

CHANTAL GARAND

**CARACTÉRISATION GÉNÉTIQUE DES RÉGIONS ITS DES
PHYTOPHTHORA SPP. QUI CAUSENT LE POURRIDÉ DES RACINES
DU FRAMBOISIER AU QUÉBEC**

Mémoire
présenté
à la Faculté des études supérieures
de l'Université Laval
pour l'obtention
du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

Département de phytologie
FACULTÉ DES SCIENCES DE L'AGRICULTURE
ET DE L'ALIMENTATION
UNIVERSITÉ LAVAL

OCTOBRE 1996

© Chantal Garand, 1996



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-25311-2

Canada

RÉSUMÉ

Plusieurs espèces de *Phytophthora* ont été isolées des racines du framboisier. *Phytophthora fragariae* var. *rubi* est l'espèce la plus virulente. Elle est morphologiquement semblable à l'espèce *Phytophthora fragariae* var. *fragariae*, pathogène du fraisier. Ces deux variétés se distinguent par leur pouvoir pathogène spécifique. Les séquences de la région ITS I (233 pb) et de la région ITS II (439 pb) de l'ADNr de tous les isolats analysés des deux variétés du *P. fragariae* sont identiques à l'exception d'un site dans la région ITS I. Ce site montre une délétion ou insertion d'une adénine dans une zone répétitive d'adénines commune aux genres *Phytophthora* et *Pythium*. Les profils RFLP de la région ITS I amplifiée par PCR distinguent *P. fragariae* des autres espèces de *Phytophthora* et de *Pythium*. Ce test PCR-RFLP identifie rapidement et objectivement les espèces de *Phytophthora* pathogènes du framboisier.

Directeur de recherche
Pierre-Mathieu Charest

Étudiante
Chantal Garand

RÉSUMÉ LONG

Plusieurs espèces de *Phytophthora* ont été isolées des racines du framboisier. *Phytophthora fragariae* var. *rubi* est l'espèce la plus virulente. Elle est morphologiquement semblable à l'espèce *Phytophthora fragariae* var. *fragariae*, pathogène du fraisier. Ces deux variétés se distinguent par leur pouvoir pathogène spécifique à l'hôte infesté. Les nombreuses variétés de framboisier démontrent un niveau de sensibilité variable envers les espèces de *Phytophthora* pathogènes. L'utilisation de variétés résistantes de framboisier est un moyen de lutte très efficace contre la majorité des agents causals du pourridié des racines. Il est donc important d'identifier rapidement les espèces de *Phytophthora* présentes dans le sol. Les critères morphologiques utilisés pour la classification taxonomique sont nombreux, complexes et parfois imprécis ce qui rend le processus d'identification laborieux et subjectif.

La variabilité des séquences des régions ITS des gènes ribosomiques des espèces de *Phytophthora* pathogènes a été évaluée pour réaliser un test diagnostique rapide et objectif. Les régions ITS I (233 pb) et ITS II (439 pb) de plusieurs isolats provenant des deux variétés de l'espèce *P. fragariae* ont été séquencées et comparées aux séquences des régions ITS des autres espèces de *Phytophthora* pathogènes. La séquence des deux régions ITS de la variété *rubi* est identique à celle des ITS de la variété *fragariae* à l'exception d'un site dans la région ITS I. Ce site présent chez des isolats des deux variétés montre la délétion ou l'insertion d'une adénine dans une zone répétitive d'adénines (de 5 à 6) commune aux genres *Phytophthora* et *Pythium*. L'analyse de la séquence de l'ITS I du *P. fragariae* révèle des motifs de séquences conservés chez les autres espèces de *Phytophthora*. Des profils RFLP de la région ITS I amplifiée par PCR ont été produits pour chacun des 6 enzymes suivants: *Alu* I, *Ban* II, *Hae* III, *Mbo* I, *Rsa* I, *Taq* I. Ces profils RFLP distinguent *P. fragariae* des autres espèces de *Phytophthora* et de *Pythium*. Ce test PCR-RFLP permet l'identification rapide et objective des espèces de *Phytophthora* pathogènes au framboisier

À Réjean, Fleurette
et Sophie

AVANT-PROPOS

Les travaux de recherche de ce mémoire s'intègrent à un programme de recherche entrepris en 1994 visant l'identification et la détection génétique des *Phytophthora* qui causent le pourridié des racines du framboisier et la stèle rouge du fraisier. Ce programme de recherche est financé par l'Entente Canada-Québec pour un environnement durable en agriculture. Le volet de la caractérisation des régions ITS des gènes ribosomiques nucléaires et le volet de la production d'un test diagnostique pour l'identification génétique des *Phytophthora* pathogènes aux fraisiers et aux framboisiers constituent par les travaux de ce projet de recherche.

Ce projet de maîtrise a été une étape de ma vie où j'ai acquis plusieurs connaissances reliées à la phytoprotection, mais surtout, cette étape a été un grand apprentissage des règles de jeu régissant le milieu de la recherche. Je dois cet apprentissage à de nombreuses personnes.

Je remercie, le **Dr. Pierre-Mathieu Charest**, mon directeur ainsi que le **Dr. Richard Hogue**, mon co-directeur de m'avoir donné la chance de relever un défi de cette taille. Je les remercie aussi pour leur support financier, leur encadrement, leur disponibilité et leurs nombreux conseils et critiques constructives.

Je remercie le **Dr. Serge Laberge** d'Agriculture Canada et son équipe, spécialement **Lucien Pelletier** (technicien) et **Jimmy Rail**, étudiant à la maîtrise pour m'avoir enseigné les techniques de séquençage par PCR, leur grande patience, mais surtout leur joie de vivre.

Je ne peux passer sous silence les techniciens du Dr. Hogue, soit **Sophie Roy**, **Donald Dubé** et **Christian Bolduc** pour leur patience, leur aide et leur amitié. Merci énormément. Je remercie aussi **Danièle Pagé** et le **Dr. Jean-Guy Parent** du MAPAQ pour leur amitié et leur nombreux conseils.

Je remercie tout particulièrement l'équipe du laboratoire de diagnostic en

phytoprotection du MAPAQ, Ste-Foy. Ils étaient toujours disponibles pour répondre à mes nombreuses questions, et leurs conseils ont toujours été forts précieux.

Je remercie toutes les personnes, professionnels, techniciens et étudiants (surtout, du laboratoire 1242 et 1252) que j'ai cotoyée au MAPAQ et au pavillon Marchand pour votre gentillesse, votre support et vos conseils.

Je remercie chaleureusement les étudiants d'été du laboratoire du Dr. Hogue, en particulier **Patrick Dussault** qui a récolté avec une patience d'ange les mycéliums de *Phytophthora* et **Eva Berka** pour la mise au point du système MC1-MC4.

Je termine en remerciant des personnes très chères à mon cœur de ma famille. Mon père **Réjean**, ma mère **Fleurrette** et ma soeurette **Sophie** de m'avoir permis de réaliser mes rêves, de m'avoir encouragé dans les moments difficiles et d'avoir partagé mes moments de bonheur. C'est à eux que je dois mon courage et ma détermination.

Merci de tout coeur ♥

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	ii
RÉSUMÉ LONG	iii
AVANT-PROPOS.....	v
TABLE DES MATIÈRES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES FIGURES.....	xii
LISTE DES ANNEXES.....	xiv
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xv
CHAPITRE 1 REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	1
1.1- Le pourridié des racines.....	1
1.1.1- Le framboisier, une importance économique	1
1.1.2- Description de la maladie causé par les <i>Phytophthora</i> pathogènes.....	2
1.1.2.1- Les symptômes observés aux champs et au niveau racinaire.....	2
1.1.2.2- Cycle de la maladie.....	3
1.1.2.3- Les facteurs épidémiologiques.....	5
1.2- Qu'est-ce qu'un <i>Phytophthora</i> (situation taxonomique) ?.....	6
1.2.1- Le règne	6
1.2.2- L'ordre des Péronosporales.....	8
1.2.3- Le genre <i>Phytophthora</i>	9
1.3- Les agents qui causent le pourridié des racines du framboisier.....	13
1.3.1- Les espèces de <i>Phytophthora</i> pathogènes au framboisier.....	13
1.3.2- <i>Phytophthora fragariae</i> var. <i>rubi</i> , l'espèce la plus virulente.....	18
1.3.2.1- Historique de la dénomination de <i>P. fragariae</i> var. <i>rubi</i>	18

1.3.2.2-	La stèle rouge du fraisier.....	21
1.3.2.3-	Identification des races de <i>P. fragariae</i> var. <i>fragariae</i>	21
1.3.2.4-	Identification des races de <i>P. fragariae</i> var. <i>rubi</i>	24
1.4-	La détection des pathogènes de plantes.....	25
1.4.1-	Les moyens de détection des <i>Phytophthora</i> , spécialement chez les <i>P. fragariae</i>	25
1.4.2-	Les régions d'ADN ciblées pour la PCR chez les champignons.....	30
1.4.2.1-	Les régions d'ADN codant pour des protéines.....	30
1.4.2.2-	L'ADN mitochondrial.....	31
1.4.2.3-	L'ADN ribosomal nucléaire.....	32
1.5-	Hypothèse et objectifs.....	35
 CHAPITRE 2 MATÉRIEL ET MÉTHODES.....		 37
2.1-	Conservation et culture des isolats.....	37
2.1.1-	Le matériel fongique utilisé.....	37
2.1.2-	Conservation des isolats.....	37
2.1.3-	Culture des isolats pour l'extraction de l'ADN.....	40
2.2-	Isolement de l'ADN.....	40
2.2.1-	Extraction de l'ADN génomique.....	40
2.2.2-	Évaluation de la quantité et de la qualité de l'ADN.....	41
2.3-	Système d'amplification.....	42
2.3.1-	Produits et protocoles utilisés pour les systèmes PCR.....	42
2.3.2-	Système PS1-PS2.....	43
2.3.3-	Autres systèmes d'amorces.....	43
2.4-	Séquençage par PCR.....	44
2.4.1-	L'obtention des produits PCR ITS1F-ITS4.....	44
2.4.2-	Purification des produits PCR ITS1F-ITS4.....	48
2.4.3-	Méthodologie de séquençage.....	49
2.4.3.1-	Stratégie de séquençage et sélection des oligonucléotides.....	49
2.4.3.2-	Réaction de séquençage.....	51
2.4.3.3-	Gel de séquençage.....	52
2.4.3.4-	L'analyse des séquences.....	53

2.4.3.5- Séquences de <i>Phytophthora</i> spp. et <i>Pythium</i> spp. utilisées dans les analyses	53
2.4.3.6- Résolution d'ambiguïtés	53
2.5- Test PCR-RFLP	55
2.5.1- Profils PCR-RFLP théoriques et cartes RFLP.....	55
2.5.2- Profils PCR-RFLP expérimentaux	55
2.5.2.1- Amplification PCR de la région ITS I.....	56
2.5.2.2- Digestion des produits PCR MC1-MC4.....	56
2.5.2.3- Séparation des fragments RFLP sur gel de MetaPhor 4%	57
 CHAPITRE 3 RÉSULTATS.....	 59
3.1 Distinction de <i>Phytophthora fragariae</i> var. <i>rubi</i> et <i>Phytophthora</i> <i>fragariae</i> var. <i>fragariae</i>	59
3.1.1- Séquence de la région ITS I.....	59
3.1.2- Séquence de la région ITS II.....	65
3.1.3- Comparaison des régions ITS I et ITS II	67
3.2- Système MC1-MC4, test PCR-RFLP	69
3.3- Autres systèmes d'amorces	79
3.3.1- Le système PS1-PS2	79
3.3.2- Les systèmes combinés des amorces PS et Phyto	80
 CHAPITRE 4 DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	 85
 BIBLIOGRAPHIE	 92
 ANNEXE A	 109
ANNEXE B	112
ANNEXE C.....	114
ANNEXE D.....	116
ANNEXE E	118

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 1	page
Tableau 1.1: Taxonomie du genre <i>Phytophthora</i>	7
Tableau 1.2: Sommaire des diverses classifications.....	10
Tableau 1.3: Pouvoir pathogène des <i>Phytophthora</i> spp. isolés de framboisiers atteints du pourridié des racines ou de sols des cultures.....	15
Tableau 1.4: Sommaire des caractéristiques morphologiques des <i>Phytophthora</i> spp. isolés du framboisier.....	16
Tableau 1.5: Température cardinale de croissance mycélienne des <i>Phytophthora</i> spp. en milieux de culture.....	17
Tableau 1.6: Pouvoir pathogène des sept races pathogéniques de <i>P. fragariae</i> var. <i>fragariae</i> sur sept génotypes de fraisier.....	23
Tableau 1.7: Équivalence des races britanniques et américaines de <i>P. fragariae</i> var. <i>fragariae</i> selon le groupe de cultivars différentiels utilisé.....	23
Tableau 1.8: Pouvoir pathogène de trois races de <i>P. fragariae</i> var. <i>rubi</i> sur six génotypes de framboisier.....	24
CHAPITRE 2	
Tableau 2.1: Répertoire de l'identité et de la provenance des champignons utilisés.....	38
Tableau 2.2: Liste des amorces utilisées et leurs caractéristiques.....	46

Tableau 2.3: Programme type d'amplification PCR utilisé dans cette étude.....	47
Tableau 2.4: La température d'hybridation et le type de programme utilisés pour les divers systèmes d'amplification des gènes d'ADNr.....	47
Tableau 2.5: Identification des séquences disponibles de <i>Phytophthora</i> spp. et <i>Pythium</i> spp.....	54
Tableau 2.6: Liste des tampons recommandés et des sites de restriction.....	58

CHAPITRE 3

Tableau 3.1: Comparaison chez les <i>Phytophthora</i> spp. des longueurs des régions ITS, leur pourcentage G + C et leur pourcentage de variabilité intraspécifique.....	68
Tableau 3.2: Longueurs des fragments de digestion enzymatique des produits PCR MC1-MC4.....	77
Tableau 3.3: Système d'amplification PS1-PS2 selon différentes températures d'hybridation des amorces.....	81

ANNEXE E

Tableau E.1: Indice de pourridié causé par différentes souches de <i>Phytophthora</i> isolées du framboisier et provenant du Québec, de l'Allemagne et des États-Unis.....	120
--	-----

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1

- Figure 1.1: Cycle de la pathogénèse de *P. fragariae* var. *rubi*..... 4
- Figure 1.2: Schéma phylogénétique des six groupes de *Phytophthora* selon Waterhouse (1963) basé sur les caractères primitifs et avancés..... 11
- Figure 1.3: Schéma représentant la structure des gènes d'ADNr..... 34

CHAPITRE 2

- Figure 2.1: Schéma de la localisation des amorces universelles et spécifiques au niveau des gènes codant pour les ARNr..... 45

CHAPITRE 3

- Figure 3.1: Séquence consensus de 233 pb des deux variétés de *Phytophthora fragariae* pour la région ITS1..... 62
- Figure 3.2: Alignement de séquences des 50 premières bases au bout 5' de la région ITS1 de 8 isolats de *P. fragariae*.....62
- Figure 3.3: Alignement de séquences des 25 premières bases au bout 5' de la région ITS1 de 11 espèces de *Phytophthora* et de 3 espèces de *Pythium*..... 63
- Figure 3.4: Alignement de séquences de la région ITS1 de 10 espèces de *Phytophthora*..... 64

Figure 3.5: Séquence consensus de 439 pb des deux variétés de <i>P. fragariae</i> pour la région ITSII.....	66
Figure 3.6: Alignement de séquences de la région ITSII de 6 espèces de <i>Phytophthora</i>	66
Figure 3.8: Cartes des sites de restriction enzymatique de la région ITS1 déduites des séquences respectives des <i>Phytophthora</i> spp. et des <i>Pythium</i> spp.	72
Figure 3.9: Comparaison des profils PCR-RFLP de 4 isolats de <i>P. fragariae</i>	74
Figure 3.10: Comparaison des profils PCR-RFLP de <i>P. fragariae</i> à d'autres <i>Phytophthora</i> spp. et au genre <i>Pythium</i>	75
Figure 3.11: Diagrammes des profils de digestion enzymatique des produits PCR MC1-MC4 de la région ITS1.....	76
Figure 3.12: Amplification PCR du système d'amorces PS1-PS2.....	82
Figure 3.13: Amplification PCR du système d'amorces PS1-ITS3.....	82
Figure 3.14: Amplification PCR du système d'amorces Phyto2-ITS4.....	83
Figure 3.15: Amplification PCR du système d'amorces PS2-NS2.....	83
Figure 3.16 : Amplification PCR du système d'amorces Phyto1-PS2.....	84

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE A: Milieu de culture et extraction.....	109
A- Milieux de culture à base d'agar.....	109
B- Milieux de culture à base de Gel-Gro.....	110
C- Solubilisation des milieux à base de Gel-Gro GCV8 et GPD.....	110
D- Extraiton d'ADN.....	111
ANNEXE B: Solutions nécessaires aux électrophorèses.....	112
ANNEXE C: Séquence de la région ITS I des isolats de <i>P. fragariae</i>	114
ANNEXE D: Séquence de la région ITS II des isolats de <i>P. fragariae</i>	116
ANNEXE E: Caractérisation pathologique des souches de <i>Phytophthora</i>	118
A- Méthodologie: le test du pouvoir pathogène.....	118
B- Résultats.....	119

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A	ampère ou adénine selon le contexte
ACV8	milieu d'agar et de jus V8 clarifié
ADN (DNA)	acide désoxyribonucléique
ADNmt	acide désoxyribonucléique mitochondrial
ADNr	acide désoxyribonucléique ribosomal
ARNr	acide ribonucléique ribosomal
ATP	adénosine triphosphate
ATPase	ATP synthétase
BHR	large éventail d'hôte (broad host range)
C	cytosine ou concentration de l'oligonucléotide (selon le contexte)
°C	degré Celcius
Cal.	calorie
CHEF	Champ électrique homogène appliqué sur les contours du gel (contour-clamped homogenous electric field)
Ci	curie
cm	centimètre
dNTP	désoxyribonucléoside (A, C, G, T) triphosphate
ddNTP	didésoxyribonucléoside (A, C, G, T) triphosphate
DSI	Index de sévérité de la maladie (Disease-severity index)
EDTA	éthylène diaminotétraacétique
ELISA	Essai réalisé avec un enzyme lié à un anticorps (Enzyme-linked immunosorbent assay)
ERIC	Séquence consensus intergénique répétitive d'origine entérobactère (enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences)
fmol	femtomole (10^{-15})
g	gramme
x g	force gravitationnelle
G	guanine
GCV8	milieu à base de Gel-Gro et de jus de V8 clarifié
GPD	milieu à base de Gel-Gro et de dextrose de pomme de terre
HPLC	chromatographie liquide à haute pression (performance)
HPRs	isolats hautement pathogènes du framboisier (highly pathogenic to

	raspberry)
IGS	espaceur non transcrit des gènes d'ADNr (Intergenic spacer)
ITS	espaceur interne transcrit des gènes d'ADNr (Internal Transcribed Spacer)
Kb	kilobase
L	lître ou longueur de l'oligonucléotide en nombre de bases (selon le contexte)
GSU	grande sous-unité
m	mètre
M	molaire (concentration en mole/Litre)
mers	nombre de bases nucléotidiques formant un oligonucléotide.
mM	millimolaire
MCV8	milieu modifié d'agar et de jus de V8 clarifié
MEA	milieu d'agar et d'extrait de malt
mg	milligramme
min	minute
mL	millilitre
mm	millimètre
mmol	millimole
NAD ⁺	forme oxidée de nicotinamide adénine dinucléotide
ng	nanogramme
nm	nanomètre
P ₅ AR	milieu de farine de maïs (corn meal agar, CMA) et d'antibiotiques pimaricin, ampicilline et rifampicine
pb	paire de bases
PCR	amplification <i>in vitro</i> de l'ADN (polymerase chain reaction)
PDA	milieu à base d'agar et de dextrose de pomme de terre
P _f	pourcentage de formamide
<i>Pfu</i>	ADN polymérase de <i>Pyrococcus furiosus</i>
P _{gc}	pourcentage des bases G + C (doit se situer entre 30 et 70)
P _m	pourcentage des bases non appariées
PM	poids moléculaire
pmol	picomole (10 ⁻¹²)
PSU	petite sous-unité
R	constante des gaz (1.978 cal/°C x mol)
RAPD	polymorphisme d'ADN obtenu par amplification au hasard

	(random amplified polymorphisms DNA)
REP	éléments palindromiques extragéniques répétitifs (repetitive extragenic palindromic elements)
RFLP	polymorphisme de la longueur des fragments de restriction (restriction fragment length polymorphisms)
S	unité Svedberg (coefficient de sédimentation)
SDS	sodium dodécyl sulfate
sec	seconde
syn	synonyme
t	constante de correction d'hybridation
T	thymine
TAE	tampon Tris-EDTA, acide acétique
TBE	tampon Tris-EDTA, acide borique
TEMED	N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine
T _d	température de dissociation des duplexes d'ADN
T _m	température où 50% des oligonucléotides sont dissociés de l'ADN
Tris	2-amino-2-(hydroxyméthyl)-1-3-propanediol
U	quantité d'enzyme (mole de substrats transformés/unité de temps en min)
μg	microgramme
μL	microLitre
μm	micromètre
μM	micromolaire
UV	ultraviolet.
V	volt
VNTR	nombre variable d'un loci répété en tandem (variable number tandem repeat loci)
ΔH	enthalpie
ΔS	entropie

CHAPITRE 1

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1- Le pourridié des racines

1.1.1- Le framboisier, une importance économique

Le genre *Rubus* comprend 12 sous-genres dont 2 seulement présentent une importance commerciale. Il s'agit du sous-genre *Eubatus*, ou mûres, et du sous-genre *Idaeobatus* qui inclut le framboisier (Baudry *et al.*, 1993). En 1991, la framboise représentait au Québec 13% du marché des petits fruits d'une valeur à la ferme de 40 millions de dollars (Anonyme, 1994). Les framboisiers regroupent environ 200 espèces. Celle qui nous intéresse, *Rubus idaeus sub. vulgatus*, possède des fruits rouges. Ces plantes ont un système racinaire pérenne et des tiges à croissance déterminée bisannuelle. Certaines variétés, dites remontantes, fructifient à l'extrémité des primocannes ou cannes de l'année puis à partir des ramules la seconde année. Les variétés, dites non-remontantes ne fructifient que la seconde année, les cannes sont alors appelées floricanes (Baudry *et al.*, 1993).

Le framboisier possède un système racinaire lignifié et superficiel à partir duquel se différencie un réseau radicellaire assimilateur et, par endroits, des drageons. Un petit nombre de champignons et de bactéries phytopathogènes affectent gravement les organes souterrains (racines et collet). Par ordre de gravité croissante, citons: *Verticillium dahliae*, *Armillaria mellea*, *Agrobacterium radiobacter var. tumefaciens* (et *A. radiobacter var. rubi*) et plusieurs espèces de *Phytophthora*. Les dégâts provoqués par *Phytophthora fragariae var. rubi* sont de loin les plus importants au

niveau de la production commerciale de par le monde (Baudry *et al.*, 1993). L'analyse de la répartition des cas de pourridié des racines du framboisier, causé par des *Phytophthora* pathogènes, révèle que plusieurs régions du Québec sont affectées, les principales étant Chaudière-Appalache, Montérégie, l'Estrie, Québec et Lanaudière (Laboratoire de diagnostic en phytoprotection du MAPAQ, 1994-96).

1.1.2- Description de la maladie causée par les *Phytophthora* pathogènes

Plusieurs espèces de *Phytophthora* peuvent causer le pourridié des racines du framboisier plus ou moins sévèrement. Les espèces rencontrées seront décrites plus loin à la section 1.3.1. Les symptômes observés ainsi que le cycle de la maladie (initiation et développement) peuvent être grandement influencés par le type de cultivars de framboisier rencontré, les facteurs environnementaux abiotiques et biotiques ainsi que par l'interaction entre les espèces de *Phytophthora* présentes et les caractéristiques intrinsèques à chacune d'elles (Ellis *et al.*, 1991). La description des symptômes et du cycle de la maladie présentée dans cette étude seront généralisés à *P. fragariae* var. *rubi*. Cette espèce est la plus virulente sous notre latitude (Wilcox, 1989; Wilcox *et al.*, 1993). De plus, les interactions entre les *Phytophthora* spp. et la description du schéma pathologique ne sont pas encore tout à fait connues.

1.1.2.1- Les symptômes observés aux champs et au niveau racinaire

L'année de la plantation, le dépérissement des jeunes framboisiers se traduit par une mauvaise reprise dans les trois mois qui suivent la transplantation. Les plants ne se développent pas (absence de débourrage) ou forment une pousse qui se dessèche dès les premières chaleurs. La formation de nouvelles racines est très réduite voire inexistante (Nourrisseau et Baudry, 1987; Bolay et Lauber, 1989b, 1989c).

Les années subséquentes ou dans les cultures déjà en place, au démarrage de la végétation, les mêmes manifestations que celles décrites précédemment peuvent se manifester. Les premiers symptômes apparaissent surtout au stade fruit vert (Aber, 1993). Les cannes juvéniles sont réduites et parfois flétrissent brusquement.

Dans d'autres cas, après un démarrage normal de la végétation, les symptômes suivants apparaissent à la fin du printemps ou en été: une croissance réduite des tiges, un port de petits fruits par les cannes fructifères, le jaunissement puis le dessèchement du feuillage (du bas vers le haut) qui reste accroché à la tige, la courbure de la tige en forme de crosse, et finalement, la mort des tiges dont la base (au-dessus du collet) présente souvent une coloration beige foncée sur une longueur de quelques centimètres (10 à 30 cm). Dans leur ensemble, les plantes infectées paraissent flétries et asphyxiées. À l'arrachage, le système racinaire s'avère réduit avec une région corticale de la racine de couleur brune et une région cambiale noirâtre avec peu ou pas de drageons. En cours de saison, ces foyers primaires s'étendent rapidement (de quelques 10 à 20 m) le long des rangs. Cette progression est plus lente d'un rang à l'autre. De ce fait, les foyers ont une forme ovale à elliptique, avec des plantes mortes au centre et des framboisiers à tous les stades de dépérissement à la périphérie, la longueur et la vigueur des drageons augmentant au fur et à mesure qu'on se rapproche des zones saines. À la fin de la deuxième année, les dégâts ont pris une telle importance, que la culture ne peut plus être maintenue et doit être arrachée (Nourrisseau et Baudry, 1987; Bolay et Lauber, 1989b, 1989c).

1.1.2.2- Cycle de la maladie

L'agent pathogène se maintient dans le sol sous forme d'oospores en dormance. Ces oospores sont localisées dans des débris racinaires en décomposition ou dans les sols (voir figure 1.1). La structure de ces oospores permet aux *Phytophthora* pathogènes de résister à des conditions environnementales défavorables pendant au moins cinq ans, probablement plus longtemps (Nourrisseau et Baudry, 1987; Bolay et Lauber, 1989b, 1989c). La germination des oospores conduit à la formation des sporocystes qui produisent des spores motiles (zoospores) (Aber, 1993). Ces zoospores sont ensuite relâchées des sporocystes et ils se déplacent dans l'eau sur de courtes distances dans le sol, selon un géotactisme négatif (déplacement des zoospores dans le sens contraire de la gravité, vers le haut) (Cameron et Carlile, 1977). Les zoospores sont attirées par les exsudats racinaires (acides aminés, sucres, composés phénoliques) des framboisiers selon un chimiotactisme positif (Deacon et Donaldson, 1993; Irwin *et al.*, 1995). Par la suite, les zoospores s'enkystent, se fixent aux racines, germent et les pénètrent, causant

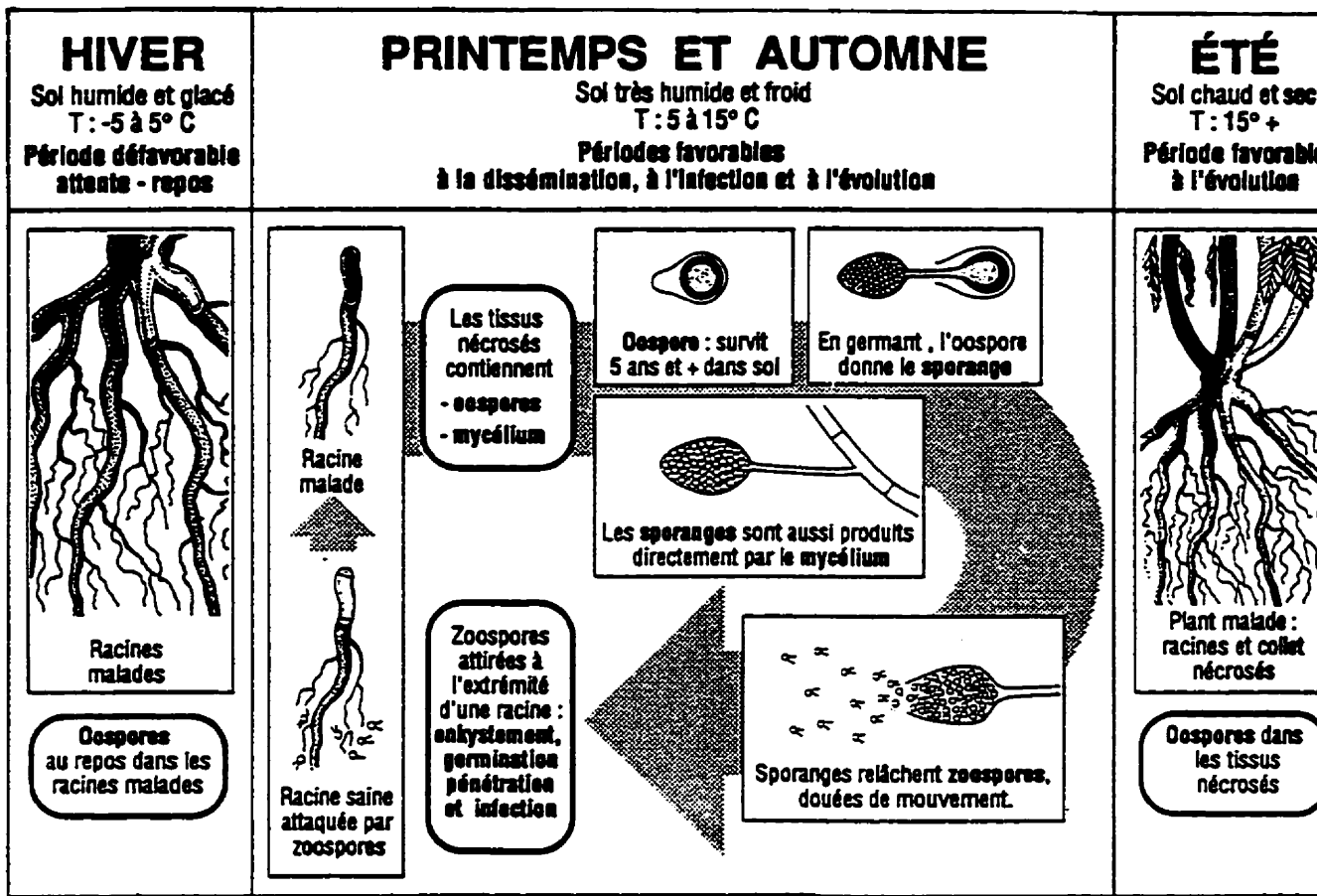


Figure 1.1: Cycle de la pathogénèse de *P. fragariae* var. *rubi*
La figure est tirée de Aber, 1993.

ainsi de nouveaux sites d'infections (Aber, 1993; Deacon et Donaldson, 1993; Irwin *et al.*, 1995). Les tissus de la zone médulaire de la racine sont envahis par le mycélium (Aber, 1993). La production des sporocystes favorisera la libération de nombreuses zoospores lors des infestations secondaires qui se produisent à l'été et à l'automne. La gamétogénèse conduit à la formation des oospores qui assurent la survie hivernale de l'agent pathogène (Zentmyer, 1983).

1.1.2.3- Les facteurs épidémiologiques

Le potentiel génétique intrinsèque à chacune des espèces de *Phytophthora* pathogènes du framboisier détermine, entre autres, la structure, le nombre et la physiologie des diverses formes de propagules fongiques impliquées dans le cycle de la maladie (Zentmyer, 1983). Ce potentiel génétique détermine également les facteurs de virulence des espèces de *Phytophthora* (Kennedy et Duncan, 1993a, 1993b).

Les variétés de framboisiers rouges sont plus sensibles à l'infection des *Phytophthora* pathogènes que les variétés de framboisiers noires (Nourrisseau et Baudry, 1987; Ellis *et al.*, 1991). La sensibilité des variétés de framboisiers rouges est également variable en fonction des espèces de *Phytophthora* pathogènes (Duncan *et al.*, 1987; Wilcox *et al.*, 1993; Kennedy et Duncan 1993a). De plus, les variétés américaines de framboisier sont plus résistantes que les européennes (Duncan *et al.*, 1987; Bolay et Lauder, 1989c; Ellis *et al.*, 1991).

La propagation des *Phytophthora* pathogènes est favorisée par un excès d'eau dans les sols. La maladie apparaît d'abord et avec une plus grande intensité, dans les mouillères établies dans les cuvettes mal drainées et à la base des parcelles en pente (Nourrisseau et Baudry, 1987; Bolay et Lauber, 1989b, 1989c). L'homme joue un rôle important dans leur propagation. Il transporte des débris de framboisiers contaminés ou de la terre contenant des oospores, avec ses chaussures ou avec la machinerie agricole. Il ne fait aucun doute que le commerce des plants de framboisier est le principal responsable de la diffusion rapide de la maladie. Les sols argileux (peu filtrant) et acides (pH 5,5 à 6,7) sont plus favorables aux pathogènes que les terres légères (Nourrisseau et Baudry, 1987; Bolay et Lauber, 1989b, 1989c; Aber, 1993).

Le *Phytophthora* a une vie semi-aquatique. L'eau est nécessaire à la dissémination des zoospores (Nourrisseau et Baudry, 1987; Bolay et Lauber, 1989a, 1989b; Aber, 1993). Entraînées par l'eau de ruissellement ou de drainage, ces zoospores peuvent facilement contaminer des framboisiers situés à plusieurs centaines de mètres du foyer initial (Nourrisseau et Baudry, 1987; Bolay et Lauber, 1989a, 1989b).

Les *Phytophthora* spp. (surtout *P. fragariae* var. *rubi*) sont agressifs en période fraîche, lorsque la température du sol est comprise entre 5 et 20°C, l'optimum étant à 15°C (Nourrisseau et Baudry, 1987, Bolay et Lauber, 1989b, 1989c). Au Québec, ils sont actifs au printemps et à l'automne avec une interruption plus ou moins longue l'hiver où l'importance de leur dissémination et la gravité de ces attaques sont proportionnelles à la durée et au nombre de période d'inondation (Thibodeau, 1991a; Aber, 1993).

1.2- Qu'est-ce qu'un *Phytophthora* (situation taxonomique) ?

La classification des champignons est souvent très controversée car les données fossilisées sont rares (Bousquet, 1995). Le genre *Phytophthora* étant un champignon de classification inférieur n'échappe pas à cette situation. De plus, les données morphologiques sur lesquelles est basée la taxonomie classique sont très variables et souvent trop limitées. Cette section décrit l'évolution de la situation taxonomique du genre *Phytophthora* .

1.2.1- Le règne

Le terme *Phytophthora* est composé de deux racines grecques soit *phyton*, une plante et *phthora*, destruction (Blackwell, 1949). Les *Phytophthora* sont donc des destructeurs de végétaux. C'est Anton de Bary en 1876 qui a été le premier à utiliser ce terme lorsqu'il décrivait l'agent responsable de la destruction des cultures de la pomme de terre (mildiou), *P. infestans*. Cet agent causa la famine au milieu du 19^e siècle en Europe ainsi qu'en Irlande contraignant une partie de leur population à émigrer en Amérique du Nord (Zentmyer, 1983). Zentmyer (1983)

mentionne que plus de 43 espèces (67 espèces, Stamps *et al.*, 1990) sont connues et causent un grand nombre de maladies sur un nombre croissant d'espèces végétales incluant les grandes cultures, les espèces forestières, subtropicales, tropicales et les plantes ornementales.

Les *Phytophthora* spp. appartiennent à la classe des Oomycètes, à l'ordre des Péronosporales, à la famille des Pythiaceae et au genre *Phytophthora* (voir tableau 1.1).

Tableau 1.1: Taxonomie du genre *Phytophthora*

	Ancienne*	Nouvelle**
Règne	Myceteae	Protoctista (Protista) groupe IV
Division	Mastigomycota	Oomycota
subdivision	Diplomastigomycotina	
Classe	Oomycète	
Ordre	Péronosporale	Péronosporale
Famille	Pythiaceae	Pythiaceae
Genre	<i>Phytophthora</i>	<i>Phytophthora</i>

* réf. Whittaker, 1969 ou Ainsworth, 1973

** réf: Margulis *et al.*, 1990

Traditionnellement, les Oomycètes étaient placés dans le règne des Myceteae et dans la division des Mastigomycètes avec les Chytridiomycètes et les Hypochytriomycètes à cause de leur production de spores motiles (biflagellées chez les Oomycètes), leur mode d'absorption des nutriments et leur morphologie en thalle (Whittaker, 1969; Ainsworth, 1973) (voir tableau 1.1). Des études récentes basées sur la petite sous-unité d'ADN ribosomal (PSU d'ADNr) démontrent que les Mastigomycètes sont diphyllétiques (Gunderson *et al.*, 1987; Förster et Coffey, 1990). Les Chytridiomycètes, les Zygomycètes et les champignons supérieurs forment un groupe monophylétique se référant aux champignons parfaits tels les Ascomycètes et les Basidiomycètes, lesquels partagent un ancêtre commun (Gunderson *et al.*, 1987; Förster et Coffey, 1990). Les Oomycètes forment, avec les Hypochytriomycètes, un groupe monophylétique et dérivés des algues (à spores) hétérokontes photosynthétiques ayant perdu leurs chloroplastes (Gunderson *et al.*, 1987; Förster et Coffey, 1990; Bhattacharya *et al.*, 1992; Bowman *et al.*, 1992; Van

de Peer *et al.*, 1993; Van der Auwera *et al.*, 1995). Les algues hétérokontes regroupent les Phaeophytes, les Xanthophytes, les Chrysophytes (algues dorées), et les diatomés (Barr, 1983). Les Oomycètes auraient évolué de façon similaire aux champignons, mais indépendamment d'eux (Gunderson *et al.*, 1987).

1.2.2- L'ordre des Péronosporales

L'ordre des Péronosporales comprend une seule famille, les Pythiaceae. Cette famille regroupe entre autres les genres *Phytophthora* et *Pythium*. Par le passé, certaines espèces mal classées étaient permutées d'un genre à l'autre car les caractéristiques des deux genres étaient incorrectement ou peu définies (Erwin, 1983; Dick *et al.*, 1984; Belkhiri et Dick, 1988; Dick, 1989; Brasier et Hansen, 1992). Ces deux genres partagent des caractéristiques morphologiques et une gamétogénèse similaires. Cependant, ils se distinguent par la formation de leurs zoospores. Chez les *Phytophthora*, les zoospores se différencient dans le sporocyste avant leur expulsion dans l'environnement. Chez les *Pythium*, les zoospores sont relâchées dans une vésicule avant leur différenciation (Dick, 1969; Waterhouse, 1973). De plus, les *Phytophthora* forment des sporocystes de formes différentes sur des sporangiophores distincts, et plusieurs espèces possèdent des gamétocystes mâles (anthéridies) amphigynes plutôt que paragynes (Brasier et Hansen, 1992).

Des évidences moléculaires différencient aussi ces deux genres. Des anticorps monoclonaux distinguent *Phytophthora* de *Pythium* (Hardham *et al.*, 1986). Les *Phytophthora* ne possèdent pas de séquences répétitives inversées dans leur ADN mitochondrial (ADNmt). Cela est retrouvée chez les *Pythium* et chez les autres Oomycètes (Hudspeth *et al.*, 1983; McNabb et Klassen, 1988; Shumard-Hudspeth et Hudspeth, 1990). La vitesse de sédimentation de l'ADN génomique permet aussi de distinguer les deux genres (Belkhiri et Dick, 1988). La comparaison de la grande sous-unité (GSU) 28S de l'ARNr entre les genres *Phytophthora* et *Pythium* réalisée par Briard *et al.* (1995) indique qu'ils partagent une racine commune et que les différences génétiques entre les deux genres sont plus grandes qu'à l'intérieur de chacun des genres. De plus, cette étude révèle que les *Pythium* montrent plus de divergences que les *Phytophthora* au niveau de la GSU 28S de l'ARNr. Ceci suggère que les *Phytophthora* ont une origine plus récente que celles des *Pythium*.

(Briard *et al.*, 1995). Les *Pythium* sont plutôt saprophytes dans les sols et l'eau. Ils sont des parasites faibles à modérés pour les monocotylédones. Les *Phytophthora* sont de pauvres compétiteurs saprophytes, mais des agents pathogènes très virulents chez les dicotylédones (Brasier et Hansen, 1992).

