THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'INSTITUT AGRO MONTPELLIER ET DE L'UNIVERSITE DE MONTPELLIER

En Mécanismes des Interactions parasitaires pathogènes et symbiotiques

École doctorale GAIA – Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre, Eau

Portée par
L'UMR PHIM (Plant Health Institute of Montpellier)

Etudes des bases génétiques de la fertilité mâle et femelle chez le champignon pathogène modèle *Pyricularia oryzae*

Présentée par Alexandre LASSAGNE

Le 23 mars 2023

Sous la direction de Didier THARREAU
et Elisabeth FOURNIERournier

Devant le jury composé de

M. Didier THARREAU, Cadre scientifique, CIRAD	Directeur de thèse
Mme Elisabeth FOURNIER, Directrice de recherche, INRA	Co-Directrice de thèse
Mme Isabelle FUDAL, Directrice de recherche, INRAE	Rapporteusre
M. Robert DEBUCHY, Directeur de recherche, CNRS	Rapporteur
Mme Tatiana GIRAUD, Directrice de recherche, CNRS	Examinatrice
M. Jean-Luc LEGRAS, Ingénieur de recherche, INRAE	Examinateur
M. Jean-Christophe SIMON, Directeur de recherche, INRAE	Examinateur
M. Didier THARREAU, Cadre scientifique, CIRAD	Directeur de thèse
Mme Elisabeth FOURNIER, Directrice de recherche, INRAE	Co-Directrice de thèse

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

L'INSTITUT agro Montpellier

Remerciements

Voilà la partie tant attendue par la plupart des gens qui vont lire ce manuscrit. Tout d'abord, la réalisation de ce manuscrit et plus globalement de ces trois années de travail n'a été possible que grâce à la présence de chaque personne citée ci-après. J'espère qu'elles prendront beaucoup de plaisir à lire ce manuscrit.

Je souhaite commencer par remercier **Didier Tharreau** et **Elisabeth Fournier**, mes deux encadrants. Toutes les phrases que je pourrai écrire ne seront pas suffisante pour vous adresser toute ma gratitude. Je vous remercie de m'avoir donné l'opportunité d'accomplir ce travail avec vous et de m'avoir accordé votre confiance. J'ai pris énormément de plaisir à échanger avec vous que ce soit sur des sujets scientifiques ou sur des discussions plus personnelles. Vous avez toujours été disponible pour moi et répondu à mes questionnements dans une humilité qui ne cessera de me surprendre. Vous êtes pour moi des modèles à suivre pour ma future carrière.

Je remercie **Isabelle Fudal** et **Robert Debuchy** d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit. Je remercie également **Tatiana Giraud**, **Jean-Luc Legras** et **Jean-Christophe Simon** d'avoir acceptés d'être examinateur de ce travail de thèse. Je vous souhaite à tous beaucoup de plaisir à lire ce manuscrit autant que j'ai éprouvé de plaisir à l'écrire.

Un grand merci aux membres de mon comité de thèse pour leur temps et pour leurs précieux conseils : **Jean-Benoît Morel** pour sa rigueur scientifique, **Claire Neema**, **Cyril Dutech**, **Thomas Kroj**, **Marie Foulongne-Oriol** pour nos échanges sur la GWAS ainsi que **Delphine Sicard** pour sa bienveillance.

Je veux plus particulièrement remercier **Fabienne Malagnac** qui s'est énormément investi dans ce projet. Merci pour tous ses échanges qu'on a eus et ses belles collaborations. Merci également pour ta gentillesse et ta bienveillance. De la même manière, je remercie **Sylvain Brun** qui m'a accueilli à Paris à deux reprises et avec qui j'ai beaucoup appris sur la microscopie et la biologie de la reproduction des Ascomycètes. Vous êtes pour moi des amis précieux et je n'oublierai jamais notre séjour passé ensemble à San Francisco.

Viens le moment pour moi de remercier **Henri Adreit**. Chef ! Je ne sais pas vraiment par où commencer. Cette thèse, c'est aussi un peu la tienne finalement. Ton aide au labo m'aura été précieuse mais tu es surtout une belle rencontre. J'ai énormément de souvenirs agréables avec toi et l'encre me manquerait pour tous les écrire. J'ai adoré faire le jardin avec toi et partager tous ces moments conviviaux. J'espère qu'ils seront encore nombreux !

Je remercie également mes mamans du labo, **maman Christine** et **Mama Soso** ainsi que **Fafa** (qui, aparté faite, a le plus beau des petits anges) et **Véro** qui ont été pour moi un nuage de douceur durant ces trois années de thèse. J'ai partagé avec vous mes joies et mes peines et vous avez su m'apporter réconfort avec café et chocolats. Un grand merci à **Geneviève** pour son aide sur les tâches administratives. Merci d'avoir toujours été disponible pour régler tous mes petits (et plus gros) problèmes administratifs. Merci à **Joëlle** qui a pris le temps de me former à la mycologie et qui maitrise mieux que personne le prélèvement des ascospores. Merci aussi à **Nadia** pour sa bonne humeur. Tu m'auras beaucoup fait rire.

J’exprime toute ma gratitude à **Florian Chariat** qui a eu la patience pour m’aider en bio-info. Tu es très pédagogue et j’ai énormément progressé grâce à toi. Tu m’auras bien sauvé. Merci !

Plus généralement, je souhaite remercier tous mes autres collègues de l’équipe BLAST/FBI. Merci à **Pierre Gladieux** pour avoir animé le Journal Club. Tu es un puit de connaissances scientifiques intarissable. Merci à **Sébastien Ravel** d’avoir conçu tous ses pipelines bio-info. Merci à **Jean Carlier** pour son aide sur le séquençage en pool et **Emmanuel Wicker** pour ses découvertes musicales. Un grand merci à **Stéphane de Mita**, le magicien des scripts pythons préparés aux petits oignons. Merci à **Michel Ducamp**, malgré le fait qu’il soit Béglais et qu’il supporte l’UBB. J’attends la proposition d’embauche au moment de ton départ en retraite. Je n’oublie pas non plus notre belge national **Nicolas**. Ravi que tu saches enfin ce qu’est le soleil.

J’adresse tous mes remerciements à mes camardes du bureau avec qui j’ai partagé tous les moments de la vie d’un thésard. A commencer par **Pascal**, merci pour ses discussions fortes intéressantes et de m’avoir partagé ta passion pour le monde marin qui m’était bien inconnu. Merci à **Hilaire** pour ta gentillesse et pour tous ses moments agréables en ta compagnie. Promis je boirai une canette à ta santé. Enfin je remercie **Oumaima** et **Mathilde**, inséparables. D’avoir partagé ce bureau avec vous a été un réel bonheur.

Merci à **Rémy** aussi appelé Rémos pour toutes les douceurs gustatives apportées pour son anniversaire chaque mois. Je ne sais pas quel âge tu as mais j’en suis arrivé à la conclusion que tu devais vieillir drôlement plus vite que les autres pour que ton anniversaire revienne si souvent. Je remercie également son binôme **Axel** aussi nommé « homme solide » par quiconque l’aura vu soulever un sac de terreau. Et enfin le trinôme **Romain**, avec qui j’ai eu plaisir à échanger le matin très très tôt autour de 9h quand j’arrivais par l’entrée côté serre.

Je remercie **Michel Amphoux** et **Agnès Delauney** qui ont grandement participé à mon épanouissement à Montpellier. Merci Agnès pour ses rando où la récompense d’une bonne brioche ou d’un gâteau me poussait à marcher plus vite. Merci Michel pour les sorties vélo ne devant pas dépasser les 50km et où je finissais épuisé. Merci également pour les régat’Apéro même si tu n’as pas été un compétiteur dur à battre et j’espère que l’année prochaine tu seras mieux entrainé. Merci également pour tous ces apéros avec **Modération**.

Il est temps de remercier toutes les personnes qui sont devenues, au cours de ces trois ans, des amis et avec qui j’ai eu plaisir à partager du temps. Il y a les anciens thésards : **Rémi** et **Thomas**. D’abord merci pour votre aide, c’est aussi grâce à vous que j’ai fait ces GWAS. Merci **Rémi** pour ces parties de ping pong endiablées avec tes bras beaucoup trop long. Tu gères les références de beauf comme personne. Merci Thomas d’être fidèle à toi-même, tu brasses la meilleure bière de Montpellier. Merci aux thésards qui ont commencé en même temps que moi et autres personnes avec qui j’ai grandi pendant ces trois ans. **Marie** qui aime les frites plus que de raison, pour tous ces moments passés en ta compagnie. **Mélia** la sportive, pour les randos et ta gentillesse. **Margaux** la parigo pour les soirées qu’on a faites et les macdo de samedi de rédaction. **Babil** le plus habile, tu m’auras bien fait rire dans les débats enflammés. **Céline** dit Zélin malin, parce qu’on a vu Marnik ensemble et pour avoir supporté toutes mes blagues. **Marie B** dit brevette, pour ton humour. **Guillaume**, fin stratège du jeu « Talk ». Merci à **Lucas Bonomononineti** (à peu près) pour son organisation du volley au top. Merci à **Laura** qui va faire une thèse incroyable j’en suis sûr. Un très grand merci à **Andy** et **Prune**. J’ai adoré passer du temps avec vous. **Andy** désolé pour le surnom que je t’ai donné et qui te suit… **Prune**, tu es un joli fruit. Merci à **Nutt**, **Sarah**, **Noun**, **Nathalia** et **Julie** pour votre bonne humeur.

Julita, eres un gran encuentro. Gracias por estas tardes en TB. Un grand merci aux stagiaires qui sont passé par le labo en commençant par **Constance**. Ton encadrement fût une bonne expérience pour moi. Merci à **Pauline** et **Inès**. Je ne remercie pas **Malo** (à sa demande).

De manière plus générale, j'adresse mes remerciements à tous les membres de l'unité PHIM pour leur accueil et leur aide pour ne citer que certains : **Laurence Blondin** et **Charlotte Julian, Isabelle** et **Véronique**, **Martine**, **Serge**... J'ai cependant une pensée pour chaque personne non-citée.

Un immense merci à **Valentin**. Merci d'avoir été là dans les moments compliqués mais aussi dans les bons moments. Tu es la première personne qui m'a invité pour une soirée à Montpellier et plus de trois ans après, tu es devenu la famille. Et n'oublie pas à deux on a bu beaucoup de bière mais à Troyes on boira du champagne. La bise à **Cindy**.

Et pour finir je remercie mon meilleur ami **Val** pour son soutien. Mes plus sincères remerciements à **Hannah** qui m'a aidé lorsque j'ai postulé à la thèse. **Hannah**, tu as toujours été là et tu le seras toujours. Enfin merci à ma famille : **Maman** et **Papa** d'avoir pensé à me concevoir, mes **frères** et mes **sœurs** et comme dirait la chanson c'est ça le vrai bonheur.

Table des matières

Table des figures et des tableaux 3
Introduction générale 5
1. Systèmes de reproduction 8
1.1. Définition reproduction sexuée/asexuée et type de reproduction 8
1.2. Conséquences évolutives des systèmes de reproduction 9
2. Système de compatibilité 11
2.1. Définitions et concept 11
2.2. Fonctions et régulations des gènes au locus MAT 13
3. Cycle de reproduction sexuée chez les Ascomycètes 16
3.1. Gamètes et structures sexuelles 16
3.1.1. Gamètes mâles 17
3.1.2. Gamètes femelles 17
3.2. Initiation du cycle de reproduction 18
3.3. Plasmogamie 19
3.4. Formation de l'ascocarpe (périthèce) et réalisation de la méiose générant les ascospores 19
3.5. Régulation génétique de la reproduction sexuée 21
3.5.1. Gènes impliqués dans la formation des gamètes 21
3.5.2 Gènes impliqués dans la formation du périthèce 23
4. *Pyricularia oryzae* 25
4.1. Importance de la maladie, la pyriculariose 25
4.2. Structure des populations et modes de reproduction au sein de la lignée pathogène du riz 26
4.3. Biologie et génétique de la reproduction sexuée chez *P. oryzae* 27
5. Objectifs de la thèse 30
Chapitre 1 : 33
1. Présentation générale 34
2. Article : Male fertility in *Pyricularia oryzae*: Microconidia are spermatia 34
3. Conclusion et perspectives 46
Chapitre 2 : 48
1. Présentation générale 49
2. Article : Identification of genetic bases of male fertility in *Pyricularia oryzae* by Genome Wide Association Study 50
3. Conclusion et perspectives 80
Chapitre 3 : 82

1. Présentation générale 83
2. Article : Combining two complementary forward genetic approaches to decipher the genomic bases of female fertility in *Pyricularia oryzae* 85
3. Résultats complémentaires : Analyse QTL 118
3.1 Materials 118
3.2. QTL analyses 119
3.2.1 Simple Interval Mapping (SIM) 119
3.2.2. Composite Interval Mapping (CIM) 121
3.2.3. Congruence with the regions found with BSA 121
3.3. Cited reference: 122
4. Conclusion et perspectives 123
Discussion générale 126
1. Apports de la thèse sur la compréhension des mécanismes de la reproduction sexuée chez *P. oryzae* 127
1.1. Identification des spermaties et quantification de la fertilité mâle 127
1.2. Phénotypage de la fertilité femelle 128
1.3 Perspectives sur l'observation de la rencontre des gamètes chez *P. oryzae* 131
2. Apports de la thèse sur les gènes impliqués dans la reproduction sexuée chez *P. oryzae* 132
2.1. Régions génomiques contrôlant la fertilité mâle et femelle identifiées par les différentes approches 135
2.2. Fonctions des gènes candidats et processus biologiques 135
2.2.1 Gènes candidats considérés comme prioritaires 136
2.2.2 Autres fonctions et processus biologiques fréquemment retrouvés dans les régions identifiées 139
2.2.3. Pléiotropie des gènes impliqués dans la reproduction sexuée 142
2.3. Stratégie de validation des gènes candidats et de découverte de nouveaux gènes 144
3. Hypothèses sur l'absence d'observation de la reproduction sexuée au champ 145
Conclusion générale 148
Bibliographie de l'Introduction et de la Conclusion générale 150
Annexes 163
Annexe 1 : Scripts informatiques utilisés pour l'analyse GWAS 164
Annexe 2 : Protocole de production des microconidies 167
Annexe 3 : Séquences des gènes candidats sur le scaffold 10 de GUY11 168
Résumé 172
Abstract 173

Table des figures et des tableaux

Figure 1 : Schéma des différents modes de reproduction sexuée chez les champignons. 9

Figure 2 : Système de comptabilité sexuelle chez les champignons filamenteux. 12

Figure 3 : Loci impliqués dans le système de compatibilité chez les Ascomycètes. 13

Tableau 1 : Equivalence des gènes impliqués dans le système de compatibilité chez plusieurs Ascomycètes. 15

Figure 4 : Cycle de la reproduction sexuée chez les Ascomycètes. 18

Figure 5 : Formation des ascospores chez les Ascomycètes. 21

Figure 6 : Exemple de croisement en condition contrôlée entre des souches de MAT opposés. 28

Figure 7. Information on the QTL data..... 119

Figure 8. Manhattan plot of the local score for the SIM model. 120

Figure 9. Manhattan plot of the local score for the SIM model in blue and the CIM model in green. 121

Figure 10 : Cartographie des gènes identifiés dans la littérature pour leur implication dans la reproduction sexuée chez *P. oryzae*, et des régions identifiées au cours de cette thèse par différentes approches de génétique d'association. 133

Tableau 2 : Correspondance et positions génomiques chez *P. oryzae* des gènes impliqués dans la reproduction sexuée chez les Ascomycètes 134

Introduction générale

En 1959, Robert Harding Whittaker classe les champignons, auparavant apparentés aux végétaux, dans un règne à part entière nommé Fungi (Whittaker, 1959). Le règne fongique est aujourd'hui composé de 2,2 à 3,8 millions d'espèces distinctes, dont deux phylums largement connus : les Basidiomycètes et les Ascomycètes. Les Basidiomycètes sont notamment connus pour leur aspect culinaire avec un commerce global s'élevant à 35 Milliards de dollars en 2015 (Heitman et al., 2018). Parmi les Ascomycètes, certaines espèces ont été domestiquées pour la transformation alimentaire (cf *Saccharomyces spp*) ou sont utilisées dans l'industrie. Beaucoup d'espèces appartenant à ce phylum sont également des pathogènes d'animaux ou de plantes. Ces champignons phytopathogènes représentent une menace majeure pour la sécurité alimentaire (Fisher et al., 2012). Afin de mieux contrôler les épidémies fongiques, il est important de comprendre la biologie et le cycle de vie des champignons phytopathogènes.

Un trait majeur du cycle de vie des champignons phytopathogènes est la reproduction. Au cours de mon projet de thèse, j'ai exploré comment un champignon phytopathogène Ascomycète d'intérêt agronomique majeur, *Pyricularia oryzae*, se reproduit. Plus précisément, je me suis intéressé aux traits de fertilité mâle et femelle chez cette espèce. Dans l'introduction du manuscrit, je présenterai d'abord de façon générale les différents systèmes de reproduction des organismes. Puis, j'exposerai les spécificités du système de reproduction sexué inféodé aux Ascomycètes : j'introduirai d'abord la notion de système de compatibilité et décrirai les bases génétiques régissant ce système ; puis je détaillerai le cycle de reproduction sexué des Ascomycètes filamenteux, et proposerai un état de l'art des bases génétiques contrôlant les principales étapes de ce cycle. Dans une dernière partie, je présenterai le modèle biologique étudié dans cette thèse : le champignon phytopathogène Ascomycète *Pyricularia oryzae*.

1. Systèmes de reproduction

1.1. Définition reproduction sexuée/asexuée et type de reproduction

Avant de rentrer dans les détails sur la reproduction chez les champignons Ascomycètes, il est important de définir ce que sont la reproduction sexuée et la reproduction asexuée. Dans la thèse, nous définirons la **reproduction sexuée** comme la production d'une descendance viable et fertile par recombinaison. C'est un processus qui est conservé chez les Eucaryotes (Goodenough et Heitman, 2014; Heitman, 2015). Cette définition n'exclut pas l'autofécondation qui peut induire une structure de population clonale. Elle implique la **succession de phases haploïdes et diploïdes** et repose sur des échanges de matériel génétique assuré par les gamètes. Le passage d'un stade diploïde à un stade haploïde, ou **réduction chromosomique**, est accompli par la méiose durant laquelle la recombinaison et la ségrégation chromosomique ont lieu. La **syngamie** quant à elle, est l'étape de fusion des gamètes qui conduit à la diploïdisation (Billiard et al., 2012; Ni et al., 2011; Zeyl, 2009). La réduction chromosomique et la syngamie sont cruciales à la définition de la reproduction sexuée mais leur ordre d'enchainement dépend de la ploïdie de l'organisme (Figure 1). Le **gamète** est défini, chez les Eucaryotes, comme une cellule reproductrice généralement haploïde qui va fusionner avec un autre gamète complémentaire pour former un zygote. Cependant, les gamètes ne sont pas toujours des structures spécialisées ou simples à identifier, notamment dans le règne fongique (*e.g.* la reproduction des levures).

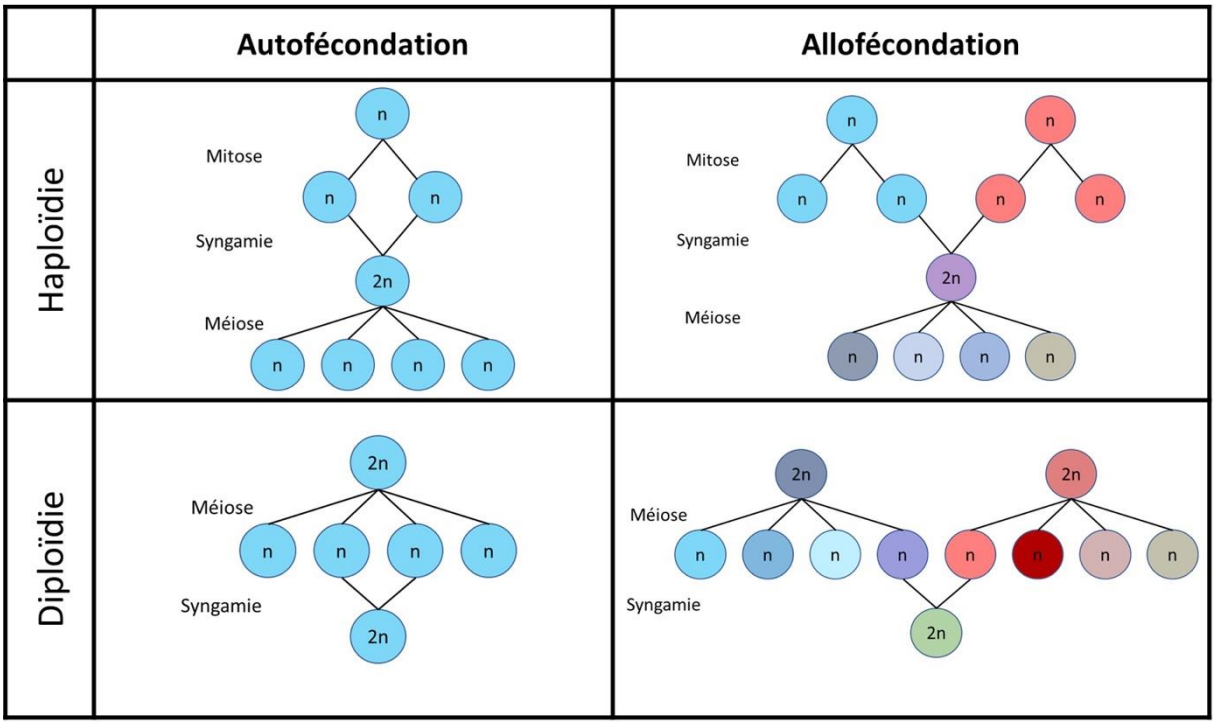


Figure 1 : Schéma des différents modes de reproduction sexuée chez les champignons. D'après Billard et al. (2012).

La **reproduction asexuée** (reproduction végétative ou agamétique) se déroule sans aucune implication de gamètes. Ce mode de reproduction conduit un individu à produire un nouvel individu génétiquement identique à lui-même à tous les loci du génome, à l'exception des sites de l'ADN ayant subi des mutations somatiques (de Meeûs et al., 2007). La reproduction sexuée génère donc des populations clonales.

1.2. Conséquences évolutives des systèmes de reproduction

Le système de reproduction d'un organisme conditionne l'émergence de variants par réarrangements alléliques dans une population, variants sur lesquels d'autres forces évolutives, notamment la sélection, vont ensuite agir. Seulement 1% des Angiospermes (Whitton et al., 2008) et 0,1% du règne animal (Vrijenhoek, 1998) ont une reproduction *a priori* totalement

asexuée (pas de forme sexuée connue). Suivant ce mode de reproduction, qui, comme mentionné précédemment, induit de la clonalité, un génotype adapté aux conditions actuelles de l'environnement va diffuser très rapidement, ce qui lui confère un avantage si l'environnement est, et reste, homogène. La reproduction asexuée a néanmoins l'inconvénient de ne pas permettre la purge des mutations délétères, qui s'accumulent donc dans les génomes des organismes à reproduction asexuée stricte. Au contraire la reproduction sexuée, via la recombinaison, va conduire à la création de nouvelles combinaisons d'allèles à différents loci, donc de nouveaux génotypes, ce qui peut conférer un avantage dans un environnement hétérogène (de Meeûs et al., 2007; Stukenbrock et McDonald, 2008). Elle a également l'avantage de contrer l'accumulation de mutations délétères (Bruggeman et al., 2003). Néanmoins, la reproduction sexuée nécessite d'une part d'entrer en contact avec un partenaire compatible (sauf dans les cas de la parthénogénèse et de l'autofécondation), et d'autre part d'allouer des ressources importantes à la production d'une descendance ne possédant que 50% du patrimoine génétique d'un parent : ce désavantage est appelé le « double coût » (two-fold cost) du sexe (Meirmans et al., 2012). Du fait de ce coût, le maintien de la reproduction sexuée observé chez la plupart des organismes représente une énigme évolutive. Une hypothèse pour expliquer ce paradoxe est la nécessité de générer en permanence à court terme de nouveaux génotypes afin de s'adapter aux parasites, qui représentent un environnement biotique constamment changeant (hypothèse de la Reine Rouge ; Van Valen, 1973). Cependant, il n'y a pas de consensus sur cette hypothèse. Une autre hypothèse complémentaire est la sélection à long terme à l'échelle de l'espèce de la reproduction sexuée. Cette seconde hypothèse s'appuie sur la sélection de processus liés à la reproduction sexuée autres que la recombinaison et qui confèrent un avantage à l'espèce (forme de survie, de dispersion ; de Vienne et al., 2013).

Bien que la reproduction sexuée soit obligatoire chez certaines espèces fongiques comme *Cryptococcus dapauperatus* (Passer et al., 2022), la plupart des espèces fongiques

associent des modes de reproduction sexuée et asexuée. L'existence d'espèces fongiques totalement clonales est encore débattue (Taylor et al., 1999, 2015), car l'asexualité complète représente un cul-de-sac évolutif (Judson et Normark, 1996). Certains mécanismes alternatifs à la recombinaison peuvent engendrer de la diversité génotypique, comme la recombinaison mitotique qui peut avoir lieu lors d'anastomoses (c'est à dire la fusion de mycélium) entre thalles végétatifs, mais leur existence dans les populations naturelles n'a été que très rarement rapportée (Taylor et al., 1999; Zeigler et al., 1997).

Il existe une très grande diversité de systèmes de reproduction sexuée au sein du règne des champignons, allant de l'autofécondation haploïde ou diploïde jusqu'aux croisements entre individus régis par des systèmes de compatibilité (Billiard et al., 2012).

2. Système de compatibilité

2.1. Définitions et concept

Chez les champignons, indépendamment de la capacité de former des cellules sexuées ou gamètes, la possibilité de croisement entre deux individus, qu'ils soient différents ou identiques, est régie par le système de compatibilité de fécondation MAT pour « mating type » (Coppin et al., 1997). Ce mécanisme est contrôlé génétiquement par un ou des loci de compatibilité sexuelle, appelés loci MAT, et met en jeu des gènes qui codent pour un système de reconnaissance phéromones/récepteurs. Il existe trois types de compatibilité : l'homothallisme, l'hétérothallisme et le pseudo-homothallisme (Figure2).

