

Incidence des Éléments Transposables sur l'évolution des génomes des champignons phytopathogènes et sur leur potentiel adaptatif

Jonathan Grandaubert, Marie-Hélène Balesdent et Thierry Rouxel

INRA-Bioger, Campus AgroParisTech, 78850 Thiverval-Grignon, France

Auteur correspondant : Thierry Rouxel, rouxel@versailles.inra.fr

Reçu le 4 octobre 2013

Résumé – Les champignons phytopathogènes, menace majeure pour la sécurité alimentaire mondiale, présentent une plasticité de modes de vie remarquable et une extrême capacité à s'adapter aux méthodes de lutttes qui leur sont opposées par l'homme dans les agro-systèmes. La génomique et la génomique comparative sont utilisées ici pour évaluer le lien entre plasticité génomique et potentiel évolutif et adaptatif. Une série évolutive de champignons phytopathogènes inféodés aux crucifères, le complexe d'espèces *Leptosphaeria maculans*-*Leptosphaeria biglobosa*, a été choisi ici comme modèle puisqu'il regroupe cinq entités dont le statut con- ou hétérospécifique est peu clair mais présente des différences de gamme d'hôte ou de pouvoir pathogène. En particulier, l'espèce la mieux adaptée sur le colza (et la plus dommageable pour l'agriculture), *L. maculans* « brassicae », possède, par rapport aux autres membres du complexe d'espèces, un génome caractérisé par l'expansion récente, mais massive, de quelques familles d'éléments transposables (ET). Celle-ci a sans doute eu un effet encore peu clair sur la spéciation, mais a surtout contribué à la diversification de molécules de type « effecteurs », donc à l'acquisition de nouvelles spécificités parasitaires. La localisation des gènes codant pour des effecteurs dans des régions génomiques enrichies en ET a par ailleurs un effet direct sur l'adaptation aux résistances variétales en favorisant une diversité d'événements mutationnels. Ces données sont confrontées à d'autres exemples de la littérature qui tendent à généraliser l'idée que les champignons phytopathogènes ont, au cours de l'évolution, développé des « génomes à deux vitesses » incluant un compartiment plastique enrichi en ET et en gènes impliqués dans le pouvoir pathogène et l'adaptation à l'hôte.

Mots clés : Génome fongique / éléments transposables / spéciation / effecteurs / adaptation

Abstract – Transposable elements reshaping genomes and favouring the evolutionary and adaptive potential of fungal phytopathogens.

Phytopathogenic fungi are a major threat for global food security and show an extreme plasticity in pathogenicity behaviours. They often have a high adaptive potential allowing them to rapidly counteract the control methods used by men in agrosystems. In this paper, we evaluate the link between genome plasticity and adaptive potential using genomics and comparative genomics approaches. Our model is the evolutionary series *Leptosphaeria maculans*-*Leptosphaeria biglobosa*, encompassing five distinct entities, whose conspecificity or heterospecificity status is unclear, and which all are pathogens of cruciferous plants. They however differ by their host range and pathogenicity. Compared to other species of the species complex, the species best adapted to oilseed rape, *L. maculans* “brassicae”, causing important losses in the crop, has a genome that was submitted to a recent and massive burst of transposition by a few families of transposable elements (TEs). Whether the genome invasion contributed to speciation is still unclear to-date but there is a coincidence between this burst of TEs

and divergence between two species. This TE burst contributed to diversification of effector proteins and thus to generation of novel pathogenic specificities. In addition, the location of effector genes within genome regions enriched in TEs has direct consequences on adaptation to plant resistance and favours a multiplicity of mutation events allowing “breakdown” of resistance. These data are substantiated by other examples in the literature showing that fungi tend to have a “two-speed” genome, in which a plastic compartment enriched in TE host genes is involved in pathogenicity and adaptation to host.

Key words: Fungal genome / transposable elements / speciation / effector / adaptation to host

Abréviations

ET : Élément Transposable
 Lbb : *L. biglobosa* “brassicae”
 Lbc : *L. biglobosa* “canadensis”
 Lbt : *L. biglobosa* “thlaspii”
 Lmb : *L. maculans* “brassicae”
 Lml : *L. maculans* “lepidii”
 LTR : Long Terminal Repeat
 PPS : Petites Protéines Sécrétées
 RIP : Repeat-Induced Point mutation

Introduction

Avec un nombre (sous-)estimé à 1,5 million d'espèces, les champignons représentent une partie extrêmement importante de la biodiversité globale ; leur biomasse est considérable au sein des écosystèmes dans lesquels ils jouent des rôles fondamentaux (Silar, 2013). Avec une majorité d'espèces saprophytes, les champignons sont responsables de la dégradation de la matière organique permettant ainsi le recyclage de composés tels que la lignine qu'ils sont les seuls à pouvoir dégrader efficacement (Silar, 2013). Les champignons sont les organismes interagissant le plus souvent avec les plantes, en particulier les plantes cultivées, et leurs impacts sur l'environnement, l'économie et la santé humaine sont conséquents. Au cours de l'évolution, de nombreuses espèces ont développé des interactions très spécialisées avec les plantes, et des lignages endophytes, mutualistes ou phytopathogènes, ont émergé à de multiples reprises et indépendamment au sein de clades de saprophytes. Les champignons phytopathogènes ont un impact tout particulier en termes de pertes de rendement, d'altération de la qualité des produits et de coûts économiques et environnementaux engendrés par des méthodes de lutte souvent basées sur la chimie de synthèse. Ils peuvent aussi avoir un impact plus direct sur la santé humaine *via* la production de mycotoxines. De plus, la lutte chimique dirigée contre ces organismes contribue fortement à des effets adverses sur la santé humaine et sur l'environnement, notamment à cause de la persistance et de la toxicité des biocides utilisés.

Les champignons, de par leur petit génome particulièrement plastique, leur cycle de vie court, la taille de leur population et leurs nombreuses formes de multiplication, montrent d'extrêmes capacités évolutives et adaptatives. Ainsi de nouvelles maladies fongiques des plantes, mais aussi des animaux et des hommes émergent constamment (Olsen *et al.*, 2011). Toutefois, il ne s'agit pas là d'une menace nouvelle puisque des épidémies dues à des champignons ou à des organismes présentant une convergence évolutive avec les champignons, les oomycètes, ont influé sur l'histoire humaine. L'exemple le plus célèbre est la Grande Famine, due aux épidémies de mildiou de la pomme de terre (*Phytophthora infestans*) survenues en Irlande au milieu du 19^e siècle, qui a causé la mort d'un million de personnes et entraîné l'émigration de deux millions de personnes principalement vers les États-Unis, la Grande-Bretagne, le Canada et l'Australie. Au cours du 20^e siècle, et en particulier durant les deux dernières décennies, la fréquence et la vitesse d'apparition de nouvelles maladies semblent s'accroître, comme le démontrent des rapports alarmistes récemment publiés dans des revues prestigieuses telles que *Nature* ou *Science* (Fisher *et al.*, 2012 ; Kupferschmidt *et al.*, 2012) et de nombreux articles dans les médias ou sur internet (par exemple concernant l'encre du châtaigner -*Cryphonectria parasitica*-[1]¹ ; la maladie du flétrissement des frênes -*Chalara fraxinea*-[2] ; la graphiose de l'orme -*Ophiostoma novo-ulmi*-[3] ; ou la rouille du caféier -*Hemileia vastatrix*-[4]). De plus en plus d'études insistent sur l'émergence de nouvelles maladies fongiques chez de nombreux organismes (chauves-souris, batraciens, tortues marines, poissons, coraux) qui peuvent être dues soit à l'apparition de nouvelles espèces fongiques, soit à l'adaptation d'une espèce préexistante à un nouvel hôte (Fisher *et al.*, 2012). À ce jour, les plantes restent les organismes les plus attaqués par les champignons et ces derniers sont considérés comme une menace majeure pour la sécurité alimentaire mondiale puisqu'on estime

¹ Les numéros entre crochets renvoient aux sites web indiqués après les références.

qu'environ 10 % de la production agricole mondiale sont perdus à cause de maladies fongiques (Strange & Scott, 2005; Pennisi, 2010; Fisher *et al.*, 2012; Silar, 2013). Plus de 125 millions de tonnes des produits des cinq plantes de grandes cultures les plus utilisées pour l'alimentation humaine (incluant le blé et le riz) sont ainsi détruites chaque année par des maladies fongiques (Anderson *et al.*, 2004; Olsen *et al.*, 2011).

Dans le contexte du changement global, les champignons phytopathogènes agissent comme des espèces invasives, ce qui est favorisé par leurs caractéristiques biologiques mais aussi par la mondialisation des échanges commerciaux (Stukenbrock & McDonald, 2008; Stukenbrock & Bataillon, 2012). Les champignons ont souvent de fortes capacités de dispersion (principalement pour les parasites aériens) mais profitent aussi des échanges intercontinentaux des plantes qu'ils infectent. Ils possèdent aussi de grandes tailles de population efficace, des régimes reproductifs mixtes (une reproduction sexuée permettant la recombinaison des caractères et une multiplication asexuée favorisant une expansion massive des génotypes les mieux adaptés), et des capacités de survie à long terme en dehors de leur hôte (tant en initiant un mode de vie saprophyte que sous forme de spores dormantes). Toutes ces caractéristiques biologiques couplées à certaines particularités génomiques indiquent que les champignons sont des organismes aux mécanismes adaptatifs spécifiques particulièrement efficaces, comme nous le montrerons dans cet article à l'aide du modèle *Leptosphaeria maculans*, leur permettant de s'adapter rapidement aux méthodes de lutte (résistance variétale ou lutte chimique) utilisées par l'homme pour les contrôler (Giraud *et al.*, 2010).