1.2.3- Le genre *Phytophthora*

Rosenbaum (1917) et Tucker (1931) furent les premiers à bâtir la classification du genre *Phytophthora*. Ces premières classifications ont été reprises par Waterhouse (1963, *et al.* 1983) qui assignait les espèces à l'un ou l'autre des 6 groupes morphologiques de "I-VI" selon la nature des sporocystes (papillées, semi-papillées ou non-papillées), la forme de l'attachement de l'anthéridie (amphigyne ou paragyne), et l'homothallisme (voir tableau 1.2). Les taxonomistes utilisent habituellement les caractères morphologiques les plus évidents pour établir les relations entre les divers groupes taxonomiques. Cependant, ces caractères ne sont pas toujours le reflet de l'évolution naturelle et des vraies différences entre les espèces (Brasier et Hansen, 1992). Ho (1982), en assignant des coefficients de pondération aux oogones, aux sporocystes et autres caractéristiques morphologiques, a généré des groupes similaires à ceux de Waterhouse, à l'exception des groupes V et VI qui ont été regroupés et appelés "groupe *megasperma*" (voir tableau 1.2). De plus, trois espèces du groupe VI ont été réassignées à d'autres groupes. Brasier (1983) a repris les groupes établis par Waterhouse et a tracé un arbre phylogénétique relatant l'évolution des espèces. Son arbre s'appuyait sur des caractères considérés comme "primitifs" et associés au genre *Pythium* (voir figure 1.2). La paragynie, les anthéridies multiples et latérales, les semi-papillés, la non-caducité, les sporocystes intercalaires sont des exemples de caractères plus primitifs. Selon Brasier (1983), le groupe III de Waterhouse doit être considéré comme le plus primitif. À partir de cette classification deux lignes évolutives ont été établies (figure 1.2). La première étant basé sur le caractère péronosporaléen aérien montrant une spécialisation dans le mode de dispersion par les sporocystes caduques (groupe II et IV); la deuxième ligne représentait la spécialisation des espèces dite "sol" montrant des sporanges non-caducs (groupe V et VI). Un problème s'est posé avec cette nouvelle classification, où l'hétérothallisme associé à l'état amphigyne s'est retrouvé à la fois en haut de l'arbre évolutif (groupe II et VI), et sur chacune des lignes évolutives.

Tableau 1.2: Sommaire des diverses classifications

Waterhouse (1963, 1983) et Brasier (1983)

Groupe		I	II	III	IV	V	VI
Espèce type		<i>cactorum</i>	<i>palmivora</i>	<i>primulae</i>	<i>infestans</i>	<i>megasperma</i>	<i>cinnamomi</i>
Critères dominants	sporocyste:	papillé	papillé	semi-papillé	papillé	non-papillé	non-papillé
	anthéridie:	paragyne	amphigyne	paragyne	amphigyne	para/amphi	amphigyne
	thalle:	homo	hétéro	homo	homo/hétéro	homo/hétéro	hétéro
	propagation:		(air)		(air)	(sols)	(sols)

Ho (1982)

Groupe		I	II	III	IV	V
Espèce type		<i>cactorum</i>	<i>palmivora</i>	<i>syringae</i>	<i>infestans</i>	<i>megasperma</i>
Critères dominants	sporocyste:	papillé	papillé	semi-papillé	papillé	non-papillé
	anthéridie:	paragyne	amphigyne	paragyne	amphigyne	para/amphi
	thalle:	homo	hétéro	homo	homo/hétéro	homo/hétéro

homo: homothallique

hétéro: hétérothallique

para: paragyne

amphi: amphigyne

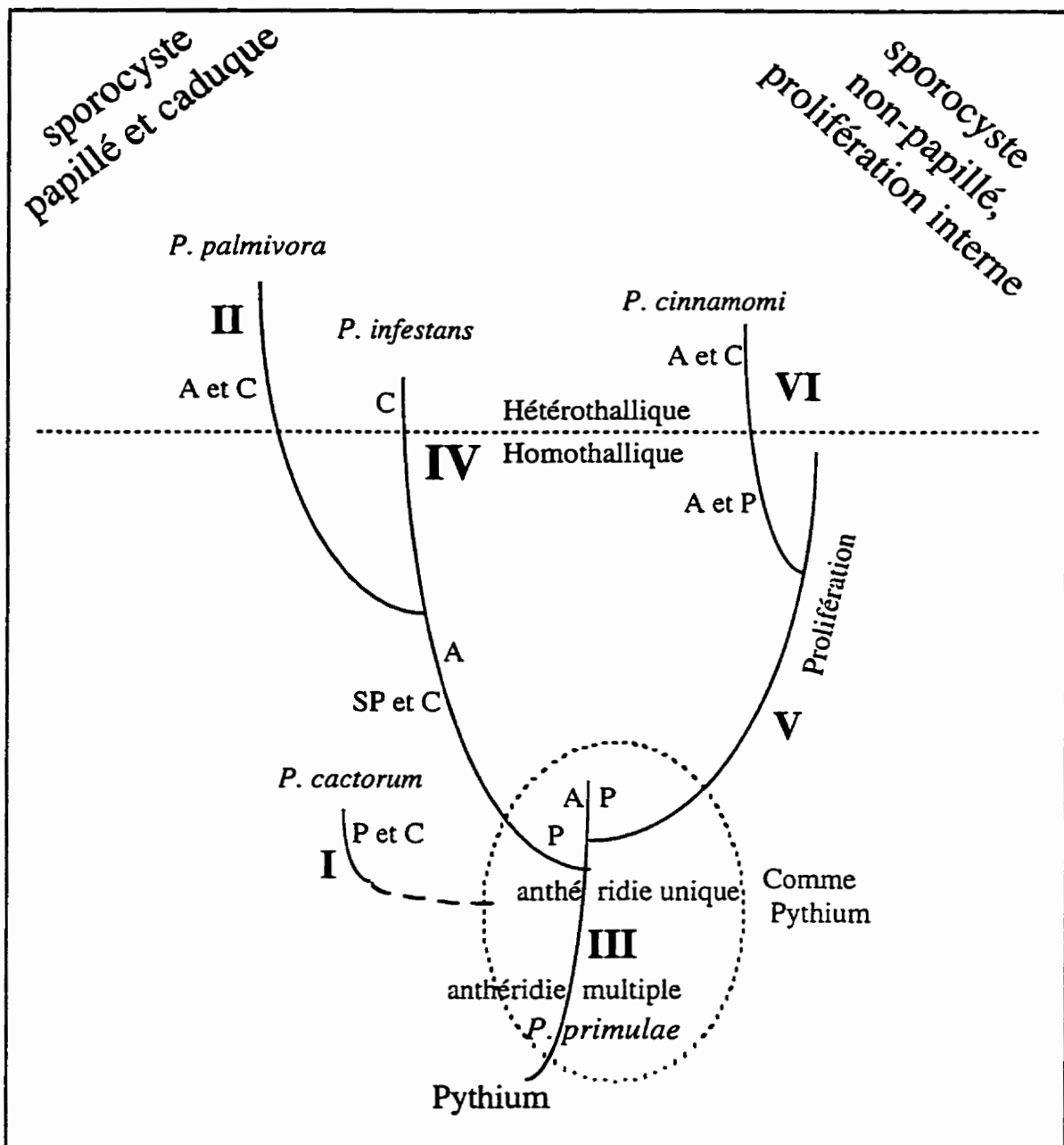


Figure 1.2: Schéma phylogénétique des six groupes de *Phytophthora* selon Waterhouse (1963) basé sur les caractères primitifs et avancés. Le groupe III est le plus primitif, les groupes IV et V sont intermédiaires et les groupes II et VI sont les plus évolués. P: anthéridie parazygane. A: anthéridie amphigyne. C: chlamydospore. SP: semi-papillé.

L'hétérothallisme semble cependant avoir évolué avant la divergence des types de sporocyste (Brasier, 1983).

Plus tard, des évidences moléculaires se sont ajoutées. Des études d'isoenzymes ont montré des grandes distances génétiques entre les espèces (distance de Roger 0,65-0,85). Chez d'autres organismes, de telles distances sont plutôt retrouvées au niveau des genres (Oudemans et Coffey, 1991a, 1991b). De plus, les études sur le polymorphisme de l'ADNmt indiquent aussi de grandes distances entre les espèces (Förster *et al.*, 1988). Cependant, en établissant un arbre phylogénétique basé sur le domaine D₂ de la GSU 28S de l'ARNr, Briard *et al.* (1995) ont démontré qu'il y avait peu de distances entre les espèces donc peu de différences génétiques. Cette étude est en conflit avec la taxonomie de Waterhouse, car elle regroupe les espèces d'une façon différente. Brasier et Hansen (1992) mentionnent que si cette étude est confirmée par de nouvelles évidences moléculaires; les considérations systématiques et évolutives basées sur des critères morphologiques seront remises en question. Également, des débats sur la classification intraspécifique d'une espèce sont fréquents; par exemple, le complexe *megasperma* (groupe d'espèces hétérogènes) ou le complexe *cryptogea /drescleri* (espèces très similaires morphologiquement) (Brasier et Hansen, 1992). Ainsi, les connaissances actuelles et les outils traditionnellement utilisés pour la classification des *Phytophthora* sont inadéquats ou trop imprécis pour établir avec certitude une taxonomie interspécifique et intraspécifique significative. Ceci explique l'intérêt de caractériser les régions ITS de l'ARNr des *Phytophthora* et d'exploiter leur variabilité pour confirmer ou infirmer la classification basée sur des caractères morphologiques, telle qu'établie initialement par Waterhouse.

1.3- Les agents qui causent le pourridié des racines du framboisier

Plusieurs espèces de *Phytophthora* peuvent causer le pourridié des racines du framboisier. La pathogénèse et le niveau de virulence de ces espèces envers les variétés de framboisiers peuvent également varier.

1.3.1- Les espèces de *Phytophthora* pathogènes du framboisier

Le pourridié des racines du framboisier est connue depuis les années 30. Des dommages sévères ont été rapportés en Écosse par Waterston en 1937. Il a attribué cette maladie à *P. citricola* Sawada, mais il n'est pas parvenu à faire la preuve de sa virulence. Vingt ans plus tard, en Nouvelle-Zélande, Brien et Dingley (1959) ont isolé deux autres espèces *P. cactorum* (Lebert et Cohen) J. Schröeter et *P. cinnamomi* Rands, sans toutefois pouvoir démontrer leur action parasitaire. McKeen (1958a), mentionnait qu'une race de *P. fragariae* Hickman était pathogène du *Rubus loganobaccus* (hybride framboisier rouge x d'un mûrier noir, *Rubus ursinus*). Une décennie plus tard, Converse et Schwartze (1968) ont rapporté des cas de pourridié des racines du framboisier dans la région nord-ouest de la côte du Pacifique. L'agent causal a été identifié à l'espèce *P. erythroseptica* Pethybridge. Le pourridié des racines du framboisier a ensuite été rapportée par Nourriseau et Baudry (1987) en France. Elle mettait en cause des isolats similaires à l'espèce *P. fragariae* Hickman. De même, plusieurs dommages sévères de pourridié des racines du framboisier ont été observés par Seemüller *et al.* (1986) en Allemagne et d'autres ont été vus dans les Îles Britanniques par Duncan *et al.* (1987). À l'origine, l'agent causal a été identifié à *P. erythroseptica* avant d'être reclassé à l'espèce *P. megasperma* Drechsler. D'autres cas de pourridié des racines du framboisier ont été rapportés en Norvège par Heiberg *et al.* (1989), en Suisse par Bolay et Lauber (1989c), dans les états du New Jersey et de New York par Wilcox (1987, 1989), en Australie par Washington (1988) où *P. cryptogea* Pethbridge et Lafferty était pour la première fois mentionnée, au Chili (Latorre et Muñoz, 1993), en Bulgarie (Ilieva *et al.*, 1995) et en Pologne (Profic-Alwasiak et Danek, 1993). Dans l'est du Canada, les premiers cas de pourridié des racines du framboisier ont été recensés en Ontario en 1988 et au Québec en 1989 par le Ministère de l'Agriculture de chacune des provinces (Thibodeau, 1991a, 1991b). L'agent causal identifié était

le *Phytophthora* sp. (Thibodeau, 1991a). Les évidences morphologiques associaient ce *Phytophthora* sp. à *P. fragariae* var. *rubi* (Aber, 1993).

Plus de treize espèces de *Phytophthora* sont maintenant caractérisées, dont deux à virulence extrême en présence ou en absence d'hydromorphie du sol, soit *P. fragariae* var. *rubi* et *P. citricola* (Duncan et Kennedy, 1988; Wilcox, 1989). Les tableaux 1.3, 1.4, 1.5 résument le pouvoir pathogène des *Phytophthora* spp. du framboisier, leurs caractéristiques morphologiques majeures et leur température de croissance en culture.

La possibilité de retrouver des isolats de *P. citricola* dans l'est du Canada est peu probable car les températures requises pour sa croissance sont élevées (optimum 28-30°C, Wilcox, 1989). *Phytophthora cryptogea*, l'espèce homothallique du groupe I et *P. megasperma* sont moyennement à hautement virulents en présence de sol hydromorphe (Wilcox, 1989). Ces espèces causent de 46 à 96% des pourridiés racinaires et elles engendrent 20 à 80% des mortalités chez les framboisiers dans l'état de New York (Wilcox, 1989). Duncan *et al.* (1987) mentionnaient que *P. megasperma* var. *megasperma*, aussi appelée BHR (large éventail d'hôte ou de "type 1") est non-pathogène au framboisier. *P. idaei* sp. nov. est aussi une espèce moyennement virulente. Elles causent 75% des mortalités chez les jeunes plantes et de 30 à 40% chez les plantes âgées avec ou sans inondation du sol (Kennedy et Duncan, 1995). Les autres espèces soit *P. cactorum*, *P. cryptogea*, *P. syringae* (Klebahn) Klebahn, *P. cambivora* (Petri) Buisman, *P. citrophthora* (R. E. Smith & E. H. Smith) Leonian, *P. cinnamomi* Rands, *P. drechsleri* Tucker et l'espèce hétérothallique du groupe VI sont faiblement parasitaires en présence d'hydromorphie du sol (voir tableau 1.3, Duncan *et al.*, 1987, 1991; Latorre et Muñoz, 1993; Wilcox, 1989). *Phytophthora cambivora* cause aussi de légers symptômes aux tiges (Duncan *et al.*, 1987). *Phytophthora sojae* est non-pathogène au framboisier tandis que *P. erythroseptica* var. *erythroseptica* (pomme de terre) cause de légère pourriture (Duncan *et al.*, 1987; Wilcox *et al.*, 1993).

Tableau 1.3: Pouvoir pathogène des *Phytophthora* spp. isolés de framboisiers atteints du pourridié des racines ou de sols des cultures.

<i>Phytophthora</i> isolé	Groupe	Auteurs	Pays	Pouvoir pathogène
<i>P. cactorum</i>	I*	Brien <i>et al.</i> , 1959 Duncan <i>et al.</i> , 1987 Wilcox <i>et al.</i> , 1989	Nouvelle-Zélande Grande-Bretagne É.-U. (NY)	0 (+-) (+-)
<i>P. sp. homothallique</i>	I?	Wilcox, 1989	É.-U. (NY)	(+-)
<i>P. idaei</i> sp. nov.	I	Kennedy <i>et al.</i> , 1995	Grande-Bretagne	(+)
<i>P. citrophthora</i>	II	Latorre <i>et al.</i> , 1993 Ilieva <i>et al.</i> , 1995	Chili Bulgarie	(+-) N.D.
<i>P. citricola</i>	III	Waterston, 1937** Wilcox, 1987, 1989 Duncan <i>et al.</i> , 1987 Latorre <i>et al.</i> , 1993 Profic-Alwasiak <i>et al.</i> , 1993 Ilieva <i>et al.</i> , 1995	Ecosse É.-U. (NY) Chili Pologne Bulgarie	0 (+-) (++) (+-) (+) ?
<i>P. syringae</i>	III	Duncan <i>et al.</i> , 1987	Grande-Bretagne	(+-)
<i>P. fragariae</i>	V	McKeen, 1938*** Nourrisseau <i>et al.</i> , 1987 Wilcox, 1989	France É.-U. (NY)	(++)
<i>P. megasperma</i> type 2	V	Duncan <i>et al.</i> , 1987	Grande-Bretagne	(++)
<i>P. megasperma</i> var. <i>megasperma</i> (BHR ou type 1)	V	Montgomerie <i>et al.</i> , 1980 Duncan <i>et al.</i> , 1987 Wilcox, 1989	Grande-Bretagne Grande-Bretagne É.-U. (NY)	(-) (-) (+-)
<i>P. cambivora</i>	VI	Montgomerie <i>et al.</i> , 1980 Duncan <i>et al.</i> , 1987	Grande-Bretagne É.-U.	(-) (+-)
<i>P. cinnamomi</i>	VI	Brien <i>et al.</i> , 1959	Nouvelle-Zélande	0
<i>P. cryptogea</i>	VI	Washington, 1988 Wilcox, 1989	Australie É.-U. (NY)	(+-)
<i>P. drechsleri</i>	VI	Duncan <i>et al.</i> , 1987	Allemagne	(+-)
<i>P. erythroseptica</i>	VI	Converse <i>et al.</i> , 1968 Seemuller <i>et al.</i> , 1986	Canada (CB) Allemagne	(++) (+-)
<i>P. sp. hétérothallique</i>	VI?	Wilcox, 1989	É.-U. (NY)	(+-)

* Groupe désigné selon la clé taxonomique de Newhook, Waterhouse et Stamp, 1978.

** L'isolement ne semble pas avoir été effectué

*** Isolé du *Rubus loganobaccus* et non pas du framboisier

N.D. Non-déterminé

0: Il n'y a eu aucune inoculation

(-): Framboisier inoculé est resté sain

(+-): Inoculation positive, si inondation

(+) ou (++) : Inoculation positive avec mort des plant à 50 ou 100%

? : La désignation du groupe taxonomique est incertaine due au manque de données

Tableau 1.4: Sommaire des caractéristiques morphologiques des *Phytophthora* spp. isolés du framboisier. Les caractéristiques sont tirées des travaux suivants: Wilcox, 1989; Stamps *et al.*, 1990; Ellis *et al.*, 1991; Latorre et Muñoz, 1993; Kennedy et Duncan, 1995. Forme de sporocystes: a = obpyriforme; b = obturbiné; c = ovoïde; d = distordu; e = elliptique; f = sporocystes à base fuselé; g = sporocystes à base ronde; l = sporocyste à coup allongé dans l'eau; o = ovoïde et s = sphérique. (z): sporangiophore ayant un gonflement d'hyphe intercallé ou à sa base. Hyphe gonflé: oui = présence sur gélose et dans l'eau; oui (eau): présence seulement dans l'eau et oui (corail) = présence de la forme corail seulement dans l'eau. Hyphe gonflé (ou gonflement d'hyphe) est équivalent au terme anglais "swelling". N.D.: non-déterminé. ?: La désignation du groupe taxonomique est incertaine due au manque de données. Le terme "parfois" indique la présence de chlamydo-spores chez certains isolats et l'absence chez d'autres isolats. La taille en (μm) des chlamydo-spores est très variable à l'exception de l'espèce *P. drechsleri*.

Espèce	Groupe	Thalle	Oospore (Diamètre) (μm)	Oogone (Diamètre) (μm)	Anthéridie	Sporocyste					Sporangiophore	Hyphe gonflé	Chlamyospore	mycélium sur géluse
						Forme	Papille	Prolifération interne	Caducité	Présence dans l'eau				
<i>P. cactorum</i>	I	homothallique	aplérotique (26.0)	(28.0)	paragyne	s, e, o, a	oui	non	oui	oui et géluse	sympodiale simple	non	oui	
<i>P. cambivora</i>	VI	hétérothallique	plérotique (32-38)	parois ornementées	amphigyne	e, o, f	non	oui	non	oui	sympodiale	oui	non	
<i>P. cinnamomi</i>	VI	hétérothallique	plérotique (19-54)	base fuselée (21-58)	amphigyne	e, o	non	oui	non	oui	sympodiale	oui (corail)	parfois	
<i>P. citricola</i>	III	homothallique	plérotique (29.5)	(30.5)	paragyne	e, o, a, c, d	semi 2 apex	non	non	oui	sympodiale irrégulier	non	parfois	aérien ou rosette
<i>P. citrophthora</i>	II	hétérothallique	N.D.	N.D.	amphigyne	e, o, a, d	oui	oui	oui	oui	irrégulier (z)	non	parfois	aérien
<i>P. cryptogea</i>	VI	hétérothallique	plérotique (30).	base ronde (30-38)	amphigyne	e, o, a	non	oui	non	oui et géluse	sympodiale	oui (eau)	non	rosette
<i>P. drechsleri</i>	VI	hétérothallique	plérotique (33-50)	base fuselée (36-53)	amphigyne	e, o, a, d, f	non	oui	non	oui et géluse	sympodiale	oui	parfois	
<i>P. erythrosepilca</i>	VI	homothallique	plérotique (27-43)	(30-46)	amphigyne	e, o, a, f, d (arachide)	non	non	non	oui	sympodiale	oui	parfois	
<i>P. fragariae</i>	V	homothallique	plérotique (35.5)	base fuselée (39.6)	amphigyne	e, o, a, l	non	oui	non	oui	sympodiale	oui (eau)	non	croissance lente
<i>P. idaei</i>	I	homothallique	aplérotique (27.0)	(32.1)	à dominance paragyne	s, o	oui	non	non	oui et géluse	sympodiale simple	N.D.	N.D.	
<i>P. megasperma</i> (BHR)	V	homothallique	aplérotique (44.5)	sphérique (49.1)	à dominance paragyne	o, a	non	oui	non	oui	sympodiale irrégulier	oui (eau)	parfois	
<i>P. sp.</i>	I?	homothallique	(32.2)	base fuselée (35.2)	paragyne	o, d, l	oui 2 apex	non	non	oui	N.D.	N.D.	N.D.	
<i>P. sp.</i>	VI?	hétérothallique	N.D.	N.D.	amphigyne	o, g		N.D.	oui	oui	N.D.	N.D.	N.D.	zigzag
<i>P. syringae</i>	III	homothallique	plérotique (31-43)	(33-46)	paragyne	e, o, a, c	semi	non	non	oui	sympodiale irrégulier	oui	oui (25 μm)	rosette

Tableau 1.5: Température cardinale de croissance mycélienne des *Phytophthora* spp. en milieux de culture

Espèce	Température		
	minimale (°C)	optimale (°C)	maximale (°C)
<i>P. cactorum</i>	4	22-25	33
<i>P. cambivora</i>	2	22-24	32
<i>P. cinnamomi</i>	4	22-25	31-33
<i>P. citricola</i>	7	28-30	33
<i>P. citrophthora</i>	5	20-30	35
<i>P. cryptogea</i>	4	22-25	36
<i>P. drechleri</i>	5	28-31	36
<i>P. erythroseptica</i>	4	27	35
<i>P. fragariae</i>	4	19-22	30
<i>P. idaei</i>	4	22	35
<i>P. megasperma</i> (BHR)	4	22-25	33
<i>P. sp. homothalique</i>	7	25	36
<i>P. sp. hétérothalique</i>	4	25-28	36
<i>P. syringae</i>	4	20	30

†Les températures de croissance proviennent des travaux suivants:
 Ribeiro, 1978; Wilcox, 1989; Stamps *et al.*, 1990; Ellis *et al.*, 1991;
 Latorre et Muñoz, 1993; Kennedy et Duncan, 1995.

1.3.2- *Phytophthora fragariae* var. *rubi* , l'espèce la plus virulente

1.3.2.1- Historique de la dénomination de *P. fragariae* var. *rubi*

Le premier *Phytophthora* hautement virulent qui cause le pourridié des racines chez le framboisier a été rapporté par Converse et Schwartze (1968). À cause de la présence d'anthéridies à prédominance amphigyne et de la présence de sporocystes non-papillés, le champignon a été identifié à *P. erythroseptica*. Cependant, cet isolat "Canby" différait du *P. erythroseptica* typique par des sporocystes de plus grande taille, l'absence de gonflement des hyphes ("swelling"), l'apparence de la croissance du mycélium (sans rosette), et par les températures cardinales requises à leur croissance. De plus, cet isolat ne causait pas de pourriture dans les tubercules de pomme de terre. Converse et Schwartze (1968) ont toutefois soulevé la similarité entre *P. fragariae* et leur isolat "Canby" provenant du framboisier rouge. Subséquemment, le pourridié des racines du framboisier a été rapporté en France (Nourrisseau et Baudry, 1987). Cette maladie était alors associée à un *Phytophthora* morphologiquement similaire à *P. fragariae* Hickman, pathogène du fraisier. Cependant, les souches isolées du fraisier (*Fragariae* x *ananassa* Duch.) n'infectaient pas le framboisier. À cet époque, de sévères dépérissements des framboisiers ont été observés en Allemagne (Seemüller *et al.*, 1986) et dans les Îles Britanniques (Duncan *et al.*, 1987). À l'origine, les souches isolées ont été désignées *P. erythroseptica* (Seemüller *et al.*, 1986). Ces mycètes ont ensuite été reclassifiés sous le taxon *P. megasperma* Drechsler, lequel est considéré comme une collection de sous-groupes hétérogènes ou d'espèces biologiques émergentes (Hansen *et al.*, 1986). Les souches isolées étaient divisées en deux différents groupes de *P. megasperma* (Duncan *et al.*, 1987). Le type 1 est plus étroitement lié à la description de Waterhouse (1970) de *P. megasperma* var. *megasperma*. Le type 2 avait une croissance beaucoup plus lente et des oogones de plus petites tailles. Il était indistinguishable des isolats pathogènes du framboisier de l'Amérique du Nord. Ce type 2 ne correspondait pas à la description du taxon *P. megasperma* var. *megasperma* ou var. *sojae* Hildebrand (syn *P. sojae* Kaufmann et Gerdemann) au *sensu strictu*. Il ressemblait plus à *P. fragariae* au niveau de la vitesse de croissance, de l'apparence de la colonie sur milieu de culture, des gamètes et des sporocystes. De plus, le type 2 ne causait pas la stèle rouge chez le fraisier (Duncan *et al.*, 1987). Finalement, Wilcox

(1989) a assigné les souches isolées de framboisiers cultivés dans les états de New York et du New Jersey au taxon *P. fragariae*.

Au début des années 1990, la plupart des auteurs cités ci-haut concluaient que les isolats de *P. erythroseptica* du framboisier, ceux de *P. megasperma* type 2 et ceux similaire à *P. fragariae* du framboisier ne pouvaient être qu'une seule espèce biologique. Ces isolats sont alors regroupés sous le nom d'isolats hautement pathogènes au framboisier (HPRs). Des études réalisées par Duncan *et al.* (1991) et par Wilcox *et al.* (1993) ont comparé les HPRs d'Europe et d'Amérique du Nord aux espèces "types" de chaque taxons énumérés précédemment. Ils ont conclu que les HPRs de par leurs caractéristiques morphologiques, culturelles et selon les patrons électrophorétiques de leurs protéines solubles étaient un groupe homogène, indépendamment de leur origine géographique. Les HPRs se distinguaient des isolats de *P. fragariae* du fraisier et du *Rubus loganobaccus* par de légères différences morphologiques. Ils se distinguaient aussi par leur pouvoir pathogène ainsi que par leur habilité à croître sur milieu MEA. Ils ont également une petite différence constante au niveau des patrons électrophorétiques des protéines solubles. Les HPRs sont aussi distincts des isolats de *P. erythroseptica* var. *erythroseptica* chez la pomme de terre et du *P. megasperma* de type 1 retrouvé chez le framboisier et chez d'autres hôtes. Ils différaient aussi de *P. cambivora* et de *P. sojiae* (Duncan *et al.*, 1991; Wilcox *et al.* 1993).

Förster et Coffey (1992) ont réalisé une analyse de l'ADNmt des HPRs pathogéniques au framboisier. Ils ont démontré une relation étroitement fermée parmi les HPRs confirmant ainsi la cospécificité des taxons établit par les données traditionnelles. Ils ont trouvé de 34 à 55% de similarité entre les isolats du fraisier et ceux du framboisier suggérant un ancêtre commun. Les isolats *P. megasperma* type 2 du framboisier et ceux du type 1 sont aussi placés dans deux sous-groupes moléculaires distincts.

Stammler *et al.* (1993) ont cloné l'ADNmt et l'ADN génomique de *P. fragariae* var. *rubi* (un isolat HPR) dans *E. coli* afin de bâtir une série de sondes moléculaires d'ADN. La majorité des sondes qu'ils ont sélectionnées pour l'hybridation en application par point ("dot blot") se sont révélées spécifiques aux HPRs et aux *P. fragariae* du fraisier. Elles n'hybridaient pas avec les autres *Phytophthora* spp.,

à l'exception de *P. cambivora* (groupe VI) qui hybridait avec les sondes lors de l'analyse en application par point et en Southern. Duncan *et al.* (1991) ont mentionné une grande similarité des protéines totales entre *P. cambivora* et *P. fragariae*. De plus, les analyses des polymorphismes RFLP des ADNmt et génomiques par Southern montraient que les HPRs et les *P. fragariae* du fraisier étaient distinguables l'un de l'autre. Ils étaient aussi très différents des autres espèces de *Phytophthora* et de *Pythium*. Les HPRs tout comme les *P. fragariae* du fraisier démontraient aussi une grande homogénéité intraspécifique indépendamment de leur origine géographique. En plus, ceci confirmait la cospécificité des taxons. Plus tard, leurs travaux ont permis d'appuyer la séparation des HPRs et des *P. fragariae* du fraisier au niveau variétal sous le taxon *P. fragariae*.

Les évidences traditionnelles et moléculaires ont permis à Wilcox *et al.* en 1993 de désigner les HPRs comme une nouvelle entité biologique appelée *Phytophthora fragariae* Hickman var. *rubi* Wilcox & Duncan, var. nov. Cette espèce possède des oogones à paroi dorée ayant des oospores sphériques aplérotiques. Les oogones sont légèrement fuselées et ils ont une base en forme d'entonnoir. Les anthéridies sont à dominance parogyne. Les sporocystes ont une forme ovoïde à obpyriforme. Ils sont non-papillés, non-caduques, seuls ou simplement branchés. Ils sont produits par prolifération interne en "nesting" (nid) ou en extension.

Les HPRs et les isolats de *P. fragariae* auraient un ancêtre commun appartenant aux membres de la tribu des Potentillae dans la famille des Rosaceae (Duncan *et al.*, 1991; Wilcox *et al.*, 1993). Ceci suggère une divergence récente de ces deux groupes spécialisés pathogéniquement (Brasier et Hansen, 1992). Les HPRs auraient évolué des sites infestés de la stèle rouge dans lesquels des framboisiers auraient été par la suite cultivés (Duncan *et al.*, 1991). Les *P. fragariae* et les HPRs auraient leur origine dans le nouveau monde (Duncan *et al.*, 1991). Thomas (1935) dit qu'ils étaient, probablement, déjà présent dans les sols vierges.

Les *P. fragariae* var. *rubi* sont donc très apparentés aux *P. fragariae* var. *fragariae* et très virulents pour le framboisier. Les *P. fragariae* var. *rubi* dominent ainsi la liste des 13 espèces de *Phytophthora* qui peuvent infecter le framboisier.

1.3.2.2- La stèle rouge du fraisier

La stèle rouge du fraisier est causée par *P. fragariae* C. J. Hickman var. *fragariae* (*P. fragariae* var. *fragariae*). Cette maladie cause tout comme le pourridié des racines du framboisier de sérieux problèmes économiques lors des hivers à précipitations élevées, et aux endroits où les sols sont mal drainés (Paulus, 1990). Cette maladie a été en premier lieu observée dans le district du Lanakshire, en Écosse, en 1920 (Paulus, 1990). Le premier rapport publié sur cette maladie aux États-Unis était en provenance de l'Illinois en 1935 (Bain et Demaree, 1945). Au Québec, la stèle rouge est apparue au milieu des années 50 (Anonyme, 1955). En France, cette maladie a été introduite en 1982 par des plantules micropropagées en pépinières infectées (Nourriseau *et al.*, 1983).

Le développement de la stèle rouge et le cycle évolutif du champignon sont sensiblement les mêmes que chez le pourridié des racines du framboisier (voir section 1.1.2) (Bolay et Lauder, 1989a, Aber 1993). Une étude histologique sur le taux de colonisation des racines de fraisier et la relation temporelle et spatiale de la production de spores est connue sur les cultivars sensibles et résistants (Milholland et Daykin, 1993).

1.3.2.3- Identification des races de *P. fragariae* var. *fragariae*

Chez le fraisier, dix races physiologiques de *P. fragariae* var. *fragariae* causent la stèle rouge aux États-Unis (Converse, 1970). Ces races ont été déterminées par les caractéristiques culturales (Maas, 1972), les patrons électrophorétiques des protéines (Gill et Powell, 1968) ainsi que par l'évaluation visuelle de la résistance de divers cultivars de fraisier (McKeen, 1958b; Converse et Scott, 1962; Montgomerie, 1966; Scott *et al.*, 1975). Les races A1 à A6 sont endémiques dans l'est des États-Unis (Converse *et al.*, 1958; Converse et Scott, 1962) tandis que les races A7 et A10 le sont dans l'ouest des États-Unis (Converse, 1967, 1970). La race A7 est aussi exotique dans l'est de l'Amérique (Maine). Elle a été introduite par des plantules infectées de pépinière (Maas *et al.*, 1988). L'établissement des races à partir des procédures d'évaluation visuelle de la stèle rouge est généralement subjectif et inconstant (Scott *et al.*, 1975). L'instauration d'un index de sévérité (DSI) basé sur le nombre d'oospores par segment racinaire et le

pourcentage de racines infectées a permis de regrouper les 10 races physiologiques en 7 races pathogéniques (Milholland *et al.*, 1989; Law et Milholland, 1992) (voir tableau 1.6). Le comptage des oosphères pour la détermination d'un DSI est cependant laborieux et demande un temps de travail énorme (Kennedy et Duncan, 1993b). Plusieurs autres races physiologiques ont aussi été identifiées de par le monde; onze au Royaume-Uni (Montgomerie, 1966), six au Canada (McKeen, 1958b; Pepin et Danberry, 1966), six au Japon (Morita, 1975) et trois en Allemagne (Scheewe, 1994).

La détermination des races pathogéniques du *P. fragariae* var. *fragariae* requiert l'utilisation d'un nombre plus ou moins élevé de cultivars de fraisier, entre 6 à 10. La réponse sensible ou résistant de chacun des cultivars est notée en fonction des isolats testés. La grande variation dans l'identité des cultivars utilisés pour la détermination des races pathogéniques des isolats de *P. fragariae* var. *fragariae* rend difficile la correspondance entre des races identifiées par des individus différents ou de pays différents (voir tableau 1.7). Une uniformisation de la sélection des cultivars de fraisier à utiliser permettrait de s'assurer de la légitimité de l'identité des nombreuses races déjà identifiées (Kennedy et Duncan, 1993b). Cela éviterait d'associer deux ou plusieurs noms de race pathogénique à des souches fongiques génétiquement identiques mais géographiquement dispersées (Montgomerie, 1966; Nickerson, 1990; Kennedy et Duncan, 1993b).

1.3.2.4- Identification des races de *P. fragariae* var. *rubi*

Chez le framboisier, une seule étude est mentionnée (Kennedy et Duncan, 1993a). Ils ont identifié 3 races de *P. fragariae* var. *rubi* en évaluant le pourcentage de pourridié des racines sur 5 cultivars. Des isolats des Îles Britanniques, de l'Allemagne, de la Norvège, du Canada et des États-Unis ont été utilisés dans cette étude. Les 3 races se distinguent par la réaction de résistance ou de susceptibilité des cultivars testés. La race 1 est composée d'isolats des Îles Britanniques et d'un de la Norvège, la race 2 est la plus hétérogène, et la race 3 regroupe les 2/3 des isolats testés ainsi que tous les isolats américains (voir tableau 1.8).

En résumé, plus de treize espèces de *Phytophthora* et 3 races de *P. fragariae* var. *rubi* causent le pourridié des racines du framboisier. Chez le fraisier, une seule

Tableau 1.6: Pouvoir pathogène des sept races pathogéniques de *P. fragariae* var. *fragariae* sur sept géotypes de fraisier

Géotypes	Pf-1*		Pf-2					Pf-3	Pf-4	Pf-5	Pf-6	Pf-7
	A1 ^a	A3	A2	A7	NC1	NC2	NC3	A4	A6	A8	A9	A10
Tennessee Beauty	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Del Norte	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
Aberdeen	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
Climax	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R
MD683	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R
Stelemaster	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R
Surecrop	R	R	S	S	S	S	S	R	R	S	R	R

R: Géotype résistant S: Géotype sensible

*: Races pathogéniques

^a: Races physiologiques: A(X): races américaines, selon la nomenclature de Converse et Scott (1962) et NC(X): isolats de la Caroline du Nord, E.-U, selon la nomenclature de Milholland *et al.*, 1989.

Tiré de: Milholland *et al.*, 1989

Tableau 1.7: Équivalence des races britanniques et américaine de *P. fragariae* var. *fragariae* selon le groupe de cultivars différentiels utilisé

Race:	Groupes différentiels							
	Britannique		Américain-1		Américain-2		Combiné	
	R.U.	É.U.	R.U.	É.U.	R.U.	É.U.	R.U.	É.U.
1		A4	1 & 4	A4	1	A4	1	A4
2			2		2		2	
3		A10	3	A10	3		3	
4			9 & 11B	A6	4		4	
9		A6	10		9 & 11B	A6	9	A6
11A		A8	11A		10		11A	
11B		A3	11D(2)	A5	11A	A5	11B	
11D(2)		A5		A1	11D(2)	A1	11D(2)	A5
		A1		A2		A2		A1
		A2		A3		A3		A2
		A7		A7		A7		A3
		A9		A8		A8		A7
				A9		A9		A8
						A10		A9
								A10

Britannique: sensible universel, Climax, Silctz (aberdeen), Maryland 683, 52AC18, Stelemaster

Américain-1: Blakemore, Aberdeen, Maryland 683, Stelemaster, Del Norte, Yaquina A

Américain-2: Blakemore, Climax, Aberdeen, Maryland 683, Stelemaster, Del Norte, Yaquina A, Perle de Prague

Combiné: sensible universel, Climax, Aberdeen, Maryland 683, Stelemaster, Del Norte, Yaquina A, Perle de Prague, 52AC18

Tiré de: Kennedy et Duncan, 1993b.

Tableau 1.8: Pouvoir pathogène de trois races de *P. fragariae* var. *rubi* sur six géotypes de framboisier

Race	Géotype de framboisier†					
	Latham	Meeker	Autumn Bliss	Glen Moy	Malling Jewel	5605/12
1	R	S	R	S	I	S
2	R	I	R	I	R	S
3	R	S	R	S	I	R

R: géotype résistant.

S: géotype sensible.

I: géotype de sensibilité intermédiaire.

†: Tous les géotypes de framboisier proviennent des îles Britanniques, à l'exception des géotypes Latham et Meeker qui sont de l'Amérique du Nord.

Tiré de: Kennedy et Duncan, 1993a

espèce de *Phytophthora* cause la stèle rouge du fraisier, soit *P. fragariae* var. *fragariae*. Chez cette variété fongique, un minimum de quinze races physiologiques ont été identifiées de par le monde (tableau 1.7). En plus, la possibilité d'identifier de nouvelles races ou espèces doit être fortement considérée car les méthodes d'isolement en culture pure des *P. fragariae* sont ardues. Ces deux situations exigent donc d'envisager des stratégies différentes pour l'établissement d'un test diagnostique, ou pour l'orientation des travaux de sélection de cultivars résistants. La caractérisation génétique des espèces de *Phytophthora* pathogènes de même que la caractérisation génétique des variétés *fragariae* et *rubi* de l'espèce *P. fragariae* et de leurs races respectives semble incontournable pour établir une lutte efficace contre la pourriture racinaire des fraisiers et des framboisiers.

1.4- La détection des pathogènes de plantes

1.4.1- Les moyens de détection des *Phytophthora*, spécialement chez les

P. fragariae

Les phytopathologistes bénéficient de quelques moyens de détection des *Phytophthora* pathogènes des plantes cultivées. Ces moyens sont classés en quatre groupes soit: le dépistage visuel, les techniques traditionnelles, les techniques immunologiques et les outils moléculaires.

Un des premiers moyens de détection des *Phytophthora* pathogènes utilisés est le dépistage visuel des symptômes aux champs au départ de la végétation, au stade fruit vert et à la fin du mois de septembre (Aber, 1993) pour le fraisier et le framboisier. Malheureusement, à l'apparition des symptômes, il est souvent trop tard pour une lutte efficace contre la maladie. De plus, les symptômes observés peuvent être confondus avec d'autres maladies, telle l'asphyxie (Nourriseau et Baudry, 1987; Baudry *et al.*, 1993).