Chez les espèces homothalliques, chaque individu est capable de se reproduire avec tous les individus de l'espèce y compris avec lui-même (autofécondation). Chez ces espèces, l'ensemble des gènes codés par les loci MAT sont présents dans un même individu (i.e. un même thalle ; Dyer et al., 2016).

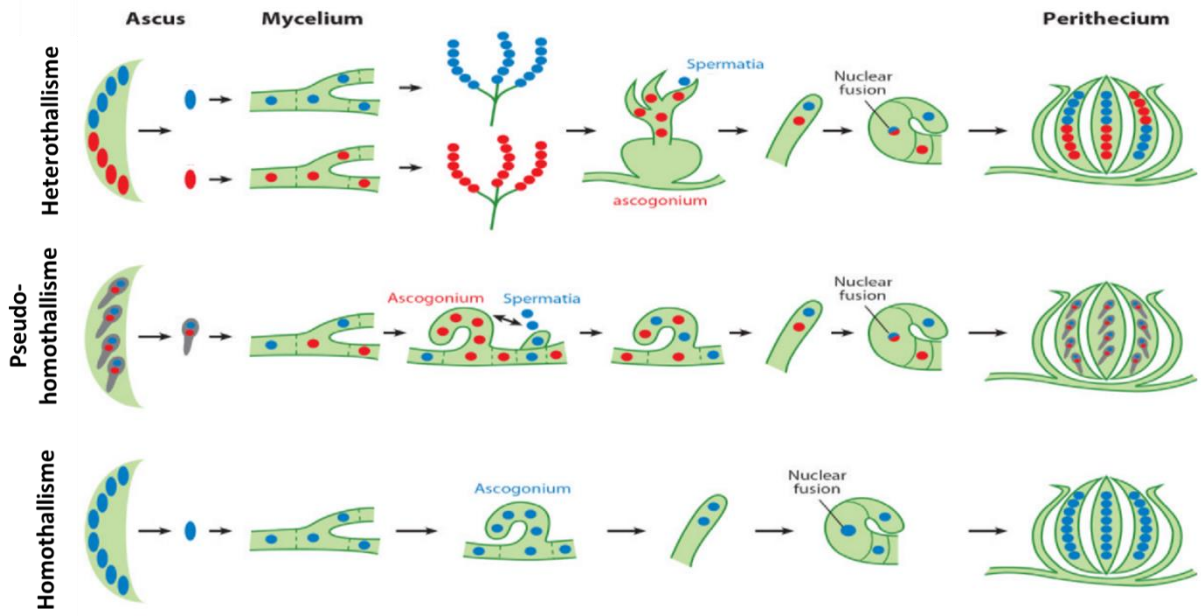


Figure 2 : Système de comptabilité sexuelle chez les champignons filamenteux. D'après Ni et al. (2011).

Chez les espèces hétérothalliques, pour que la reconnaissance nécessaire à la reproduction puisse avoir lieu, il faut que deux thalles de signes de compatibilité sexuelle opposés se rencontrent. Les gènes impliqués dans le système de reconnaissance sont localisés au locus MAT présents dans les génomes de thalles différents. Dans ce cas, le locus MAT présente des idiomorphes alternatifs situés à la même position génomique qui codent pour les différentes protéines du système de reconnaissance phéromones/récepteurs. Dans une grande majorité des cas, les espèces hétérothalliques présentent un système bipolaire et les deux idiomorphes sont nommés MAT1-1 et MAT1-2, mat A et mat a (*N. crassa ;* Metzenberg et

Glass, 1990), mat+ et mat- (*P. anserina* ; Turgeon et Yoder, 2000) ou encore a et α chez les levures. Les espèces hétérothalliques ne peuvent pas avoir recours à l'autofécondation.

Le pseudo-homothallisme concerne les espèces avec des cellules hétérocaryotiques (e.g. chez *P. anserina*). Elle permet l'autofécondation d'individus possédant des noyaux contenants chacun un seul idiomorphe. Ces autofécondations sont rendues possibles par l'existence des deux idiomorphes dans des noyaux différents au sein du thalle (Ni et al., 2011).

2.2. Fonctions et régulations des gènes au locus MAT

La plupart des Ascomycètes possèdent des gènes codant un **facteur de transcription** contenant un domaine de **type α** sur l'idiomorphe de type MAT1-1 (codé par le gène *MAT1-1-1*) et un facteur de transcription contenant un domaine de type MATA-HMG ou simplement appelé de **type a** sur l'idiomorphe MAT1-2 (codé par le gène *MAT1-2-1* ; Figure 3). Ces facteurs de transcription appartiennent à la superfamille des HMG-box, sont très conservés entre les espèces et les deux idiomorphes dériveraient d'un même gène ancestral (Martin et al., 2010). Chez *Saccharomyces cerevisiae*, il n'y a pas d'évidence de facteurs contrôlant les loci

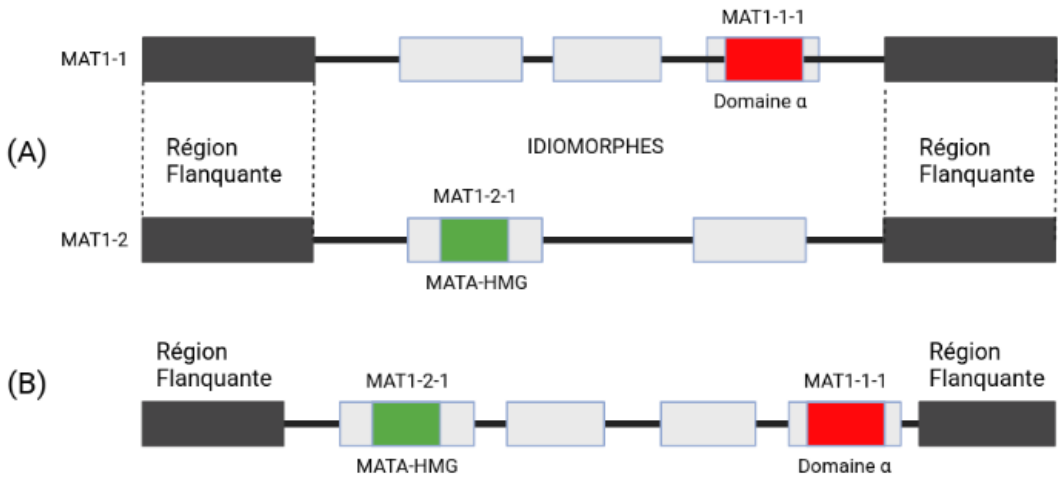


Figure 3 : Loci impliqués dans le système de compatibilité chez les Ascomycètes. (A) pour les espèces hétérothalliques et (B) pour les espèces homothalliques

MAT qui semblent avoir une expression constitutive. Cependant, chez *Podospora anserina*, les loci MAT sont contrôlés par *STE11*, qui est un facteur de transcription à domaine HMG (Dyer et al., 2016).Les facteurs de transcription du locus MAT régulent la formation **des phéromones** qui vont être excrétées de la cellule ainsi que la production des **récepteurs membranaires**. Les cibles des facteurs vont prendre par extension la dénomination du type de facteur (**α ou a**). Chez *S. macrospora*, les gènes qui codent pour les phéromones sont *ppg1* pour les phéromones de type α et *ppg2* pour les phéromones de type a (Mayrhofer et al., 2006; Pöggeler, 2000; Pöggeler et Kück, 2001). Ces gènes codant pour deux types de phéromones sont également présents chez les Ascomycètes hétérothalliques tels que *N. crassa* ou *P. anserina* (Bobrowicz et al., 2002; Coppin et al., 2005). Différents gènes vont participer à la maturation des phéromones. Les phéromones vont venir se fixer à un récepteur membranaire couplé à une protéine G (GPCR) contenant sept domaines transmembranaires permettant la liaison de la phéromone du type MAT opposé (voir revue Jones et Bennett, 2011). Cette liaison va entrainer la transformation de GDP en GTP au niveau la sous-unité α de la protéine G et ainsi libérer un dimère constitué des sous-unités β et γ (Koelle, 2006). La libération du dimère déclenche une cascade de signalisation sous le contrôle d'une Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK), qui va activer un gène codant pour un facteur de transcription contrôlant l'expression des gènes impliqués dans la croissance du trichogyne et sa fusion avec la spermatie (Kim et Borkovich, 2004; voir section 3.1). Le gène codant pour le récepteur de type α aux phéromones de type a est *pre2* et le récepteur de type a aux phéromones de type α est codé par le gène *pre1* chez *N. crassa* (Pöggeler et Kück, 2001). Les gènes homologues respectifs de ces gènes sont *STE3* et *STE2* chez *S. cerevisiae* et *pre2* et *pre1* chez *S. macrospora* (Tableau 1).

Tableau 1 : Equivalence des gènes impliqués dans le système de compatibilité chez plusieurs Ascomycètes. Ce tableau présente les gènes présents aux loci MAT, le gène codant pour la phéromone et le récepteur associé au locus MAT. D'après Wilson et al. (2019)

Espèce	Type sexuel	Séquence MAT1-1 (α)			Séquence MAT1-2 (a)		
		Gènes	Phéromone α	Récepteur a	Gènes	Phéromone a	Récepteur α
Aspergillus nidulans	Homothallique	*MAT1-1*	*ppgA*	*preA*	*MAT2-1*	-	*preB*
Fusarium graminearum	Homothallique	*MAT1-1-1* *MAT1-1-2* *MAT1-1-3*	*ppg1*	*pre1*	*MAT1-2-1*	*ppg2*	*Pre2*
Neurospora crassa	Hétérothallique	*matA-1* *matA-2* *matA-3*	*ccg4*	*pre1*	*mata-1* *mata-2*	*mfa-1*	*pre2*
Podospora anserina	Pseudo-homothallique	*FMR1* *SMR1* *SMR2*	*mfm*	*pre1*	*FPR1*	*mfp*	*pre2*
Pyricularia oryzae[1]	Hétérothallique	*MAT1-1-1* *MAT1-1-2* *MAT1-1-3*	*MF1-2*	*ste2-like*	*MAT1-2-1* *MAT1-2-2*	*MF1-1*	*ste3-like*
Sordaria macrospora	Homothallique	*SmtA-1* *SmtA-2* *SmtA-3*	*ppg1*	*pre1*	*Smta-1*	*ppg2*	*pre2*

1 : A noter que pour des raisons historiques, la nomenclature des MAT chez *P. oryzae* est inversée par rapport au standard adopté pour les champignons et inversée par rapport à la dénomination préconisée par Kanamori *et al.* (2007). Donc, les souches MAT1-1 portent en réalité les loci codant pour un facteur de transcription a et les souches MAT1-2 pour un facteur de transcription α

3. Cycle de reproduction sexuée chez les Ascomycètes

Le cycle de reproduction sexuée chez les Ascomycètes est un processus complexe incluant la formation de structures spécialisées à différents moments du cycle. Ici nous nous focaliserons sur la description du cycle pour les espèces haploïdes, puisqu'il s'agit de la ploïdie la plus présente chez les Ascomycètes et que c'est également la ploïdie de notre organisme modèle. Nous avons également fait le choix de ne présenter que le cycle d'espèces filamenteuses, car la reproduction sexuée des levures, qui sont des unicellulaires, est notablement différente. Au sein des Ascomycètes haploïdes filamenteux, les mécanismes et le contrôle génétique de la reconnaissance intra-spécifique entre thalles (voir section 2 ci-dessus) et les structures cellulaires impliquées dans la reproduction sexuée, peuvent varier en fonction de l'espèce.

3.1. Gamètes et structures sexuelles

Chez les champignons la notion de fertilité mâle inclut la capacité de l'organisme à produire des gamètes mâles mais aussi le pouvoir fécondant de ces gamètes mâles. De la même manière, la fertilité femelle inclut la capacité de produire des gamètes femelles et leur pouvoir fécondant, mais est souvent assimilé à la capacité à produire une descendance (voir section 3.4.).

3.1.1. Gamètes mâles

Les gamètes mâles, aussi appelés spermaties, ont des structures très différentes chez les Ascomycètes. Dans certains cas, les éléments fécondants mâles peuvent être des structures non spécialisées dans la reproduction sexuée. Par exemple, chez *Podospora anserina* les fragments mycéliens peuvent assurer le rôle de spermaties (Bouhouche et al., 2004). Mais plus communément, les gamètes mâles sont des cellules spécialisées souvent nommées microconidies (Fukumori et al., 2004), ou des hyphes spécialisés appelées anthéridies dont l'unique fonction connue est de féconder le gamète femelle. Les gamètes mâles ont été décrits chez plusieurs espèces d'Ascomycètes mais peu d'études traitent des conditions nécessaires à leur formation. Chez *Neurospora crassa*, l'humidité, la température et la quantité de nutriments sont des facteurs importants influençant la production de gamètes mâles (Maheshwari, 1999; Rossier et al., 1977).

3.1.2. Gamètes femelles

Chez les Ascomycètes filamenteux, le gamète femelle est une structure multinucléée appelée ascogone (Dodge, 1935). L'ascogone se trouve le long des hyphes végétatifs et se présente sous la forme d'une cellule unique qui s'enroule sur elle-même. La littérature est unanime sur la structure de l'ascogone (Coppin et al., 1997). De la même manière que pour les gamètes mâles, les conditions nécessaires à la formation des ascogones ont très peu été étudiées. En effet, les études se concentrent essentiellement sur les étapes suivantes du cycle de reproduction sexuée (Debuchy et al., 2010).

3.2. Initiation du cycle de reproduction

Le cycle de reproduction sexuée commence par la rencontre des gamètes. L'ascogone va produire un hyphe spécialisé appelé trichogyne. Ce trichogyne va se développer en direction des spermaties. Ces dernières produisent en effet des phéromones attirant le trichogyne qui va jouer le rôle de réceptacle du noyau de la spermatie par fusion cellulaire (ou plasmogamie ; Bistis, 1996), et c'est ce chimiotropisme hormonal qui est régi par les gènes du système de compatibilité MAT (voir section 2.2). Une fois que la fusion cellulaire de la spermatie avec le trichogyne est effectuée, des hyphes protecteurs vont venir envelopper l'ascogone pour former l'ascocarpe (Figure 4).

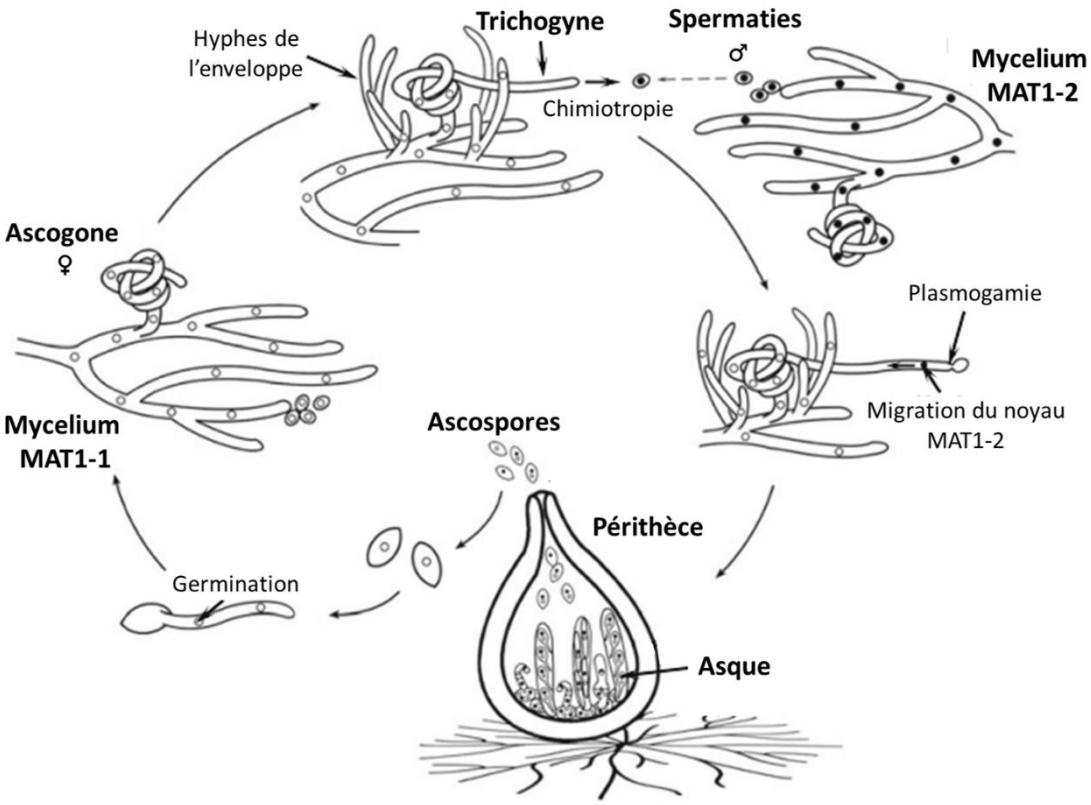


Figure 4 : Cycle de la reproduction sexuée chez les Ascomycètes. D'après Peraza-Reyes et Malagnac (2016).

3.3. Plasmogamie

La plasmogamie est une étape clé intervenant après l'adhésion des gamètes l'une à l'autre, et est nécessaire au transfert du noyau de la spermatie vers l'organe reproducteur femelle. En effet, cette étape met en jeu deux processus importants : le réarrangement et la fusion des parois cellulaires ainsi que la fusion des membranes plasmiques (Peraza-Reyes et Malagnac, 2016). Le réarrangement des parois cellulaires nécessite l'intervention d'enzymes transitant par des vésicules de sécrétions. Le relargage des enzymes est dépendant du système de compatibilité MAT mais pas leur production (Gammie et al., 1998; Grote, 2010). La fusion des membranes qui suit nécessite également l'expression de différents gènes codants pour des protéines membranaires (Heiman et Walter, 2000; Palma-Guerrero et al., 2014) ou encore des protéines régulatrices du système d'influx du calcium (Aguilar et al., 2007; Erdman et al., 1998). L'expression de ces gènes est régulée par les facteurs de transcription du locus MAT.

3.4. Formation de l'ascocarpe (périthèce) et réalisation de la méiose générant les ascospores

La formation de l'ascocarpe débute au moment de la fécondation. En effet, une fois la plasmogamie entre la spermatie et le trichogyne effectuée, le noyau issu de la spermatie va migrer vers l'ascogone puis va se diviser par mitoses consécutives. Suivant les espèces considérées, différents noms ont été donnés à l'ascocarpe en fonction de sa forme, tels que cleistothèce, apothécie ou périthèce, mais sa fonction reste la même (Pöggeler et al., 2018). L'ascocarpe est constitué de deux types de tissus : l'enveloppe et les hyphes ascogènes. L'enveloppe est formée d'hyphes végétatifs haploïdes issus de l'organisme femelle. Le rôle de cette enveloppe est de protéger les futures ascospores (Peraza-Reyes et Malagnac, 2016). A partir de l'ascogone, qui contient donc plusieurs noyaux issus de la division du noyau de la

spermatie et du trichogyne femelle, se forment des hyphes ascogènes, puis des paires aléatoirement constituées d'un noyau provenant de chaque cellules partenaires vont migrer vers les hyphes ascogènes. A ce stade, les hyphes ascogènes sont également appelés « croziers » en raison de leur forme de crosse. Ces noyaux vont à nouveau se diviser de manière synchronisée et un septum va se former de telle manière que soient regroupés un noyau issu de la spermatie et un noyau issu de l'ascogone dans une cellule entourée par une cellule avec un noyau de l'un des parents à son extrémité et une cellule avec un noyau de l'autre parent à sa base. La cellule centrale de cet ensemble de trois cellules est donc une cellule dicaryotique (Bennett et Turgeon, 2016; Coppin et al., 1997). La caryogamie a alors lieu entre les deux noyaux de la cellule centrale, donnant une cellule diploïde qui va devenir l'asque contenant les ascospores issues d'une unique méiose. Dans le même temps, les deux cellules flanquantes vont se rejoindre et fusionner, donnant une nouvelle cellule dans laquelle les noyaux vont se rediviser et qui va se différencier en un nouveau crozier. Ce cycle de génération des asques va se répéter de très nombreuses fois, permettant, à partir d'un seul événement de fécondation, d'obtenir de très nombreux asques, chacun étant issu d'une méiose indépendante. Dans chaque asque, la cellule diploïde formée par la fusion des noyaux issus de la spermatie et du trichogyne va subir une méiose donnant quatre ascospores. Chez certaines espèces, ces quatre ascospores vont subir une mitose, générant ainsi quatre paires d'ascospores sœurs. Enfin, dans le cas des périthèces, les ascospores vont être expulsées au niveau du col et être dispersées dans le milieu (Cavinder et al., 2012; Guyot et Eveno, 2015 ; Figure 5).

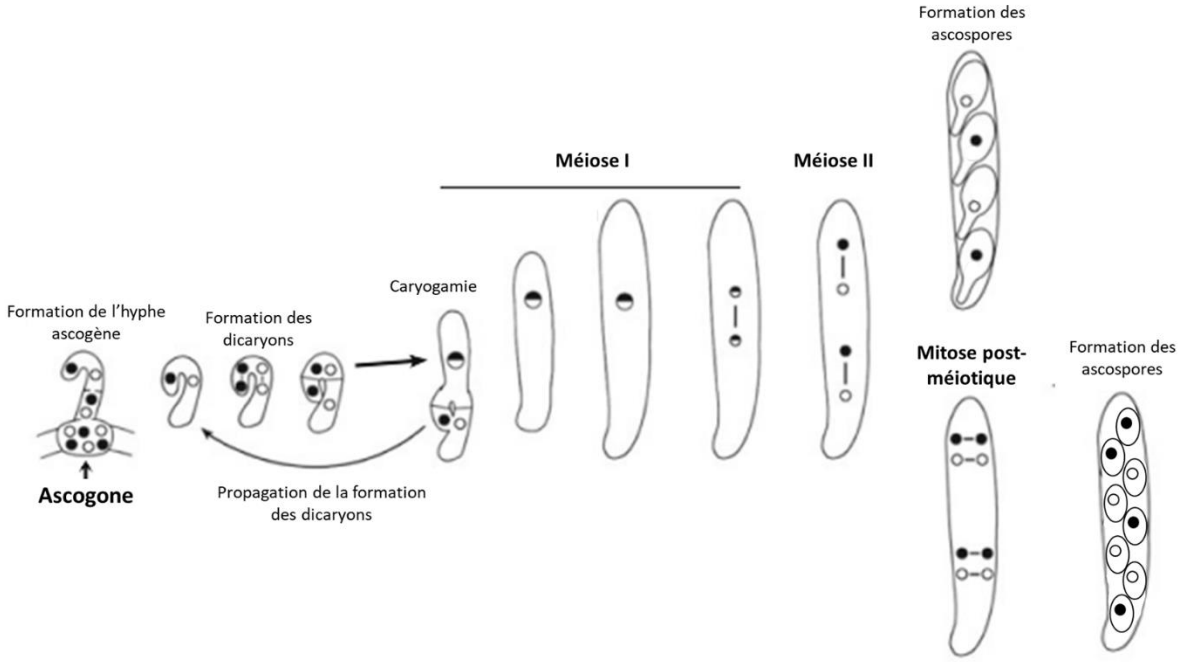


Figure 5 : Formation des ascospores chez les Ascomycètes. Après la caryogamie le noyau va subir une méiose pour venir former quatre noyaux, possiblement suivie d'une mitose pour obtenir huit noyaux. D'après Peraza-Reyes et Malagnac (2016).

3.5. Régulation génétique de la reproduction sexuée

3.5.1. Gènes impliqués dans la formation des gamètes

Les bases génétiques de la production de microconidies ont été explorées chez différentes espèces de champignons modèles (*Aspergillus nidulans*, *P. anserina*, et *N. crassa*) et chez des agents pathogènes de plantes (*Fusarium verticillioides*, *F. verticillioides*). Bien que sa fonction exacte reste inconnue, le gène *veA*, codant pour une protéine appartenant à la famille des protéines Velvet, semble avoir été identifié chez *A. nidulans* comme ayant un rôle dans la formation des hyphes portant les microconidies. En effet, ce gène régule de manière positive le développement des structures sexuelles et dans un même temps de manière négative le développement asexué (Kim et al., 2002). Le gène *FvVE1*, homologue au gène *veA*, impliqué dans la régulation de la croissance du mycélium aérien chez *F. verticillioides* impacte le ratio entre le nombre de microconidies et celui de conidies (spores asexuées), ce qui montre l'effet

pléiotropique du gène (Li et al., 2006). De la même manière, la délétion du gène *Ssnsd1*, codant pour un facteur de transcription de type GATA, induit la surproduction de spermaties au niveau des hyphes végétatifs. Ce gène régule également la formation de l'appressorium chez *S. sclerotiorum*, et a donc un effet sur la pathogénicité de ce champignon (Li et al., 2018). Ce gène est un orthologue du gène *nsdD* chez *A. nidulans* également connu pour son implication dans la reproduction sexuée (Han et al., 2001). Chez *P. anserina*, les mécanismes de méthylation de l'histone H3 contrôlés par la méthyl transférase EZH2-like codées par *Paktm6* joue un rôle dans le contrôle de la production des spermaties. En effet, la mutation de *Paktm6* entraine une surproduction de spermaties (Carlier et al., 2021). La délétion du gène *PaHMG4*, codant pour un domaine HMG chez le même organisme entraine également une surproduction des gamètes mâles (Ait Benkhali et al., 2013). Chez *P. anserina* et *N. crassa*, le rôle des gènes *MAT* dans la formation de microconidies, mais également dans la formation des ascogones, ont été testés et ils ne sont pas nécessaires (Coppin et al., 1993; Ferreira et al., 1998; Kim et al., 2012). Le gène *Ami1* chez *P. anserina* code pour un orthologue du gène *ApsA* chez *A. nidulans*. Le gène *ApsA* code pour une protéine de régulation. Sa délétion entraine un défaut de migration du noyau lors du développement des conidiophores (Fischer et Timberlake, 1995). Le gène *Ami1* intervient lors de la migration nucléaire pendant la formation des microconidies et la mutation du gène conduit à la formation de spermaties non-nucléées (Bouhouche et al., 2004). Chez *P. anserina*, FLE1 qui possède deux motifs C2H2 Zinc finger joue un rôle sur la pigmentation du mycélium mais aussi dans la production de microconidies (Coppin, 2002).