Depuis les origines de l'agriculture, l'Homme a utilisé, intentionnellement ou non, des résistances variétales basées sur des gènes majeurs de résistance montrant un déterminisme mendélien simple (Biffen, 1905) et définissant la relation « gène-pour-gène » dans laquelle la résistance est mise en place lorsque le gène de résistance de la plante « reconnaît » la présence d'un gène correspondant chez l'agent pathogène (appelé « gène d'avirulence »). Depuis l'identification de ce déterminisme simple (Biffen, 1905), les phytopathologistes ont observé dans les agro-écosystèmes des centaines de cas dans lesquelles des populations pathogènes devenaient capables de contourner une résistance variétale qui leur était opposée. De tels effondrements de l'efficacité d'une résistance ont par exemple été décrits pour des maladies aériennes des céréales (rouilles ou oïdiums) (McDonald & Linde, 2002) et pour la nécrose du collet du colza causée par *Leptosphaeria maculans* (Rouxel *et al.*, 2003). Typiquement, un gène majeur montrant une efficacité extrême est utilisé de plus en plus massivement par les agriculteurs et sur de grandes superficies, aboutissant

les premières années à une absence visible de la maladie puisque la résistance éradique effectivement la partie « avirulente », majoritaire dans la population pathogène. En général, la population pathogène s'adapte à la pression de sélection en quelques années seulement et la composante « avirulente » devient peu à peu minoritaire dans la population, rendant la résistance inefficace, et réduisant à néant des efforts de sélection variétale de plusieurs années (Rouxel *et al.*, 2003; Daverdin *et al.*, 2012). Les caractéristiques biologiques citées précédemment sont importantes pour de tels contournements, mais la structure et le dynamisme du génome des champignons sont essentiels pour une adaptation optimale à ce type de pression de sélection.

L'obtention des séquences génomiques de la levure, puis des premiers champignons filamenteux (Galagan *et al.*, 2003; Machida *et al.*, 2005) a permis d'esquisser les caractéristiques génomiques des champignons : génome de petite taille présentant une forte densité génique et comportant peu de séquences répétées. Les premiers séquençages de champignons phytopathogènes, montrant des génomes de 20–40 Mb (*Ustilago maydis*, *Magnaporthe oryzae*, *Fusarium graminearum*, *Phaeosphaeria nodorum*) (Dean *et al.*, 2005; Kämper *et al.*, 2006; Cuomo *et al.*, 2007; Hane *et al.*, 2007) ne dérogeaient pas à cette règle. En ce sens le génome était peu explicatif des capacités évolutives et adaptatives de ces organismes. Ce point de vue a drastiquement changé à partir de 2009, pour les oomycètes (Haas *et al.*, 2009; Raffaele *et al.*, 2010), puis pour les ascomycètes (Spanu *et al.*, 2010; Rouxel *et al.*, 2011) et les basidiomycètes (Duplessis *et al.*, 2011), lors de la caractérisation du génome d'agents pathogènes montrant une diversité de taille et d'architecture inattendue et contradictoire avec les données issues des premiers génomes séquencés. En particulier, on observe une tendance à une augmentation de la taille des génomes due à l'invasion de ces derniers par des éléments transposables (ET), qui sculptent un génome « à deux vitesses » favorisant l'adaptabilité des organismes. C'est ce que nous allons illustrer dans la suite de cet article, principalement avec l'analyse du génome de *Leptosphaeria maculans* et de plusieurs espèces proches.

Montagnes russes dans le génome de *Leptosphaeria maculans*

Leptosphaeria maculans est un champignon phytopathogène inféodé aux crucifères, responsable de l'une des principales maladies du colza (*Brassica napus*), la nécrose du collet (*blackleg* des anglo-saxons) (Rouxel & Balesdent, 2005). Durant les années 1990 et 2000, *L. maculans* est devenu un modèle d'étude important grâce aux ressources accumulées telles que des grandes collections de souches et de mutants

d'insertion (Blaise *et al.*, 2007) et à sa plasticité au laboratoire (incluant la possibilité d'obtenir la reproduction sexuée au laboratoire et donc d'initier des analyses de génétique formelle, chose rare pour un champignon phytopathogène). Ainsi, *L. maculans* est à ce jour l'un des modèles fongiques chez lequel le plus de gènes d'avirulence ont été clonés et caractérisés, favorisant ainsi la connaissance des gènes de résistance majeurs correspondants (gènes *Rlm*) chez le colza ou les espèces de *Brassica* apparentées. Au milieu des années 2000, une initiative conjointe de l'INRA et de l'Université de Melbourne (Australie) a conduit au séquençage du génome d'une souche européenne de *L. maculans* « brassicae » (v23.1.3) par le Genoscope (Rouxel *et al.*, 2011). La séquence du génome, obtenue à l'aide d'une technologie de séquençage de type Sanger, a été fournie en 2007 sous la forme d'un assemblage de très bonne qualité et a révélé plusieurs traits caractéristiques. Avec une taille de plus de 45 Mb, il constitue en 2007 l'un des plus grands génomes séquencés jusqu'alors chez les champignons filamenteux (Rouxel *et al.*, 2011). De plus, le génome présente une composition en bases GC (44 %) globalement inférieure à celles des espèces fongiques proches taxinomiquement (50–55 %) (Rouxel *et al.*, 2011). Mais la particularité inédite de ce génome réside dans sa structuration en isochores, c'est-à-dire une alternance le long des chromosomes de deux compartiments génomiques, l'un équilibré en bases GC (ou isochores GC) et l'autre pauvre en bases GC (ou isochores AT), qui jusqu'ici n'avait été observée que chez des Eucaryotes plus complexes tels que les Mammifères (Rouxel *et al.*, 2011; Raffaele & Kamoun, 2012). L'analyse du génome a montré que les isochores GC comprennent la majorité des gènes (95 %), avec une forte densité génique, alors que les isochores AT sont surtout composés de mosaïques plus ou moins complexes d'éléments transposables inactivés par un phénomène préméiotique d'inactivation des éléments répétés spécifique des champignons, le RIP (*Repeat-Induced Point mutations*). Ces isochores AT, correspondant à 36 % du génome, contiennent certes peu de gènes, mais ils sont enrichis en gènes codant des petites protéines sécrétées, collectivement appelées effecteurs, potentiellement impliquées dans les interactions entre *L. maculans* et son hôte lors de la mise en place de la pathogenèse (Rouxel *et al.*, 2011).

Les questions posées par la structure du génome

Une telle structure de génome pose des questions évolutives, notamment sur la contribution des ET dans l'émergence d'une nouvelle espèce et sur les différents mécanismes mis en œuvre lors de la

spéciation. Elle nous questionne aussi sur l'incidence de cette structure sur les capacités parasitaires et adaptatives et l'on peut se demander quels sont les avantages/désavantages du maintien de cette structure pour l'organisme.

Plus spécifiquement, les questions que l'on peut envisager de traiter sur la base d'une telle structure de génome sont les suivantes : (i) Peut-on déterminer quand les ET ont envahi les génomes fongiques au cours de l'évolution et en déduire des mécanismes de spéciation ? (ii) Dans le cas de *L. maculans*, les ET ont-ils contribué à générer de nouveaux gènes ou à créer des duplications à l'origine de nouvelles fonctions ? En quoi une telle innovation génique a-t-elle favorisé l'adaptation à la plante hôte, le colza ? (iii) Quel est le lien entre la structure du génome et l'adaptation aux résistances variétales utilisées en agriculture pour contrôler la maladie ?

Un modèle pour la génomique évolutive et adaptative : le complexe d'espèces *Leptosphaeria maculans*-*Leptosphaeria biglobosa*

Pour traiter ces différentes questions, nous avons initié une approche de génomique comparative, en prenant avantage de l'existence d'un complexe d'espèces plus ou moins bien définies, proches de *L. maculans* et parasitant les crucifères adventices ou cultivées. Ainsi, si depuis le début du 20^e siècle, les mycologues estimaient que l'espèce « *L. maculans* » était extrêmement polymorphe et reconnaissaient deux formes distinctes principalement selon leur agressivité et les dégâts causés sur colza, ce n'est qu'en 2001 que les deux « formes » ont été formellement reconnues comme deux espèces distinctes dont l'une était alors renommée *Leptosphaeria biglobosa* (Shoemaker & Brun, 2001). Très proches morphologiquement, les deux espèces partagent la même niche écologique et le même style de vie et, à l'exception de quelques régions du globe, se retrouvent généralement ensemble dans les parcelles de colza et même dans les plantes infectées chez lesquelles elles peuvent toutes deux développer une longue colonisation systémique et endophyte sans expression de symptômes (West *et al.*, 2002). Cette séparation en deux espèces n'était que le premier pas vers une plus grande complexité puisque des collectes effectuées sur crucifères adventices dans les années 1960 par un mycologue canadien, J.A. Petrie, identifiaient plusieurs sous-groupes de souches inféodées à diverses espèces de crucifères tant chez *L. maculans* (appelées *L. maculans* « lepidii », par contraste avec la souche de référence isolée de colza ou *L. maculans* « brassicae ») que chez *L. biglobosa* (*L. biglobosa* « brassicae » et *L. biglobosa*