Les méthodes traditionnelles d'identification sont aussi largement répandues. Elles regroupent les méthodes basées sur l'observation des caractéristiques morphologiques et physiologiques à partir d'isolement du pathogène dans les échantillons racinaires des plants ou des sols (Converse, 1970; Wilcox, 1989;

Wilcox *et al.*, 1993; Kennedy et Duncan, 1995). Bien que ces méthodes soient facilement réalisables, elles requièrent beaucoup de matériel. Elles peuvent être laborieuses, et elles exigent des périodes prolongées d'incubation et d'attente. L'absence de géloses spécifiques aux *P. fragariae* augmente les difficultés associées à l'isolement des *P. fragariae* en culture pure. La croissance lente de *P. fragariae* associée à ses capacités saprophytiques limitées accentuent ces difficultés (Nourrisseau et Baudry, 1987; Duncan *et al.*, 1991; Wilcox *et al.*, 1993). L'évaluation des caractères morphologiques repose sur des valeurs moyennes. De nombreux chevauchements, dûs aux écarts des mesures de ces caractères morphologiques peuvent conduire à des erreurs d'identification ou à des identifications imprécises. De plus, la majorité des caractères morphologiques sont variables selon les environnements et les milieux de culture employés.

Les trois prochains moyens de détection sont des applications des techniques traditionnelles. 1) La coloration racinaire est la méthode de dépistage la plus utilisée au Québec. Elle a été adaptée par Thibodeau et Charrier (1994) d'une méthode de détection des champignons endomycorhiziens. Elle est utilisée en complément du dépistage des symptômes. Le MAPAQ utilise cette approche diagnostique dans le cadre de son programme de certification des plants de fraisier et de framboisier. Il faut noter que si la coloration racinaire à la fuchsine permet d'observer et de dénombrer la présence d'hyphes et d'oogones; elle ne permet pas de discriminer l'espèce de *Phytophthora* en présence. 2) L'emploi de plantes pièges (variétés de fraisiers ou framboisiers très sensibles) selon le test de Duncan (1980) est une méthode de détection très sensible, mais qui nécessite un grand nombre de chambres de croissance. Elle est basée sur l'observation de l'expression des symptômes lorsque les plantes pièges sont incubées à des conditions de croissance favorisant le développement de la maladie. L'établissement d'un diagnostic sur la présence de *Phytophthora* pathogènes est aussi très long (3 à 5 semaines). De plus, la confirmation des symptômes nécessite l'isolement du pathogène. 3) L'emploi de fruits, tels la pomme ou la poire dans des bioessais de trappage sont utilisés pour faciliter la détection, l'isolement et l'identification de beaucoup de *Phytophthora* spp. (Jeffers et Aldwincke, 1987). Cette méthode est moins lourde que le test de Duncan, mais demande d'une à deux semaines de délai avant une confirmation (Duncan *et al.*, 1987; Hamm et Hansen, 1991; Innis, 1995). De plus, les diverses espèces de *Phytophthora* ne sont pas trappées avec la même efficacité (Duncan *et al.*, 1987; Hamm et Hansen, 1991).

La technique de la pomme est couramment utilisée au Ministère des Ressources Naturelles du Québec pour la détection des *Phytophthora* pathogènes des conifères (Innis, 1995). Malheureusement, cette technique n'est pas fonctionnelle avec *P. ragariae* qui ne semble pas infecter les pommes ou très faiblement (Duncan *et al.*, 1987; Wilcox *et al.*, 1993).

L'identification par les profils électrophorétiques des protéines solubles ou des isoenzymes appartient à la classe des méthodes classiques. Elle permet de distinguer les *Phytophthora* pathogènes du framboisier et du fraisier (Gill et Powell, 1968; Bielenin *et al.*, 1988; Mills *et al.*, 1991; Oudemans et Coffey, 1991a, 1991b; Wilcox *et al.*, 1993; Latorre et Pérez, 1995). Cette méthode requiert l'isolement préalable du pathogène (Bonde *et al.*, 1993). Elle permet l'identification au niveau de l'espèce, mais elle est peu sensible (50-100 mg de matières sèches) (Bonde *et al.*, 1993). Des chevauchements importants surviennent lorsque deux espèces sont très proches (Duncan *et al.*, 1991; Briard *et al.*, 1995). En plus, cette technique repose sur l'expression de gènes qui sont affectés par les méthodes culturales du champignon causant ainsi des erreurs d'identification (Panabières *et al.*, 1989).

Les techniques immunologiques du type ELISA qui ciblent des antigènes de surface cellulaire procurent une grande sensibilité. A ce jour, il y a trop peu d'antiséras spécifiques à chacune des espèces de *Phytophthora* pathogènes du fraisier ou du framboisier. De plus, plusieurs auteurs ont observé des réactions non-spécifiques (Amouzou-Alladaye *et al.*, 1988; Ali-Shtayeh, 1991; Ellis et Miller, 1993; Hardham *et al.*, 1994). Cependant, l'obtention d'une réponse diagnostique est très rapide (10 min. à une journée).

Avec les outils moléculaires, de nouvelles techniques de détection ont été développées telles l'établissement du caryotype, les empreintes génétiques, l'emploi de sondes moléculaires chaudes ou froides et les techniques d'amplification des acides nucléiques (PCR). L'analyse du caryotype et des empreintes génétiques demandent l'isolement préalable du champignon et d'importantes quantités de champignons. L'établissement du caryotype est une méthode très longue, et la séparation des chromosomes par électrophorèse en champs pulsés n'est pas parfaitement reproductible (Tooley et Carras, 1992).

Les empreintes génétiques de l'ADN génomique à l'aide d'analyse RFLP permettent la distinction des espèces chez les *Phytophthora*. Mais, cette technique ne permet pas la détermination du pourcentage de similarité entre les différentes espèces (Panabières *et al.*, 1989). Stammler *et al.*, (1993), avec la méthode Southern, distinguent *P. fragariae* var. *rubi* de *P. fragariae* var. *fragariae* par hybridation des empreintes RFLP d'ADN de *P. fragariae* avec des sondes d'ADNmt et génomique. Cette approche diagnostique nécessite toutefois l'isolement des champignons et l'extraction d'ADN en grande quantité. La réalisation de cette technique nécessite de deux à trois jours de travail spécialisé. Ces contraintes rendent difficile l'utilisation de cette approche à des fins diagnostiques routinières. D'autant plus, que ces sondes s'hybrident à l'ADN de plusieurs autres espèces lorsque les empreintes Southern des profils RFLP est délaissée au profit d'une application en point (dot blot) des échantillons d'ADN à identifier (Stammler *et al.*, 1993).

L'emploi de sondes moléculaires sont souvent exclusives soit au genre ou à une espèce particulière (Panabières *et al.*, 1989; Goodwin *et al.*, 1989, 1990; Stammler *et al.*, 1993; Förster et Coffey, 1992; Lee *et al.*, 1993). Leur utilisation ne nécessite pas l'isolement du pathogène. Les sondes sont assez sensibles (1 ng d'ADN). Les réponses de diagnostic demande de 2 à 3 jours. Elles procurent un haut degré d'objectivité ce qui n'est pas permis avec les méthodes traditionnelles (Goodwin *et al.*, 1989, 1990).

L'amplification enzymatique de l'ADN *in vitro* par PCR est l'une des techniques récentes qui permet une grande sensibilité et spécificité pour la détermination des pathogènes de plantes. Elle ne requiert pas l'isolement préalable du pathogène (Henson et French, 1993). La PCR est une méthode simple composée de trois étapes (Saiki *et al.*, 1985): 1) L'ADN est chauffé à température élevée (94°C à 96°C) pour convertir l'ADN double brins en simple brin; 2) La température est ensuite diminuée (au Tm optimale des amorces) afin de permettre aux amorces de s'hybrider à leur site complémentaire sur la séquence cible de l'ADN; 3) L'ADN est allongé par l'addition de nucléotides libres à partir de chacune des amorces par l'action d'une ADN polymérase thermophilique. La répétition de ce processus cyclique de 30 à 35 fois résulte en l'augmentation exponentielle des quantités d'ADN de départ (2^n , n = nombre de cycles). L'avantage majeure de la PCR est de

permettre (au sens théorique) la détection d'une simple molécule d'un mélange complexe d'ADN sans l'emploi de sondes radioactives (Henson et French, 1993). Depuis l'avènement de cette technique, plusieurs systèmes spécifiques d'amplification d'agents phytopathogènes ont été développés (Henson et French, 1993). Des amorces spécifiques d'amplification pour quelques espèces de *Phytophthora* ont été mises au point telles *P. citrophthora* et *P. parasitica* pour leur détection dans les tiges de plants de tomate (Érser *et al.*, 1994). Un autre système a été mis au point dernièrement pour détecter *P. infestans* dans les tubercules et les feuilles de plants de pomme de terre (Niepold et Schoberbutin, 1995). Finalement, Stammler et Seemüller (1993) ont produit des amorces qui amplifient un fragment de 3006 pb chez les deux variétés de l'espèce *P. fragariae*. Ce fragment de 3006 pb inclut les gènes d'ADNr

Beaucoup de techniques sont reliées à la PCR, quatre d'entre elles seront mentionnées ici. 1) L'utilisation d'enzymes de restriction sur un fragment PCR est utilisé pour différencier une espèce de l'autre ou une race d'une autre présentant des polymorphismes RFLP (Henson et French, 1993; Mugnier et Grosjean, 1995; Gardes et Bruns, 1996). 2) L'emploi de la "nested PCR" c.i.e de l'amplification d'un fragment PCR par l'emploi d'amorces internes d'un premier produit PCR de plus grande taille permet d'augmenter la sensibilité et la spécificité de détection (Henson *et al.*, 1993; Fell, 1995; Ferreira *et al.*, 1996). 3) Le séquençage par PCR est aussi un outil très utile dans la détermination de la variabilité génétique qui évite le temps requis par les étapes de clonage (Rao, 1994). 4) L'emploi de sondes moléculaires permet aussi la détection d'espèce à partir de produits PCR (Rollo *et al.*, 1990; Gardes *et al.*, 1991; Nazar *et al.*, 1991; Lévesque *et al.*, 1994).

La RAPD de l'anglais "Random Amplified Polymorphisms DNA" dérive de la PCR par l'emploi de courtes amorces (6 à 10 mers) aléatoires (Williams *et al.*, 1991). Cette technique permet d'obtenir des polymorphismes de fragments aléatoires à partir de l'ADN nucléaire. L'emploi de la RAPD permet de faire des distinctions aux niveaux des populations et à l'intérieur des espèces, mais demande au préalable l'isolement du pathogène (Mills *et al.*, 1992; Bounou, 1996). Quelques études chez les *Phytophthora* ont été publiées récemment (Judelson *et al.*, 1995; Tyler *et al.*, 1995; Whisson *et al.*, 1995). Des sondes froides ou chaudes ainsi que des amorces spécifiques peuvent dérivées d'un fragment RAPD spécifique à une

espèce ou sous-espèce pour une détection directe ou indirecte de tissus infectés (Crowhurst *et al.*, 1991; Hadrys *et al.*, 1992; Jones et Dunkles, 1993; Li *et al.*, 1993; Pryor *et al.*, 1994; Wiglesworth *et al.*, 1994; Lanfranco *et al.*, 1995; Bounou, 1996).

1.4.2- Les régions d'ADN ciblées pour la PCR chez les champignons

Toute séquence d'ADN ou d'ARN qui est spécifique à un organisme particulier peut être utilisée pour la détection PCR (Henson et French, 1993). Cette séquence est d'origine connue (voir section 1.4.2.1 à 1.4.2.3) ou anonyme (Rollo *et al.*, 1990; Érsek *et al.*; 1994). Les régions anonymes proviennent habituellement d'un clone particulier à copie unique ou répétée (Henson et French, 1993). Ces régions anonymes ne seront pas discutées ici car le criblage d'une banque de clones ne correspond pas à nos objectifs (voir chapitre 2). Les régions cibles utilisées pour la PCR et décrites dans les sections suivantes seront celles codantes pour des protéines, l'ADNmt et l'ADNr.

1.4.2.1- Les régions d'ADN codant pour des protéines

Peu de systèmes d'amplification PCR sont basés sur des séquences uniques de gènes codant pour des protéines, car il y a une perte de sensibilité de détection (Johnston et Aust, 1994). Johnston et Aust (1994) ont utilisés des amorces amplifiant spécifiquement la ligninase H8 chez *Phanerochaete chrysosporium*. Ils n'obtenaient aucune amplification en dessous de 70 ng d'ADN comparativement à l'emploi des ITS des gènes d'ADNr nécessitant seulement 3 ng de matières sèches et un minimum de 14 ng par 100 µg d'ADN total extrait à partir de 1 g de sol. De plus, peu de gènes sont caractérisés chez les champignons phytopathogènes. Par conséquent, le niveau de conservation de la séquence d'ADN d'un gène codant pour une protéine peut influencer le niveau taxonomique ciblé (Bruns *et al.*, 1991; Bousquet, 1995). Ce sont deux de ces raisons pour laquelle les méthodes de détection sont basées surtout sur les gènes d'ADNr ou d'ADNmt (voir section 1.4.2.2 et 1.4.2.3). Les gènes à séquence unique sont aussi utiles pour identifier et distinguer des races. Par exemple, l'amplification spécifique du gène HC-toxin (tétrapeptide cyclique) est retrouvé seulement chez la race 1 de *Cochliobolus carbonum*, pathogène des graminés.

Les classes de gènes codant pour des protéines sont aussi utilisées (Glass et Donaldson, 1995). Par exemple, les produits PCR des Ascomycètes obtenus avec cinq groupes d'amorces contiennent chacun des polymorphismes de longueur et de RFLP. Ces cinq groupes d'amorces sont Pst2 pour le gène de la β -tubuline, H3-1 et H4-1 pour les histones 3 et 4 respectivement, A1 pour les ATPases plasmamembranaires et les ITS. Ces polymorphismes sont associés à des variations de la longueur ou du nombre d'introns. À l'intérieur d'une espèce (comme chez le *Fusarium oxysporum*), on ne retrouve pas de polymorphismes de longueur mais des polymorphismes RFLP. Le niveau de polymorphisme entre les gènes est similaire à la région ITS des gènes d'ADNr. Notez que les gènes codant pour les histones sont répétés en tandem de 50 à 500 copies par cellule chez les organismes multicellulaires (Darnell *et al.*, 1986). Chez les *Phytophthora*, Unkles *et al.* (1992) ont amplifié par PCR avec des amorces dégénérées la famille des protéines dite "doigt de zinc" (Zinc finger). Les domaines des doigts de zinc sont organisés en tandem répété et les polymorphismes observés sont complexes et spécifiques à l'espèce. Les espèces de *Phytophthora* utilisées dans cette étude sont les suivantes: *P. fragariae*, *P. cactorum*, *P. megasperma*, *P. nicotianae*, *P. palmivora*, *P. cambivora*, *P. citricola* et *P. infestans*. Cet outil ne permet pas cependant d'identifier des races à l'intérieur d'une espèce. Il a une sensibilité limitée à 0,5 ng d'ADN fongique.

1.4.2.2- L'ADN mitochondrial

L'ADNmt des champignons a été largement utilisé comme source de marqueurs moléculaires pour l'évolution (Bruns *et al.*, 1991), la taxonomie (Martin et Kistler, 1990) et les études de diversité génétique (Förster et Coffey, 1992, 1993). Un haut niveau de diversité est communément trouvé au niveau de l'ADNmt (Förster et Coffey, 1992, 1993; Förster *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 1993; Martin et Kistler, 1990; Milgroom et Lipari, 1993). La petite taille du génome mitochondrial (Bruns *et al.*, 1991; White *et al.*, 1990) et l'existence de régions variables et conservées sont appropriées pour l'évaluation de la variation génétique permettant la différenciation d'espèces voisines (Li *et al.*, 1994). Le grand nombre de copies de l'ADNmt dû au nombre d'organelles présents en font une cible de choix pour la PCR (Henson et French, 1993). La cause majeure de la variation intraspécifique dans l'ADNmt est

attribuée à des événements de délétion et d'insertion (Carter *et al.*, 1990; Li *et al.*; 1994). L'ADNr mitochondrial est composé de deux sous-unités (White *et al.*, 1990). L'emploi de la PSU de l'ADNr mitochondrial a permis l'identification et la détection de quelques phytopathogènes soit par amplification PCR avec des amorces spécifiques (Li *et al.*, 1994) ou soit par l'utilisation de sondes moléculaires (Ward et Gray, 1992; Stammler *et al.*, 1993) . Des amorces spécifiques d'amplification de l'ADNmt de *Tilletia indica* ont une sensibilité de détection de 500 pg et avec un système d'amplification avec des amorces internes (nested PCR) de 1 pg à partir de mycélium purifié (Ferreira *et al.*, 1996). De même, Henson *et al.* (1993) ont amplifié par des amorces interne une région d'ADNmt spécifique à *Gaeumannomyces graminis*. La seule difficulté majeure de l'utilisation de l'ADNmt est l'étape d'isolement qui nécessite un gradient de centrifugation rendant la procédure plus lourde (Ferreira *et al.*, 1996).

1.4.2.3- L'ADN ribosomal nucléaire

Les ADNr nucléaires codent pour les gènes des ARNr constitutifs impliqués entre autres dans le bon positionnement des ARNm pour leur traduction en protéine (Lewin, 1994). Les ADNr sont organisés en domaines d'unités invariables répétées en tandem. Une unité est constituée des trois plus grands gènes d'ARNr (18S, 5.8S, 28S) (voir figure 1.3) séparés par deux espaceurs internes transcrits (ITS). Chaque unité est séparé d'une autre unité par un espaceur intergénique non-transcrit [IGS ou IGR, formellement appelé espaceur non-transcrit (NTS)] (Bruns *et al.*, 1991; Henson et French, 1993; Jorgensen et Cluster, 1988). On retrouve de 60 à 200 copies des répétitions en tandem par génome haploïde chez les champignons (Bruns *et al.*, 1991, Yao *et al.*, 1992). De plus, plusieurs séquences amorces leurs sont associées et leur amplification nécessite peu d'ADN ce qui permet une haute sensibilité de détection (White *et al.*, 1990). Les copies multiples des unités répétées semblent très homogènes en concert avec l'évolution horizontale (Li et Graur, 1991). En générale, il n'y a qu'une seule copie (séquence unique) de chacun des gènes d'ADNr (Bruns *et al.*, 1991; Henson et French, 1993).

Les portions géniques des ADNr sont hautements conservées, elles évoluent lentement. Elles sont un outil de choix dans les études systématiques chez les champignons (Bruns *et al.*, 1991). Par conséquent, plusieurs tests de détection

PCR au niveau des familles et des genres sont connus, comme par exemple les champignons endomycorhiziens, les levures et le genre *Pythium* (Simon *et al.*, 1992; Chen et Hoy, 1993; Henrion *et al.*, 1992; Fell, 1995).

L'ordre des gènes d'ARNr apparaît être universellement conservé à l'exception du gène 5S lequel peut ou pas être à l'intérieur des répétitions. Il peut exister en orientation inverse comme chez les Basidiomycètes (Henson et French, 1993). Le gène 5S de l'ARNr est très petit. Il évolue trop rapidement pour être souhaitable à employer dans les études établissant des relations entre les champignons (Bruns *et al.*, 1991).

De grandes variations génétiques sont trouvées dans les ITS et les espaces transcrits des ARNr, car leur évolution est plus rapide que les portions géniques. Les ITS permettent de différencier les espèces à l'intérieur d'un genre ou parmi une population (Henson et French, 1993; White *et al.*, 1990). Ils sont largement utilisés pour la fabrication d'amorces spécifiques d'identification et/ou de détection de genres (Gardes et Bruns, 1993) et d'espèces (Mills *et al.*, 1992; Chen, 1994; Lovic *et al.*, 1994, 1995; Moukhamedov *et al.*, 1994; Tisserat *et al.*, 1994; Beck et Ligon, 1995; Di Bonito *et al.*, 1995; Goodwin *et al.*, 1995). L'analyse des deux régions ITS d'ADNr de plusieurs espèces de *Phytophthora* a permis de conclure à la validité de l'emploi des critères morphologiques utilisés dans la classification de Waterhouse (Crawford *et al.*, 1996). Notons qu'aucune espèce isolée de racines de framboisier ou de fraisier n'a été analysée par ces auteurs. Finalement, Cooke *et al.* (1996) comparent les séquences des régions ITS de cinq espèces de *Phytophthora* du groupe I et observent peu de variations interspécifiques.

La distinction d'espèces par les RFLP des produits PCR des régions ITS a aussi été appliquée avec succès (Chen, 1992; Chen *et al.*, 1992; Henrion *et al.*, 1992; Chen et Hoy, 1993; Liu et Sinclair, 1993; Johnston et Aust, 1994; Rafin *et al.*, 1994). Cette approche a été particulièrement fructueuse pour la différenciation des espèces du genre *Pythium* (Mugnier et Grosjean, 1995). L'approche PCR-RFLP des régions ITS a même permis d'établir une différenciation intraspécifique chez le *Fusarium sambucinum*, le *Leptosphaeria maculans* et le *Rhizoctonia solani* (O'Donnell, 1992; Xue *et al.*, 1992; Boysen *et al.*, 1996).

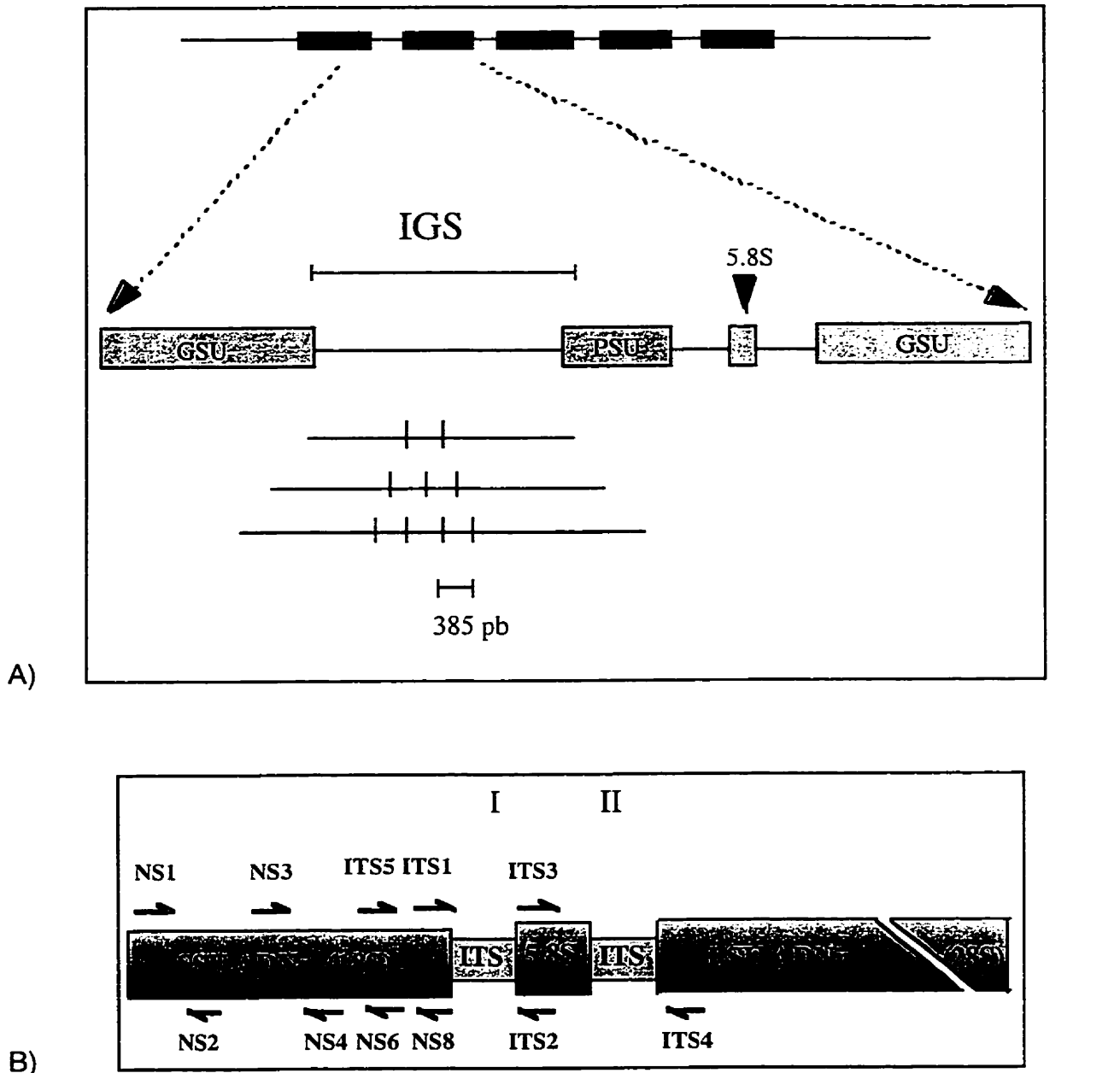


Figure 1.3: Schéma représentant la structure des gènes d'ADNr. A) Ci-haut: Schéma de la structure répétée en tandem des ADNr. Ci-bas: Schéma agrandi d'une unité complète avec la localisation des ADNr et la région intergénique IGS. Les lignes horizontales représentent le polymorphisme de longueur des IGS variant selon le nombre de sous-répétitions de 385 pb chez *Pythium ultimum* (tiré de Buchklo et Klassen, 1990). B) Localisation des amorces PCR universelles sur l'ADNr. La tête des flèches représente le bout 3' de chaque amorce. PSU (SSU) et GSU (LSU) réfèrent à la petite sous-unité ribosomique 18S et à la grande sous-unité 28S d'ARNr. ITS et IGS réfèrent aux espaceurs internes transcrits et aux espaceurs intergéniques, respectivement (tiré de White *et al.*, 1990).

On retrouve encore plus de polymorphismes dans les IGS, ou dans les régions non-codantes qui entourent les domaines d'unités d'ADNr répétés chez les champignons (Kim *et al.*, 1992; Henson et French, 1993). La longueur des domaines répétés d'unité ribosomique est constante, par contre la variation du nombre de sous-répétitions de petits motifs constants d'ADN modifie la longueur de l'IGS. Cette variation de longueur des IGS est la cause du polymorphisme. Ce polymorphisme des IGS est retrouvé chez les plantes, les animaux, les champignons et surtout les Oomycètes (Flavell *et al.*, 1986; Rogers *et al.*, 1986; Cluster *et al.*, 1987; Rogers et Bendisch, 1987; Klassen et Buchko, 1990; Buchko et Klassen, 1990; Martin, 1991; Henrion *et al.*, 1992, 1994). Ainsi, la longueur des IGS varie significativement au niveau intraspécifique (Bruns *et al.*, 1991). Les nombreuses sous-répétitions des IGS jouent un rôle essentiel dans le maintien élevé du nombre de copies des ARNr, car elles ont un fort effet activateur sur l'ARN polymérase I, responsable de la transcription (Reeder, 1984).

1.5- Hypothèse et objectifs

Plus d'une dizaine d'espèces de *Phytophthora* sont pathogènes au framboisier. *P. fragariae* var. *rubi* est la plus virulente. La variété *P. fragariae* var. *fragariae* cause la stèle rouge du fraisier. Ces deux variétés sont morphologiquement semblables. Des races pathogéniques de chacune des variétés du *P. fragariae* ont été caractérisées.

Les méthodes traditionnelles d'identification sont basées sur l'observation des caractéristiques morphologiques, physiologiques et pathogéniques. Bien que simples à réaliser, ces méthodes sont longues. Elles exigent beaucoup de prises de données et elles nécessitent souvent l'isolement du champignon pathogène. De plus, les chevauchements des écarts de mesures des valeurs moyennes de plusieurs caractères morphologiques essentiels à la classification taxonomique de Waterhouse peuvent conduire à des erreurs d'identification, ou tout au moins, accentuent la subjectivité des tests d'identification.

Les progrès de la biologie moléculaire ont facilité la mise au point de techniques d'investigation du génome des champignons. Les informations générées par les

outils moléculaires comme les sondes nucléaires, les profils RFLP, les techniques d'amplification spécifique ou aléatoires, le séquençage de l'ADN ont résolu plusieurs dilemmes taxonomiques. L'analyse des séquences des gènes de l'ADNr nucléaire, et plus particulièrement des régions ITS, pour évaluer la variabilité interspécifique et intraspécifique de plusieurs genre fongiques en est un bon exemple.

En regard de la problématique posée par le pourridié des racines du framboisier causé par des *Phytophthora* pathogènes, l'hypothèse suivante a été formulé: "La variabilité des séquences des régions ITS de l'ADNr nucléaire des *Phytophthora* causant le pourridié des racines du framboisier permettra leur identification spécifique".

Six objectifs ont été fixés pour vérifier cette hypothèse, soit: 1) Séquencer les deux régions ITS de *P. fragariae* var. *rubi* et évaluer leur variabilité intraspécifique. 2) Séquencer les deux régions ITS de *P. fragariae* var. *fragariae* et évaluer leur variabilité intraspécifique. 3) Comparer les séquences de la région ITS I et de la région ITS II de chacune des variétés de *P. fragariae*. 4) Comparer les séquences des régions ITS des deux variétés du *P. fragariae* avec celles des autres *Phytophthora* spp. et *Pythium* spp. 5) Produire un test d'identification génétique des espèces de *Phytophthora* pathogènes du framboisier qui utilise les régions ITS de l'ADNr nucléaire. 6) Optimiser l'emploi des amorces PS3003-1 (PS1) et PS3003-2 (PS2) décrite par Stammler *et al.*, (1993) pour produire un test d'identification qui génère un fragment amplifié inférieur à 1 500 pb et spécifique aux *P. fragariae*.

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Notez que les produits chimiques utilisés sont de qualité analytique et les produits moléculaires sont de qualité biologie moléculaire. Sauf indication contraire, le terme H₂O désigne de l'eau distillée et déminéralisée. De plus, les coordonnées des compagnies mentionnées dans cette étude ne sont citées que lors de leur première apparition afin d'alléger le texte.

2.1- Conservation et culture des isolats

2.1.1- Le matériel fongique utilisé

La banque de champignon utilisée était constituée d'isolats de différentes espèces de *Phytophthora*, de *Pythium* et d'isolats de *Fusarium oxysporum*, de *Rhizoctonia solani* et de *Verticillium dahliae*. Le numéro d'identification et la provenance des isolats sont indiqués au tableau 2.1.

2.1.2- Conservation des isolats

La banque fongique a été conservée sur milieu MCV8 (ACV8 modifié), un milieu d'agar et de jus de légume V8 clarifié (ACV8) enrichi d'antibiotiques bactériens. Les antibiotiques utilisés ont été ceux déterminés par Jeffers et Martin (1986) pour le milieu P₅AR (Pimaricin, Ampicilline, Rifampicin). Seuls, les *Verticillium* ont été conservés sur PDA. La composition des milieux MCV8, ACV8 et PDA est décrite à

Tableau 2.1: Répertoire de l'identité et de la provenance des champignons utilisés.

GENRE	ESPECE	RACE	No. ldd.	Plant Hôte	Pays	Source
<i>Fusarium</i>	<i>oxysporum</i>	Nil	992-B	pois mange-tout	N.D.	1
<i>Fusarium</i>	<i>oxysporum</i>	Nil	249	sol (terre)	N.D.	1
<i>Fusarium</i>	<i>oxysporum</i>	Nil	1835	Mais en grain	N.D.	1
<i>Fusarium</i>	<i>oxysporum</i>	Nil	Nil	N.D.	N.D.	N. D.
<i>Phytophthora</i>	<i>cactorum</i>	Nil	1570	Fraise	N.D.	1
<i>Phytophthora</i>	<i>cactorum</i>	Nil	28946	Pomme	É.-U.	7
<i>Phytophthora</i>	<i>cactorum</i>	Nil	44100	Fraise	Allemagne	7
<i>Phytophthora</i>	<i>cambivora</i>	A1	56888	Pomme	N.D.	7
<i>Phytophthora</i>	<i>cinnamomi</i>	Nil	46292	Rhododendron	É.-U.	7
<i>Phytophthora</i>	<i>cinnamomi</i>	Nil	U.S.	N.D.	Canada	2
<i>Phytophthora</i>	<i>cryptogea</i>	N.D.	BR521	Tomate	Nouv. Zélande	8
<i>Phytophthora</i>	<i>erythroseptica</i>	N.D.	392	Framboisier	Pacific NW	4
<i>Phytophthora</i>	<i>erythroseptica</i>	N.D.	399	Framboisier	Pacific NW	4
<i>Phytophthora</i>	<i>erythroseptica</i>	N.D.	Ei	N.D.	N.D.	7
<i>Phytophthora</i>	<i>fragariae</i>	N.D.	430	Fraisier	É.-U.	4
<i>Phytophthora</i>	<i>fragariae</i>	N.D.	May	Fraisier	Canada	1
<i>Phytophthora</i>	<i>fragariae</i>	N.D.	MayUS	Fraisier	Canada	2
<i>Phytophthora</i>	<i>fragariae</i> var. <i>fragariae</i>	A1	PfA1	Fraisier	Canada	6
<i>Phytophthora</i>	<i>fragariae</i> var. <i>fragariae</i>	A2	PfA2	Fraisier	Canada	6
<i>Phytophthora</i>	<i>fragariae</i> var. <i>fragariae</i>	A3	PfA3	Fraisier	Canada	6
<i>Phytophthora</i>	<i>fragariae</i> var. <i>fragariae</i>	A4	PfA4	Fraisier	Canada	6
<i>Phytophthora</i>	<i>fragariae</i> var. <i>fragariae</i>	A5	PfA5	Fraisier	Canada	6
<i>Phytophthora</i>	<i>fragariae</i> var. <i>fragariae</i>	A6	PfA6	Fraisier	Canada	6
<i>Phytophthora</i>	<i>fragariae</i> var. <i>fragariae</i>	A7	PfA7	Fraisier	Canada	6
<i>Phytophthora</i>	<i>fragariae</i> var. <i>fragariae</i>	A8	PfA8	Fraisier	Canada	6
<i>Phytophthora</i>	<i>fragariae</i> var. <i>fragariae</i>	A9	PfA9	Fraisier	Canada	6
<i>Phytophthora</i>	<i>fragariae</i> var. <i>fragariae</i>	A10	PfA10	Fraisier	Canada	6
<i>Phytophthora</i>	<i>fragariae</i> var. <i>fragariae</i>	N.D.	E	Fraisier	Suisse	12
<i>Phytophthora</i>	<i>fragariae</i> var. <i>fragariae</i>	N.D.	G	Fraisier	Suisse	12
<i>Phytophthora</i>	<i>fragariae</i> var. <i>fragariae</i>	N.D.	Pt47	Fraisier	Allemagne	12
<i>Phytophthora</i>	<i>fragariae</i> var. <i>rubi</i>	N.D.	390	Framboisier	Allemagne	13
<i>Phytophthora</i>	<i>fragariae</i> var. <i>rubi</i>	N.D.	M10	Framboisier	Allemagne	14
<i>Phytophthora</i>	<i>fragariae</i> var. <i>rubi</i>	N.D.	545	Framboisier	Allemagne	13
<i>Phytophthora</i>	<i>fragariae</i> var. <i>rubi</i>	N.D.	93	Framboisier	Allemagne	13
<i>Phytophthora</i>	<i>fragariae</i> var. <i>rubi</i>	N.D.	G1	Framboisier	Allemagne	14
<i>Phytophthora</i>	N.D.	N.D.	745	Framboisier	Canada	1
<i>Phytophthora</i>	N.D.	N.D.	1232	Framboisier	Canada	1
<i>Phytophthora</i>	N.D.	N.D.	1369	Framboisier	Canada	1
<i>Phytophthora</i>	N.D.	N.D.	111009	Framboisier	N.D.	7
<i>Phytophthora</i>	N.D.	N.D.	Path	Framboisier	Canada	1

Tableau 2.1: Répertoire de l'identité et de la provenance des champignons utilisés.

<i>Phytophthora</i>	N.D.	N.D.	ML2	Framboisier	Canada	2
<i>Phytophthora</i>	<i>infestans</i>	N.D.	866	Patate	Canada	1
<i>Phytophthora</i>	<i>infestans</i>	A1	Pi A1	N.D.	Canada	5
<i>Phytophthora</i>	<i>infestans</i>	A2	Pi A2	N.D.	Canada	5
<i>Phytophthora</i>	<i>megasperma</i>	N.D.	926	Lupin	Canada	1
<i>Phytophthora</i>	<i>megasperma</i>	N.D.	56892	Pomme	N.D.	7
<i>Phytophthora</i>	<i>megasperma</i>	N.D.	lab	Framboisier	Canada	1
<i>Phytophthora</i>	<i>megasperma</i>	N.D.	Lab-F3	Framboisier	Canada	1
<i>Phytophthora</i>	<i>megasperma type 2</i>	N.D.	425	Framboisier	Allemagne	4
<i>Phytophthora</i>	<i>meg var. megasperma</i>	BHR	416	Framboisier	Écosse	4
<i>Phytophthora</i>	<i>meg var. magasperma</i>	BHR	420	Framboisier	E.-U.	4
<i>Phytophthora</i>	N.D.	N.D.	314	Épinette rouge	Canada	1
<i>Phytophthora</i>	N.D.	N.D.	100	Sapin	Canada	3
<i>Phytophthora</i>	N.D.	N.D.	102	Sapin	Canada	3
<i>Pythium</i>	<i>aphanidermatum</i>	Nil	2367	Concombre	N.D.	1
<i>Pythium</i>	<i>ultimum</i>	Nil	447	N.D.	N.D.	8
<i>Rhizoctonia</i>	<i>solani</i>	AG3	AG3	N.D.	N.D.	9
<i>Rhizoctonia</i>	<i>solani</i>	AG1	13248	N.D.	N.D.	10
<i>Verticillium</i>	<i>dahliae</i>	6881	Nil	N.D.	Canada	11
<i>Verticillium</i>	<i>dahliae</i>	6901	Nil	N.D.	Canada	11

1: Laboratoire de diagnostique, MAPAQ, Ste-Foy, Québec, Canada.

2: Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, a/s Dr. Carole Beaulieu.

3: Ministère des Forêts du Québec, Ste-Foy, Québec, Canada, a/s Dr. Louise Innes.

4: Collection de l'université de l'état d'Oregon, É.-U., a/s Dr. Hansen.

5: Laboratoire de Léon Tartier, MAPAQ, St-Hyacinthe, Québec, Canada.

6: Station de la Nouvelle-Écosse, Agriculture Canada, Canada, a/s du Dr. Nancy Nicholson.

7: Souche provenant de l'ATCC

8: Laboratoire de Biosystématique, Ottawa, Canada, a/s Dr. Barr

9: Université Laval, Ste-Foy, Canada, a/s Dr. P. -M. Charest.

10: Station Des Buissons a/s Barbara Otryscko

11: Agriculture Canada, Charleton, Iles du Prince-Édouard, Canada, a/s Velma MacLean.

12: Centre Fédéral de Biologie pour l'Agriculture et la Foresterie, Dossenheim, Allemagne,
a/s Dr. E. Seemüller

13: Isolé par P. Schödel (voir #12)

14: Isolé par S. Keinath (voir #12)

N.D.: non-déterminé

l'annexe A (section A). Tous les champignons de la banque ont été cultivés à la noirceur (16°C) et ils ont été repiqués aux 2 à 3 mois.

2.1.3- Culture des isolats pour l'extraction de l'ADN

La plupart des isolats soumis à l'extraction d'ADN ont été repiqués de la banque mère sur milieu ACV8 ou GCV8. Le milieu GCV8 est fait à base de Gel-Gro® (ICN Biochemicals, Cleveland, OH, É.-U.) et de V8 clarifié. Le Gel-Gro, un agent gélifiant, est un polysaccharide acétylé complexe composé d'acide glucuronique, de rhamnose, et de glucose (gellam gum). Le *P. erythroseptica*, isolat Ei a été repiqué sur milieu MEA, car sur milieu ACV8, il produisait peu ou pas d'hyphe aérien (Duncan *et al.*, 1987; Duncan *et al.*, 1991). Les isolats de *Verticillium dahliae* ont été repiqués sur milieu GPD. Le GPD est un milieu à base de Gel-Gro et de bouillon de dextrose de pomme de terre. La composition des milieux GCV8, MEA et GPD est décrite à l'annexe A (section A et B). Tous les isolats ont été incubés en chambre de croissance pour une période minimale de 2 semaines à 20°C, à la noirceur.

Le mycélium sur milieu ACV8, ou MEA a été récolté par grattage du mycélium aérien sur la gélose à l'aide d'un scalpel en prenant soin de minimiser la quantité d'agar recueilli. Pour la récolte du mycélium sur milieu GCV8 ou GPD, les géloses ont été préalablement solubilisées par un tampon citrate, et le mycélium a été recueilli par filtration sous vide. Le protocole de solubilisation est décrit à l'annexe A (section C). Il est aussi important de s'assurer, par des lavages successifs (2 à 3 fois) à l'H₂O stérile, que toute trace de Gel-Gro a été éliminée, car le Gel-Gro précipite avec l'ADN lors de l'extraction. Le mycélium récupéré a ensuite été lyophilisé pour une période variant de 24 à 48 heures.

