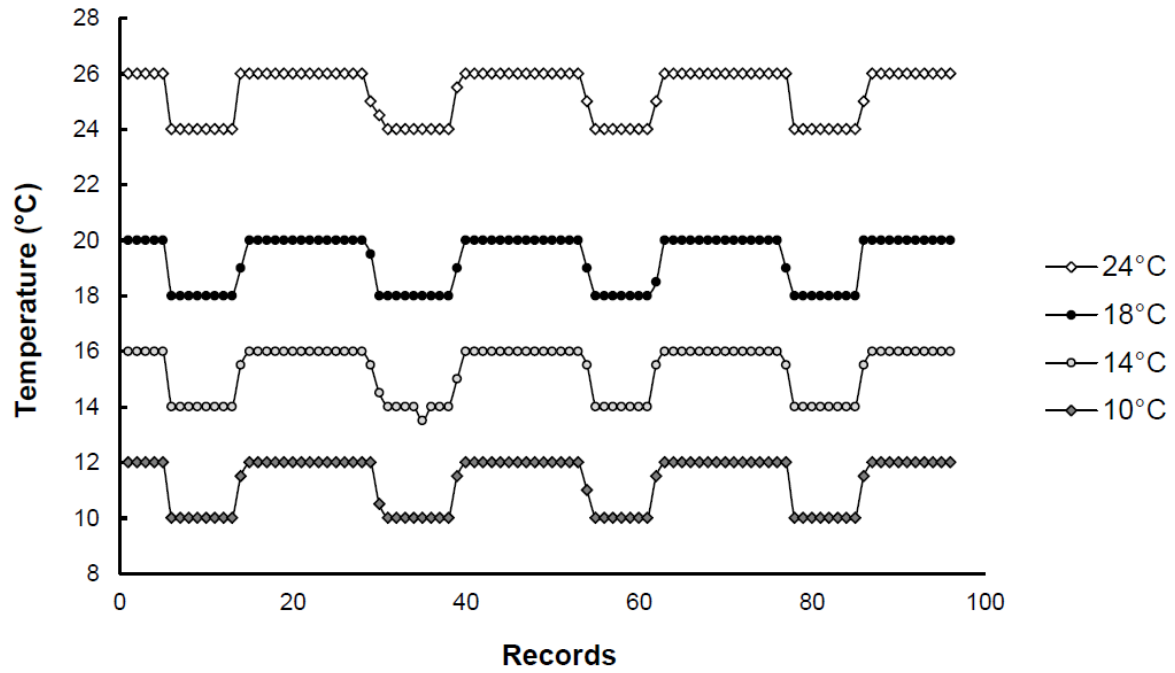


Fig. S1. Temperature survey within the four climatic chambers used for the common-garden experiments (10°C, 14°C, 18°C, 24°C). The records were made every hour during four consecutive days, from 03/10/14 to 03/13/14 (*i.e.* 96 records), using Thermo Tracer recorders (Oceasoftware, Montpellier, France). This tracking reveals an increase of the temperature by 2°C during the diurnal phase compared to the initial parameters of the chambers.

Discussion générale

Cette thèse visait à comprendre les dynamiques d'invasions clonales dans les populations de *P. infestans*, en les reliant aux caractéristiques adaptatives des groupes génétiques impliqués. Elle reposait sur deux hypothèses sous-jacentes fortes, à savoir que (i) la fitness des clones de *P. infestans* est directement déterminée par leur capacité d'adaptation au milieu, biotique ou abiotique, tant durant la phase épidémique que durant la phase de survie inter-épidémique, et que (ii) cette capacité adaptative est elle-même la résultante de compromis évolutifs s'exerçant de manière différentielle entre les deux grandes périodes du cycle biologique annuel du parasite. L'ensemble des résultats obtenus, s'ils confortent en partie ces hypothèses, révèlent toutefois une explication plus complexe que celle envisagée initialement, et amènent en parallèle à revisiter la manière d'évaluer la fitness de parasites biotrophes.

1. Agressivité et fitness

Le but des deux ensembles d'analyses conjointes de données de génotypage et de phénotypage pour le pouvoir pathogène au sein de populations de *P. infestans* était de tester l'hypothèse d'un plus grand pouvoir invasif chez les génotypes les plus agressifs. Les résultats du suivi à long terme de populations collectées durant près d'une décennie lors des pics épidémiques annuels, complété par un suivi longitudinal sur deux épidémies consécutives, en incluant la phase inter-épidémique, tendent à rejeter cette hypothèse au profit de scénarios plus complexes, mêlant sélection balancée en phases épidémiques et inter-épidémiques et compromis évolutifs entre pouvoir pathogène et capacité de transmission asexuée entre saisons épidémiques.

1.1. Comment évaluer correctement la fitness ?

1.1.1. Extrapoler la fitness à partir de mesures sur monocycle épidémique

L'ensemble des mesures d'agressivité réalisées ou exploitées dans ce travail provient de tests en conditions contrôlées, très favorables au parasite et couvrant un seul cycle

épidémique, c'est-à-dire de l'inoculation à la production des spores de la génération suivante. Ces données permettent de caractériser divers traits d'histoire de vie (période de latence = âge à la première reproduction ; nombres de spores = fécondité, etc.) et d'estimer une 'fitness' sur une courte période, proportionnelle au taux intrinsèque de multiplication R_0 (Montarry *et al.* 2010a).

Par ailleurs, le suivi de long terme (2001-2008) à partir d'échantillons collectés annuellement au moment des pics épidémiques donne une autre évaluation de la fitness relative des clones. La confrontation de ces données avec les résultats issus des tests d'agressivité en conditions contrôlées suggère toutefois l'intervention d'autres facteurs que la seule agressivité 'instantanée' dans la dynamique de long terme des invasions clonales. Il est également important de souligner que la date de prélèvement des échantillons au champ influence notablement l'évaluation de la fitness *via* les données de suivi. En effet, la fréquence relative des clones peut considérablement varier au cours de la saison, comme l'a montré le suivi réalisé durant deux années pleines en Bretagne (Chapitre 2) et comme cela avait été observé précédemment à partir de caractérisations d'échantillons prélevés tout au long de la saison épidémique (Lebreton *et al.* 1998).

Il n'existe donc pas une méthode unique et optimale pour déterminer avec exactitude la fitness réelle des isolats ou groupes génétiques chez un parasite tel que *P. infestans*. De ce fait, il semble que la conjugaison de méthodes d'évaluation (*i.e.* mesures instantanées de traits liés au pouvoir pathogène, modélisation à partir de ces données, suivis en populations naturelles) soit une voie à privilégier, chacune de ces méthodes représentant en effet un 'proxy' différent de la fitness au cours du temps.

1.1.2. A partir de quels traits d'histoire de vie ?

Si la sporulation, la croissance ou encore la période de latence sont considérées comme des traits d'histoire de vie essentiels dans la phase épidémique des champignons et oomycètes phytopathogènes, d'autres traits, comme par exemple la taille des spores, pourraient également s'avérer importants. En effet, ce trait de vie est généralement ignoré chez ces parasites, et notamment chez *P. infestans*, alors que les travaux menés au cours de cette

thèse (Chapitres 2, 3 et 4) suggèrent qu'il a probablement une importance notable dans le cycle de vie de cette espèce. Chez *P. infestans*, la taille des sporanges est en effet impliquée dans un trade-off avec la production de sporanges (Chapitre 3), qui a notamment contribué à l'émergence de différentes stratégies reproductives (*i.e.* r et K) au sein d'une même population (Chapitre 2). Nous avons également montré que la taille des spores pouvait être impactée par des facteurs biotiques et abiotiques comme l'hôte (Chapitre 3) ou la température (Chapitre 4).

Ces observations ouvrent de nouvelles perspectives de travail sur ce trait d'histoire de vie chez *P. infestans*. En premier lieu, s'il s'avère plus « coûteux » pour un individu de produire des sporanges de grande taille, on peut penser que la taille est un bon proxy de la qualité des descendants. On peut notamment supposer que des grands sporanges contiendraient plus de réserves nutritives que des petits, ce qui leur permettrait de pouvoir germer de façon plus efficace. En outre, des grandes spores pourraient former et libérer un plus grand nombre de zoospores, comme cela avait été observé chez un autre oomycète biotrophe, *Plasmopara viticola* (Delmas *et al.* 2014).

Cependant, il conviendrait de vérifier la relation entre taille et qualité infectieuse des sporanges chez *P. infestans*, ce qui n'est pas documenté chez cette espèce. Il serait par exemple intéressant de tester l'effet de la taille sur différents traits de fitness tels que le taux de germination et la capacité d'infection, mais également la survie face à des facteurs abiotiques (températures, rayons UV...). En effet, si la relation peut paraître intuitive, elle n'est cependant pas toujours vérifiée par l'expérience chez d'autres parasites fongiques. Ainsi, il n'existe pas de corrélation positive entre la taille des spores et leur taux de germination chez *Venturia inaequalis*, agent de la tavelure du pommier (De Gracia *et al.* 2015). Si chez *P. infestans*, les grands sporanges s'avéraient effectivement plus infectieux, cela permettrait notamment d'expliquer la variabilité dans les taux d'infection causés par différents isolats. Une récente expérience menée en conditions contrôlées (chambres de cultures) de Fall *et al.* (2015b) avait par exemple montré qu'à concentration de sporanges égale dans l'atmosphère, différentes lignées clonales (US-8, US-11, US-23 et US-24) ne causaient pas les mêmes quantités de lésions.

Par ailleurs, la taille des spores des champignons et oomycètes pourrait être liée à leur capacité de dispersion, des modèles de simulation prédisant une corrélation entre ces deux traits (*i.e.* des petites spores se dispersant potentiellement sur des distances plus grandes ; Norros *et al.* 2014). Il serait donc intéressant de savoir si un tel patron est retrouvé chez *P. infestans*, en ayant notamment recours à des modèles de simulation, étant donné que la dispersion est un critère important dans le cycle épidémique de ce parasite mais difficile à mesurer. Par ailleurs, outre leur taille, la forme des sporanges pourrait être un critère important pour la dispersion : une forme allongée pourrait permettre à un sporange de mieux se propager. De ce fait, le ratio longueur/largeur semble être un critère intéressant à prendre en compte (Roper *et al.* 2010; Philibert *et al.* 2011). Les données acquises dans cette thèse sur les sporanges de plus d'une centaine d'isolats collectés à différents moments d'une épidémie et appartenant aux lignées clonales 6_A1 et 13_A2 (chapitre 4), permettront de tester l'existence d'une variabilité pour ce critère.

Chez *P. infestans*, l'importance de la taille des sporanges comme trait d'histoire de vie est d'autant plus grande qu'elle est impliquée dans un trade-off avec le nombre de sporanges (Chapitre 3). Cette étude a permis de montrer que le trade-off entre le nombre et la taille des descendants, rapportées de nombreuses fois chez les espèces animales et végétales (*e.g.* Werner & Platt 1976 ; Charnov & Ernest 2006) était donc aussi possible chez des parasites fongiques. Ces compromis entre nombre et taille des descendants sont peu étudiés chez les champignons et assimilés (Kausarud *et al.* 2008) ; il est donc difficile de savoir si ce trade-off est commun chez ces organismes. Car s'il est observé chez *P. viticola* (Delmotte *et al.* 2014 ; Delmas *et al.* 2014) et suggéré (corrélation négative mais non significative) chez *Melampsora larici-populina* (Pernaci 2015), il n'a en revanche pas été trouvé chez *Venturia inaequalis* chez qui la corrélation entre ces deux traits était même positive (De Gracia *et al.* 2015). Les conséquences de ces compromis sur la fitness des populations étant évidentes, une exploration plus systématique de leur occurrence, de leur forme et de leur sensibilité aux variables environnementales (hôte, facteurs abiotiques) mériterait certainement d'être conduite chez ces parasites.

1.2. L'hypothèse du 'toujours plus agressif' : une explication trop simple

Le suivi sur près de dix années (2001-2008) des populations françaises de *P. infestans* (Chapitre 1) a révélé des modifications majeures des lignées clonales dominantes. En particulier, si 2_A1 était l'une des lignées clonales dominantes de 2001 à 2005, c'est ensuite 13_A2, observée à partir de 2004, qui est rapidement devenue majoritaire. Il s'est avéré que les lignées clonales invasives pendant cette période (*i.e.* 2_A1 puis 13_A2) n'avaient pas de hauts niveaux d'agressivité (estimée *via* la taille des lésions et la sporulation). Au contraire, elles étaient généralement moins agressives que leurs congénères. Ce chapitre de la thèse a ainsi montré que fitness et agressivité n'étaient pas forcément liées chez *P. infestans*, ce qui tend donc à contredire l'hypothèse d'un plus grand pouvoir invasif des isolats les plus agressifs.

L'existence d'un trade-off entre la transmission intra-épidémique (*i.e.* agressivité) et la transmission asexuée inter-épidémique était une piste suggérée pour expliquer que les clones agressifs ne soient pas les plus invasifs. En effet, les isolats agressifs, probablement favorisés pendant la phase épidémique (Andriveau *et al.* 2007), pourraient en revanche souffrir d'une faible transmission entre deux épidémies et avoir ainsi une faible fitness globale (Pasco *et al.* 2015). Des modèles de simulation prédisaient notamment qu'un tel trade-off pourrait conduire à la coexistence d'isolats avec des stratégies d'histoire de vie différentes au sein d'une même population, certains investissant dans la transmission intra-épidémique et présentant donc des hauts niveaux d'agressivité, tandis que d'autres seraient moins agressifs et investiraient dans la transmission inter-épidémique (Hamelin *et al.* 2011).

Le suivi d'une population de *P. infestans* réalisé pendant deux années successives, incluant deux épidémies et la phase inter-épidémique (Chapitre 2), ne semble pas corroborer toutes les conséquences attendues d'un trade-off entre agressivité et transmission inter-épidémique. Pourtant ce suivi a révélé la coexistence, dans des proportions assez proches, de deux lignées clonales majoritaires (6_A1 et 13_A2) qui présentaient des dynamiques épidémiques semblables à celles des deux morphes décrits par les modèles de simulation de Hamelin *et al.* (2011), c'est à dire l'un (6_A1) avec une bonne transmission inter-épidémique et présent dès le début des épidémies, et l'autre (13_A2) plus tardif. Cependant, les niveaux d'agressivité de ces deux clones, estimés par des traits de vie

classiquement utilisés (taille de lésion, sporulation, période de latence), ne répondaient pas aux prédictions de ce modèle, les 6_A1 étant plus agressifs que les 13_A2.

Si le maintien des 13_A2 à de grandes fréquences dans la population malgré, semble-t-il, une plus mauvaise transmission inter-épidémique et une plus faible agressivité que les 6_A1 était difficilement explicable, la taille des sporanges a permis d'en savoir davantage. La mesure de ce trait de vie a ainsi révélé que 6_A1 et 13_A2 avaient des stratégies de reproduction opposées, qu'on pouvait assimiler aux stratégies *r* et *K* (Pianka 1970 ; Lodge 1993). Tandis que les 6_A1 produisent beaucoup de sporanges de petite taille (stratégie *r*), les 13_A2 en produisent moins mais de plus grande taille (stratégie *K*). Ces deux stratégies pourraient d'ailleurs expliquer pourquoi ces deux clones, très différents génétiquement (Chapitre 3), peuvent coexister dans les mêmes niches écologiques, ce qui est en apparence contraire aux prédictions de la théorie de l'exclusion compétitive (Gause 1934).