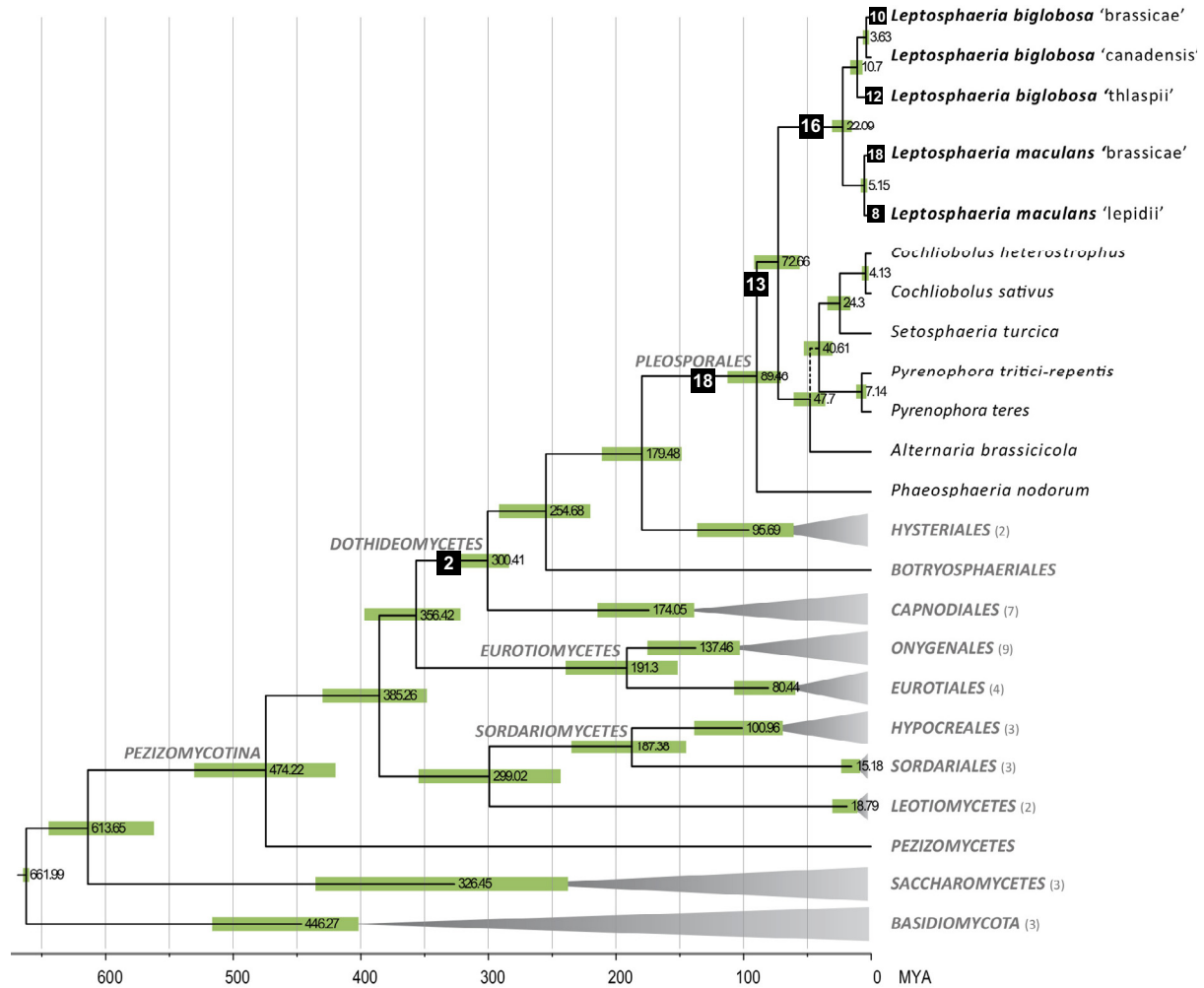


Fig. 1. Relations phylogénétiques et estimation des temps de divergence au sein des classes majeures des Ascomycètes. Les chiffres indiqués dans des carrés noirs représentent le nombre de familles d'éléments transposables qui ont envahi les différentes branches de l'arbre.

« thlaspii ») et de sous-groupes géographiques au sein des *L. biglobosa* infectant le colza (*L. biglobosa* « canadensis », *L. biglobosa* « occiaustralensis ») (Mendes-Pereira *et al.*, 2003; Vincenot *et al.*, 2008) (figure 1). Pour ces différents sous-groupes, des données préliminaires montraient par ailleurs des structures chromosomiques et des tailles de génome différentes de celles de la souche de référence. Il s'agissait donc tout d'abord de mieux définir les relations phylogénétiques entre ces différentes entités, puis de comparer leurs structures de génome et l'incidence des ET dans la structure du génome de chacune d'entre elles. À l'aide de stratégies NGS (*Next Generation Sequencing* : 454 Roche et HiSeq Illumina), nous avons ainsi séquencé plusieurs autres souches incluant trois autres souches de *L. maculans* « brassicae » (Lmb), une souche de *L. maculans* « lepidii »

(Lml), une souche de *L. biglobosa* « brassicae » (Lbb) et une souche de *L. biglobosa* « thlaspii » (Lbt). Nos collègues australiens de l'Université de Melbourne ont, quant à eux, séquencé une souche de *L. biglobosa* « canadensis » (Lbc) à l'aide de la technologie HiSeq Illumina uniquement.

Ces données nous ont permis de préciser la phylogénie des différentes souches séquencées. Elles ont ainsi indiqué que les temps de divergence entre Lmb et Lml ou entre Lbb et Lbc sont de l'ordre de 4 à 5 millions d'années (figure 1), suggérant dans les deux cas une divergence compatible avec l'existence d'espèces distinctes qu'il faudra formellement renommer dans le futur. L'analyse des données de séquence (tableau 1) nous a ensuite montré que les génomes des membres du complexe d'espèces, hormis la référence Lmb, ont une taille similaire à celle du génome de la plupart des

Tableau 1. Données de séquençage et d’annotation des génomes du complexe d’espèces *L. maculans*-*L. biglobosa*.

	<i>L. maculans</i> « brassicae »	<i>L. maculans</i> « lepidii »	<i>L. biglobosa</i> « brassicae »	<i>L. biglobosa</i> « canadensis »	<i>L. biglobosa</i> « thlaspii »
Taille du génome (Mb)	45,1	31,5	31,8	30,2	32,1
Nombre de contigs	1743	2802	2533	7124	3506
Nombre de scaffolds	76	123	606	6748	237
Scaffold N50 (kb)	1770	1356	779	245	715
Gaps (%)	2,5	7,12	7,37	0,11	8,69
Éléments répétés (%)	35,5	3,99	4,44	3,88	5,11
Éléments transposables (%)	32,5	2,7	3,2	2,9	4,0
Contenu en GC (%)	45,2	50,9	51,4	51,1	51,4
Nombre de gènes prédits	12543	11272	11390	11068	11691
Nombre d’effecteurs prédits	651	737	665	621	676

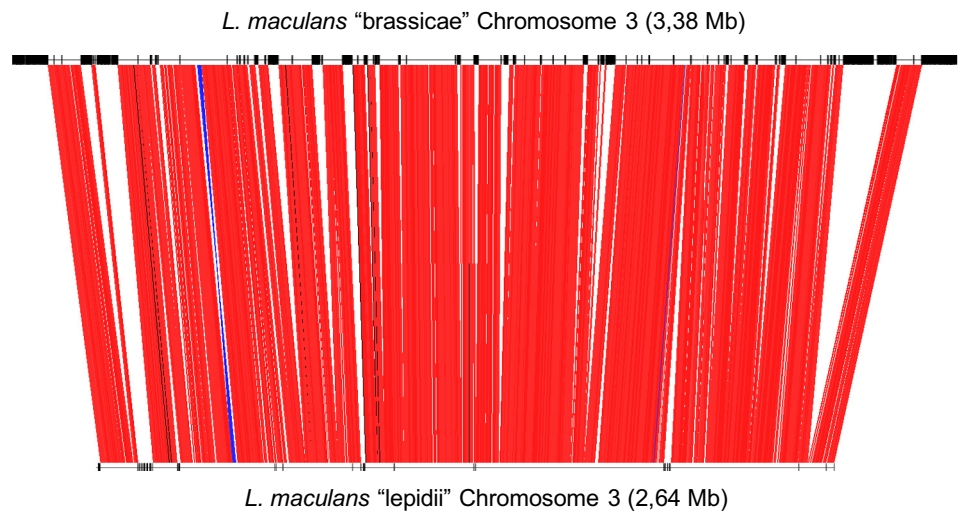


Fig. 2. Synténie entre les génomes de *L. maculans* « brassicae » et *L. maculans* « lepidii », exemple du chromosome 3. Le chromosome 3 de *L. maculans* est ici schématisé par une ligne sur laquelle sont représentés les ET (traits noirs verticaux). Ce schéma permet de voir que les séquences se trouvant de part et d’autre de grandes régions riches en ET, les isochores AT, sont très conservées. Lorsqu’un trait rouge relie des régions synténiques entre les deux séquences, cela signifie qu’elles sont orientées de la même façon, dans le cas contraire le trait est bleu. Ce schéma permet donc de visualiser deux inversions intra-chromosomiques, qui dans ce cas-là, ne présentent pas d’ET à leurs points de cassure ou à proximité. (Contig : une séquence d’ADN continue et ordonnée résultant de la séquence de plusieurs clones contigus; scaffold – aussi appelé « super-contig » – : séquence génomique résultant de l’assemblage de plusieurs contigs.)

ascomycètes filamenteux (entre 30 et 32 Mb), ce qui est cohérent avec nos données préliminaires basées sur l’analyse des électrocaryotypes de ces espèces. Les données obtenues sont compatibles avec une très faible quantité de régions répétées chez les membres du complexe d’espèces autres que *Lmb*. Ainsi le génome de *Lml* ne contient que 2,7 % d’ET (tableau 1, figure 2). L’ensemble de ces données suggère fortement que le génome de *Lmb* a été envahi par des ET il y a moins de 5 millions d’années, concomitamment ou après l’émergence de *Lmb* en tant qu’espèce nouvelle.

