Etude des populations de *Cronartium pini* sur les sites de Herm, Léon et Castets, forêt des Landes.

Renaud IOOS, Céline JEANDEL, Nathalie SCHENCK, Carole SAURAT, Vanessa BASTID, Gérald UHMANG, Jaime AGUAYO

ANSES Nancy-Malzéville, France

Augmentation marquée et récente de cas de rouille vésiculeuse dans les Landes

« Scots pine blister rust, resin top disease of pine »



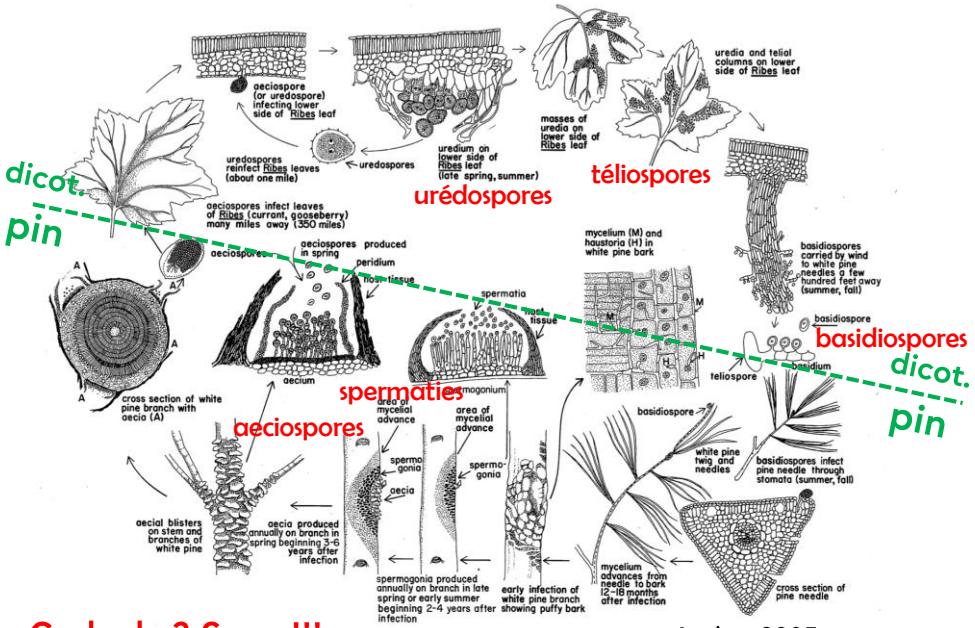
Chancre à écidies sur *P. pinaster* adulte



Mortalités dans les jeunes plantations de pins

Cronartium pini, et *C. ribicola*, basidiomycètes à cycle de vie complexe

Cycle biologique de *Cronartium ribicola*,
Autre agent de la rouille des pins (à 5 aiguilles)



Cycle de 3-6 ans !!!

Agrios, 2005

Champignons

- **Macrocycliques**
- **Héteroïques** (besoin d'hôte alternant)
  ou
  Autoïques (cycle raccourci sur pin seul)

Cronartium pini, agent de la rouille des pins à 2 aiguilles

Hôtes écidiens :
P. sylvestris
P. nigra,
P. pinaster
P. halepensis

Forme autoïque



Pinus pinaster

Forme hétéroïque

Hôtes téliens :
14 familles (Scrophulariaceae, Gentianaceae, Paeoniaceae, …)
30 genres
~ 90 espèces