La coexistence de différentes stratégies d'histoire de vie au sein d'une même population peut notamment être expliquée par l'existence de trade-offs (Héraudet *et al.* 2008). Dans le cas de *P. infestans*, la présence au sein d'une même population de deux clones avec des stratégies *r* et *K* est probablement permise par le trade-off entre la production et la taille des sporanges mis en évidence au cours de ce travail de thèse (Chapitre 3). Le fait que ce trade-off ne différait pas sur les trois cultivars de pomme de terre testés, alors que ceux-ci impactent sensiblement le niveau de reproduction des isolats, est un élément très important. En effet, il implique que les conséquences écologiques et évolutives de ce compromis se feront sentir dans tous les contextes génétiques liés à la plante, et non de manière différentielle selon le niveau –ou le type– de résistance des variétés hôtes. Ceci devrait considérablement simplifier leur prévision, et donc leurs possibilités d'exploitation pour une gestion plus durable de ces résistances (*cf. infra*).

2. La température, un autre facteur d'adaptation des populations

Dans la seconde partie de ma thèse (Chapitre 4), je me suis intéressé à un autre facteur pouvant impacter le pouvoir invasif au sein des populations de *P. infestans* : la température.

Avec l'humidité, la température est probablement l'un des paramètres les plus importants dans le développement des maladies fongiques. Il était donc possible que, malgré le caractère essentiellement biotrophe (et donc la forte inféodation à son hôte) de *P. infestans*, ce facteur abiotique soit une force importante de structuration des populations et de détermination de leur caractère invasif. J'ai en effet pu montrer des réponses différentes à la température entre les deux des clones les plus fréquemment trouvés en Europe de l'ouest (6_A1 et 13_A2) pour les traits d'histoire de vie liés à la phase épidémique du parasite. Ces différences étaient surtout prononcées aux faibles températures auxquelles les isolats 13_A2 présentaient à la fois une faible sporulation et une faible croissance. Cette possible maladaptation des 13_A2 aux plus faibles températures pourrait expliquer en partie sa répartition : plus faibles fréquences en 2013 qu'en 2014, absence en début d'épidémies, ou en Europe du Nord. En outre, j'ai pu mettre en évidence des patrons d'adaptation locale très nets, en particulier au sein de populations géographiquement éloignées d'un même clone (13_A2). Ce résultat très original mériterait donc une exploration similaire chez d'autres parasites de cultures répartis dans différentes zones climatiques.

Par ailleurs, ces expériences de réponse à la température entre des isolats collectés dans différentes zones géographiques a révélé un comportement assez singulier des isolats nordiques pour les traits liés au pouvoir pathogène. Comparés aux isolats des autres populations, et en particulier aux isolats français, les isolats nordiques avaient en effet une longue période de latence et un faible taux de croissance. Ce comportement singulier des isolats d'Europe du Nord est possiblement lié à des adaptations à la reproduction sexuée. Etant donné que dans ces populations, la survie inter-épidémique est principalement sous forme d'oospores, une longue période de latence et une faible croissance pourraient en effet favoriser la rencontre d'un partenaire. Cependant, ces traits sont peut être également imputables à une moins bonne fitness des descendants sexués (Klarfeld *et al.* 2009), ce qui signifierait dans ce cas que les épidémies seraient également initiées à partir d'isolats peu agressifs.

3. Perspectives et nouvelles questions de recherche

Plusieurs perspectives ont déjà été évoquées comme des suites directes de ce travail dans les paragraphes précédents, notamment en ce qui concerne l'exploitation du trait 'taille (et forme) des spores. D'autres, plus générales, méritent également d'être envisagées et seront donc évoquées brièvement ici. Plus que de simples extensions des expérimentations effectuées durant cette thèse, elles constituent surtout de nouveaux axes de recherche qui mériteraient d'être explorés.

3.1. Suivre les phases cryptiques des épidémies : une démarche expérimentale difficile

L'une des originalités de ce travail de thèse a été de réaliser, durant deux années successives, un suivi longitudinal d'une population de *P. infestans* tout au long du cycle de vie du parasite (Chapitre 2). En effet, on a souvent tendance à ne s'intéresser qu'à une partie du cycle de vie des agents phytopathogènes, la phase épidémique, c'est à dire lorsqu'ils infectent et endommagent leurs hôtes. Cependant ces parasites, et en particulier ceux infectant des plantes annuelles, doivent aussi survivre et se transmettre d'une saison à l'autre pour que les épidémies soient possibles. Cette phase de survie/transmission inter-épidémique des parasites est souvent ignorée et ce, pour deux raisons évidentes : d'une part, elle n'est pas directement impliquée dans les pertes économiques et, d'autre part, elle est difficile à explorer car les populations de parasites sont alors fortement réduites et les formes de transmission (ou les hôtes alternatifs) parfois difficiles à observer.

Nous avons été confrontés à ces problèmes d'échantillonnage lors du suivi de la phase inter-épidémique de *P. infestans*. En effet, étant donné que sous des climats tempérés avec des hivers doux comme en France, *P. infestans* est connu pour se transmettre principalement *via* les repousses des tubercules infectés et les tas de déchets, nous allions régulièrement échantillonner des parcelles où des pommes de terre étaient cultivées l'année précédente. Cependant, malgré nos efforts de recherche, moins de 10 isolats furent collectés de cette manière dans seulement quelques parcelles. Ainsi, à l'inverse de

l'échantillonnage réalisé pendant la phase épidémique (*i.e.* un grand nombre d'isolats collectés dans de nombreuses parcelles), le faible nombre d'isolats collectés durant la phase inter-épidémique du parasite laisse donc supposer un fort biais d'échantillonnage, et/ou une forte dérive génétique. Face aux difficultés pour suivre les populations de *P. infestans* durant la phase inter-épidémique du cycle de vie du parasite, nous proposons donc deux méthodes complémentaires à ces échantillonnages : (i) la quantification de l'inoculum présent dans l'air à l'aide de pièges à spores et (ii) le recours à des modèles de simulation.

La quantification de l'inoculum aérien des parasites fongiques, via le piégeage de spores, est une technique de plus en plus utilisée pour prédire les risques d'épidémies. Fall *et al.* (2015a) ont notamment mis en place des pièges à sporanges afin de détecter la présence de *P. infestans* dans deux zones de production de pommes de terre situées dans le Nouveau-Brunswick. Cette expérience s'est montrée concluante puisque les premiers pics enregistrés par les pièges précédaient d'environ une semaine les premiers cas de mildiou déclarés dans les parcelles de pomme de terre. Si dans l'étude de Fall *et al.* (2015a), les sporanges collectés dans les pièges étaient ensuite comptés sous microscope, les techniques de PCR quantitative (PCRq), permettant une détection très rapide, sont de plus en plus plébiscitées (Sanzani *et al.* 2013). D'ailleurs, dans une autre étude, Fall *et al.* (2015b) ont développé une PCRq permettant de quantifier les sporanges aériens de *P. infestans* avec une sensibilité de détection d'un seul sporange. Ces auteurs indiquent notamment qu'ils ont commencé le développement d'une PCRq permettant d'aller plus loin que la simple détection de *P. infestans*, et de savoir quelle lignée clonale est présente. Avec une telle technique et des pièges judicieusement placés, il semblerait alors possible de connaître à tout moment la composition de la population du parasite, sans avoir besoin d'échantillonner. Ceci étant, l'échantillonnage physique restera nécessaire si l'on veut pouvoir typer les traits biologiques des souches présentes. Le piégeage permettrait alors d'optimiser cet échantillonnage, en ne le réalisant qu'au moment où des pics d'émissions de spores sont détectables.

Pour suivre l'évolution des populations de *P. infestans* tout au long de l'année et notamment lors de la phase inter-épidémique, le recours à des modèles de simulation peut également représenter un outil complémentaire aux échantillonnages. Ces modèles peuvent

notamment se baser sur les principaux traits d'histoire de vie du parasite afin, par exemple, de prédire les conséquences évolutives de certains trade-offs (e.g. van den Berg *et al.* 2011 ; Hamelin *et al.* 2011). Nous reviendrons sur ce point un peu plus loin dans cette discussion.

3.2. Quelles inférences tirer des données génotypiques pour la prédiction des phénotypes ?

Les différents travaux menés au cours de cette thèse ont permis de montrer que deux des lignées clonales majeures des populations de *P. infestans* actuelles d'Europe de l'Ouest, 6_A1 et 13_A2, avaient des stratégies d'histoire de vie spécifiques (Chapitre 2) et présentaient des réponses à la température contrastées (Chapitre 4). Ces observations laissent donc penser qu'en connaissant le profil génétique d'un isolat, on pourrait prédire son phénotype.

Si chez *P. infestans*, le génotype était effectivement un bon prédicteur du phénotype, cela ouvrirait alors des perspectives intéressantes au niveau de la gestion des épidémies. En effet, alors que le phénotypage des isolats est souvent un processus long et fastidieux nécessitant également des étapes d'isolement et de maintien sur milieu de culture, le génotypage, quant à lui, est plutôt simple et rapide (notamment avec la possibilité d'extraire l'ADN à partir des cartes FTA ; Meier-Runge *et al.* 2014). Ainsi, si le fait de connaître le génotype d'un isolat nous informait de manière fiable sur son phénotype, cela permettrait un gain de temps précieux, permettant d'agir plus efficacement contre le parasite. Par exemple, savoir si des parcelles sont contaminées par une lignée clonale particulière permettrait d'évaluer le risque épidémique par rapport à la météo ou à l'emploi de fongicides spécifiques (e.g. risque plus élevé aux faibles températures avec des 6_A1 par rapport à des 13_A2 ; résistance à certaines matières actives dans une lignée clonale et pas d'autres), ce qui pourrait être utilisé dans des outils d'aide à la décision tels que Mileos®. De plus, on pourrait également supposer un lien entre le génotype et la virulence d'un isolat, ce qui permettrait notamment de prédire le risque de contournement de résistances variétales en fonction des génotypes présents dans les populations et donc d'adapter les cadences de traitement.

Un tel lien univoque entre génotype et phénotype reste cependant très hypothétique chez *P. infestans*. D'une part, il existe une variabilité phénotypique intra-clonale, comme cela est apparu dans les travaux réalisés dans cette thèse, que ce soit pour le pouvoir pathogène ou la réponse à la température. De même, Montarry *et al.* (2010a) et Chmielarz *et al.* (2014) avaient montré qu'il existait de la variabilité intra-génotypique pour la virulence. Par ailleurs, chez *P. infestans*, on a vu que des phénomènes d'adaptation pouvaient avoir lieu au sein d'une lignée clonale (ici pour la température, mais on peut penser que ça peut aussi concerner des facteurs biotiques comme l'adaptation locale à l'hôte). Ces phénomènes d'adaptation sont donc également à prendre en considération car des isolats d'une même lignée clonale n'auront pas forcément les mêmes réponses selon les conditions environnementales (biotiques et/ou abiotiques) dans lesquelles ils évoluent.

Pour conclure, un lien entre génotype et phénotype chez *P. infestans* avantagerait considérablement la lutte contre ce parasite mais, en l'état actuel des connaissances, il n'est pas évident de savoir si ce lien est avéré et la question mérite donc d'être approfondie. Elle fait d'ailleurs l'objet d'un projet actuellement déposé dans le cadre de l'ERA NET C-IPM.

3.3. Les patrons d'adaptation observés ici sont-ils connectés aux stratégies solitaires/solitaires lors d'infections multiples ?

L'expérience sur les patrons d'adaptation à la température (Chapitre 4) a mis en lumière le comportement singulier des isolats d'Europe du Nord pour des traits d'histoire de vie liés au à la phase épidémique (*i.e.* longue période de latence et faible croissance), suggérant une adaptation de ces isolats à la reproduction sexuée. A l'inverse, dans les populations où la transmission inter-épidémique *via* les oospores est marginale, les isolats possédant des traits favorisant la reproduction clonale (*i.e.* courte période de latence et grande croissance) devraient être sélectionnés. Il pourrait donc y avoir une sélection de deux stratégies de reproduction différentes dans ces deux types de population : une 'stratégie lente' dans les populations sexuées et une 'stratégie rapide' dans les populations clonales. Ces deux stratégies pourraient correspondre, respectivement, aux stratégies 'solitaire' et 'solitaire' mises en évidence au sein de populations de *P. infestans* par Clément

et al. (2012). En effet, ces auteurs avaient montré qu'il existait des isolats dont la reproduction asexuée était favorisée en co-infection (isolats 'solidaires') et d'autres meilleurs en simple infection (isolats 'solitaires'). Cependant, ce lien reste à établir formellement, puisque l'appartenance des isolats étudiés ici à l'un ou l'autre type (solitaire ou solidaire) n'a pas été déterminée.

Par ailleurs, si l'hypothèse d'une sélection des traits favorisant la reproduction sexuée en Europe du nord et la reproduction clonale en Europe de l'Ouest est fondée, on peut aussi s'attendre à ce que les isolats nordiques soient plus efficaces que les isolats ouest européens dans la production de descendants sexués. Une expérience de croisements réciproques entre isolats sympatriques et allopatriques sexuellement compatibles pourrait être tentée pour valider cette hypothèse.

4. Quelles conséquences pour la gestion des variétés résistantes ?

Nos résultats ont montré que les facteurs d'adaptation des populations ne se restreignent pas à l'hôte et aux pressions de sélection qu'ils exercent, mais que tous ces facteurs jouent sur les mêmes traits biologiques (taille et nombre des spores, période de latence, croissance des lésions). De ce fait, il devient maintenant important de réfléchir aux conséquences de ces pressions de sélection concomitantes dans un contexte général associant changement climatique (et donc variation forte des régimes de température) et déploiement de plus en plus important de constructions génétiques possédant des niveaux accrus de résistance, en particulier de résistance partielle. Dès lors, existe-t-il un risque plus grand d'adaptation multiple, ou au contraire des possibilités de sélections divergentes entre les deux forces ?

La réponse à cette question n'est pas aisée, et n'est sans doute pas univoque. En effet, il apparaît clairement qu'il existe des patrons d'adaptations locales à la température entre populations géographiquement distantes, mais également des possibilités de migration à moyenne/longue distance qui tendent à homogénéiser les populations pour le pouvoir pathogène (Glais *et al.* 2014). Par ailleurs, les ressources génétiques utilisées en sélection restent encore peu nombreuses par rapport à la richesse du pool génétique des

Solanum tubérifères, et cette même base génétique tend donc à être déployée à de larges échelles spatiales. Dans ces conditions, prédire la résultante d'une sélection conjointe par les hôtes résistants et par les variations climatiques est actuellement fort complexe. La solution pourrait venir à terme de modèles de simulations plus complets, intégrant l'effet des différentes forces sélectives sur chacun des traits de vie du parasite (y compris les interactions entre ces traits résultant des compromis évolutifs), car ces traits sont eux-mêmes les maillons clés des modèles de prévision du développement épidémique (modèles à compartiments type Mileos[®] ou modèles plus simples type SEIR). Des démarches de modélisation en ce sens sont ébauchées dans notre équipe, mais leur finalisation requerra encore d'assez nombreuses études pour caractériser mathématiquement les formes de trade-offs et les normes de réponse des traits aux pressions sélectives, puis intégrer ces relations au sein de modèles adaptés à la simulation, et enfin tester par simulation différents types de scénarios possibles concernant à la fois l'évolution climatique et les intensités, les échelles et les modes de déploiement des variétés. Du travail pour quelques années... et quelques autres doctorants!