Récemment, les analyses de génomique comparative entre espèces fongiques ou oomycètes plus

ou moins proches se sont multipliées (Schirawski *et al.*, 2010; De Wit *et al.*, 2012; Ohm *et al.*, 2012; Gan *et al.*, 2013; Hacquard *et al.*, 2013; Manning *et al.*, 2013; Schardl *et al.*, 2013; Syme *et al.*, 2013). Généralement, la structure des génomes est comparable entre espèces proches, que celles-ci montrent toutes un génome riche en ET, comme lors des comparaisons entre espèces de *Colletotrichum* ou entre *Blumeria* spp. (Spanu, 2012; Gan *et al.*, 2013), ou au contraire un faible taux d’ET chez toutes les espèces proches, comme lors de comparaisons entre différentes espèces de *Cochliobolus* (Ohm *et al.*, 2012; Condon *et al.*, 2013).

Les rares cas où des comparaisons sont réalisées entre espèces différant radicalement dans leur contenu en ET concernent surtout à ce jour des entités phylogénétiquement relativement éloignées telles que *Cladosporium fulvum* et *Dothistroma septosporum* (De Wit *et al.*, 2012). La série évolutive *L. maculans*-*L. biglobosa* est donc un modèle tout à fait original pour étudier le déterminisme d'une invasion récente de génome par des ET et les conséquences que cela peut avoir sur la structure et le fonctionnement d'un génome fongique.

Éléments transposables et spéciation

L'annotation des éléments répétés dans l'ensemble des génomes du complexe d'espèces a permis d'identifier 121 séquences réparties par la suite en trois catégories : (i) les ET de classe I ou rétrotransposons, représentés par 24 familles ; (ii) les ET de classe II ou transposons à ADN, représentés par 21 familles ; et (iii) les éléments non catégorisés comprenant 52 séquences. Une étude de la proportion de ces familles dans les génomes du complexe d'espèces a mis en évidence une très forte expansion de rétrotransposons à LTR (*Long Terminal Repeats*) chez *Lmb*, comme cela est généralement le cas pour les génomes fongiques riches en ET (Gan *et al.*, 2013). Dans l'ensemble des génomes du complexe, toutes les copies d'ET sont généralement tronquées et dégénérées par le RIP, qui introduit de multiples codons stop le long de la séquence codante ; il n'y a donc actuellement plus d'activité de transposition possible pour ces éléments.

Afin d'établir la distribution de ces familles d'ET dans les génomes du complexe d'espèces et de savoir, par la même occasion, si ces éléments sont spécifiques au complexe d'espèces, leur présence a été analysée dans l'ensemble des génomes de champignons Ascomycètes disponibles dans la base de données Mycocosm du JGI [5]. En couplant ces données avec les temps de divergence calculés entre ces espèces, il est possible d'estimer la date d'invasion par les familles d'ET. Plusieurs points importants ressortent de cette étude : (i) les ET présents chez les membres du complexe d'espèces *L. maculans*-*L. biglobosa* sont retrouvés uniquement dans des génomes de Dothidéomycètes, et majoritairement des Pléosporales ; (ii) 66 % des familles ne sont présentes que dans le complexe *L. maculans*-*L. biglobosa* et sont réparties selon plusieurs niveaux de spécificité (genre, espèces, « sous-espèces ») ; (iii) trois des quatre familles d'ET les plus abondantes (rétrotransposons à LTR) chez *Lmb* sont présentes dans les phylogénies depuis 70 à 90 millions d'années, mais elles sont généralement très minoritaires chez les autres espèces fongiques ou chez les autres membres du complexe d'espèces

(figure 1). Des analyses phylogénétiques basées sur la divergence nucléotidique (hors nucléotides mutés par le RIP) entre les copies d'ET de chaque famille indiquent ainsi un « *burst* » de transposition pour les familles les plus représentées dans le génome de *Lmb*, il y a environ 5 millions d'années (Rouxel *et al.*, 2011).

Les ET sont connus pour induire des réarrangements chromosomiques tels que des translocations, des inversions ou des délétions (Zolan, 1995 ; Rebollo *et al.*, 2010). Afin de savoir si cette expansion soudaine d'ET a eu des effets sur la structure du génome de *Lmb*, nous avons comparé ce dernier avec le génome de *Lml*, pauvre en ET et phylogénétiquement proche. L'alignement obtenu présente une très grande conservation des chromosomes et de l'ordre des gènes au sein des chromosomes (macrosynténie) et l'on dénombre seulement 30 inversions intra-chromosomiques et aucune translocation entre ces deux espèces (figure 2). Cela correspond à une image des toutes premières étapes conduisant à ce que Hane *et al.* (2011) ont appelé mésosynténie, c'est-à-dire, entre deux espèces, la conservation des chromosomes et de leur contenu en gènes sans conservation de l'ordre ou de l'orientation de ces gènes au sein de ces chromosomes. Ce phénomène évolutif semble restreint aux champignons filamenteux Ascomycètes et plus particulièrement aux Dothidéomycètes (Hane *et al.*, 2011 ; Ohm *et al.*, 2012). Ohm *et al.* (2012) ont montré, à travers une simulation, que l'accumulation de séries d'inversions intra-chromosomiques génère la mésosynténie au cours de l'évolution. La comparaison de 18 génomes de Dothidéomycètes a par ailleurs mis en évidence la présence de répétitions simples (de type microsatellite) aux points de cassure des inversions et suggéré un lien mécanistique entre les remaniement intra-chromosomiques et la présence de telles répétitions (Ohm *et al.*, 2012). Chez *Lmb*, toutefois, de telles répétitions simples ne sont pas retrouvées et les bordures des inversions intra-chromosomiques sont, pour les deux-tiers d'entre elles, colocalisées avec des ET ayant envahi les génomes durant ou après la spéciation *Lmb*-*Lml*.

L'importance évolutive des ET est aujourd'hui démontrée dans tous les règnes du vivant. Ils peuvent contribuer à l'innovation génique, à la perte de gènes ou à une instabilité génomique en tant que substrat pour la recombinaison méiotique conduisant à des réarrangements chromosomiques (Rebollo *et al.*, 2010). Les « *bursts* » de transposition d'éléments qui sont souvent lignée- ou espèce-spécifiques sont reliés à des événements de spéciation sans qu'il soit possible de savoir s'ils en sont la cause ou la conséquence (Rebollo *et al.*, 2010). Une telle importance évolutive des ET est ainsi illustrée par nos analyses chez les Dothidéomycètes. En prenant comme référence les ET présents au sein du complexe d'espèces *L. maculans*-*L.*

biglobosa, nous observons des « *bursts* » de transposition et des ET spécifiques d'un lignage à différents niveaux de la phylogénie des Dothidéomycètes. Ainsi 18 familles sont spécifiques des Pléosporales, ayant potentiellement envahi les génomes 89 millions d'années auparavant, 13 familles sont spécifiques d'une branche postérieure au sein des Pléosporales ayant potentiellement envahi les génomes 72 millions d'années auparavant, 16 familles sont concomitantes ou postérieures à la séparation entre *L. maculans* et *L. biglobosa* ayant potentiellement envahi les génomes 22 millions d'années auparavant (figure 1). À chaque branche majeure de la phylogénie, on note donc l'invasion par des ET spécifiques qui ont potentiellement contribué aux événements de spéciation. L'exemple le plus frappant, et sans équivalent dans la phylogénie des Dothidéomycètes, concerne la séparation entre Lml et Lmb. Les deux génomes montrent une forte conservation de synténie mais diffèrent par leur contenu en ET puisque seul le génome de Lmb a subi une expansion massive d'ET il y a environ 5 millions d'années, ce qui coïncide avec la date de séparation entre Lmb et Lml. Ces données sont cohérentes avec une relation causale entre « *bursts* » de transposition et spéciation. Cependant, corrélérer les ET et la spéciation est assez compliqué au vu des imprécisions de datation, mais aussi de l'isolement reproductif des deux nouvelles espèces permettant alors une dynamique indépendante d'invasion du génome par les ET (Rebollo *et al.*, 2010). *A contrario*, il semble établi dans ce système que les ET bordent la plupart des inversions intra-chromosomiques entre les génomes de Lmb et Lml et en sont sans doute la cause. Ces événements créent ainsi plusieurs régions génomiques (dont certaines de très grande taille contiennent plus d'une centaine de gènes) inaccessibles à la recombinaison méiotique entre les ancêtres de Lmb et Lml.

Cependant, une donnée reste obscure à la suite de cette étude : la transposition massive des ET dans le génome de Lmb concerne des familles ayant nouvellement envahi les génomes, comme l'on pouvait s'y attendre, mais aussi trois familles de rétrotransposons à LTR présents dans la phylogénie des Pléosporales depuis au moins 72 millions d'années, et qui sont, dans toutes les espèces, fortement dégénérées par troncatures et par RIP. Le mécanisme ayant permis une réactivation de ces familles pour leur permettre, il y a environ 5 millions d'années, un « *burst* » de transposition dans le génome de Lmb seulement reste à élucider.