Les gènes impliqués dans la formation des ascogones sont très peu connus. Il semble que chez *N. crassa*, les gènes *MAK-1* et *OS-2* impliqués dans la synthèse de MAP Kinases sont nécessaires à la formation de l'ascogone (Maerz et al., 2008). De plus, les gènes *Pro11* et *Pro22* codants pour des sous-unités protéiques du complexe STRIPAK chez *Sordaria macrospora* (voir section suivante) sont impliqués dans la formation des ascogones (Bloemendal et al., 2012,

2010). La délétion du gène *Ssnsd1* (précédemment cité pour son implication dans la formation de gamètes mâles) impacte l'intégrité cellulaire et interrompt la formation des ascogones chez *S. sclerotiorum* (Li et al., 2018).

3.5.2 Gènes impliqués dans la formation du périthèce

La maturation et la formation du périthèce requiert l'activation de divers gènes de développement (Teichert et al., 2014). Ces gènes ont été beaucoup étudiés chez les espèces modèles telles que *S. macrospora* et *P. anserina* et ont été souvent découverts à partir de mutants ayant des phénotypes altérés pour ces caractères. Parmi ces gènes, on retrouve des gènes codant pour deux complexes protéiques : le signalosome COP9 (CSN) et le complexe « Striatin- Interacting Phosphatase and Kinase » (STRIPAK) qui jouent un rôle dans les processus de phosphorylation post-transcriptionnels. Le signalosome COP9 présent chez plusieurs espèces fongiques est impliqué dans la réponse à la lumière. La fonctionnalité de toutes les sous-unités du complexe est nécessaire à la maturation des périthèces chez *A. nidulans* (Braus et al., 2010; Busch et al., 2007). Les gènes *Pro11* et *Pro22* précédemment cités codent pour des sous-unités du complexe STRIPAK. Ce complexe extrêmement conservé chez les Eucaryotes et qui a été décrit pour la première fois chez l'humain (Hwang et Pallas, 2014), joue également un rôle dans la formation du protopérithèce. La famille de protéines *Velvet* sont également impliquées dans divers processus tels que la croissance végétative et le contrôle de la production des spores asexuées chez *A. nidulans*, et possède des effets pléiotropes sur la formation de périthèces (Kim et al., 2002; Park et al., 2014). Il semble que le gène *Ami1* chez *P. anserina* précédemment cité pour la fertilité mâle soit également impliqué dans la migration nucléaire lors de la formation du périthèce, tandis que son homologue *ApsA* chez *A. nidulans* est limité à la croissance végétative (Bouhouche et al., 2004; Coppin, 2002). Par ailleurs, le gène *MCM1* de *S. macrospora*, homologue du gène *Mcm*1 chez *S. cerevisiae* qui intervient dans

la régulation des gènes cibles des facteurs de transcription codés par les loci MAT (Herskowitz, 1989), semble également impliqué dans la maturation du périthèce (Hagen et al., 1993; Nolting et Pöggeler, 2006). Les facteurs de transcriptions de type Zinc finger sont aussi impliquées dans la formation des périthèces. En effet, la mutation du gène *pro1* chez *S. macrospora* qui codent pour un facteur de transcription de type Zinc finger C6 bloque la formation de périthèces dans les premier stade de développement (Masloff et al., 1999). L'orthologue de *pro1*, *Papro1* chez *P. anserina* est essentiel à la formation des périthèces puisque son inactivation entraine l'incapacité à former des périthèces. Il semble également que le gène *FLE1* qui code pour un facteur de transcription Zinc finger C2H2 et ayant un effet dans la production de microconidies agisse comme un répresseur dans la formation des périthèces chez *P. anserina* (Coppin, 2002). Les gènes codants pour les enzymes oxydases NADPH ou gènes *NOX* identifiés pour leur implication dans la production de radicaux libres (O_2^-) chez différentes espèces sont également impliqués dans les processus développementaux (revue Tudzynski et al., 2012). Des analyses fonctionnelles, chez *A. nidulans*, *N. crassa* et *P. anserina*, ont montré que le gène *NOX1* est nécessaire à la formation du périthèce (Lara-Ortíz et al., 2003; Malagnac et al., 2004; Semighini et Harris, 2008).

Cet état de l'art (probablement non exhaustif) des gènes impliqués dans le système de compatibilité (section 2.2) et dans le déroulement du cycle sexuel (section 3.5) montre l'extrême complexité du processus de reproduction sexuée, et permet de pointer vers les principaux processus biologiques (et donc les principales voies génétiques) qui sont mises en jeu au cours de ce processus, et notamment :

- les systèmes de transduction du signal de type cascade MAPK
- les systèmes de régulation de la transcription : facteurs de transcription (notamment Zinc Finger) et régulation post-transcriptionnelle (STRIPAK et COP9)

- la biosynthèse des phéromones et de leurs récepteurs
- le réarrangement et la fusion des parois et des membranes plasmiques
- les systèmes de sécrétion d'enzymes via des vésicules
- les systèmes d'influx de calcium
- les systèmes de production et de régulation de radicaux libres.

Dans cette thèse, nous nous sommes centrés sur l'étude de la reproduction sexuée, et plus précisément de la fertilité mâle et femelle, chez le champignon Ascomycète phytopathogène *Pyricularia oryzae*. Cette espèce est responsable d'une des plus importantes maladies des céréales cultivées et sauvages et un modèle pour les champignons phytopathogènes aériens (Dean et al., 2012; Valent, 2021, 1990).

4. *Pyricularia oryzae*

4.1. Importance de la maladie, la pyriculariose

Pyricularia oryzae (syn. *Magnaporthe oryzae*) est un champignon ascomycète phytopathogène de la famille des Magnaporthaceae (Klaubauf et al., 2014), qui est responsable de la pyriculariose sur de nombreuses céréales cultivées d'intérêt alimentaire majeur (riz, blé, maïs, sétaires...) et d'autres Poacées (Islam et al., 2016; Ou, 1985; Pordel et al., 2021)). Sur le riz, la pyriculariose provoque la perte d'environ 3% de rendement à l'échelle mondiale (Savary et al., 2019) et est considérée comme la plus dommageable (Fisher et al., 2012; Gurr et al., 2011; Pennisi, 2010). La présence de la lignée génétique pathogène du riz est attestée dans plus

de 80 pays à travers le monde (Boddy, 2016) et son point d'émergence semble se trouver en Asie du Sud, proche de l'Himalaya (Gladieux et al., 2018; Saleh et al., 2014; Tharreau et al., 2009; Thierry et al., 2022; Zeigler, 1998). La pyriculariose fait aussi des dégâts très importants sur le blé (50% en moyenne lors d'épidémies sévères) en Amérique du Sud depuis le milieu des années 80 (Cruz et Valent, 2017). La lignée pathogène du blé vient d'émerger en Asie (Islam et al., 2016) et en Afrique de l'Est (Tembo et al., 2020) et représente donc une menace pour le blé en Europe.

4.2. Structure des populations et modes de reproduction au sein de la lignée pathogène du riz

Bien que la reproduction sexuée n'ait pour le moment jamais été observée directement au champ chez *P. oryzae*, elle a déjà été réalisée au laboratoire sur milieu artificiel (Saleh et al., 2012a; Zeigler, 1998 pour revue) et sur des tissus morts de riz (Hayashi et al., 1997; Silué et Nottéghem, 1990). Les souches pathogènes du riz sont structurées en quatre grandes lignées phylogénétiques. L'utilisation de marqueurs génétiques a permis d'inférer l'existence d'événements de recombinaison ainsi qu'une forte diversité génétique dans la lignée 1 tandis que les trois autres lignées ont une structure clonale (Gladieux et al., 2018; Thierry et al., 2022). La lignée 1 est notamment présente au niveau du centre d'origine en Asie du Sud Est qui semble être le point d'émergence de l'espèce à partir duquel la pyriculariose s'est dispersée dans le monde (Saleh et al., 2014). Dans une population chinoise échantillonnée à Yule (province du Yunnan), proche du centre d'origine et appartenant à la lignée 1, Saleh et al., (2012b) ont mis en évidence une forte diversité génotypique, le réarrangement des combinaisons alléliques entre deux échantillonnages de cohortes successives avec des fréquences alléliques similaires, et la présence équilibrée des deux idiomorphes du MAT, ce qui laisse présumer l'occurrence de la

reproduction sexuée. En dehors du centre d'origine la structure clonale des populations et le mode reproduction observé au champ (conidies) montrent que la reproduction est uniquement asexuée. La colonisation des nouvelles zones s'est vraisemblablement faite de manière asexuée (Saleh et al., 2012b ; Gladieux et al., 2018). Il serait donc intéressant de comprendre comment une espèce, utilisant à l'origine la reproduction sexuée est devenue une espèce à reproduction majoritairement asexuée, d'autant que ce phénomène semble s'être reproduit pour les populations pathogènes du blé (Latorre et al., 2022).

4.3. Biologie et génétique de la reproduction sexuée chez *P. oryzae*

La reproduction sexuée de *P. oryzae* est bien maitrisée en laboratoire. L'ensemble du cycle, jusqu'à la production d'ascospores viables, est obtenu après confrontation de mycéliums de MAT opposés et donc compatibles (Nottéghem et Silué, 1992 ; Figure 6). *Pyricularia oryzae* est une espèce hétérothallique. Les gènes au locus MAT sont nécessaires pour la reproduction sexuée et formation de périthèces (Wang et al., 2021). Les séquences codantes des gènes à ce locus ont été caractérisées. Le locus MAT1-1 est composé de trois gènes : *MAT1-1-1* qui code pour le facteur de type α, le gène *MAT1-1-2* qui code pour une protéine ayant un domaine HPG de fonction inconnue, et le gène *MAT1-1-3* qui qui code pour une HMG-box et possède deux transcrits. Le locus MAT1-2 est composé de deux gènes : MAT1-2-1 qui code pour une HMG-box qui constitue le facteur de type a, et le gène MAT1-2-2 qui possède deux transcrits (Kanamori et al., 2007; Kang et al., 1994). Comme présenté dans la section 2.2, le facteur de type α régule la production des phéromones contrôlées par le gène précurseur *MF2-1,* et celle des récepteurs membranaires aux phéromones codés par le gène *ste3-like* (MGG_06452, accession : GCA_000002495). Le facteur de type a va réguler la production des phéromones

contrôlées par le gène précurseur *MF1-1*, et celle des récepteurs membranaires aux phéromones codés par le gène *ste2-like* (MGG_04711, accession : GCA_000002495 ; Tableau 1).

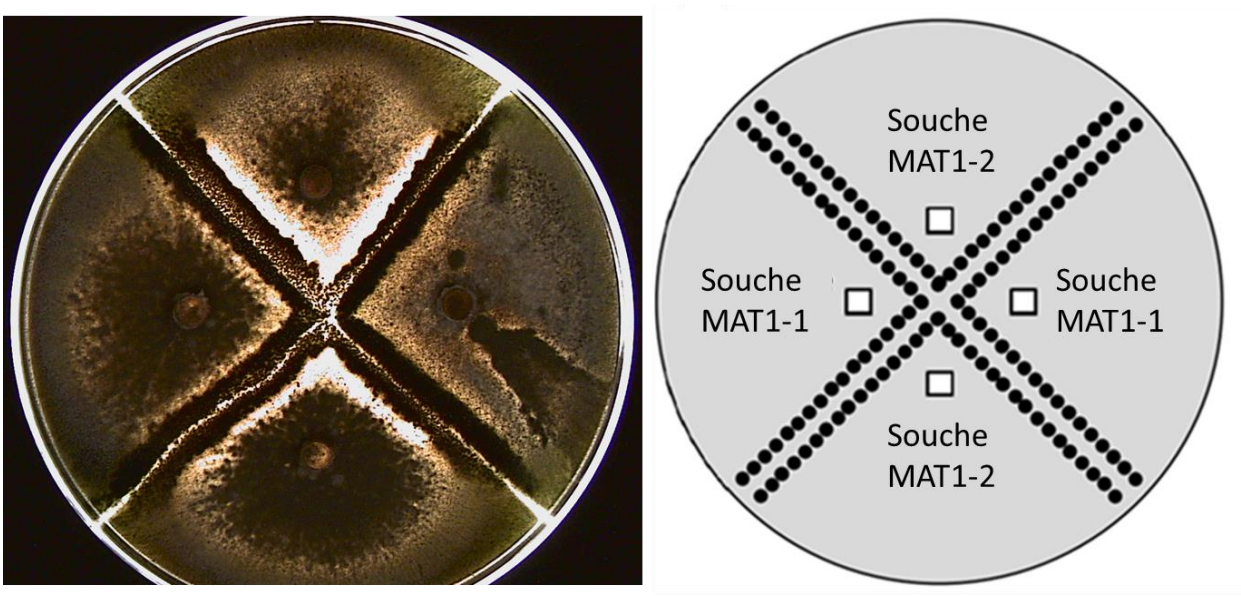


Figure 6 : Exemple de croisement en condition contrôlée entre des souches de MAT opposés. La partie droite de la figure schématise la boite de pétri qui figure sur la partie gauche. Les points noirs sur le schéma représentent les périthèces.

La fertilité femelle a été étudiée chez *P. oryzae* à travers la production de périthèces. La culture de la souche OG02, pathogène du millet (*Eleusine coracana*) sur milieu artificiel a permis l'obtention par reproduction végétative d'un mutant femelle stérile (OG02-HSP) lié à une forte sporulation asexuée (Tharreau et al., 1997). Ces deux traits sont régulés par le même locus nommé *HSP1* (pour high sporulation on plates). De la même manière, le mutant OG05-FSP (pour self-formation of sterile perithecia) produit de manière autonome (c'est à dire sans confrontation avec une autre souche compatible), des périthèces ne contenant pas d'ascospores. La fonctionnalité des périthèces est cependant rétablie en croisement avec une autre souche. Ce trait est également monogénique. Le croisement entre les deux mutants ne conduit pas à la restauration de la production de périthèces pour les descendants avec une forte sporulation, suggérant l'existence de relations d'épistasie entre les deux gènes (Tharreau et al., 1997). Sur boîtes de Petri contenant du mycélium en croissance (multiplication végétative), des mutants

différant pour leur morphologie mycélienne (mycelium blanc et aérien ou au contraire très gris et ras) sont régulièrement observés, et ces modifications sont en général associées à la stérilité (Kamakura et al., et Tharreau, communications personnelles). La pléiotropie entre la reproduction asexuée et la production de périthèces a été plusieurs fois observée. Saleh et al. (2012a) ont réalisé une expérience d'évolution expérimentale à partir de souches sauvages multipliées uniquement par spores asexuées, et ont obtenu en quelques générations des lignées mutantes ayant perdu la capacité de produire des périthèces, et donc femelles stériles. Les conidies de ces mutants stériles se détachaient plus facilement du conidiophore que les conidies des souches sauvages (dont elles étaient issues).

La fertilité mâle est bien moins étudiée chez *P. oryzae*. Des cellules en forme de demi-lune appelées microconidies ont été observées par Kato et al. (1994). Leur rôle en tant que spermatie a été envisagé par les auteurs de l'étude, mais n'a cependant pas été démontré. Les microconidies sont des cellules hyalines sans septum, d'une taille allant de 6 µm à 11 µm de longueur pour 1 µm à 2 µm d'épaisseur et sont facilement distinguables des conidies (spores asexuées ; Chuma et al., 2009).

Concernant le contrôle génétique de la fertilité mâle, la production de microconidies semble être régulée par une MAP kinase codé par le gène *pmk1* (MGG_09565), également impliqué dans la formation de l'appressorium, et par le facteur de transcription *Mst12* (MGG_12958) en aval de *pmk1*. En effet, une mutation dans un des deux gènes entraine une réduction de la production de microconidies (Zhang et al., 2014). La mutation dans le gène *MoMcm1* codant un facteur de transcription MADS-box également impliqué dans la formation de l'appressorium en interaction avec *Mst12* empêche la production de microconidies en milieu liquide de PDB (Zhou et al., 2011). Le contrôle génétique de la fertilité femelle a été moins exploré. La formation de l'ascogone n'a pas été observé et la plupart des études portent sur la formation des périthèces. Récemment, le gène *MoRPD3* (MGG_05857) codant pour une

histone déacétylase, impliqué notamment dans la sporulation, a été identifié comme ayant un rôle négatif dans la production de périthèces. La mutation du gène entraine une production de périthèces plus élevée et une diminution de la sporulation (Lee et al., 2021). Au contraire, des mutations dans la Glycoside Hydrolase *MoGLS2* (MGG_08623) ont un effet négatif sur la production de périthèces et positif sur la sporulation (Li et al., 2016).

5. Objectifs de la thèse

Comme on peut le constater, la littérature autour de la reproduction et plus précisément sur la fertilité mâle et femelle chez *P. oryzae* est pauvre. En effet, les cellules et les gènes impliqués dans la fertilité sont encore largement inconnus chez cette espèce. Un des projets de l'équipe d'accueil dans laquelle j'ai réalisé ma thèse, est l'étude des mécanismes de la reproduction chez *P. oryzae* afin de comprendre les relations de cause à effet entre l'expansion du champignon à travers le monde et la perte de fertilité. Dans ce cadre, l'objectif principal de ma thèse a donc consisté en l'étude des bases génétiques de la fertilité chez *P. oryzae*, espèce modèle en phytopathologie et agent pathogène fongique causant des pertes importantes sur des cultures alimentaires majeures (blé, riz). Pour contribuer à cet objectif, nous nous sommes posés trois questions de recherche qui font l'objet des trois chapitres de ma thèse.

Question 1 : Les microconidies jouent-elles un rôle dans la reproduction sexuée ?

Nous répondons à cette question dans le chapitre I. Nous sommes partis de la littérature qui suggère que les microconidies sont l'élément fécondant mâle chez *P. oryzae* sans toutefois le démontrer. Nous avons donc testé l'hypothèse selon laquelle les microconidies jouent un rôle dans la reproduction sexuée et nous avons essayé de démontrer leur rôle d'élément fécondant.

Question 2 : Quelles sont les bases génétiques de la fertilité mâle ?

Nous avons contribué à répondre à cette question dans le chapitre II. Nous nous sommes servi des résultats obtenus dans le chapitre I afin de répondre à cette question. En effet, la caractérisation de la production de spermaties nous permet de réaliser un phénotypage quantitatif précis de la fertilité mâle. Nous avons tiré profit de cette possibilité pour rechercher les bases génétiques de la fertilité mâle par une approche de génomique d'association (GWAS) en analysant une population recombinante de *P. oryzae*.

Question 3 : Quelles sont les bases génétiques de la fertilité femelle ?

Cette question est abordée dans le chapitre III, en utilisant deux approches complémentaires. Nous avons d'une part tiré profit de travaux antérieurs menés dans l'équipe par Saleh et al (2012a) : des croisements impliquant des souches femelle-fertiles et des souches femelle-stériles avaient été réalisés, et les descendants de ces croisements avaient été phénotypés pour la fertilité femelle. Nous avons utilisé ce matériel pour réaliser une analyse de « Bulk Segregant ». En parallèle, nous avons phénotypé la fertilité femelle dans la même population que celle utilisée dans le Chapitre 2, et avons appliqué une approche de GWAS.

Chapitre 1 :

Caractérisation de la production de gamètes mâles (spermaties) chez *Pyricularia oryzae*

Lassagne, A., Brun, S., Malagnac, F., Adreit, H., Milazzo, J., Fournier, E., Tharreau, D. (2022) Male fertility in *Pyricularia oryzae*: Microconidia are spermatia. *Environmental Microbiology*, 1–11. Available at: https://doi.org/10.1111/1462-2920.16226

1. Présentation générale

Ce premier chapitre de thèse, porte sur la caractérisation et la compréhension biologique des éléments fécondants et, plus particulièrement, des structures ayant le rôle de gamète mâle chez *Pyricularia oryzae*.

Les résultats présentés ci-dessous ont fait l'objet d'une fructueuse collaboration entre différentes personnes de l'Institut Jacques Monod de Paris, l'Institute for Integrative Biology of the Cell de Saclay et le Plant Health Institute of Montpellier conduisant à la publication d'un article de recherche dans Environmental Microbiology intitulé **Male fertility in *Pyricularia oryzae*: Microconidia are spermatia**

L'objectif des travaux présentés dans cet article était d'identifier les spermaties chez notre espèce modèle. Des cellules particulières produites par *P. oryzae* et appelées microconidies ont été communément associées à un rôle de spermatie. Cependant, aucune démonstration de ce rôle n'a été faite. Nous avons supposé que, comme chez d'autres espèces, les microconidies de *P. oryzae* jouent le rôle d'éléments fécondants mâles. Pour tester cette hypothèse, nous avons cherché à produire des microconidies sur 12 souches provenant d'hôtes différents, de lignées génétiques différentes pour les souches provenant du riz mais également des deux systèmes de compatibilité sexuelle, puis ensuite nous avons testé leur pouvoir fécondant.

2. Article : Male fertility in *Pyricularia oryzae*: Microconidia are spermatia

Received: 13 June 2022 | Accepted: 25 September 2022

DOI: 10.1111/1462-2920.16226

RESEARCH ARTICLE

environmental microbiology Applied Microbiology International

Male fertility in *Pyricularia oryzae*: Microconidia are spermatia

Alexandre Lassagne[1,2] | **Sylvain Brun**[3] | **Fabienne Malagnac**[4] | **Henri Adreit**[1] | **Joëlle Milazzo**[1] | **Elisabeth Fournier**[2] | **Didier Tharreau**[1]

[1]Plant Health Institute of Montpellier (PHIM), CIRAD, Montpellier, France

[2]Plant Health Institute of Montpellier (PHIM), University of Montpellier, CIRAD, INRAE, Institut Agro, IRD, Montpellier, France

[3]Institut Jacques Monod, Université Paris Cité, CNRS, Paris, France

[4]Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Gif-sur-Yvette, France

Correspondence
Didier Tharreau, Plant Health Institute of Montpellier (PHIM), CIRAD, TA A120/K, 34398 Montpellier, France.
Email: didier.tharreau@cirad.fr

Funding information
Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement, Grant/Award Number: PhD grant to AL; Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement; French National Research Agency, Grant/Award Number: ANR-10-INSB-04; INRAE; CIRAD

Abstract

Sexual reproduction in Ascomycetes is well described in several model organisms such as *Neurospora crassa* or *Podospora anserina*. Deciphering the biological process of sexual reproduction (from the recognition between compatible partners to the formation of zygote) can be a major advantage to better control sexually reproducing pathogenic fungi. In *Pyricularia oryzae*, the fungal pathogen causing blast diseases on several Poaceae species, the biology of sexual reproduction remains poorly documented. Besides the well-documented production of asexual macroconidia, the production of microconidia was seldom reported in *P. oryzae,* and their role as male gamete (i.e., spermatia) and in male fertility has never been explored. Here, we characterised the morphological features of microconidia and demonstrated that they are bona fide spermatia. Contrary to macroconidia, microconidia are not able to germinate and seem to be the only male gametes in *P. oryzae*. We show that fruiting body (perithecium) formation requires microconidia to get in contact with mycelium of strains of opposite mating type, to presumably fertilise the female gametes.

INTRODUCTION

The reproductive system influences the apparition and the evolution of adaptive variants in response to selective pressures. Asexual reproduction induces clonality which allows an adapted genotype to spread quickly in a homogeneous environment. By contrast, sexual reproduction induces recombination which generates new genotypic combinations that can be advantageous in heterogeneous environments (De Meeûs et al., 2007; Stukenbrock & McDonald, 2008). Recombination also permits to slow down the accumulation of deleterious mutations (Bruggeman et al., 2003). Some eukaryote taxa like Ascomycete fungi exhibit a wide variety of reproductive systems, from strictly clonal to strictly sexual species, including numerous species that alternate both (Billiard et al., 2012). To understand how reproduction systems and genes involved in these processes evolved in Ascomycete fungi, a prerequisite is to document how sexual reproduction takes place and what the biological determinants of fertility are.

Sexual reproduction implies the succession of haploid, dikaryotic and diploid phases implemented during meiosis and syngamy (Billiard et al., 2012). In Ascomycete fungi, the reproduction cycle starts by the encounter of a male gamete (either contained in antheridia, or present as individualised specialised cells called spermatia) with a female differentiated gamete (the ascogonium), a step called fertilisation. The ascogonium is a multinucleate haploid cell produced by mitosis (Billiard et al., 2012) which differentiates specialised hyphae called trichogynes (Debuchy et al., 2010). Hormonal

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.
© 2022 The Authors. *Environmental Microbiology* published by Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd.

14622920, 0, Downloaded from https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1462-2920.16226 by CIRAD - DGDRS - DIST, Wiley Online Library on [21/10/2022]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

attraction directs the growth of trichogynes towards spermatia (Bistis, 1996). This hormonal chemotropism is controlled by the mating type genes on a pheromone/receptor recognition basis and occurs only between cells of opposite mating type in heterothallic species (Bistis, 1983). The contact between the trichogyne and the spermatia triggers cell fusion, that is, plasmogamy, after which the spermatia nucleus migrates across the trichogyne into the ascogonium (Brun et al., 2021). Plasmogamy is controlled by mating-type genes (Bistis, 1996; Peraza-Reyes & Malagnac, 2016). Plasmogamy is followed by syngamy, meiosis and differentiation of the ascus that will contain the ascospores produced after meiosis. Asci are contained in fruiting bodies (perithecia in *P. oryzae*), which are composed of an envelope of maternal origin that shelters the ascogonium. Hence, sexual reproduction in heterothallic Ascomycetes is an intricate process which requires, on the one hand, mating type compatibility between partners, and on the other hand, female and male fertile gametes.