Dompte-venin officinal
Vincetoxicum hirundinaria



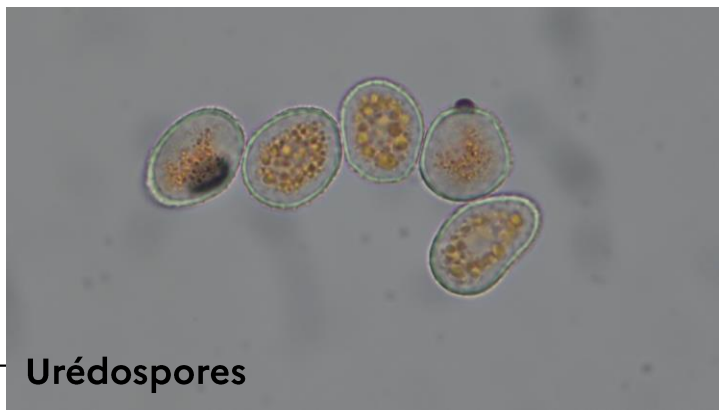
Pivoine herbacée
Paeonia lactiflora

Symptômes de *Cronartium pini* sur pivoines



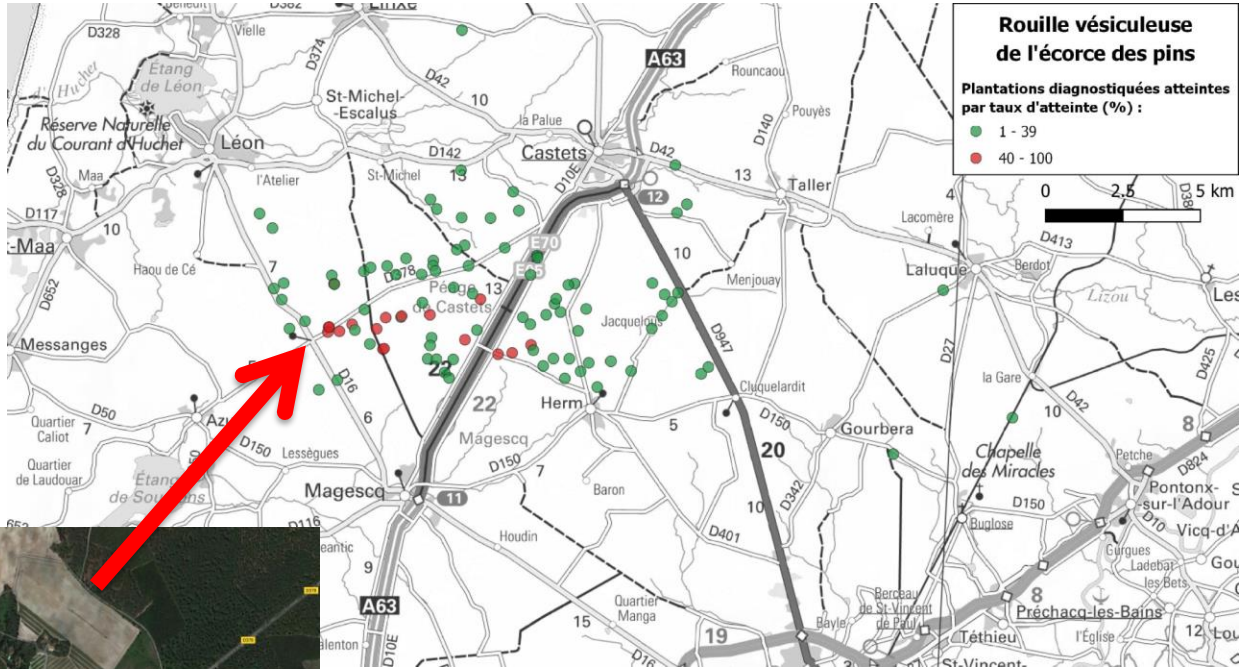






Photos P. Frey, INRAE

Cas de mortalité principalement observés depuis 2018 à proximité d'un champ de 20 hectares de pivoines