Naissance et mort des effecteurs

Lors d'une analyse de génomique comparative, on attend de la comparaison des protéomes la mise en évidence de différences fonctionnelles que l'on pourra ensuite relier aux différentes stratégies ou

capacités parasitaires ou biologiques. Les génomes des espèces du complexe sont très proches en termes d'organisation et de séquence, il est donc normal de penser qu'une grande partie des protéines produites par ces génomes sera conservée au sein du complexe et c'est effectivement le cas, puisque les membres du complexe partagent près de 90 % de leurs protéines prédites. Les 10 % de séquences spécifiques de l'un ou l'autre génome représentent des pistes potentiellement explicatives de la spécialisation d'hôte ou des différentes symptomatologies sur un hôte donné. Malheureusement, comme pour beaucoup d'autres cas d'analyse de génomique comparative, ces espoirs sont en grande partie déçus puisque plus de 95 % des gènes spécifiques de l'un ou l'autre membre du complexe n'ont pas de fonctions attribuées informatiquement. Un énorme travail expérimental sera donc nécessaire pour l'annotation fonctionnelle de ces séquences, la bioinformatique permettant uniquement de pointer du doigt les séquences à étudier.

Si la majeure partie des gènes spécifiques d'une espèce n'a pas d'annotation, deux catégories fonctionnelles semblent toutefois ressortir dans toutes les études de génomique comparative, les effecteurs peptidiques et les métabolites secondaires (Condon *et al.*, 2013; Manning *et al.*, 2013; Syme *et al.*, 2013; Schardl *et al.*, 2013). Depuis quelques années maintenant, l'étude de la pathogenèse fongique s'est focalisée sur un groupe de gènes spécifiques : les gènes codant pour des effecteurs. Les effecteurs sont des molécules produites par le champignon lors de l'interaction avec son hôte et jouant un rôle souvent encore obscur lors de la mise en place de la pathogénie. Le plus souvent ils correspondent à des petites protéines sécrétées (PPS). Aujourd'hui, tout champignon phytopathogène séquencé a son répertoire de PPS caractérisé. Ainsi, pour chaque membre du complexe *L. maculans*-*L. biglobosa*, le répertoire des PPS a été défini. Ces protéines varient très peu en nombre entre les génomes (650–700), elles représentent une grande partie (60 %) du sécrétome de chaque génome et leurs caractéristiques structurales sont très similaires. Pour chaque génome, 30 % de ces séquences sont conservées chez tous les membres du complexe, 40–50 % sont présentes chez au moins un autre membre et 10–25 % sont spécifiques. Bien entendu, plus la spécificité augmente, moins les séquences ont des fonctions associées.

Chez Lmb, les isochores AT sont enrichis en gènes codant pour des effecteurs (20 % contre 4 % dans les isochores GC). D'ailleurs, c'est dans ces compartiments qu'a été identifié l'ensemble des gènes d'avi-rulence de *L. maculans*. La présence de séquences codantes au sein de régions riches en ET peut être en effet bénéfique pour l'organisme, puisque des analyses ont montré que les mutations RIP pouvait « déborder » des ET vers les séquences adjacentes, leur fournissant

ainsi une nouvelle source de diversification (Rouxel *et al.*, 2011). Cette association entre régions riches en ET (ou ET isolé) et effecteurs est retrouvée chez la plupart des espèces de champignons filamenteux ou d'oomycètes phytopathogènes (Orbach *et al.*, 2000; Haas *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2010; De Wit *et al.*, 2012; Hacquard *et al.*, 2013).

Des analyses de synténie effectuées entre les génomes de Lmb et d'autres Pléosporales telles que *Phaeosphaeria nodorum* ou *Pyrenophora tritici-repentis* ont montré que les gènes directement séparés par des isochores AT (jusqu'à plusieurs centaines de kilobases) chez Lmb sont conservés et consécutifs dans les autres génomes. Par contre, certains gènes présents au sein des isochores AT, plus particulièrement codant pour des PPS, n'ont pas d'homologues dans les génomes des autres organismes. Il semblerait donc que la formation des isochores dans le génome de Lmb soit liée à la génération de nouveaux gènes. Cette hypothèse a été renforcée lors de l'étude comparative entre les génomes des membres du complexe, car chez Lmb 25 % des gènes localisés dans les isochores AT sont spécifiques, contre 10 % en isochores GC. Si l'on considère uniquement les gènes codant des effecteurs en isochores AT, cette spécificité atteint 41 %. Cette étude nous a aussi permis d'observer des « mouvements » de gènes qui pourraient être liés au « burst » de transposition : les orthologues des gènes d'avirulence de Lmb, lorsqu'ils existent chez un ou plusieurs membres du complexe d'espèces, sont systématiquement localisés dans des régions différentes, ou sur des chromosomes différents, alors que les gènes environnants conservent leur synténie avec leurs orthologues chez Lmb. Cette information rappelle, à une échelle moindre, la localisation chromosomique extrêmement variable dans le génome du champignon *Magnaporthe oryzae* du gène d'avirulence *AVR-Pita*, lui aussi flanqué de rétrotransposons (Chuma *et al.*, 2011). Chez d'autres espèces fongiques ou d'oomycètes, on postule que les événements de transposition favorisent la duplication des gènes codant pour des effecteurs, conduisant finalement à des diversifications géniques (et à des néofonctionnalisations?) (Raffaele & Kamoun, 2012), et il est tentant de penser qu'au cours de l'évolution le déplacement de ces gènes dans des régions très dynamiques a mené à l'apparition ou l'acquisition de nouvelles capacités parasitaires chez Lmb. Les ET peuvent aussi avoir, et c'est bien connu, un rôle négatif quand ils viennent s'insérer dans une séquence codante. Ce cas permet de créer de la diversité entre deux espèces, mais aussi entre deux isolats d'une même espèce. En comparant les génomes de deux isolats de Lmb, on note du polymorphisme d'insertion d'ET relativement jeunes, c'est-à-dire spécifiques de l'espèce *L. maculans*, pouvant engendrer de la spécificité génique.

Structure du génome et adaptation aux pressions de sélection

L'utilisation massive de résistances variétales de type « gène majeur » conduit à une forte pression de sélection contre un gène unique du champignon et à des cycles récurrents de « boom-and-burst » dans lesquels l'utilisation d'une nouvelle résistance variétale conduit à une valeur ajoutée pour la culture et donc à un succès massif des variétés possédant cette nouvelle résistance, suivi très rapidement par une perte d'efficacité de la résistance à la suite de l'apparition et de la dissémination de souches mutantes devenues virulentes (McDonald & Linde, 2002). Si ce phénomène est décrit depuis longtemps, la vitesse d'apparition et de dissémination des souches virulentes (souvent 2 à 3 ans suffisent pour qu'une résistance variétale soit contournée) et les mécanismes moléculaires permettant ce contournement étaient restés obscurs jusqu'à très récemment. En effet, si diverses études analysant (souvent rétrospectivement) des souches ou des populations fongiques devenues virulentes vis-à-vis d'une résistance décrivent de nombreux événements moléculaires conduisant généralement à l'inactivation totale de celui-ci (mutations ponctuelles du gène d'avirulence, délétion totale ou partielle, insertion d'ET, mutations dues au RIP (Kang *et al.*, 2001; Rep *et al.*, 2004; Fudal *et al.*, 2005, 2009; Farman, 2007; Gout *et al.*, 2007; Stergiopoulos *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2007), les tout premiers événements moléculaires permettant le contournement et leur dissémination dans les populations restaient inconnus. Pour clarifier ce point, nous avons mis en place un essai pluri-annuel dans lequel des populations avirulentes de Lmb étaient confrontées pour la première fois à une nouvelle résistance, *Rlm7* (Daverdin *et al.*, 2012). Le gène fongique soumis à sélection, *AvrLm7*, étant localisé en isochore AT (Parlange *et al.*, 2009), comme tous les autres gènes d'avirulence connus chez Lmb, cette expérience avait ainsi pour objet d'élucider le lien entre dynamique évolutive et structure du génome. Dans le cadre de cette expérience, nous avons effectivement observé un contournement de la résistance, avec des populations qui, de totalement avirulentes sont devenues virulentes, pour 40 % des souches échantillonnées, et ce en trois ans seulement (Daverdin *et al.*, 2012). De façon surprenante, nous avons observé, dans une petite parcelle de 0,25 ha, tous les événements moléculaires décrits dans la littérature, voire d'autres non encore décrits, pour l'inactivation ou la mutation de gènes d'avirulence, avec une sur-représentation des mutations dues au RIP lors des premières années d'expérience, et une prévalence globale des événements de délétion partielle ou totale (Daverdin *et al.*, 2012). Cette étude confirme l'importance de l'environnement génomique des gènes

d'avirulence sur la capacité que montre l'agent pathogène à s'adapter à une pression ciblée en particulier lors des cycles de reproduction sexuée. Une étude récente révèle toutefois que de tels événements liés à un environnement génomique riche en ET sont aussi retrouvés chez des espèces majoritairement asexuées, telles que *Verticillium dahliae* (De Jonge *et al.*, 2013). L'environnement génomique couplé avec un mode de vie, dans lequel la reproduction sexuée est obligatoire, favorise des phénomènes d'hypermutableté tels que le RIP, dont on a vu qu'il peut déborder des régions riches en ET vers des gènes copie-unique inclus dans de grandes régions riches en ET, ou des délétions induites par des mésappariements chromosomiques entre ET lors de la méiose. Dans le cas de *Lmb*, mais aussi probablement dans de nombreux autres cas de champignons phytopathogènes pour lesquels les gènes codant des effecteurs et/ou des gènes d'avirulence sont localisés dans des régions génomiques riches en ET, il apparaît donc qu'une telle localisation présente un double avantage adaptatif en permettant une diversification génique et la génération de nouvelles fonctionnalités, mais aussi en favorisant des phénomènes d'hypermutableté qui expliquent la rapidité avec laquelle on observe des contournements de résistance variétale au champ.