2.2- Isolement de l'ADN

2.2.1- Extraction de l'ADN génomique

Le mycélium lyophilisé de chacun des isolats a été broyé dans l'azote liquide. Les

mycéliums ont ensuite été extraits selon le protocole d'isolement de l'ADN de Lee et Taylor (1990) en annexe A (section D). Une quantité de 20 à 60 mg de mycélium lyophilisé a été pesée et déposée dans un tube de 1,5 mL. Un volume de 400 à 700 μL de tampon de lyse a été ajouté selon la viscosité du mélange. Le mélange a été vortexé afin de le rendre homogène. Par la suite, le mélange a été incubé à 65°C pendant une heure. Un volume de phénol:chloroforme équivalent à celui du tampon de lyse (1:1) a été ajouté au mélange incubé (voir annexe A, section D). Les tubes ont été inversés de 1 à 2 fois pour bien répartir les solvants. Les tubes ont été centrifugés à 10,000 x g pendant 15 min. La phase aqueuse (300 à 350 μL) a été retirée et déposée dans un nouveau tube. Un volume de 0,033 (v/v) de NaOAc 3M (pH 8,0) et un volume de 0,54 (v/v) d'isopropanol froid (-20°C) ont été ajoutés à la phase aqueuse. Les tubes ont été inversés à 2 reprises, et centrifugés à 10,000 x g pendant 2 min. Le surnageant a été jeté et le culot lavé avec 1 mL d'éthanol 70%. Le culot d'ADN a ensuite été séché par centrifugation sous-vide au "speed-vac" (Savant, Holbrook, NY, É.-U.). Il a été resuspendu dans 100 à 500 μL d' H_2O stérile de qualité HPLC. La resuspension du culot a été facilitée par une incubation à 65°C pendant 15 à 30 min. Les ADN ont été conservés à -20°C pour l'utilisation courante et à -80°C pour une conservation à plus long terme. Pour des extractions d'ADN avec de plus grandes quantités de mycélium, les tubes en verre "Correx" de 15 ou 30 mL ont été utilisés. Les solutions utilisées sont les mêmes, mais les volumes utilisés lors des différentes étapes ont été augmentés de 10 fois.

2.2.2- Évaluation de la quantité et de la qualité de l'ADN

La quantité et la qualité de l'ADN génomique ont été évaluées par deux méthodes; soit par électrophorèse en gel d'agarose, soit par spectre d'absorbance dans l'ultraviolet. Pour la méthode par électrophorèse en gel d'agarose, 5 à 10 μL d'ADN extrait et 2 μL de solution de dépôt (voir la composition à l'annexe B) ont été déposés pour chaque puits sur un gel d'agarose 0,8% (p/v) dans du tampon TAE 1 X. La migration a été effectuée à 150 volts sous un voltage constant pendant 30 à 40 min pour un petit gel (30 mL de gel, dimensions: 8,3 x 10,8 x 0,33 cm) ou pendant 1,5 à 2 heures pour un grand gel (200 mL, dimensions: 20 x 20 x 0,5 cm). Le gel d'agarose a ensuite été coloré dans du bromure d'éthidium (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) pendant 15 à 20 min. Après, il a été décoloré pendant 15 à 20 min dans l' H_2O . L'ADN génomique a été visualisé par illumination avec une lampe UV à

ondes longues (360 nm). Par la suite, le gel a été photographié sur film Polaroid (Cambridge, MA, É.-U.) de type 53 ou 55. La concentration en ADN a été déterminée par la comparaison de l'intensité de la fluorescence de la bande d'ADN à celle des bandes de concentration connues du standard d'ADN en échelle de 1 Kb de Gibco BRL (Life Technologies, Burlington, ON). Un ADN de qualité se caractérisait par l'absence d'une trainée fluorescente causée par la migration de plusieurs fragments d'ADN de faibles masses moléculaires. La deuxième méthode consistait à déterminer la pureté et la concentration des acides nucléiques en mesurant l'absorbance à 260 et 280 nm (Maniatis *et al.*, 1982). Une unité d'absorbance correspond à une concentration de 50 µg/mL d'ADN double brin. Le rapport $D.O_{260nm}$ sur $D.O_{280nm}$ nous révèle la proportion de protéines contaminantes. Un rapport de 2 indique l'absence de quantités significatives de protéines dans la solution d'acides nucléiques.

2.3- Système d'amplification

Diverses combinaisons d'amorces localisées au niveau des gènes d'ADNr ont été utilisées avec l'objectif de trouver un système spécifique et sensible à l'amplification PCR de *P. fragariae* var. *rubi* et des autres espèces de *Phytophthora* pathogènes dans les racines du framboisier et dans les sols.

2.3.1- Produits et protocoles utilisés pour les systèmes PCR

La description et/ou la source des produits utilisés dans les "pré-mix" des divers systèmes d'amplification sont décrites ci-dessous. Le tampon PCR utilisé est le GeneAMP® PCR Buffer 10 X de Perkin Elmer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH8,3, 15 mM MgCl₂, 0,01% (p/v) gélatine). Les nucléotides (dNTPs) proviennent des compagnies Perkin Elmer (Mississauga, ON) ou Pharmacia et le MgCl₂ 25 mM de Perkin Elmer ou de Boehringer Mannheim (Laval, QC). L'ADN polymérase utilisée est l'AmpliTaq® DNA polymerase de Perkin Elmer. Les quantités et les concentrations de ces produits sont mentionnées dans les sections respectives. De plus, les manipulations suivantes sont réalisées de façon routinière afin de permettre le bon fonctionnement des systèmes PCR et d'analyser les résultats d'amplification. Cinquante µL d'huile de paraffine ont été ajoutés à la surface du volume réactionnel de chacun des tubes d'amplifications afin de prévenir

l'évaporation. Les amplifications ont été effectuées dans un thermocycleur Tempronie (Barnstead/Thermolyne, Dubuque, IW, É.-U.) où une goutte d'huile minérale a été ajoutée à chacun des puits du thermocycleur afin de maximiser les échanges de chaleur. Les détails relatifs aux paramètres d'amplification des divers systèmes ont été décrits aux sections concernées. Les produits des amplifications ont été analysés par électrophorèse en gel d'agarose 1,4% (p/v) selon les mêmes conditions que celles décrites à la section 2.2.2.

2.3.2- Système PS1-PS2

Le système d'amplification PS1-PS2, dérivé des amorces PS3003-1 et PS3003-2 de Stammler et Seemüller (1993), et utilisé selon leurs paramètres expérimentaux, amplifie de façon spécifique *P. fragariae* var. *rubi* dans les racines de framboisier. Le matériel d'amplification et le thermocycleur disponibles n'étant pas les mêmes que ceux utilisés par Stammler et Seemüller (1993), une mise au point de ce système a dû être effectuée. L'amorce PS1 est localisée au niveau de la sous-unité d'ADNr 28S tandis que l'amorce PS2 est localisée en amont (500 pb) de la sous-unité 18S au niveau de l'IGS (InterGenic Spacer) (voir figure 2.1). Les amorces PS1-PS2 ont été synthétisées par la compagnie Bio/Can Scientific Inc. (Mississauga, ON) et aussi par l'université de Sherbrooke (a/s Dr. Carole Beaulieu). La composition en nucléotide de ces amorces est notée au tableau 2.2. L'amplification a été effectuée dans un volume réactionnel de 25 µL comprenant 2,5 µL/tube de tampon PCR, 200 µM final de chacun des dNTPs, 1 µM de chacune des amorces, 1,25 U d'ADN polymérase, 1 µL de MgCl₂ 25 mM pour une concentration totale et finale de MgCl₂ de 2,5 mM. Un µL d'ADN 100 ng/µL a été additionné au cocktail d'amplification. L'amplification a été effectuée selon le programme A (voir tableau 2.3). Les températures d'hybridation 45, 50, 55, 60 et 65°C ont été vérifiées.

2.3.3- Autres systèmes d'amorces

Lee *et al.* (1993) ont mis au point une sonde de 20 mers appelé "Phyto". Cette sonde est spécifique au genre *Phytophthora*. Elle a été utilisée en hybridation par application en points (dot blot). Dans cette étude, la sonde Phyto est utilisée comme amorce d'amplification dans le but de déterminer sa spécificité lorsqu'elle est

combinée avec d'autres amorces situées sur les gènes d'ADNr (voir figure 2.1). De plus, les deux amorces PS1 et PS2 ont aussi été utilisées en combinaison avec Phyto et d'autres amorces des gènes d'ADNr. L'amorce Phyto s'hybride au niveau des 20 dernières bases en bout 3' de la région ITS1. Les autres amorces utilisées dans les systèmes de combinaison sont ITS1, NS2, ITS2, ITS3 et ITS4 localisées au niveau des sous-unités 18S, 5.8S ou 28S des gènes d'ADNr (White *et al.*, 1990; voir figure 1.1 ou 2.1). Ces amorces ont été synthétisées par la compagnie Bio/Can. Les séquences nucléotidiques ainsi que les caractéristiques de toutes ces amorces sont décrites au tableau 2.2. L'amplification a été effectuée dans un volume réactionnel de 50 μ L comprenant 5 μ L/tube de tampon PCR, 200 μ M final de chacun des dNTPs, 0,4 μ M de chacune des amorces, 1,25 U d'ADN polymérase, et 10 μ L d'ADN 10 ng/ μ L. L'amplification a été effectuée suivant le programme A ou B selon la combinaison d'amorces utilisée (voir tableau 2.3 et 2.4). Les températures optimales d'hybridation sélectionnées pour l'amplification de chacun des systèmes d'amorces sont présentées au tableau 2.4.

2.4- Séquençage par PCR

Le séquençage des deux régions ITS a été réalisé dans l'objectif de distinguer les deux variétés de *P. fragariae*. L'obtention des séquences d'ADN a requis trois étapes. Les deux premières ont consisté en la production et en la purification des produits PCR ITS1F-ITS4. La troisième étape décrit la méthodologie de séquençage par PCR utilisée.

Notez que les produits et les protocoles de base utilisés pour l'amplification PCR ont été décrits à la section 2.3.1, à moins d'indication contraire. De plus, les programmes FindPatterns, Lineup, Map et Pileup utilisés pour les analyses de séquences proviennent du logiciel GCG (Wisconsin Package, Version 8, 1994, Genetics Computer Group, Madison, WI, É.-U.).

2.4.1- L'obtention des produits PCR ITS1F-ITS4

Les produits PCR ITS1F-ITS4 d'une longueur d'environ 800 pb couvrent les 2 régions ITS ainsi que la sous-unité d'ADNr 5.8S (figure 2.1). L'amorce ITS1F est

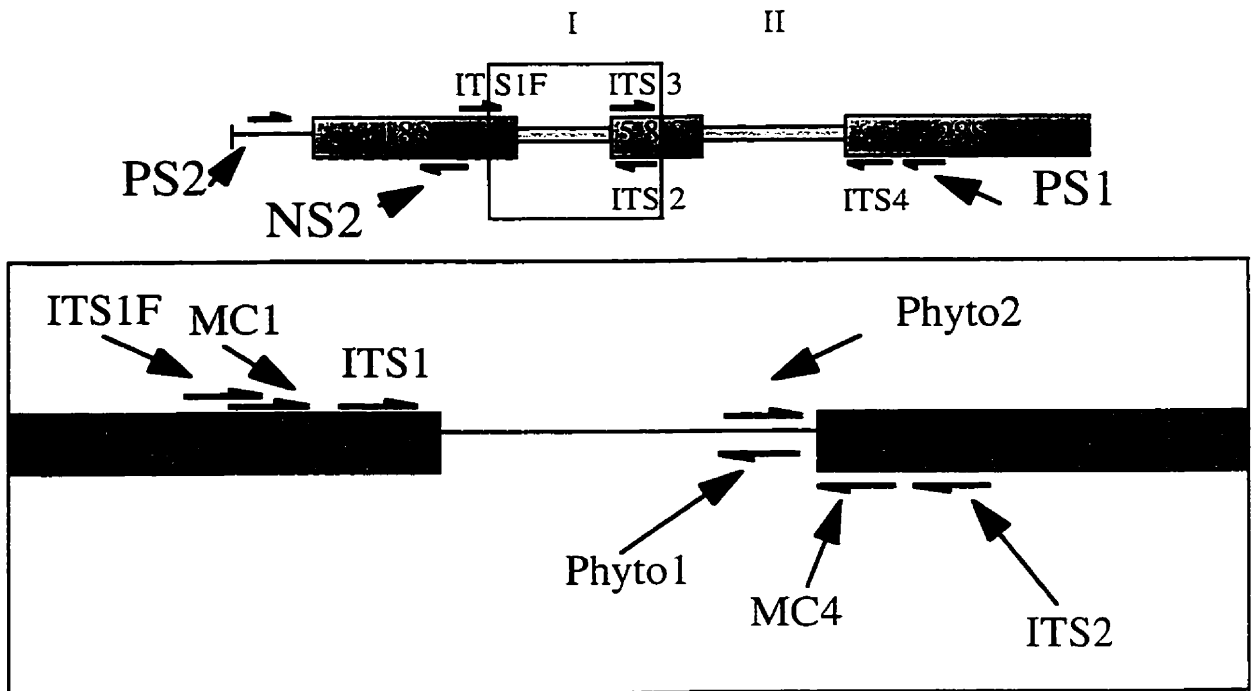


Figure 2.1: Schéma de la localisation d'amorces universelles et spécifiques au niveau des gènes codant pour les ARNr. I: Région ITS I. II: Région ITS II.

Tableau 2.2: Liste des amorces utilisées et leurs caractéristiques

Nom	Séquence†	MERS	% G + C	Tm (°C)	Loc.	Référence
ITS1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	19	63,0	55,7	18S	White <i>et al.</i> , 1990
ITS 1F	CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A	22	36,4	66,0*	18S	Gardes et Bruns, 1993
ITS2	GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC	20	45,0	55,7	5.8S	White <i>et al.</i> , 1990
ITS3	GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC	20	55,0	55,7	5.8S	White <i>et al.</i> , 1990
ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	20	50,0	49,6	28S	White <i>et al.</i> , 1990
Phyto1	GCT ATC TAG TTA AAA GCA GA	20	35,0	38,9	ITS I	Lee <i>et al.</i> , 1993
Phyto2**	TCT GCT TTT AAC TAG ATA GC	20	35,0	38,9	ITS I	Lee <i>et al.</i> , 1993
MC1	AAG TTA AAG TCG TAA CAA GG	20	35,0	54,0*	18S	Mugnier et Grosjean, 1995
MC4	CAT CCA CTG CTG AAA GTT G	19	47,0	56,0*	5.8S	Mugnier et Grosjean, 1995
NS2	GGC TGC TGG CAC CAG ACT TGC	21	67,0	61,6	18S	White <i>et al.</i> , 1990
PS1	CCG TTA CTA GGG GAA TCC TT	20	50,0	49,3	28S	Stammler et Seemüller, 1993
PS2	TTC ATT TTC GGA TAG ACC CG	20	45,0	49,6	16S	Stammler et Seemüller, 1993
CG1	GCG TGA CGT TGT TGG TTG TG	20	55,0	70,0*	ITS II	Garand, 1996
CG3***	CAC AAC CAA CAA CGT CAC GC	20	55,0	70,0*	ITS II	Garand, 1996

†: Les amorces sont indiquées dans les sens 5'→ 3'

* Le Tm est déterminée par la méthode % G + C, à l'exception des amorces ITS1F, MC1, MC4, CG1 et CG3 pour qui le Tm a été déterminé par la méthode de Suggs *et al.*, 1981 (voir section 2.4).

** L'amorce Phyto2 est complémentaire à l'amorce Phyto1

*** L'amorce CG3 est complémentaire à l'amorce CG1

Loc.: Localisation

Tableau 2.3: Programme type d'amplification PCR employé dans cette étude

Programme					
A			B		
Cycle	Température (°C)	Durée (min)	Cycle	Température (°C)	Durée (min)
Pour 1 cycle: Pré-dénaturation	94	5	Pour 1 cycle: Pré-dénaturation	96	3
Pré-hybridation	X	5			
Pour 35 cycles: Élongation	72	2	Pour 35 cycles: Dénaturation	96	1,5
Dénaturation	94	1,5	Hybridation	X	2
Hybridation	X	1,5	Élongation	72	2
Pour 1 cycle: Élongation finale	72	10	Pour 1 cycle: Élongation finale	72	10

X: Cette température varie selon la combinaison d'amorces utilisée (voir tableau 2.4)

Tableau 2.4: La température d'hybridation et le type de programme utilisés pour les divers systèmes d'amplification des gènes d'ADNr.

Système	Température d'hybridation (°C)	Programme
ITS1-ITS2	55	B
ITS1-ITS4	50	B
ITS3-ITS4	55	B
Phyto1-PS2	38	A
Phyto2-PS1	38	A
Phyto2-ITS4	38	A
PS1-ITS1	55	A
PS1-ITS3	55	A
PS2-ITS2	55	A
PS2-ITS4	50 ou 55	A
PS2-NS2	55	A

localisée à -44 pb du bout 3' de la sous-unité d'ADNr 18S. Cette amorce universelle est spécifique à l'amplification des champignons (Gardes et Bruns, 1993). L'amorce ITS4 est localisé sur la sous-unité 28S (White *et al.*, 1990). La séquence et la longueur de ces amorces sont rapportées au tableau 2.2. Les amorces ont été synthétisées au service de synthèse d'acide nucléique de l'université Laval (Pavillon C.-E. Marchand, Ste-Foy, QC).

L'amplification a été effectuée dans un volume réactionnel de 25 µL comprenant 2,5 µL/tube de tampon PCR, 200 µM final de chacun des dNTPs, 1 µM de chacune des amorces, 1 U d'ADN polymérase, 1 µL de MgCl₂ 25 mM pour une concentration finale de 2,5 mM. Dix µL d'ADN 100 ng/µL ont été ajoutés au cocktail d'amplification. L'amplification a été faite avec une pré-dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 3 min suivie par 30 cycles consécutifs d'une dénaturation à 95°C pendant 30 sec, d'une hybridation spécifique des amorces à 45°C pendant 30 sec, d'une élongation par l'ADN polymérase à 72°C pendant 2 min et d'un dernier cycle d'élongation à 72°C pendant 10 min. Habituellement, deux tubes d'amplification par isolats ont été produits. Les amplicons obtenus des 2 tubes ont été combinés dans un tube de 1.5 mL pour un volume de produits PCR total d'environ 50 µL.

2.4.2- Purification des produits PCR ITS1F-ITS4

Les produits PCR combinés ont été purifiés par centrifugation sur minicolonne (Wizard™ PCR Preps DNA Purification System, Promega) selon le protocole B de la compagnie. Cependant, si les produits PCR, lors de l'électrophorèse montraient des bandes non spécifiques, une purification par gel d'agarose 1,4% (p/v) devait préalablement être effectuée (voir section 2.2.2). Les bandes qui représentaient les fragments PCR ITS1F-ITS4 ont été excisées du gel à l'aide d'un scalpel. L'isolement des fragments PCR du morceau d'agarose excisé et leurs purifications ont été effectués selon le protocole A du kit Wizard de la compagnie Promega (Madison, WI, É.-U). La purification permettait d'éliminer toute trace de dNTPs libres, d'amorces et de sels pouvant nuire aux réactions de séquençage.

2.4.3- Méthodologie de séquençage

2.4.3.1- Stratégie de séquençage et sélection des oligonucléotides

Les produits PCR ITS1F-ITS4 purifiés ont été utilisés comme matrice au séquençage direct par PCR des deux régions ITS. La région ITS I a été séquencée par l'amorce ITS1F et le brin complémentaire par l'amorce ITS2 (voir figure 2.1). La région ITS II a été séquencée en deux parties, le premier brin par les amorces ITS3 et CG1 et le brin complémentaire par les amorces ITS4 et CG3 (voir figure 2.1). L'amorce CG3 est complémentaire à l'amorce CG1 (voir tableau 2.2). Les amorces CG1 et CG3 ont été choisies à la jonction du brin séquencé par l'amorce ITS1F et du brin complémentaire ITS4 lors de l'alignement de ces séquences dans le programme Lineup. Ces amorces ont été sélectionnées selon les critères suivants (Rychlik et Rhoads, 1989; Saiki, 1990):

- La composition de l'amorce doit avoir un minimum de 50% GC, où la T_m de l'amorce doit être plus grande que 50°C;
- L'amorce ne doit pas contenir de suite longue d'un même nucléotide (< 4), et elle ne doit pas contenir de palindromes;
- La longueur de l'amorce doit être entre 17 à 21 mers;
- L'amorce, si possible ne doit pas former de dimère et s'auto-apparier;
- L'amorce doit se situer au centre de la région ITS II.

Le programme OLIGO (Primer Analysis Software, OLIGO® 4.06, W. Rychlik 1992, National Bioscience Inc. Publisher, Plymouth, MN, É.U.) a permis de vérifier et de déterminer par des algorithmes, les caractéristiques thermodynamiques des amorces, comme la stabilité interne de l'amorce, la formation de dimère, la présence de palindrome et d'auto-appariement (formation d'épingle à cheveux, "hairpin"), la T_d (duplex dissociation temperature), et la T_m (melting temperature) selon la méthode du %GC (Davis *et al.*, 1986) ou et selon la méthode de Suggs *et al.*, 1981 :

$$T_d = \frac{\Delta H}{\Delta S + R \times \ln (C/4)} - 273.15^\circ\text{C} - t$$

$$T_m (\%GC) = 16,6 \log[M] + 0,41[P_{gc}] + 81,5 - P_m - B/L - 0,65[P_f]$$

$$T_m = 2^\circ\text{C} \times (A + T) + 4^\circ\text{C} \times (G + C)$$

- T_d** = température de dissociation des duplexes d'ADN
ΔH = enthalpie
ΔS = entropie
R = contante des gaz (1.978 cal/°C x mole)
C = concentration de l'oligonucléotide
t = constante de correction d'hybridation (16,6 log[K⁺])
T_m = température où 50% des oligonucléotides sont dissociés de l'ADN
M = [Na⁺], jusqu'à un maximum de 0,5
P_{gc} = % des bases G + C (doit se situer entre 30 et 70)
P_m = % des bases non appariées
P_f = % de formamide dans la solution
B = 675 pour les oligonucléotides plus petits que 100 bases
L = longueur de l'oligonucléotide en nombre de bases

La température d'hybridation des amorces qui est utilisée lors de l'amplification PCR est habituellement de 5°C plus basse que la T_d. La température T_d est sensiblement équivalente à celle du T_m (Suggs *et al.*, 1981), mais plus précise.

De plus, les endroits possibles d'appariement des amorces sur la séquence de la région ITSII de *P. fragariae* ont été examinés avec la fonction "MISmatch" du programme FindPatterns. Ces possibilités d'appariement ont été vérifiées en acceptant des défauts d'appariement "mismatch" de 1 à 6 à la région ITSII. Une valeur de reconnaissance des amorces plus grande que 0 pour un nombre de défauts supérieur à 2 indique que celles-ci peuvent se fixer à des sites autres que celui attendu (spécificité faible). Cette vérification a aussi permis de rejeter toutes les amorces ne s'appariant pas au site ciblé de la région ITSII. Le terme anglais "mismatch" spécifie, lors d'un alignement de séquences, qu'il existe des bases différentes à une même position homologue au niveau de deux séquences (Li et Graur, 1991).

2.4.3.2- Réaction de séquençage

Le séquençage a été réalisé en employant le kit de séquençage dsDNA Cycle Sequencing System de la compagnie Gibco BRL. Trois étapes composent le séquençage directe par PCR soit le marquage de l'amorce au bout 5', la préparation du pré-mix et des réactions de séquence, et l'électrophorèse en gel d'acrylamide dénaturant. Les quantités et les volumes mentionnés ci-dessous valaient pour une seule réaction de séquence comprenant les 4 ddNTPs. Lors des manipulations ci-dessous, les tubes ont été conservés sur la glace. Le marquage au bout 5' de l'amorce s'est déroulé comme suit: 1 μ L de de tampon kinase 5 X [300 mM de Tris-HCl (pH 7,8), 50 mM $MgCl_2$, 1 M KCl], 2 μ L d'amorce 0,5 μ M (1 pmol), 1 μ L (γ - ^{33}P)ATP (2 pmol, activité spécifique: 2000-4000Ci/mmol) de DuPont® NEN Research Product (Boston, MA, É.-U.), 1 μ L de polynucléotide kinase T4 (1 U). Le cocktail de 5 μ L a été mélangé et centrifugé brièvement à vitesse maximale (13 500 x g), puis incubé dans le thermocycleur à 37°C pendant 10 min suivie d'une incubation à 55°C pendant 5 min. Aux cinq μ L d'amorces marquées, 21 μ L H_2O stérile, 4,5 μ L de tampon de séquençage Taq 10 X [300 mM Tris-HCl (pH 9,0), 50 mM $MgCl_2$, 300 mM KCl, 0,5% (p/v) W-1], 10 μ L de produits PCR ITS1F-ITS4 purifiés (15 à 50 fmol) et 0,5 μ L d'ADN polymérase Taq (1,25 U) ont été ajoutés pour un volume réactionnel total de 41 μ L. Ce pré-mix a ensuite été mélangé, puis centrifugé. Par la suite, huit μ L de pré-mix ont été distribués dans 4 tubes de 0,5 mL contenant respectivement: le tube A: 2 μ L de mélange de terminaison A (2 mM ddATP, 100 μ M de chacun dATP, dCTP, 7-deaza-dGTP, dTTP), le tube C: 2 μ L de mélange de terminaison C (1 mM ddCTP, 100 μ M de chacun dATP, dCTP, 7-deaza-dGTP, dTTP), le tube G: 2 μ L de mélange de terminaison G (0.2 mM ddGTP, 100 μ M de chacun dATP, dCTP, 7-deaza-dGTP, dTTP), le tube T: 2 μ L de mélange de terminaison T (2 mM ddTTP, 100 μ M de chacun dATP, dCTP, 7-deaza-dGTP, dTTP). Les tubes de 0,5 mL ont été mélangés, et centrifugés à vitesse maximale (13,500 x g) pendant 10 à 20 secondes. Une goutte d'huile de silicone a été ajoutée à chacun des tubes afin d'éviter l'évaporation. Les tubes ont été déposés dans les puits du thermocycleur lorsque le bloc thermique a atteint 95°C. À ce moment, l'incubation a été initiée par un premier cycle de dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 3 sec, suivie de 20 cycles: d'une dénaturation à 95°C pendant 30 sec, d'une hybridation à 55°C pendant 30 sec, d'une élongation à 70°C pendant 1 min. L'amplification s'est poursuivie avec 10 cycles d'une dénaturation à 95°C pendant 30 sec et d'une élongation à 70°C pendant 1 min. Les 10 derniers cycles

ont permis de s'assurer que tous les fragments PCR étaient terminés par un ddNTP. La température d'hybridation utilisée pour les amorces ITS1F et ITS2 a été diminuée à 45°C au lieu de 55°C afin d'augmenter le nombre de molécules amplifiées. Cinq μL de solution STOP [95% (v/v) formamide, 10 mM EDTA (pH 8,0), 0.1% (p/v) bromophénol bleu, 0,1% (p/v) xylène cyanol] ont été ajoutés pour arrêter chaque réaction de séquence. Les réactions ont été analysées dans un délai maximum de 24 heures. Les réactions ont été chauffées à 90°C pendant 5 min, et 2 μL de réaction ont été déposés à l'aide d'une seringue dans les puits du gel de séquence d'acrylamide dénaturant.

2.4.3.3- Gel de séquençage

La détermination de la structure primaire de l'ADN des régions ITS est réalisée sur un gel vertical d'acrylamide dénaturant de 5 ou 6% (p/v) de type "Wedge" d'une épaisseur de 0,2 mm en haut et de 0,4 mm en bas. Le gel de type "Wedge" permet d'augmenter le pouvoir de résolution lors de la séparation des bandes (Sambrook *et al.*, 1989a). Le gel est préparé à partir d'une solution d'acrylamide 50% Long Ranger (J.T. Baker, Toronto, ON) et d'urée 7M (voir annexe B). La solution d'acrylamide est légèrement chauffée pour solubiliser l'urée. Elle est ensuite filtrée sur une membrane de nitrocellulose 0,45 μm (Nalge, Rochester, NY, É.-U.) et dégazée durant 5 min sous-vide. De l'ammonium persulfate 10% (p/v) (375 μL) et du TEMED (37,5 μL) sont ajoutés à la solution d'acrylamide pour assurer sa polymérisation (30 min). Avant de couler le gel, la plaque thermostatée est lavée à l'eau, séchée à l'éthanol et siliconisée avec une solution de diméthylchlorosilane 2% (v/v) dans du CCl_4 dite "Repel Silane". L'autre plaque est lavée avec un récurrent "ajax", rincée à l'eau, séchée à l'éthanol et traitée avec 15 mL de solution liante appelée "Binding Silane" (15 mL d'éthanol 99% (v/v), 45 μL d'acide acétique glaciale et 45 μL de γ -(métacryloxy)-propyltriméthoxysilane). La pré-électrophorèse du gel (55 cm) se fait à 44 watts constants à 55°C pendant 10 à 20 min, et l'électrophorèse à 44 watts constants pendant 2,5 heures pour les migrations courtes et 4,5 heures pour les migrations longues dans le TBE 0,6 X (voir annexe B). Après l'électrophorèse, le gel est traité 15 min dans l'acide acétique 10% (v/v), rincé à l'eau pendant 15 min, séché toute la nuit et autoradiographié pendant une semaine. Avec les gels de migration longue et courte, la structure primaire en ADN d'un fragment PCR peut être déterminée à plus de 400 bases .

2.4.3.4- L'analyse des séquences

L'analyse de séquence a été effectuée avec les programmes Lineup et Pileup. Le programme Lineup a été utilisé afin d'aligner les séquences obtenues des 2 brins d'ADN pour chaque isolat. La séquence résultante de cet alignement a donné la séquence consensus complète et exacte de chacun des isolats après vérification sur les gels de séquence. Le programme Pileup a permis de comparer la séquence consensus de *P. fragariae* à celles des autres *Phytophthora* spp. grâce à des algorithmes.

2.4.3.5- Séquences de *Phytophthora* spp. et *Pythium* spp. utilisées dans les analyses

L'identification des séquences de *Phytophthora* spp. et de *Pythium* spp. utilisées dans les comparaisons et les analyses de séquences avec les deux variétés de *P. fragariae* est retrouvée au tableau 2.5.

2.4.3.6- Résolution d'ambiguïtés

L'emploi de l'enzyme *Pfu* DNA polymérase de Stratagene (PDI Bioscience Inc., Aurora, ON), un enzyme isolé d'une archaébactérie marine hyperthermophile *Pyrococcus furiosus* a été utilisé pour résoudre les ambiguïtés A/G de l'isolat E de *P. fragariae* var. *fragariae*. La *Pfu* possède une activité exonucléasique 5' → 3' "proofreading" (autocorrection) et elle est 12 fois plus fidèle (7×10^{-7} erreur/pb d'incorporée) que la Taq DNA polymérase (7.2×10^{-5}) (Dieffenbach et Dveksler, 1995).

Trois étapes ont donc été nécessaires pour résoudre les ambiguïtés A/G; soit l'amplification PCR du fragment CG1-ITS4 (~ 335 pb) de l'isolat E, le séquençage par PCR et l'analyse de séquence. L'amplification a été effectuée dans un volume réactionnel de 25 µL comprenant 2,5 µL/tube de tampon *Pfu* Buffer #2 10 X de Stratagene (200 mM Tris-HCl (pH8,2), 100 mM KCl, 60 mM (NH₄)₂SO₄, 15 mM MgCl₂, 1% Triton X-100), 200 µM final de chacun des dNTPs, 1 µM de chacune des amorces, 0,5 U de *Pfu* de Stratagene (2,5 U/µL) et 5 µL d'ADN 10 ng/µL de l'isolat

Tableau 2.5: Identification des séquences de *Phytophthora* spp. et de *Pythium* spp.

Champignon	No. isolat	No. séquence	source	Région
<u><i>Phytophthora</i>:</u>				
<i>cactorum</i> Baarn	279,37	phcac2	1	ITSI
<i>capsici</i> Baarn	423,77	phcap2	1	ITSI
		phcap1_1	2	ITSI
		phcap1_2	2	ITSII
<i>cinnamomi</i>	N.D.	phcin1_1	2	ITSI
		phcin1_2	2	ITSII
<i>citricola</i> Baarn	379,61	phcit1	1	ITSI
<i>citrophthora</i>	N.D.	phcit1_1	2	ITSI
		phcit1_2	2	ITSII
<i>megasperma</i> f. sp. <i>glycenea</i> race 1	30,3	phmeg1	1	ITSI
<i>erythroseptica</i>	19,1	phery1	1	ITSI
<i>megakaria</i>	N.D.	phmgk2	1	ITSI
		phmgk1_1	2	ITSI
		phmgk3_1	3	ITSI
		phmgk1_2	2	ITSII
		phmgk3_2	4	ITSII
<i>palmivora</i>		phpal1_1	2	ITSI
		phpal1_2	2	ITSII
<i>undulata</i> Baarn	179,1	pund1	1	ITSI
<u><i>Pythium</i>:</u>				
<i>aphanidermatum</i>	13,2	pyaph1	1	ITSI
<i>coloratum</i> Baarn	649,79	pycol1	1	ITSI
<i>diclinum</i>	52,1	pydic1	1	ITSI
<i>flevoense</i> Baarn	237,72	pyfle1	1	ITSI
<i>ultimum</i>	189,1	pyult1	1	ITSI

1: Grosjean, (1992)

2: Lee et Taylor, (1992)

3: Séquence de GeneBankEMBL, le no. d'accèsion est s40356*

4: Séquence de GeneBankEMBL, le no. d'accèsion est s40358*

N.D.: non-disponible

*: Séquence identique à celles de Lee et Taylor, (1992)

E. L'amplification a été effectuée avec une pré-dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 3 min suivie par 30 cycles consécutifs d'une dénaturation à 95°C pendant 30 sec, d'une hybridation spécifique des amorces à 55°C pendant 30 sec, d'une élongation par la *Pfu* à 72°C pendant 2 min et d'un dernier cycle d'élongation à 72°C pendant 10 min. Quatre tubes d'amplification ont été produits. Les amplicons obtenus des 4 tubes ont été combinés dans un nouveau tube pour un volume total de produits PCR d'environ 100 µL. Ces amplicons ont été purifiés sur mini colonne Wizard (voir section 2.4.2). Le produit PCR CG1-ITS4 a été séquencé par PCR au Service technique d'analyse et de synthèse d'acide nucléique de l'université Laval à l'aide de fluorochromes d'ABI (Applied Biosystems, Forster City, CA, US). La séquence obtenue a été analysée à l'aide du logiciel Sequence Navigator™ de Perkin Elmer (Version 1.0.1, Applied Biosystems Inc., John Kececioglu, 1990) et de Lineup.

2.5- Test PCR-RFLP

Les profils PCR-RFLP de la région ITS1 ont été obtenus soit à partir d'informations de séquence disponible, ou soit expérimentalement afin de vérifier l'information théorique et/ou d'obtenir des profils pour des espèces de *Phytophthora* pour lesquelles aucune information de séquence n'était disponible.

2.5.1- Profils PCR-RFLP théoriques et cartes RFLP

Les profils théoriques et les cartes des sites de restriction enzymatique obtenus à partir des séquences ont été établis avec le programme "Map" de GCG (voir section 2.4). Les séquences disponibles proviennent des travaux de Grosjean (1992) et ceux de Lee et Taylor (1992) (voir tableau 2.5).

2.5.2- Profils PCR-RFLP expérimentaux

Les profils PCR-RFLP expérimentaux ont été constitués en trois étapes soit l'amplification PCR, la digestion enzymatique des produits PCR suivie de la séparation des fragments par électrophorèse en gel Metaphor.

Notez que les produits utilisés pour l'amplification PCR de cette section et certaines manipulations routinières sont, à moins d'avis contraire, décrit à la section 2.3.1.

2.5.2.1- Amplification PCR de la région ITSI

La région ITSI a été au préalable amplifiée par deux amorces localisées dans les régions conservées des gènes d'ADNr. L'amorce MC1 est localisée à -35 pb du bout 3' de la sous-unité 18S tandis que l'amorce MC4 est localisée au début de la sous-unité 5.8S. La séquence et la longueur de ces amorces sont présentées au tableau 2.2 (Mugnier et Grosjean, 1995). Les amorces ont été synthétisées au Service technique d'analyse et de synthèse d'acide nucléique de l'université Laval. L'amplification a été effectuée dans un volume réactionnel de 25 μL comprenant 2,5 μL /tube de tampon PCR, 200 μM final de chacun des dNTPs, 1 μM de chacune des amorces, 1 U d'ADN polymérase et 5 μL d'ADN 10 ng/ μL . L'amplification a été effectuée avec une pré-dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 3 min suivie par 35 cycles consécutifs d'une dénaturation à 95°C pendant 30 sec, d'une hybridation spécifique des amorces à 55°C pendant 30 sec, d'une élongation par la Taq polymérase à 72°C pendant 2 min et d'un dernier cycle d'élongation à 72°C pendant 10 min. Habituellement, trois tubes d'amplification par isolat ont été produits. Les amplicons obtenus des 3 tubes ont été combinés dans un nouveau tube pour un volume total de produits PCR d'environ 70 μL .

2.5.2.2- Digestion des produits PCR MC1-MC4

Les amplicons de chacun des isolats analysés ont été soumis à la digestion enzymatique de six enzymes de restriction. Ces enzymes sont *Alu* I, *Ban* II, *Hae* III, *Mbo* I, *Rsa* I, *Taq* I. Deux autres enzymes de restriction ont été utilisés exclusivement avec le genre *Pythium* (Mugnier et Grosjean, 1995), soit *Dra* I et *Hha* I. Les enzymes de restriction ont été fournis par la compagnie Promega ou New England Biolabs, Ltd (Mississauga, ON). Le mélange de digestion était composé de 1,5 μL de tampon de digestion 10 X, de 1 μL d'enzyme de restriction (10 U/ μL) et de 7,5 μL d' H_2O stérile de qualité HPLC pour un volume total de 10 μL . Le tampon de digestion 10 X utilisé a été celui recommandé par la compagnie (voir tableau 2.6). Cinq μL de produits PCR ont été ajoutés à chacun des mélanges de

digestion pour les six enzymes. La digestion a été effectuée dans un bain à 37°C pendant 2 heures à l'exception de l'enzyme *Taq* I, où l'incubation a été effectuée à 65°C. La digestion enzymatique a été arrêtée par l'ajout de 1,5 µL d'ENDO-R-STOP 1 X (voir annexe B).

2.5.2.3- Séparation des fragments RFLP sur gel de MetaPhor 4% (p/v)

L'agarose MetaPhor™ (FMC Bioproducts, Rockland, ME, É.-U.) a un point de fusion intermédiaire ($\leq 75^\circ\text{C}$). Cet agarose permet une haute résolution de séparation au niveau des produits PCR ≤ 1 Kb. On a ajouté graduellement 1,2 g de poudre MetaPhor à 30 mL d'eau distillé et 600 µL de TAE 50 X en agitation (voir annexe B). La solution a été solubilisée au four à micro-ondes à "médium" jusqu'au début de l'ébullition en prenant soin d'agiter à tous les 30 sec. Lorsque la solution commençait à bouillir, on réduisait l'intensité du four à "low" et on continuait à chauffer jusqu'à la dissolution complète et la disparition des bulles d'air formant une mousse qui nuit à la migration (agitation à toute les 30 sec). Le gel a été coulé dès sa sortie du four afin d'éviter une polymérisation inégale de celui-ci. Après quinze minutes de polymérisation à température de la pièce, le gel a été transféré à 4°C pour 30 min afin d'obtenir une meilleure résolution. La migration a été effectuée dans du TAE 1 X à 4°C pour prévenir la surchauffe du gel (montage pour petit gel, peigne à 8 puits de 5 mm de largeur x 1 mm d'épaisseur). Le voltage a été fixé à 100V pour avoir un ampérage d'environ 70 à 80 A (≥ 6 V/cm). La migration a été effectuée sur une durée d'environ 2 heures et elle fut arrêtée lorsque que le bleu était à 1 cm de la fin du gel. Au premier et au dernier puits, un mélange de 1,1 µL de standard 1 Kb de Gibco BRL, 2 µL d'ENDO-R-STOP 1 X, et 9 µL d'H₂O stérile de qualité HPLC a été déposé. Les six autres puits ont été réservés au dépôt des produits de digestion. Quinze µL de digestion enzymatique ont été déposés dans ces puits. Après la migration, le gel MetaPhor a été coloré et décoloré selon la procédure mentionnée à la section 2.2.2. Les profils PCR-RFLP ont été photographiés (surexposition 1min 30sec) seulement avec les films Polaroid de type 53 (sans négatif) pour permettre de voir les bandes plus petites que 75 pb. Par la suite, les photographies ont été numérisées afin de bâtir une banque de profils PCR-RFLP pour l'identification des *Phytophthora* pathogènes au framboisier.