Pyricularia oryzae (syn. *Magnaporthe oryzae*) is a phytopathogenic fungus of Pyriculariaceae (Klaubauf et al., 2014), causing blast disease on many cultivated cereals (rice, wheat, maize, millets…) and others Poaceae (Couch et al., 2005; Gladieux et al., 2018a). This fungus is responsible for the rice blast disease causing the loss of 3% of global rice yield (Savary et al., 2019). The genetic lineage of *P. oryzae* pathogenic on rice likely emerged in South Asia, close to the Himalayas (Gladieux et al., 2018b; Saleh et al., 2014; Tharreau et al., 2009; Zeigler, 1998) and is reported in more than 80 countries across the world (Boddy, 2016). The asexual mode of reproduction, through asexual spores (macroconidia) or mycelium multiplication, is commonly observed on rice host and most of the pathogen populations are clonal (Zeigler, 1998). Although sexual reproduction of *P. oryzae* has never been observed in the field on any host, evidences from biology, genetic and genomic studies of populations from rice suggest that sexual reproduction took place or is still taking place in limited areas in the putative centre of origin (Gladieux et al., 2018b; Saleh et al., 2012b; Thierry et al., 2021). *P. oryzae* is a heterothallic species with two idiomorphs at the mating type locus named Mat1.1 and Mat1.2 (Kanamori et al., 2007). Sexual reproduction is easy to complete in vitro in this species. Formation of perithecia is easily observed in the laboratory by crossing fertile strains of opposite mating types, on artificial medium (Nottéghem & Silué, 1992). However, only some strains are able to form perithecia, and are then defined as female fertile. Similarly, male fertility has so far been defined as the capacity to induce perithecia formation in a female fertile strain of opposite mating type (Saleh et al., 2012a). However, the mechanisms of fertilisation have not yet been described. By analogy with other Ascomycetes, microconidia have been supposed to be the male fertilising elements (Fukumori et al., 2004). Microconidia were observed for the first time by Kato et al. (1994). Microconidia as well as specialised hyphae bearing them (phialides) were also observed by Chuma et al. (2009) and more recently by Zhang et al. (2014). But the role of microconidia in fertilisation was not demonstrated yet. Here, we demonstrate that microconidia are fertilising cells, that is, spermatia in *P. oryzae*. We propose a new and direct biological definition of male fertility in *P. oryzae*, independent of the stimulation by a female fertile strain.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Biological materials

We used 12 *P. oryzae* strains isolated from six different host plants and collected in seven different countries (Table 1). Strains of both mating types (Mat1.1 and Mat1.2) were used to measure the production of microconidia. The strains CH0997 (Mat1.2) and CH0999 (Mat1.1) (Saleh et al., 2012a), used for the fertilisation and mating assays, were collected on *Oryza sativa* in China in 2008 and belong to lineage 1 (Gladieux et al., 2018b; Latorre et al., 2020; Thierry et al., 2021). All strains were stored at −20°C on dried filter paper (Valent et al., 1986).

Growing media

Rice flour agar (RFA) medium was prepared with 20 g of organic rice flour, 15 g of Bacto agar, 2 g of Yeast Extract (Bacto™) in 1 L water with 500,000 units of penicillin G added after autoclaving for 20 min at 120°C. Fresh homemade potato dextrose broth (PDB) was prepared with 200 g of sliced organic potatoes boiled for 30 min in 800 ml sterile water. The preparation was filtrated through multilayer gauze. The filtrated solution was added with 20 g of glucose and replenished to 1 L.

Microconidia production

Microconidia were produced following a protocol modified by Zhang et al. (2014). Two circular plugs of 5 mm diameter of actively growing mycelium on RFA medium were used to inoculate 40 ml of fresh homemade PDB. The liquid culture was incubated for 3 days at 25°C, then 6 days at 20°C with permanent shaking at 150 rpm, and then filtrated on Miracloth (EMD Millipore Corp., 475855-1R) to remove mycelium fragments, and centrifuged at 4500*g* for 10 min. The pelleted microconidia were resuspended in 1 ml sterile distilled water. When microconidia production was too low, after

14622920, 0, Downloaded from https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1462-2920.16226 by CIRAD - DGDRS - DIST, Wiley Online Library on [21/10/2022]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

TABLE 1 Production of microconidia by different *Pyricularia oryzae* strains in liquid culture. Information on synonymous names, on the sampling, on accession numbers to publicly available genetic information, on the fertility in mating assays and on the number of microconidia produced

Strain	Synonymous	References	Genetic information	Mating type	Isolated in	Isolated from	Lineage (rice strains only)	Mating assays		Microconidia production.ml^{-1}		
								Male fertility	Female fertility	Replicate 1	Replicate 2	Mean replicates
US0068	70-15	Dean et al. (2005)	INSDC Assembly GCA_000002495.2	Mat1.1	USA	Hybrid lab strain (pathogenic to rice)	1	Fertile	Fertile	2.36E+06	1.53E+06	1.94E+06
OG0002	UG771511, KA3	Kato et al. (2000)		Mat1.1	Ouganda	*Eleusine coracana*		Fertile	Fertile	8.57E+07	2.05E+08	1.46E+08
OG0003	UG771711, KA4	Tanaka et al. (2009)		Mat1.1	Ouganda	*Eleusine coracana*		Fertile	Fertile	7.03E+08	1.51E+09	1.10E+09
GY0006		This article		Mat1.2	French Guyana	*Oryza sativa*		Fertile	Fertile	2.80E+04	1.73E+04	2.27E+04
GY0011	GUY11	Leung et al. (1988)	NCBI database: ASM236848v1 (GY11 PacBio Bao 2016)	Mat1.2	French Guyana	*Oryza sativa*	1	Fertile	Fertile	1.04E+06	1.06E+06	1.05E+06
CD0141		This article		Mat1.2	Ivory Coast	*Leersia hexandre*		Fertile	ND	2.00E+04	2.13E+04	2.07E+04
TH0012		Gladieux et al. (2018a)	ENA repository: PRJEB8341 (TH16 GEMO)	Mat1.1	Thailand	*Hordeum vulgare*	1	Fertile	Fertile	6.13E+04	2.69E+06	1.38E+06
TH0016		Gladieux et al. (2018a)	ENA repository: PRJEB8341 (TH16 GEMO)	Mat1.2	Thailand	*Hordeum vulgare*	1	Fertile	Fertile	3.60E+04	4.40E+04	4.00E+04
CH0997		Saleh et al. (2012a, 2012b)		Mat1.2	China	*Oryza sativa*	1	Fertile	Fertile	5.33E+04	4.80E+04	5.07E+04
CH0999		Saleh et al. (2012a, 2012b)		Mat1.1	China	*Oryza sativa*	1	Fertile	Fertile	4.52E+05	5.49E+05	5.00E+05
BF0026		This article		Mat1.2	Burkina Faso	*Eleusine indica*		Fertile	Fertile	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
CH0052		Gladieux et al. (2018a)		Mat1.1	China	*Oryza sativa*	2	Fertile	Sterile	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00

14622920, 0, Downloaded from https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1462-2920.16226 by CIRAD - DGDRS - DIST, Wiley Online Library on [21/10/2022]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

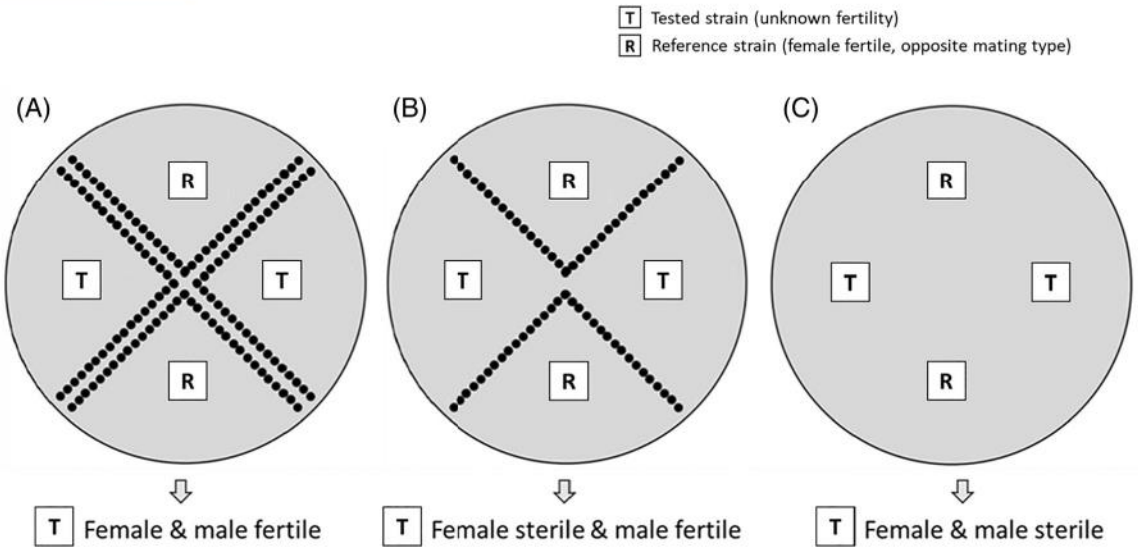


FIGURE 1 Interpretation of in vitro sexual crossing of *Pyricularia oryzae* with a tested strain of unknown fertility and a female fertile reference strain of opposite mating types. (A) Two lines of perithecia are formed: The tested strain is both male and female fertile. (B) One line of perithecia is formed: The tested strain is female sterile but male fertile. (C) Absence of perithecia: The tested strain is both male and female sterile.

filtration on Miracloth, the liquid culture was filtrated at 0.45 μm and microconidia were collected from the filter surface by washing the filter in 3 ml sterile water. To evaluate the capacity of each studied strain to produce microconidia, two independent replicates were performed and microconidia were counted three times for each replicate using a Malassez cell of 5 mm^2 and a limit threshold of 4000 units per ml.

Staining and microscopic observation

For staining of cell wall, a droplet of Uvitex 2B (biovalley, 19517-10) fluorescent dye was added directly in the suspension of macroconidia or microconidia on a microscopic slide and incubated in the dark for 15 min. The preparation was observed under photonic microscope Nikon ECLIPSE Ni-E with 390 nm GFP excitation filter. Ascogonia were observed with an inverted microscope Zeiss Axio observer Z.1 (objective 63× Plan Apo ON 1.4 Oil DIC) and photographed with an ORCA Flash4 LT CMOS camera (Hamamatsu). Images were analysed using Fiji software (Schindelin et al., 2012).

Mating assays

Crosses between strains of opposite mating type were performed as described by Nottéghem and Silué (1992) on RFA medium in 90 mm Petri dishes. Plugs of mycelia grown on RFA at 25°C for 1 week were deposited on RFA medium following the design described in Saleh et al. (2012a). Cultures were incubated under continuous light for 2 days at 25°C and then at 20°C. The reference strains CH0997 and CH0999 are known to be female fertile when crossed with a broad number of genetically diverse strains (Thierry et al., 2021). The production of mature perithecia was evaluated 21 days after inoculation to determine the fertility phenotype according to Saleh et al. (2012b): the formation of two rows of perithecia between a tested strain and a reference strain of opposite mating type indicated that both strains were male fertile and female fertile (Figure 1A); the observation of a single row indicated that only the reference strain produced perithecia, and that the tested strain was female sterile but male fertile (Figure 1B); the absence of perithecia indicated that the tested strain was both female-sterile and male-sterile (Figure 1C). The cross CH0997 × CH0999 was used as positive controls, the crosses CH0997 × CH0997 and CH0999 × CH0999 were used as negative controls.

Fertilisation assays

To assess the fertilisation capacity of microconidia, we first grew female fertile strains on RFA medium in 90 mm diameter Petri dishes for 3 days at 25°C and 6 days at 20°C. The two reference strains CH0997 (Mat1.2) and CH0999 (Mat1.1) were chosen as 'female' thalli in this experiment. After screening different strains, OG0002 (Mat1.1) was chosen as 'male' thallus in this experiment for its capacity to produce high quantities of microconidia. We prepared

14629920, 0, Downloaded from https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1462-2920.16226 by CIRAD - DGDRS - DIST, Wiley Online Library on [21/10/2022]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

microconidia suspensions of OG0002 following the protocol described above, and adjusted them to 11 different concentrations: 400, 800, 1600, 3200, 4000, 6000, 8000, 12,000 and 24,000 microconidia.ml^{-1}. For each suspension, 250 μl were sprayed on the mycelium of CH0997 and CH0999 strains. The inoculated plates were then cultured for 3 more days at 20°C before observation of perithecia formation. Two replicates were performed for each combination of female strain × concentration of microconidia suspensions.

The fertilisation capacity of macroconidia was tested in a similar way, using the same strains grown as described above. Macroconidia of strain OG0002 were harvested on aerial mycelium from cultures grown on RFA medium for 2 weeks at 25°C. To release macroconidia from the mycelium, cultures were gently scrapped after addition of 4 ml distilled water. Macroconidia suspensions were then filtrated on a 40 μm filter to eliminate mycelium fragments. Female fertile strains CH0997 and CH0999 were inoculated with 250 μl of suspensions at 9.00×10^4 macroconidia.mL^{-1} of OG0002.

We also tested the fertilisation capacity of mycelium using the same strains as above (i.e., OG0002 as 'male', and CH0997 and CH0999 as 'female'). To produce mycelium fragments of OG0002, 40 ml of commercial PDB (Difco™) were inoculated with two plugs of 5 mm diameter of mycelium actively growing on RFA medium. We observed that, in our conditions, microconidia are not produced in commercial PDB. The liquid culture was incubated with a permanent shaking at 150 rpm for 3 days at 25°C and then for 6 days at 20°C. The mycelium was then centrifuged at 4500*g* for 10 min and resuspended in 4 ml sterile water. Mycelium was sonicated for 1 min at 12 W and 20 Hz to obtain fragments. The female fertile strains CH0997 and CH0999, grown as described above, were then inoculated with 250 μl of mycelium fragment suspensions. The same volume of suspensions of mycelium fragments was also inoculated on two plates of RFA medium to check their viability.

Quantification of perithecia on fertilised cultures

After 3 days of incubation, pictures of plates of fertilisation assays were taken with a camera. The proportion of the surface occupied by perithecia formed on plates was evaluated by image analysis with the software IPSDK Explorer developed by Reactiv'IP. This software uses machine learning techniques to classify pixels. The software was trained to classify pixels into three classes: background, mycelium and perithecia (model in Supporting Information). Due to the difficulty to precisely count individual perithecia, we quantified the number of pixels assigned to the 'perithecia' class. We then calculated the proportion of surface occupied by perithecia as the ratio of the number of pixels assigned to the 'perithecia' class on the number of pixels assigned to the 'mycelium' + 'perithecia' classes. We used the 'drc' R package (Ritz et al., 2015) to fit a log-logistic model with the lowest value fixed to 0 and three parameters (*b*, *d*, *e*) as in the following equation:

$$f(x) = \frac{d}{[1 + \exp(b * (\log(x) - \log(e)))]}$$

Time frame assay for production of fertilisation competent female gametes

To determine the minimum time required for the female thallus to become competent for fertilisation, 20 μl of a suspension of OG0002 microconidia of opposite mating type (1×10^6/ml) were poured on mycelial cultures of the female strain CH0997 of eight different ages (from 3 to 10 days). Eight plates of CH0997 were cultured on RFA medium at 25°C for 2–9 days, respectively, before being placed at 20°C 1 day before the inoculation with microconidia of OG0002. Perithecia formation was assessed every day from the 10th to the 17th day of the experiment. The presence of perithecia was assessed based on the observation of fungal structures with the morphological characteristics of perithecia.

RESULTS

Production of microconidia by *P. oryzae* strains

Ten out of the 12 studied strains produced microconidia in fresh homemade PDB (Table 1). All 10 strains inducing the formation of perithecia in classical in vitro tests produced from 2.07×10^4 to 1.10×10^9 (significant effect of the strain tested with a nested ANOVA: $F = 1021.7$, $p = 2 \times 10^{-16}$, $Df = 11$) microconidia (Figure 2). A significant difference in microconidia production was also observed when considering only the five strains isolated from the same host, rice (nested ANOVA: $F = 232.57$, $p = 2 \times 10^{-16}$, $Df = 4$). The two strains producing the highest number of microconidia were OG0002 and OG0003, with 1.46×10^8 and 1.10×10^9 microconidia.ml^{-1}, respectively, that is, 100 to 10,000 times more than the other producing strains. Based on its high microconidia production, OG0002 was chosen as 'male' fertilising strain in the following assays. The number of microconidia produced was consistent between the two biological replicates of the same strain, except for

14622920, 0, Downloaded from https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1462-2920.16226 by CIRAD - DGDRS - DIST, Wiley Online Library on [21/10/2022]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

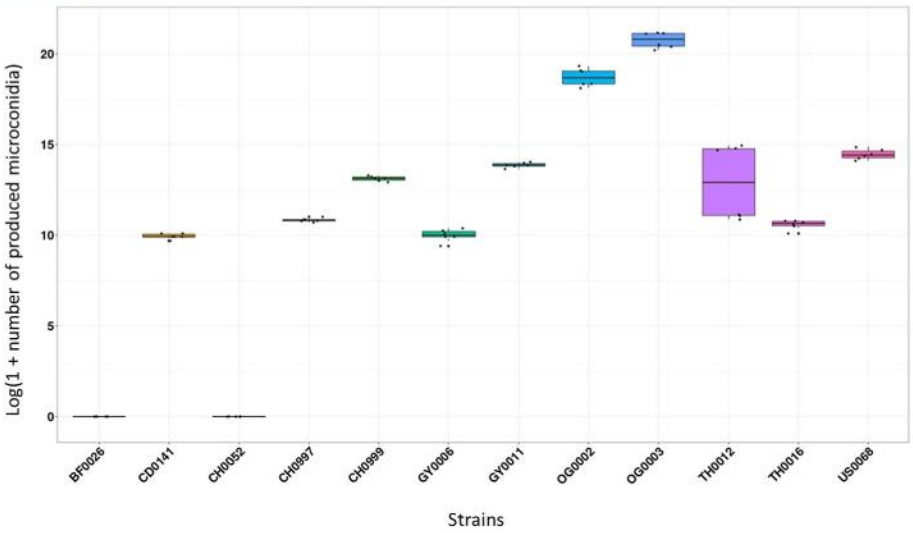


FIGURE 2 Quantity of microconidia produced for different strains of *Pyricularia oryzae* from different countries and host plants.

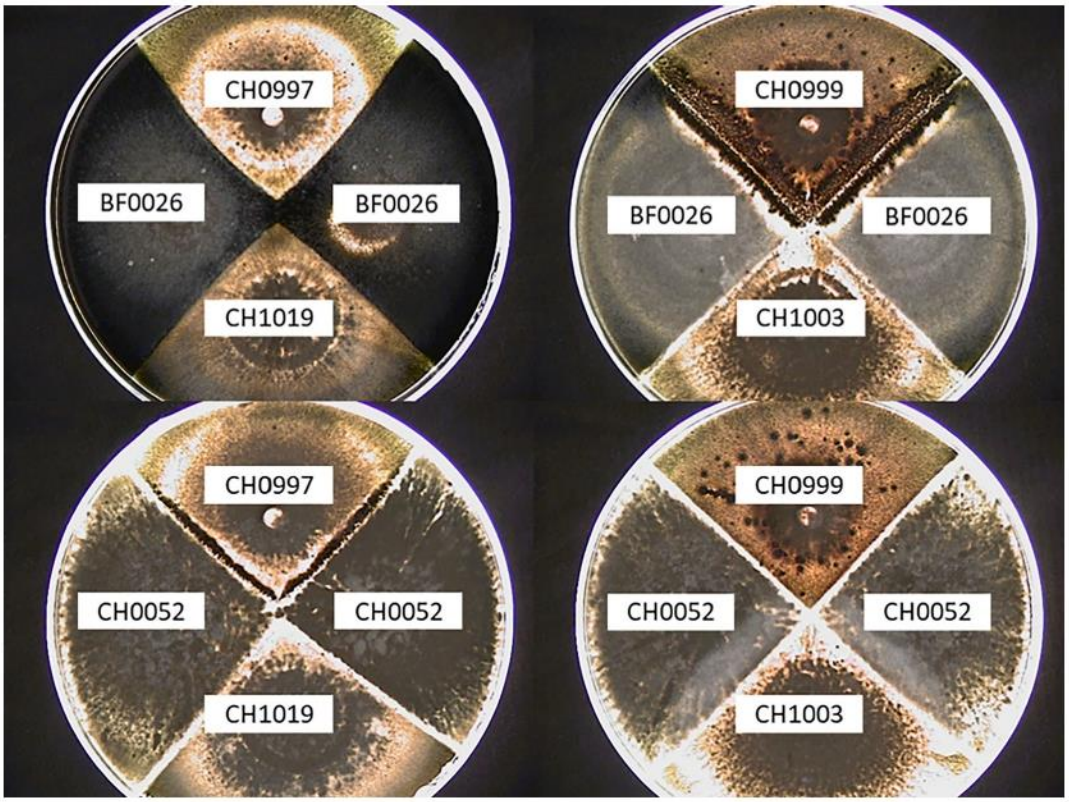


FIGURE 3 Crosses between strains CH0052 (Mat1.1) and BF0026 (Mat1.2) with four reference female fertile strains CH0999 (Mat1.1), CH1003 (Mat1.1), CH0997 (Mat1.2) and CH1019 (Mat1.2).

TH0012. Although microconidia were not observed for strains CH0052 and BF0026 (Table 1), these strains induced the formation of a low quantity of perithecia on female reference strain. Furthermore, CH0052 and BF0026 induced perithecia formation with only one of the two female reference strains (Figure 3). As expected from previous reports, microconidia were produced regardless of the mating type of the strains, with four strains of each mating type producing microconidia and one strain of each mating type not producing microconidia. It is important to note that microconidia were obtained from cultures of single strains, confirming that the stimulation by another strain is not necessary to induce their production.

14622920, 0, Downloaded from https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1462-2920.16216 by CIRAD - DGDRS - DIST, Wiley Online Library on [21/10/2022]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

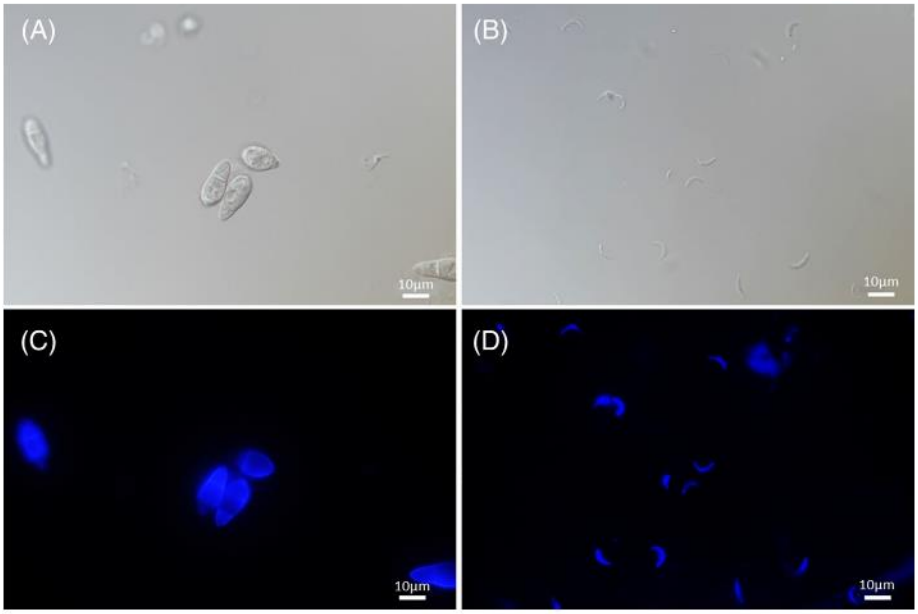


FIGURE 4 Macroconidia and microconidia of *Pyricularia oryzae* strain OG0002 under differential interference contrast light microscopy (100×) and with 0.05% Uvitex stain. (A) Macroconidia, (B) microconidia, (C) macroconidia (350 nm excitation light) and (D) microconidia (350 nm excitation light).

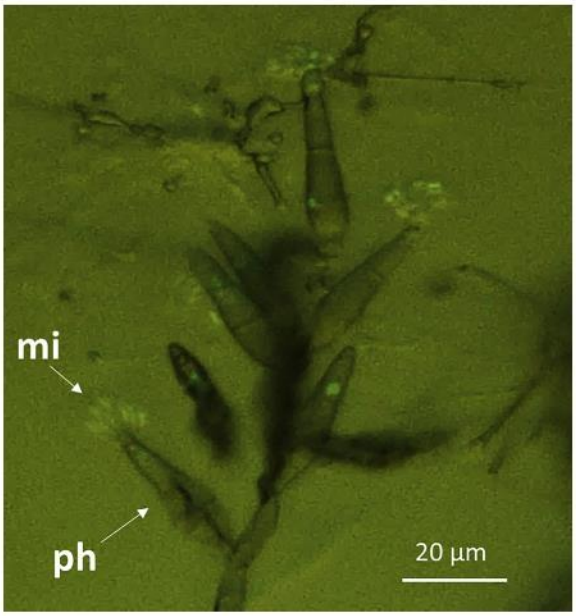


FIGURE 5 Fluorescence microscopy of microconidia worn by phialides hyphae of the transformed strain CH0997_GFP. (mi) microconidia, (ph) phialide.

Morphological characteristics of microconidia

The mean length of OG0002 microconidia was 7.36 µm ($n = 62$, standard deviation = 1.15). Hence microconidia are smaller than macroconidia whose dimensions are 16–33 µm long and 6–13 µm wide (Biju-Duval, 1994; Chuma et al., 2009; Ou, 1985). Microconidia are also clearly distinguishable from macroconidia in their structure and shape (Figure 4): they are single-celled and crescent-shaped (Figure 4B,D), whereas macroconidia are three-celled and pyriform with a characteristic light grey pigmentation (Figure 4A,C). Microconidia have a hyaline aspect (Figure 4B), which makes them uneasy to observe under microscope at low magnification and on cultures on solid medium. Both types of conidia have a chitinous cell wall evidenced by Uvitex staining (Figure 4C,D). Microconidia are worn by specialised hyphae called phialides (Figure 5).

Fertilisation assays

Spraying of pure suspension of microconidia of strain OG0002 (Mat1.1) on a 'female' strain of opposite mating type previously cultured for 9 days induced the formation of perithecia (Figure 6). Perithecia were formed on cultures of CH0997 (Mat1.2) for all concentrations of sprayed suspensions of microconidia in both replicates. Perithecia were observed 3 days after spraying. No perithecium was formed on cultures of CH0997 either sprayed with sterile water or unsprayed. As expected, no perithecia were formed by CH0999 (Mat1.1) after spraying with OG0002 microconidia, since both strains were of the same mating type.