Références bibliographiques

N.B. Ne sont mentionnées ici que les références bibliographiques citées dans l'introduction et la discussion générale. Ainsi, il est possible que certaines références citées dans les chapitres 1 à 4 n'apparaissent pas (mais sont référencées dans la partie « Références bibliographiques » de chaque chapitre).

Agrios GN (2005) *Plant Pathology* (5^{ème} édition). Elsevier-Academic Press, San Diego.

Aktar MW, Sengupta D, Chowdhury A (2009) Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology* **2** : 1-12.

Alizon S, Hurford A, Mideo N, Van Baalen M (2009) Virulence evolution and the trade-off hypothesis: history, current state of affairs and the future. *Journal of Evolutionary Biology* **22** : 245-259.

Alyokhin A, Baker M, Mota-Sanchez D, Dively G, Grafius E (2008) Colorado potato beetle resistance to insecticide. *American Journal of Potato Research* **85** : 395-413.

Anderson PK, Cunningham AA, Patel NG, Morales FJ, Epstein PR, Daszak P (2004) Emerging infectious diseases of plants : pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends in Ecology and Evolution* **19** : 535-544.

Anderson RM, May RM (1982) Coevolution of hosts and parasites. *Parasitology* **85** : 411-426.

Andersson B, Sandström M, Strömberg A (1998) Indications of soil borne inoculum of *Phytophthora infestans*. *Potato Research* **41** : 305-310

Andrion D (1993) Nomenclature for pathogenicity and virulence: the need for precision. *Phytopathology* **83** : 889-890.

Andrion D (1995) Biology, ecology and epidemiology of the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans* in soil. *Phytopathology* **85** : 1053-1056.

Andrion D (1996) The origin of *Phytophthora infestans* populations present in Europe in the 1840s: a critical review of historical and scientific evidence. *Plant Pathology* **45** : 1028-1036.

Andrion D (2009) Plantes, parasites et pathologistes : de la compréhension des interactions à la gestion durable des résistances. *Cahiers Agricultures* **18** : 486-492.

- Andriveau D, Pilet F, Montarry J, Hafidi M, Corbière R, Achbani EH, Pellé R, Ellissèche D (2007) Adaptation of *Phytophthora infestans* to partial resistance in potato: evidence from French and Moroccan populations. *Phytopathology* **97** : 338-343.
- Andriveau D, Montarry J, Corbière R, Pasco C, Glais I, Marquer B, Clément JAJ, Castel M, Hamelin FM (2013) The hard life of *Phytophthora infestans* : when trade-offs shape evolution in a biotrophic plant pathogen. *Plant Pathology* **62** : 28-35.
- Angilletta MJ (2009) Thermal adaptation: a theoretical and empirical synthesis. Oxford University Press, Oxford.
- Ashton KG (2002) Patterns of within-species body size variation of birds: strong evidence for Bergmann's rule. *Global Ecology and Biogeography* **11** : 505-524.
- Ashton KG, Tracy MC, Queiroz A (2000) Is Bergmann's rule valid for mammals? *American Naturalist* **156** : 390-415.
- Atkinson D (1994) Temperature and organism size: a biological law for ectotherms? *Advances in Ecological Research* **25** : 1-58.
- Ayers WA, Adams PB (1979) Factors affecting germination, mycoparasitism and survival of *Sporidesmium sclerotivorum*. *Canadian Journal of Microbiology* **25** : 1021-1026.
- Aylor DE (2003) Spread of plant disease on a continental scale: role of aerial dispersal of pathogens. *Ecology* **84** : 1989-1997.
- Bahri B, Kaltz O, Leconte M, de Vallavieille-Pope C, Enjalbert J (2009) Tracking costs of virulence in natural populations of the wheat pathogen, *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *BMC Evolutionary Biology* **9** : 26.
- Barhoom S, Sharon A (2007) Bcl-2 proteins link programmed cell death with growth and morphogenetic adaptations in the fungal plant pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. *Fungal Genetics and Biology* **44** : 32-43.
- Bayles RA, Flath K, Hovmøller MS, de Vallavieille-Pope C (2000) Breakdown of the Yr 17 resistance to yellow rust of wheat in northern Europe. *Agronomie* **20** : 805-811.

- Bebber DP, Ramotowski MAT, Gurr SJ (2013) Crop pest and pathogens move polewards in a warming world. *Nature Climate Change* **3** : 985-988.
- Begon M, Townsend CR, Harper JL (2006) Life, Death and Life Histories. In: Ecology, from individuals to ecosystems (4th edition), Begon M, Townsend CR, Harper JL, eds., pp. 89-132. Blackwell Publishing, Oxford.
- Bernard F, Sache I, Suffert F, Chelle M (2013) The development of a foliar fungal pathogen does react to leaf temperature! *New Phytologist* **198** : 232-240.
- Bjor T, Mulelid K (1991) Differential resistance to tuber late blight in potato cultivars without R-genes. *Potato Research* **34** : 3-8.
- Blanquart F, Kaltz O, Nuismer S, Gandon S (2013) A practical guide to measuring local adaptation. *Ecology Letters* **16** : 1195-1205
- Brown JKM (2015) Durable resistance of crops to disease: a darwinian perspective. *Annual Review of Phytopathology* **53** : 513-539.
- Brun H, Chèvre AM, Fitt BD, Powers S, Besnard AL, Ermel M, Huteau V, Marquer B, Eber F, Renard M, Andrivon D (2010) Quantitative resistance increases the durability of qualitative resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *The New Phytologist* **185** : 285-299.
- Brurberg MB, Elameen A, Le VH, Naerstad R, Hermansen A, Lehtinen A, Hannukkala A, Nielsen B, Hansen J, Andersson B, Yuen J (2011) Genetic analysis of *Phytophthora infestans* populations in the Nordic countries reveals high genetic variability. *Fungal Biology* **115** : 335-342.
- Carlile JC (1986) The zoospore and its problems. In: Water, Fungi and Plants (Ayres PG, Boddy L, eds.), pp 105-118. Cambridge University Press, Cambridge.
- Carson ML (1998) Aggressiveness and perennation of isolates of *Cochliobolus heterostrophus* from North Carolina. *Plant Disease* **82** : 1043-1047.
- Campbell GS, Norman JM (1998) An introduction to environmental biophysics (2^{ème} édition). Springer-Verlag New York.
- Castel MK, Mailleret L, Andrivon D, Ravigné V, Hamelin FM (2014) Allee effects and the evolution of polymorphism in cyclical parthenogens. *American Naturalist* **18** : E75-E88.

- Charnov EL, Ernest SKM (2006) The offspring-size /clutch-size trade-off in mammals. *The American Naturalist* **167** : 578-582.
- Chmielarz M, Sobkowiak S, Dębski K, Cooke DEL, Brurberg MB, Śliwka J (2014) Diversity of *Phytophthora infestans* from Poland. *Plant Pathology* **63** : 203-211.
- Chown SL, Terblanche JS (2007) Physiological diversity in insects: ecological and evolutionary contexts. In: *Advances in insect physiology* (Vol. 33), Simpson SJ, ed., pp. 50-152. Academic Press, Londres.
- Clément JAJ (2011) Stratégies de reproduction de l'oomycète hétérothallique *Phytophthora infestans* en réponse aux infections multiples et à la résistance partielle de son hôte *Solanum tuberosum*. Thèse de doctorat. Rennes: Agrocampus Ouest.
- Clément JAJ, Magalon H, Pellé R, Marquer B, Andrivon D (2010) Alteration of pathogenicity-linked life-history traits by resistance of its host *Solanum tuberosum* impacts sexual reproduction of the plant pathogenic oomycete *Phytophthora infestans*. *Journal of Evolutionary Biology* **23** : 2668-2676.
- Clément JAJ, Magalon H, Glais I, Jacquot E, Andrivon D (2012) To be or not to be solidary: *Phytophthora infestans*' dilemma for optimizing its reproductive fitness in intra- and intergenotype multiple infections. *PLoS One*, **7** : e37838.
- Clusella-Trullas S, Blackburn TM, Chown SL (2011) Climatic predictors of temperature performance curve parameters imply complex responses to climate change. *American Naturalist* **177** : 738-751.
- Coffey M, Gees R (1991) The cytology of development. In: *Advances in plant pathology*, Ingram DS, Williams PH, eds., pp. 31-47. Academic Press, Londres.
- Cooke DEL, Cano LM, Raffaele S, Bain RA, Cooke LR, Etherington GJ, Deahl KL, Farrer RA, Gilroy EM, Goss EM, Grünwald NK, Hein I, MacLean D, McNicol JW, Randall E, Oliva RF, Pel MA, Shaw DS, Squires JN, Taylor MC, Vleeshouwers VGAA, Birch PRJ, Lees AK, Kamoun S (2012). Genome analyses of an aggressive and invasive lineage of the Irish potato famine. *PLoS Pathogens* **8** : e1002940.

- Cooke, L R, Schepers HTAM, Hermansen A, Bain RA, Bradshaw NJ, Ritchie F, Shaw DS, Evenhuis A, Kessel GJT, Wander JGN, Andersson B, Hansen JG, Hannukkala A, Naerstad R, Nielsen BJ (2011) Epidemiology and integrated control of potato late blight in Europe. *Potato Research* **54** : 183-222.
- Corbière R, Andrivon D (2003) Preparation of a simple pea medium for culturing *Phytophthora infestans*. <http://www.eucablight.org/EucaBlight.asp>
- Crowl TA, Crist TO, Parmenter RR, Belovsky G, Lugo AE (2008) The spread of invasive species and infectious disease as drivers of ecosystem change. *Frontiers in Ecology and the Environment* **6** : 238-246.
- Danies G, Small IM, Myers K, Childers R, Fry WE (2013) Phenotypic characterization of recent clonal lineages of *Phytophthora infestans* in the United States. *Plant Disease* **97** : 873-881.
- Day T, Otto SP (2001) Fitness. In: Encyclopedia of life sciences, Nature Publishing Group, pp. 1-6. www.els.net.
- Day JP, Shattock RC (1997) Aggressiveness and other factors relating to displacement of populations of *Phytophthora infestans* in England and Wales. *European Journal of Plant Pathology* **103** : 379-391.
- Delmas CEL, Mazet ID, Jolivet J, Delière L, Delmotte F (2014) Simultaneous quantification of sporangia and zoospores in a biotrophic oomycete with an automatic particle analyzer: disentangling dispersal and infection potentials. *Journal of Microbiological Methods* **107** : 169-175.
- Delmotte F, Mestre P, Schneider C, Kassemeyer HH, Kozma P, Richart-Cervera S, Rouxel M, Delière L (2014) Rapid and multiregional adaptation to host partial resistance in a plant pathogenic oomycete: evidence from European populations of *Plasmopara viticola*, the causal agent of grapevine downy mildew. *Infection, Genetics and Evolution* **27** : 500-508.
- De Waard MA, Georgopoulos SG, Hollomon DW, Ishii H, Leroux P, Ragsdale NM, Schwinn FJ (1993) Chemical control of plant diseases: problems and prospects. *Annual Review of Phytopathology* **31** : 403-421.
- DeWitt TJ, Scheiner SM (2004) Phenotypic plasticity; functional and conceptual approaches. Oxford University Press, New York.

- Drenth A, Janssen EM, Govers F (1995) Formation and survival of oospores of *Phytophthora infestans* under natural conditions. *Plant Pathology* **44** : 86-94.
- Durel CE, Laurens F, Caffer V, Le Cam B, Sapoukhina N (2007) Les apports de l'innovation variétale : recherches menées pour améliorer la résistance du pommier à la tavelure. *Innovations Agronomiques* **1** : 47-61.
- Duvauchelle S (1991) Lutte contre le mildiou de la pomme de terre en France : modèles de prévision pour les avertissements agricoles et stratégie d'utilisation des spécialités contenant des matières actives systémiques face à la résistance. *Bulletin OEPP* **21** : 49-55.
- Duvauchelle S, Andrivon D (1996) Le mildiou et son agent *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. In: La Pomme de terre, Rousselle P, Robert Y, Crosnier JC eds., pp. 281-291. INRA Editions, Paris.
- Ebert D, Bull JJ (2003) Challenging the trade-off model for the evolution of virulence: is virulence management feasible? *Trends in Microbiology* **11**: 15–20.
- Ebert D, Weisser WW (1997). Optimal killing for obligate killers: the evolution of life histories and virulence of semelparous parasites. *Proceedings of the Royal Society B* **264** : 985-991.
- Edeline E, Lacroix G, Delire C, Poulet N, Legendre S (2013) Ecological emergence of thermal clines in body size. *Global Change Biology* **19** : 3062-3068.
- Elbaz A, Levecque C, Clavel J, Vidal JS, Richard F, Amouyel P, Alperovitch A, Chartier-Harlin MC, Tzourio C (2004) CYP2D6 polymorphism, pesticide exposure, and Parkinson's disease. *Annals of Neurology* **55** : 430-434.
- Emge RG, Kingsolver CH, Johnson DR (1975) Growth of the sporulating zone of *Puccinia striiformis* and its relationship to stripe rust epiphytology. *Phytopathology* **65** : 679-681.
- Erwin DC, Ribeiro OK (1996) *Phytophthora* Diseases Worldwide. APS Press, St. Paul.
- Fabre F, Rousseau E, Mailleret L, Moury B (2012) Durable strategies to deploy plant resistance in agricultural landscapes. *The New Phytologist* **193** : 1064-1075.
- Fall ML, Van der Heyden H, Brodeur L, Leclerc Y, Moreau G, Carisse O (2015a) Spatiotemporal variation in airborne sporangia of *Phytophthora infestans*: characterization and initiatives towards improving potato late blight risk estimation. *Plant Pathology* **64** : 178-190.