Conclusion

L'ensemble des travaux exposés ici indique la valeur d'exemple générique du complexe d'espèces *L. maculans*-*L. biglobosa*. Ils suggèrent ainsi fortement que, dans les phylogénies fongiques, les événements d'invasion/expansion par des ET touchent majoritairement des branches terminales et donc sont « récents », même si leur déterminisme reste peu clair en particulier pour les cas observés chez *L. maculans* de « réactivation » d'ET inactivés par des mutations massives de type RIP. Ces phénomènes d'invasion/expansion concourent comme chez de nombreux autres organismes à des remaniements chromosomiques et potentiellement à la génération de nouvelles espèces. Dans de nombreux cas d'espèces ascomycètes, des mécanismes de protection du génome tel que le RIP permettent de limiter l'expansion des ET et d'aboutir à un équilibre entre inflation de taille de génome et maintien de régions dispensables présentant un avantage évolutif ou sélectif. Toutefois, dans certains cas extrêmes chez lesquels le RIP ou autres mécanismes de protection du génome sont inactifs (cas par exemple des oïdiums et dans une moindre mesure des rouilles et des mildious), on assiste à une inflation de taille de génome (parfois largement supérieure à 100 Mb) liée à un envahissement massif du génome par les ET et résultant en

une perte massive de gènes et un mode de vie strictement biotrophe, l'agent pathogène devenant incapable de vivre en dehors de son hôte en tant que saprophyte comme le font la plupart des champignons phytopathogènes. De façon moins drastique, l'ensemble de ces études montre que les champignons ont quasi systématiquement généré et utilisent des génomes à deux vitesses, dont le compartiment « plastique » enrichi en ET peut prendre des formes diverses (chromosomes dispensables, amplification des régions sub-télomériques, isochores AT). On observe une sélection pour la localisation de gènes importants pour la pathogenèse et l'adaptation dans de telles régions plastiques du génome avec des conséquences sur la diversification/expansion du répertoire d'effecteurs, des conséquences sur l'adaptation aux pressions dues à l'hôte, des capacités accrues de transferts horizontaux entre espèces partageant la même niche écologique et sans doute des conséquences sur la régulation de l'expression des gènes inclus dans de telles régions génomiques.

Références

- Anderson P.K., Cunningham A.A., Patel N.G., Morales F.J., Epstein P.R., Daszak P., Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends Evol Ecol*, 2004, 19, 535-544.
- Biffen, R.H., The inheritance of sterility in the barleys. *J Agric Sci*, 1905, 1, 250-257.
- Blaise F., Rémy E., Meyer M., Zhou L., Narcy J.P., Roux J., Balesdent M.H., Rouxel T., A critical assessment of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for pathogenicity gene discovery in the phytopathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. *Fungal Genet Biol*, 2007, 44, 123-138.
- Chuma I., Isobe C., Hotta Y., Ibaragi K., Futamata N., Kusaba M., Yoshida K., Terauchi R., Fujita Y., Nakayashiki H., Valent B., Tosa Y., Multiple translocation of the AVR-Pita effector gene among chromosomes of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* and related species. *PloS Pathog*, 2011, 7, e1002147.
- Condon B.J., Leng Y., Wu D., Bushley K.E., Ohm R.A., Otillar R., Martin J., Schackwitz W., Grimwood J., MohdZainudin N., Xue C., Wang R., Manning V.A., Dhillon B., Tu Z.J., Steffenson B.J., Salamov A., Sun H., Lowry S., LaButti K., Han J., Copeland A., Lindquist E., Barry K., Schmutz J., Baker S.E., Ciuffetti L.M., Grigoriev I.V., Zhong S., Turgeon B.G., Comparative genome structure, secondary metabolite, and effector coding capacity across *Cochliobolus* pathogens. *PloS Genet*, 2013, 9, e1003233.
- Cuomo C.A., Guldener U., Xu J.R., Trail F., Turgeon B.G., Di Pietro A., Walton J.D., Ma L.J., Baker S.E., Rep M., Adam G., Antoniw J., Baldwin T., Calvo S., Chang Y.L., Decaprio D., Gale L.R., Gnerre

- S., Goswami R.S., Hammond-Kosack K., Harris L.J., Hilburn K., Kennell J.C., Kroken S., Magnuson J.K., Mannhaupt G., Mauceli E., Mewes H.W., Mitterbauer R., Muehlbauer G., Münsterkötter M., Nelson D., O'Donnell K., Ouellet T., Qi W., Quesneville H., Roncero M.I., Seong K.Y., Tetko I.V., Urban M., Waalwijk C., Ward T.J., Yao J., Birren B.W., Kistler H.C., The *Fusarium graminearum* genome reveals a link between localized polymorphism and pathogen specialization. *Science*, 2007, 317, 1400–1402.
- Daverdin G., Rouxel T., Gout L., Aubertot J.N., Fudal I., Meyer M., Parlange F., Carpezat J., Balesdent M.H., Genome structure and reproductive behaviour influence the evolutionary potential of a fungal phytopathogen. *PLoS Pathog*, 2012, 8, e1003020.
- Dean R.A., Talbot N.J., Ebbole D.J., Farman M.L., Mitchell T.K., Orbach M.J., Thon M., Kulkarni R., Xu J.R., Pan H., Read N.D., Lee Y.H., Carbone I., Brown D., Oh Y.Y., Donofrio N., Jeong J.S., Soanes D.M., Djonovic S., Kolomiets E., Rehmeier C., Li W., Harding M., Kim S., Lebrun M.H., Bohnert H., Coughlan S., Butler J., Calvo S., Ma L.J., Nicol R., Purcell S., Nusbaum C., Galagan J.E., Birren B.W., The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature*, 2005, 434, 980–986.
- De Jonge R., Bolton M.D., Kombrink A., van den Berg G.C., Yadeta K.A., Thomma B.P., Extensive chromosomal reshuffling drives evolution of virulence in an asexual pathogen. *Genome Res*, 2013, 23, doi:10.1101/gr.152660.112.
- De Wit P.J., van der Burgt A., Ökmen B., Stergiopoulos I., Abd-El Salam K.A., Aerts A.L., Bahkali A.H., Beenen H.G., Chettri P., Cox M.P., Datema E., de Vries R.P., Dhillon B., Ganley A.R., Griffiths S.A., Guo Y., Hamelin R.C., Henrissat B., Kabir M.S., Jashni M.K., Kema G., Klaubauf S., Lapidus A., Levasseur A., Lindquist E., Mehrabi R., Ohm R.A., Owen T.J., Salamov A., Schwelm A., Schijlen E., Sun H., van den Burg H.A., van Ham R.C., Zhang S., Goodwin S.B., Grigoriev I.V., Collemare J., Bradshaw R.E., The genomes of the fungal plant pathogens *Cladosporium fulvum* and *Dothistroma septosporum* reveal adaptation to different hosts and lifestyles but also signatures of common ancestry. *PLoS Genet*, 2012, 8, e1003088.
- Duplessis S., Cuomo C.A., Lin Y.C., Aerts A., Tisserant E., Veneault-Fourrey C., Joly D.L., Hacquard S., Amselem J., Cantarel B.L., Chiu R., Coutinho P.M., Feau N., Field M., Frey P., Gelhaye E., Goldberg J., Grabherr M.G., Kodira C.D., Kohler A., Kües U., Lindquist E.A., Lucas S.M., Mago R., Mauceli E., Morin E., Murat C., Pangilinan J.L., Park R., Pearson M., Quesneville H., Rouhier N., Sakthikumar S., Salamov A.A., Schmutz J., Selles B., Shapiro H., Tanguay P., Tuskan G.A., Henrissat B., Van de Peer Y., Rouzé P., Ellis J.G., Dodds P.N., Schein J.E., Zhong S., Hamelin R.C., Grigoriev I.V., Szabo L.J., Martin F., Obligate biotrophy features unraveled by the genomic analysis of rust fungi. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108, 9166–9171.
- Farman M.L., Telomeres in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*: the world of the end as we know it. *FEMS Microbiol Lett*, 2007, 273, 125–132.
- Fisher M.C., Henk D.A., Briggs C.J., Brownstein J.S., Madoff L.C., McCraw S.L., Gurr S.J., Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature*, 2012, 484, 186–194.
- Fudal I., Böhner H.U., Tharreau D., Lebrun M.H., Transposition of MINE, a composite retrotransposon, in the avirulence gene *ACE1* of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Fungal Genet Biol*, 2005, 42, 761–772.
- Fudal I., Ross S., Brun H., Besnard A.L., Ermel M., Kuhn M.L., Balesdent M.H., Rouxel T., Repeat-induced point mutation (RIP) as an alternative mechanism of evolution toward virulence in *Leptosphaeria maculans*. *Mol Plant Microbe Interact*, 2009, 22, 932–941.
- Galagan J.E., Calvo S.E., Borkovich K.A., Selker E.U., Read N.D., Jaffe D., FitzHugh W., Ma L.J., Smirnov S., Purcell S., Rehman B., Elkins T., Engels R., Wang S., Nielsen C.B., Butler J., Endrizzi M., Qui D., Ianakiev P., Bell-Pedersen D., Nelson M.A., Werner-Washburne M., Selitrennikoff C.P., Kinsey J.A., Braun E.L., Zelter A., Schulte U., Kothe G.O., Jedd G., Mewes W., Staben C., Marcotte E., Greenberg D., Roy A., Foley K., Naylor J., Stange-Thomann N., Barrett R., Gnerre S., Kamal M., Kamvysselis M., Mauceli E., Bielke C., Rudd S., Frishman D., Krystofova S., Rasmussen C., Metzenberg R.L., Perkins D.D., Kroken S., Cogoni C., Macino G., Catcheside D., Li W., Pratt R.J., Osmani S.A., DeSouza C.P., Glass L., Orbach M.J., Berglund J.A., Voelker R., Yarden O., Plamann M., Seiler S., Dunlap J., Radford A., Aramayo R., Natvig D.O., Alex L.A., Mannhaupt G., Ebbole D.J., Freitag M., Paulsen I., Sachs M.S., Lander E.S., Nusbaum C., Birren B.W., The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature*, 2003, 422, 859–868.
- Gan P., Ikeda K., Irieda H., Narusaka M., O'Connell R.J., Narusaka Y., Takano Y., Kubo Y., Shirasu K. Comparative genomic and transcriptomic analyses reveal the hemibiotrophic stage shift of *Colletotrichum* fungi. *New Phytol*, 2013, 197, 1236–1249.
- Giraud T., Gladieux P., Gavrillets S., Linking the emergence of fungal plant diseases with ecological speciation. *Trends Ecol Evol*, 2010, 25, 387–395.
- Gout L., Kuhn M.L., Vincenot L., Bernard-Samain S., Cattolico L., Barbetti M., Moreno-Rico O., Balesdent M.H., Rouxel T. Genome structure impacts molecular evolution at the *AvrLm1* avirulence locus of the plant pathogen *Leptosphaeria maculans*. *Environ Microbiol*, 2007, 9, 2978–2992.
- Haas B.J., Kamoun S., Zody M.C., Jiang R.H., Handsaker R.E., Cano L.M., Grabherr M., Kodira C.D., Raffaele S., Torto-Alalibo T., Bozkurt T.O., Ah-Fong A.M., Alvarado L., Anderson V.L., Armstrong M.R., Avrova A., Baxter L., Beynon J., Boevink P.C., Bollmann S.R., Bos J.I., Bulone V., Cai G., Cakir C., Carrington J.C., Chawner M., Conti L., Costanzo S., Ewan R.,