We observed a significant positive relationship between the number of microconidia sprayed on the 'female' thalli and a proxy of the number of perithecia (i.e., the proportion of surface occupied by perithecia on the fertilised culture). The relationship between the number of microconidia sprayed and the proportion of

14622920, 0, Downloaded from https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1462-2920.16226 by CIRAD - DGDRS - DIST, Wiley Online Library on [21/10/2022]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

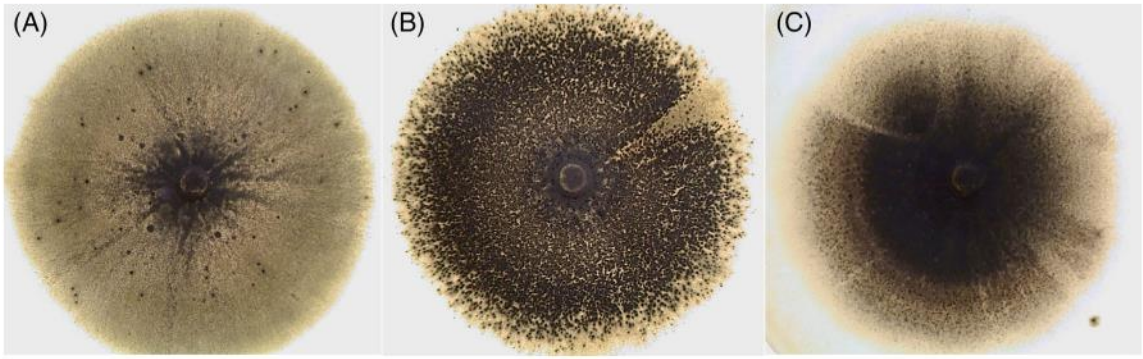


FIGURE 6 Observation of perithecia formation on female fertile strains 3 days after spraying with microconidia of OG0002 (Mat 1.1). (A) 100 microconidia sprayed on CH0997 (Mat 1.2) compatible strain. (B) 6000 microconidia sprayed on CH0997 (Mat 1.2) compatible strain. (C) 6000 microconidia sprayed on CH0999 (Mat 1.1) incompatible strain.

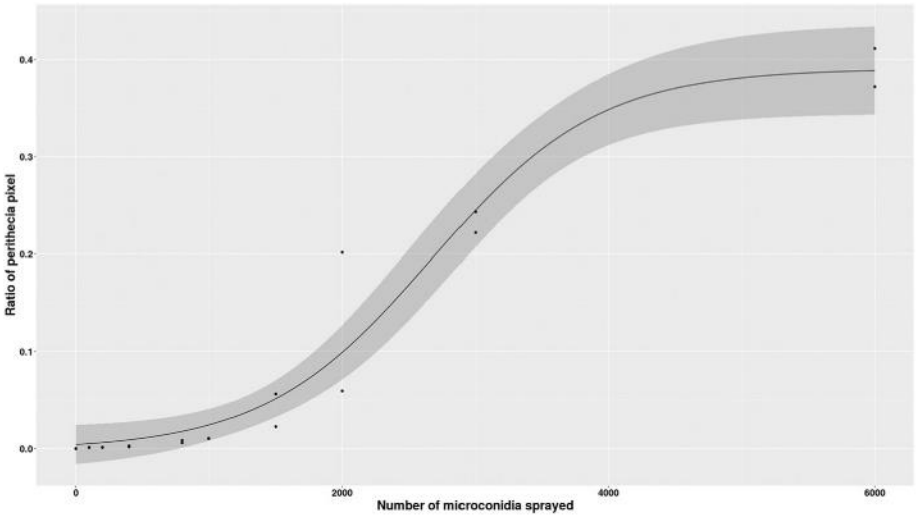


FIGURE 7 Relationship between the number of microconidia of OG0002 deposited and the number of perithecia formed on CH0997 is approximate by image analysis. The fitted model is a logistic curve with the lowest value fixed at 0 and 3 parameters (*b*, *d*, *e*).

surface occupied by perithecia was explained by a log-logistic model with minimum value fixed at 0 and three parameters (*b*: slope, *d*: plateau, and *e*: ED50), with $b = -1.59 \times 10^{-3}$, $d = 0.39$ and $e = 2670$ (Figure 7). A plateau seems to be reached around 0.39 corresponding to 39% of pixels assigned to perithecia.

Unlike for microconidia spraying, no perithecia were formed 3 days after spraying with macroconidia or with mycelium fragments of OG0002 on CH0997. However, perithecia started to appear 2 weeks after spraying mycelium fragments or macroconidia. As expected, since they have the same mating type, no perithecia were formed at all after spraying with macroconidia or with mycelium fragments of OG0002 on CH0999.

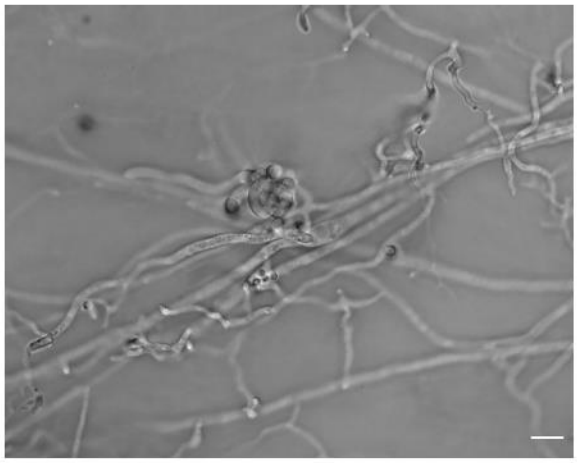


FIGURE 8 Inverted microscopy of ascogonium of the strain CH0997. Scale bar = 10 μm.

Production of fertilisation competent female gametes

Ascogonia were observed on female fertile strain thalli aged 11 days (Figure 8). To determine a putative minimum age for female receptivity, microconidia suspensions were sprayed on cultures of the female fertile

14622920, 0, Downloaded from https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1462-2920.16226 by CIRAD - DGDRS - DIST, Wiley Online Library on [21/10/2022]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

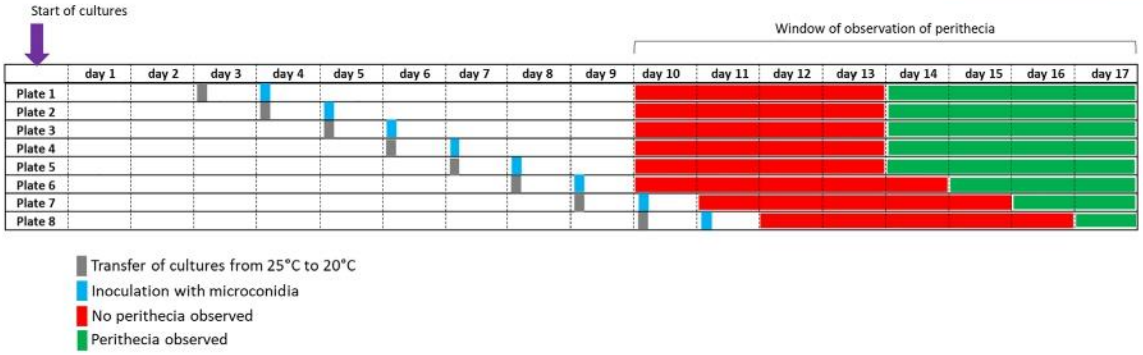


FIGURE 9 Time frame of perithecia development of strain CH0997 inoculated at different ages with spermatia of OG0002. Time scale corresponds to the number of days after the start of the culture of CH0997. The inoculation corresponds to the deposition of the microconidia suspension of OG0002 on the mycelial culture of CH0997.

strain CH0997 from 4 to 11 days after the starting of the culture. When the female fertile strain was grown for 7 days or more on RFA medium before inoculation (i.e., 6 days or more at 25°C and 1 day at 20°C), the formation of perithecia in those conditions occurred 6 days after spraying microconidia suspension. For younger cultures, that is, when the female fertile strain was grown 6 days or less on RFA medium before inoculation (i.e., 5 days or less at 25°C and 1 day at 20°C), it took more than 6 days for perithecia to be formed (7–10 days for cultures aged of 6–3 days, respectively; Figure 9). Hence, the age of the female thallus influences the ability to form perithecia.

DISCUSSION

The first aim of our study was to confirm that *P. oryzae* from different origins were capable of producing microconidia. The other aim was to determine whether, in *P. oryzae* life cycle, microconidia could play the role of spermatia, that is, the biological elements inducing fertilisation and perithecia formation on compatible and competent strains.

Among the three previous studies describing microconidia, Chuma et al. (2009) and Zhang et al. (2014) focused on a single strain (G10-1 and 70-15, respectively), whereas Kato et al. (1994) tested 45 strains from different host plants, without quantifying microconidia production. In our experiments, 10 out of the 12 studied strains produced microconidia in quantities varying from 2.07×10^4 to 1.10×10^9 per ml. It is worth to note that strains from both mating types were capable of producing microconidia. Furthermore, the capacity of producing microconidia did not seem to depend on the original host of the strain either, since strains collected from *Hordeum vulgare*, *Eleusine coracana* or *Oryza sativa* produced microconidia. Morphological observations of *P. oryzae* microconidia confirmed previous studies (Chuma et al., 2009; Kato et al., 1994): they are crescent-shaped hyaline and are two to four times smaller than macroconidia, which makes their observation harder and could explain why they were so scarcely reported in the literature.

Fertilising cells in Ascomycetes can be either unspecialised cells like macroconidia or mycelial fragments, or specialised cells, that is, microconidia (Pöggeler et al., 2018). Microconidia were proved to be spermatia in several Ascomycete species, including *Botrytis cinerea* (Fukumori et al., 2004) and *Neurospora crassa* (Maheshwari, 1999). In these two species, however, microconidia designate the male gametes, are able to germinate, and are distinct from macroconidia (often called conidia) which are asexual spores but can also be fertilising elements (Brun et al., 2021); hence both microconidia and macroconidia are spermatia in *B. cinerea* and *N. crassa*.

In *P. oryzae*, the role of microconidia as spermatia is commonly accepted, but this had never been demonstrated so far (Chuma et al., 2009; Zhang et al., 2014). Here, we demonstrate that in *P. oryzae*, microconidia are the only fertilising elements, hence that they are spermatia. Contrarily to macroconidia and mycelium fragments, only microconidia sprayed on a compatible female fertile strain led to the formation of perithecia after only 3 days. In addition, the number of perithecia formed was positively correlated to the number of microconidia sprayed, confirming that microconidia have the capacity to induce perithecia formation. Reaching a plateau of perithecium formation despite growing numbers of sprayed spermatia suggests that the number of female gametes competent for fertilisation could be the limiting parameter. Although no microconidia were observed for two strains (CH0052 and BF0056), they induced the formation of perithecia on female fertile strains of the opposite mating type. We hypothesised that the two strains produce quantities of microconidia that are below the detection threshold of the counting method, that is, 4000 microconidia per ml. The apparition of perithecia after spraying

14622920, 0, Downloaded from https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1462-2920.16216 by CIRAD - DGDRS - DIST, Wiley Online Library on [21/10/2022]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

macroconidia or mycelium fragments of the male strains on a female-compatible strain was clearly delayed (15 days compared to 3 days after spraying microconidia). We hypothesised that the female strain has been fertilised by microconidia produced de novo by new thalli resulting from the growth of mycelium fragments or macroconidia germination. However, we cannot exclude that a yet unknown alternative way of fertilisation may take place when macroconidia or mycelium fragments are sprayed.

We observed that the age of the female thallus influenced its ability to produce perithecia when inoculated with spermatia of a compatible strain (Figure 9). In our conditions, a minimum age of 7 days of culture is required for female thalli to be able to produce perithecia when sprayed with spermatia. This minimum age could correspond to the time needed for female gametes to differentiate. In *Podospora anserina*, male and female gametes start to differentiate after 3 days of growth on minimal medium at optimal temperature (Coppin et al., 1997; Silar, 2011). In *P. oryzae*, other parameters such as temperature or nutrient supplies might probably also play a role on the time needed for female thalli to become competent.

Before the present study, microconidia had never been observed in our laboratory conditions despite successful in vitro crossing between strains. One explanation could be the low quantity of microconidia produced on RFA medium (the medium routinely used for growing strains and performing in vitro crosses; Nottéghem & Silué, 1992). Here, we used the modified protocol of Zhang et al. (2014) to obtain high quantity of microconidia. Sporulation is a highly variable developmental process subjected to many environmental parameters. In *N. crassa*, several external factors such as humidity, temperature or starvation have an effect on male gamete production (Debuchy et al., 2010; Maheshwari, 1999). For instance, a low concentration of carbon source and a shift from high to low temperature also facilitates the production of microconidia in *N. crassa* (Ebbole & Sachs, 1990; Rossier et al., 1977). The production of microconidia in *P. oyyzae* might also rely on specific conditions, which might be related to the fact that sexual reproduction was seldom observed in nature.

Ten strains that produced microconidia in our conditions showed significant differences in the quantity of microconidia produced. The strains OG0002 and OG0003, that were isolated from *Eleusine corocana* in the same field, produced more microconidia than other. Confirming the difference of production of microconidia between strains from different host-specific groups will require additional studies. However, differences within host-specific groups of *P. oryzae* are also worth documenting. For example, in this study, we observed significant quantitative differences in the production of microconidia between strains isolated from rice. Male fertility likely depends not only on the original host but also on the reproduction mode of the populations or genetic groups sampled. If spermatia have no other role than fertilisation, their production is expected to decrease and to be lost in populations that are no longer experiencing sexual reproduction. *P. oryzae* populations from rice allow to test this hypothesis and to investigate the heritability and genetic bases of microconidia production.

The demonstration of the role of microconidia as spermatia allows to reconsider the definition of male fertility in *P. oryzae*. Until now, male fertility was only defined as the capacity of a strain to induce perithecia formation on a strain of opposite mating type in a cross (Nottéghem & Silué, 1992; Saleh et al., 2012a). There are several limitations to this initial definition. The use of a female auxiliary strain is necessary to assess male fertility, which introduces an additional variable parameter. A second limitation is the potential existence of prezygotic barriers. Here, we define male fertility of *P. oryzae* strains as the ability of a strain to produce male gametes (i.e., microconidia), and without crossing with a reference strain. Counting the spermatia produced will in addition permit a quantitative phenotyping of male fertility.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors want to thank the ImagoSeine facility, member of the France BioImaging infrastructure supported by the French National Research Agency (ANR-10-INSB-04, 'Investments for the future '). AL was supported by grants of INRAE and CIRAD.

REFERENCES

Biju-Duval M.P. (1994) Etude de la structure génétique des populations du champignon pathogène des graminées *Magnaporthe grisea*. PhD Thesis, University Paris 6. p. 156.

Billiard, S., López-Villavicencio, M., Hood, M.E. & Giraud, T. (2012) Sex, outcrossing and mating types: unsolved questions in fungi and beyond: sexy fungi. *Journal of Evolutionary Biology*, 25, 1020–1038.

Bistis, G.N. (1983) Evidence for diffusible, mating-type-specific trichogyne attractants in *Neurospora crassa*. *Experimental Mycology*, 7, 292–295.

Bistis, G.N. (1996) Trichogynes and fertilization in uni- and bimating type colonies of *Neurospora tetrasperma*. *Fungal Genetics and Biology*, 20, 93–98.

Boddy, L. (2016) Pathogens of autotrophs. In: *The fungi*. Oxford, UK: Elsevier, pp. 245–292.

Bruggeman, J., Debets, A., Wijngaarden, P., De Visser, J.A. & Hoekstra, R.F. (2003) Sex slows down the accumulation of deleterious mutations in the homothallic fungus *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 164, 479–485.

Brun, S., Kuo, H.C., Jeffree, C.E., Thomson, D.D. & Read, N. (2021) Courtship ritual of male and female nuclei during fertilization in *Neurospora crassa*. *Microbiology spectrum*, 9(2), 00335-21.

Chuma, I., Shinogi, T., Hosogi, N., Ikeda, K., Nakayashiki, H., Park, P. et al. (2009) Cytological characteristics of microconidia of *Magnaporthe oryzae*. *Journal of General Plant Pathology*, 75, 353–358.

Coppin, E., Debuchy, R., Arnaise, S. & Picard, M. (1997) Mating types and sexual development in filamentous ascomycetes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(4), 411–428.

14622920, 0, Downloaded from https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1462-2920.16216 by CIRAD - DGDRS - DIST, Wiley Online Library on [21/10/2022]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

Couch, B.C., Fudal, I., Lebrun, M.-H., Tharreau, D., Valent, B., van Kim, P. et al. (2005) Origins of host-specific populations of the blast pathogen *Magnaporthe oryzae* in crop domestication with subsequent expansion of pandemic clones on rice and weeds of rice. *Genetics*, 170, 613–630.

De Meeûs, T., Prugnolle, F. & Agnew, P. (2007) Asexual reproduction: genetics and evolutionary aspects. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64, 1355–1372.

Dean, R.A., Talbot, N.J., Ebbole, D.J., Farman, M.L., Mitchell, T.K., Orbach, M.J. et al. (2005). The genome sequence of the rice blast fungus Magnaporthe grisea. *Nature*, 434(7036), 980–986. https://doi.org/10.1038/nature03449

Debuchy, R., Berteaux-Lecellier, V. & Silar, P. (2010) Mating systems and sexual morphogenesis in ascomycetes. In: Borkovich, E., & Ebbole, D.J. (Eds.) *Cellular and molecular biology of filamentous fungi*. Washington, USA: American Society of Microbiology, pp. 501–535.

Ebbole, D. & Sachs, M.S. (1990) A rapid and simple method for isolation of *Neurospora Crassa* homokaryons using microconidia. *Fungal Genetics Reports*, 37, 7.

Fukumori, Y., Nakajima, M. & Akutsu, K. (2004) Microconidia act the role as spermatia in the sexual reproduction of *Botrytis cinerea*. *Journal of General Plant Pathology*, 70, 256–260.

Gladieux, P., Condon, B., Ravel, S., Soanes, D., Maciel, J.L.N., Nhani, A. et al. (2018a) Gene flow between divergent cereal- and grass-specific lineages of the Rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *mBio*, 9, e01219-17.

Gladieux, P., Ravel, S., Rieux, A., Cros-Arteil, S., Adreit, H., Milazzo, J. et al. (2018b) Coexistence of multiple endemic and pandemic lineages of the rice blast pathogen. *mBio*, 9, e01806-17.

Kanamori, M., Kato, H., Yasuda, N., Koizumi, S., Peever, T.L., Kamakura, T. et al. (2007) Novel mating type-dependent transcripts at the mating type locus in *Magnaporthe oryzae*. *Gene*, 403, 6–17.

Kato, H., Mayama, S., Sekine, R., Kanazawa, E., Izutani, Y., Urashima, A., & Kunoh, H. (1994) Microconidium formation in magnaporthe grisea. *Annals of the Phytopathological Society of Japan,* 60, 175–185.

Kato, H., Yamamoto, M., Yamaguchi-Ozaki, T., Kadouchi, H., Iwamoto, Y., Nakayashiki, H. et al. (2000) Pathogenicity, mating ability and DNA restriction fragment length polymorphisms of pyricularia populations isolated from gramineae, bambusideae and zingiberaceae plants. *Journal of General Plant Pathology*, 66(1), 30–47. https://doi.org/10.1007/pl00012919

Klaubauf, S., Tharreau, D., Fournier, E., Groenewald, J.Z., Crous, P.W., de Vries, R.P. et al. (2014) Resolving the polyphyletic nature of *Pyricularia* (Pyriculariaceae). *Studies in Mycology*, 79, 85–120.

Latorre, S.M., Reyes-Avila, C.S., Malmgren, A., Win, J., Kamoun, S. & Burbano, H.A. (2020) Differential loss of effector genes in three recently expanded pandemic clonal lineages of the rice blast fungus. *BMC Biology*, 18, 88.

Leung, H. (1988). Genetic analysis of virulence in the rice blast fungusMagnaporthe grisea. *Phytopathology*, 78(9), 1227. https://doi.org/10.1094/phyto-78-1227

Maheshwari, R. (1999) Microconidia of *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*, 26, 1–18.

Nottéghem, J.L. & Silué, D. (1992) Distribution of the mating type alleles in *Magnaporthe grisea* populations pathogenic on rice. *Phytopathology*, 82, 421–424.

Ou, S.H. (1985) *Rice diseases*, 2nd edition. Slough, UK: Commonwealth Agricultural Bureau, pp. 109–201.

Peraza-Reyes, L. & Malagnac, F. (2016) Sexual development in fungi. In: Wendland, J. (Ed.) *Growth, differentiation and sexuality*. Cham: Springer International Publishing, pp. 407–455.

Pöggeler, S., Nowrousian, M., Teichert, I., Beier, A. & Kück, U. (2018) Fruiting-body development in ascomycetes. In: Anke, T. & Schüffler, A. (Eds.) *Physiology and genetics*. Cham: Springer International Publishing, pp. 1–56.

Ritz, C., Baty, F., Streibig, J.C. & Gerhard, D. (2015) Dose-response analysis using R. *PLoS One*, 10, e0146021.

Rossier, C., Ton-That, T. & Turian, G. (1977) Microcyclic microconidiation in *Neurospora crassa*. *Experimental Mycology*, 1, 52–62.

Saleh, D., Milazzo, J., Adreit, H., Fournier, E. & Tharreau, D. (2014) South-East Asia is the center of origin, diversity and dispersion of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *The New Phytologist*, 201, 1440–1456.

Saleh, D., Milazzo, J., Adreit, H., Tharreau, D. & Fournier, E. (2012a) Asexual reproduction induces a rapid and permanent loss of sexual reproduction capacity in the rice fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*: results of in vitro experimental evolution assays. *BMC Evolutionary Biology*, 12, 42.

Saleh, D., Xu, P., Shen, Y., Li, C., Adreit, H., Milazzo, J. et al. (2012b) Sex at the origin: an Asian population of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* reproduces sexually. *Molecular Ecology*, 21, 1330–1344.

Savary, S., Willocquet, L., Pethybridge, S.J., Esker, P., McRoberts, N. & Nelson, A. (2019) The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature Ecology & Evolution*, 3, 430–439.

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T. et al. (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9, 676–682.

Silar, P. (2011) Grafting as a method for studying development in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Fungal Biology*, 115(8), 793–802.

Stukenbrock, E.H. & McDonald, B.A. (2008) The origins of plant pathogens in agro-ecosystems. *Annual Review of Phytopathology*, 46, 75–100.

Tanaka, M., Nakayashiki, H., & Tosa, Y. (2009). Population structure of Eleusine isolates of Pyricularia oryzae and its evolutionary implications. *Journal of General Plant Pathology*, 75(3), 173–180. https://doi.org/10.1007/s10327-009-0158-0

Tharreau, D., Fudal, I., Andriantsimialona, D., Santoso, Utami, D., Fournier, E., Lebrun, M.-H. et al. (2009) World population structure and migration of the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. In: Wang, G.-L. & Valent, B. (Eds.) *Advances in genetics, genomics and control of rice blast disease*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 209–215.

Thierry, M., Charriat, F., Milazzo, J., Adreit, H., Ravel, S., Cros-Arteil, S. et al. (2022). Maintenance of divergent lineages of the Rice Blast Fungus Pyricularia oryzae through niche separation, loss of sex and post-mating genetic incompatibilities. *PLOS Pathogens*, 18(7), e1010687. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010687

Valent, B., Crawford, M.S., Weaver, C.G. & Chumley, F.G. (1986) *Genetic studies of fertility and pathogenicity in Magnaporthe grisea (Pyricularia oryzae)*. USA: Iowa State Journal of Research.

Zeigler, R.S. (1998) Recombination in *Magnaporthe grisea*. *Annual Review of Phytopathology*, 36, 249–275.

Zhang, H., Wu, Z., Wang, C., Li, Y. & Xu, J.R. (2014) Germination and infectivity of microconidia in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Nature Communications*, 5, 4518.

How to cite this article: Lassagne, A., Brun, S., Malagnac, F., Adreit, H., Milazzo, J., Fournier, E. et al. (2022) Male fertility in *Pyricularia oryzae*: Microconidia are spermatia. *Environmental Microbiology*, 1–11. Available from: https://doi.org/10.1111/1462-2920.16226

14622920, 0, Downloaded from https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1462-2920.16226 by CIRAD - DGDRS - DIST, Wiley Online Library on [21/10/2022]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

3. Conclusion et perspectives

L'objectif de cet article était d'identifier les spermaties chez notre espèce modèle.

Premièrement, la production de microconidies a été observée pour plusieurs souches et également quantifiée. Cela nous a permis de mettre en évidence une différence de production significative entre les différentes souches testées. Nous avons pu observer les phialides (hyphe porteur des microconidies) et caractériser la morphologie des microconidies en comparaison aux conidies (spores asexuées chez *P. oryzae*).

Deuxièmement, grâce à la quantification des microconidies nous avons pu ensemencer une souche femelle fertile avec différentes concentrations de microconidies et observer une corrélation de type dose-réponse entre le nombre de microconidies ensemencées et le nombre de périthèces formés, et ainsi monter le rôle fécondant en tant que spermaties des microconidies.

La caractérisation des spermaties chez *P. oryzae* nous a servi de base de phénotypage pour déterminer les bases génétiques impliquées dans la fertilité mâle étudiées dans le chapitre 2.

Chapitre 2 :

Identification des bases génétiques de la fertilité mâle chez *Pyricularia oryzae*

Lassagne A., Adreit H., Malagnac F., Charriat F., Dumartinet T., Parinello H., Gonzalez A-A., Tharreau D. and Fournier E. (2023) Identification of genetic bases of male fertility in *Pyricularia oryzae* by Genome Wide Association study (GWAS)

1. Présentation générale

Ce deuxième chapitre de thèse porte sur l'identification des bases génétiques de la fertilité mâle et, plus précisément, de la production de microconidies chez *P. oryzae* par une « Genome Wide Association Study » (GWAS).

Les résultats présentés ci-dessous ont fait l'objet d'une fructueuse collaboration entre différentes personnes de l'Institute for Integrative Biology of the Cell de Saclay, le Plant Health Institute of Montpellier, ainsi que de la plateforme de séquençage MGX, conduisant à l'écriture d'un article de recherche en préparation, intitulé **Identification of genetic bases of male fertility in *Pyricularia oryzae* by Genome Wide Association Study**.

L'objectif de cet article était d'identifier les bases génétiques de la production de microconidies qui sont les spermaties chez *P. oryzae*. Pour cela, nous avons mesuré la production de microconidies pour 71 souches d'une population recombinante avec le protocole de production de microconidies mis au point dans le chapitre 1. En parallèle, le génome des 71 souches a été séquencé puis une table de marqueur SNPs a été générée. Nous avons ensuite utilisé une approche de GWAS pour essayer de corréler la variation de la production de microconidies entre les souches et la variation génotypique, et ainsi trouver des régions impliquées dans le trait.

2. Article : Identification of genetic bases of male fertility in *Pyricularia oryzae* by Genome Wide Association Study

Identification of genetic bases of male fertility in *Pyricularia oryzae* by Genome Wide Association study (GWAS).