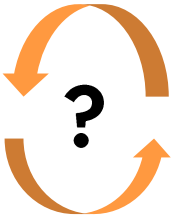




Enquête DSF Sud-Ouest 2021

Objectifs du projet



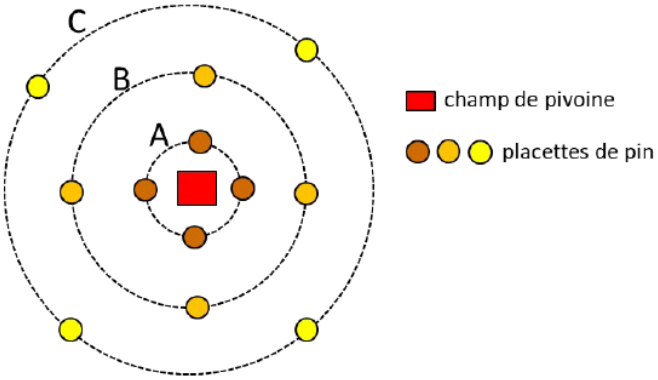




Forme autoïque ou forme héteroïque présente sur pins ?

Proximité génétique entre isolats sur pins et isolats sur pivoines ?

Le dispositif d'étude



Prélèvement de ±400 échantillons

- **320 écidies sur *P. pinaster**
- **75 urédies sur *Paeonia* ****

Les différents sites de prélèvement sur pin sont sélectionnés sur des arcs de cercles autour de la parcelle de pivoines :

-de 0 à 500 m de la parcelle
-puis tous les km, jusqu'à 22 km

***Prélèvement d'une écidie par arbre**
****Prélèvement d'une urédie par pivoine**

Etude de la diversité/proximité génétique

FUNGAL BIOLOGY 115 (2011) 1303–1311

ELSEVIER

bms British Mycological Society promoting fungal science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/funbio



New genetic markers for identifying *Cronartium flaccidum* and *Peridermium pini* and examining genetic variation within and between lesions of Scots pine blister rust in Sweden

Berit SAMILS[a,*], Katarina IHRMARK[a], Juha KAITERA[b], Jan STENLID[a], Pia BARKLUND[a]

[a]Department of Forest Mycology and Pathology, Box 7026, Swedish University of Agricultural Sciences, SE-75007 Uppsala, Sweden
[b]Finnish Forest Research Institute, Muhos Unit, Kirkkosaarentie 7, FI-91500 Muhos, Finland

Exploitation de marqueurs microsatellites de Samils *et al*., 2011

= répétitions de motifs nucléotidiques présents à haute fréquence dans le génome des eucaryotes, varient en longueur entre individus

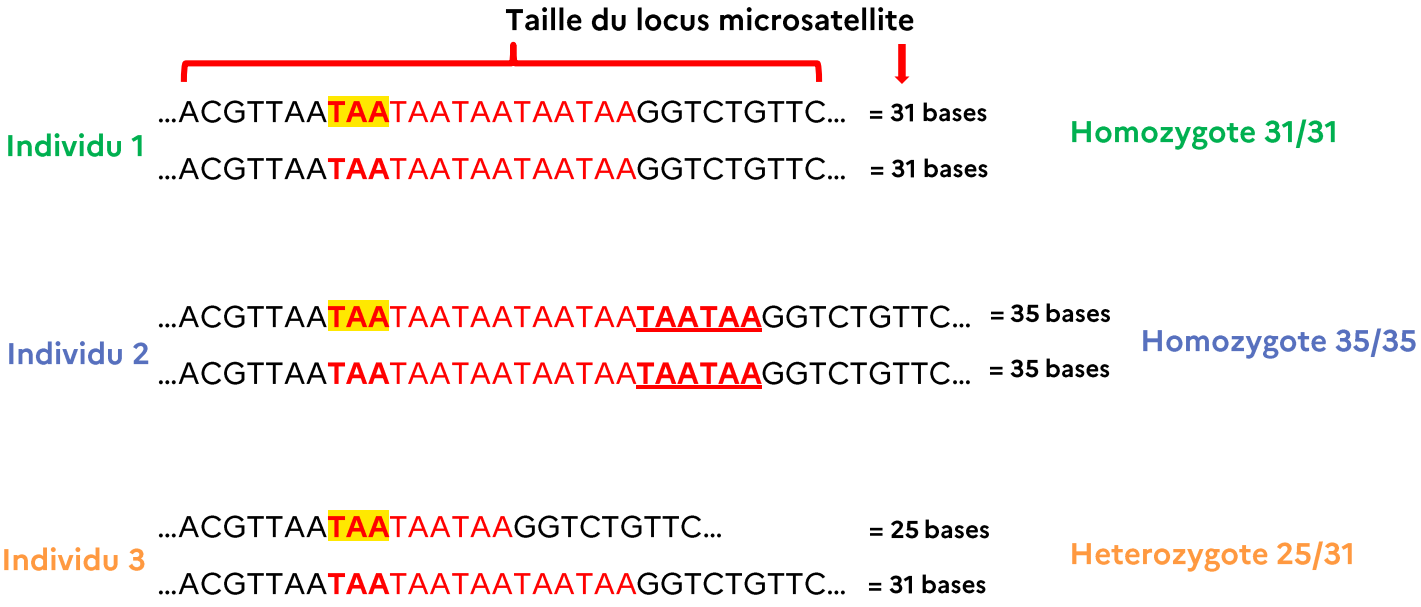
- Permettent d'évaluer la zygotie des individus : homozygote ou hétérozygote?
Intérêt :