Tableau 2.6: Liste des tampons recommandés et des sites de restriction

Enzyme	Tampon	Site
Alu I	B promega 1 New England	AG [^] CT TC [^] GA
Ban II	E,M promega	G(A/G)GC(T/C) [^] C C [^] (T/C)CG(A/G)G
Dra I	B promega	TTT [^] AAA AAA [^] TTT
Hae III	C promega	GG [^] CC CC [^] GG
Hha I ^a	C promega	GCG [^] C C [^] GCG
Mbo I ^b	C promega 2 New England	[^] GATC CTAG [^]
Rsa I	C promega	GT [^] AC CA [^] TG
Taq I	E,M promega	T [^] CGA AGC [^] T

a Isoschizomère = Cfo I

b Isoschizomères = Dpn I et Sau3A I

Genre fongique:

Phytophthora

Pythium

Enzymes utilisés:

Alu I Ban II Hae III Mbo I Rsa I Taq I

Alu I Dra I Hha I Mbo I Rsa I Taq I

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

3.1 Distinction de *Phytophthora fragariae* var. *rubi* et *Phytophthora fragariae* var. *fragariae*

Afin d'alléger le texte, les termes "variété *rubi* " et "variété *fragariae* " référeront respectivement à "*Phytophthora fragariae* var. *rubi* " et "*Phytophthora fragariae* var. *fragariae* ".

3.1.1- Séquence de la région ITS1

Les amorces ITS1 et ITS2 ont été utilisées pour séquencer par PCR la région ITS1 préalablement amplifiée avec les amorces ITS1F-ITS4 (voir figure 2.1). Dix isolats de *P. fragariae* ont été utilisés dont 6 de la variété *rubi* et 4 de la variété *fragariae*. Les isolats canadiens 745, 1369 et ML2 ainsi que les isolats allemands 93, 390 et M10 de la variété *rubi* ont été utilisés (voir tableau 2.1). Les isolats de la variété *fragariae* utilisés sont Pt47, une souche d'Allemagne ainsi que PfA5, PfA7 et PfA8 correspondant aux races américaines A5, A7 et A8. La séquence de chacune des régions ITS1 de ces isolats se retrouve à l'annexe C.

Toutes ces séquences ont été alignées dans le programme Lineup afin de les comparer les unes aux autres et d'établir une séquence consensus (voir figure 3.1). Pour tous les isolats, la région ITS1 a une longueur totale de 232 ou de 233 pb. La séquence nucléotidique pour les dix isolats est identique à l'exception d'une zone répétitive en adénines à partir de la position 10 du bout 5' de la région ITS1 (voir

figure 3.2). Les isolats 93 et PfA5 ont été omis dans la figure 3.2, car ils n'apportaient pas d'informations additionnelles (voir annexe C).

Une répétition de 6 adénines est observée pour l'isolat européen Pt47 et l'isolat américain PfA8 de la variété *fragariae* (figure 3.2). L'isolat américain PfA7 de la variété *fragariae* possède 5 adénines. Pour la majorité des isolats de la variété *rubi*, on observe une répétition de 5 adénines à l'exception de l'isolat 745. Cet isolat possède 6 adénines. Un bioessai utilisant des plantules de framboisier a été réalisé par le laboratoire du Dr. Carole Beaulieu à l'université de Sherbrooke selon la méthodologie de Nourrisseau et Baudry (1987). Ce bioessai a permis de vérifier la spécificité pathogénique des divers isolats utilisés pour ce projet. Les isolats de la variété *rubi* se sont révélés virulents pour tous les cultivars de framboisier utilisés (voir tableau E.1, à l'annexe E). Les *P. fragariae* var. *fragariae* isolés du fraisier sont non pathogènes au framboisier (Nourrisseau et Baudry, 1987; Wilcox *et al.*, 1993). Ceci permet d'affirmer que les isolats PfA7 et 745 qui ne suivent pas la tendance de leur variété respective tant qu'au nombre d'adénines n'est pas due à une erreur expérimentale mais à une différence génétique individuelle.

Un alignement des 25 premières bases du bout 5' de la région ITS1 a été réalisé grâce au programme Pileup (figure 3.3). Cet alignement comprend 3 séquences du genre *Pythium*, 10 séquences différentes du genre *Phytophthora* et une séquence consensus des 8 isolats de *P. fragariae* vue précédemment. Les espèces du genre *Phytophthora* peuvent être regroupées dans 5 des 6 groupes taxonomiques de Waterhouse (1963, 1970, 1983). Aucune séquence d'une espèce représentative du groupe IV n'était disponible. Dans l'encadré gris vertical, nous revoyons la répétition variable d'adénines, soit de 4 à 7 adénines pour les *Pythium* ou de 5 à 6 adénines pour les différentes espèces de *Phytophthora*. La zone de répétition en adénine semble une caractéristique de la famille des *Pythiaceae*. Cette zone répétitive en adénine a été vérifiée chez 36 espèces de *Pythium* (Grosjean, 1992) et chez 11 espèces différentes de *Phytophthora*. Il est important de souligner, à l'exception des répétitions des adénines, les séquences des espèces présentées ici sont très différentes les unes des autres et elles varient en longueur (voir figure 3.4).

Michot *et al.* (1983) ainsi que Torres *et al.* (1990) mentionnent que les régions ITS sont composées de certaines zones conservées espacées par des zones variables

sujettes à de grandes pressions de sélection. Cette hypothèse a été démontrée par un alignement de séquences de la région ITS1 dans Pileup de 10 espèces différentes de *Phytophthora*, soit *P. cactorum* du groupe I, 4 espèces du groupe II (*P. capsici*, *P. citrophthora*, *P. megakaria* et *P. palmivora*), 2 espèces du groupe V (*P. fragariae* et *P. megasperma*) ainsi que 3 espèces du groupe VI (*P. erythrospetica*, *P. cinnamomi* et *P. undulata*). Les zones gris pâles de cet alignement indiquent les régions conservées qui représentent 48,3% de la région ITS1 (voir figure 3.4). En gris foncé, les régions variables représentent 17,1% de la région ITS1. En noir, les régions de délétion/insertion représentent 34,6% de l'ITS1. Les régions variables et de délétion/insertion représentent près de la moitié de la région ITS1. Il y a une différence de 49 pb entre la plus petite séquence de l'ITS1, celle de *P. citricola* (184 pb) et de la plus grande, celle de *P. megasperma* (233 pb). Ceci explique le haut pourcentage de zones de délétion/insertion sur le nombre total de sites nucléiques alignés (240 pb).

1	AACCTGCGGA	AGGATCATT	CCACACCT*A	AAAAC T TTTCC	ACGTGAACCG
51	TATCAACCCA	CTTAGTTGGG	GGCCTGTCCT	<u>GGCGG</u> CTGGC	TGTCGATGTC
101	AAAGTTGACG	<u>GCTGCT</u> GCTG	TGTGTGCGGC	CCTATCATGG	CGAGCGTTTG
151	GGT <u>CCCT</u> CCTC	GGGGGAACTG	AGCCAGTAGC	<u>CCTTTT</u> CCTT	TAAACCCATT
201	CTTGAATACT	GAATATACTG	TGGGGACGAA	AGTCTCTGCT	TTAACTAGA
251	TAGCAACTTT	CAGTGGATGTC			

Figure 3.1: Séquence consensus de 233 pb des deux variétés de *P. fragariae* pour la région ITSI. Position 1 à 20: PSU 18S de l'ADNr (en caractère gras). Position 21 à 253: ITSI. Position 254 à 270: 5.8S de l'ADNr (en caractère gras). Les bases soulignées montrent quelques exemples de petits et simples motifs répétés. Ce symbole (*) indique la présence d'une délétion/insertion d'une base adénine.

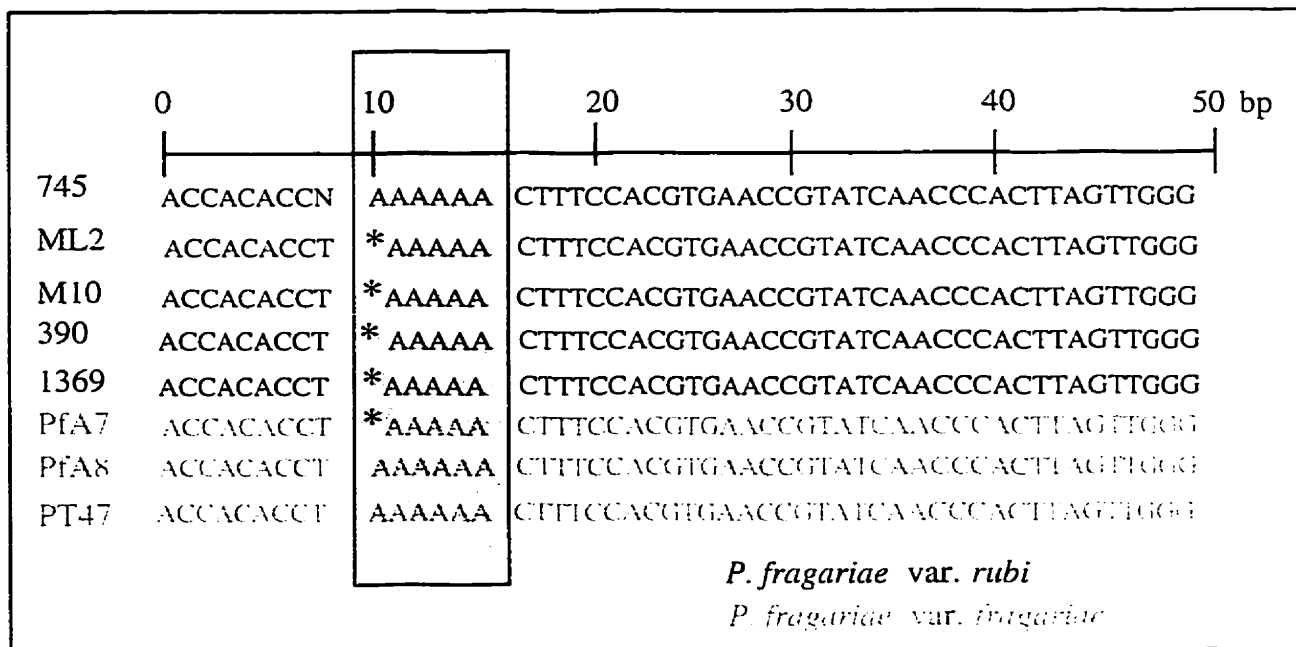


Figure 3.2: Alignement de séquences des 50 premières bases au bout 5' de la région ITSI de 8 isolats de *P. fragariae*. L'encadré gris pâle représente une zone de répétition d'adénine. Ce symbole (*) indique la présence d'une délétion/insertion d'une base adénine.

	0	5	10	15	20	25	pb
<i>P. capsici</i>	ACCCACACC	TAAAAAA	CTTTCCACGT	173			
<i>P. coronata</i>	ACC*ACACC	AAAAAAA	CTTTCCACGT	173			
<i>P. flevoense</i>	ACC*ACACC	CT**AAAA	CTTTCCACGT	175			
<i>P. dictinum</i>	ACC*ACACC	AAAAAAA	CTTTCCACGT	175			
<i>P. citricola</i>	ACC*ACACC	TAAAAAA	CTTTTCACGT	184			
<i>P. citrophthora</i>	ACCCACACC	T*AAAAA	CTTTCCACGT	193			
<i>P. undulata</i>	ACC*ACACC	TAAAAAA	CTTTCCACGT	208			
<i>P. megakaria</i>	ACCCACACC	T*AAAAA	CTTTCCACGT	214			
<i>P. palmivora</i>	ACCCACACC	T*AAAAA	CTTTCCACGT	214			
<i>P. cactorum</i>	ACC*ACACC	T*AAAAA	CTTTCCACGT	219			
<i>P. erythroseptica</i>	ACC*ACACC	T*AANNA	CTTTCCACGT	232			
<i>P. fragariae</i>	ACC*ACACC	T*AAAAA	CTTTCCACGT	233			
<i>P. cinnamomi</i>	ACCCACACC	TAAAAAA	CTTTCCACGT	233			
<i>P. megasperma</i>	ACC*ACACC	TAAAAAA	CTTTCCACGT	233			

Figure 3.3: Alignement de séquences des 25 premières bases au bout 5' de la région ITS1 de 11 espèces de *Phytophthora* et 3 espèces de *Pythium*. Dans l'encadré horizontal gris foncé, la séquence consensus de *P. fragariae*. En noir, dix séquences de *Phytophthora* spp. En gris pâle, trois séquences de *Pythium*. L'encadré gris pâle représente une zone de répétition d'adénine. À l'extrémité droite, on retrouve la longueur de la région ITS1 pour chaque espèce. Ce symbole (*) indique la présence d'une délétion/insertion d'une base adénine. Notez que la longueur de la région ITS1 pour *P. citrophthora* est variable de 176 pb à 196 pb (Lee et Taylor, 1992). L'identification des séquences présentées dans cette figure se retrouve au tableau 2.5.

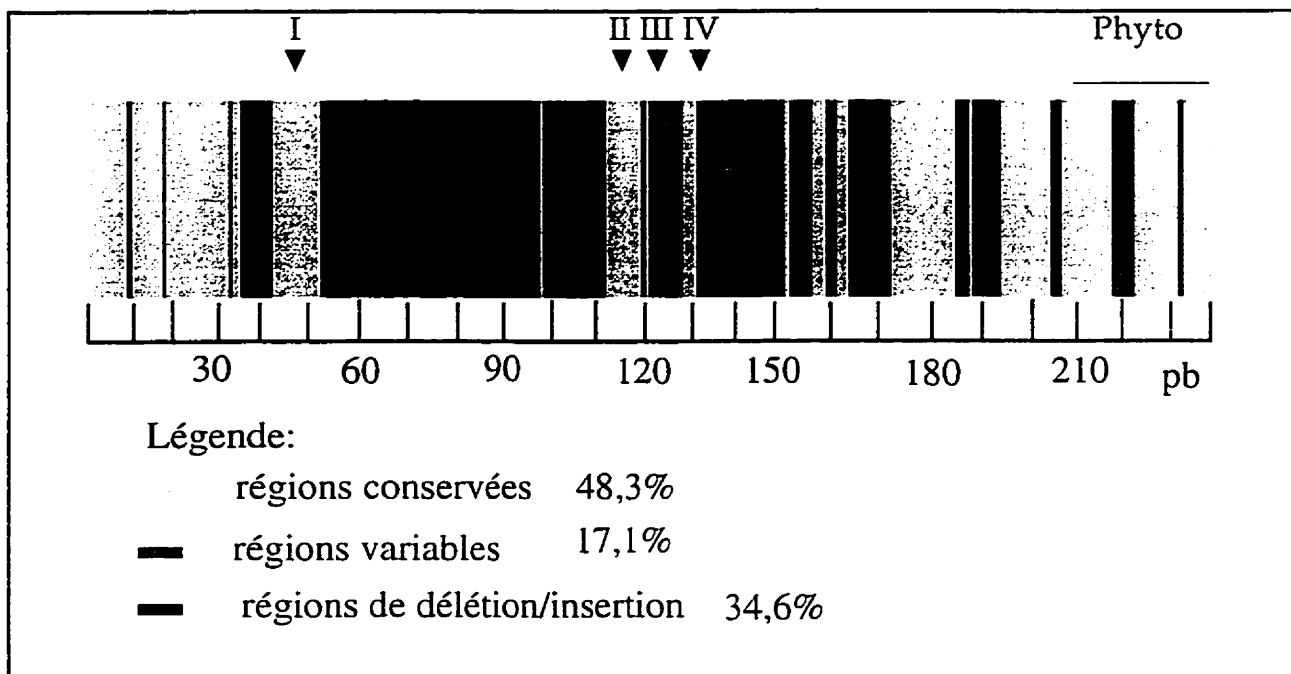


Figure 3.4: Alignement de séquences de la région ITS1 de 10 espèces de *Phytophthora*. Les espèces de *Phytophthora* ayant servi à l'alignement sont *capsici*, *cactorum*, *cinnamomi*, *citricola*, *citrophthora*, *erythrospetica*, *fragariae*, *megakaria*, *megasperma* f. sp. *glycinea* et *palmivora*. Les domaines I, II, III, IV correspondent aux domaines propres des *Phytophthora* tels que postulés par Grosjean, (1992). Phyto, indique la position de la sonde spécifique aux *Phytophthora* utilisé par Lee et al., (1993).

3.1.2- Séquence de la région ITSII

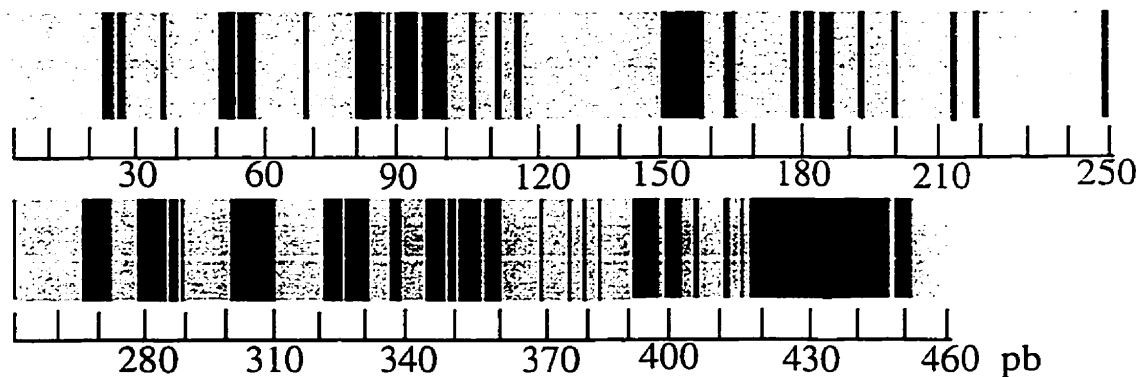
Le produit PCR ITS1F-ITS4 a servi de matrice au séquençage de la région ITSII (voir figure 2.1). Les amorces ITS3 et CG1 ont été utilisées pour séquencer par PCR le premier brin 5'→3' de la région ITSII tandis que les amorces CG3 et ITS4 ont été utilisées pour le deuxième brin 3'←5'. Cinq isolats de *P. fragariae* ont été séquencés, dont 2 de la variété *rubi* et 3 de la variété *fragariae*. Les isolats canadiens de la variété *rubi* utilisés sont 1369 et ML2. Les isolats de la variété *fragariae* utilisés sont Pt47 et E, des isolats d'Allemagne, ainsi que PfA7, la race américaine A7. La séquence de la région ITSII de chacun des isolats est retrouvée à l'annexe D.

Toutes ces séquences ont été alignées dans le programme Lineup afin de les comparer les unes aux autres et d'établir une séquence consensus (voir figure 3.5). Pour tous les isolats, la région ITSII a une longueur totale de 439 pb. La séquence nucléotidique pour les cinq isolats est parfaitement identique. L'isolat E, de la variété *fragariae* présentait deux sites d'ambiguïtés adénine/guanine (A/G). Le premier dû a une structure secondaire et le deuxième à une erreur de la Taq polymérase lors de l'élongation des brins PCR. Le clonage a été en premier lieu envisagé pour résoudre les ambiguïtés, mais fut ensuite exclu par le manque de paramètres adéquats et le travail laborieux exigé. Ces ambiguïtés ont cependant été résolues par l'emploi de l'ADN polymérase *Pfu* lors du séquençage par PCR des produits d'amplification. Ces deux sites sont occupés par des guanines (G).

De la même façon qu'à la figure 3.4 pour la région ITS1, la figure 3.6 représente un alignement de séquences de la région ITSII de 6 espèces de *Phytophthora*. Les séquences utilisées correspondent à 6 des 10 espèces antérieurement utilisées pour la région ITS1, à savoir; 4 espèces du groupe II, *P. fragariae* pour le groupe V et *P. cinnamomi* pour le groupe VI. La différence entre la plus petite et la plus grande séquence de l'ITSII est de 25 pb, *P. megakaria* (411 pb) versus *P. cinnamomi* (436 pb). La proportion de régions conservées de l'ITSII est plus importante que celle de l'ITS1. Elles représentent 67,7% des sites alignés totaux (446 pb) par rapport à 32,3% pour les sites non-conservés. Ces derniers se répartissent ainsi; 22,9% pour les zones variables et 9,4% pour les zones de délétion/insertion (voir figure 3.6).

1	CAGTGTCCG	TACATCAAAC	TTGGCTCTCT	TCCTTCCGTG	TAGTCGGTGG
51	ATGGGGACGC	CAGACGTGAG	GTGTCTTGCG	GGTGGCCTTC	GGGCTGCCTG
101	CGAGTCCCTT	GAAATGTACT	GAACTGTACT	TCTCTTTGCT	CGAAAAGCGT
151	GACG <u>TT</u> GTTG	GTTGTGGAGG	CTGCCTGTGT	GGCCAGTCGG	CGACCGGTTT
201	GTCTGCTGCG	GCGTTTAATG	GAGGAGTGTT	CGATTCCGCG	TATGGTTGGC
251	TTCGGCTGAA	CAATGCGCTT	ATTGGACGTT	CTTCCTGCTG	TGGCGGTACG
301	GATCGGTGAA	CCGTAGCTGT	GCGAGGCTTG	GCCTTTGAAC	<u>CGGCGGTGTT</u>
351	GGTCGCGAAG	TAGGGT <u>GGCG</u>	GCTTCGGCTG	TCGAGGGGTC	GATCCATTTG
401	GGAACTTGTG	TCTCT <u>GCGGC</u>	GCGCTTCGGT	GTGCTGCGGG	TGGCATCTCA
451	ATTGGACCTG	ATATC			

Figure 3.5: Séquence consensus de 439 pb des deux variétés de *P. fragariae* pour la région ITSII. Position 1 à 11: 5.8S de l'ADNr (en caractère gras). Position 11 à 451: ITSII. Position 452 à 465: GSU 28S de l'ADNr. Les bases soulignées montrent quelques exemples de petits et simples motifs répétés.



Légende:

- régions conservées 67,7%
- régions variables 22,9%
- régions de délétion/insertion 9,4%

Figure 3.6: Aligement de séquences de la région ITSII de 6 espèces de *Phytophthora*. Les espèces ayant servi à l'aligement sont *P. capsici*, *P. cinnamomi*, *P. citrophthora*, *P. fragariae*, *P. megakaria* et *P. palmivora*. L'identification des séquences présentées dans cette figure se retrouve au tableau 2.5.

3.1.3- Comparaison des régions ITS I et ITS II

Chez les *Phytophthora* spp., un polymorphisme de longueur est observé dans les deux régions ITS. La longueur des régions ITS varie entre les espèces, par exemple pour la région ITS I: *P. capsici* à une longueur de 219 pb et *P. fragariae* à une longueur de 233 pb. Les isolats 1369, 390, M10, ML2 du *P. fragariae* var. *rubi* et l'isolat PfA7 du *P. fragariae* var. *fragariae* ont une région ITS I de 232 pb (voir annexe C). De plus, chez certaines espèces, la longueur des ITS varie d'un isolat à un autre (par exemple: région ITS I: *P. citrophthora* 176 à 196 pb) (Lee et Taylor, 1992). *P. fragariae* fait partie du groupe morphologique V de Waterhouse. La longueur des deux régions ITS de *P. fragariae* ainsi que des autres espèces du groupe V et VI semblent avoir une homogénéité de longueur (par exemple: région ITS I: *P. megasperma* 233 pb, *P. erythroseptica* 232 pb) (voir tableau 3.1).

Le pourcentage de variabilité intraspécifique varie aussi d'une espèce à l'autre, et aussi à l'intérieur d'une même espèce tandis que d'autres semblent très homogène (voir tableau 3.1). Par exemple, chez *P. fragariae*, pour les isolats des deux variétés, le pourcentage de variabilité est quasi nul (ITS I: 0,4% et ITS II: 0%) tandis que chez *P. citrophthora*, la variabilité intraspécifique entre les différents isolats varie de 2,4 à 4,2%. Le pourcentage de variabilité intraspécifique est une mesure qui dénote du nombre de mutation accumulé chez une espèce donnée (Lee et Taylor, 1992).

Chez *P. fragariae*, le contenu G+C de la région ITS I est équivalent à la région ITS II (voir tableau 3.1). Ce contenu en G+C pour les deux ITS est retrouvé aussi chez les autres *Phytophthora*.

Tableau 3.1: Comparaison chez les *Phytophthora* spp. des longueurs des régions ITS, leur pourcentage en G + C et leur pourcentage de variabilité intraspécifique.

Isolat*	ITS I			ITS II		
	Longueur	%G+C	% variabilité intraspécifique	Longueur	%G+C	% variabilité intraspécifique
<i>P. cactorum</i>	219	48,9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
<i>P. capsici</i>	176	42,6	1,1	417	53,7	0,5
<i>P. cinnamomi</i>	233	53,6	4,6 (TA)	436	55,7	4,6(TA)
<i>P. citricola</i>	184	49,5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
<i>P. citrophthora</i>	176 à 196	41,8	2,4 à 4,2	417 à 427	54,5	1,3 à 1,6
<i>P. erythroseptica</i>	232	49,6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
<i>P. fragariae</i>	233	55	0,4	439	60	0
<i>P. megakaria</i>	214	46,7	0	411	49,1	0
<i>P. megasperma**</i>	233	48,8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
<i>P. palmivora</i>	214	47,2	0	414	49,3	0
<i>P. undulata</i>	208	49,5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

*: Les données présentées proviennent de Lee et Taylor, (1992) et de Grosjean, (1992), sauf celle de *P. fragariae* (en caractère gras).

** : f. sp. *glycenea*.

(TA): Pourcentage établi sur le nombre total de sites nucléiques alignés des régions ITS I et II.

N.D.: Non-déterminé.

Notez que le % de variabilité intraspécifique égale le nombre de sites nucléiques variables sur le nombre total de sites nucléiques alignés pour toutes les séquences des isolats d'une espèce donnée.

3.2- Système MC1-MC4, test PCR-RFLP

La comparaison des séquences de la région ITS1 a révélé que plusieurs espèces de *Phytophthora* possédaient une région ITS1 plus courte (voir figure 3.4). De plus, parmi celles ayant une région ITS1 de longueur similaire à celles des *P. fragariae*, toutes se caractérisent par des domaines de séquences variables. L'analyse des sites de restrictions enzymatiques de l'ITS1 de 11 espèces de *Phytophthora* a conduit à l'élaboration d'un test PCR-RFLP qui a permis de différencier *P. fragariae* des autres espèces de *Phytophthora*. Cette approche PCR-RFLP a été élaborée en se servant des amorces MC1-MC4 décrites par Mugnier et Grosjean (1995). L'emploi de 6 enzymes de restriction (*Alu* I, *Ban* II, *Hae* III, *Mbo* I, *Rsa* I et *Taq* I) sur ces produits d'amplification a permis d'obtenir les profils RFLP.

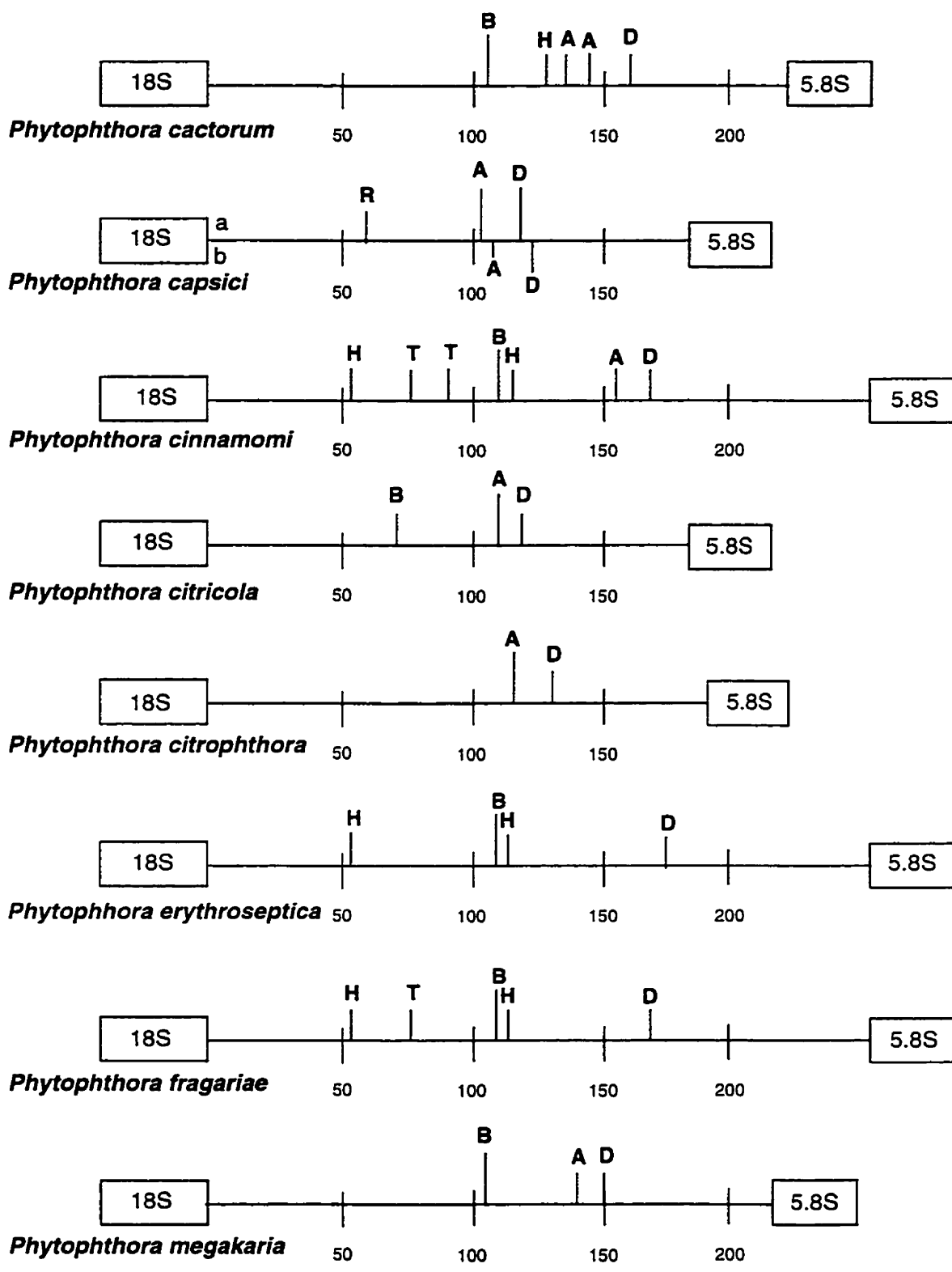
Les séquences disponibles de la région ITS1 ont aussi permis d'obtenir les cartes des sites de restriction enzymatique de 11 espèces de *Phytophthora*, incluant *P. fragariae* et 2 de *Pythium* spp. (voir figure 3.8).

Les profils PCR-RFLP de deux isolats pour chacune des deux variétés de *P. fragariae* ont été comparés (voir figure 3.9). Les profils RFLP obtenus pour les deux variétés de *P. fragariae* sont identiques malgré leur localisation géographique différente. Quelques autres isolats de deux variétés ont été testés, les patrons obtenus étaient le même (la variété *fragariae* : 430, E, PfA5, PfA7; la variété *rubi* : 93, 390, 745, 1369, M10). Les RFLP de deux autres isolats hautement pathogènes de *P. fragariae* var. *rubi* précédemment identifiés comme étant *P. erythrospetctica*, isolat 392 et *P. megasperma* de type 2, isolat 425 provenant de la collection du Dr Hansen ont aussi des profils identiques à *P. fragariae* (voir tableau 3.2, note c). La seule exception rencontrée est un isolat provenant du cultivar Pathfinder du framboisier qui a un profil totalement différent. Il a cependant été identifié comme étant soit un *P. porri* ou *P. primulae* (Dr. D. J. S. Barr, No. de lot : 94M-71, Service national d'identification, Agriculture Canada, Ottawa, ON) et il partage des caractéristiques morphologiques avec *P. citricola* (double apex papillés) (Lucie Laverdière, Laboratoire de diagnostic en phytoprotection, MAPAQ, St-Foy, QC). De plus, ce profil ne correspond à aucune des autres espèces analysées (voir tableau 3.2).

Phytophthora fragariae est différent génétiquement des autres espèces de *Phytophthora* ainsi que de *Pythium* spp. (figure 3.10 A et B). La différence des patrons RFLP entre le *P. megasperma* type 1 (isolat 56 892, hôte = pomme) et *fragariae* est observée avec les enzymes *Alu* I, *Hae* III et *Taq* I (figure 3.10 A). La différence entre l'espèce *cryptogea* (isolat BR521, hôte = tomate) et *fragariae* est remarquée avec les enzymes *Ban* II et *Taq* I (figure 3.10 A). Ces enzymes ne coupent pas le produit PCR. La différence avec l'espèce *cactorum* (isolat 1570) est observée avec les enzymes *Alu* I, *Hae* III, *Taq* I (figure 3.10 A). Le profil de l'isolat *P. megasperma* 56 892 est légèrement différent de *P. megasperma* var. *megasperma*, isolat 416 du framboisier avec les enzymes *Ban* II et *Hae* III (voir figure 3.11). Les profils des *P. megasperma* var. *megasperma* 416 et 56 892 diffèrent énormément du profil théorique de *P. megasperma* f. sp. *glycinea* (voir figure 3.11 et tableau 3.1). *Phytophthora infestans*, pathogène de la pomme de terre et *P. cambivora* (isolat 56 888) ont aussi des profils très différents de *P. fragariae* (figure 3.10 B). Les "mating type" 1 et 2 de *P. infestans* (isolat 866, Pi A1 et A2) montrent le même profil que celui du *P. infestans* de la figure 3.10 B avec les enzymes utilisés (voir figure 3.11). Le profil de l'isolat *Pythium ultimum* 447 est aussi très différent de *P. fragariae* (voir figure 3.10 B). Dans ce cas-ci, les enzymes *Dra* I et *Hha* I ont été utilisés. Ces enzymes ont été utilisés seulement avec le genre *Pythium* (Mugnier et Grosjean, 1995). Les enzymes *Ban* II et *Hae* III ne coupent pas le produit d'amplification de *Pythium ultimum*. Le profil RFLP de *Pythium aphanidermatum* est aussi facilement distinguable de *Phytophthora* spp. et de *Pythium ultimum*, où seul l'enzyme *Mbo* I donne un patron RFLP (figure 3.11). Les profils expérimentaux des figures 3.9 et 3.10 ainsi que d'autres obtenus ont été schématisés à la figure 3.11. De plus, le tableau 3.1 donne les longueurs exactes ou estimées de chacun des profils observés pour les *Phytophthora* spp. et *Pythium* spp.

Un cas problématique intéressant est survenu avec l'analyse d'isolats de *Phytophthora* de conifères (100, 102 et 314). L'isolat 314 (hôte = épinette rouge) a été associé à *P. citricola* à cause de ces caractéristiques morphologiques et culturelles (a/s Dr. D. J. S. Barr). Cependant, la taille du fragment PCR MC1-MC4 est de taille estimée beaucoup plus élevée que celle attendue (321 au lieu de 255 pb). De plus, le profil RFLP est totalement différent de celui théorique du *P. citricola* (voir tableau 3.1). Les profils RFLP de isolats 100 et 102 sont identiques à celui du 314 (voir tableau 3.2).

D'autres genres fongiques ont été analysés en particulier *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* et les *Verticillium dahliae*. *Verticillium dahliae* ne donne aucun produit d'amplification avec les amorces MC1-MC4. De plus, une observation visuelle des séquences disponibles dans GCG de *V. albo-atrum* (110 pb) et de *V. tricorpus* (127 pb) ne montre aucun site d'attachement de l'amorce MC4 au niveau de la sous-unité 5.8S de l'ADNr. Les mêmes observations ont été réalisées pour *F. oxysporum* et *R. solani*; ils ne montrent, eux aussi, aucun site d'attachement à l'amorce MC4.



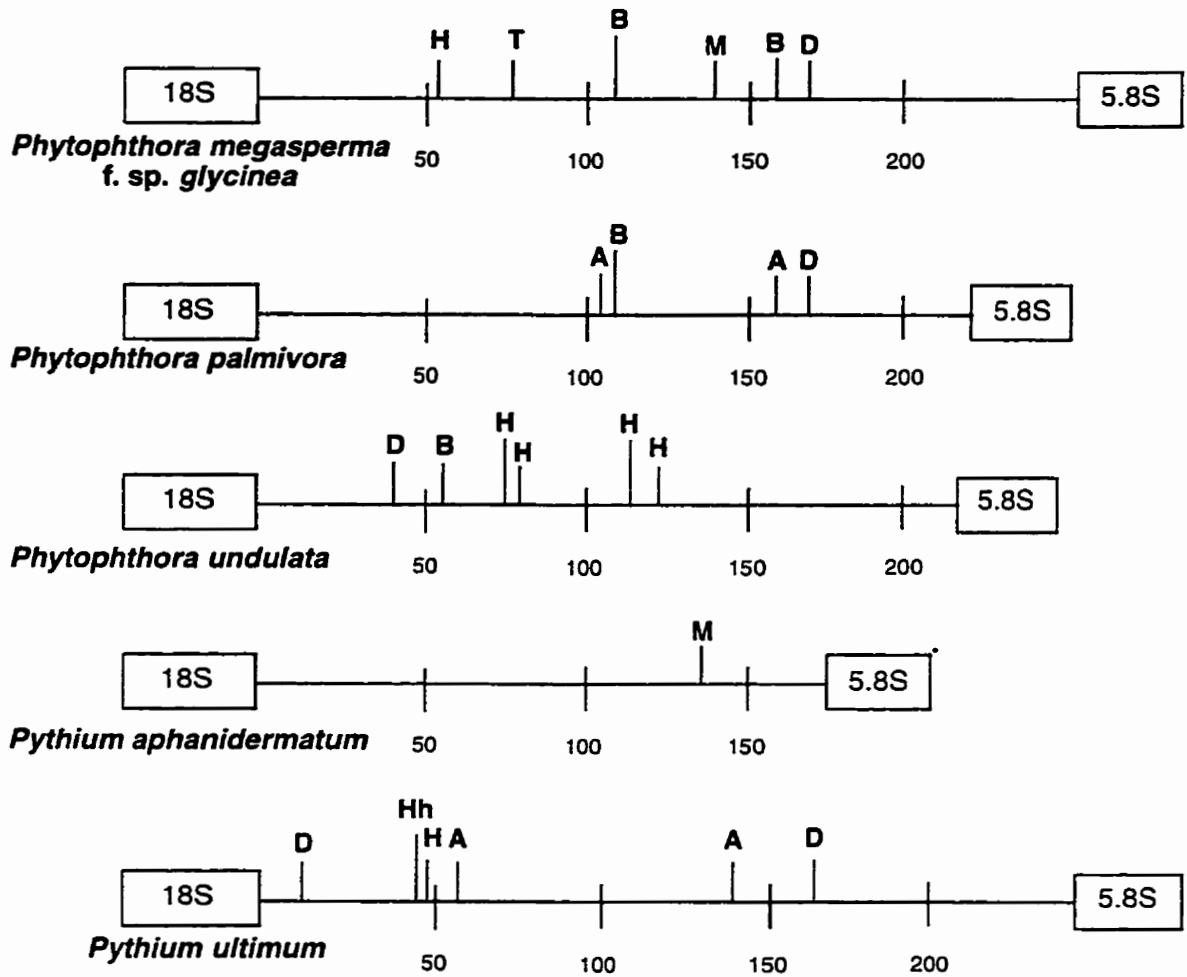


Figure 3.8: Cartes des sites de restriction enzymatique de la région ITS1 déduites des séquences respectives des *Phytophthora* spp. et *Pythium* spp. A: *Alu* I. B: *Ban* II. D: *Dra* I. H: *Hae* III. Hh: *Hha* I. M: *Mbo* I. R: *Rsa* I. T: *Taq* I. L'enzyme *Mbo* I coupe à -7pb du bout 3' du 18S de l'ARNr pour la majorité des Pythiaceae. a: séquence phcap2. b: séquence phcap1_1. L'identification des séquences, à l'exception de *P. fragariae* est au tableau 2.5.