Authors:

Alexandre Lassagne [a,b], Henri Adreit [a], Fabienne Malagnac [c], Florian Charriat [b], Thomas Dumartinet [a,b], Hugues Parinello [d], Anne-Alicia Gonzalez [d], Didier Tharreau [a] and Elisabeth Fournier [b]

Affiliations

a. Plant Health Institute of Montpellier (PHIM), CIRAD, TA A120/K, 34398 Montpellier, France

b. Plant Health Institute of Montpellier (PHIM), University of Montpellier, CIRAD, INRAE, IRD, Institut Agro Montpellier, 34398 Montpellier, France

c. Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, 91118 gif-sur-Yvette, France

d. Montpellier Genomix (MGX), c/o Institut de Génomique Fonctionnelle, UMR 5203 CNRS – U 1191 INSERM – Université de Montpellier, 141, rue de la cardonille, 34094 Montpellier Cedex 05, France

Introduction

The potential of a pathogen population to adapt to its environment is driven by evolutionary forces, among which recombination is key to reassort existing parental alleles and generate new genotypes (McDonald and Linde, 2002). Sexual reproduction is the main mechanism producing recombination at the genome scale. In the phytopathogenic fungus *Pyricularia oryzae* (syn. *Magnaporthe oryzae*), sexual reproduction has never been observed in the field, whatever the host specificity of the population. However, evidences from biological, genetic and genomic studies of populations isolated from rice suggest that sexual reproduction took place or is still taking place in limited areas of the Himalaya foothills (the putative center of origin of *P. oryzae*; Zeigler, 1998), some populations present in this area exhibiting footprints of recombination (Saleh et al., 2012; Gladieux et al., 2018; Thierry et al., 2022). These populations belong to a single lineage. The three other genetic lineages that have spread worldwide are clonal (Saleh et al., 2012; Gladieux et al., 2018; Thierry et al., 2022) and show all genetic and biological characteristics of asexual populations. Whether the loss of sexual reproduction is a cause or a consequence of the spread of these lineages outside the center of origin is still a matter of debate. To understand the evolution of the reproduction mode of populations, a preliminary step is to better characterize the genetic determinants of fertility.

In Ascomycete fungi, the ability to reproduce sexually requires two conditions: the production of functional sexual cells, i.e. male and female gametes, and the recognition, meeting and fusion between these gametes. Recognition and encounter of a male gamete (either contained in antheridia, or present as individualized specialized cells called spermatia) with a female gamete (the ascogonium) is the starting point of the fertilization process. This process is governed by hormonal attraction, and is controlled by a single mating-type locus with two alternative versions in heterothallic fungi (Metzenberg and Glass, 1990). These idiomorphs comprise genes encoding proteins with an HMG-box DNA binding motif that regulate the expression of genes involved in the pheromone/receptor machinery. The mating-type system therefore rules the meeting and fusion of gametes (Debuchy et al., 2010). In *P. oryzae*, the two idiomorphs of the *MAT1* locus (*MAT1.1* and *MAT1.2*) correspond to 2 and 3 genes respectively, one of them encoding an unrelated protein containing an alpha-box DNA binding domain (Kanamori et al.,

2007). Proteins encoded by HMG-box genes are transcription factors able to bind DNA, facilitate nucleoprotein assembly (Giese et al., 1992), and its role in gamete production vary between species (Koopman, 2010). The mating-type system is not necessary for the production of gametes in *Podospora anserina* (Coppin et al., 1993) or in *Neurospora crassa* (Ferreira et al., 1998). On the contrary to mating type genes, the genetic determinants governing gamete production in Ascomycetes remain poorly characterized. Some genes involved in spermatia production have been identified, such as *SsNsd* in *Sclerotinia sclerotiorum* (Li et al., 2018) or H3K27 histone methyltransferase genes in *P. anserina* (Carlier et al., 2021). These genes usually have pleiotropic effects. In *P. oryzae*, the implication of the mating-type system in the production of male gametes was not assessed, and more generally, only two genes involved in PMK1 MAP kinase signalization cascade were linked to male fertility. In fact, deletion of *pmk1*, encoding the MAP kinase 1, and *MoMCM1*, encoding a MADS-box transcription factor, lead to male sterility (Zhang et al., 2014; Zhou et al., 2011). In this species, specialized crescent-shaped cells called microconidia were recently shown to be the male fertilizing elements (i.e. the spermatia), and male fertility was therefore defined as the ability to produce microconidia (Lassagne et al., 2022). Here we aimed at characterizing the genetic determinants governing the production of microconidia in *P. oryzae*.

Two complementary strategies have successfully been used to identify genes involved in fertility in fungi: reverse and forward genetics. Apart from reverse genetics approaches based on transcriptomic analyses (Garg and Jain, 2013; Riaño-Pachón et al., 2021; Strickler et al., 2012), reverse genetics requires that genes governing the trait of interest have been characterized in one or several model species, and therefore assumes that the genetic processes underlying the trait of interest are similar in the model and focal species. Combined with comparative genomics, such candidate genes approaches allow considerable insights in the understanding of sexual reproduction in Ascomycetes (Ellena et al., 2020; Passer et al., 2022). However, such candidate-genes strategies do not allow to bring to light other uncharacterized genes potentially involved in the phenotypic trait of interest. Alternatively, forward genetic approaches allow detecting the genetic determinants of a given trait without a priori. Contrary to reverse approaches, forward approaches aim to link genotypes to phenotypes by detecting statistical

correlations between genotypic markers and phenotypic observations in recombinant controlled or wild populations. These approaches have long been restricted to Quantitative Trait Loci (QTL) analyses based on progeny of controlled sexual crosses between parents with contrasted phenotypes, including in fungi (Foulongne-Oriol, 2012). Genome Wide Association Studies (GWAS) approaches have later been used. GWAS was initially developed to face the necessity of understanding human genetic diseases with no access to controlled crosses (Hirschhorn and Daly, 2005). This method aims to detect significant associations between allelic frequencies at polymorphic positions (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) along the genome and phenotypic status for a given quantitative trait in wild recombinant populations. It overcomes two limitations of QTL approaches by avoiding the time-consuming production of laboratory-controlled progenies and by giving access to many more generations of recombination. Within the Fungal kingdom, GWAS proved its efficacy in several model and non-model species, notably in understanding the genetic architecture of adaptation to the host (Dumartinet et al., 2022; Plissonneau et al., 2017; Sánchez-Vallet et al., 2018), resistance to fungicides (Mohd-Assaad et al., 2016; Sanglard, 2019; Spanner et al., 2021), or communication between germinating neighbor conidia (Palma-Guerrero et al., 2013). To our knowledge, fertility in fungi has never been investigated using GWAS. Here, we used this approach to determine the genetic bases of male fertility in *P. oryzae*.

Material and Methods

Strains of Pyricularia oryzae

Seventy-one strains of *P. oryzae* from a single population sampled in the locality of Yule in Yunnan Province of China in 2008 and 2009 (Saleh et al., 2012) were characterized in this study. This population, belonging to the recombinant lineage 1 described in Thierry et al. (2022), was shown to be highly recombinant and suspected to be sexually reproducing (Saleh et al., 2012; Thierry et al., 2022).

DNA extraction, sequencing, mapping and SNP calling

DNA was extracted as described in Ali et al. (2021). Preparation of libraries and Illumina NovaSeq 6000 sequencing was performed at Montpellier GenomiX (MGX), resulting in paired-end reads of 150 bp. For each sequenced strain, genomic reads were mapped on GUY11 PacBio reference genome with masked repeated elements (Bao et al., 2017; BioSample: SAMN06050153). We choose GUY11 genome as a reference since this strain belongs to the same genetic lineage as the strains studied here. Mappings were performed with bwa mem v.0.7.17 and filtered with samtools v.1.10 (Danecek et al., 2021) for a mapping quality q=20 (Annexe 1: Script1). Mapping quality was assessed with samtools v.1.10 (Danecek et al., 2021) and html-formatting of the report was performed with multiqc v.1.9 (Ewels et al., 2016; Annexe 1: Script2). SNP calling was performed using bcftools v.1.10.2 (Danecek et al., 2021) for a minimum depth of 10 reads per position and per individual, and a phred-scaled score above 30. SNPs were filtered for a Minimum Allele Frequency above 5%, and the insertions / deletions were removed. Sites with more than 10% of missing data were deleted (Annex 1: Script3). Synteny between the 13 longest (>800 kb) scaffolds of GUY11 reference genome and 70-15 reference genome (Dean et al., 2005; BioSample: SAMN02953596; Supp. Figure 1) was assessed with SyMAP (Soderlund et al., 2006; 2011).

Population structure and LD decay

The population structure of the 71 strains was inferred by a Principal Components Analysis (PCA) using the R packages vcfR v.1.12.0 (Knaus and Grünwald, 2016) and adegenet v.2.1.7 (Jombart, 2008). Linkage disequilibrium (LD) decay was assessed with the PopLDdecay software (Zhang et al., 2019), first by calculating pairwise r^2 between all pairs of SNPs with a maximum distance of 300 kb, then by calculating the mean r^2 value between equally distant pairs of SNPs, then by averaging all values in adjacent windows of 10 bp. Nucleotide diversity (Pi) was calculated with EggLib v. 1.2 (De Mita and Siol, 2012) from the raw vcf file containing both invariant and variable sites filtered for a maximum missing data of 10% and a minimum depth of 10 reads per position and per individual.

Microconidia production phenotyping

Microconidia were produced following the protocol described in Lassagne et al. (2022). Briefly, young mycelium grown on Rice Flour medium (20 g of rice flour, 15 g of Bacto agar, 2 g of Bacto Yeast Extract in 1 L pure water with 500,000 U of penicillin G after autoclaving for 20 min at 120°C) was put in 40 mL fresh homemade Potatoes Dextrose Broth (PDB). PDB was prepared with 200 g of sliced organic potatoes boiled during 30 minutes in 800 mL pure water, filtrated through multi-layer gauze, completed with 20 g glucose and replenished to 1 L. Liquid cultures were incubated during 3 days at 25°C then 6 days at 20°C with permanent shaking (150 rpm). After removing the mycelium by filtration on Miracloth filter paper (22 µm), preparations were centrifuged at 4,500g for 15 min and microconidia were pelleted and re-suspended in 1 mL sterile distilled water (Annex 2). The number of microconidia per mL was counted twice with a Malassez cell under optic microscope (X40). Two cultures per strain, considered as independent biological replicates, were carried out. The 71 strains were distributed in 9 batches corresponding to different lots of fresh PDB and dates of experiment. To control for a possible batch effect, 11 strains were duplicated in different batches.

Genome-wide association study and local score approach analyses

GWAS was performed with the software TASSEL v.5.0 (Bradbury et al., 2007). We used a Mixed Linear Model (MLM) accounting for genetic relatedness using kinship between strains, estimated using the centered identity-by-step algorithm. The variant component procedure was used to estimate σ^2_a and σ^2_e using restricted maximum likelihood, from the equation:

$$Var(Y) = \sigma^2_a K + R$$

where Var(Y) is the phenotypic variance of the production of microconidia, σ^2_a the genetic variance, K the kinship matrix, and R the residual effect. Under the hypothesis of homogeneous variance, $R= I\sigma^2_e$, where I is an identity matrix and σ^2_e is the unknown residual variance. Broad sense heritability defined

as the proportion of genetic variance over the total variance was calculated as follows: $h^2 = \sigma^2_a / (\sigma^2_a + \sigma^2_e)$.

A p-value of genotype-phenotype association was considered significant when it was smaller than the threshold calculated using the Dunn-Šidák method (Šidák, 1967), calculated as:

$$-\log10[1-(1-\alpha)^{1/N}]$$

with α the Type I error (here 0.05) and N the number of SNP analyzed.

To get a better resolution on sub-significant peaks of p-values, we used the local score method (Fariello et al., 2017). This method is designed to cumulate local association signals based on p-values found with GWAS method, and is efficient in detecting loci with moderate to small effects (Bonhomme et al., 2019). The aim of the local score method is to identify the genome segments that have a higher density of SNPs with medium to high signal of association, compared with the rest of the genome. The ξ parameter determines the range of p-values contributing to the local score: if p_i is the p-value of the i^{th} locus, then the score is taken as $X_i = -\log10(p_i) - \xi$, meaning that only p-values under $10^{-\xi}$ will contribute positively to the score and p-values above will substract from the signal. the distribution of p-values was considered as non-uniform, hence resampling based on Gumbel distribution was performed to approximate a null distribution. We retained ξ=1 and a Type I error risk of α=1 % as local score parameters.

Statistical analyses

The microconidia production data were transformed in log(p+1) to reach normality of residues and homoscedasticity. An analysis of variance (ANOVA) using a linear model was performed with the lm function implemented in R. The model used was:

$$Y_{ijk} = \mu + a_i + b_j + c_k + E_{ijk}$$

where Y_{ijk} is the logarithm of the production of microconidia, μ is the intercept term, a_i the random genotype effect of genotype i, b_j the replicate effect in replicate j, c_k the effect of batch k and E_{ijk} the

residuals term. This model was used to adjust the phenotypic values with the Least Square means (LSmeans) procedure using the lsmeans R package (Lenth, 2016)

Analysis of genomic regions associated with microconidia production

Local LD was assessed with the open source software LDBlockShow (Dong et al., 2021) in the genomic regions significantly associated with microconidia production. To precisely identify the candidate genes in these regions, we performed *de novo* gene prediction from the GUY11 assembly using BRAKER1 and AUGUSTUS v3.0.3 software (Hoff et al., 2016), with the same RNA-sequencing data for gene prediction as in Pordel et al. (2021). Gene models of GUY11 (including 5,000 bp upstream and downstream of the gene) were compared to their homologs in the 70-15 reference genome (Dean et al., 2005). For the most significant candidate region, to overcome possible errors of annotation, gene models were, when necessary, corrected for start, stop and introns positions with the 70-15 reference genome or *de novo*, so that the coding sequences (CDS) correspond to functional (non-interrupted) protein sequences. For each gene in this most significant candidate region, polymorphic sites in the 71 strains of the GWAS population were then extracted from the vcf using the coordinates of the corrected gene model in the GUY11 reference genome (Table 1).

To infer haplotype groups in the most significant candidate region, we used Multiple Correspondence Analysis (MCA) implemented in the FactoMineR package (Lê et al., 2008) using the SNP markers significantly associated to the production of microconidia. We performed an ANOVA to test for the effect of the haplotype group on the phenotypic values of the 71 strains, and used Tukey tests for pairwise comparisons of the mean phenotypic value per haplotypic group.

Results

Genetic diversity, population structure and recombination within the P. oryzae *population*

The total number of reads per strain (in million) ranged from 10.9 to 85.9 with a mean of 20.9 and a median of 19.3 (i.e. total sequence per isolate ranging from 1.6 to 12.9 Gb with a mean of 3.1 and a median of 2.9 Gb). Reads were mapped on the GUY11 reference genome with repeated elements masked, and only reads with a mapping quality above 30 were retained. For all strains, at least 75% of the reads mapped on the GUY11 genome, covering more than 80% of it, and leading to a mean mapping depth from 36X to 278X per strain (median 63X; GUY11 genome size of 42.87 Mb according to Bao et al., 2017; Supp. Figure 2). After filtration, 19,331 high-confidence SNPs distributed on the 56 scaffolds of the GUY11 genome were identified among the 71 strains. To optimize calculation time, all subsequent analyses were performed on the 16,220 SNPs from the 13 longest scaffolds (> 800 kb) of GUY11, which had a cumulative size of 37 Mb, representing 86.3% of the GUY11 genome size.

The PCA showed a lack of genetic structure among individuals (Supp. Figure 3). Therefore, all strains were kept in further analyses. LD decreased rapidly with physical distance between markers. The fit of a logarithm regression $y=a.\ln(x) + b$ (with a = -0.068 and b = 0.9434) to the LD decay resulted in a half-LD decay distance of 3.2 kb (Supp. Table 1, Supp. Figure 4), showing a high recombination rate among the population. Nucleotide diversity within the population, Pi (assessed on 31,834,555 nucleotides including 35,277 polymorphic sites) was estimated at $2x10^{-04}$ per site, which agreed with the $2.11x10^{-04}$ value estimated by Gladieux et al. (2018) for the *P. oryzae* recombinant lineage (to which the studied population belongs to).

Phenotypic variability

The strain effect on the production of microconidia was significant, as shown by analysis of variance ($F=32.34$, $P<2\times10^{-16}$, $Df=70$). Although the production of microconidia seemed to be more variable between replicates for some strains than others (e.g. CH1019; Supp. Figure 5), the effect of the technical replicate was not significant ($F=3.43$, $P=0.067$, $Df=1$). The batch effect, estimated using the

11 strains repeated in different batches, was significant (F=63.3, $P<2\times10^{-16}$, Df=8). We corrected for this batch effect using the lsmean method. The corrected value of microconidia production, hereafter expressed in log(1 + number of microconidia per mL), remained highly variable between strains (overall mean, median, and variance: 12.2, 12.0, and 3.5 respectively; Figure 1). Some strains produced high quantities of microconidia, e.g. CH1073, CH1152 and CH1110 (16.2, 16.3 and 17.6, respectively), whereas others were low producers, e.g. CH1093 and CH1126 (8.3 and 8.8, respectively). The broad sense heritability for the production of microconidia was estimated at 0.032.

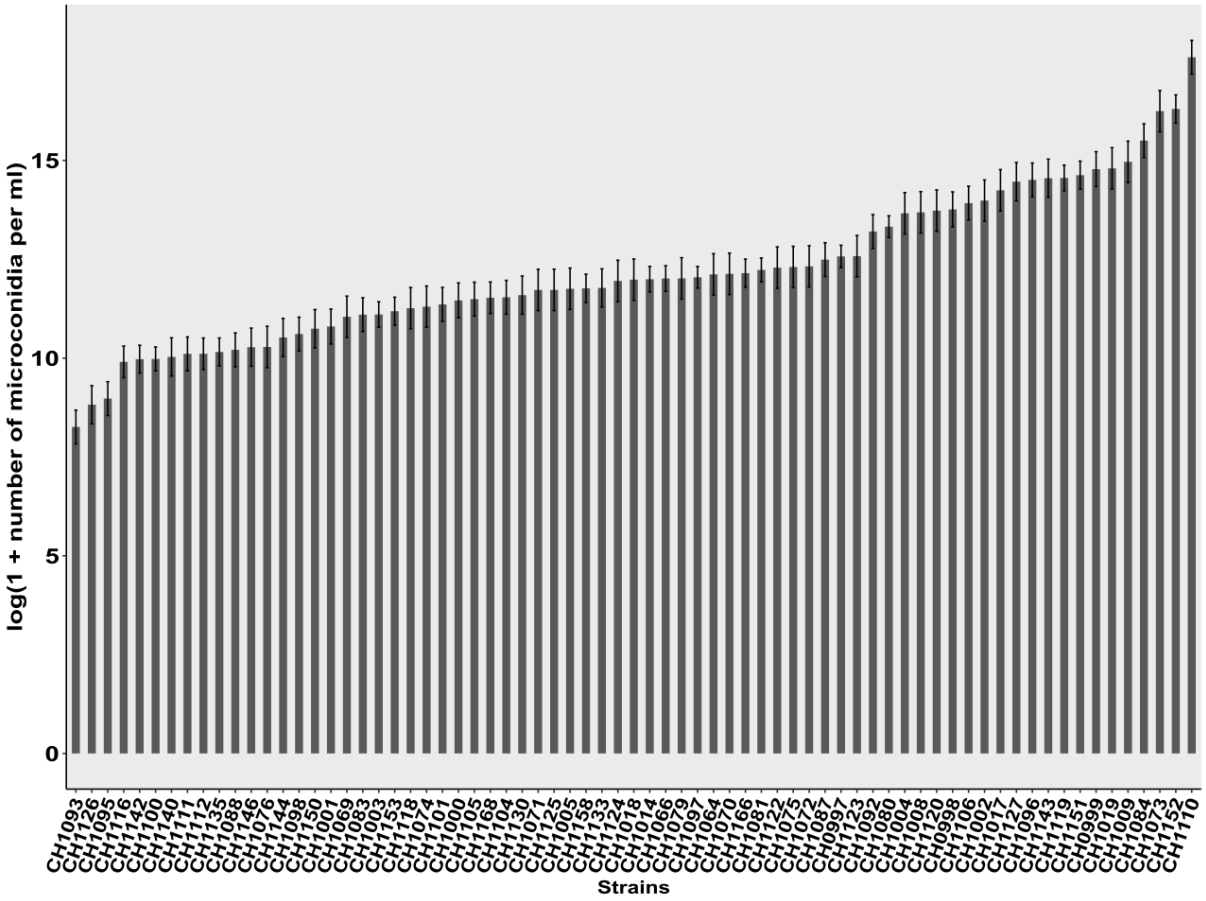


Figure 1: Production of microconidia of 71 strains of *P. oryzae*. The 71 strains were isolated from rice in Yule (Yunnan Province of China). The microconidia production is represented as log(1+ number of microconidia per mL) corrected with the lsmean method. The standard deviation per strain is represented on each barplot.

Association mapping

GWAS analysis was done on the 71 individuals using a mixed linear model that included a kinship matrix. The mating-type of each strain was verified biologically by *in vitro* crosses. We used this mating-type phenotype as a positive control of GWAS, since the position of the MAT locus is known in the 70-15genome. The mating-type phenotype was significantly associated with a peak on scaffold 8 between positions 794,254 and 798,440 of GUY11 genome. This position corresponds to the MAT locus of the 70-15 reference genome located on chromosome 7 between positions 772,852 and 778,251.

We tested the association between the logarithm of the lsmean corrected values of production of microconidia as phenotypic information [log(1 + number of microconidia per mL)], and the polymorphism of 12,725 SNPs (biallelic, with no missing data) as genotypic information. No SNP marker was significantly associated to the microconidia production when the Dunn-Šidák p-value threshold (here, $-\log[1-(1-0.05)^{1/12,725}] = 5.40$) was considered (Figure 2). However, a peak of sub-significant p-values was observed on scaffold 10. The most significant association was at position 917,921 with a -log10(p-value) of 3.04. This peak was significant when the local score analysis was applied (Figures 2 and 3). The SNP marker at position 966,561 had a local score of 129.5, that is, 10 times higher than the local score threshold of 12.5. The markers above the local score threshold defined a genomic region of 254.60 kb starting from marker at position 924,990 and ending at the last marker of the scaffold at position 1,179,586. This region included 347 SNP markers (Figure 4).

The local score approach allowed detecting additional associated SNP markers on scaffold 4 (Figures 2 and 3) forming two adjacent peaks above the local threshold (6.8). For the first peak on scaffold 4, the highest local score was 11.3, corresponding to marker at position 3,021,046. The size of the region above the local score threshold was 99.21 kb (from marker at position 2,997,644 to marker at position 3,096,850). This region included 29 SNP markers (Figure 3). The second peak on scaffold 4 included 162 markers, the highest local score being 17.48 at position 4,007,290. Markers above the threshold defined a region of 511.46 kb starting at position 3,617,045 and ending at position 4,128,509 (Figure 3).

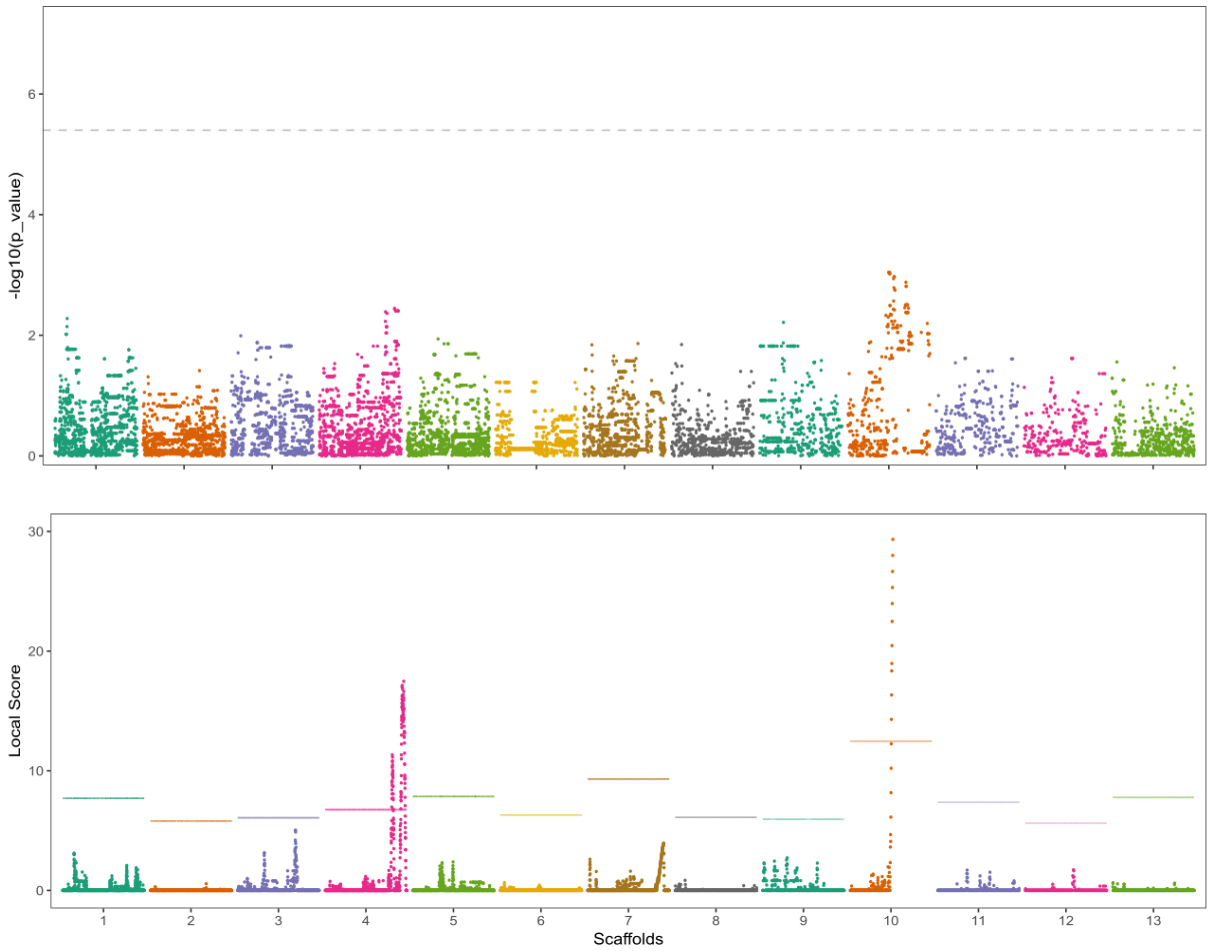


Figure 2: Genome-wide association mapping for microconidia production in *P. oryzae*. Upper panel: Manhattan plot of GWAS showing association p-values for each SNP marker. P-values (vertical axis) are expressed in -log10. GWAS was performed with a mixed linear model including kinship matrix. The grey dashed line indicates the significance threshold after Dunn-Šidák correction with an α risk of 0.05 ($-\log[1-(1-0.05)^{1/12,725}] = 5.40$). Lower panel: Manhattan plot showing SNP marker local score values. The local score values were calculated with $\xi = 1$ after re-sampling based on the Gumbel law to assume a Gaussian distribution of p-values. The horizontal dashed line corresponds to the scaffold-wide local score threshold with an α risk of 0.01.