- **La forme autoïque de *C. pini* est homozygote sur une majorité de loci (A/A)**
- **La forme hétéroïque de *C. pini* est hétérozygote sur une majorité de loci (A/B)**

- Permettent d'évaluer la diversité de populations d'individus et la proximité génétique entre ces derniers

Comment est « mesuré » un locus microsatellite?

Chaque individu (isolat) est diploïde, il possède deux allèles à chaque locus



Détermination d'un profil microsatellite

Taille du locus microsatellite TAA_n

Individu 1

…ACGTTAA**TAA**TAATAATAATAAGGTCTGTTC… = 31 bases

…ACGTTAA**TAA**TAATAATAATAAGGTCTGTTC… = 31 bases

Homozygote 31/31

Taille du locus microsatellite $GATC_n$

Individu 1

…TCCCCTG**GATC**GATCGATCGATCAAATCGTT… = 125 bases

…TCCCCTG**GATC**GATCGATCAAATCGTT… = 121 bases

Heterozygote 125/121

…

…

En mesurant les tailles des allèles pour X loci microsatellites, on obtient un profil de l'individu et on peut comparer des individus entre eux (principe utilisé pour les tests de paternité)

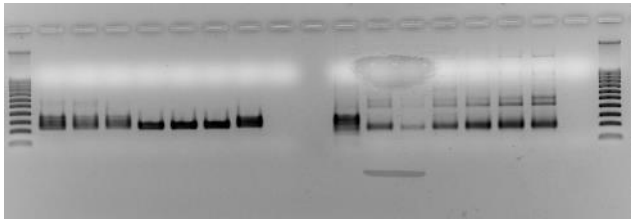
Etapes d'établissement des profils microsatellites

Table 2 – Microsatellite primer sequence, allele size range, and annealing temperature.

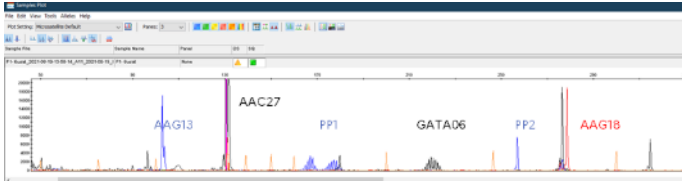
Locus	Primer sequence 5′–3′	Allele size range (bp)	Number of alleles	T_a (°C)
Pp1	F: ATTACCTCTCTTGATGACAA R[a]: GTACCAGGCCAAAGG	153–195	34	54
Pp2	F[a]: CTGGGTCAAGTCAAATCTCC R: GGACCAAATTCGATCATAGG	260–300	5	50
CqfSl_AAC27	F[b]: TGGTGAGATATAGATAAGCATCAAGC R[b]: ACAAAGGGAGGACACATTGG	134–137	2	53
CqfSl_AAC30	F[b]: ATTTTCGCACGAACAGAGC R[b]: ATGTAAGTACTGCCGGTGGC	341–515	28	53
CqfSl_AAG13	F[b]: AGCAGCACAAGCTGAGAATG R[b]: CGTTCTCATCCGAATCCATC	104–107	2	50
CqfSl_AAG18	F[b]: AGTTTTCTTGGGTGGTGGTG R[b]: ACCATCAGGTGGTCAAGGAG	276–282	3	62
CqfSl_GATA06	F[b]: ATCGAGAACGAGAGCGAGAG R[b]: AGAACAGATTGGCATGAGCC	213–233	10	47