- Fall ML, Tremblay D M, Gobeil-Richard M, Couillard J, Rocheleau H, Van der Heyden H, Lévesque CA, Beaulieu C, Carisse O (2015b) Infection efficiency of four *Phytophthora infestans* clonal lineages and DNA-based quantification of sporangia. *Plos One* **10** : e0136312.
- Fisher MC, Henk DA, Briggs CJ, Brownstein JS, Madoff LC, McCraw SL, Gurr SJ (2012) Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* **484** : 186-194.
- Flor HH (1971) Current status of gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology* **9** : 275-296.
- Frank SA (1996) Models of parasite virulence. *Quarterly Review of Biology* **71** : 37-78.
- Fry W (2008) *Phytophthora infestans*: the plant (and R gene) destroyer. *Molecular Plant Pathology* **9** : 385-402.
- Gaucher D, Duvauchelle S, Andrivon D (1998) Mildiou de la pomme de terre – le champignon évolue, la lutte aussi ! *Perspectives Agricoles* **236** : 1-20.
- Gause GF (1934) The struggle for existence. Williams & Wilkins Publishers, Baltimore.
- Gérard PR, Husson C, Pinon J, Frey P (2006) Comparison of genetic and virulence diversity of *Melampsora larici-populina* populations on wild and cultivated poplar and influence of the alternate host. *Phytopathology* **96** : 1027-1036.
- Gisi U, Cohen Y (1996) Resistance to phenylamide fungicides: a case study with *Phytophthora infestans* involving mating type and race structure. *Annual Review of Phytopathology* **34** : 549-572.
- Goss EM, Tabima JF, Cooke DEL, Restrepo S, Fry WE, Forbes GA, Fieland VJ, Cardenas M, Grünwald NJ (2014) The Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans* originated in central Mexico rather than the Andes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111** : 8791-8796.
- Gottlieb D (1950) The physiology of spore germination in fungi. *The Botanical Review* **16** : 229-257.
- Hahn M (2000). The rust fungi. In: Fungal Pathology, Kronstad JW, ed., pp. 267-306. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

- Hall SR, Becker CR, Duffy MA, Caceres CE (2010). Variation in resource acquisition and use among host clones creates key epidemiological trade-offs. *The American Naturalist* **167** : 557-565.
- Hamelin FM, Castel M, Poggi S, Andrivon D, Mailleret L (2011) Temporal heterogeneity in host availability can cause evolutionary branching of plant parasites. *Ecology* **92** : 2159-2166.
- Hardham AR, Hyde GJ (1997) Asexual sporulation in the Oomycetes. *Advances in Botanical Research* **24** : 353-398
- Hardham AR (2007) Cell biology of plant-oomycete interactions. *Cellular Microbiology* **9** : 31-39.
- Harlapur SI, Kulkarni MS, Wali MC, Patil BC, Kulkarni S, Hegde Y (2007) *Saccharum arundinaceum* – A new report of alternative host of turcicum leaf blight of maize. *The Journal of Agricultural Science* **20** : 867-868
- Harrisson JG (1992) Effects of the aerial environment on late blight of potato foliage—a review. *Plant Pathology* **41**: 384-416.
- Hartung J, Burton C, Ramsdell D (1981) Epidemiological studies of blueberry anthracnose disease caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Phytopathology* **71** : 449-53.
- Haverkort AJ, Boonekamp PM, Hutten R, Jacobsen E, Lotz LAP, Kessel GJT, Visser RGF, Van Der Vossen EAG (2008) Societal costs of late blight in potato and prospects of durable resistance through cisgenic modification. *Potato Research* **51** : 47-57.
- Héraudet V, Salvaudon L, Shykoff JA (2008) Trade-off between latent period and transmission success of a plant pathogen revealed by phenotypic correlations. *Evolutionary Ecology Research* **10** : 913-924.
- Hickling R, Roy DB, Hill JK, Fox R, Thomas CD (2006) The distributions of a wide range of taxonomic groups are expanding polewards. *Global Change Biology* **12** : 450-455.
- Ho HH, Hickman CJ (1967) Asexual reproduction and behavior of zoospores of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Canadian Journal of Botany* **45** : 1963-1981.
- Hochachka PW, Somero GN (2002) Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution. Oxford University Press, New York.

- Hoffmann AA, Sgrò CM (2011) Climate change and evolutionary adaptation. *Nature* **470** : 479-485.
- Hollomon D.W. (2015) Fungicide Resistance: Facing the Challenge. *Plant Protection Science* **51** : 170-176.
- Hovmøller M, Justesen A, Yahyaoui A, Milus E (2008) Rapid global spread of two aggressive strains of a wheat rust fungus. *Molecular Ecology* **17** : 3818-3826.
- Hubballi M, Nakkeeran S, Raguchander T, Anand T, Samiyappan R (2010) Effect of Environmental Conditions on Growth of *Alternaria alternata* causing leaf blight of noni. *World Journal of Agricultural Sciences* **6** : 171-177.
- IPCC (2013) Fifth Assessment Report – climate change 2013: The physical science basis. Summary for policy makers. In: Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, Stocker TF, Qin D, Plattner G-K, Tignor M, Allen SK, Boschung J, Nauels A, Xia Y, Bex V, Midgley PM, eds., pp. 1-30. Cambridge University Press, Cambridge.
- Islam MT, Tahara S (2001) Chemotaxis of fungal zoospores, with special reference to *Aphanomyces cohiolides*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **65** : 1933-1948.
- James FC (1970) Geographic size variation in birds and its relationship to climate. *Ecology* **51** : 365-390.
- Jones JP (1991) Early Blight. In: Compendium of Tomato Diseases, Jones JB, Jones JP, Stall RE, Zitter TA, eds., pp. 13-14. APS Press, St. Paul.
- Jensen JL (1887) Moyens de combattre et de détruire le *Peronospora* de la pomme de terre. *Mémoires de la Société Nationale d'Agriculture Française* **131** : 31-156.
- Johnson R (1984) A critical analysis of durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* **22** : 309-330.
- Jolivet E (1969) Physiologie de la tubérisation. *Annales de Physiologie Végétale*. **11** : 265-301.
- Judelson HS, Blanco FA (2005) The spores of *Phytophthora*: weapons of the plant destroyer. *Nature Reviews Microbiology* **3** : 47-58.

- Kamoun S, Furzer O, Jones JDG, Judelson HS, Ali GS, Dalio RJD, Roy SG, Schena L, Zambounis A, Panabieres F, Cahill D, Ruocco M, Figueiredo A, Chen XR, Hulvey J, Stam R, Lamour K, Gijzen M, Tyler BM, Grunwald NJ, Mukhtar MS, Tome DFA, Tor M, Van den Ackerveken G, McDowell J, Daayf F, Fry WE, Lindqvist-Kreuze H, Meijer HJG, Petre B, Ristaino J, Yoshida K, Birch PRJ, Govers F (2015) The top 10 oomycete pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* **16** : 413-434.
- Karaoglanidis GS, Thanassouloupoulos CC, Ioannidis PM (2001) Fitness of *Cercospora beticola* field isolates resistant and sensitive to demethylation inhibitor fungicides. *European Journal of Plant Pathology* **107** : 337-347.
- Kardin MK, Groth JV (1989) Density-dependent fitness interactions in the bean rust fungus. *Phytopathology* **79** : 409-412.
- Kawecki TJ, Ebert D (2004) Conceptual issues in local adaptation. *Ecology Letters* **7** : 1225-1241.
- Kinealy C (1994) This Great calamity: The Irish Famine 1845-52. Gill & Macmillan, Dublin.
- Kirk WW (2003) Tolerance of mycelium of different genotypes of *Phytophthora infestans* to freezing temperatures for extended periods. *Phytopathology* **93** : 1400-1406.
- Klarfeld S, Rubin AE, Cohen Y (2009) Pathogenic fitness of oosporic progeny isolates of *Phytophthora infestans* on late-blight-resistant tomato lines. *Plant Disease* **93** : 947-953.
- Knapova G, Gisi U (2002) Phenotypic and genotypic structure of *Phytophthora infestans* populations on potato and tomato in France and Switzerland. *Plant Pathology* **51** : 641-653.
- Koskella B, Giraud T, Hood ME (2006) Pathogen relatedness affects the prevalence of within-host competition. *The American Naturalist* **168** : 121-26.
- Kuparinen A, Markkanen T, Riikonen H, Vesala T (2007) Modeling air-mediated dispersal of spores, pollen and seeds in forested areas. *Ecological Modelling* **208** : 177-188.
- Lack D (1947) The significance of clutch size. *Ibis* **89** : 302-352.
- Lannou C (2012) Variation and selection of quantitative traits in plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **50** : 319-338.

- Larios E, Burquez A, Becerra JX, Venable DL (2014) Natural selection on seed size through the life cycle of a desert annual plant. *Ecology* **95** : 3213-3220.
- Lavergne S, Mouquet N, Ronce O, Thuiller W (2010) Biodiversity and climate change: integrating evolutionary and ecological responses of species and communities. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **41** : 1.
- Law R (1979) Optimal life histories under age-specific predation. *The American Naturalist* **114** : 399-417.
- Lebreton L, Laurent C, Andrivon D (1998) Evolution of *Phytophthora infestans* populations in the two most important potato production areas in France during 1992-1996. *Plant Pathology* **47** : 427-439.
- Lebreton L, Lucas JM, Andrivon D (1999) Aggressiveness and competitive fitness of *Phytophthora infestans* isolates collected from potato and tomato in France. *Phytopathology* **89** : 679-685.
- Lees AK, Wattier R, Shaw DS, Sullivan L, Williams NA, Cooke DEL (2006) Novel microsatellite markers for the analysis of *Phytophthora infestans* populations. *Plant Pathology* **55** : 311-319.
- Lees AK, Sullivan L, Lynott JS, Cullen DW (2012) Development of a quantitative real-time PCR assay for *Phytophthora infestans* and its applicability to leaf, tuber and soil samples. *Plant Pathology* **61**: 867-876.
- Lehtinen A, Andersson B, Le VH, Naerstad R, Rastas M, Ketoja E, Hannukkala AO, Hermansen A, Nielsen BJ, Yuen J (2009) Aggressiveness of *Phytophthora infestans* on detached potato leaflets in four Nordic countries. *Plant Pathology* **58** : 690-702.
- Lepoivre P (2003) Phytopathologie : bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte. De Boeck Supérieur, Louvain-la-Neuve.
- Li Y, Van Der Lee TAJ, Evenhuis A, Van Den Bosch GBM, Van Bekkum PJ, Förch MG, Van Gent-Pelzer MPE, Van Raaij HMG, Jacobsen E, Huang SW, Govers F, Vleeshouwers VGAA, Kessel GJT (2012) Population dynamics of *Phytophthora infestans* in the Netherlands reveals expansion and spread of dominant clonal lineages and virulence in sexual offspring. *G3: Genes/Genomes/Genetics* **2** : 1529-1540.

- Li Y, Cooke DEL, Jacobsen E, Van Der Lee T (2013) Efficient multiplex simple sequence repeat genotyping of the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans*. *Journal of Microbiology Methods* **92** : 316-322.
- Lima MA, Maffia LA, Barreto RW, Mizubuti ESG (2009) *Phytophthora infestans* in a subtropical region: survival on tomato debris, temporal dynamics of airborne sporangia and alternative hosts. *Plant Pathology* **58** : 87-99.
- Lindhout P (2002) The perspectives of polygenic resistance in breeding for durable disease resistance. *Euphytica* **124** : 217-226.
- Lipsitch M, Moxon E (1997) Virulence and transmissibility of pathogens: what is the relationship? *Trends in Microbiology* **5** : 31-37.
- Lucas JA (1998) Plant Pathology and Plant Pathogens. Black-well Science, Oxford.
- Madec P (1966) Croissance et tubérisation chez la pomme de terre. *Bulletin de la Société Française de Physiologie Végétale* **12** : 159-173.
- Mathre DE (1997) Compendium of barley diseases. APS Press, St. Paul.
- Mboup M, Bahri B, Leconte M, De Vallavieille-Pope C, Kaltz O, Enjalbert J (2012) Genetic structure and local adaptation of European wheat yellow rust populations : the role of temperature-specific adaptation. *Evolutionary Applications* **5** : 341-352.
- McDonald BA, Linde C (2002) Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* **40** : 349-379.
- Meier-Runge F, van den Bosh T, Förch M, Evenhuis B, Kessel G (2014) First results of an EU-wide genotype monitoring of *Phytophthora infestans* using FTA cards. In PPO-Special Report 16, Schepers HTAM, ed., pp. 75-82. Applied Plant Research B.V., Wageningen.
- Michalakakis Y, Charmentier A, Gaillard JM, Sorci G, Tully T, Ronce O (2010) Evolution des traits d'histoire de vie. In: Biologie Evolutive, Thomas F, Lefèvre T, Raymond M, eds., pp. 339-386. De Boeck, Bruxelles.
- Miller JS, Johnson DA and Hamm PB (1998) Aggressiveness of isolates of *Phytophthora infestans* from the Columbia Basin of Washington and Oregon. *Phytopathology* **88** : 190-197.

- Milus EA, Seyran E, McNew R (2006) Aggressiveness of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* isolates in the south-central united states. *Plant Disease* **90** : 847-852.
- Mitchell SE, Lampert W (2000) Temperature adaptation in a geographically widespread zooplankter, *Daphnia magna*. *Journal of Evolutionary Biology* **13** : 371-382.
- Mizubuti EGS, Fry WE (1998) Temperature effects on developmental stages of isolates from three clonal lineages of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* **88** : 837-843.
- Mondot J, Ruiz A (1995) Vignobles et vigneronns du Bordelais (1850-1980). PU, Bordeaux.
- Montarry J, Glais I, Corbiere R, Andrivon D (2008). Adaptation to the most abundant host genotype in an agricultural plant-pathogen system - potato late blight. *Journal of Evolutionary Biology* **21** : 1397-1407.
- Montarry J, Hamelin FM, Glais I, Corbière R, Andrivon D (2010a) Fitness costs associated with unnecessary virulence factors and life history traits : evolutionary insights from the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans*. *BMC Evolutionary Biology* **10** : 283.
- Montarry J, Andrivon D, Glais I, Mialdea G, Corbière R, Delmotte F (2010b) Microsatellite markers reveal two genetic groups in the French population of the invasive plant pathogen *Phytophthora infestans*. *Molecular Ecology* **19** : 1965-1977.
- Mueller DS, Buck JW (2003) Effects of light, temperature and leaf wetness duration on daylily rust. *Plant Disease* **87** : 442-445.
- Mundt CC (2002) Use of multiline cultivars and cultivar mixtures for disease management. *Annual Review of Phytopathology* **40** : 381-410.
- Mundt CC (2014) Durable resistance: A key to sustainable management of pathogens and pests. *Infection, Genetics and Evolution* **27** : 446-455.
- Newton MR, Kinkel LL, Leonard KJ (1997) Competition and density-dependent fitness plant parasitic fungus. *Ecology* **78** : 1774-1784.
- Norros V, Rannik Ü, Hussein T, Petäjä T, Vesala T, Ovaskainen O (2014) Do small spores disperse further than large spores? *Ecology* **95** : 1612-1621.