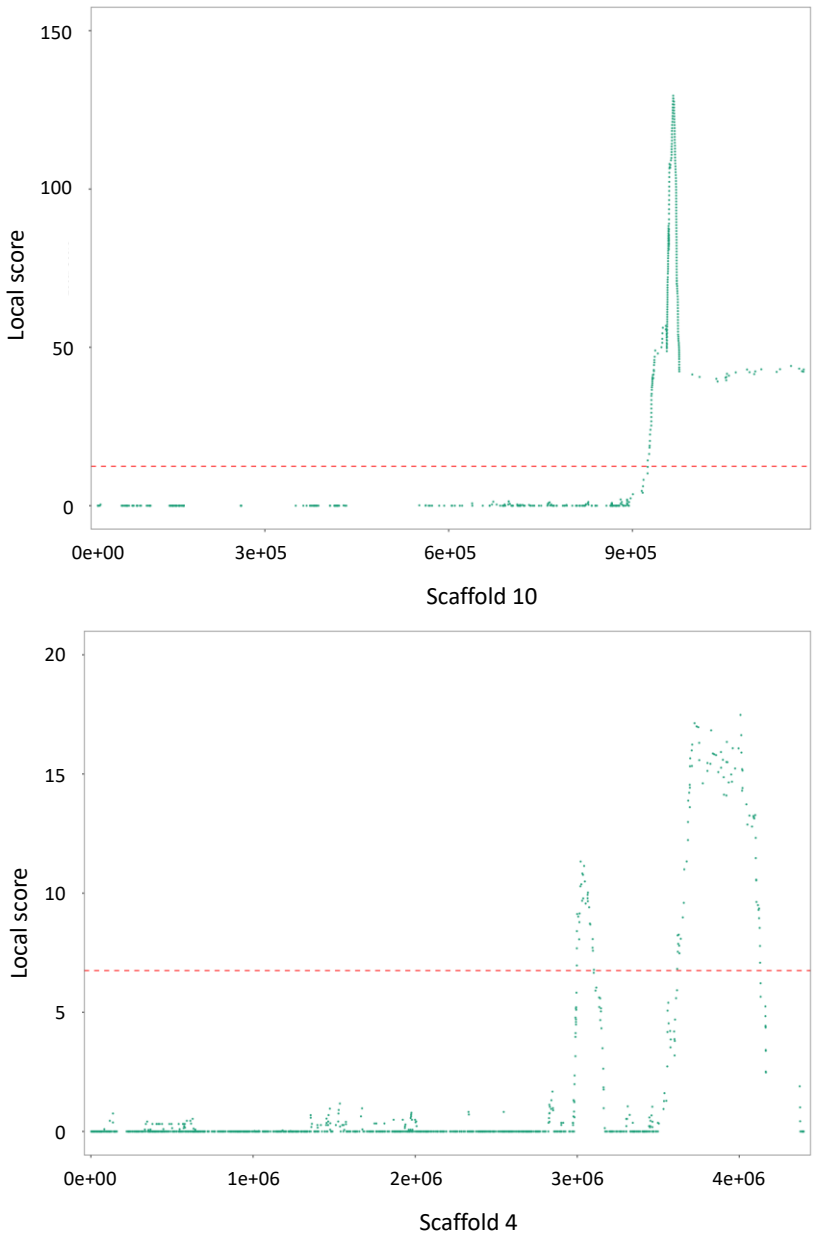


Figure 3: Manhattan plots of local score analysis showing SNP marker local score values for scaffolds 10 and 4 of GUY11. The scaffold-wide local score thresholds for scaffolds 10 (10.47; upper panel) and 4 (6.75, lower panel) are represented by horizontal dashed lines.

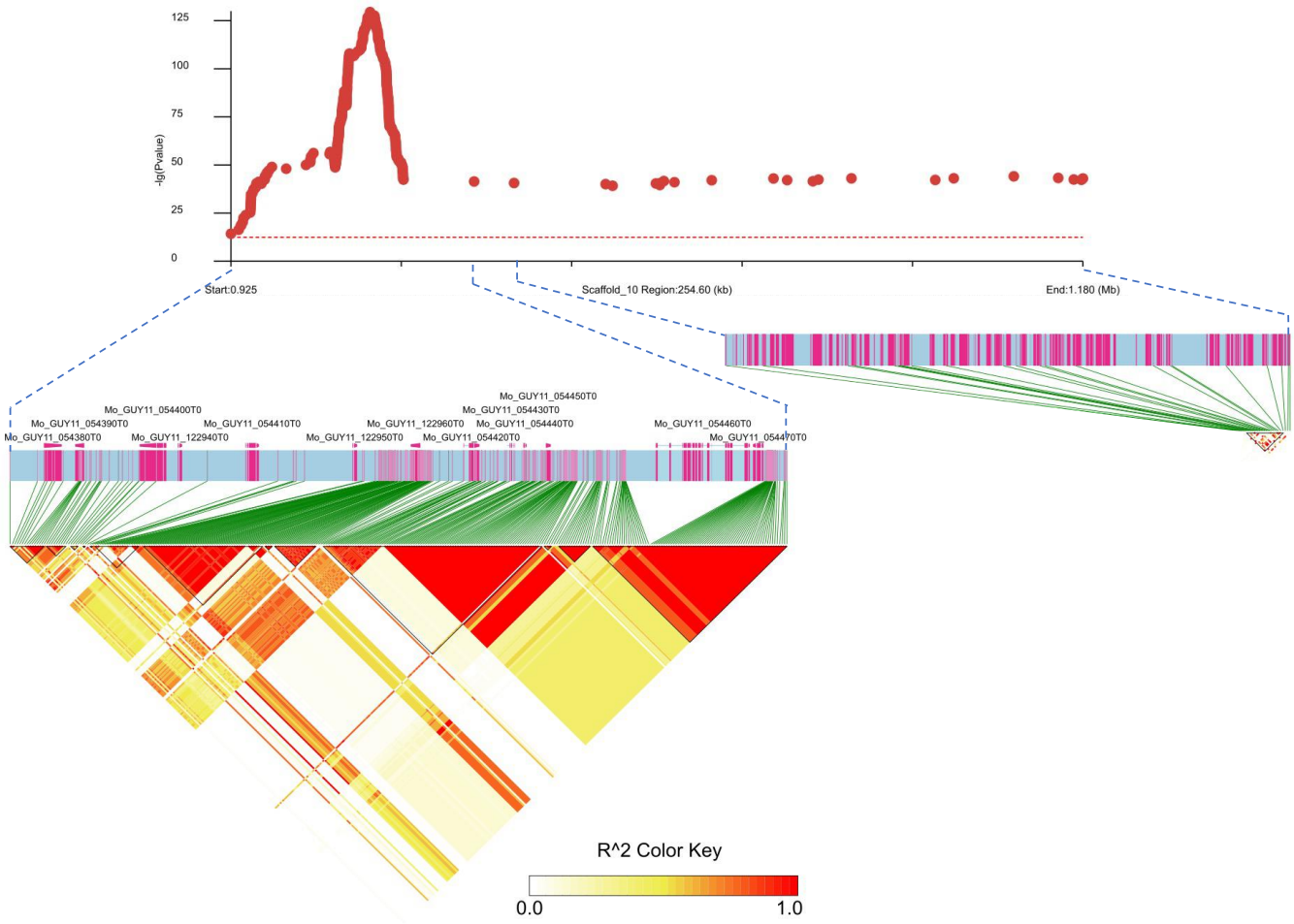


Figure 4: LD blocks contained in the associated region on scaffold 10 determined with the local score method. Upper panel: Manhattan plot of local score analysis on scaffold 10 (red dashed line: scaffold-wide local score threshold = 10.47). Left lower panel: LD blocks contained in the 65.05 kb peak region spanning 321 SNP markers. Right lower panel: LD block contained in the 140.55 kb tail region spanning 26 SNP markers.

Region on scaffold 10

When focusing on the region on scaffold 10 that had highest values of local score, we observed a region with a low-density of markers at the tail of the scaffold corresponding to a sub-telomeric region (Figures 3 and 4). The 26 markers from position 1,039,034 to position 1,179,586 formed a separated LD block, and were not considered in further analyses. Hence, the candidate region was reduced to 65.05 kb containing 321 SNP markers (from position 924,990 to position 990,038). Twelve coding genes and one pseudogene were present in this region (Figure 4). The corrected gene models for each candidate coding gene in both reference genomes are summed up in Table 1. The marker with the highest local score value was situated in the gene Mo_GUY11_054430T0. The clustering analysis of multilocus

genotypes based on the 321 SNPs markers defined three haplotypic groups (Figure 5A). The production of microconidia was significantly correlated with the assignation of strains to these haplotypic groups (ANOVA: F=4.76, P = 0.01, Df=2). Haplotypic group 1 produced significantly more microconidia than haplotypic group 2 (Tukey test: P = 0.008), whereas the production of microconidia by strains assigned to the haplotypic group 3 was not significantly different from the two other groups (Tukey tests: 1 vs 3, P = 0.80; 2 vs 3, P = 0.57; Figure 5B). A detailed analysis of the polymorphism within the 65.05 kb region revealed that, from position 924,990 to position 966,561, group 1 and group 2 had different haplotypes, whereas, from position 966,831 to position 990,038, they globally shared the same haplotype (Sup. Figure 6).

Among the twelve predicted genes (the sequences of these genes in the GUY11 genome are in Annex 3), only one had a predicted function in the 70-15 genome (Mo_GUY_054400 / MGG_02049, encoding an Interferon-induced GTP-binding protein Mx2; Table 2). PFAM domains were detected in seven other genes: a protein Kinase domain in Mo_GUY_054380 (MGG_02051), a GH43 Pc3Gal43A-like domain in Mo_GUY_054390 (MGG_02050), an oxidoreductase domain in Mo_GUY_122940 (MGG_16015), a WH2 domain in Mo_GUY_054410 (MGG_02047) a DIOX_N domain in Mo_GUY_122960 (MGG_16014), a JmjC domain in Mo_GUY_054420 (MGG_02045) and a BTB domain in Mo_GUY_054450 (MGG_02043).

Table 1: Putative genes in the candidate region associated with microconidia production on GUY11 scaffold 10.

GUY11 reference genome						70-15 reference genome						
Gene ID	Scaffold	Start	Stop	Length (bp)	Strand	Gene ID	Chromosome	Start	Stop	Length (bp)	Strand	Correction[1]
Mo_GUY11_054380	10	927822	929318	1497	-	MGG_02051	1	393105	395039	1935	+	No
Mo_GUY11_054390	10	930093	931202	1110	+	MGG_02050	1	391659	392768	1110	+	Yes
Mo_GUY11_054400	10	935840	938079	2240	+	MGG_02049	1	384782	387021	2240	+	No
Mo_GUY11_122940	10	939051	939395	345	+	MGG_16015	1	383466	383690	225	+	No
Mo_GUY11_054410	10	944594	946455	1862	-	MGG_02047	1	376406	378267	1862	+	Yes
Mo_GUY11_122950	10	953656	954046	391	-	MGG_13692	1	368872	369201	330	+	No
Mo_GUY11_122960	10	958537	959340	804	+	MGG_16014	1	363621	364385	765	-	No
Mo_GUY11_054420	10	960874	964289	3416	-	MGG_02045	1	358633	362047	3415	+	Yes
Mo_GUY11_054430	10	966804	967511	708	+	MGG_16012	1	355412	356119	708	-	Yes
Mo_GUY11_054440	10	967968	968239	272	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	No
Mo_GUY11_054450	10	969851	970258	408	-	MGG_02043	1	351965	353190	1065	+	No
Mo_GUY11_054470	10	987189	988068	880	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	No

[1]: to overcome possible errors of annotation in GUY11 genome, gene models were, when necessary, corrected for start, stop and introns positions, so that the coding sequences (CDS) correspond to functional (non-interrupted) protein sequences.

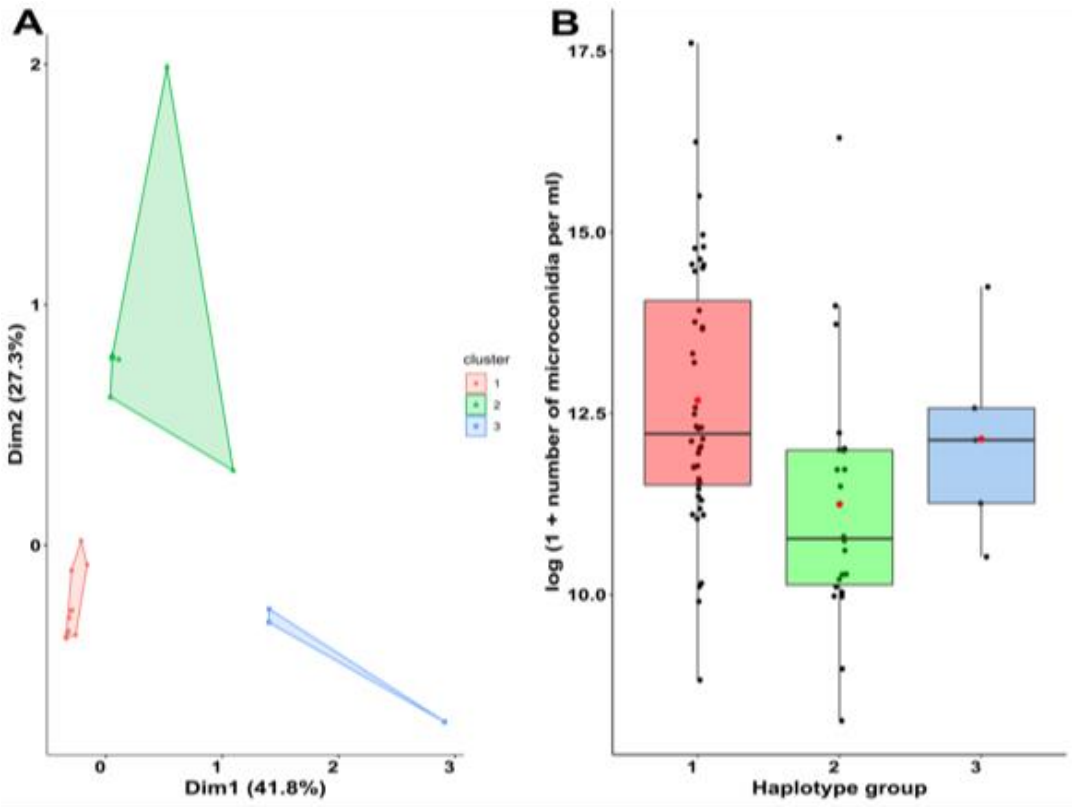


Figure 5: Clustering of strains based on genotypes at the peak associated region on scaffold 10. A: Multiple Correspondence Analysis performed on the 321 most associated SNPs identify three haplotypic groups. B: Boxplot of phenotypic values of strains assigned to each haplotypic group (mean and median value for each group are shown by red point and horizontal black line, respectively).

Only five genes showed polymorphism among the 71 strains in the CDS region (Mo_GUY11_054380, Mo_GUY11_054390, Mo_GUY11_122960, Mo_GUY11_054420, Mo_GUY11_054400; Table 2). Among these five genes, Mo_GUY11_054420, which contained the JmjC domain and was located 2.5kb upstream of the SNP with the highest local score, and Mo_GUY11_122960 were the most polymorphic and presented respectively 10 and 11 nucleotide mutations. The ratio of the number of mutations on the CDS length was respectively 0.0030 and 0.0137 mutations/bp, whereas the mean of the twelve genes was 0.0019. Mo_GUY11_054420 contained nine non-synonymous mutations that lead to nine protein sequences whereas Mo_GUY11_122960 contained seven non-synonymous mutations that lead to three protein sequences. Mo_GUY_054380,

Mo_GUY11_054400, and Mo_GUY_054390 had 2, 1 and 4 non-synonymous mutations respectively (Table 2). The non-synonymous mutation of Mo_GUY11_054400 was in the dynamin GTPase domain.

Discussion

In this study, we phenotyped 71 strains of a recombinant population of *P. oryzae* from Yule (Yunnan Province, China) for male fertility, and showed that this character segregated in the population and was heritable. The use of GWAS combined to Local Score approach was successful in detecting significant associations between this trait and three genomic regions. The narrowest region contains twelve predicted genes, one of them being a candidate of particular interest. Such a forward GWAS approach remains scarce in fungi, and to our knowledge, has never been applied for studying fertility traits.

The population chosen for this study clearly showed genomic footprints of recombination (as shown by LD decay analysis), which confirmed the results obtained by Thierry et al. (2022) with Genotyping By Sequencing markers. The values of LD decay and nucleotide diversities were also in agreement with what was observed by Gladieux et al. (2018) for the rice-attacking lineage 1, to which the population belongs to. The high recombination rate and high diversity observed in the Yule population confirmed that this population is adequate for GWAS analysis.

Table 2: Annotation of candidate genes

Gene ID	Synonymous / Non Synonymous mutations	CDS length (pb)	Number of alternative proteic sequences	70-15 homologue	Protein function from 70-15 annotation	Predicted domain (Pfam / InterProScan / Uniprot search)	Putative function of homologue protein in other species	NCBI Domain search
Mo_GUY_054380	2/2	1497	3	MGG_02051	Uncharacterized	CAMK protein kinase	CAMK protein kinase	Serine-threo kinase, similar to protein CELE_K09C6 6
Mo_GUY_054390	4/4	1110	2	MGG_02050	Uncharacterized	GH43 Pc3Gal43A-like		
Mo_GUY_054400	0/1	2136	2	MGG_02049	Interferon-induced GTP-binding protein Mx2	Dynamin-type guanine nucleotide-binding domain, Interferon-induced GTP-binding protein Mx2	Putative vacuolar sorting protein VPS1, dynamin-2, Dynamin, GTPase domain, mitochondrial fission & membrane fusion	Proteins of the dynamin family catalyze membrane fission during clathrin-mediated endocytosis
Mo_GUY_122940	0/0	276	1	MGG_16015	Uncharacterized	Oxidoreductase	FAD-binding/transporter-associated domain-like	
Mo_GUY_054410	0/0	1737	1	MGG_02047	Uncharacterized	C2H2-type domain, WH2 domain	Actin-cytoskeleton organisation	
Mo_GUY_122950	0/0	306	1	MGG_13692	Uncharacterized		Breast carcinoma amplified sequence 2 (BCAS2)	
Mo_GUY_122960	4/7	804	3	MGG_16014	Uncharacterized	DIOX_N domain-containing protein		
Mo_GUY_054420	1/9	3315	9	MGG_02045	Uncharacterized	JmJ domain	JmjC domain-containing histone demethylation protein	The JmjC domain belongs to the Cupin superfamily.
Mo_GUY_054430	0/0	609	1	MGG_16012	Uncharacterized			Septal ring assembly protein ZapB; provisional
Mo_GUY_054440	0/0	177	1	NA	Uncharacterized	NA		
Mo_GUY_054450	0/0	408	1	MGG_02043	Uncharacterized	BTB domain-containing protein		SKP1/BTB/POZ domain superfamily, versatile protein-protein interaction motif involved in many cellular functions, including transcriptional regulation, cytoskeleton dynamics, ion channel assembly and gating, and targeting proteins for ubiquitination
Mo_GUY_054470	0/0	720	1	NA	Uncharacterized		Class I SAM-dependent methyltransferase	Class I SAM-dependent methyltransferases catalyze the methylation of one or more specific substrates using S-adenosyl-L-methionine as the methyl donor

The phenotyping of male gamete production showed that this trait, that we equate to male fertility, segregated in the studied population and was heritable, albeit weakly. The significant batch effect highlighted by the analysis of variance indicated that environmental variation could highly impact the production of microconidia, at least in our experimental conditions. Previous studies on other fungal species also showed that the production of male gametes tightly relies on available resources (Debuchy et al., 2010; Wilson et al., 2019). Resource availability could result in the complete lack of microconidia production, and consequently, of sexual reproduction, in peculiar conditions. The potential role of environmental conditions in the emergence and spread of clonal lineages in *P. oryzae* (Gladieux et al., 2018; Saleh et al., 2014; Thierry et al., 2022) remains to be deciphered. The environmental effects also likely contribute to the low heritability of male fertility observed in this study.

The low heritability of the studied trait might be one reason why classical GWAS failed to detect any significant association between SNPs and the production of microconidia. In our study, the combination of GWAS with the Local Score approach allowed to circumvent this limitation, proving that this approach is a powerful tool for the detection of the genomic bases of weakly heritable traits, and an efficient alternative to QTL analyses. Indeed, QTL approaches are risky for traits related to fertility, because the necessity to cross parents with extreme phenotypes (i.e. in our case: high- / low-microconidia producers) jeopardizes the success of the cross itself and the obtention of enough progeny. Furthermore, QTL approach provides a lower genomic resolution than GWAS and is restricted to the allelic diversity of the two parents (Borevitz and Nordborg, 2003).

In *P. oryzae*, studies on microconidia production and more globally on male fertility are limited to observation (Chuma et al., 2009) and demonstration of their fertilizing role (Lassagne et al., 2022). Genetic bases of fertility have been scarcely explored for female fertility through perithecia production and asci formation (Lee et al., 2021; Li et al., 2016). Furthermore, in these studies, the genetic bases of fertility have been discovered by reverse genetic thanks to homologous genes already identified in other fungal species (Peraza-Reyes and Malagnac, 2016). Here, combining GWAS with local score allowed the discovery of three genomic regions significantly associated to microconidia production. One of these three genomic regions (on GUY11 scaffold 10) is a good candidate for further studies since it includes

the markers most significantly associated with the phenotype, is highly resolutive (65.05 kb-wide region containing 321 SNPs), and contain a limited number of coding-genes (12).

In the region of interest, Mo_GUY_054420 is the most promising candidate gene. This gene and the marker most significantly associated to the phenotype are physically close (2.5 kb) and belong to the same LD block (half LD decay of 3.2kb). A more detailed analysis of multilocus genotypes in the LD block shows that Mo_GUY_054420 is located in the region where markers are polymorphic between the two phenotypic clusters of strains that are significantly different for microconidia production. In addition, Mo_GUY_054420 was the most polymorphic gene in the region and showed also a high rate of non-synonymous mutations. Mo_GUY_054420 contains a JmjC domain. Although the gene function remains unknown, the Jumonji family protein present in Eukaryotes was shown to be involved in chromatin regulation and in many signaling pathway (Takeuchi et al., 2006). In *P. oryzae*, the gene MoJMJ1 (MGG_04878) encodes a histone demethylase containing a Jmjc domain. Deletion of MoJMJ1 reduced mycelial growth and asexual spore production, altered germ-tube formation and suppressed appressorium formation (Huh et al., 2017). In the region of interest, we also found the Mo_GUY_054380 gene whose role deserves to be functionally explored with regards to spermatium production. This gene encodes a putative Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase (CAMK), a class of serine/threonine-specific protein kinases that phosphorylates transcription factors. Some of the CAMK responding genes were shown to regulate cell life cycle and cytoskeleton network (Berchtold and Villalobo, 2014). Also potentially related to cytoskeleton organization, this study identified the gene Mo_GUY11_054400 which encodes a putative dynamin GTPase. Proteins endowed with a dynamin domain are essential to membrane fusion and fission, from endocytosis to organelle division. They are involved in microtubules organization and clathrin-mediated cell membrane invaginations to form budding vesicles (Antonny et al., 2016), a process that may be at work during formation of spermatium cells from syncytial hyphae. Importantly, none of the five genes of the interval of interest showing polymorphism in their CDS were previously identified as involved in male gametes differentiation.

This study confirmed that the Yule population, and more generally, population from the recombinant rice-attacking lineage 1, are male and female fertile (Saleh et al., 2012; Gladieux et al.,

2018; Thierry et al., 2022). Previous studies also showed that the three other rice-attacking lineages found worldwide were clonal, and that populations from these lineages exhibited low to null levels of female fertility and a single mating type. Thus, these populations were considered to reproduce only asexually. It could be interesting to phenotype populations from these clonal lineages for male fertility to test whether they have completely lost the biological ability to produce male gametes, and therefore, to perform sexual reproduction. In parallel, comparing the polymorphism in the candidate genes controlling male fertility in recombinant populations from lineage 1 and in clonal populations from lineages 2-4 would contribute to a better understanding of the causes, stochastic or adaptive, of the loss of fertility that accompanied the migration of clonal lineages all around the world.

Acknowledgements:

We thank Marie Leys and Stéphane de Mita for their helpful support in population genomic analyses (calculation of LD decay and Pi). This study was supported by grants from CIRAD and INRAE.