- Fahlgren N., Fischbach M.A., Fugelstad J., Gilroy E.M., Gnerre S., Green P.J., Grenville-Briggs L.J., Griffith J., Grünwald N.J., Horn K., Horner N.R., Hu C.H., Huitema E., Jeong D.H., Jones A.M., Jones J.D., Jones R.W., Karlsson E.K., Kunjeti S.G., Lamour K., Liu Z., Ma L., Maclean D., Chibucos M.C., McDonald H., McWalters J., Meijer H.J., Morgan W., Morris P.F., Munro C.A., O'Neill K., Ospina-Giraldo M., Pinzón A., Pritchard L., Ramsahoye B., Ren Q., Restrepo S., Roy S., Sadanandom A., Savidor A., Schornack S., Schwartz D.C., Schumann U.D., Schwessinger B., Seyer L., Sharpe T., Silvar C., Song J., Studholme D.J., Sykes S., Thines M., van de Vondervoort P.J., Phuntumart V., Wawra S., Weide R., Win J., Young C., Zhou S., Fry W., Meyers B.C., van West P., Ristaino J., Govers F., Birch P.R., Whisson S.C., Judelson H.S., Nusbaum C., Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature*, 2009, 461, 393–398.
- Hacquard S., Kracher B., Maekawa T., Vernaldi S., Schulze-Lefert P., Ver Loren van Themaat E., Mosaic genome structure of the barley powdery mildew pathogen and conservation of transcriptional programs in divergent hosts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110, 2219–22828.
- Hane J.K., Lowe R.G.T., Solomon P.S., Tan K.C., Schoch C.L., Spatafora J.W., Crous P.W., Kodira C., Birren B.W., Galagan J.E., Torriani S.F.F., McDonald B.A., Oliver R.P., Dothideomycete-plant interactions illuminated by genome sequencing and EST analysis of the wheat pathogen *Stagonospora nodorum*. *Plant Cell*, 2007, 19, 3347–3368.
- Hane J.K., Rouxel T., Howlett B.J., Kema G.H., Goodwin S.B., Oliver R.P., A novel mode of chromosomal evolution peculiar to filamentous Ascomycete fungi. *Genome Biol*, 2011, 12, R45.
- Kämper J., Kahmann R., Bölker M., Ma L.J., Brefort T., Saville B.J., Banuett F., Kronstad J.W., Gold S.E., Müller O., Perlin M.H., Wösten H.A., de Vries R., Ruiz-Herrera J., Reynaga-Peña C.G., Snetselaar K., McCann M., Pérez-Martín J., Feldbrügge M., Basse C.W., Steinberg G., Ibeas J.I., Holloman W., Guzman P., Farman M., Stajich J.E., Sentandreu R., González-Prieto J.M., Kennell J.C., Molina L., Schirawski J., Mendoza-Mendoza A., Greilinger D., Münch K., Rössel N., Scherer M., Vranes M., Ladendorf O., Vincon V., Fuchs U., Sandrock B., Meng S., Ho E.C., Cahill M.J., Boyce K.J., Klose J., Klosterman S.J., Deelstra H.J., Ortiz-Castellanos L., Li W., Sanchez-Alonso P., Schreier P.H., Häuser-Hahn I., Vaupel M., Koopmann E., Friedrich G., Voss H., Schlüter T., Margolis J., Platt D., Swimmer C., Gnirke A., Chen F., Vysotskaia V., Mannhaupt G., Güldener U., Münsterkötter M., Haase D., Oesterheld M., Mewes H.W., Mauceli E.W., DeCaprio D., Wade C.M., Butler J., Young S., Jaffe D.B., Calvo S., Nusbaum C., Galagan J., Birren B.W., Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature*, 2006, 444, 97–101.
- Kang S., Lebrun M.H., Farrall L., Valent B., Gain of virulence caused by insertion of a Pot3 transposon in a *Magnaporthe grisea* avirulence gene. *Mol Plant Microbe Interact*, 2001, 14, 671–674.
- Kupferschmidt, K., Mycology. Attack of the clones. *Science*, 2012, 337, 636–638.
- Ma L.J., van der Does H.C., Borkovich K.A., Coleman J.J., Daboussi M.J., Di Pietro A., Dufresne M., Freitag M., Grabherr M., Henrissat B., Houterman P.M., Kang S., Shim W.B., Woloshuk C., Xie X., Xu J.R., Antoniw J., Baker S.E., Bluhm B.H., Breakspear A., Brown D.W., Butchko R.A., Chapman S., Coulson R., Coutinho P.M., Danchin E.G., Diener A., Gale L.R., Gardiner D.M., Goff S., Hammond-Kosack K.E., Hilburn K., Hua-Van A., Jonkers W., Kazan K., Kodira C.D., Koehrsen M., Kumar L., Lee Y.H., Li L., Manners J.M., Miranda-Saavedra D., Mukherjee M., Park G., Park J., Park S.Y., Proctor R.H., Regev A., Ruiz-Roldan M.C., Sain D., Sakthikumar S., Sykes S., Schwartz D.C., Turgeon B.G., Wapinski I., Yoder O., Young S., Zeng Q., Zhou S., Galagan J., Cuomo C.A., Kistler H.C., Rep M., Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature*, 2010, 464, 367–373.
- Machida M., Asai K., Sano M., Tanaka T., Kumagai T., Terai G., Kusumoto K., Arima T., Akita O., Kashiwagi Y., Abe K., Gomi K., Horiuchi H., Kitamoto K., Kobayashi T., Takeuchi M., Denning D.W., Galagan J.E., Nierman W.C., Yu J., Archer D.B., Bennett J.W., Bhatnagar D., Cleveland T.E., Fedorova N.D., Gotoh O., Horikawa H., Hosoyama A., Ichinomiya M., Igarashi R., Iwashita K., Juvvadi P.R., Kato M., Kato Y., Kin T., Kokubun A., Maeda H., Maeyama N., Maruyama J., Nagasaki H., Nakajima T., Oda K., Okada K., Paulsen I., Sakamoto K., Sawano T., Takahashi M., Takase K., Terabayashi Y., Wortman J.R., Yamada O., Yamagata Y., Anazawa H., Hata Y., Koide Y., Komori T., Koyama Y., Minetoki T., Suharnan S., Tanaka A., Isono K., Kuhara S., Ogasawara N., Kikuchi H., Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature*, 2005, 438, 1157–1161.
- Manning V.A., Pandelova I., Dhillon B., Wilhelm L.J., Goodwin S.B., Berlin A.M., Figueroa M., Freitag M., Hane J.K., Henrissat B., Holman W.H., Kodira C.D., Martin J., Oliver R.P., Robbertse B., Schackwitz W., Schwartz D.C., Spatafora J.W., Turgeon B.G., Yandava C., Young S., Zhou S., Zeng Q., Grigoriev I.V., Ma L.J., Ciuffetti L.M., Comparative genomics of a plant-pathogenic fungus, *Pyrenophora tritici-repentis*, reveals transduplication and the impact of repeat elements on pathogenicity and population divergence. *G3*, 2013, 3, 41–63.
- McDonald B.A., Linde C., Pathogen population genetics, evolutionary potential and durable resistance. *Annu Rev Phytopathol*, 2002, 40, 349–379.
- Mendes-Pereira E., Balesdent M.H., Brun H., Rouxel T., Molecular phylogeny of the *Leptosphaeria*