- Nunkumar A, Caldwell PM, Pretorius ZA (2008) Alternative hosts of Asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in South Africa. *South African Journal of Plant and Soil* **25** : 62-63.
- Ohlberger J (2013) Climate warming and ectotherm body size - from individual physiology to community ecology. *Functional Ecology* **27** : 991-1001.
- Orozco-Avitia A, Esqueda M, Meza A, Tiznado M, Gutierrez A, Gardea A (2013) Temperature effect on *Rhizoctonia solani* analyzed by microcalorimetry. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* **8** : 62-166.
- Pariaud B, Ravigne V, Halkett F, Goyeau H, Carlier J, Lannou C (2009) Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens. *Plant Pathology* **58** : 409-424.
- Pariaud B, Goyeau H, Halkett F, Robert C, Lannou C (2012) Variation in aggressiveness is detected among *Puccinia triticina* isolates of the same pathotype and clonal lineage in the adult plant stage. *European Journal of Plant Pathology* **134** : 733-743.
- Pariaud B, Berg F, Bosch F, Powers SJ, Kaltz O, Lannou C (2013) Shared influence of pathogen and host genetics on a trade-off between latent period and spore production capacity in the wheat pathogen, *Puccinia triticina*. *Evolutionary Applications* **6** : 303-312.
- Pianka ER (1970) On r and K selection. *The American Naturalist* **104** : 592-597.
- Parlevliet JE (1979) Components of resistance that reduce the rate of epidemic development. *Annual Review of Phytopathology* **17** : 203-222.
- Pasco C, Montarry J, Marquer B, Andrivon D (2015) And the nasty ones lose in the end: foliar pathogenicity trades off with asexual transmission in the Irish famine pathogen *Phytophthora infestans*. *New Phytologist*, DOI: 10.1111/nph.13581.
- Peetz AB, Mahaffee WF, Gent DH (2009) Effect of temperature on sporulation and infectivity of *Podosphaera macularis* on *Humulus lupulus*. *Plant Disease* **93** : 281-286.
- Pernaci M (2015) Etude des traits d'histoire de vie de *Melampsora larici-populina*, agent de la rouille du peuplier : de leur déterminisme génétique à leurs conséquences évolutives. Thèse de doctorat. Université de Lorraine, Nancy, France.

- Philibert A, Desprez-Loustau ML, Fabre B, Frey P, Halkett F, Husson C, Lung-Escarment B, Marçais B, Robin C, Vacher C, Makowski D (2011). Predicting invasion success of forest pathogenic fungi from species traits. *Journal of Applied Ecology* **48** 1381-1390.
- Rakotonindrainy T, Corbière R, Chatot C, Pinchon V, Dubois L, Aurousseau F, Chauvin JE, Aubertot JN (2012) Analysis of volunteer density under the influence of cropping practices: a contribution to the modelling of primary inoculum of *Phytophthora infestans* in potato crops. In: PPO-Special Report 15, Schepers HTAM, ed., pp 67-73. Applied Plant Research B.V., Wageningen.
- Rausher MD (1984) Tradeoffs in performance on different hosts: evidence from within - and between - site variation in the beetle *Deloyala guttata*. *Evolution* **38** : 582-595.
- Ravichandra NG (2013) Infection process and survival of plant pathogens. In: Fundamentals of Plant Pathology, Ravichandra NG, ed., pp. 434-464. PHI Learning Pvt. Ltd. Delhi.
- REX Consortium (2013) Heterogeneity of selection and the evolution of resistance. *Trends in Ecology and Evolution* **28** : 110-118.
- Robert C, Bancal MO, Lannou C (2004) Wheat leaf rust uredospore production on adult plants: influence of leaf nitrogen content and *Septoria tritici* blotch. *Phytopathology* **94** : 712-721.
- Robertson NF (1991) The challenge of *Phytophthora infestans*. In: Advances in Plant Pathology , vol. 7 - *Phytophthora infestans*, the Cause of Late Blight of Potato, Ingram DS, Williams PH, eds., pp. 1-30. Academic Press, Londres.
- Roff DA (1992) The evolution of life histories: Theory and analysis. Chapman & Hall, New York.
- Roper M, Seminara A, Bandi MM, Cobb A, Dillard HR, Pringle A (2010) Dispersal of fungal spores on a cooperatively generated wind. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **107** : 17474-17479.
- Ross D (2002) Ireland: History of a Nation. Geddes & Grosset, New Lanark.
- Rossi V, Bolognesi M, Languasco L, Giosuè S (2006) Influence of Environmental Conditions on Infection of Peach Shoots by *Taphrina deformans*. *Ecology and Epidemiology* **96** : 155-163.
- Ryley MJ, Lloyd DL, Johnson B, Teasdale KC, Mackie JM (2004) Rhizoctonia crown and root rot of the pasture legume, sulla (*Hedysarum coronarium*). *Australasian Plant Pathology* **33** : 183-188.

- Sache I (1997) Effect of density and age of lesions on sporulation capacity and infection efficiency in wheat leaf rust (*Puccinia recondita* f.sp. *tritici*). *Plant Pathology* **46** : 581-589.
- Sadeghi H, Khazaei F, Sheidaei S, Yari L (2011) Effect of seed size on seed germination behavior of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *ARPJ Journal of Agricultural and Biological Science* **6** : 5-8.
- Sanzani SM, Li MG, Nicosia D, Faedda R, Cacciola SO, Schena L (2013) Use of quantitative PCR detection methods to study biocontrol agents and phytopathogenic fungi and oomycetes in environmental samples. *Journal of Phytopathology* **162** 1-13.
- Sato N (1979) Effect of soil temperature on the field infection of potato tubers by *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* **69** : 989-993.
- Savary S, Teng PS (1994) La protection des cultures dans une agriculture durable. *La Recherche* **25** : 1322-1329.
- Schulte PM, Healy TM, Fangue NA (2011) Thermal performance curves, phenotypic plasticity, and the time scales of temperature exposure. *Integrative and Comparative Biology* **51** : 691-702.
- Sera B (2008) Simple traits among diaspore weight / number, plant height and ability of vegetative propagation. *Journal of Integrative Plant Biology* **50** : 1563-1569.
- Shaner GE (1980) Probits for analyzing latent period data in studies of slow rusting resistance. *Phytopathology* **70** : 1179-1182.
- Sjöholm L, Andersson B, Högborg N, Widmark A-K, Yuen J (2013) Genotypic diversity and migration patterns of *Phytophthora infestans* in the Nordic countries. *Fungal Biology* **117** : 722-730.
- Soltner D (1999) Les grandes productions végétales. Collections Sciences et Techniques agricoles, Angers.
- Sosa-Alvarez M, Madden LV, Ellis MA (1995) Effects of temperature and wetness duration on sporulation of *Botrytis cinerea* on strawberry leaf residues. *Plant Diseases* **79** : 609-615.
- Spielman LJ, Drenth A, Davidse LC, Sujkowski LJ, Gu W, Tooley W, Fry WE (1991) A second world-wide migration and population displacement of *Phytophthora infestans*. *Plant Pathology* **40** : 422-430.

- Spire D, Rousselle P (1996) La plante ; origine socio-historique. In: La pomme de terre : Production, amélioration, ennemis et maladies, utilisations, Rousselle P, Robert Y, Crosnier JC, eds., pp. 25-48. INRA Editions, Paris.
- Staples RC, Hoch HC (1997) Physical and chemical cues for spore germination and appressorium formation by fungal pathogens. In: The mycota V (part A), Carroll GC, Tudzynski P, eds., pp. 27-40. Springer, New York.
- St Clair DA (2010) Quantitative disease resistance and quantitative resistance loci in breeding. *Annual Review of Phytopathology* **48** : 247-268.
- Stefansson TS, McDonald BA, Willi Y (2013) Local adaptation and evolutionary potential along a temperature gradient in the fungal pathogen *Rhynchosporium commune*. *Evolutionary Applications* **6** : 524-534.
- Stearns SC (1989) Trade-offs in life-history evolution. *Functional Ecology* **3** : 259-268.
- Stearns SC (1992) The evolution of life histories. Oxford University Press, Oxford.
- Stroud JA, Shaw DS, Hale MD, Steele KA (2015) SSR assessment of *Phytophthora infestans* populations on tomato and potato in British gardens demonstrates high diversity but no evidence for host specialization. *Plant Pathology*. DOI: 10.1111/ppa.12407.
- Suffert F, Ravigne V, Sache I (2015) Seasonal changes drive short-term selection for fitness traits in the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Applied and Environmental Microbiology* **81** : 6367-6379.
- Thomas F, Poulin R, Brodeur J (2010) Host manipulation by parasites: a multidimensional phenomenon. *Oikos* **119** : 1217-1223.
- Thrall PH, Burdon JJ (2002) Evolution of gene-for-gene systems in metapopulations: the effect of spatial scale of host and pathogen dispersal. *Plant Pathology* **51** : 169-184.
- Tilman D, Fargione J, Wolff B, D'Antonio Dobson A, Howarth R, Schindler D, Schlesinger WH, Simberloff D, Swackhamer D (2001) Forecasting agriculturally driven global environmental change. *Science* **292** : 281-284.

- Timmer LW, Graham JH, Zitko SE (1998) Metalaxyl - Resistant Isolates of *Phytophthora nicotianae* : Occurrence, Sensitivity, and Competitive Parasitic Ability on Citrus. *Plant Disease* **82** : 254-261.
- Travadon R, Bousset L, Saint-Jean S, Brun H, Sache I (2007) Splash dispersal of *Leptosphaeria maculans* pycnidiospores and the spread of blackleg on oilseed rape. *Plant Pathology* **56** : 595-603.
- Van Den Berg F, Lannou C, Gilligan CA, Van Den Bosch F (2014) Quantitative resistance can lead to evolutionary changes in traits not targeted by the resistance QTLs. *Evolutionary Applications* **7** : 370-380.
- Vanderplank JE (1968) Disease Resistance in Plants. Academic Press, New York.
- Wastie RL (1991) Breeding for resistance. In: Advances in Plant Pathology (vol 7), *Phytophthora infestans*, the Cause of Late Blight of Potato, Ingram DS, Williams PH, eds., pp. 193-224. Academic Press, Londres.
- Werner PA, Platt WJ (1976) Ecological relationship of co-occurring goldenrods (*Solidago Compositae*). *The American Naturalist* **110** : 959-971.
- Westoby M, Jurado E, Leishman M (1992) Comparative evolutionary ecology of seed size. *Trends in Ecology and Evolution* **7** : 368-372.
- Widmark AK, Andersson B, Cassel-Lundhagen A, Sandström M, Yuen JE (2007) *Phytophthora infestans* in a single field in southwest Sweden early in spring : symptoms, spatial distribution and genotypic variation. *Plant Pathology* **56** : 573-579.
- Widmer TL (2009) Infective potential of sporangia and zoospores of *Phytophthora ramorum*. *Plant Disease* **93** : 30-35.
- Wilbur HM (1977) Propagule size, number, and dispersion pattern in *Ambystoma* and *Asclepias*. *The American Naturalist* **111** : 43-68.
- Williams PH (1992) Biology of *Leptosphaeria maculans*. *Canadian Journal of Plant Pathology* **14** : 30-35.

- Wolfe MS (1993) Can the strategic use of disease resistant hosts protect their inherent durability? In: Durability of disease resistance, Jacobs T, Parlevliet JE, eds., pp. 83-96. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht .
- Woodham-Smith C (1991) The Great Hunger (2^{ème} edition). Penguin, Harmondsworth.
- Yuen JE, Andersson B (2013) What is the evidence for sexual reproduction of *Phytophthora infestans* in Europe? *Plant Pathology* **62** : 485-491.
- Zeigler RS, Teng PS, Leong SA (1994) Rice blast diseases. CABI Biosciences, Wallingford.
- Zhan J, McDonald BA (2011) Thermal adaptation in the fungal pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Molecular Ecology* **20** : 1689-1701.
- Zhan J, McDonald BA (2013) Experimental measures of pathogen competition and relative fitness. *Annual Review of Phytopathology* **51** : 131-153.

Annexe 1

Mariette N, Mabon R, Corbière R. 2014. Souches de *Phytophthora infestans*, que nous apprennent les marqueurs microsatellites ? *La Pomme de Terre Française* 593 : 30-32.

>> SOUCHES DE *PHYTOPHTHORA INFESTANS*

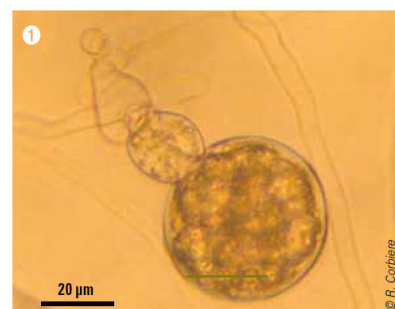
QUE NOUS APPRENNENT

Les populations européennes de *Phytophthora infestans* ont été marquées par des modifications importantes avec l'arrivée des souches A2 à partir des années 1980. Avec le développement des marqueurs génétiques tels que les microsatellites, les chercheurs disposent aujourd'hui de puissants outils pour suivre l'évolution des populations afin d'adapter les méthodes de lutte.

PAR NICOLAS MARIETTE*, ROMAIN MABON ET ROSELYNE CORBIÈRE**, INRA - IGEPP - LE RHEU

Phytophthora infestans est un agent pathogène hétérothallique, avec deux types de compatibilité sexuels (A1 et A2) requis pour la reproduction sexuée (encadré 1). Pendant longtemps, les souches appartenant au type sexuel A2 étaient présentes uniquement au Mexique alors que les A1 étaient distribuées mondialement. À la fin des années 1970, l'importation de grandes quantités de pomme de terre en provenance du Mexique et d'Amérique du Nord a causé l'arrivée en Europe de nouvelles populations

de *P. infestans*, composées de souches A1 mais aussi de A2. En France, les souches A2 n'ont été détectées qu'à partir de 1995 mais leur fréquence est restée très faible jusqu'en 2004. Leur nombre a ensuite rapidement augmenté, les souches A2 sont ainsi devenues majoritaires en 2006 dans le nord du pays et en 2008 en Bretagne. Cette année-là, plus de 70 % des souches collectées en France étaient de type sexuel A2. Après 2010, la fréquence des A2 en France a diminué progressivement et aujourd'hui la répartition des deux types sexuels au sein des populations françaises



30

1 Biologie

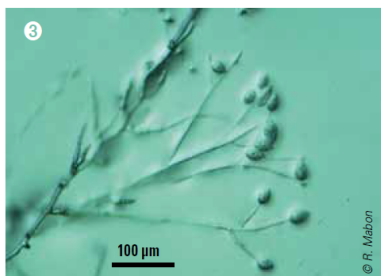
Les deux types de survie chez *Phytophthora infestans*

Le cycle de *P. infestans* comprend une phase épidémique et une phase de survie. La première a lieu lors de la période de culture de la pomme de terre et elle se caractérise par la succession de nombreux cycles de production de spores asexuées, les sporanges. Entre deux périodes de culture, le parasite peut survivre sous deux formes, asexuée et sexuée. Sous forme asexuée, il se conserve via le mycélium, dans les tubercules infectés restés au champ après la récolte ainsi que dans les tas de déchets. Les spores sexuées de survie de cet agent pathogène sont les oospores; elles sont issues du croisement entre deux souches de types sexuels opposés, appelés A1 et A2. Les oospores peuvent survivre dans le sol, hors de l'hôte pendant plusieurs hivers successifs. La forme sexuée de *P. infestans* n'a pas été mise en évidence en France jusqu'à présent, alors qu'elle existe en Europe du Nord. Au printemps, le mycélium ou les oospores produisent des sporanges qui peuvent démarrer une nouvelle épidémie.

est assez équilibrée. Étudier la distribution spatiale et temporelle des types sexuels permet d'apporter des informations importantes, mais ne donne pas d'indication précise sur l'évolution des populations de *P. infestans*. Les progrès réalisés dans la génomique de cette espèce ont conduit au développement de puissants marqueurs génétiques qui ont permis de combler ces lacunes. En effet, grâce à ces outils, connaître la diversité génétique des populations est possible, afin de suivre leurs changements ou encore de connaître l'implication de la reproduction sexuée dans le cycle de la maladie. Parmi les marqueurs

LES MARQUEURS GÉNÉTIQUES ?