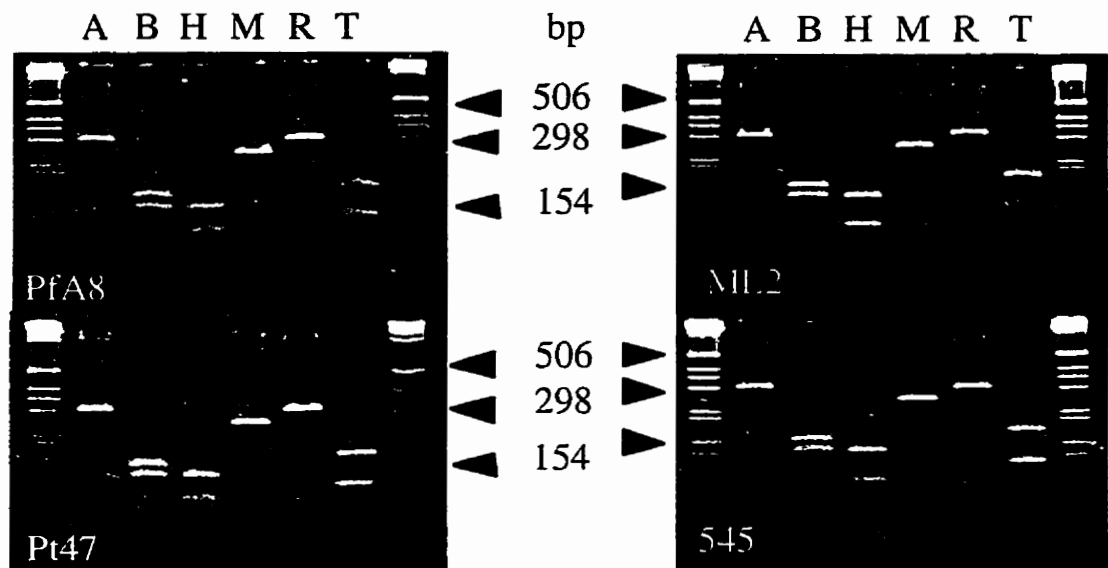


Figure 3.9: Comparaison des profils PCR-RFLP de 4 isolats de *P. fragariae*. PfA8: variété *fragariae*, isolat américain. Pt47: variété *fragariae*, isolat allemand. ML2: variété *rubii*, isolat québécois. 545: variété *rubii*, isolat allemand. À l'extrémité gauche et droite, référence de poids moléculaires en échelle 1 Kb de BRL. Les enzymes de restriction utilisés: A: *Alu* I; B: *Ban* II; H: *Hae* III; M: *Mbo* I; R: *Rsa* I; T: *Taq* I.

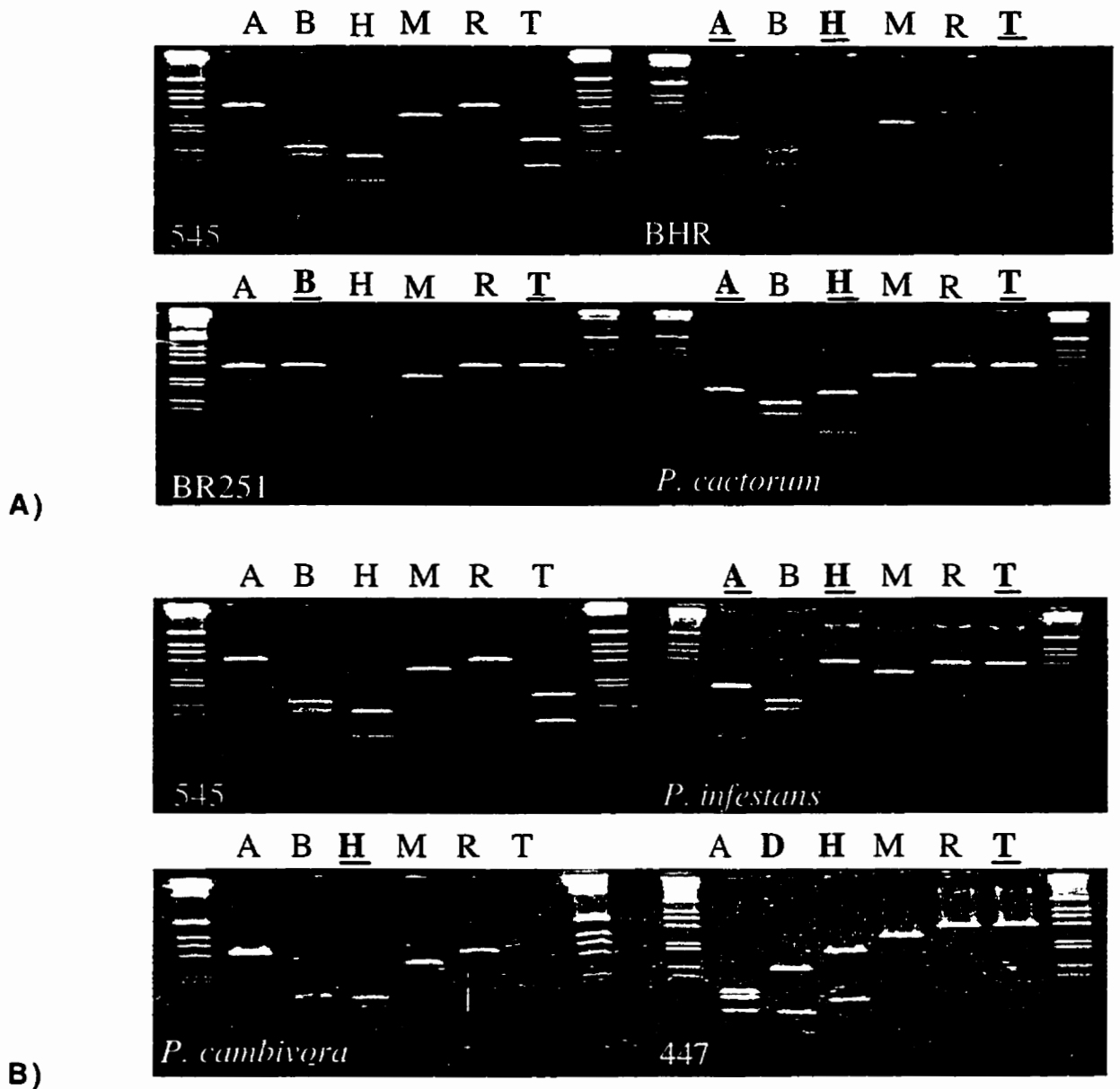


Figure 3.10: Comparaison des profils PCR-RFLP de *P. fragariae* à d'autres *Phytophthora* spp. et au genre *Pythium* (A et B). 545: *P. fragariae* var. *rubi*, isolat 545. BHR. *P. megasperma*, isolat 56 892. BR251: *P. cryptogea*, isolat BR521. *P. cactorum*: isolat 1570. *P. infestans*, isolat 866. *P. cambivora*: isolat 56 888. 447: *Pythium ultimum*, isolat 447. À l'extrémité gauche et droite, référence de poids moléculaires en échelle 1 Kb de BRL. Les enzymes de restriction utilisés sont: A: *Alu* I; B: *Ban* II; H: *Hae* III; M: *Mbo* I; R: *Rsa* I; T: *Taq* I. Pour l'isolat 447, D: *Dra* I et H: *Hha* I (en caractère gras). Les lettres soulignées en caractère gras représentent les patrons qui diffèrent de *P. fragariae*.

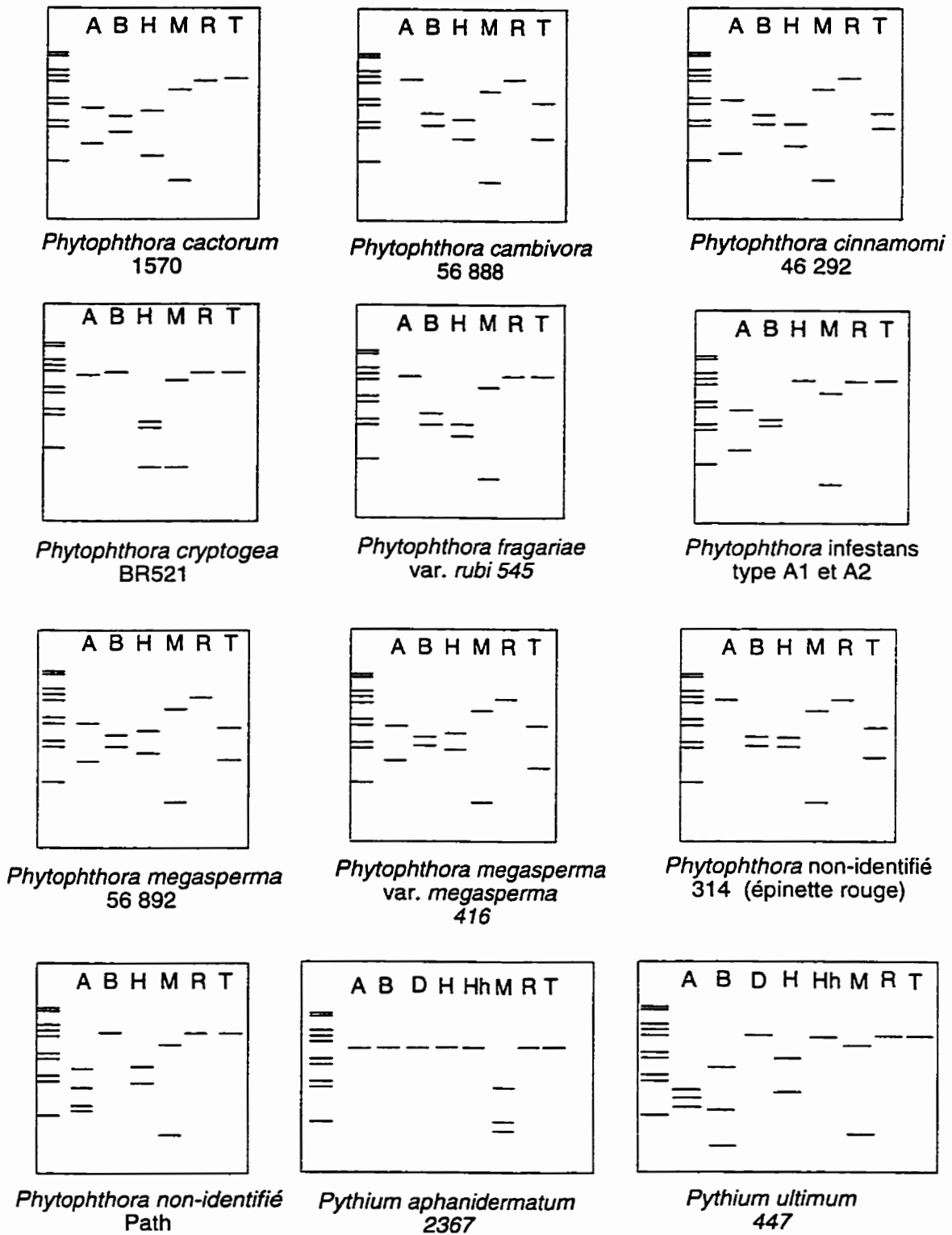


Figure 3.11: Diagrammes des profils de digestion enzymatique des produits PCR MC1-MC4 de la région ITS1. À l'extrémité gauche, référence de poids moléculaires 1 Kb BRL. A: *Alu* I. B: *Ban* II. D: *Dra* I. H: *Hae* III. Hh: *Hha* I. M: *Mbo* I. R: *Rsa* I. T: *Taq* I.

Tableau 3.2: Longueurs des fragments de digestion enzymatique des produits PCR MC1-MC4

SOUCHE	Longueurs des fragments PCR-RFLPs (pb)								Longueur totale (pb)
	AluI	BanII	DraI	HaeIII	HhaI	MboI	RsaI	TaqI	
<i>P. cambivora</i> * 56 888	316	143 159	nt	136 159	nt	42 263	316	126 182	309 ^d
<i>P. capsici</i>	92-95	247	81-82 165-166	247	247	ND	110 137	247	247
<i>P. cactorum</i> ^b	7 92 191	129 158	82 208	105 185	290	45 245	290	290	290
<i>P. cinnamomi</i> ^a	100 204	142 162	83 221	61 103 140	304	45 259	304	14 124 166	304
<i>P. citricola</i>	91 164	124 131	80 175	255	255	255	255	255	255
<i>P. citrophthora</i>	93 171	264	81 183	264	129 141	45 219	264	264	264
<i>P. cryptogea</i> * BR251	86 203	134 168	nt	57 99 113	nt	57 252	311	311	249 ^d
<i>P. erythroseptica</i>	303	141 162	81 222	61 103 140	303	303	303	303	303
<i>P. fragariae</i> ^c	303	142 162	81 222	61 103 140	303	45 258	303	124 180	303
<i>P. megasperma</i> <i>f. sp. glycinea</i>	304	52 89 163	81 223	102 202	304	98 206	304	124 180	304
<i>P. megasperma</i> var. <i>megasperma</i> * 416	81 212	131 169	nt	119 165	nt	45 260	311	92 202	298 ^d

Tableau 3.2: Longueurs des fragments de digestion enzymatique des produits PCR MC1-MC4

SOUCHE	Longueurs des fragments PCR-RFLPs (pb)								Longueur totale (pb)
	AluI	BanII	DraI	HaeIII	HhaI	MboI	RsaI	TaqI	
<i>P. megasperma</i> ^a (pomme) 56 892	84 205	137 159	nt	126 173	nt	45 267	317	92 206	304 ^d
<i>P. megakaria</i>	90 195	130 155	83 202	285	285	45 241	285	285	283
<i>P. palmivora</i>	52 79 154	129 156	72 213	285	285	45 240	285	285	285
<i>P. non-identifié</i> (conifère) 314, 100 et 102	328	145 172	nt	144 172	nt	42 286	328	129 189	321 ^d
<i>P. non-identifié</i> (framboisier) Path ^e	72 80 120	302	nt	119 166	nt	45 256	294	302	294 ^d
<i>Pythium</i> ^f <i>aphanidermatum</i>	245	245	245	245	245	45 60 140	245	245	245
<i>Pythium</i> ^g <i>ultimum</i>	83 100	292	61 81	94 193	98 194	45 247	292	292	292

*: La longueur des fragments a été déterminée par mesure de la régression linéaire du Rf en fonction du log (PM) de la référence 1Kb de BRL.

a: Le profil PCR-RFLP de l'isolat *P. cinnamomi* 46 292 correspond au profil théorique de *P. cinnamomi*.

b: Le profil PCR-RFLP de l'isolat *P. cactorum* 1570 correspond au profil théorique de *P. cactorum*.

c: Le profil PCR-RFLP des *fragariae* PfA5, PfA7, PfA8, E, Pt47, des *rubi* 390, M10, 545, 93, 430, 745, 1369, ML2, d'un *P. megasperma* de "type 2" 245, et d'un *P. erythroseptica* 392 correspond au profil théorique de *P. fragariae*.

d: Valeur moyenne

e: *P. non-identifié*, isolat Path est associé à un *Phytophthora* à double papille soit *P. citricola*, *P. citrophthora*, *P. porri* ou *P. primulea*.

f: Le profil PCR-RFLP de l'isolat *Pythium aphanidermatum* 2367 correspond au profil théorique de *Pythium aphanidermatum*.

g: Le profil PCR-RFLP de l'isolat *Pythium ultimum* 447 correspond au profil théorique de *Pythium ultimum*.

nt: non-testé.

ND: impossible à déterminer.

3.3- Autres systèmes d'amorces

Quelques combinaisons d'amorces localisées au niveau des gènes d'ADNr ont été utilisées avec l'objectif de trouver un système spécifique et sensible à l'amplification PCR de *P. fragariae* var. *rubi* et des autres espèces de *Phytophthora* pathogènes dans les racines du framboisier et dans les sols.

3.3.1- Le système PS1-PS2

Selon Stammler et Seemüller (1993), le système PS1-PS2 amplifie de façon spécifique un fragment de 3006 pb chez *P. fragariae*. Une optimisation des conditions d'amplification a été réalisée dans l'objectif d'effectuer la détection de *P. fragariae*. Diverses températures d'appariement des amorces ont été vérifiées. À 48°C, une bande d'amplification est observée à 3006 pb pour les espèces suivantes: *P. fragariae*, *P. megasperma*, *P. cinnamomi* et *Pythium ultimum*. À 50°C, seulement les *Phytophthora* spp. montrent une amplification. À 55°C, tous les isolats de *P. fragariae* possèdent une bande d'amplification à 3006 pb; *P. megasperma* n'a plus de signal ou présente seulement un fragment de 500 pb à l'exception de *P. megasperma*, isolat "Lab-F3" qui a été isolé du framboisier montrant une bande à 3006 pb. De même, *P. cambivora* 56 888 qui n'a pas été utilisé lors des travaux de Stammler (1993), et *P. cactorum* 1570 ont une bande d'amplification à 3006 pb. *P. cinnamomi*, *P. erythroseptica*, quelques autres isolats de *Phytophthora*, les *Pythium* spp., les *Rhizoctonia solani* et les *Fusarium oxysporum* ne présentent aucune bande d'amplification à 55°C (voir tableau 3.3). La figure 3.12 montre l'amplification des races physiologiques américaines de A2 à A10, deux isolats obtenus de la fraise, l'isolat 745 de la variété *rubi* ainsi que l'isolat *P. megasperma* Lab-F3. À 60°C, seulement *P. fragariae* (3006 pb) et *P. megasperma* (500 pb) possèdent une bande d'amplification à 3006 pb. À 65°C, on perd le signal d'amplification de *P. fragariae*, mais celui de *P. megasperma* est conservé.

3.3.2- Les systèmes combinés des amorces PS et Phyto

Les systèmes combinés des amorces PS et Phyto ont été vérifiés pour leur sensibilité et leur spécificité d'amplification des *Phytophthora* spp. Les divers systèmes analysés ont été classés en deux groupes, les systèmes "Ph+Py" et les systèmes "Ph". Les systèmes "Ph+Py" amplifient les espèces des genres *Phytophthora* et *Pythium*. Deux systèmes "Ph+Py" donnent une amplification intense et de taille optimale, soit Phyto2-ITS4 (572 pb) et PS1-ITS3 (579 pb) (voir figure 3.13 et 3.14). Ils amplifient la région 5.8S et l'ITSII. Les systèmes "Ph" amplifient seulement les *Phytophthora* spp. Deux combinaisons "Ph" ont été retenues soit Phyto1-PS2 (2410 pb) et soit PS2-NS2 (840 pb) (voir figure 3.15 et 3.16). Le système PS2-NS2 est le plus intéressant, car tous les *Phytophthora* montrent une amplification et qu'une étude RFLP sur ces produits PCR pourrait mettre en évidence des polymorphismes au niveau de l'IGS et du bout 5' de la PSU de l'ADNr. Les autres systèmes présentent un moins grand intérêt. Ils donnent une amplification peu intense et de taille trop élevée. De plus, tous les systèmes utilisant les amorces Phyto sont désavantagés car la température d'hybridation de ceux-ci est de 38°C comparativement à 55°C pour les autres systèmes. La séquence nucléotidique des amorces Phyto est identique à celle de son site d'hybridation chez les *Phytophthora*. Mais, quatorze des vingt nucléotides des amorces Phyto peuvent s'hybrider avec la séquence nucléotidique des *Pythium*.

Tableau 3.3: Système d'amplification PS1-PS2 selon différentes températures d'hybridation des amorces.

souche	No. idd	Tailles des fragments amplifiés				
		température d'hybridation				
		48°C	50°C	55°C	60°C	65°C
<i>Phytophthora fragariae</i>	A1	nt	0	*	nt	nt
<i>Phytophthora fragariae</i>	A2	*	*	*	nt	nt
<i>Phytophthora fragariae</i>	A3	nt	*	*	nt	nt
<i>Phytophthora fragariae</i>	A4	nt	*	*	nt	nt
<i>Phytophthora fragariae</i>	A5	nt	nt	*	nt	nt
<i>Phytophthora fragariae</i>	A6	nt	nt	*	nt	nt
<i>Phytophthora fragariae</i>	A7	*	*	*	*	0
<i>Phytophthora fragariae</i>	A8	nt	nt	*	nt	nt
<i>Phytophthora fragariae</i>	A9	nt	nt	*	nt	nt
<i>Phytophthora fragariae</i>	A10	nt	*	*	*	0
<i>Phytophthora fragariae</i>	E	nt	nt	*	nt	nt
<i>Phytophthora fragariae</i>	Pt47	nt	nt	*	nt	nt
<i>Phytophthora fragariae</i>	MAY	nt	nt	*	nt	nt
<i>Phytophthora fragariae</i>	MAYUS	nt	nt	*	nt	nt
<i>Phytophthora fragariae</i>	545	nt	nt	*	nt	nt
<i>Phytophthora fragariae</i>	93	nt	nt	*	nt	nt
<i>Phytophthora fragariae</i>	G1	nt	nt	*	nt	nt
<i>Phytophthora fragariae</i>	745	*	*	*	*	0
<i>Phytophthora fragariae</i>	1232	nt	nt	*	nt	nt
<i>Phytophthora fragariae</i>	ML2	nt	nt	*	nt	nt
<i>Phytophthora fragariae</i>	Path	nt	nt	*	nt	nt
<i>Phytophthora</i>	111009	nt	nt	0	nt	nt
<i>Phytophthora megasperma</i>	926	nt	nt	0	nt	0
<i>Phytophthora megasperma</i>	56 892	*	*	0 ou 500pb	500pb	500pb
<i>Phytophthora megasperma</i>	lab	nt	nt	0	nt	0
<i>Phytophthora megasperma</i>	Lab-F3	nt	nt	*	nt	*
<i>Phytophthora erythroseptica</i>	Ei	nt	nt	0	nt	nt
<i>Phytophthora cambivora</i>	56 888	nt	nt	*	nt	nt
<i>Phytophthora cinnamomi</i>	cin US	nt	nt	0	nt	nt
<i>Phytophthora cinnamomi</i>	46 292	*	*	0	0	0
<i>Phytophthora cactorum</i>	44 100	nt	nt	0	nt	nt
<i>Phytophthora cactorum</i>	28 946	nt	nt	0	nt	nt
<i>Phytophthora cactorum</i>	1570	nt	nt	*	nt	nt
<i>Pythium aphanidermatum</i>	2367	nt	nt	0	nt	nt
<i>Pythium ultimum</i>	447	*	100pb	0	0	0
<i>Rhizoctonia solani</i>	AG1	0	0	0	0	0
<i>Rhizoctonia solani</i>	AG3	nt	nt	0	nt	nt
<i>Fusarium oxysporum</i>	249	nt	nt	0	nt	nt
<i>Fusarium oxysporum</i>	1835	nt	nt	0	nt	nt

Légende: *: amplification à 3006pb nt: non-testé 0: aucune amplification

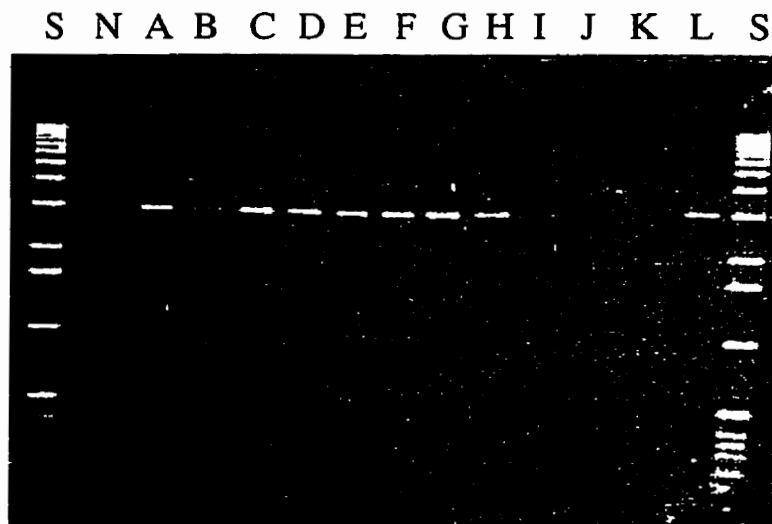


Figure 3.12: Amplification PCR du système amorce PS1-PS2 (3006 pb). S: référence de poids moléculaires 1 Kb de BRL. N: témoin négatif. *P. fragariae* var. *fragariae*, A: PfA2, race A2, B: PfA3, race A3, C: PfA5, race A5, D: PfA6, race A6, E: PfA7, race A7, F: PfA8, race A8, G: PfA9, race A9, H: PfA10, race A10, I: isolat May, J: isolat MayUS. K: *P. fragariae* var. *rubi* 745. L: *P. megasperma* Lab-F3 (isolé du framboisier).

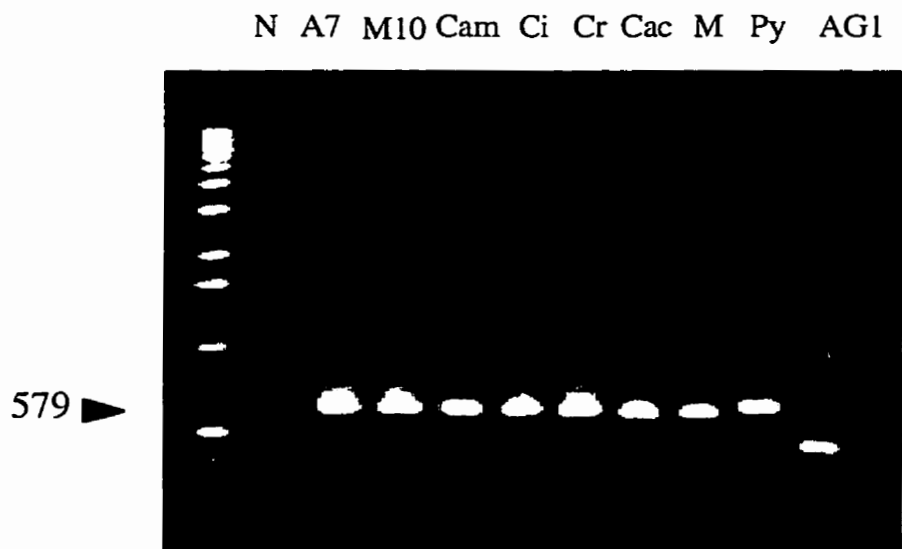


Figure 3.13: Amplification PCR du système d'amorces PS1-ITS3 (579 pb). À l'extrémité gauche, référence de poids moléculaires en échelle 1 Kb BRL. N: témoin négatif. A7: *P. fragariae* var. *fragariae* PfA7. M10: *P. fragariae* var. *rubi*. Cam: *P. cambivora* 56 888. Ci: *P. cinnamomi* 46 292. Cr: *P. cryptogea* BR521. Cac: *P. cactorum* 1570. M: *P. megasperma* 56 892. Py: *Pythium ultimum* 447. AG1: *Rhizoctonia solani* groupe AG1.

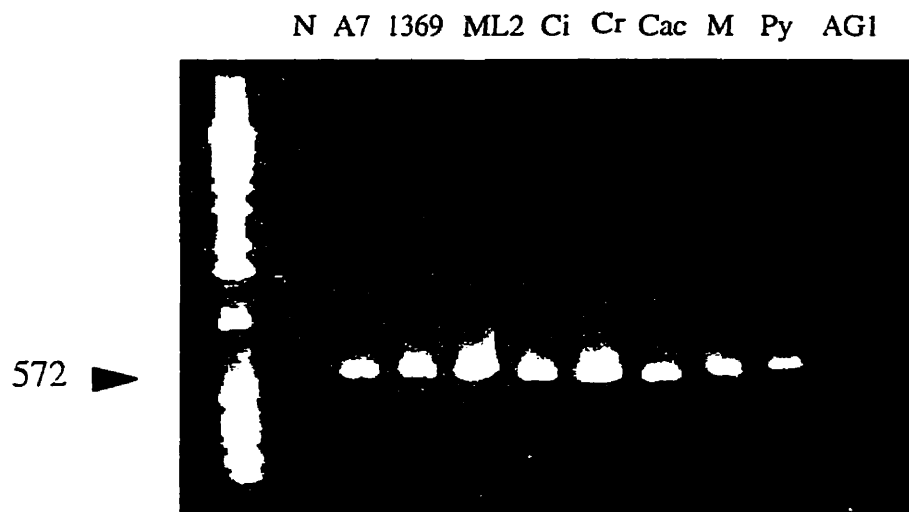


Figure 3.14: Amplification PCR du système d'amorces Phyto2-ITS4 (572 pb). À l'extrémité gauche, référence de poids moléculaire en échelle 1 Kb BRL. N: témoin négatif. A7: *P. fragariae* var. *fragariae* PfA7. 1369: *P. fragariae* var. *rubi*. ML2: *P. fragariae* var. *rubi*. Ci: *P. cinnamomi* 46 292. Cr: *P. cryptogea* BR251. Cac: *P. cactorum* 1570. M: *P. megasperma* 56 892. Py: *Pythium ultimum* 447. AG1: *Rhizoctonia solani* groupe AG1.

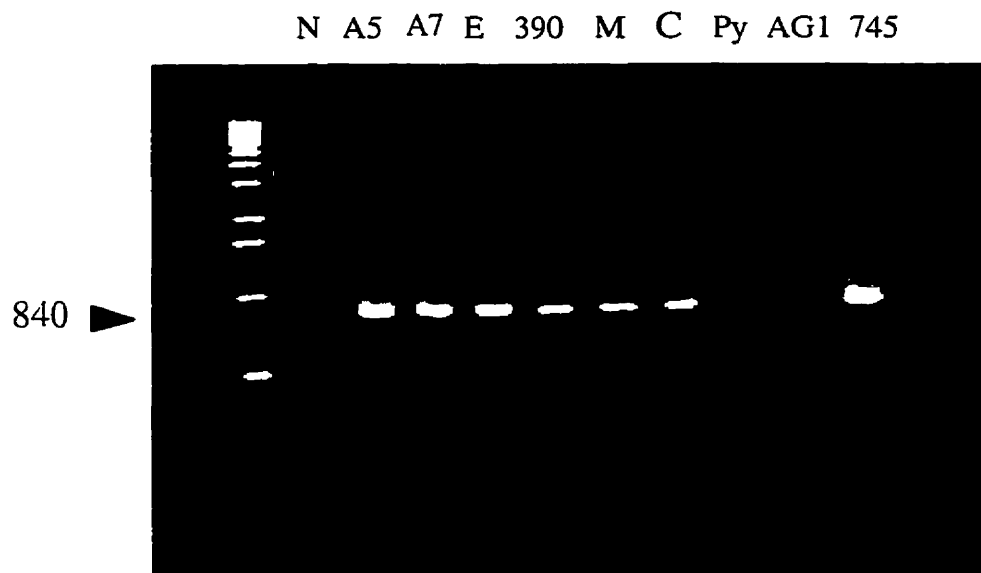


Figure 3.15 : Amplification PCR du système d'amorces PS2-NS2 (840 pb). À l'extrémité gauche, standard en échelle 1 Kb BRL. N: négatif. A5: *P. fragariae* var. *fragariae* PfA5. A7: *P. fragariae* var. *fragariae* PfA7. E: *P. fragariae* var. *fragariae*. 390: *P. fragariae* var. *rubi*. M: *P. megasperma* 56 892. C: *P. cinnamomi* 46 292. Py: *Pythium ultimum* 447. AG1: *Rhizoctonia solani* groupe AG1. 745: *P. fragariae* var. *rubi*.

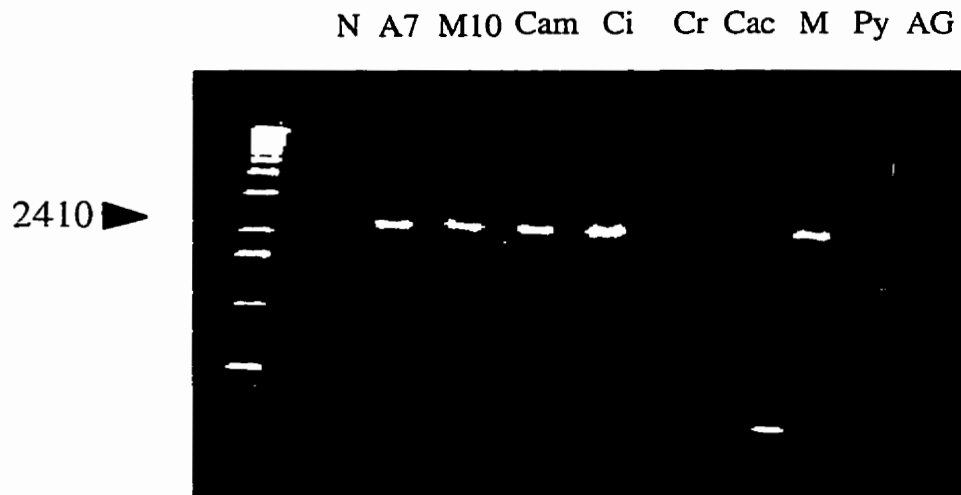


Figure 3.16 : Amplification PCR du système d'amorces Phyto1-PS2 (2410 pb). À l'extrémité gauche, référence de poids moléculaires en échelle 1 Kb BRL. N: témoin négatif. A7: *P. fragariae* var. *fragariae* PfA7. M10: *P. fragariae* var. *rubi*. Cam: *P. cambivora* 56 888. Cin: *P. cinnamomi* 46 292. Cry: *P. cryptogea* BR251. Cac: *P. cactorum* 1570. M: *P. megasperma* 56 892. Py: *Pythium ultimum* 447. AG: *Rhizoctonia solani* groupe AG1.

CHAPITRE 4

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'identification des races et des espèces de *Phytophthora* pathogènes des cultures du fraisier et du framboisier est importante afin d'orienter les travaux de sélection de cultivars résistants et de permettre un suivi de ces pathogènes dans les champs. La technique PCR a été utilisée dans le but principal de créer un test d'identification par l'amplification des régions ITS de l'ADNr nucléaire.

Pour obtenir ce test, nous avons comme objectifs le séquençage des deux régions ITS de chacune des deux variétés de *P. fragariae* et de comparer les séquences obtenues avec celles disponibles dans les écrits scientifiques et les banques de données pour d'autres espèces de *Phytophthora*. et d'autres espèces de *Pythium*. L'emploi des ITS pour distinguer des espèces fongiques est une des stratégies les plus utilisées et citées dans les écrits scientifiques (Bruns *et al.*, 1991; Henson et French, 1993). L'utilisation de cet outil pour différencier les deux variétés de *P. fragariae* semblait une bonne voie, même si, à priori, le pourcentage de variabilité génétique intraspécifique chez les *Phytophthora* était faible (de 0 à 4,6%, voir tableau 3.1). D'autres cas de faible pourcentage de variabilité génétique intraspécifique ont été observés chez les Oomycètes, les champignons (<2%), les plantes (<1%) et les animaux (<1%) (Lee et Taylor, 1992). Des différences aussi petites que de quelques nucléotides (4 à 5) ont permis de dessiner des amorces PCR spécifiques. Par exemple, une différence de 5 nucléotides dans les deux ITS entre *Verticillium dahliae* et *V. albo-atrum* (variabilité intraspécifique ~ 1%) a permis de fabriquer une sonde spécifique à chaque espèce (Nazar *et al.*, 1991), et par la suite, d'obtenir des amorces PCR spécifiques (Moukhamedov *et al.*, 1994). D'autres cas de variations intraspécifiques obtenues avec les séquences des

régions ITS étaient rapportées pour *Fusarium sambucinum* et *Leptosphaeria maculans* (O'Donnel, 1992; Xue *et al.*, 1992).

L'étude des séquences d'ADN des régions ITS I et ITS II n'a pas permis de distinguer génétiquement *P. fragariae* var. *rubi* de *P. fragariae* var. *fragariae*. La seule différence présente s'exprime par une différence individuelle des isolats dans la région ITS I. Cette différence d'une délétion/insertion d'une adénine dans une zone répétitive d'adénine localisée dans une petite répétition directe CCAC...14N....CCAC (voir figure 3.1) semble due au mécanisme de "slipped-strand mispairing". Ce type d'événement est lié à des régions d'ADN contenant de petites répétitions continues causées par un mauvais appariement des unités voisines (Levinson et Gutman, 1987; Li et Graur, 1991). Ceci est fréquent dans les ITS (voir section 4.1.3). Cette similitude entre les séquences des deux variétés de *P. fragariae* n'est pas surprenante car les différences entre celles-ci reposent sur peu de critères tels la capacité de croître sur milieu MEA, le délai d'apparition des oospores sur milieu de culture, de très légères différences dans les profils électrophorétiques (Duncan *et al.*, 1991).

L'analyse des séquences ITS de *P. fragariae* var. *rubi* n'a pas permis de déceler de la variabilité intraspécifique. Cette absence de variabilité dans les séquences ITS est aussi confirmée par les publications scientifiques où les isolats de la variété *rubi* sont présentés comme un groupe homogène tant par les RFLP, les profils protéiques que par les caractères morphologiques (Förster et Coffey, 1992; Stammler et Seemüller, 1993; Wilcox *et al.*, 1993). De plus, l'analyse des séquences ITS des isolats de la variété *fragariae* a également démontrée l'homogénéité des séquences ITS. À la lumière de ces résultats, il semble qu'il n'y a pas suffisamment de différences accumulées entre les deux variétés pour que notre choix d'employer les ITS soit adéquat. Briard *et al.* (1995) suggèrent que l'origine des *Phytophthora* est récente. Ils obtenaient un faible taux de substitution dans le domaine D2 de la GSU de l'ARNr. La similitude de séquences dans les ITS confirme aussi l'hypothèse avancée par Brasier et Hansen (1992) que la divergence entre les deux variétés serait récente. La différence majeure entre les deux variétés est leur pouvoir pathogène sur des hôtes spécifiques. (Duncan *et al.*, 1991). Donc, la distinction entre les deux variétés et surtout entre les races de chacune des variétés serait déterminée par leur effet pathogénique sur les cultivars

mettant ainsi en jeu les gènes de virulence et de résistance des deux partenaires. Par conséquent, la différence entre les deux variétés pourrait se situer au niveau des gènes de virulence (Förster et Coffey, 1992; Stammler et Seemüller, 1993; Wilcox *et al.*, 1993). Comme aucun gène de virulence chez *P. fragariae* n'est connu et qu'aucune carte de marqueurs n'était disponible au début du présent projet chez les *Phytophthora*, l'utilisation de ces gènes pour établir un test diagnostique aurait demandé quelques années de travail.

Bousquet (1995) mentionne que si l'analyse des régions variables du génome démontre que celles-ci sont encore trop conservées pour des espèces rapprochées ou des sous-espèces qui se sont séparées récemment; on peut devoir recourir aux empreintes génétiques. Des outils moléculaires exploitants l'ADN génomique total tel l'emploi d'amorces aléatoires RAPD, l'utilisation de séquences répétées telles les VNTRs (Meyer *et al.*, 1991; DeScenzo et Harrington, 1994), les ERICs, les REPs (Edel *et al.*, 1995) ou autres (Taylor, 1993) pourraient permettre l'obtention d'empreintes génétiques pour la détermination des races ou la distinction des deux variétés. Les IGS (Bruns *et al.*, 1990) ou encore l'ADNmt (Stammler *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1994) pourraient permettre aussi la distinction entre les deux variétés de *P. fragariae* compte tenu de la plus grande variabilité intraspécifique observée dans ces séquences.

Malgré l'homogénéité de l'espèce *P. fragariae*, les séquences des deux régions ITS pour cette espèce sont différentes en longueur et en composition des autres séquences ITS disponibles pour d'autres espèces de *Phytophthora* et plusieurs espèces du genre *Pythium*, son plus proche parent. Ces polymorphismes de longueur sont dus aux régions de délétions/insertions tandis que les variations de composition sont observées dans les régions variables qui bordent ces zones de délétion/insertions (voir figure 3.4 et 3.6). Ces régions non-conservées sont dispersées entre les régions conservées des ITS et elles sont sujettes à de grandes pressions de sélection (Michot, 1983; Torres, 1990).

Grosjean (1992) a étudié les séquences de la région ITS1 chez de nombreuses espèces de *Pythium* (environ 36 espèces) et de quelques espèces de *Phytophthora* (environ 9 espèces). Cette étude lui a permis d'établir certains domaines de séquences propres aux *Pythium* ou aux *Phytophthora* (4 domaines) et

d'autres domaines conservés partagés par les *Pythium* et les *Phytophthora*. Un premier domaine spécifique aux *Phytophthora* est observé dans une zone conservée localisée à 50 pb du bout 5' de la région ITS1 (voir figure 3.4). Trois autres domaines peuvent être localisés aux positions de 110 à 130 pb. Un dernier domaine de 20 nucléotides (213 à 233 pb) semblent aussi correspondre à des zones de séquences conservées décrites par Grosjean (1992). Lee *et al.* (1993) ont utilisé la séquence de ce dernier domaine pour fabriquer une sonde nucléique (Phyto) spécifique au genre *Phytophthora*.

Les régions ITS de *P. fragariae* ont en commun avec les autres *Phytophthora* spp. de petits et simples motifs répétés, un pourcentage de base G + C équivalent dans le deux ITS et une répétition directe à l'extrémité 5' de l'ITS1 (voir figure 3.1 et tableau 3.1). Les patrons répétitifs conservés près des bouts 3' et 5' de chaque ITS ont été en premier lieu reconnu chez la souris, la levure et le rat (Goldman *et al.*, 1983). Quatre nucléotides répétés sont détectés au bout 3' de la PSU 18S et de la 5.8S de l'ARNr. Ils sont aussi présent chez *P. fragariae* et les autres *Phytophthora* spp. Chez les *Phytophthora*, les répétitions sont plus espacées que celle rapportées, par exemple CCAC...14N...CCAC au bout 3' du 18S d'ADNr (voir figure 3.1 de la position 21 à 42, et voir figure 3.2 de la position 1 à 20). Les séquences bordant les bouts de terminaison des ARNr matures sont probablement impliquées dans le processus de développement du pré-ARNr. Ces répétitions directes présenteraient un site de coupure pour les ribonucléases (Veldman *et al.*, 1980, 1981; Goldman *et al.*, 1983).