a Kasanen *et al.* (2000).
b Burdine *et al.* (2007).

7 marqueurs microsatellites sont utilisés



Optimisation des conditions d'amplifications des marqueurs par PCR sur un panel restreint d'individus avec amorces non marquées.



Pour mesurer précisément les tailles des allèles -à la base près-, utilisation d'amorces marquées fluorescentes et électrophorèse capillaire pour mesure au génotypeur.

Préparation des échantillons

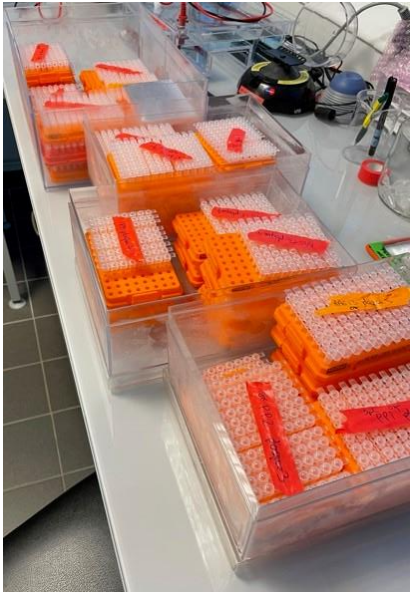
Extractions individuelles des ADN totaux / dosage / amplification par PCR des 7 loci microsatellites





Génotypage des échantillons

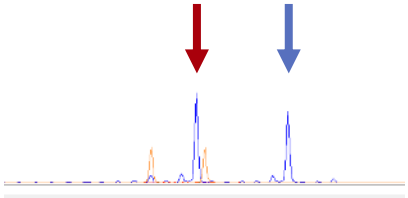
Les 7 loci microsatellites sont amplifiés et analysés au génotypeur





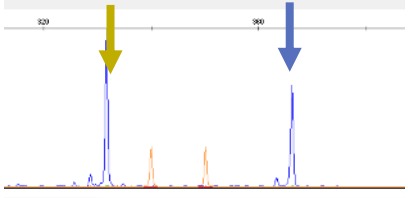
Profils hétéro-/homozygotes et polymorphismes au niveau d'un marqueur

Ecidie 1, marqueur TAA



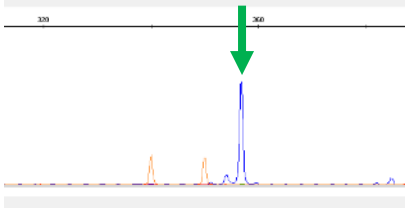
=> Héterozygote A/B

Ecidie 2, marqueur TAA



=> Héterozygote C/B

Ecidie 3, marqueur TAA



=> Homozygote D/D

Analyses multiplexées en masse

Génotypages des écidies / urédies et interprétation/conversion des pics en taille d'allèles