P. infestans possède deux formes de survie pendant l'hiver. Il se conserve grâce à des oospores (1), issues de la reproduction sexuée entre une souche A1 et une souche A2 ou bien sous forme de mycélium dans les tubercules. Lorsque les conditions climatiques sont favorables, les oospores ou le mycélium produisent des sporanges (2). Ces spores asexuées (clonales) sont générées en grand nombre (3), à la face inférieure des feuilles, pendant les épidémies de mildiou.



génétiques disponibles pour étudier cette diversité, l'utilisation des microsatellites est la technique privilégiée à l'heure actuelle en Europe (encadré 2).

Les populations connaissent de fréquents changements

Entre 2001 et 2013, notre équipe (responsable : Didier Andrivon) a travaillé sur la caractérisation génétique des populations françaises à l'aide de dix marqueurs microsatellites. Cette étude a révélé une faible diversité génétique avec la dominance chaque année de quelques génotypes (graphique 3).

2 Technique

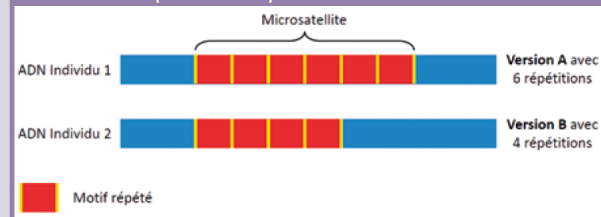
Les marqueurs microsatellites

Le génotypage permet de déterminer la variation génétique, à une position spécifique du génome, pour un individu ou un groupe d'individus. Pour étudier cette variation, différentes techniques existent comme l'utilisation des microsatellites.

Un microsatellite est une courte séquence d'ADN, d'un à six nucléotides, répétée de nombreuses fois à un endroit du génome. Le nombre de répétitions de cette séquence peut varier entre deux individus, ce qui va modifier la taille du microsatellite (voir schéma ci-dessous). Cette variation de taille nous renseigne donc sur le polymorphisme de chaque microsatellite étudié. L'analyse de plusieurs microsatellites permet ainsi d'établir le profil génétique de chaque individu, appelé alors un génotype (multilocus genotype ou MLG), et de comparer les individus entre eux.

Les microsatellites, découverts dans les années 1960, sont utilisés dans de nombreux domaines, par exemple en tant que marqueurs génétiques par la police scientifique ou bien pour étudier la diversité génétique de populations animales, végétales, bactériennes ou fongiques. À partir des années 2000, ils ont servi à décrire les populations de *Phytophthora infestans*. C'est aujourd'hui la technique de référence en Europe pour étudier la diversité génomique chez cette espèce à l'aide d'une vingtaine de marqueurs microsatellites disponibles.

Variation de taille (versions A et B) d'un microsatellite chez deux individus.



31

Mildiou

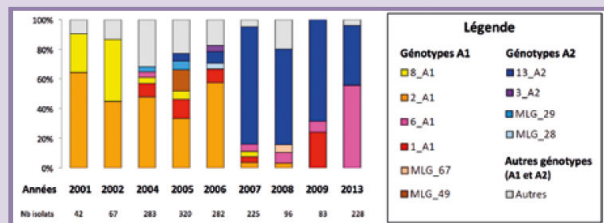
Enquête

Ces résultats indiquent notamment que les populations françaises de *P. infestans* restent largement clonales, sans réelle trace de reproduction sexuée.

Malgré cette faible diversité génétique, les populations françaises de *P. infestans* sont marquées par de fréquents changements des génotypes dominants. Par exemple, le génotype 2_A1 représentait 60 % des isolats collectés en 2006 mais avait quasiment disparu en 2007. Dans le même temps, le génotype 13_A2, appelé aussi Blue_13, regroupait seulement 10 % des isolats en 2006 pour atteindre plus de 80 % l'année suivante. Des changements similaires sont observés dans d'autres pays européens (Grande-Bretagne, Irlande), notamment la rapide expansion du génotype 13_A2 qui reste aujourd'hui encore l'un des génotypes les plus fréquents en Europe.

Ces modifications profondes observées chez les populations de *P. infestans* ne sont pas encore bien comprises à l'heure actuelle, même si plusieurs pistes sont étudiées. Une des raisons avancées est un plus haut niveau d'agressivité de certains génotypes qui leur permettrait de se répandre dans les populations. Cependant cette hypothèse ne semble pas être toujours vérifiée, nos études sur les populations françaises ne montrant pas une plus forte agressivité des isolats appartenant au génotype 13_A2 par rapport à d'autres génotypes. Une autre hypothèse serait l'acquisition par des génotypes d'une résistance à des fongicides qui pourrait leur conférer un avantage sélectif suffisant pour dominer les populations. Enfin, on peut supposer que la variation de certains facteurs environnementaux, comme de brusques modifications de température, des périodes de sécheresse au printemps ou encore une abondante pluviométrie en été, seraient susceptibles de jouer un rôle dans les changements observés. À ce titre, notre équipe étudie actuellement l'impact de la température sur la biologie de *P. infestans*

3 Fréquence des génotypes trouvés en France entre 2001 et 2013



Génotypage, avec 10 marqueurs microsatellites, réalisé à l'INRA Rennes, UMR IGEPP. Les génotypes les plus fréquents sont nommés avec la nomenclature européenne: chiffre suivi du type sexuel (ex: 13_A2); les génotypes les plus rares sont indiqués par un numéro (ex: MLG_67)

afin de déterminer si l'augmentation des températures peut contribuer à la sélection de certains génotypes.

Et maintenant ?

Les marqueurs microsatellites présentent de nombreux avantages par rapport à d'autres marqueurs moléculaires (polymorphisme élevé, résultats reproductibles d'un laboratoire à l'autre...). Leur utilisation chez *P. infestans* permet de suivre avec précision la composition des populations ainsi que leurs modifications qui se sont révélées fréquentes ces dernières années. Grâce à cette technique, la comparaison des populations françaises avec les populations des pays voisins est maintenant possible. Ainsi le suivi des populations de *P. infestans* à l'aide des marqueurs microsatellites nous indique si les populations restent clonales ou si la reproduction sexuée apparaît sur notre territoire. Comme on l'a vu, les souches des deux types sexuels A1 et A2 sont présentes en France, parfois sur une même parcelle, ce qui rend potentiellement possible la reproduction sexuée. Celle-ci pourrait avoir des conséquences majeures sur l'épidémiologie du mildiou en France comme c'est déjà le cas en Europe du Nord. En effet, dans ces régions, où la reproduction sexuée est avérée depuis une dizaine d'années, la présence d'oospores comme source d'inoculum primaire (encadré 1) a entraîné des épidémies plus précoces et donc plus difficiles à anticiper qu'auparavant. La

reproduction sexuée favorise également la diversité génétique au sein des populations, ce qui peut engendrer un plus haut niveau d'adaptation pour celles-ci. Ceci peut se traduire par l'émergence d'individus virulents face aux gènes de résistance de l'hôte ou résistants à certains fongicides.

Continuer le suivi et la caractérisation génotypique des populations de *P. infestans* est donc important. De plus, il est maintenant indispensable d'établir les liens qui existent entre les génotypes et certaines caractéristiques biologiques des souches, telles que leur pouvoir pathogène, la résistance aux fongicides, la résistance variétale ou l'adaptation éventuelle au changement climatique. Une meilleure compréhension de ces relations permettra de mieux décrire et expliquer l'évolution des populations mais aussi de l'anticiper. Les informations récoltées pourront, par exemple, être utiles pour affiner les paramètres d'outils d'aide à la décision tels que Mileos. ■

* Nicolas Mariette, doctorant, bénéficie d'une bourse Cifre grâce au soutien de l'ACV/NPT

** Nous remercions toutes les personnes qui nous ont aidés à réaliser les prospections sur le terrain et à collecter les échantillons de mildiou, en particulier Roland Pellé, Catherine Chatot, Claude Masclez, Yvon Pouliquen, Jo Petton, Jean-Marc Abiven, Jacques le Mouellie, Mathilde Bodiou, Philippe Laty, Delphine Detourné, Ludovic Dubois, Serge Duvauchelle.

Annexe 2

Corbière R, Chatot C, Mabon R, Mariette N. 2016. Mildiou en France : *P. infestans* sous surveillance. *Phytoma* 690 : 30-36.



Mildiou en France : *P. infestans* sous surveillance

Le réseau d'épidémiosurveillance du mildiou de la pomme de terre permet de suivre les populations de *Phytophthora infestans*, ses résistances aux fongicides et ses contournements de résistances variétales. C'est utile.

ROSELYNE CORBIÈRE*, CATHERINE CHATOT**, ROMAIN MABON* ET NICOLAS MARIETTE*

Le mildiou de la pomme de terre dû à *Phytophthora infestans* occasionne la majorité des traitements appliqués sur cette culture.

Il faut donc agir sur cette maladie pour mettre au point une vraie protection intégrée répondant aux enjeux du plan Écophyto. Pour cela, il est utile d'avoir une bonne connaissance des populations de *P. infestans* présentes en France.

Pourquoi suivre génotypes et phénotypes

La maladie peut être foudroyante et les populations évoluent vite

Le mildiou de la pomme de terre, causé par l'oomycète *Phytophthora infestans*, peut provoquer de graves dégâts en culture si les conditions climatiques de la saison sont favorables à son développement.

La maladie est redoutable par son caractère fortement épidémique dû au taux de multiplication du bioagresseur ; en quelques jours, une lésion sur feuille peut générer plus de 100 000 spores capables de se disperser rapidement par voie aérienne et provoquer de nouveaux foyers de maladie. Les populations de *P. infestans* sont sujettes à de



1. Parcelle d'essai non traitée à l'Inra de Ploudaniel. Les génotypes de pomme de terre sensibles, au premier plan et à droite, sont détruits par le mildiou, les génotypes résistants restent verts. > 2. Symptôme de mildiou sur feuille.



Photos : Inra Rennes-Le Rheu R. Corbière

profonds et rapides changements au cours des années, dus à leur remarquable capacité de dispersion et d'adaptation.

Des modifications des caractères biologiques du bioagresseur peuvent avoir des effets importants, comme le contournement de gènes de résistance ou l'apparition de souches résistantes à des matières actives.

Elles peuvent aussi conduire, par exemple, à une augmentation de l'agressivité de certaines souches ou bien à une meilleure adaptation à des températures basses (pouvant causer des épidémies précoces), ou à des températures extrêmes assurant une meilleure survie de ces nouveaux isolats par rapport aux populations précédentes.

RÉSUMÉ

♦ **CONTEXTE** - Les populations de *P. infestans* évoluent rapidement vu leur capacité de dispersion et d'adaptation. Pour développer des stratégies de protection durable des cultures face à ces évolutions et aux enjeux d'Écophyto, une bonne connaissance des populations de *P. infestans* présentes en France est nécessaire. Il faut déterminer leurs caractères génétiques (génotypage) et biologiques (phénotypage).

♦ **ÉTUDE** - Un dispositif national de suivi des populations de *P. infestans* s'est mis en place en 2013 afin de déterminer leur structure génotypique et leur évolution dans le temps et l'espace. L'action est couplée à celle du réseau EuroBlight. Plus de 300 échantillons collectés en 2013-2014 ont été analysés et près de 150 isolats 2015 sont en cours de traitement. Le génotypage des isolats est complété par du phénotypage

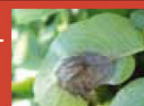
pour étudier leurs caractéristiques biologiques et détecter d'éventuelles relations génotype/phénotype des individus.

♦ **RÉSULTATS** - Sur pomme de terre, les populations françaises actuelles de *P. infestans* comprennent deux lignées clonales dominantes, EU_6_A1 et EU_13_A2, sans reproduction sexuée décelée. La tomate (diversité génétique supérieure) et les repousses de pomme de

terre pourraient constituer des « refuges » de génotypes diversifiés. Les isolats EU_13_A2, à profils de virulence complexes, résistent aux phénylamides. Les isolats EU_6_A1, plus agressifs, produisent davantage de spores, mais la plus grande taille des sporanges des isolats EU_13_A2 pourrait leur offrir un avantage sélectif. Les deux lignées, surtout EU_13_A2, présentent des variants pouvant avoir des propriétés

biologiques différentes. Il est donc encore difficile d'établir un lien direct entre le génotype d'un isolat et ses caractères biologiques, en particulier son pouvoir pathogène.

♦ **MOTS-CLÉS** - Biosurveillance, mildiou *Phytophthora infestans*, pomme de terre, tomate, génotypage, lignée clonale, phénotypage, résistance aux fongicides, agressivité, Écophyto, protection intégrée.



Vingt années d'analyse d'isolats

Pour bien comprendre et anticiper les évolutions potentielles des populations de *P. infestans*, il est indispensable de déterminer les caractères génétiques (génotypage) et biologiques (phénotypage) des populations actuellement présentes sur le territoire et d'établir les relations éventuelles entre génotype et phénotype, en particulier pour le pouvoir pathogène.

Déjà, depuis plus de vingt ans, les isolats sont analysés pour déterminer leur type de compatibilité sexuel, A1 ou A2, afin d'en estimer le ratio.

Il est également conseillé de surveiller, en parallèle, les modalités de début d'épidémie pour déterminer l'origine des sources d'inoculum primaire : soit les repousses de l'année précédente, soit d'éventuelles oospores (issues du croisement entre un isolat A1 et un isolat A2) qui peuvent se conserver plusieurs années dans le sol.

Des outils moléculaires pour décrire les populations

Des génotypes définis

Depuis une dizaine d'années, de nouveaux outils moléculaires, basés sur l'analyse de l'ADN, ont été développés au laboratoire, afin de caractériser les isolats de *P. infestans* collectés dans les parcelles.

Parmi ces outils, les marqueurs microsatellites (ou SSRs pour « simple sequence repeats ») se sont révélés très puissants pour définir des génotypes (ou MLG pour « multi-locus genotype »).

Une fois caractérisés d'un point de vue génétique, les isolats peuvent être comparés entre eux pour déterminer leurs niveaux de proximité génétique et décrire la structure (composition) génotypique des populations échantillonnées.

Dénominations harmonisées au niveau européen

Afin de comparer les populations entre pays, une harmonisation des techniques et de la dénomination des génotypes a été réalisée en Europe, grâce au réseau Euro-Blight. Chaque génotype européen (EU) est dénommé par un numéro, suivi du type sexuel (A1 ou A2). De nombreux génotypes sont maintenant identifiés, comme EU_1_A1, EU_2_A1, EU_6_A1 (dit aussi pink 6), EU_13_A2 (ou blue 13), EU_33_A2 (ou green 33), etc. D'autres génotypes, rares ou uniques, n'ont pas encore de nom.

Grâce à cette technique fiable et rapide, utilisée au niveau international, la comparaison des populations de *P. infestans* entre bassins de production, différents pays européens, voire à l'échelle mondiale, est maintenant possible. L'évolution et les changements dans les populations peuvent aussi être suivis au cours du temps, d'une année à l'autre (Figure 1).