Les ITS et la GSU 25/28S de l'ARNr de la plupart des eucaryotes partagent des caractéristiques de séquences similaires dans les régions variables: de simples et petits motifs répétés de 3 à 4 nucléotides (Handcock et Dover, 1988; Gonzalez *et al.*, 1990; Torres *et al.*, 1990). Les *Phytophthora* spp. possèdent aussi ces motifs répétés (Lee et Taylor, 1992), tout comme *P. fragariae*. Les motifs GGC, TGC, TTG et CGG sont des exemples retrouvés dans les régions ITS de *P. fragariae* (voir figure 3.1 et 3.5). Ces simples et petites répétitions sont souvent générées lors de glissement de brins créant des désappariements durant la réplication ("slipped strand mispairing", Levinson et Gutman 1987). À l'opposé chez la drosophile, les ITS ne montrent pas des taux élevés de simplicité, c'est donc peu probable que cela soit dû au glissement de réplication ("slippage replication"; Tautz *et al.*, 1980).

Chez les *Phytophthora*, il y a un contenu en GC équivalent chez les deux ITS, comme cela est observé chez 19 des 20 champignons observés, plantes ou animaux (Torres *et al.*, 1990). La balance en GC est interprétée comme un support à la coévolution (ou évolution dite horizontale) des deux ITS (Gonzalez *et al.*, 1990; Torres *et al.*, 1990; Li et Graur, 1991).

De même, la région ITSI des *Phytophthora* semble une région beaucoup plus variable que l'ITSII, même si elle est plus courte. Elle semble aussi montrer un bon potentiel pour la distinction des *Phytophthora* pathogènes du framboisier et pour la fabrication d'amorces spécifiques. Lee et Taylor (1992) mentionnent qu'une identification rapide des espèces *P. capsici*, *P. cinnamomi*, *P. citrophthora*, *P. megakaria* et *P. palmivora* peut être possible par l'emploi des RFLP sur les produits PCR des ITS. Plus tard, ceci était confirmé par Cooke *et al.* (1996) qui ont utilisé les régions ITS des *Phytophthora* du groupe taxonomique I. Crawford *et al.* (1996) citent aussi les ITS comme outil pour établir des relations systématiques entre les groupes taxonomiques.

L'emploi de six enzymes de restriction sur le produit d'amplification MC1-MC4 couvrant la région ITSI a permis l'atteinte du but principal, soit un test d'identification des *Phytophthora* pathogènes. Ce système PCR-RFLP permet de différencier *P. fragariae* des autres *Phytophthora* spp. aussi bien que du genre *Pythium*. D'ailleurs, les différentes espèces testées ont un profil RFLP unique.

L'homogénéité des profils RFLP de *P. fragariae*, *P. megasperma* type 2 et *P. erythroseptica* isolés du framboisier confirme la cospécificité de ces taxons à l'espèce *P. fragariae* (Duncan *et al.*, 1991). La différence entre les profils PCR-RFLP est remarquée au niveau interspécifique et non à l'intérieur des espèces, comme par exemple pour *P. fragariae* et *P. infestans*. Par conséquent, les espèces étroitement liées ne diffèrent pas suffisamment à l'intérieur des ITS pour être différenciées avec cette approche (Gardes et Bruns, 1996). L'emploi des PCR-RFLP au niveau des IGS pourrait être un meilleur outil ou un outil complémentaire pour les espèces étroitement liées (Gardes et Bruns, 1996). De plus, l'ADN amplifié de moins de 500 pb ne possède pas nécessairement assez de sites de reconnaissance RFLP pour permettre la différenciation entre des isolats apparentés

(Henson et French, 1993). Des différences entre les profils PCR-RFLP peuvent cependant être remarquées au niveau intraspécifique pour des taxons plus variables comme chez l'espèce *P. megasperma*. Ce complexe regroupe des espèces dites biologiquement émergentes (Hansen *et al.*, 1986). Une étude des séquences des régions ITS a permis de préciser la position taxonomique relative de ce complexe d'espèces (Crawford *et al.*, 1996).

Cette approche de faire correspondre un profil PCR-RFLP à une espèce (matching) nécessite la connaissance d'une ou plusieurs caractéristiques des espèces cibles (Gardes et Bruns, 1996). Les caractéristiques associées à l'identification peuvent être des caractères morphologiques et physiologiques spécifiques, l'hôte, etc... Ceci est très efficace pour diminuer ou éliminer les identités faussement similaires. Mais, une association positive d'un profil RFLP à une espèce donnée ne peut pas être obtenue pour un organisme totalement inconnu ou pour lequel aucune information complémentaire n'est connue (Gardes et Bruns, 1996). Par exemple, l'isolat Path isolé du cultivar Pathfinder de framboisier ne correspond à aucun profil en banques et les informations morphologiques associées à son identification par les clés taxonomiques sont vagues. Ou bien encore, les profils PCR-RFLP des isolats de conifères ne correspondent pas aux données génétiques théoriques associées à l'espèce déterminée par les clés taxonomiques.

Le système PCR-RFLP est un test rapide, simple et relativement peu dispendieux (Gardes et Bruns, 1996). Il peut être semi-automatisé afin d'être utilisé quotidiennement (Mugnier et Grosjean, 1995). Cet outil de première génération pourra être combiné avec d'autres systèmes d'amorces, ou technique ELISA pour un complément d'information (quantification) (Martin *et al.*, 1995), une meilleure sensibilité de détection et pour augmenter sa spécificité. Par exemple, le système d'amorces PCR-RFLP peut être utile pour vérifier le résultat obtenu avec le système PS1-PS2 mis au point par Stammler et Seemüller (1993). Si une première amplification avec PS1-PS2 est positive, il est possible de réamplifier avec des amorces internes comme MC1-MC4 et donner un profil RFLP concluant ou non à *P. fragariae*. Aux conditions optimales d'amplification du système PS1-PS2, l'espèce *P. cambivora* (isolat 56 888) amplifie un fragment de 3006 pb, mais elle donnera un profil PCR-RFLP différent de *P. fragariae*; ou encore l'espèce *P. megasperma*, isolat Lab-F3 qui amplifie avec les amorces PS1-PS2 pourrait être

identifié via le système MC1-MC4 suivi d'un RFLP.

Plusieurs autres combinaisons d'amorces ont été utilisées au niveau des gènes d'ADNr. Ces combinaisons ont été réalisées pour obtenir un système spécifique d'amplification PCR de *P. fragariae* var. *rubi* de plus petite taille que le système de Stammler et Seemüller (1993) et de meilleure sensibilité. Cependant, aucune des combinaison retenues n'a donné des résultats satisfaisant en regard de l'objectif visé. Prises individuellement, les amorces PS semblent ne conférer aucune spécificité à l'espèce *P. fragariae* lorsqu'elles sont couplées avec les amorces ITS ou des amorces dont la séquence est spécifique aux *Phytophthora* (Phyto).

En conclusion, les régions ITS n'ont pas permis de différencier les 2 variétés de *P. fragariae*, mais un test d'identification des *Phytophthora* pathogènes a été mis au point. Ce test pourra être utilisé en complément à la technique de coloration racinaire à la fuchsine (Thibodeau et Charrier, 1994). De plus, les séquences et les profils PCR-RFLP permettront de préciser la distance génétique de *P. fragariae* par rapport aux autres espèces de *Phytophthora* et pourraient être un outil important pour résoudre les problèmes taxonomiques du genre *Phytophthora* au niveau des complexes d'espèces (complexe *P. megasperma* et complexe *cryptogea/drescleri*). Les résultats de Crawford *et al.* (1996) semblent confirmer cette hypothèse. Les profils RFLP pourront aussi permettre la détection des pathogènes dans les échantillons des sols en combinaison avec l'utilisation des plantes pièges servant à l'obtention de cultures fongiques purifiées. De plus, ils pourront être utilisés dans le programme de certification ou à titre préventif dans les champs lors de l'instauration d'une nouvelle culture. Ce test PCR/RFLP pourra être étendue à d'autres cultures par exemple chez la culture des pommiers (Utkhede et Smith, 1991) ou chez les pépiniéristes pour la culture des conifères (Hamm et Hansen, 1991; Chastagner *et al.*, 1995), où l'on retrouve à peu près les mêmes espèces de *Phytophthora* pathogènes que chez le framboisier. L'acquisition de nouveaux isolats et d'espèces de *Phytophthora* retrouvés chez le framboisier permettra de compléter le test PCR-RFLP, et contribuera à valider les profils des espèces déjà en banque. Finalement, l'obtention d'isolats de d'autres genres chez les Oomycètes permettra de vérifier la spécificité des amorces MC1-MC4.

BIBLIOGRAPHIE

- Aber, M. 1993. Manuel de l'observateur: Petits Fruits. Réseau d'Avertissement Phytosanitaire. Gouvernement du Québec. Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation. 52 p.
- Ainsworth, G. C. 1973. Introduction and keys to higher taxa tiré de The fungi-an advanced treatise. G. C. Ainsworth, F. K. Sparrow, A. S. Sussman, eds. Academic Press. London. pp 1-7.
- Ali-Shtayeh, M. S. 1991. A method for using commercial ELISA tests to detect zoospores of *Phytophthora* and *Pythium* species in irrigation water. Plant Disease 75(3):305-311.
- Amouzou-Alladaye, E., J. Dunez, M. Clerjeau. 1988. Immunoenzymatic detection of *Phytophthora fragariae* in infected strawberry plants. Phytopathology 78(8):1022-1026.
- Anonyme. 1955. Surveiller le coeur rouge du fraisier. Communiqué No. F-47(s). Service de l'Information. Ministère de l'Agriculture. Ottawa. Canada.
- Anonyme. 1994. Le point sur la recherche petits fruits, Gouvernement du Québec, Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation, Direction de la recherche et du développement, Ste-Foy, Québec.
- Bain, H. F., J. B. Demaree. 1945. Red stele root disease of strawberry caused by *Phytophthora fragariae*. J. Agr. Res. 70:11-30, cité par Paulus 1990.
- Barr, D. J. S. 1983. The zoosporic grouping of plant pathogens: entity or non-entity? tiré de Zoosporic plant pathogene-a modern perspective. S. T. Buczacki, ed. Academic Press. London. pp 43-83.
- Baudry, A., M. Courteix, D. Didelot. 1993. Maladies du framboisier rencontrées en France. L'Arboriculture fruitière 457:40-46.
- Beck, J. J., J. M. Ligon. 1995. Polymerase chain reaction assays for the detection of *Stagonospora nodorum* and *Septoria tritici* in wheat. Phytopathology 85(3):319-324.
- Belkhiri, A., M. W. Dick. 1988. Comparative studies on the DNA of *Pythium* species and some possibly related taxa. J. Gen. Microbiol. 134:2673-2683.
- Bhattacharya, D., L. Medlin, P. O. Wainright, E. V. Aritia, C. Bibeau, S. K. Stickel, M. L. Sogin. 1992. Algae containing chlorophylls a + c are polyphyletic: molecular evolutionary analysis of the Chromophyta. Evolution 46:1801-1817. Erratum (1993). Evolution 47:986.

- Bielenin, A., S. N. Jeffers, W. F. Wilcox, A. L. Jones. 1988. Separation by protein electrophoresis of six species of *Phytophthora* associated with deciduous fruit crops. *Phytopathology* **78**(11):1402-1408.
- Blackwell, E. 1949. Terminology in *Phytophthora*. *Mycological Papers (C. M. I.)* **30**:1-23 (issued 1 novembre 1949).
- Bolay, A., H.-P. Lauber. 1989a. Les *Phytophthora* du Fraisier. *Rev. suisse Vitic. Arboric. Hort.* **21**(2):95-96.
- Bolay, A., H.-P. Lauber. 1989b. Le *Phytophthora* du framboisier. *Rev. suisse Vitic. Arboric. Hort.* **21**(2):97-98.
- Bolay, A., H.-P. Lauber. 1989c. Un *Phytophthora*, cause d'un rapide dépérissement du framboisier. *Rev. suisse Vitic. Arboric. Hort.* **21**(3):147-152.
- Bonde, M. R., J. A. Micales, G. L. Peterson. 1993. The use of isoenzyme analysis for identification of plant-pathogenic fungi. *Plant Disease* **77**(10):961-968.
- Bounou, S. 1996. Mise au point d'un outil moléculaire de diagnostique de *Rhizoctonia solani*, groupe anastomosique 3 (AG₃). MSc. Mémoire No. 14 648. Université Laval. Québec. Canada.
- Bousquet, J. 1995. Des machines moléculaires à voyager dans le temps. *Interface* septembre-octobre pp 27-42.
- Bowman, B. H., J. W. Taylor, A. G. Brownlee, J. Lee, S. D. Lu, T. J. White. 1992. Molecular evolution of the fungi: relationship of the basidiomycetes, ascomycetes, and chytridiomycetes. *Mol. Biol. Evol.* **9**:285-296.
- Boysen, M., M., Borja, C. Delmoral, O. Salazar, V. Rubio. 1996. Identification at strain level of *Rhizoctonia solani* AG4 isolates direct-sequence of asymmetric PCR products of the ITS regions. *Curr. Genet.* **29**(2):174-181.
- Brasier, C. M. 1983. Problems and prospects in *Phytophthora* research tiré de *Phytophthora: its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology*, chap 1. D. C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia, P. H. Tsao, eds. APS Press. USA. pp 351-364.
- Brasier, C. M., E. M. Hansen. 1992. Evolutionary biology; Part II: Phylogeny, Speciation and Population Structure. *Annu. Rev. Phytopath.* **30**:173-200.
- Briard, M., M. Dutertre, F. Rouxel, Y. Brygoo. 1995. Ribosomal RNA sequence diverge within the Pythiaceae. *Micol. Res.* **99**(9):1119-1127.
- Brien, R. M., J. M. Dingley. 1959. Fourth supplement to «A revised list of plant diseases recorded in New Zealand», 1957-1958. *N. Z. JIF Agric. Res.* **2**(2):406-413, cité par Montgomerie et Kennedy 1980.

- Bruns, T.D., T. J. White, J. T. Taylor. 1991. Fungal molecular systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **22**:525-564.
- Buchko, J., G. R. Klassen. 1990. Detection of length heterogeneity in the ribosomal DNA of *Pythium ultimum* by PCR amplification of the intergenic region. *Curr. Genet.* **18**:203-205.
- Cameron, J. N., M. J. Carlile. 1977. Negative geotaxis of zoospores of the fungus *Phytophthora*. *J. of General Microbiology* **98**:599-602.
- Carlile, M. J. 1983. Motility, taxis and tropism in *Phytophthora* tiré de *Phytophthora: its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology*. D. C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia, P. H. Tsao, eds. APS Press. USA. pp. 95-107.
- Carter, D. A., S. A. Archer, K. W. Buck, D. S. Shaw, R. C. Shattock. 1990. Restriction fragment length polymorphisms of mitochondrial DNA of *Phytophthora* infestants. *Mycol. Res.* **94**:1123-1128.
- Chastagner, G. A., B. Hamm, K. L. Riley. 1995. Symptoms and *Phytophthora* spp. associated with root rot and stem canker of Noble Fir Christmas trees in the Pacific Northwest. *Plant Disease* **79**(3):290-293.
- Chen, W. 1992. Restriction fragment length polymorphisms in enzymatically amplified ribosomal DNAs of three heterothallic *Pythium* species. *Phytopathology* **82**(12):1467-1472.
- Chen, W. 1994. Development of specific primers for identification and detection of *Pythium arrhenomanes*. *Phytopathology* **84**(10):1087.
- Chen, W., J. W. Hoy. 1993. Molecular and morphological comparison of *Pythium arrhenomanes* and *P. graminicola*. *Mycol. Res.* **97**(11):1371-1378.
- Chen, W., J. W. Hoy, R. W. Schneider. 1992. Species-specific polymorphisms in transcribed ribosomal DNA of five *Pythium* species. *Exp. Mycol.* **16**:22-34.
- Cluster, P. D., D. Marinkovic, R. W. Allard, F. J. Ayala. 1987. Correlations between development rates, enzyme activities, ribosomal DNA spacer-length phenotypes, and adaptation in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:610-614.
- Converse, R. H. 1967. Physiologic race of *Phytophthora fragariae* on strawberry in California, Oregon, and Washington. *Phytopathology* **57**:173-177.
- Converse, R. H. 1970. Occurrence of *Phytophthora fragariae* race A-10 in California. *Plant Dis. Rep.* **54**:969-971.
- Converse, R. H., C. D. Schwartze. 1968. A root rot of red raspberry caused by *Phytophthora erythrospectica*. *Phytopathology* **58**(1):56-59.
- Converse, R. H., D. H. Scott. 1962. Physiologic specialization in *Phytophthora*

fragariae. *Phytopathology* **52**:802-807.

- Converse, R. H., D. H. Scott, G. F. Waldo. 1958. Two additional races of *Phytophthora fragariae* Hickman in Maryland. *Plant Dis. Rep.* **42**:837-840.
- Cooke D. E. L., D. M. Kennedy, D. C. Guy, J. Russell, S. E. Unkles, J. M. Duncan. 1996. Relatedness of group I species of *Phytophthora* as assessed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPDs) and sequences of ribosomal DNA. *Mycol Res.* **100**(3):297-303.
- Crawford, A. R., B. J. Bassam, A. Drenth, D. J. Maclean, J. A. G. Irwin. 1996. Evolutionary relationships among *Phytophthora* species deduced from rDNA sequence analysis. *Mycol. Res.* **100**(4):437-443.
- Crowhurst, R. N., B. T. Hawthorne, E. H. A. Rikkerink, M. D. Templeton. 1991. Differentiation of *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* races 1 and 2 by random amplification of polymorphic DNA. *Curr. Genet.* **20**:391-396.
- Darnell, J., H. Lodish, D. Baltimore, eds. 1986. Eukariotic chromosomes and genes, chap 11. *Tiré de Molecular Cell Biology*. Scientific American Books. New York. USA. pp 420-425.
- Davis, L., M. Didner, J. F. Batley. 1986. *Basic Methods in Molecular Biology*. Elsevier Science Publisher. 388 p.
- Deacon, J. W, S. P. Donaldson. 1993. Molecular recognition in the homing responses of zoosporic fungi, with special reference to *Pythium* and *Phytophthora*. *Mycol. Res.* **97**(10):1153-1171.
- DeScenzo, R. A., T. C. Harrington. 1994. Use of (CAT)₅ as a DNA fingerprinting probe for fungi. *Phytopathology* **84**(5):534-540.
- Di Bonito, R., M. L. Elliot, E. A. Desjardin. 1995. Detection of an arbuscular mycorrhizal fungus in roots of different plant species with the PCR. *App. Environ. Microbiol.* **61**(7):2809-2810.
- Dick, M. W. 1969. Morphology and taxonomy of the Oomycetes, with special reference to Saprolegniaceae, Leptomitaceae and Pythiaceae. I. Sexual reproduction. *New Phytol.* **68**:751-775.
- Dick, M. W. 1989. *Phytophthora undulata* comb. nov. *Mycotaxon* **25**:449-453.
- Dick, M. W., P. T. W. Wong, G. Clark. 1984. The identity of the oomycete causing "kikuju yellows" with a reclassification of the downy mildews. *Botanical J. of Linnean Society* **89**:171-197.
- Dieffenbach, C.W., G. S. Dveksler. 1995. *PCR Primer: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. USA. 714p.
- Duncan, J. M. 1980. A technique for detecting red stele (*Phytophthora fragariae*)

- infection of strawberry stocks before planting. *Plant Disease* **64**(11) 1023-1025.
- Duncan, J. M., D. M. Kennedy. 1988. *Phytophthora* root rot of raspberry. In Annual Report of The Scottish Crop Research Institute. 1987. pp 94-95.
- Duncan, J. M., D. M. Kennedy, P. H. Scott. 1991. Relationships between non-papillate, soilborne species of *Phytophthora*: root rot of raspberry tiré de *Phytophthora*. J. A. Lucas, R.C. Shattock, D.S. Shaw, L.R. Cooke, eds. British Mycological Society Symposium, vol 9. Cambridge University Press. Cambridge. pp 129-147.
- Duncan, J. M., D. M. Kennedy, E. Seemüller. 1987. Identities and pathogenecities of *Phytophthora* spp. causing root rot of red raspberry. *Plant Pathology* **36**:276-289.
- Edel, V., C. Steinberg, I. Avelange, G. LAguerre, C. Alabouvette. 1995. Comparison of three molecular methods for the characterization of *Fusarium oxysporum* strains. *Phytopathology* **85**(5):579-585.
- Ellis, M. A., R. H. Converse, R. N. Williams, B. Williamson, eds. 1991. Compendium of Raspberry and Blackberry Diseases and Insects. The American Phytopathological Society Press. Minnesota. USA. pp 34-36.
- Ellis, M. A., S. A. Miller. 1993. Using a *Phytophthora* specific immunoassay kit to diagnose raspberry root rot. *HortScience* **28**(6):642-644.
- Érsek, T., J. E. Schoelz, J. T. English. 1994. PCR amplification of species-specific DNA sequences can distinguish among *Phytophthora* species. *App. Environ. Microbiol.* **60**(7):2616-2621.
- Erwin, D. C., S. Bartnicki-Garcia, P. H. Tsao, eds. 1983. Tiré de *Phytophthora*: its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology. APS Press. USA. 392 p.
- Fell, J. W. 1995. rDNA targeted oligonucleotide primers for the identification of pathogenic yeasts in polymerase chain reaction. *J. of Industrial Microbiology* **14**:475-477.
- Ferreira, M. A. S., P. T. Tooley, E. Hatziloukas, C. Castro, N. W. Schaad. 1996. Isolation of a species-specific mitochondrial DNA sequence for identification of *Tilletia indica*, the Karnal Bunt of wheat fungus. *App. Environ. Microbiol.* **62**(1):87-93.
- Flavell, R. B., M. O'Dell, P. Sharp, E. Nevo, A. Beiles. 1986. Variations in the intergenic spacer of ribosomal DNA of wild wheat *Triticum dicoccoides*, in Israel. *Mol. Biol. Evol.* **3**(6):547-558.
- Förster H., M. D. Coffey. 1990. Sequence analysis of the small subunit ribosomal RNAs of three zoosporic fungi and implications for fungal evolution. *Mycologia* **82**(3):306-312.

- Förster H., M. D. Coffey. 1992. Molecular characterization of *Phytophthora* isolates with non-papillate sporangia root rot of raspberry using mtDNA restriction fragment length polymorphisms. *Mycol. Res.* **96**(7):571-577.
- Förster H., M. D. Coffey. 1993. Molecular taxonomy of *Phytophthora megasperma* based on mitochondrial and nuclear DNA polymorphisms. *Mycol. Res.* **97**:1101-1112.
- Förster, H., T. G. Kinscherf, S. A. Leong, D. P. Maxwell. 1988. Estimation of relatedness between *Phytophthora* species by analysis of mitochondrial DNA. *Mycologia* **80**:466-478.
- Förster, H., P. Oudemans, M. D. Coffey. 1990. Mitochondrial and nuclear DNA diversity within six species of *Phytophthora*. *Exp. Mycol.* **14**:18-31.
- Gardes, M., T. D. Bruns. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.* **2**:113-118.
- Gardes, M. et Bruns, T. D. 1996. ITS-RFLP matching for identification of fungi tiré de *Methods in molecular biology*, vol 50: Species diagnostics protocols: PCR and others nucleic acid methods. J. P. Clapp, ed. Humana Press Inc. Totowa. NJ. USA. pp 177-186.
- Gardes, M., T. J. White, J. A. Fortin, T. D. Bruns, J. W. Taylor. 1991. Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. *Can. J. Bot.* **69**:180-190.
- Gill, H. S., D. Powell. 1968. Polyacrylamide gel (Disc) electrophoresis of physiologic race A-1 to A-8 of *Phytophthora fragariae*. *Phytopathology* **58**:722-723.
- Glass, N. L., G. C. Donaldson. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from Filamentous Ascomycetes. *App. Environ. Microbiol.* **61**(4):1323-1330.
- Goldman, W. E., G. Goldberg, L. H. Bowman, D. Steinmetz, D. Schlessinger. 1983. Mouse rDNA: sequences and evolutionary analysis of spacer and mature RNA regions. *Mol. Cell. Biol.* **3**:1488-1500.
- Gonzalez, I. L., C. Chambers, J. L. Gorski, K. Stambolian, R. D. Schickel et J. E. Sylvester. 1990. Sequence and structure correlation of human ribosomal transcribed spacers. *J. Mol. Biol.* **212**:27-35.
- Goodwin, P. H., J. M. Duniway, B. C. Kirkpatrick. 1989. Cloned probes for identification of *Phytophthora parasitica*. *Phytopathology* **79**(6):716-721.
- Goodwin, P. H., J. T. English, D. A. Neher, J. M. Duniway, B. C. Kirkpatrick. 1990. Detection of *Phytophthora parasitica* from soil and host tissue with species-

- specific DNA probe. *Phytopathology* **80**(3):277-281.
- Goodwin, P. H., T. Hsiang, B. G. Xue, H. W. Liu. 1995. Differentiation of *Gaeumannomyces graminis* from other turf-grass fungi by amplification with primers from ribosomal internal transcribed spacers. *Plant Pathology* **44**:384-391.
- Grosjean, M. C.. 1992. Classification et identification du genre *Pythium* par l'analyse de l'espaceur interne transcrit de l'opéron ribosomique par amplification en chaine. Thèse de l'université de Lyon. France.
- Gunderson, J. H., H. Elwood, A. Ingold, K. Kindle, M. L. Sogin. 1987. Phylogenetic relationships between chlorophytes, chrysophytes and oomycètes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**:5823-5827.
- Hamm, P. B., E. M. Hansen. 1991. The isolation and identification of *Phytophthora* species causing damage in bare-root conifer nurseries. *Inf. Rep. of B. C. and Can. For. Serv. Pac. For Cent. Victoria.* pp 169-179.
- Hadrys, H., M. Balick, B. Schierwater. 1992. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology* **1**:55-63.
- Handock, J. M., G. A. Gover. 1988. Molecular coevolution among cryptically simple expansion segments of eukariotic 26/28S rRNAs. *Mol. Biol. Evol.* **5**:377-391.
- Hansen, E. M., C. M. Brasier, D. S. Shaw, P. B. Hamm. 1986. The taxonomic structure of *Phytophthora megasperma*: evidence for emerging biological species group. *Transactions of the British Mycological Society* **87**:557-573.
- Hardham, A. R., D. M. Mills, M. Cope, B. K. Gabor, F. Gubler, G. J. Hyde. 1994. Cell surface antigens of *Phytophthora* spores: biological and taxonomic characterization. *Protoplasma* **181**:213-232.
- Hardham, A. R., E. Suzaki, J. L. Perkin. 1986. Monoclonal antibodies to isolate-, species- and genus specific components on the surface of zoospores and cyst of fungus *Phytophthora cinnamomi*. *Can. J. Bot.* **64**:311-321.
- Heiberg, N., J. M. Duncan, D. M. Kennedy, L. Semb. 1989. Raspberry root rots in Norway. *Acta Horticulturae* **262**:189-191.
- Henrion, B., G. Chevalier, F. Martin. 1994. Typing truffle species by PCR amplification of the ribosomal DNA spacers. *Mycol. Res.* **98**(1):37-43.
- Henrion, B., F. La Tacon, F. Martin. 1992. Rapid identification of genetic variation of ectomycorrhizal fungi by amplification of ribosomal RNA genes. *New Phytol.* **122**:289-298.
- Henson, J. M., R. French. 1993. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Ann. Rev. Phytopathol.* **31**:81-109.

- Henson, J. M., T. Goins, W. Grey, E. Mathre, M. L. Elliot. 1993. Use of polymerase chain reaction to detect *Gaeumannomyces graminis* DNA in plants grown in artificially and naturally infested soil. *Phytopathology* **83**(3):283-287.
- Ho, H. H. 1982. Affinity groups among plant pathogenic species of *Phytophthora* in culture. *Mycopathologia* **79**:141-146.
- Hudspeth, M. E. S., D. S. Shumard, C. J. R. Bradford, L. J. Grossman. 1983. Organization of *Achlya* mt DNA: A population with two orientations and a large inverted repeat containing both rRNA genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**:142-146.
- Ilieva, E., F. X. Arulappan, R. Pieters. 1995. *Phytophthora* root and crown rot of raspberry in Bulgaria. *European J. of Plant Pathology* **101**(6):623-626.
- Innis, L. 1995. L'isolement et l'identification des champignons pathogènes responsables de la pourriture racinaire de plants forestiers. Protection, environnement et écosystèmes. 87^e Réunion Annuelle. Société de protection des plantes du Québec. Sherbrooke. Québec. Résumé de communication C-1:37.
- Irwin, J. A. G., D. M. Cahill, A. Drenth. 1995. *Phytophthora* in Australia. *Australian J. of Agricultural Research* **46**(7):1311-1337.
- Jeffers, S. N., H. S. Aldwinckle. 1987. Enhancing detection of *Phytophthora cactorum* in naturally infested soil. *Phytopathology* **77**(10):1475-1482.
- Jeffers, S. N., S. B. Martin. 1986. Comparaison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. *Plant Disease* **70**(11): 1038-1043.
- Johnston, C. G., S. Aust. 1994. Detection of *Phanerochaete chrysosporium* in soil by PCR and restriction enzyme analysis. *App. Environ. Microbiol.* **60**(7):2350-2354.
- Jones, M. J., L. D. Dunkle. 1993. Analysis of *Cochliobolus carbonum* races by PCR amplification with arbitrary and gene-specific primers. *Phytopathology* **83**(4):366-370.
- Jorgensen, R. A., P. D. Cluster. 1988. Modes and tempos in the evolution of nuclear ribosomal DNA: new characters for evolutionary studies and new markers for genetics and population studies. *Ann. Missouri Gard.* **75**:1238-1247.
- Judelson, H. S., L. J. Spielman, R. C. Shattock. 1995. Genetic mapping and non-mendelian segregation of mating type loci in the oomycete, *Phytophthora infestans*. *Genetics* **141**:503-512.
- Kennedy, D. M., J. Duncan. 1993a. Occurrence of races in *Phytophthora fragariae* var. *rubi* on raspberry. *Acta Horticulturae* **352**:555-563.
- Kennedy, D. M., J. M. Duncan. 1993b. European races of *Phytophthora fragariae*

- and resistance of them. *Acta Horticulturae* **348**:469-476.
- Kennedy, D. M., J. Duncan. 1995. A papillate *Phytophthora* species with specificity to *Rubus*. *Mycol. Res.* **99**(1):57-68.
- Kim, D. H., R. D. Martin, C. W. Magill. 1993. Mitochondrial DNA (mtDNA)-relatedness among formae speciales of *Fusarium oxysporum* the Cucurbitaceae. *Phytopathology* **83**:91-97.
- Kim, W. K., T. Zerucha, G. R. Klassen. 1992. A region of heterogeneity adjacent to the 5s ribosomal RNA gene of cereal rust. *Curr. Genet.* **22**:101-105.
- Klassen, G. R., J. Buchko. 1990. Subrepeat structure of the intergenic region in the ribosomal DNA of the oomycetous fungus *Pythium ultimum*. *Curr. Genet.* **17**:125-127.
- Lanfranco, L., P. Wyss, C. Marzach, P. Bonfante. 1995. Generation of RAPD-PCR primers for the *Glomus mosseae*, an arbuscular mycorrhizal fungus. *Molecular Ecology* **4**:61-68.
- Latorre, B. A., G. F. Pérez. 1995. Comparative protein electrophoretic and isoenzymic patterns of *Phytophthora cryptogea* isolates from Chilean kiwifruit and North American deciduous fruits. *Plant Disease* **79**(7):703-708.
- Latorre, B. A., R. Muñoz. 1993. Root rot of red raspberry caused by *Phytophthora citricola* and *Phytophthora citrophthora* in Chile. *Plant Disease* **77**(7):715-718.
- Law, T. F., R. D. Milholland. 1992. Susceptibility of strawberry genotypes to infection and colonization by races of *Phytophthora fragariae* and the growth responses of inoculated genotypes. *Plant Disease* **76**:335-339.
- Lee, S. B., J. W. Taylor. 1990. Isolation of DNA from Fungal mycellia and single spores tiré de PCR protocols: A Guide to Methods and Applications. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, T. J. White, eds. Academic Press Inc. pp 284-286.
- Lee, S. B., J. W. Taylor. 1992. Phylogeny of five Fungus-like Protoctistan *Phytophthora* species, Inferred from the Internal Transcribed Spacers of Ribosomal DNA. *Mol. Biol. Evol.* **9**(4):636-653.
- Lee, S. B., T. J. White, J. W. Taylor. 1993. Detection of *Phytophthora* species by oligonucleotide hybridization to Amplified Ribosomal DNA Spacers. *Phytopathology* **83**(2):177-181.
- Lévesque, C. A., T. C. Vrain, S. H. De Boer. 1994. Development of a species-specific probe for *Pythium ultimum* using amplified ribosomal DNA. *Phytopathology* **84**(5):474-478.
- Levinson, G., G. A. Gutman. 1987. Slipped-strand mispairing: a major mechanism

- for DNA evolution. *Mol. Biol. Evol.* **4**:203-221.
- Lewin, B. 1994. Ribosomes provide a translation factory, chap 9. Tiré de *Gene V*. Oxford University Press Inc and Cell Press. New York. USA. pp 233-252.
- Li, K. N., D. I. Rouse, T. L. German. 1994. PCR primers that allow intrageneric differentiation of ascomycetes and their application to *Verticillium* spp. *App. Environ. Microbiol.* **60**:1068-1077.
- Li, K. N., D. I. Rouse, T. L. German. 1993. A unique RAPD fragment for *Verticillium dahliae* and its application to the specific detection of the pathogen. *Phytopathology* **83**(12):1370.
- Li, W.-H., D. Graur. 1991. *Fundamentals of Molecular Evolution*. Sinauer Associates Inc. Publisher. Sunderland. Massachusetts. 284 p.
- Liu, Z. L., J. B. Sinclair. 1993. Differentiation of intraspecific groups within anastomosis group 1 of *Rhizoctonia solani* using ribosomal DNA using ribosomal DNA transcribed spacer and isoenzyme comparisons. *Canadian J. of Plant Pathology* **15**:272-280.
- Lovic, B. R., R. D. Martyn, M. E. Miller. 1994. Detection of *Monosporascus cannoballus* in root tissue and soil by PCR-mediated amplification of the ITS region of rDNA. *Phytopathology* **84**(7):776.
- Lovic, B. R., R. D. Martyn, M. E. Miller. 1995. Sequence analysis of the ITS regions of rDNA in *Monosporascus* spp. to evaluate its potential for PCR-mediated detection. *Phytopathology* **85**(6):655-661.
- Maas, J. L. 1972. Growth and reproduction in culture of ten *Phytophthora fragariae* races. *Mycopathologia et Mycologia applicata* **48**(4):323-334.
- Maas, J. L., J. H. Harker, G. J. Galleta. 1988. Occurrence of an exotic race of *Phytophthora fragariae* in Maine. *Adv. Strawberry Prod. (North American Strawberry Growers Association)* **7**:42-44.
- Malajczuc, N. 1983. Microbial antagonism to *Phytophthora* tiré de *Phytophthora: its biology, taxonomy, ecology and pathology*. D. C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia, P. H. Tsao, eds. APS Press. St-Paul. USA. pp 197-218.
- Maniatis, T., E. F. Fritsch, J. Sambrook. 1982. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. USA. 545 p.
- Margulis, L., J. O. Corliss, M. Melkonian, D. J. Chapman. 1990. *Handbook of Protozoa*. Jones and Bartlett Publishers. Boston. USA. 914 p.
- Martin, C. S., L. Butler, I. Bronstein. 1995. Quantitation of PCR products with chemiluminescence. *Biotechniques* **18**(5):908-910.
- Martin, F. N., 1991. Variation in the ribosomal DNA repeat unit within single oospore

isolates of the genus *Pythium*. Genome **33**:585-591.

- Martin, F. N., H. S. Kistler. 1990. Species-specific banding patterns of restriction endonuclease-digested mitochondrial DNA from genus *Pythium* spp. *Exp. Mycol.* **14**:32-46.
- McNabb, S. A., G. R. Klassen. 1988. Uniformity of mitochondrial DNA complexity in Oomycetes and the evolution of the inverted repeat. *Exp. Mycol.* **12**:233-242.
- McKeen, W. E. 1958a. Red stele root disease of longanberry and strawberry caused by *Phytophthora fragariae*. *Phytopathology* **48**:129-132.
- McKeen, W. E. 1958b. Races of and resistance to *Phytophthora fragariae*. *Plant Dis. Rep.* **42**:768-771.
- Meyer, W., A. Koch, C. Niemann, B. Beyermann, J. T. Epplen, T. Börner. 1991. Differentiation of species and strains among filamentous fungi by DNA fingerprinting. *Curr. Genet.* **19**:239-242.
- Michot, B., J.-P. Bachellerie, F. Raynal. 1983. Structure of mouse rRNA precursors: complete sequence and potential folding of the spacer regions between 18S and 28S rRNA. *Nucl. Acid. Res.* **11**:3375-3391.
- Milgroom, M. G., S. E. Lipari. 1993. Maternal inheritance and diversity of mitochondrial DNA in the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Phytopathology* **83**:563-567.
- Milholland, R. D., M. E. Daykin. 1993. Colonization of roots of strawberry cultivars with different levels of susceptibility to *Phytophthora fragariae*. *Phytopathology* **83**:538-542.
- Milholland, R. D., W. O. Cline, M. E. Daykin. 1989. Criteria for identifying races of *Phytophthora fragariae* on Selected strawberry genotypes. *Phytopathology* **79**(5):535-538.
- Mills, P. R., S. Sreenivasaprasad, A. E. Brown. 1992. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. *MS Microbiology Letters* **98**:137-144.
- Mills, S. D., H. Forster, M. D. Coffey. 1991. Taxonomic structure of *Phytophthora cryptogea* and *P. dreschleri* based on isoenzyme and mitochondrial DNA analyses. *Mycol. Res.* **95**(1):31-48.
- Montgomerie, I. G. 1966. Pathogenicity of British isolates of *Phytophthora fragariae* and their relationship with American and Canadian races. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **50**:57-67.
- Montgomerie, I. G. 1980. The pathogenicity of *Phytophthora* species to red raspberry. *Acta Horticulturae* **112**:167-176.

- Morita, H. 1975. Studies on red stele root disease of strawberry. Shizuoka Agric. Exp. Stn Spec. Bull. No. 10. 63 p.
- Moukhamedov, R., X. Hu, R. N. Nazar, J. Robb. 1994. Use of polymerase chain reaction-amplified ribosomal intergenic sequences for diagnosis of *Verticillium tricorpus*. *Phytopathology* **84**(3):256-259.
- Mugnier, J., M. C. Grosjean. 1995. PCR catalogue: In plant pathology, *Pythium*. Lyon. France. 82 p.
- Nazar, R. N., X. Hu, J. Schmidt, D. Culham, J. Robb. 1991. Potential use of PCR-amplified ribosomal intergenic sequences in the detection and differentiation of *Verticillium* wilt pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **39**:1-11.
- Newhook, F. J., G. M. Waterhouse, D. J. Stamps. 1978. Tabular key to the species of *Phytophthora* de Bary. *Mycological Papers (C. M. I.)* No. 143. Commonwealth. Mycological Institute. Kew. UK.
- Nickerson, N. L. 1990. Susceptibility of strawberry cultivars to red stele root rot. *Strawberry News Letter* **5**:11-13
- Niepold, F., Schoberbutin, B. 1995. Application of the PCR technique to detect *Phytophthora infestans* in potato tubers and leaves. *Microbiological Research* **150**(4):379-385.
- Nourrisseau, J. G., A. Baudry. 1987. Un *Phytophthora* cause de dépérissement du framboisier en France. *Phytoma-Défense des cultures* **384**:39-41.
- Nourrisseau, J. G., G. Malato, A. Baudry. 1983. Une nouvelle maladie du Fraisier en France: le coeur rouge des racines. *Phytoma - Défense des cultures* **350**:31-35.
- O'Donnell, K. 1992. Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaris*). *Curr. Genet.* **22**:213-220.
- Oudemans, P., M. D. Coffey. 1991a. Isoenzyme comparisons within and among world-wide sources of three morphologically distinct species of *Phytophthora*. *Mycol. Res.* **95**(1):19-30.
- Oudemans, P., M. D. Coffey. 1991b. A revised systematics of twelve papillate *Phytophthora* species based on isoenzyme analysis. *Mycol. Res.* **95**:1025-1046.
- Panabières, F. A. Marais, F. Trentin, P. Bonet, P. Rici. 1989. Repetitive DNA polymorphism analysis as a tool for identifying *Phytophthora* species. *Phytopathology* **79**(10):1105-1109.
- Paulus, A. O. 1990. Fungal Diseases of Strawberry. *HortScience* **25**(8):885-

889.