4	P82	B,45	P82- 6usat_2	102.85	AAG13
5		B,64	P82- 6usat_2	160.82	PP1
6		B,76	P82- 6usat_2	181.47	
7		B,85	P82- 6usat_2	256.97	PP2
8		B,86	P82- 6usat_2	266.48	
9		Y,75	P82- 6usat_2	130.61	AAC27
10		Y,100	P82- 6usat_2	219.7	GATA06
11		R,86	P82- 6usat_2	278.43	AAG18
12					
13		B,104	P82- AAC30_	356.82	AAC30
14		B,137	P82- AAC30_	451.36	
15					
16					
17	P42	B,39	P42- 6usat_2	102.91	AAG13
18		B,51	P42- 6usat_2	177.35	PP1
19		B,60	P42- 6usat_2	257.03	PP2
20		Y,61	P42- 6usat_2	130.61	AAC27
21		Y,80	P42- 6usat_2	219.77	GATA06
22		R,73	P42- 6usat_2	278.45	AAG18
23					
24		B,83	P42- AAC30_	360.0	AAC30
25		B,88	P42- AAC30_	374.26	
26					

Premiers résultats

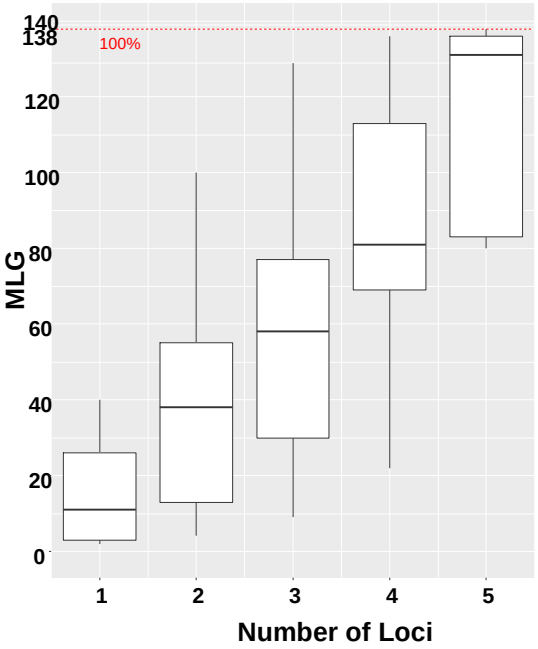
154 premiers prélèvements d'écidies sur pins,
48 premiers prélèvements d'urédies sur Pivoines.

Vérification des hypothèses :

- Les écidies sur pin sont elles majoritairement hétero- ou homozygotes? Si Hétérozygote alors présence de la forme hétéroïque alternante sur dicotylédones

- Les souches sur pivoines et sur pins correspondent à une population indistincte et certains génotypes sont partagés entre pins et pivoines

La courbe d'accumulation des génotypes



Un plateau de Multi Loci Genotypes (MLG, profil unique) est quasiment atteint avec 5 des 7 loci microsatellites.

Il est déjà quasiment possible de discriminer l'ensemble des individus échantillonnés avec 5 marqueurs

Niveaux de polymorphisme et d'hétérozygotie observés

locus	Nb alleles	1-D
CqfSI_AAG13	2	0,0049
Pp1	9	0,651
Pp2	5	0,4683
CqfSI_AAC30	22	0,6123
CqfSI_AAC27	3	0,0245
CqfSI_GATA06	5	0,0521
CqfSI_AAG18	1	
mean	**6,7143**	**0,259**

1-D = Simpson index
Cette mesure fournit une estimation de la probabilité que deux génotypes choisis au hasard soient différents.

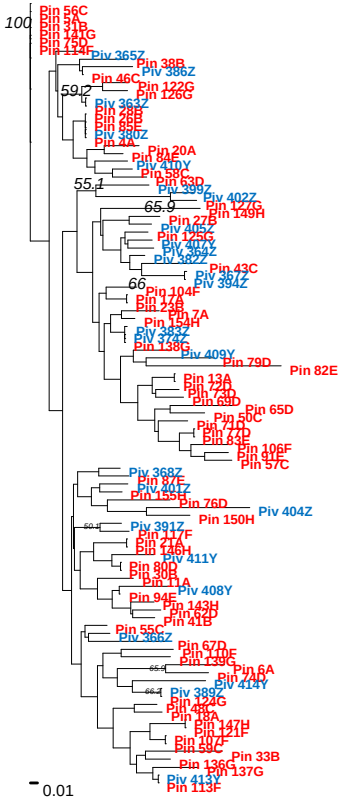
Elle s'échelonne :
de 0 (aucun génotype n'est différent)
à 1 (tous les génotypes sont différents).