Lignées clonales ou bien reproduction sexuée

En parallèle, le génotypage donne des indications sur le mode de reproduction des populations. L'existence de lignées clonales majoritaires au sein d'une population laisse à penser qu'il s'agit de populations à reproduction asexuée, soit A1 ou A2. En revanche, si l'analyse révèle de nombreux individus uniques ou rares, cela indique la présence éventuelle de reproduction sexuée.

Cependant, si ces outils permettent de constater les bouleversements dans les po-

pulations actuelles ou passées, ils ne donnent que peu d'indications pour prévoir la survenue de nouveaux génotypes.

Dispositif national de biosurveillance

Suivi organisé depuis 2013

En France, un dispositif national de suivi des populations de *P. infestans*, initié en 2013, est en place afin de déterminer la structure et la diversité génotypiques des populations, ainsi que leurs évolution et dynamique dans le temps et dans l'espace.

Cette biosurveillance dans les bassins de production de pomme de terre (plants, consommation, industrie et féculé) implique l'ensemble de la filière pomme de terre,

Arvalis-Institut du végétal et l'Inra (Rennes), et s'appuie également sur le réseau de terrain des Bulletins de santé du végétal (BSV). Cette action concertée est couplée à celle initiée au niveau européen par le réseau Euro-Blight⁽¹⁾.

Plus de 300 échantillons collectés en 2013-2014

Le génotypage des isolats par marqueurs microsatellites a l'avantage de permettre l'analyse d'un

grand nombre d'échantillons collectés sur des échelles spatiales significatives. Le prélèvement est très facile, puisque chaque individu, provenant d'une lésion unique sur feuille, est déposé par simple pression sur une bandelette de papier filtre traité (carte Whatman FTA).

Sur ce support, l'ADN de chaque isolat peut se conserver plusieurs mois, puis être ensuite directement extrait et analysé au laboratoire. Ainsi, plus de 300 échantillons collectés en 2013-2014 dans les bassins de production ont été analysés et près de 150 isolats prélevés en 2015 sont actuellement en cours de traitement.

Des populations clonales

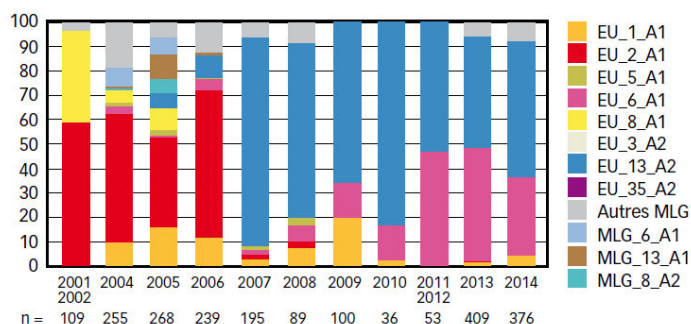
Conséquences sur la conservation hivernale de la maladie

En France, la structure génétique des populations française de *P. infestans* ne montre pas de signe de reproduction sexuée, à la différence des populations d'Europe du Nord où les oospores constituent une composante importante pour générer l'inoculum primaire. Les populations françaises semblent donc essentiellement clonales, c'est-à-dire issues de la reproduction asexuée.

La biosurveillance implique l'ensemble de la filière.

Fig. 1 : Évolution des populations françaises de *P. infestans* collectées sur pomme de terre au cours des quinze dernières années

Une couleur = une lignée clonale ou génotype. Le nombre d'isolats analysés par an à partir de 2013 représente la somme des échantillons récoltés au sein du dispositif national de surveillance et de ceux collectés dans le cadre de la thèse de N. Mariette.



(1) Voir « Miliou et al. : l'Europe mutualise ses connaissances », p. 24.



Fig. 2 : Répartition des génotypes en France

Fréquence des génotypes de *P. infestans* collectés dans les grands bassins de production de pomme de terre en 2013-2014. Une couleur = un génotype. Données recueillies sur plus de 300 échantillons.

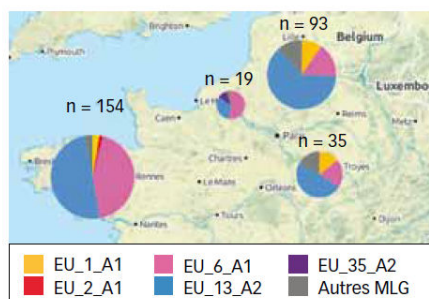
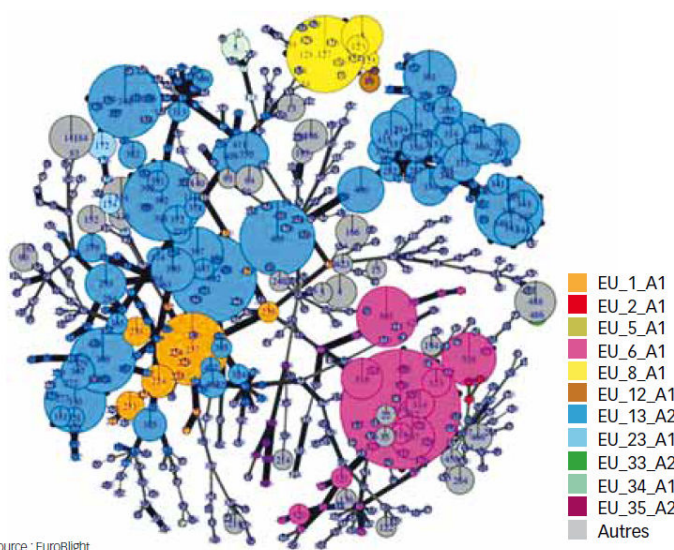


Fig. 3 : Le réseau des distances génétiques entre génotypes

Ce réseau représente la distance génétique entre les lignées clonales et leurs variants identifiés actuellement en Europe. Une lignée = une couleur. Les génotypes rares ou uniques sont en gris. Il est visible que la lignée EU_13_A2 (en bleu) compte de nombreux variants, alors que la lignée EU_6_A1 (en rose) montre moins de variabilité.



Source : EuroBlight

En l'absence de végétation, *P. infestans* se conserve alors principalement sous forme de mycélium dans les tubercules laissés au champ après la récolte et sur les repousses. En effet, *P. infestans* est un organisme biotrophe. Autrement dit, il a besoin de tissus végétaux vivants pour survivre. Lorsque les conditions climatiques sont favorables, ce mycélium produit de nouvelles spores asexuées.

Gestion de l'inoculum primaire pour lutter contre la maladie

On peut donc supposer qu'en France, les épidémies de mildiou démarrent à partir de sources telles que tas de déchets ou re-

pousses, voire tubercules de semences non certifiés infectés de manière latente. La gestion de ces sources d'inoculum primaire reste donc impérative pour retarder et diminuer l'intensité des épidémies.

Populations françaises peu diversifiées génétiquement

Les lignées EU_6_A1 et EU_13_A2 dominent nettement

Les populations françaises actuelles de *P. infestans* sont essentiellement constituées par deux lignées clonales dominantes (génotypes) de type sexuel opposé, appelées EU_6_A1 et EU_13_A2 (Figure 2). Ces deux génotypes regroupent également la majorité

des isolats de Grande-Bretagne. D'autres génotypes minoritaires sont aussi détectés, comme EU_1_A1, EU_2_A1 (trouvés uniquement en Bretagne) et des génotypes rares ou uniques.

Cependant, la fréquence des génotypes varie selon les années. Globalement en France, en 2013, la fréquence des isolats EU_6_A1 et EU_13_A2 est équivalente (43% et 46%, respectivement). En 2014, la proportion d'isolats EU_13_A2 (56%) a augmenté par rapport à 2013 et celle des isolats EU_6_A1 a diminué (25%).

Des différences sont notées en fonction des régions. La fréquence des isolats EU_6_A1 est plus importante dans l'ouest (45%) que dans le nord et le centre (17%). À l'inverse, les isolats EU_1_A1 et les génotypes uniques sont plus nombreux (10% et 13%, respectivement) dans le centre et le nord (comme en Belgique) qu'en Bretagne (2 à 3%).

Pour 2015, les isolats collectés sont en cours d'analyse ; les résultats préliminaires indiquent que la lignée EU_13_A2 est toujours dominante dans toutes les régions.

Variants au sein des lignées

L'analyse de la structure génétique montre aussi que les lignées clonales dominantes, en particulier la lignée EU_13_A2, présentent de nombreux variants (variabilité génétique intra-clonale) ; ces lignées regroupent en effet des isolats qui se distinguent des autres par de légères différences génotypiques. Cette diversité génétique au sein des lignées clonales semble s'accroître au fur et à mesure de leur expansion dans le temps et dans l'espace (Figure 3).

Toutefois, les données disponibles actuellement ne permettent pas de savoir si cette diversification génétique s'accompagne d'une modification des propriétés biologiques et, en particulier, du pouvoir pathogène.

Modifications des populations

Un effet de la mondialisation des échanges : l'exemple américain

Les populations européennes de *P. infestans* sont en constante évolution, tout comme celles des autres continents ; le génotypage permet de retracer les bouleversements survenus dans les populations.

Ainsi, en Amérique de Nord, le génotype US-23, dominant depuis 2012, provoque de très graves dégâts sur pommes de terre mais aussi sur tomates (voir article sur Euroblight p. 24).

Le génotype nuisible en Amérique du Nord l'est moins en France

En comparant les profils génotypiques des isolats, le génotype US-23 ressemble au génotype européen EU_23_A1 ; celui-ci aurait été importé aux États-Unis, via des plantules de tomates contaminées, mais cette hypothèse reste à vérifier.



Photos : Inra Rennes, Le Rheu R. Corbière

▲ 3. Tas de déchets et repousse avec mildiou sporulant sur tas de déchets, forcément non traité... Vers le bas du tas, un cadre en bois de 50 cm de côté permet d'indiquer l'échelle. ▲ 4. Symptômes de mildiou sur feuilles et tige. 5. Autre tas de déchets, le crayon bleu montre l'échelle.

En France, ce génotype EU_23_A1 est présent et il a été détecté sur tomate depuis 2008, mais n'a jamais été trouvé sur pomme de terre. Des analyses au laboratoire montrent pourtant qu'il produit autant de spores que le génotype EU_6_A1 sur une variété sensible de pomme de terre.

Les dégâts importants causés par ce génotype en Amérique du Nord pourraient être liés aux variétés de pomme de terre, différentes sur les deux continents. Cela pourrait aussi refléter une adaptation des isolats à des caractéristiques particulières des agroécosystèmes, comme des facteurs environnementaux liés au climat.

Mildiou sur pomme de terre et tomate : quelles relations ? Des génotypes mixtes et d'autres spécialisés

En parcelles de production, quelques génotypes de *P. infestans* sont détectés à la fois sur pomme de terre et sur tomate (comme EU_2_A1). En revanche, d'autres génotypes ne sont trouvés en France que sur l'une des deux cultures, mais rarement sur les deux (comme EU_13_A2 sur pomme de terre et EU_23_A1 sur tomate).

Certains génotypes présenteraient une préférence d'hôte, pomme de terre ou tomate, bien qu'ils soient pathogènes des deux espèces. De plus, sur tomate, la diversité génétique des isolats de *P. infestans* est plus grande que sur pomme de terre.

Rôle des tomates et des repousses de pomme de terre

Les tomates, aussi bien dans les parcelles commerciales que dans les jardins, pourraient constituer des plantes « refuges » pour des génotypes de *P. infestans* très différents. Des génotypes rares de *P. infestans* ont aussi été trouvés sur repousses de pomme de terre ; celles-ci, non traitées, pourraient alors, comme les tomates, être des « refuges »

d'isolats diversifiés. Ces génotypes rares se trouveraient ensuite, en faible fréquence, dans les parcelles de pomme de terre.

Connaître les caractéristiques biologiques des isolats

Pourquoi faut-il du phénotypage pour compléter le génotypage ?

L'analyse des populations par marquage moléculaire permet de génotyper un grand nombre d'individus. Mais les microsatellites, courtes séquences d'ADN répétées dans le génome, sont des marqueurs neutres et non codants. S'ils fournissent une empreinte génétique permettant de classer les individus entre eux, il est difficile d'établir un lien direct entre le génotype d'un isolat et son phénotype, en particulier avec ses caractères liés au pouvoir pathogène.

Pour étudier les caractéristiques biologiques des isolats, il est nécessaire de disposer d'individus vivants. C'est pourquoi, en parallèle du génotypage des populations, une démarche complémentaire de phénotypage a été entreprise en France (Figure 4).

Comment réaliser ce phénotypage

Pour ce faire, il est indispensable de réaliser un isolement à partir de chaque lésion, puis de maintenir l'isolat vivant pour des analyses

ultérieures. Cette méthodologie est beaucoup plus lourde que le prélèvement sur carte FTA, mais elle fournit des informations différentes et nécessaires pour comprendre la biologie des populations.

Les relations éventuelles entre le génotype et le phénotype des mêmes individus, en particulier ceux des deux lignées EU_6_A1 et EU_13_A2, ont été examinées pour plusieurs caractères (traits de vie) : résistance aux fongicides (phénylamides), virulence (contournement de gènes R de résistance de la plante), agressivité des isolats à différentes températures et taille des spores asexuées.

Caractères biologiques des isolats EU_13_A2

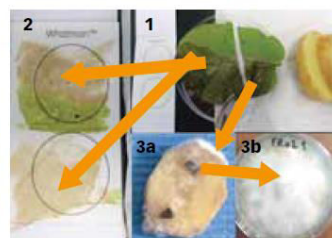
Une résistance aux fongicides phénylamides

Les isolats de la lignée EU_13_A2 sont résistants aux matières actives de la famille des phénylamides (métalaxyl, méfénoxam), alors que les isolats de la lignée EU_6_A1 semblent tous sensibles.

Les autres isolats de type sexuel A1, appartenant aux anciennes lignées EU_1_A1, EU_2_A1... sont aussi pour la plupart sensibles, bien que 25 % d'entre eux soient résistants ou tolérants.

Fig. 4 : Génotypage et phénotypage

Un échantillon prélevé à partir d'une lésion sporulante sur feuille (1) ou tige, est déposé (2) sur une carte FTA (marque déposée) pour extraire ensuite son ADN aux fins de génotypage. À partir de la même lésion, un isolement est réalisé pour obtenir un isolat vivant qui sera cultivé en boîte de Petri (3a, 3b) afin de réaliser le phénotypage.





Les mécanismes contrôlant la résistance à ces matières actives systémiques sont encore mal connus.

Dans les anciennes populations, l'apparition de résistance aux phénylamides s'est produite suite à leur emploi massif et l'exposition répétée des isolats à ces matières actives. Avec la réduction importante de leur utilisation, certaines populations peuvent redevenir sensibles. La lignée EU_6_A1 est apparue quand l'utilisation de ces matières actives était déjà réduite en culture de pomme de terre, ce qui expliquerait la sensibilité des isolats.

La résistance des isolats EU_13_A2 s'expliquerait par des mutations spécifiques dans les isolats de cette lignée.