- Pepin, H. S., H. A. Danberry. 1966. Reaction of strawberry cultivars and clones of *Fragariae chiloensis* to six races of *Phytophthora fragariae*. *Phytopathology* **56**:361-362.
- Profic-Alwasiak, H., J. Danek. 1993. Root rot of red raspberry caused by *Phytophthora* spp. in some regions in Poland. *Acta Horticulturae* **352**:587-589.
- Pryor, B. M., M. Davis, R. L. Gilbertson. 1994. Detection of *Alternaria radicina* and *A. dauci* using a PCR-based assay. *Phytopathology* **84**(10):1087.
- Rao, V. B. 1994. Review: Direct sequencing of polymerase chain reaction amplified DNA. *Analytical Biochemistry* **216**:1-14.
- Rafin, C., Y. Brygoo, Y. Tirilly. 1994. Restriction analysis of amplified ribosomal DNA of *Pythium* spp. isolated from soilless culture systems. *Mycol. Res.* **99**(3):277-281.
- Reeder, R. H. 1984. Enhancers and ribosomal gene spacers. *Cell* **38**:349-351.
- Riberio, O. K. 1978. A source book of the genus *Phytophthora*. J. Cramer, ed. Valduz, Leinstenstein.
- Rogers, O. S., A. J. Bendich. 1987. Ribosomal RNA genes in plants: variability in copy number and in the intergenic spacer. *Plant Mol. Bio.* **9**:509-520.
- Rogers, O. S., S. Honda, A. J. Bendich. 1986. Variation in the ribosomal RNA genes among individuals of *Vicia faba*. *Plant Mol. Bio.* **6**:339-346.
- Rollo, F., R. Salvi, P. Torchia. 1990. Highly sensitive and fast detection of *Phoma tracheiphila* by polymerase chain reaction. *Applied microbiology and Biotechnology* **32**:572-576.
- Rosenbaum, J. 1917. Studies of the genus *Phytophthora*. *J. Agr. Res.* **8**:233-276, cité par Brasier et Hansen 1992.
- Rychlik, W., R. E. Rhoads. 1989. A computer for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing DNA in vitro amplification of DNA. *Nuc. Acid. Res.* **17**(21):543-551.
- Saiki, R. K. 1990. Amplification of genomic DNA tiré de PCR protocols: A Guide to Methods and Applications. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, T. J. White, eds. Academic Press Inc. pp 13-20.
- Saiki, R. K., S. Sharf. F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, N. Arheim. 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**:1350-1354.

- Sambrook J., E. F. Fritsch, T. Maniatis. 1989a. DNA sequencing. Tiré de *Molecular cloning: a laboratory manual* 2nd ed, chap 13. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. pp 13.45-13.58.
- Sambrook J., E. F. Fritsch, T. Maniatis. 1989b. Appendix B: preparation of reagents and buffer used in molecular cloning. Tiré de *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. pp B.4-B.5.
- Scheewe, P. 1994. Identification of pathogenic races of *Phytophthora fragariae* Hickman in Germany. *Euphytica* **77**:25-29.
- Scott, D. H., J. L. Maas, A. D., Draper. 1975. Screening of strawberries for resistance of *Phytophthora fragariae* with single versus a composite of races of the fungus. *Plant Dis. Rep.* **59**:207-209.
- Seemüller, E. J. M. Duncan, D. M. Kennedy, M. Riedel. 1986. *Phytophthora* sp. als Ursache einer Wurzelfaule an Himbeere. *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd.* **38**(2):17-21, cité par Bolay et Lauber 1989.
- Shea, S. R., P. Broadbent. 1983. Developments in cultural and biological control of *Phytophthora* diseases tiré de *Phytophthora: its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology*, chap 26. D. C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia, P. H. Tsao, eds. APS Press. USA. pp 335-350.
- Shumard-Hudspeth, D. S., M. E. S. Hudspeth. 1990. Genic rearrangements in *Phytophthora* mitochondrial DNA. *Curr. Genet.* **17**:413-415.
- Simon, L., M. Lalonde, T. D. Bruns. 1992. Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *App. Environ. Microbiol.* **58**(1):211-215.
- Stammler, G., E. Seemüller. 1993. Specific and sensitive detection of *Phytophthora fragariae* var. *rubi* in raspberry roots by PCR amplification. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz (J. of Plant Diseases and Protection)* **100**(4):394-400.
- Stammler, G., E. Seemüller, J. M. Duncan. 1993. Analysis of RFLPs in nuclear and mitochondrial DNA and the taxonomy of *Phytophthora fragariae*. *Mycol. Res.* **97**(2):150-156.
- Stamps, D. J., G. M. Waterhouse, F. J. Newhook, G. S. Hall. 1990. Revised tabular key to the species of *Phytophthora*. *Mycological Papers (C.M.I.)* No. 162.
- Suggs, S. V. T. Hirose, E. H. Miyake, M. J. Kawashima, K. I. Johnson, R. B. Wallace. 1981. Tiré de ICN-UCLA symp. Dev. Biol. Using Purified Genes. D.D Brown, ed. Academic Press. New York. USA. **23**:683-693.
- Tautz, D., J. M. Hancock, D. A. Webb, C. Tautz, G. A. Dover. 1988. Complete sequences of the rRNA genes of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Evol.*

5:366-376.

- Taylor, J. L. 1993. A simple, sensitive, and rapid method for detecting seed contaminated with highly virulent *Leptosphaeria maculans*. *App. Environ. Microbiol.* **59**(11):3681-3685.
- Thibodeau, P. O. 1991a. Le pourridié du framboisier s'est installé au Québec. Colloque sur la Framboise: point sur la culture. Conseil des Productions Végétales du Québec. Drummondville. Québec.
- Thibodeau, P. O. 1991b. Framboisier: Pourridié des racines (*Phytophthora*) tiré de l'Avertissement Phytosanitaire. Communiqué No. 4. Réseau d'avertissements phytosanitaires. Division des Petits Fruits. Gouvernement du Québec. Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation.
- Thibodeau, P. O., F. Charrier. 1994. Recherche de techniques d'isolation et de détection de *Phytophthora fragariae* var. *fragariae* chez le fraisier. Le point sur la recherche petits fruits. Gouvernement du Québec. Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation. Direction de la recherche et du développement. Ste-Foy. Québec.
- Thomas, H. E. 1935. Root rot studies tiré de Report of the University of California College of Agriculture. Agricultural Experiment Station. Project No. 981, cité par Duncan *et al.* 1991.
- Tisserat, N. A., S. H., Hubert, K. M. Sauer. 1994. Selective amplification of rDNA internal transcribed spacer regions to detect *Ophiosphaerella korrae* and *O. herpotricha*. *Phytopathology* **84**(5):478-482.
- Tooley, P. W., M. M. Carras. 1992. Separation of chromosomes of *Phytophthora* species using CHEF gel electrophoresis. *Exp. Mycol.* **16**:188-196.
- Torres, R.A., M. Ganal, V. Hemleben. 1990. GC balance in the internal transcribed spacers ITS 1 and ITS 2 of nuclear ribosomal RNA genes. *J. Mol. Evol.* **30**:170-181.
- Tucker, C. M. 1931. Taxonomy of the genus *Phytophthora* de Bary. *Mo. Agric. Exp. Sta. Bull.* No. 153. 208 p, cité par Brasier et Hansen 1992.
- Tyler, B. M., H. Forster, M. D. Coffey. 1995. Inheritance of avirulence factors and restriction fragment length polymorphism markers in outcrosses of the oomycete *Phytophthora sojae*. *Molecular Plant-microbe interactions* **8**(4):515-523.
- Unkles, S. E., J. M. Duncan, J. R. Kinghorn. 1992. Zinc fingerprinting for *Phytophthora* species: ZIF markers. *Curr. Genet.* **22**:317-318.
- Utkhede, R. D., E. M. Smith. 1991. *Phytophthora* and *Pythium* species associated with root rot of young apple trees and their control. *Soil Biol. Biochem.* **23**(11):1059-1063.

- Van de Peer, Y., J. M. Neefs, P. De Rijk, R. De Wachter. 1993. Evolution of eukariotes as deduced from small ribosomal subunit RNA sequences. *Bioch. Syst. Ecol.* **21**:43-55.
- Van der Auwera, R. De Baere, Y. Van de Peer, P. De Rijk. I. Van de Broeck, R. De Wachter. 1995. The phylogeny of the Hypochytriomycota as deduced from ribosomal RNA sequences of *Hypochytrium catenoides*. *Mol. Biol. Evol.* **12**(4):671-678.
- Veldman, G. M., R. C. Brand, J. Klootwijk, R. J. Planta. 1980. Some characteristics of processing sites in ribosomal precursor RNA of yeast. *Nucl. Acid. Res.* **8**:2907-2920.
- Veldman, J. Klootwijk, H. van Heerikhuizen, R. J. Planta. 1981. The nucleotide sequence of the intergenic region between the 5.8S and 26S rRNA genes of the yeast ribosomal RNA operon. Possible implications for the interaction between 5.8S and 26 rRNA and the processing of primary transcript. *Nucl. Acid. Res.* **9**:4847-4862.
- Ward, E., R. M. Gray. 1992. Generation of a ribosomal DNA probe by PCR and use in identification of fungi within *Gaeumannomyces-Phialophora* complex. *Plant Pathology* **41**:730-736.
- Washington, W. S. 1988. *Phytophthora cryptogea* as a cause of root rot of raspberry in Australia; resistance of raspberry cultivars and control by fungicide. *Plant Pathology* **37**:225-230.
- Waterhouse, G. M. 1963. Key to the species of *Phytophthora* de Bary. *Mycological Papers (C. M. I.)* No. 92. Kew. Surrey. England. 22 p.
- Waterhouse, G. M. 1970. The genus *Phytophthora* de Bary. *Mycological Papers (C. M. I.)* No. 122. Kew. Uk.
- Waterhouse, G. M. 1973. Peronosporales. tiré de *The Fungi: An Advanced Treatise*, G. C. Aisnworth, F. K. Sparrow, A. S. Sussman eds., **4B**:165-183. New York . Academic 504 p.
- Waterhouse, G. M., F. J. Newhook, D. J. Stamps. 1983. Present criteria for classification of *Phytophthora* tiré de *Phytophthora: its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology*. D. C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia, P. H. Tsao, eds. APS Press. USA. pp 139-147.
- Waterston, J. M. 1937. A note on the association of a species of *Phytophthora* with a «Die-back» disease of the raspberry. *Trans. Proc. Bot. Soc. Edimb.* **32**(2):251-259, cité par Montgomerie et Kennedy 1980.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee et J. Taylor. 1990. Analysis of phylogenetic relationships by amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes tiré de *PCR Protocols: A guide to Methods and Applications*. M. A. Innis, D. H.

- Gelfand, J. J. Sninsky, T. J. White, eds. Academic Press. New York. USA. pp 315-322.
- Whisson, S. C., A. Drenth, D. J. Maclean, J. A. G. Irwin. 1995. *Phytophthora sojae* avirulence genes, RAPD, and RFLP markers used to construct a detailed genetic-linkage map. *Molecular Plant-Microbe interactions* **6**(8):988-995.
- Whittaker, R. H. 1969. New concepts of kingdoms of organism. *Science* **163**:150-160.
- Wiglesworth, M. D., W. C. Nesmith, C. L. Schard, M. R. Siegel. 1994. Use of specific repetitive sequences in *Peronospora tabacina* for the early detection of tobacco blue mold pathogen. *Phytopathology* **84**(4):425-430.
- Wilcox, W. F. 1987. Minimize root rot losses. *Fruit Grower*, January 1987. pp 18-19.
- Wilcox, W. F. 1989. Identity, virulence and isolation frequency of seven *Phytophthora* spp. causing root rot of raspberry in New York. *Phytopathology* **79**:93-101.
- Wilcox, W. F., P. H. Scott, P. B. Hamm, D. M. Kenedy, J. M. Duncan, C. M. Brasier, B. M. Hansen. 1993. Identity of a *Phytophthora* species attacking raspberry in Europe and North America. *Mycol. Res.* **97**:817-831.
- Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, S. V. Tingey. 1991. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acid. Res.* **18**(22):6531-6535.
- Xue, B., P. H. Goodwin, S. L. Annis. 1992. Pathotype identification of *Leptosphaeria maculans* with PCR and oligonucleotide primers from ribosomal internal transcribed spacer sequences. *Physiology and Molecular Plant Pathology* **41**:179-188.
- Yao. C., R. A. Frederiksen, C. W. Magill. 1992. Length heterogeneity in ITS2 and the methylation status of CCGG and GCGC sites in the rRNA genes of the genus *Peronosclerospora*. *Curr. Genet.* **22**:415-420.
- Zentmyer, G. A. 1983. The world of *Phytophthora* tiré de *Phytophthora: its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology*, chap 1. D. C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia, P. H. Tsao, eds. APS Press. USA. pp 1-8.

ANNEXE A

Culture fongique et extraction d'ADN

A- Milieux de culture à base d'agar

MILIEU ACV8

1- Clarification du V8:

Le jus de légume V8 est centrifugé à 2,603 x g durant 15 minutes, et le surnageant est recueilli.

2- Composition du milieu (1 litre)

0,5g de CaCO₃
0,03g de B-sitostérol
0,02g de Tryptophane
0,1g de CaCL₂
0,001g de Thiamine-HCL
17g d'agar Bacto (Difco, Détroit, MI, É.-U.)
100 mL de V8 clarifié
et compléter à 1L avec de l'H₂O

Milieu MCV8

Ce milieu a la même composition que le milieu ACV8, et comprend les antibiotiques suivants:

0,005g/L Pimaricin
0.250g/L Ampicillin
0,010g/L Rifampicin

Milieu MEA

45g/L de poudre d'agar et d'extrait de malt de Difco
Compléter à 1 L avec de l'H₂O

Milieu PDA

39 g/L de poudre d'agar et de dextrose de pomme de terre de Difco
Compléter à 1 L avec de l'H₂O

B- Milieux de culture à base de Gel-GroMilieu GCV8

Il est composé des mêmes ingrédients que le milieu ACV8, mais l'agar est substitué par 2g/L (0,2%) de Gel-Gro (ICN Biomedicals, Cleveland, OH, É.-U.) et 0,5g/L (0,05%) de MgCl₂.6H₂O. Ce milieu a l'avantage de pouvoir être solubilisé.

Milieu GPD

24 g/L de bouillon de dextrose de pomme de terre de Difco
2 g/L de Gel-Gro
1 g/L de MgCl₂.6H₂O
Compléter à 1 L avec de l'H₂O

Notez: ce milieu peut être solubilisé.

C- Solubilisation des milieux à base de Gel-Gro GCV8 et GPD

1- Préparation du tampon citrate

18mL/L d'acide citrique 0,1M
82 mL/L de citrate de sodium 0,1M
Compléter à 1L avec de l'H₂O
Ajuster le pH à 6,0 et stériliser.

2- Solubilisation

Le contenu d'un pétri est solubilisé à l'aide de 40 à 50 mL de tampon citrate dans un bain sous agitation constante à 30°C pour la récupération de mycelium viable ou à température supérieure si la viabilité n'est pas nécessaire pour une durée de 30 à 60 min.

D- Extraction d'ADN

1- Tampon de lyse

50 mM Tris-HCL (pH 7,2)
50 mM EDTA
3% (p/v) SDS
1% (v/v) 2-mercaptoéthanol

2- Phénol saturé en Tris-EDTA (1:1) (v/v) (Sambrook *et al.*, 1989b)

3- Phénol: chloroforme

Il est composé de phénol saturé:chloroforme: alcool isoamylique (25:24:1) (v/v) (Sambrook *et al.*, 1989b).

ANNEXE B

Solutions nécessaires aux électrophorèses

ENDO-R-STOP 10 X

4 mL TAE 50X
10 mL Glycérol
2 mL SDS 20% (p/v)
1 mL Bleu de Bromophénol 0,2% (p/v)
1,5 g EDTA (Na)₂
compléter à 20 mL avec de l'H₂O

Note: Pour obtenir du ENDO-R-STOP 1 X, effectuer une dilution 1/10

Gel d'acrylamide 6%

9 mL TBE 10 X
31,5 g Urée
9 mL de solution d'acrylamide 50% Long Ranger (J.T. Baker, Toronto, ON)
compléter à 75 mL avec de l'H₂O déionisée

Solution de dépôt:

50% (v/v) glycérol
1% (p/v) SDS
0,1 M EDTA
0,05% (p/v) de Bleu de Bromophénol

Tampon d'électrophorèse TAE 50 X:

242,2 g Tris Base
57 mL d'acide acétique glaciale
100 mL EDTA 0,5M
compléter à 1 L avec de l'H₂O

Note: Pour obtenir du TAE 1 X, effectuer une dilution 1/50.

Tampon TBE 10 X

108 g Tris Base
55 g Acide borique
40 mL EDTA 0,5M (pH 8,0)
compléter à 1 L avec de l'H₂O

Pour obtenir TBE 0,6 X prendre 600 mL TBE 1 X (1/10 TBE 10 X) et compléter à 1 L avec de l'H₂O.

ANNEXE C

Séquence de 233 pb de la région ITS1 de 6 isolats de *P. fragariae**P. fragariae* var. *fragariae*

Isolat Pt47, souche européenne

1	AACCTGCGGA	AGGATCATT	CCACACCTAA	AAAAC TTTCC	ACGTGAACCG
51	TATCAACCCA	CTTAGTTGGG	GGCCTGTCCT	GGCGGCTGGC	TGTCGATGTC
101	AAAGTTGACG	GCTGCTGCTG	TGTGTCGGGC	CCTATCATGG	CGAGCGTTTG
151	GGTCCCTCTC	GGGGGAACTG	AGCCAGTAGC	CCTTTTCTTT	TAAACCCATT
201	CTTGAATACT	GAATATACTG	TGGGGACGAA	AGTCTCTGCT	TTTAACTAGA
251	TAGCAACTTT	CAGCAGTGG	TGTC		

P. fragariae var. *fragariae*

Isolat PfA5, race américaine A5

1	AACCTGCGGA	AGGATCATT	CCACACCTAA	AAAAC TTTCC	ACGTGAACCG
51	TATCAACCCA	CTTAGTTGGG	GGCCTGTCCT	GGCGGCTGGC	TGTCGATGTC
101	AAAGTTGACG	GCTGCTGCTG	TGTGTCGGGC	CCTATCATGG	CGAGCGTTTG
151	GGTCCCTCTC	GGGGGAACTG	AGCCAGTAGC	CCTTTTCTTT	TAAACCCATT
201	CTTGAATACT	GAATATACTG	TGGGGACGAA	AGTCTCTGCT	TTTAACTAGA
251	TAGCAACTTT	CAGAGTGG	TGTC		

P. fragariae var. *fragariae*

Isolat PfA7, race américaine A7

1	AACCTGCGGA	AGGATCATT	CCACACCTAA	AAAAC TTTCCA	CGTGAACCGT
51	ATCAACCCAC	TTAGTTGGGG	GCCTGTCCTG	GCGGCTGGCT	GTCGATGTCA
101	AAGTTGACGG	CTGCTGCTGT	GTGTCGGGCC	CTATCATGGC	GAGCGTTTGG
151	GTCCCTCTCG	GGGGAACTGA	GCCAGTAGCC	CCTTTTCTTT	AAACCCATTC
201	TTGAATACTG	AATATACTGT	GGGGACGAAA	GTCTCTGCTT	TTAACTAGAT
251	AGCAACTTTC	AGCAGTGGAT	GTC		

P. fragariae var. *fragariae*

Isolat PfA8, race américaine A8

1	AACCTGCGGA	AGGATCATT	CCACACCTAA	AAAAC TTTCC	ACGTGAACCG
51	TATCAACCCA	CTTAGTTGGG	GGCCTGTCCT	GGCGGCTGGC	TGTCGATGTC
101	AAAGTTGACG	GCTGCTGCTG	TGTGTCGGGC	CCTATCATGG	CGAGCGTTTG
151	GGTCCCTCTC	GGGGGAACTG	AGCCAGTAGC	CCTTTTCTTT	TAAACCCATT
201	CTTGAATCTG	AATATACTGT	GGGGACGAAA	GTCTCTGCTT	TTAACTAGAT
251	AGCAACTTTC	AGCAGTGGAT	GTC		

P. fragariae var. *rubi*

Isolat 1369, souche du Québec (St-Césaire)

1	AACCTGCGNN	NGGATCATT	CCACACCTAA	AAAAC TTTCCA	CGTGAACCGT
51	ATCAACCCAC	TTAGTTGGGG	GCCTGTCCTG	GCGGCTGGCT	GTCGATGTCA
101	AAGTTGACGG	CTGCTGCTGT	GTGTCGGGCC	CTATCATGGC	GAGCGTTTGG
151	GTCCCTCTCG	GGGGAACTGA	GCCAGTAGCC	CCTTTTCTTT	AAACCCATTC
201	TTGAATACTG	AATATACTGT	GGGGACGAAA	GTCTCTGCTT	TTAACTAGAT
251	AGCAACTTTC	AGCAGTGGAT	GTC		

P. fragariae var. *rubi*
Isolat 745, souche canadienne

1	AAGGATCATT	ACCACACCTA	AAAAACTTTC	CACGTGAACC	GTATCAACCC
51	ACTTAGTTGG	GGGCCTGTCC	TGGCGGCTGG	CTGTTCGATGT	CAAAGTTGAC
101	GGCTGCTGCT	GTGTGTCGGG	CCCTATCATG	GCGAGCGTTT	GGGTCCCTCT
151	CGGGGGAAct	GAGCCAGTAG	CCCTTTTCTT	TTAAACCCAT	TCTTGAATAC
201	TGAATACT	GTGGGGACGA	AAGTCTCTGC	TTTTAACTAG	ATAGCAACTT
251	TCAGCAGTGG	ATGTC			

P. fragariae var. *rubi*
Isolat 390, souche européenne

1	AACCTGCGGA	AGNATCATT	CCACACCTAA	AAACTTTCCA	CGTGAACCGT
51	ATCAACCCAC	TTAGTTGGGG	GCCTGTCCTG	GCGGCTGGCT	GTCGATGTCA
101	AAGTTGACGG	CTGCTGCTGT	GTGTCGGGCC	CTATCATGGC	GAGCGTTTGG
151	GTCCCTCTCG	GGGGAActGA	GCCAGTAGCC	CTTTTCTTTT	AAACCCATTC
201	TTGAATACTG	AATATACTGT	GGGGACGAAA	GTCTCTGCTT	TTAACTAGAT
251	AGCAACTTTC	AGCAGTGGAT	GTC		

P. fragariae var. *rubi*
Isolat M10, souche européenne

1	AACCTGCGGA	AGGATCATT	CCACACCTAA	AAACTTTCCA	CGTGAACCGT
51	ATCAACCCAC	TTAGTTGGGG	GCCTGTCCTG	GCGGCTGGCT	GTCGATGTCA
101	AAGTTGACGG	CTGCTGCTGT	GTGTCGGGCC	CTATCATGGC	GAGCGTTTGG
151	GTCCCTCTCG	GGGGAActGA	GCCAGTAGCC	CTTTTCTTTT	AAACCCATTC
201	TTGAATACTG	AATATACTGT	GGGGACGAAA	GTCTCTGCTT	TTAACTAGAT
251	AGCAACTTTC	AGCAGTGGAT	GTC		

Phytophthora fragariae var. *rubi*
Isolat 93, souche européenne

1	CTCTAAGGAA	NGGATGATTA	CCACACCTAA	AAACTTTCCA	CGTGAACCGT
51	ATCAACCCAC	TTAGTTGGGG	GCCTGTCCTG	GCGGCTGGCT	GTCGATGTCA
101	AAGTTGACGG	CTGCTGCTGT	GTGTCGGGCC	CTATCATGGC	GAGCGTTTGG
151	GTCCCTCTCG	GGGGAActGA	GCCAGTAGCC	CTTTTCTTTT	AAACCCATTC
201	TTGAATACTG	AATATACTGT	GGGGACGAAA	GTCTCTGCTT	TTAACTAGAT
251	AGCAACTTTC	AGCAGTGGAT	GTC		

Phytophthora fragariae var. *rubi*
Isolat ML2, souche québécoise

1	AACCTGCGGA	AGGATNATTA	CCACACCTAA	AAACTTTCCA	CGTGAACCGT
51	ATCAACCCAC	TTAGTTGGGG	GCCTGTCCTG	GCGGCTGGCT	GTCGATGTCA
101	AAGTTGACGG	CTGCTGCTGT	GTGTCGGGCC	CTATCATGGC	GAGCGTTTGG
151	GTCCCTCTCG	GGGGAActGA	GCCAGTAGCC	CTTTTCTTTT	AAACCCATTC
201	TTGAATACTG	AATATACTGT	GGGGACGAAA	GTCTCTGCTT	TTAACTAGAT
251	AGCAACTTTC	ACGAGTGGAT	GTC		

Notez: Position 1 à 20: PSU 18S de l'ADNr (en caractère gras). Position 21 à 252 ou 253: ITS1. Position 252 ou 253 à 275: 5.8S de l'ADNr (en caractère gras). À l'exception de l'isolat 745, position 1 à 11: PSU 18S de l'ADNr (en caractère gras), la position 12 à 244: ITS1 et la position 245 à 265: 5.8S de l'ADNr (en caractère gras).

ANNEXE D

Séquence de 439 pb de la région ITSII de 5 isolats de *P. fragariae**P. fragariae* var. *rubi*

Isolat ML2, souche du Québec (Estrie)

1	CAGTGTCGGT	ACATCAAAC	TGGCTCTCTT	CCTTCCGTGT	AGTCGGTGGA
51	TGGGGACGCC	AGACGTGAGG	TGTCTTGCGG	GTGGCCTTCG	GGCTGCCTGC
101	GAGTCCCTTG	AAATGTAAGT	AACTGTAAGT	CTCTTTGCTC	GAAAAGCGTG
151	ACGTTGTTGG	TTGTGGAGGC	TGCCTGTGTG	GCCAGTCGGC	GACCGGTTTG
201	TCTGCTGCGG	CGTTTAATGG	AGGAGTGTTT	GATTCGCGGT	ATGGTTGGCT
251	TCGGCTGAAC	AATGCGCTTA	TTGGACGTTT	TTCTGCTGT	GGCGGTACGG
301	ATCGGTGAAC	CGTAGCTGTG	CGAGGCTTGG	CCTTTGAACC	GGCGGTGTTG
351	GTCGCGAAGT	AGGGTGGCGG	CTTCGGCTGT	CGAGGGGTTC	ATCCATTTGG
401	GAAC TTGTGT	CTCTGCGGCG	CGCTTCGGTG	TGCTGCGGGT	GGCATCTCAA
451	TTGGACCTGA	TATCAG			

P. fragariae var. *rubi*

Isolat 1369, souche du Québec

1	CAGTGTCGGT	ACATCAAAC	TGGCTCTCTT	CCTTCCGTGT	AGTCGGTGGA
51	TGGGGACGCC	AGACGTGAGG	TGTCTTGCGG	GTGGCCTTCG	GGCTGCCTGC
101	GAGTCCCTTG	AAATGTAAGT	AACTGTAAGT	CTCTTTGCTC	GAAAAGCGTG
151	ACGTTGTTGG	TTGTGGAGGC	TGCCTGTGTG	GCCAGTCGGC	GACCGGTTTG
201	TCTGCTGCGG	CGTTTAATGG	AGGAGTGTTT	GATTCGCGGT	ATGGTTGGCT
251	TCGGCTGAAC	AATGCGCTTA	TGGACGTTT	TTCTGCTGT	GGCGGTACGG
301	ATCGGTGAAC	CGTAGCTGTG	CGAGGCTTGG	CCTTTGAACC	GGCGGTGTTG
351	GTCGCGAAGT	AGGGTGGCGG	CTTCGGCTGT	CGAGGGGTTC	ATCCATTTGG
401	GAAC TTGTGT	CTCTGCGGCG	CGCTTCGGTG	TGCTGCGGGT	GGCATCTCAA
451	TTGGACCTGA	TATCAG			

P. fragariae var. *fragariae*

Isolat PfA7, race américaine A7

1	CAGTGTCGGT	ACATCAAAC	TGGCTCTCTT	CCTTCCGTGT	AGTCGGTGGA
51	TGGGGACGCC	AGACGTGAGG	TGTCTTGCGG	GTGGCCTTCG	GGCTGCCTGC
101	GAGTCCCTTG	AAATGTAAGT	AACTGTAAGT	CTCTTTGCTC	GAAAAGCGTG
151	ACGTTGTTGG	TTGTGGAGGC	TGCCTGTGTG	GCCAGTCGGC	GACCGGTTTG
201	TCTGCTGCGG	CGTTTAATGG	AGGAGTGTTT	GATTCGCGGT	ATGGTTGGCT
251	TCGGCTGAAC	AATGCGCTTA	TTGGACGTTT	TTCTGCTGT	GGCGGTACGG
301	ATCGGTGAAC	CGTAGCTGTG	CGAGGCTTGG	CCTTTGAACC	GGCGGTGTTG
351	GTCGCGAAGT	AGGGTGGCGG	CTTCGGCTGT	CGAGGGGTTC	ATCCATTTGG
401	GAAC TTGTGT	CTCTGCGGCG	CGCTTCGGTG	TGCTGCGGGT	GGCATCNCAA
451	TTGGACCTA	TATCAG			

P. fragariae var. *fragariae*
Isolat Pt47, souche européenne

1	CAGTGTCGGT	ACATCAAAC	TGGCTCTCTT	CCTTCCGTGT	AGTCGGTGGA
51	TGGGGACGCC	AGACGTGAGG	TGTCTTGCGG	GTGGCCTTCG	GGCTGCCTGC
101	GAGTCCCTTG	AAATGTAAGT	AACTGTACTT	CTCTTTGCTC	GAAAAGCGTG
151	ACGTTGTTGG	TTGTGGAGGC	TGCCTGTGTG	GCCAGTCGGC	GACCGGTTTG
201	TCTGCTGCGG	CGTTTAATGG	AGGAGTGTTT	GATTCGCGGT	ATGGTTGGCT
251	TCGGCTGAAC	AATGCGCTTA	TTGGACGTTT	TTCCTGCTGT	GGCGGTACGG
301	ATCGGTGAAC	CGTAGCTGTG	CGAGGCTTGG	CCTTTGAACC	GGCGGTGTTG
351	GTCGCGAAGT	AGGGTGGCGG	CTTCGGCTGT	CGAGGGGTTC	ATCCATTTGG
401	GAACTTGTGT	CTCTGCGGCG	CGCTTCGGTG	TGCTGCGGGT	GGCATCTCAA
451	TTGGACCTG	ATATCAG			

P. fragariae var. *fragariae*
Isolat E, souche européenne

1	CAGTGTCGGT	ACATCAAAC	TGGCTCTCTT	CCTTCCGTGT	AGTCGGTGGA
51	TGGGGACGCC	AGACGTGAGG	TGTCTTGCGG	GTGGCCTTCG	GGCTGCCTGC
101	GAGTCCCTTG	AAATGTAAGT	AACTGTACTT	CTCTTTGCTC	GAAAAGCGTG
151	ACGTTGTTGG	TTGTGGAGGC	TGCCTGTGTG	GCCAGTCGGC	GACCGGTTTG
201	TCTGCTGCGG	CGTTTAATGG	AGGAGTGTTT	GATTCGCGGT	ATGGTTGGCT
251	TCGGCTGAAC	AATGCGCTTA	TTGGACGTTT	TTCCTGCTGT	GGCGGTACGG
301	ATCGGTGAAC	CGTAGCTGTG	CgAGGCTTGG	CCTTTGAACC	GGCGGTGTTG
351	GTCGCGAAGT	AGGGTGGCGG	CTTCGGCTGT	CGAGGGGTTC	ATCCATTTgG
401	GAACTTGTGT	CTCTGCGGCG	CGCTTCGGTG	TGCTGCGGGT	GGCATCTCAA
451	TTGGACCTGA	TATCAG			

Notez: Position 1 à 11: 5.8S de l'ADNr (en caractère gras). Position 12 à 450: ITSII.
Position 451 à 466: GSU 28S de l'ADNr (en caractère gras).

ANNEXE E

Caractérisation pathologique des souches de *Phytophthora* †

A- Méthodologie: le test du pouvoir pathogène

Le pouvoir pathogène de 14 souches de *Phytophthora* (4 du Québec, 3 d'Allemagne et 7 des États-Unis) a été évalué sur 8 cultivars de framboisier (Anelma, Pathfinder, Nova, Algonquin, Madawaska, Gatineau, Titan et Kilarney). Deux des quatorze souches testées ne provenaient pas du framboisier soit la souche May (isolat du Québec provenant du fraisier) et la souche 56892 (isolat américain provenant du pommier).

Les tests de pouvoir pathogène ont été effectués par le laboratoire du Dr. Carole Beaulieu de l'université de Sherbrooke selon le protocole de Nourrisseau et Baudry (1987). Des plants de framboisier provenant de culture *in vitro* et âgés de 6 semaines ont été transplantés dans des pots de 12 cm contenant du terreau qui avait été préalablement stérilisé. Trois plants de chacun des cultivars ont été infectés avec une des quatorze souches de *Phytophthora*. Pour chacun des cultivars, des plants ont servi de témoins. Une semaine après la transplantation, les framboisiers ont été inoculés avec les souches de *Phytophthora*. L'inoculation s'est faite de la façon suivante. Cinq rondelles de 10 mm de diamètre ont été découpées à la périphérie de culture de *Phytophthora* sur agar V8, veille de 15 jours. Ces rondelles ont été placées à proximité des racines du framboisier. Les plants ont par la suite été incubés dans une chambre de croissance gardée à 15°C avec une photopériode de 12 heures. Les plants étaient vaporisés à l'eau aux deux jours et le sol est gardé mouillé continuellement. Après six semaines, la sévérité des symptômes a été estimée selon l'échelle de maladie (0 à 5) proposée par Malajczuk (1983). La valeur 0 a été attribuée à une plante saine et la valeur 5 à une plante présentant sur plus de 80% de sa surface foliaire et racinaire des zones de chlorose et nécrose.

B- Résultats

Le pouvoir pathogène des souches de *Phytophthora* isolées du framboisier a également été analysé sur le cultivar de framboisier Titan (cultivar extrêmement sensible; Ellis, 1991). Elles se sont révélées pathogènes.

Aucun des cultivars analysés n'est résistant contre toutes les souches testées. Toutes les souches du Québec sont capables de causer la maladie sur au moins 6 des 8 cultivars testés. De façon générale, les souches du Québec sont plus agressives que les souches allemandes et américaines. Les souches étrangères sont toutefois plus agressives que les souches québécoises sur les cultivars Pathfinder, Nova et Kilarney. Les cultivars les plus susceptibles à l'attaque par les souches québécoises sont les cultivars Madawaska, Gatineau et Titan. Les deux isolats ne provenant pas du framboisier ont démontré une certaine agressivité sur certains cultivars de framboisier (voir tableau E.1).

† Ce texte et ces données sont tirés du rapport d'étape: Détection et identification génétique des *Phytophthora* qui causent le pourridié phytophthoréen du framboisier et la stèle rouge du fraisier. Rapport d'étape 1995-1996. Entente Canada-Québec pour un environnement durable en agriculture. pp 4-6 et annexe 3.

Tableau E.1: Indice de pourridié causé par différentes souches de *Phytophthora* isolées du framboisier et provenant du Québec, de l'Allemagne et des États-Unis

Souche	Indice de pourridié moyen observé sur le cultivars									
	Anelma	Pathfinder	Nova	Algonquin	Madawaska	Gatineau	Titan	Kilarney	Index moyen	
labF3*	0,0	1,3	1,0	1,7	0,0	2,7	2,7	0,3	1,2	
1232*	4,0	3,0	4,7	5,0	5,0	5,0	5,0	0,0	4,0	
745*	3,0	3,7	3,0	5,0	5,0	5,0	4,7	4,0	4,2	
May**	0,0	2,0	3,0	0,0	0,0	0,0	3,7	0,0	1,1	
56892*** ^a	2,0	0,7	0,0	0,0	2,3	3,7	2,0	3,0	1,7	
416**	0,0	3,0	0,0	0,3	0,0	1,0	0,0	3,0	0,9	
430**	0,0	0,0	4,0	3,3	0,0	0,0	1,7	1,7	1,3	
392**	3,0	4,0	2,7	0,0	0,7	4,0	0,0	2,7	2,1	
420**	1,0	2,0	4,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,9	
399**	3,0	2,7	5,0	1,3	5,0	0,0	3,0	2,7	2,8	
425**	4,0	3,0	4,7	4,0	5,0	4,0	4,0	4,0	4,1	
545***	3,0	4,0	5,0	0,0	5,0	4,0	0,3	2,7	3,0	
390***	0,0	3,7	1,0	0,0	0,0	2,7	0,0	2,3	1,2	
93***	4,0	3,7	3,7	4,0	5,0	2,3	4,7	0,7	3,5	
moyenne	1,7	2,6	2,7	1,8	2,0	2,2	2,3	2,0	2,1	

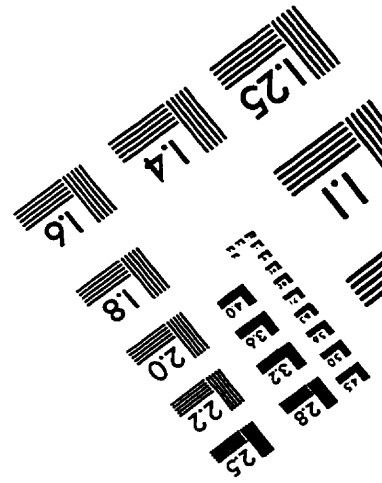
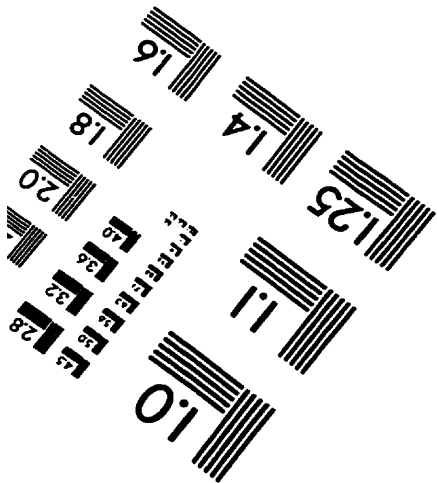
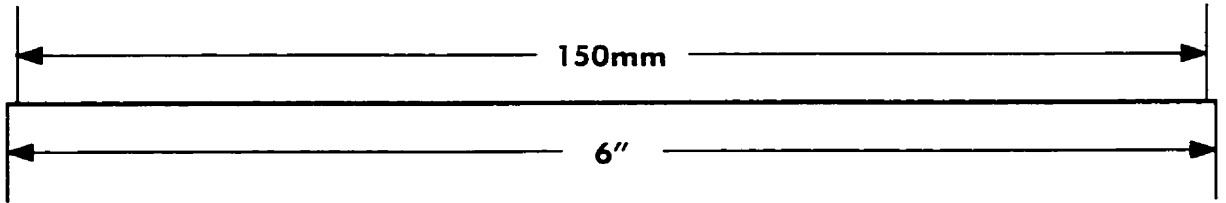
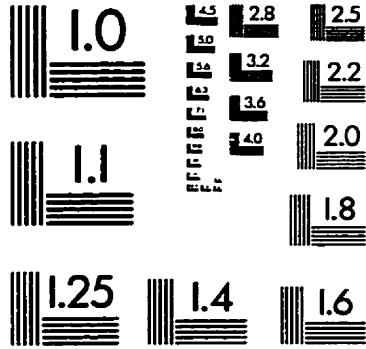
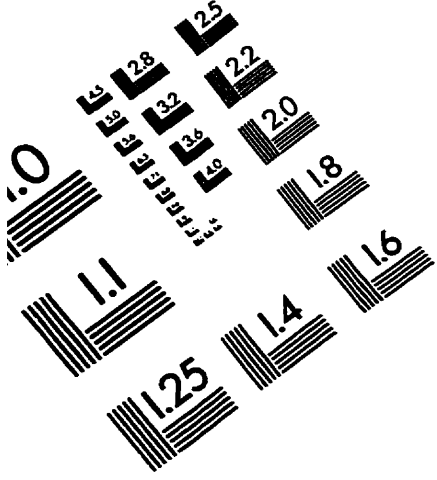
* Souche provenant du Québec

** Souche provenant des États-Unis

*** Souche provenant d'Allemagne

^a: Souche de *Phytophthora* n'ayant pas été isolée du framboisier

TEST TARGET (QA-3)



APPLIED IMAGE . Inc
1653 East Main Street
Rochester, NY 14609 USA
Phone: 716/482-0300
Fax: 716/288-5989

© 1993, Applied Image, Inc., All Rights Reserved