Sur un sous-échantillonnage d'environ 200 individus / 400 prélevés, beaucoup de polymorphismes observés pour certains loci.

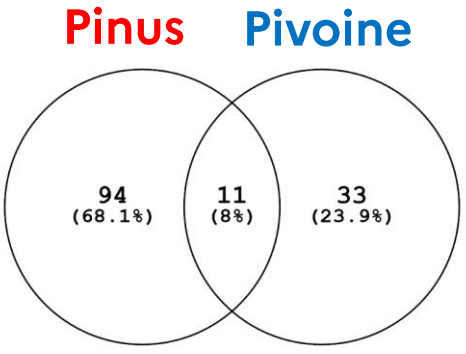
- **Sur pin 87% d'individus à profil hétérozygote**
- **Sur pivoine 95% d'individus à profil hétérozygote**

⇒ **La forme hétéroïque –alternante- semble très largement dominante**
⇒ **La forme autoïque semble exister mais ne semble pas être un problème majeur comme cela peut être le cas dans certains endroits en Scandinavie**

Distance génétique entre individus par plante hôte



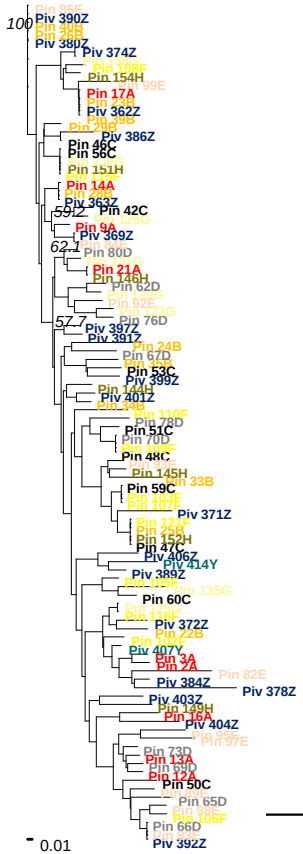
Dendrogramme basé sur la distance de Provesti. entre 100 échantillons tirés au hasard



Pinus
N:154; MLG: 105
Pivoine
N:48; MLG: 44

- Pas de structuration génétique selon la plante hôte et existence de MLG communs entre pivoines et pins
- Beaucoup de génotypes uniques, cohérent avec l'existence de reproduction sexuée, donc avec hôte alternant.

Distance génétique entre individus / géographie



Dendrogramme basé sur la distance de Provesti
Entre 100 échantillons tirés au hasard

Chaque couleur correspond à une sous-population

Pinus sp.	Distance à parcelle pivoines Landes
Subpop A >	0,0 – 0,5 km
Subpop B >	0,5 – 1,0 km
Subpop C >	1,0 – 2,0 km
Subpop D >	2,0 – 3,0 km
Subpop E >	3,0 – 4,0 km
Subpop F >	4,0 – 5,0 km
Subpop G >	5,0 – 6,0 km
Subpop H >	22 km

Paeonia sp.	
Subpop Y>	parcelle Campagne (40)
Subpop Z>	parcelle Léon (40)

=>Pas de structuration génétique évidente en fonction de la distance à la parcelle de pivoines

Premières interprétations / conclusions

- Les écidies sur pin sont très majoritairement **hétérozygotes**, témoignant d'une **reproduction sexuée sur un ou plusieurs hôtes alternants**

- Les souches sur pivoines et sur pins font partie d'**une même population indistincte** et **certains génotypes sont partagés** entre pins et pivoines : on peut raisonnablement supposer que certaines des souches sur pins alternent sur pivoines

- La **dynamique et intensité de la maladie sur pin sont cohérentes avec l'introduction d'un hôte alternant important**, qui renforce la quantité d'inoculum disponible pour réinfecter les pins.