Comme ces matières actives sont maintenant peu employées en culture de pomme de terre, cette résistance ne semble pas avoir de conséquence pour la lutte actuelle contre la maladie. Elle n'explique donc pas l'invasion du territoire par la lignée EU_13_A2.

EU_13_A2 contourne davantage de gènes de résistance que EU_6_A1

Les isolats EU_13_A2 présentent d'autres caractéristiques biologiques particulières. Ils ont un profil de virulence plus complexe que les isolats de type sexuel A1, c'est-à-dire qu'ils contournent davantage de gènes R de résistance spécifique (Figure 5).

Les tests au laboratoire en conditions contrôlées (dispositif explicité dans l'encadré ci-dessous) montrent que tous les isolats (A1 et A2) sont virulents face à six gènes R de résistance R1, R3, R4, R7, R10 et R11 (non montrés figure 5) de la gamme d'hôtes différentiels.

La température joue un rôle important sur la quantité des spores produites mais aussi sur leur taille.

Cependant, les isolats EU_6_A1 ont un profil de virulence assez simple ; la majorité ne contourne pas les gènes R2, R5 et R6, alors que les isolats EU_13_A2 surmontent généralement ces trois gènes. Certains isolats EU_13_A2 sont même virulents vis-à-vis des onze gènes de résistance spécifique testés, tandis que les isolats A1 testés ne sont pas virulents face au gène R9 (Figure 5).

Ces résultats indiquent aussi que tous les isolats d'une même lignée ne répondent pas de façon similaire face aux gènes de résistance spécifique ; il est donc encore impossible d'établir un lien direct entre le génotype d'un isolat et son profil de virulence.

Par ailleurs, il est remarquable de noter que certains isolats EU_13_A2 sont virulents vis-à-vis de gènes majeurs de résistance (R5 et R9) qui ne sont pourtant pas déployés actuellement en culture de pomme de terre en France.

Tests sur trois variétés décrites comme résistantes

La virulence des isolats EU_6_A1 et EU_13_A2 a également été évaluée sur trois variétés décrites comme résistantes au champ : Sarpo Mira (contenant au moins cinq gènes de résistance spécifique Rpi-smira1, Rpi-smira2, R3a, R3b, R4), Bionica (porteur des gènes Rpi-blb2, R2, R3a, R3b) et Carolus, dont la base génétique de la résistance n'est pas connue.

En conditions contrôlées au laboratoire, Carolus n'est pas attaquée ; sur Bionica et Sarpo Mira, plus de 50 % des isolats EU_13_A2 (sur vingt testés) provoquent des lésions sporulantes, tandis que seuls 15 à 25 %,

respectivement, des isolats EU_6_A1 (sur vingt-cinq testés) causent des lésions.

Ces tests, réalisés sur folioles détachées, ne reflètent pas totalement les conditions du champ et les interactions entre génotypes de *P. infestans*, résistance des plantes et environnement.

Ils donnent néanmoins d'utiles informations sur les relations entre les génotypes de *P. infestans* et les gènes majeurs de résistance de la plante, lorsque les isolats sont placés en conditions optimales pour leur développement.

Comparaison des deux lignées Études sur folioles de Bintje

Des études réalisées à l'Inra de Rennes (N. Mariette, R. Mabon *et al.*) ont été entreprises pour comparer l'agressivité des isolats EU_6_A1 et EU_13_A2, à différentes températures (10, 14, 18 et 24°C), en conditions expérimentales.

Le comportement des isolats est alors étudié sur folioles détachées d'une variété sensible (Bintje), pour plusieurs traits de vie : le développement des lésions, la sporulation et la taille des sporanges. Ces traits correspondent à différentes étapes du cycle infectieux de l'agent pathogène.

La vitesse de croissance des lésions indique la capacité des isolats à coloniser les tissus de l'hôte. La production de spores, évaluée par la quantité de spores produites par lésion, reflète la capacité de l'agent pathogène à se disperser.

Enfin, la taille des sporanges peut avoir un impact sur leur survie et leur germination, ainsi que sur leur dispersion générant les épidémies.

Des isolats EU_6_A1 plus agressifs

Les résultats obtenus montrent que les isolats de la lignée EU_6_A1 sont plus agressifs que ceux de la lignée EU_13_A2. Les isolats EU_6_A1 causent de plus grandes lésions

Dispositif de test du contournement de résistance

Chaque isolat est inoculé sur une foliole détachée d'un génotype de pomme de terre et portant un gène R de résistance spécifique. Douze folioles sont inoculées pour chaque isolat : une pour chacun des gènes de résistance testés (R1 à R11) et une pour un témoin sensible (sans gène de résistance).

Le gène de résistance est contourné quand



l'isolat produit une lésion sporulante sur la foliole contenant le gène R considéré ; dans le cas contraire, le gène R n'est pas surmonté.

L'isolat ci-dessus est virulent vis-à-vis des sept gènes R1, R3, R4, R6, R7, R10 et R11, mais ne contourne pas les quatre gènes R2, R5, R8 et R9.

Fig. 5 : Contournement de résistance variétale

Profil de virulence des deux principales lignées de *P. infestans* présentes en France.

Pourcentage d'isolats virulents

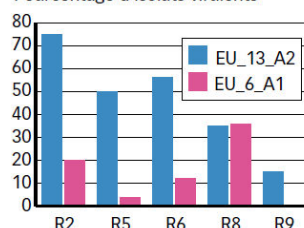
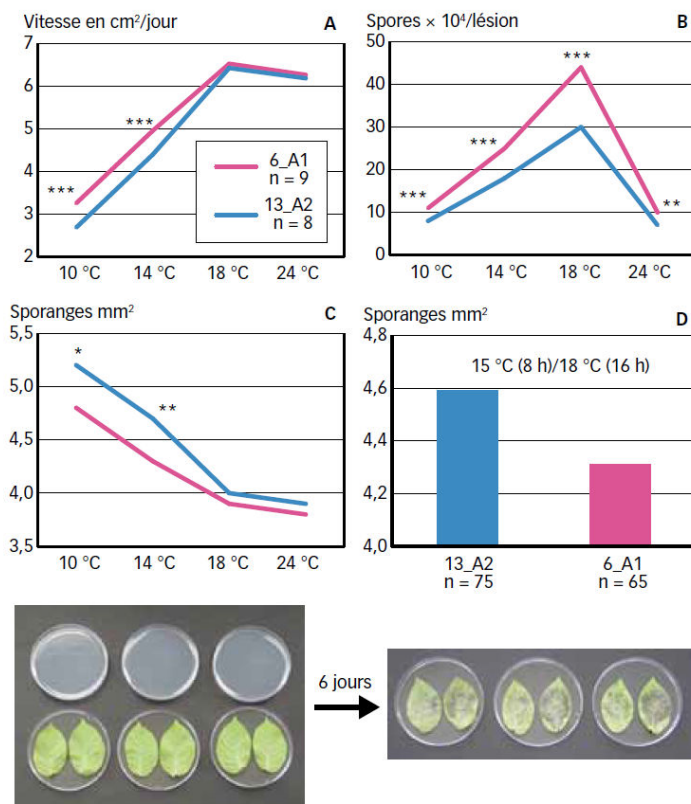


Fig. 6 : Agressivité des souches 13_A2 et 6_A1

comparaison de traits de vie d'isolats appartenant à ces deux lignées clonales sur folioles détachées de Bintje, variété de pomme de terre sensible au mildiou. Les photos représentent le dispositif expérimental.



que les isolats EU_13_A2 (Figure 6A), en particulier à faibles températures (10 °C et 14 °C). Ils produisent davantage de spores quelle que soit la température (Figure 6B).

EU_13_A2 et la taille des sporanges

Mais les isolats EU_13_A2 présentent un caractère particulier : leurs sporanges sont de plus grande taille que celles des isolats EU_6_A1 (Figures 6C et 6D). On peut supposer que ceci donne à la lignée EU_13_A1 des avantages tels une meilleure survie, une bonne capacité de germination ou un plus grand nombre de zoospores produites. En effet, selon la température, les sporanges peuvent germer directement ou, à températures basses, générer en moyenne quatre à dix zoospores biflagellées qui vont elles aussi se disperser, germer et infecter leur hôte. Les sporanges des isolats EU_13_A2, plus gros que ceux des isolats EU_6_A1, pourraient alors produire un plus grand nombre

de zoospores, mais cela reste à démontrer. Il est intéressant de constater que la température influe sur la taille des sporanges ; pour les deux lignées, les sporanges sont plus grands à basses températures (10 °C et 14 °C), qu'à 18 °C et 24 °C (Fig. 6C).

Aux températures basses, la production de grosses spores, de bonne qualité, vraisemblablement favorisant une efficacité d'infection élevée, compenserait le faible nombre de spores produites.

À l'inverse, les températures élevées sont pénalisantes : spores en plus faible nombre (Figure 6B) et de taille réduite (Figure 6C) à 24 °C par rapport à 18 °C.

Possibilité d'adaptation au changement climatique De la Baltique à l'Algérie

Les capacités d'adaptation de *P. infestans* à la température ont aussi été examinées dans le contexte du changement climatique. Des

populations d'origine géographique très différenciées (Bretagne ; nord de l'Europe, Danemark et Pays baltes ; Bassin méditerranéen, Chypre et Algérie) ont été comparées pour leur production de spores.

Des populations adaptées au climat

À faible température (10 °C), les dix-sept isolats issus du nord de l'Europe se sont montrés plus performants que les neuf isolats méditerranéens ; à l'inverse, aux températures élevées (18 °C et 24 °C), les isolats du sud sporulent davantage que ceux du nord. Enfin, à température douce (14 °C), les seize isolats de Bretagne produisent davantage de spores que les autres.

Il semble donc exister une adaptation locale des populations de *P. infestans* à la température. Comprendre les causes et mécanismes de cette adaptation serait un atout en réponse aux changements globaux.

Conclusion

Le réseau national mis en place pour la bio-surveillance des populations de *P. infestans* favorise le partage d'informations entre les acteurs de terrain et de laboratoire, et il doit être pérennisé.

Le génotypage des isolats apporte des informations très importantes sur la structure et la dynamique des populations de *P. infestans*. Cependant, il ne permet pas seul de définir des stratégies de protection durable contre le mildiou. Il est nécessaire de compléter ce génotypage par la caractérisation biologique des génotypes.

Les résultats récents obtenus montrent l'intérêt de combiner l'évaluation génotypique et phénotypique dans le suivi des populations. Ils ouvrent des pistes afin d'affiner les paramètres de l'OAD Mileos et de combiner les divers leviers (destruction des tas de déchets et repousses, déploiement de variétés résistantes, programmes de traitements...) pour développer des solutions innovantes de protection des cultures.

POUR EN SAVOIR PLUS

AUTEURS : *R. CORBIÈRE, *R. MABON ET *N. MARIETTE, Inra Rennes, UMR Igepp 35653 Le Rheu.

**C. CHATOT, Germicopa R&D, Kerguivarc'h 29520 Chateaufort-du-Faou.

CONTACTS : roselyne.corbier@rennes.inra.fr catherine.chatot@germicopa.fr

LIENS UTILES : www6.rennes.inra.fr/igepp http://euroblight.net

BIBLIOGRAPHIE : Une bibliographie est disponible auprès des auteurs de l'article.

REMERCIEMENTS Les auteurs remercient les nombreux acteurs des filières de pomme de terre, des instituts techniques et des chambres d'agriculture, pour le prélèvement des échantillons et leur investissement dans ce travail.

RÉSUMÉ

Traits d'histoire de vie, adaptation et pouvoir invasif de lignées clonales de *Phytophthora infestans*, agent du mildiou de la pomme de terre

Les populations ouest européennes de *Phytophthora infestans*, l'oomycète responsable du mildiou chez la pomme de terre, sont caractérisées par une structure clonale et un remplacement rapide des lignées dominantes. Cette thèse visait à identifier les déterminants écologiques, phénotypiques et évolutifs du caractère invasif de ces lignées clonales. Pour cela, les dynamiques génotypiques et phénotypiques de populations ont été analysées sur deux échelles de temps, l'une sur près d'une décennie et l'autre via un suivi longitudinal sur deux épidémies consécutives. Ces suivis étaient complétés par l'étude des réponses adaptatives au sein de ces populations liées aux principaux traits d'histoire de vie du parasite. Ces résultats tendent à rejeter l'hypothèse, souvent avancée, que la capacité invasive est liée à une plus grande agressivité des nouvelles lignées par rapport aux anciennes. De plus, le suivi sur deux ans a révélé un scénario complexe, avec la présence de deux lignées clonales dominantes (6_A1 et 13_A2) aux stratégies reproductives opposées : alors que les isolats 6_A1 produisent un grand nombre de petits sporanges, ceux des 13_A2 sont moins nombreux mais de plus grande taille. La coexistence au sein d'une même population de ces stratégies pourrait être due au trade-off entre nombre et taille des sporanges que nous avons également mis en évidence. Enfin, différentes réponses à la température entre ces lignées clonales ont été observées, ainsi que des patrons d'adaptation locale au sein de populations géographiquement éloignées. Ces travaux soulignent que différents facteurs d'adaptation peuvent impacter les mêmes traits biologiques de *P. infestans* et qu'il est nécessaire de réfléchir aux conséquences de ces pressions de sélection concomitantes dans un contexte associant changement climatique et déploiement de variétés résistantes.

Mots-clés : trade-off, agressivité, survie, adaptation à la température, fitness, *Solanum tuberosum*, stratégies r et K

ABSTRACT

*Life-history traits, adaptation and invasive ability of clonal lineages of *Phytophthora infestans*, the potato late blight agent*

West European populations of *Phytophthora infestans*, the oomycete causing late blight in potato, are characterized by a clonal structure and rapid replacement of dominant lineages. This work thus aimed to identify the ecological, phenotypic and evolutionary determinants of the invasive character of these clonal lineages. To this end, the phenotypic and genotypic population dynamics were analysed over two time scales, one over nearly a decade and a shorter one consisting in a longitudinal tracking over two consecutive epidemics. This monitoring was supplemented by the analysis of adaptive responses within these populations with respect to the main life-history traits of the parasite. These results tend to reject the hypothesis, often advanced, that the invasive ability is linked to a higher aggressiveness of the new clonal lineages compared to the previous ones. Moreover, the short-term study revealed complex scenario, involving the presence of two main clonal lineages (6_A1 and 13_A2) with opposite reproductive strategies: while 6_A1 isolates produced many, small sporangia, those of 13_A2 isolates are fewer but bigger. The coexistence within a single population of these strategies could result from the trade-off between the spore size and spore number, that we also demonstrated. Finally, differential responses between clones to temperature were observed, as well as clear local adaptation patterns among geographically distant populations. This work highlight that different adaptive factors can impact the same biological traits of *P. infestans* and that it is crucial to think about the consequences of these concomitant selective pressures in a context associating climate change and deployment of resistant potato varieties.

Keywords: trade-off, aggressiveness, survival, thermal adaptation, fitness, *Solanum tuberosum*, r- and K-strategies.



AGROCAMPUS OUEST • Institut supérieur des sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage

65 rue de Saint-Brieuc - CS84215 - F-35042 Rennes Cedex

Tél. : 02 23 48 50 00

www.agrocampus-ouest.fr