- maculans-L. *biglobosa* species complex. *Mycol Res*, 2003, 107, 1287–1304.
- Ohm R.A., Feau N., Henrissat B., Schoch C.L., Horwitz B.A., Barry K.W., Condon B.J., Copeland A.C., Dhillon B., Glaser F., Hesse C.N., Kosti I., LaButti K., Lindquist E.A., Lucas S., Salamov A.A., Bradshaw R.E., Ciuffetti L., Hamelin R.C., Kema G.H., Lawrence C., Scott J.A., Spatafora J.W., Turgeon B.G., de Wit P.J., Zhong S., Goodwin S.B., Grigoriev I.V., Diverse lifestyles and strategies of plant pathogenesis encoded in the genomes of eighteen Dothideomycetes fungi. *PLoS Pathog*, 2012, 8, e1003037.
- Olsen L.A., Choffnes E.R., Relman D.A., Pray L., Fungal diseases: an emerging threat to human, animal, and plant health: Workshop Summary. 2011, The National Academies Press, Washington DC, USA, http://www.nap.edu/catalog.php?record_id=13147.
- Orbach M.J., Farrall L., Sweigard J.A., Chumley F.G., Valent B. A telomeric avirulence gene determines efficacy for the rice blast resistance gene *Pi-ta*. *Plant Cell*, 2000, 12, 2019–2032.
- Parlange F., Daverdin G., Fudal I., Kuhn M.L., Balesdent M.H., Blaise F., Grezes-Besset B., Rouxel T., *Leptosphaeria maculans* avirulence gene *AvrLm4-7* confers a dual recognition specificity by the *Rlm4* and *Rlm7* resistance genes of oilseed rape, and circumvents Rlm4-mediated recognition through a single amino-acid change. *Mol Microbiol*, 2009, 71, 851–863.
- Pennisi, E., Armed and dangerous. *Science*, 2010, 327, 804–805.
- Raffaele S., Win J., Cano L.M., Kamoun S. Analyses of genome architecture and gene expression reveal novel candidate virulence factors in the secretome of *Phytophthora infestans*. *BMC Genomics*, 2010, 11, 637.
- Raffaele S., Kamoun S., Genome evolution in filamentous plant pathogens: why bigger can be better. *Nat Rev Microbiol*, 2012, 10, 417–430.
- Rebollo R., Horard B., Hubert B., Vieira C., Jumping genes and epigenetics: Towards new species. *Gene*, 2010, 454, 1–7.
- Rep M., Meijer M., Houterman P.M., van der Does H.C., Cornelissen B.J., A small, cysteine-rich protein secreted by *Fusarium oxysporum* during colonization of xylem vessels is required for I-3-mediated resistance in tomato. *Mol Microbiol*, 2004, 53, 1373–1383.
- Rouxel T., Balesdent M.H., The stem canker (blackleg) fungus, *Leptosphaeria maculans*, enters the genomic era. *Mol Plant Pathol*, 2005, 6, 225–241.
- Rouxel T., Penaud A., Pinochet X., Brun H., Gout L., Delourme R., Schmit J., Balesdent, M. H., A 10-year survey of populations of *Leptosphaeria maculans* in France indicates a rapid adaptation towards the *Rlm1* resistance gene of oilseed rape. *Eur J Plant Pathol*, 2003, 109, 871–881.
- Rouxel T., Grandaubert J., Hane J.K., Hoede C., van de Wouw A.P., Couloux A., Dominguez V., Anthouard V., Bally P., Bourras S., Cozijnsen A.J., Ciuffetti L.M., Degraeve A., Dilmaghani A., Duret L., Fudal I., Goodwin S.B., Gout L., Glaser N., Linglin J., Kema G.H., Lapalu N., Lawrence C.B., May K., Meyer M., Ollivier B., Poulain J., Schoch C.L., Simon A., Spatafora J.W., Stachowiak A., Turgeon B.G., Tyler B.M., Vincent D., Weissenbach J., Amselem J., Quesneville H., Oliver R.P., Wincker P., Balesdent M.H., Howlett B.J., Effector diversification within compartments of the *Leptosphaeria maculans* genome affected by Repeat-Induced Point Mutations. *Nat Commun* 2011, 2, 202.
- Schardl C.L., Young C.A., Hesse U., Amyotte S.G., Andreeva K., Calie P.J., Fleetwood D.J., Haws D.C., Moore N., Oeser B., Panaccione D.G., Schweri K.K., Voisey C.R., Farman M.L., Jaromczyk J.W., Roe B.A., O'Sullivan D.M., Scott B., Tudzynski P., An Z., Arnaoudova E.G., Bullock C.T., Charlton N.D., Chen L., Cox M., Dinkins R.D., Florea S., Glenn A.E., Gordon A., Güldener U., Harris D.R., Hollin W., Jaromczyk J., Johnson R.D., Khan A.K., Leistner E., Leuchtmann A., Li C., Liu J., Liu J., Liu M., Mace W., Machado C., Nagabhyru P., Pan J., Schmid J., Sugawara K., Steiner U., Takach J.E., Tanaka E., Webb J.S., Wilson E.V., Wiseman J.L., Yoshida R., Zeng Z., Plant-symbiotic fungi as chemical engineers: multi-genome analysis of the *Clavicipitaceae* reveals dynamics of alkaloid loci. *PLoS Genet*, 2013, 9, e1003323.
- Schirawski J., Mannhaupt G., Münch K., Brefort T., Schipper K., Doehlemann G., Di Stasio M., Rössel N., Mendoza-Mendoza A., Pester D., Müller O., Winterberg B., Meyer E., Ghareeb H., Wollenberg T., Münsterkötter M., Wong P., Walter M., Stukenbrock E., Güldener U., Kahmann R., Pathogenicity determinants in smut fungi revealed by genome comparison. *Science*, 2010, 330, 1546–1548.
- Shoemaker R.A., Brun H., The telemorph of the weakly aggressive segregate of *Leptosphaeria maculans*. *Can J Bot*, 2001, 79, 412–419.
- Silar P., La mycologie au début du 21^e siècle : crise et renouveau. *Biol Auj*, 2013, 207, n° 4.
- Spanu, P.D., The genomics of obligate (and nonobligate) biotrophs. *Annu Rev Phytopathol*, 2012, 50, 91–109.
- Spanu P.D., Abbott J.C., Amselem J., Burgis T.A., Soanes D.M., Stüber K., Ver Loren van Themaat E., Brown J.K., Butcher S.A., Gurr S.J., Lebrun M.H., Ridout C.J., Schulze-Lefert P., Talbot N.J., Ahmadinejad N., Ametz C., Barton G.R., Benjdia M., Bidzinski P., Bindschedler L.V., Both M., Brewer M.T., Cadle-Davidson L., Cadle-Davidson M.M., Collemare J., Cramer R., Frenkel O., Godfrey D., Harriman J., Hoede C., King B.C., Klages S., Kleemann J., Knoll D., Koti P.S., Kreplak J., López-Ruiz F.J., Lu X., Maekawa T., Mahanil S., Micali C., Milgroom M.G., Montana G., Noir S., O'Connell R.J., Oberhaensli S., Parlange F., Pedersen C., Quesneville H., Reinhardt R., Rott M., Sacristán S., Schmidt S.M., Schön M., Skamnioti P., Sommer H., Stephens A., Takahara H., Thordal-Christensen H., Vigouroux M., Wessling R., Wicker T., Panstruga R., Genome expansion and gene

- loss in powdery mildew fungi reveal tradeoffs in extreme parasitism. *Science*, 2010, 330, 1543–1546.
- Stergiopoulos I., De Kock M.J., Lindhout P., De Wit P.J., Allelic variation in the effector genes of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum* reveals different modes of adaptive evolution. *Mol Plant Microbe Interact*, 2007, 20, 1271–1283.
- Strange R.N., Scott P.R., Plant disease: a threat to global food security. *Annu Rev Phytopathol*, 2005, 43, 83–116.
- Stukenbrock E.H., McDonald B.A., The origins of plant pathogens in agro-ecosystems. *Annu Rev Phytopathol*, 2008, 46, 75–100.
- Stukenbrock E.H., Bataillon T., A population genomics perspective on the emergence and adaptation of new plant pathogens in agro-ecosystems. *PloS Pathog*, 2012, 8, e1002893.
- Syme R.A., Hane J.K., Friesen T.L., Oliver R.P., Resequencing and Comparative Genomics of *Stagonospora nodorum*: Sectional Gene Absence and Effector Discovery. *G3*, 2013, 3, 959–969.
- Vincenot L., Balesdent M.H., Li H., Barbetti M.J., Sivasithamparam K., Gout L., Rouxel T., Occurrence of a new subclade of *Leptosphaeria biglobosa* in Western Australia. *Phytopathology*, 2008, 98, 321–329.
- West J.S., Fitt B.D.L., Leech P.K., Biddulph J.E., Balesdent M.H., Huang Y.J., Effects of timing of *Leptosphaeria maculans* ascospore release and fungicide regime on phoma leaf spot and phoma stem canker development on winter oilseed rape *Brassica napus* in southern England. *Plant Pathol*, 2002, 51, 454–463.
- Zhou E., Jia Y., Singh P., Correll J.C., Lee F.N., Instability of the *Magnaporthe oryzae* avirulence gene *AVR-Pita* alters virulence. *Fungal Genet Biol*, 2007, 44, 1024–1034.
- Zolan, M.E., Chromosome-length polymorphism in fungi. *Microbiol Rev*, 1995, 59, 686–698.
- [1] http://www.thesundaytimes.co.uk/sto/news/uk_news/Environment/article1238345.ece
- [2] https://www.youtube.com/watch?v=HIII-_bL5c&list=UU_iFLW6c8oHkYuWnc8hzTqA
- [3] <http://news.bbc.co.uk/2/hi/programmes/newsnight/8912727.stm>
- [4] <http://www.miamiherald.com/2013/05/19/3405435/colombias-fight-against-coffee.html>
- [5] <http://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi/index.jsf>