References cited:

Ali, S., Gladieux, P., Ravel, S., Adreit, H., Meusnier, I., Milazzo, J., Cros-Arteil, S., Bonnot, F., Jin, B., Dumartinet, T., Charriat, F., Lassagne, A., He, X., Tharreau, D., Huang, H., Morel, J.-B., Fournier, E., 202. Coevolution with spatially structured rice landraces maintains multiple generalist lineages in the rice blast pathogen. BioRXiv. https://doi.org/10.1101/2021.12.15.472812

Antonny, B., Burd, C., De Camilli, P., Chen, E., Daumke, O., Faelber, K., Ford, M., Frolov, V.A., Frost, A., Hinshaw, J.E., Kirchhausen, T., Kozlov, M.M., Lenz, M., Low, H.H., McMahon, H., Merrifield, C., Pollard, T.D., Robinson, P.J., Roux, A., Schmid, S., 2016. Membrane fission by dynamin: what we know and what we need to know. EMBO J 35, 2270–2284. https://doi.org/10.15252/embj.201694613

Bao, J., Chen, M., Zhong, Z., Tang, W., Lin, L., Zhang, X., Jiang, H., Zhang, D., Miao, C., Tang, H., Zhang, J., Lu, G., Ming, R., Norvienyeku, J., Wang, B., Wang, Z., 2017. PacBio sequencing reveals transposable elements as a key contributor to genomic plasticity and virulence variation in *Magnaporthe oryzae*. Molecular Plant 10, 1465–1468. https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.08.008

Berchtold, M.W., Villalobo, A., 2014. The many faces of calmodulin in cell proliferation, programmed cell death, autophagy, and cancer. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research 1843, 398–435. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.10.021

Bistis, G.N., 1981. Chemotropic interactions between trichogynes and conidia of opposite mating-type in *Neurospora crassa*. Mycologia 73, 959. https://doi.org/10.2307/3759806

Bonhomme, M., Fariello, M.I., Navier, H., Hajri, A., Badis, Y., Miteul, H., Samac, D.A., Dumas, B., Baranger, A., Jacquet, C., Pilet-Nayel, M.-L., 2019. A local score approach improves GWAS resolution and detects minor QTL: application to *Medicago truncatula* quantitative disease resistance to multiple Aphanomyces euteiches isolates. Heredity 123, 517–531. https://doi.org/10.1038/s41437-019-0235-x

Borevitz, J.O., Nordborg, M., 2003. The Impact of genomics on the study of natural variation in Arabidopsis. Plant Physiology 132, 718–725. https://doi.org/10.1104/pp.103.023549

Bradbury, P.J., Zhang, Z., Kroon, D.E., Casstevens, T.M., Ramdoss, Y., Buckler, E.S., 2007. TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. Bioinformatics 23, 2633–2635. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm308

Carlier, F., Li, M., Maroc, L., Debuchy, R., Souaid, C., Noordermeer, D., Grognet, P., Malagnac, F., 2021. Loss of EZH2-like or SU(VAR)3–9-like proteins causes simultaneous perturbations in H3K27 and H3K9 tri-methylation and associated developmental defects in the fungus *Podospora anserina*. Epigenetics & Chromatin 14, 22. https://doi.org/10.1186/s13072-021-00395-7

Chuma, I., Shinogi, T., Hosogi, N., Ikeda, K., Nakayashiki, H., Park, P., Tosa, Y., 2009. Cytological characteristics of microconidia of *Magnaporthe oryzae*. J Gen Plant Pathol 75, 353–358. https://doi.org/10.1007/s10327-009-0181-1

Coppin, E., Arnaise, S., Contamine, V., Picard, M., 1993. Deletion of the mating-type sequences in *Podospora anserina* abolishes mating without affecting vegetative functions and sexual differentiation. Molec. Gen. Genet. 241–241, 409–414. https://doi.org/10.1007/BF00284694

Danecek, P., Bonfield, J.K., Liddle, J., Marshall, J., Ohan, V., Pollard, M.O., Whitwham, A., Keane, T., McCarthy, S.A., Davies, R.M., Li, H., 2021. Twelve years of SAMtools and BCFtools. GigaScience 10, giab008. https://doi.org/10.1093/gigascience/giab008

De Mita, S., Siol, M., 2012. EggLib: processing, analysis and simulation tools for population genetics and genomics. BMC Genet 13, 27. https://doi.org/10.1186/1471-2156-13-27

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., Rehmeyer, 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., 2005. The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. Nature 434, 980–986. https://doi.org/10.1038/nature03449

Debuchy, R., Berteaux-Lecellier, V., Silar, P., 2010. Mating systems and sexual morphogenesis in Ascomycetes, in: Borkovich, Ebbole (Eds.), Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi. American Society of Microbiology, pp. 501–535. https://doi.org/10.1128/9781555816636.ch33

Dong, S.-S., He, W.-M., Ji, J.-J., Zhang, C., Guo, Y., Yang, T.-L., 2021. LDBlockShow: a fast and convenient tool for visualizing linkage disequilibrium and haplotype blocks based on variant call format files. Briefings in Bioinformatics 22, bbaa227. https://doi.org/10.1093/bib/bbaa227

Dumartinet, T., Ravel, S., Roussel, V., Perez-Vicente, L., Aguayo, J., Abadie, C., Carlier, J., 2022. Complex adaptive architecture underlies adaptation to quantitative host resistance in a fungal plant pathogen. Molecular Ecology 31, 1160–1179. https://doi.org/10.1111/mec.16297

Ellena, V., Sauer, M., Steiger, M.G., 2020. The fungal sexual revolution continues: discovery of sexual development in members of the genus *Aspergillus* and its consequences. Fungal Biol Biotechnol 7, 17. https://doi.org/10.1186/s40694-020-00107-y

Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S., Käller, M., 2016. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. Bioinformatics 32, 3047–3048. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354

Fariello, M.I., Boitard, S., Mercier, S., Robelin, D., Faraut, T., Arnould, C., Recoquillay, J., Bouchez, O., Salin, G., Dehais, P., Gourichon, D., Leroux, S., Pitel, F., Leterrier, C., SanCristobal, M., 2017. Accounting for linkage disequilibrium in genome scans for selection without individual genotypes: The local score approach. Mol Ecol 26, 3700–3714. https://doi.org/10.1111/mec.14141

Ferreira, A.V., An, Z., Metzenberg, R.L., Glass, N.L., 1998. Characterization of mat A-2, mat A-3 and deltamatA mating-type mutants of *Neurospora crassa*. Genetics 148, 1069–1079.

Foulongne-Oriol, M., 2012. Genetic linkage mapping in fungi: current state, applications, and future trends. Appl Microbiol Biotechnol 95, 891–904. https://doi.org/10.1007/s00253-012-4228-4

Garg, R., Jain, M., 2013. RNA-seq for transcriptome analysis in non-model plants, in: Rose, R.J. (Ed.), Legume Genomics, Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 43–58. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-613-9_4

Giese, K., Cox, J., Grosschedl, R., 1992. The HMG domain of lymphoid enhancer factor 1 bends DNA and facilitates assembly of functional nucleoprotein structures. Cell 69, 185–195. https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90129-Z

Gladieux, P., Ravel, S., Rieux, A., Cros-Arteil, S., Adreit, H., Milazzo, J., Thierry, M., Fournier, E., Terauchi, R., Tharreau, D., 2018. Coexistence of multiple endemic and pandemic lineages of the rice blast pathogen. mBio 9, e01806-17, /mbio/9/2/mBio.01806-17.atom. https://doi.org/10.1128/mBio.01806-17

Hirschhorn, J.N., Daly, M.J., 2005. Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. Nat Rev Genet 6, 95–108. https://doi.org/10.1038/nrg1521

Hoff, K.J., Lange, S., Lomsadze, A., Borodovsky, M., Stanke, M., 2016. BRAKER1: Unsupervised RNA-seq-based genome annotation with GeneMark-ET and AUGUSTUS. Bioinformatics 32, 767–769. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv661

Huh, A., Dubey, A., Kim, S., Jeon, J., Lee, Y.-H., 2017. MoJMJ1, encoding a histone demethylase containing JmjC domain, is required for pathogenic development of the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. The Plant Pathology Journal 33, 193–205. https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.11.2016.0244

Jombart, T., 2008. adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. Bioinformatics 24, 1403–1405. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn129

Kanamori, M., Kato, H., Yasuda, N., Koizumi, S., Peever, T.L., Kamakura, T., Teraoka, T., Arie, T., 2007. Novel mating type-dependent transcripts at the mating type locus in *Magnaporthe oryzae*. Gene 403, 6–17. https://doi.org/10.1016/j.gene.2007.06.015

Knaus, B.J., Grünwald, N.J., 2016. VcfR: a package to manipulate and visualize VCF format data in R. Bioinformatics. https://doi.org/10.1101/041277

Koopman, P., 2010. HMG domain superfamily of DNA -bending proteins: HMG, UBF, TCF, LEF, SOX, SRY and related proteins, in: John Wiley & Sons, Ltd (Ed.), ELS. Wiley. https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0002325.pub2

Lassagne, A., Brun, S., Malagnac, F., Adreit, H., Milazzo, J., Fournier, E., Tharreau, D., 2022. Male fertility in *Pyricularia oryzae*: microconidia are spermatia. Environmental Microbiology 1462-2920.16226. https://doi.org/10.1111/1462-2920.16226

Lê, S., Josse, J., Husson, F., 2008. FactoMineR: An R Package for multivariate analysis. J. Stat. Soft. 25. https://doi.org/10.18637/jss.v025.i01

Lee, S.H., Farh, M.E.-A., Lee, J., Oh, Y.T., Cho, E., Park, J., Son, H., Jeon, J., 2021. A Histone deacetylase, *Magnaporthe oryzae* RPD3, regulates reproduction and pathogenic development in the rice blast fungus. mBio 12, e02600-21. https://doi.org/10.1128/mBio.02600-21

Lenth, R.V., 2016. Least-squares means: The R Package lsmeans. J. Stat. Soft. 69. https://doi.org/10.18637/jss.v069.i01

Li, J., Mu, W., Veluchamy, S., Liu, Y., Zhang, Y., Pan, H., Rollins, J.A., 2018. The GATA-type IVb zinc-finger transcription factor SsNsd1 regulates asexual-sexual development and appressoria formation in *Sclerotinia sclerotiorum*. Molecular Plant Pathology 19, 1679–1689. https://doi.org/10.1111/mpp.12651

Li, M., Liu, X., Liu, Z., Sun, Y., Liu, M., Wang, X., Zhang, H., Zheng, X., Zhang, Z., 2016. Glycoside hydrolase MoGls2 controls asexual/sexual development, cell wall integrity and infectious growth in the rice blast fungus. PLoS ONE 11, e0162243. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162243

McDonald, B.A., Linde, C., 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. Annu. Rev. Phytopathol. 40, 349–379. https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.40.120501.101443

Metzenberg, R.L., Glass, N.L., 1990. Mating type and mating strategies in *Neurospora*. Bioessays 12, 53–59. https://doi.org/10.1002/bies.950120202

Mohd-Assaad, N., McDonald, B.A., Croll, D., 2016. Multilocus resistance evolution to azole fungicides in fungal plant pathogen populations. Mol Ecol 25, 6124–6142. https://doi.org/10.1111/mec.13916

Palma-Guerrero, J., Hall, C.R., Kowbel, D., Welch, J., Taylor, J.W., Brem, R.B., Glass, N.L., 2013. Genome wide association identifies novel loci involved in fungal communication. PLoS Genet 9, e1003669. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003669

Park, H.-S., Nam, T.-Y., Han, K.-H., Kim, S.C., Yu, J.-H., 2014. VelC positively controls sexual development in *Aspergillus nidulans*. PLoS ONE 9, e89883. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089883

Passer, A.R., Clancey, S.A., Shea, T., David-Palma, M., Averette, A.F., Boekhout, T., Porcel, B.M., Nowrousian, M., Cuomo, C.A., Sun, S., Heitman, J., Coelho, M.A., 2022. Obligate sexual reproduction of a homothallic fungus closely related to the *Cryptococcus* pathogenic species complex. eLife 11, e79114. https://doi.org/10.7554/eLife.79114

Peraza-Reyes, L., Malagnac, F., 2016. 16 Sexual development in fungi, in: Wendland, J. (Ed.), Growth, Differentiation and Sexuality. Springer International Publishing, Cham, pp. 407–455. https://doi.org/10.1007/978-3-319-25844-7_16

Plissonneau, C., Benevenuto, J., Mohd-Assaad, N., Fouché, S., Hartmann, F.E., Croll, D., 2017. Using population and comparative genomics to understand the genetic basis of effector-driven fungal pathogen evolution. Front. Plant Sci. 8. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00119

Pordel, A., Ravel, S., Charriat, F., Gladieux, P., Cros-Arteil, S., Milazzo, J., Adreit, H., Javan-Nikkhah, M., Mirzadi-Gohari, A., Moumeni, A., Tharreau, D., 2021. Tracing the origin and evolutionary history of *Pyricularia oryzae* infecting maize and barnyard grass. Phytopathology 111, 128–136. https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-20-0423-R

Riaño-Pachón, D.M., Espitia-Navarro, H.F., Riascos, J.J., Margarido, G.R.A., 2021. Modern approaches for transcriptome analyses in plants, in: Vischi Winck, F. (Ed.), Advances in Plant Omics and Systems Biology Approaches, Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer International Publishing, Cham, pp. 11–50. https://doi.org/10.1007/978-3-030-80352-0_2

Saleh, D., Milazzo, J., Adreit, H., Fournier, E., Tharreau, D., 2014. South-East Asia is the center of origin, diversity and dispersion of the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. New Phytol 201, 1440–1456. https://doi.org/10.1111/nph.12627

Saleh, D., Xu, P., Shen, Y., Li, C., Adreit, H., Milazzo, J., Ravigné, V., Bazin, E., Nottéghem, J.-L., Fournier, E., Tharreau, D., 2012. Sex at the origin: an Asian population of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* reproduces sexually. Molecular Ecology 21, 1330–1344. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05469.x

Sánchez-Vallet, A., Hartmann, F.E., Marcel, T.C., Croll, D., 2018. Nature's genetic screens: using genome-wide association studies for effector discovery. Mol Plant Pathol 19, 3–6. https://doi.org/10.1111/mpp.12592

Sanglard, D., 2019. Finding the needle in a haystack: Mapping antifungal drug resistance in fungal pathogen by genomic approaches. PLoS Pathog 15, e1007478. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007478

Šidák, Z., 1967. Rectangular confidence regions for the means of multivariate normal distributions. Journal of the American Statistical Association 62, 626–633. https://doi.org/10.1080/01621459.1967.10482935

Soderlund, C., Bomhoff, M., Nelson, W.M., 2011. SyMAP v3.4: a turnkey synteny system with application to plant genomes. Nucleic Acids Research 39, e68–e68. https://doi.org/10.1093/nar/gkr123

Soderlund, C., Nelson, W., Shoemaker, A., Paterson, A., 2006. SyMAP: A system for discovering and viewing syntenic regions of FPC maps. Genome Res. 16, 1159–1168. https://doi.org/10.1101/gr.5396706

Spanner, R., Taliadoros, D., Richards, J., Rivera-Varas, V., Neubauer, J., Natwick, M., Hamilton, O., Vaghefi, N., Pethybridge, S., Secor, G.A., Friesen, T.L., Stukenbrock, E.H., Bolton, M.D., 2021. Genome-wide association and selective sweep studies reveal the complex genetic architecture of DMI fungicide resistance in *Cercospora beticola*. Genome Biology and Evolution 13, evab209. https://doi.org/10.1093/gbe/evab209

Strickler, S.R., Bombarely, A., Mueller, L.A., 2012. Designing a transcriptome next-generation sequencing project for a nonmodel plant species. American Journal of Botany 99, 257–266. https://doi.org/10.3732/ajb.1100292

Takeuchi, T., Watanabe, Y., Takano-Shimizu, T., Kondo, S., 2006. Roles of jumonji and jumonji family genes in chromatin regulation and development. Dev. Dyn. 235, 2449–2459.

Thierry, M., Charriat, F., Milazzo, J., Adreit, H., Ravel, S., Cros-Arteil, S., borron, S., Sella, V., Kroj, T., Ioos, R., Fournier, E., Tharreau, D., Gladieux, P., 2022. Maintenance of divergent lineages of the rice blast fungus *Pyricularia oryzae* through niche separation, loss of sex and post-mating genetic incompatibilities. PLoS Pathog 18, e1010687. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010687

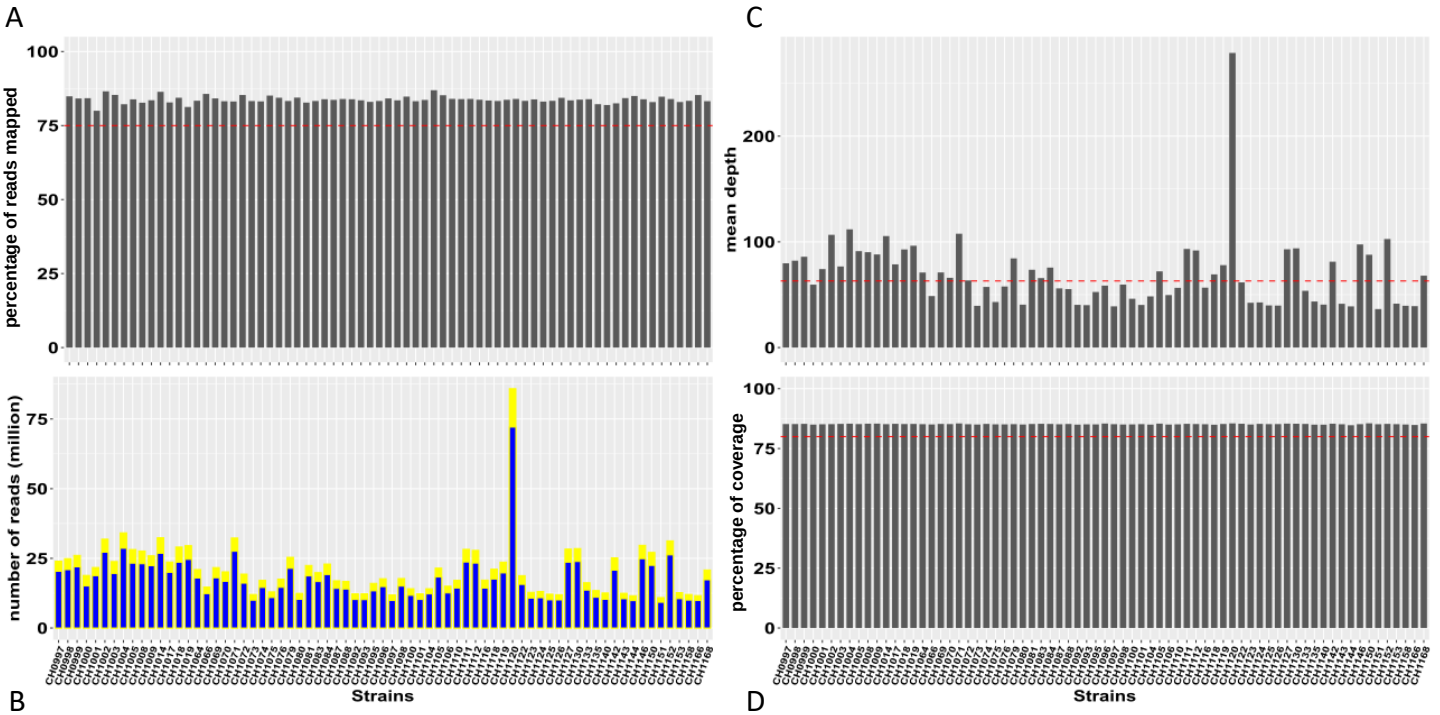
Wilson, Wilken, van der Nest, Wingfield, Wingfield, 2019. It's all in the Genes: the Regulatory pathways of sexual reproduction in filamentous Ascomycetes. Genes 10, 330. https://doi.org/10.3390/genes10050330

Zeigler, R.S., Scott, R.P., Leung, H., Bordeos, A.A., Kumar, J., Nelson, R.J., 1997. Evidence of parasexual exchange of DNA in the rice blast fungus challenges its exclusive clonality. Phytopathology 87, 284–294. https://doi.org/10.1094/PHYTO.1997.87.3.284

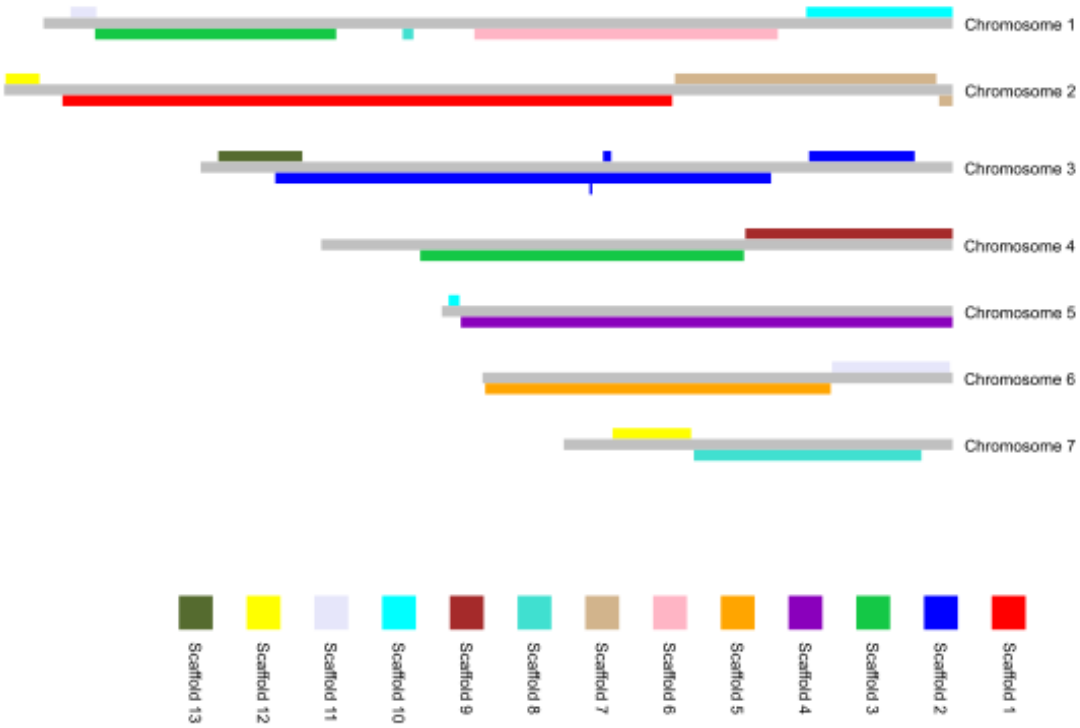
Zhang, C., Dong, S.-S., Xu, J.-Y., He, W.-M., Yang, T.-L., 2019. PopLDdecay: a fast and effective tool for linkage disequilibrium decay analysis based on variant call format files. Bioinformatics 35, 1786–1788. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty875

Zhang, H., Wu, Z., Wang, C., Li, Y., Xu, J.-R., 2014. Germination and infectivity of microconidia in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. Nat Commun 5, 4518. https://doi.org/10.1038/ncomms5518

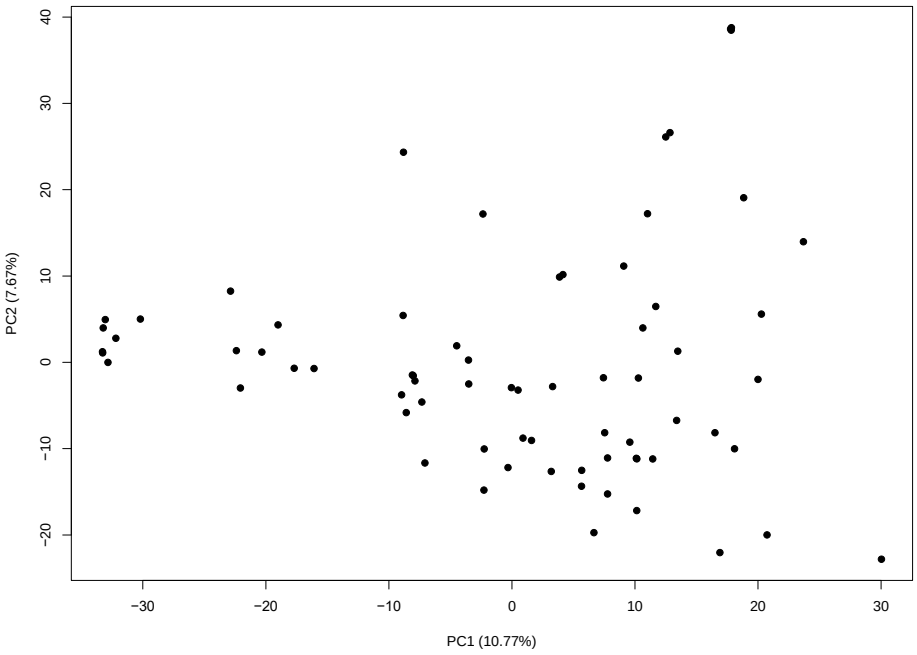
Zhou, X., Liu, W., Wang, C., Xu, Q., Wang, Y., Ding, S., Xu, J.-R., 2011. A MADS-box transcription factor MoMcm1 is required for male fertility, microconidium production and virulence in *Magnaporthe oryzae*. Molecular Microbiology 80, 33–53. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07556.x



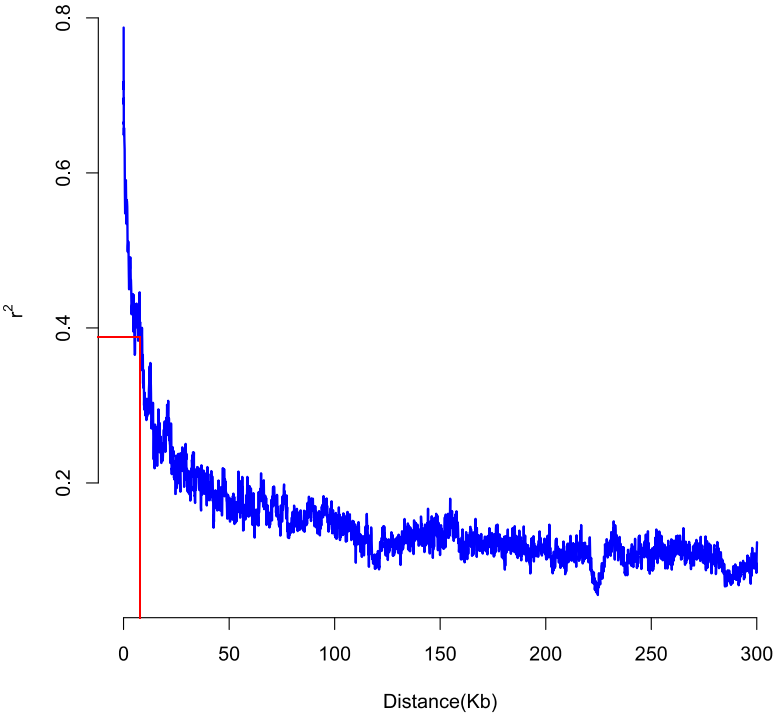
Supplementary Figure 1: Genome sequencing statistics of 71 *P. oryzae* strains. A: Percentage of reads mapped on the reference genome GUY11; the red dashed line is a threshold at 75%. B: Number of reads (in million) produced per strain (yellow + blue) and number of reads (in million) mapped on the reference (blue). C: Mean depth; the red dashed line is the global median (63X) of the 71 strains. D: Percentage of reference genome covered; the red dashed line is the threshold of 80% coverage.



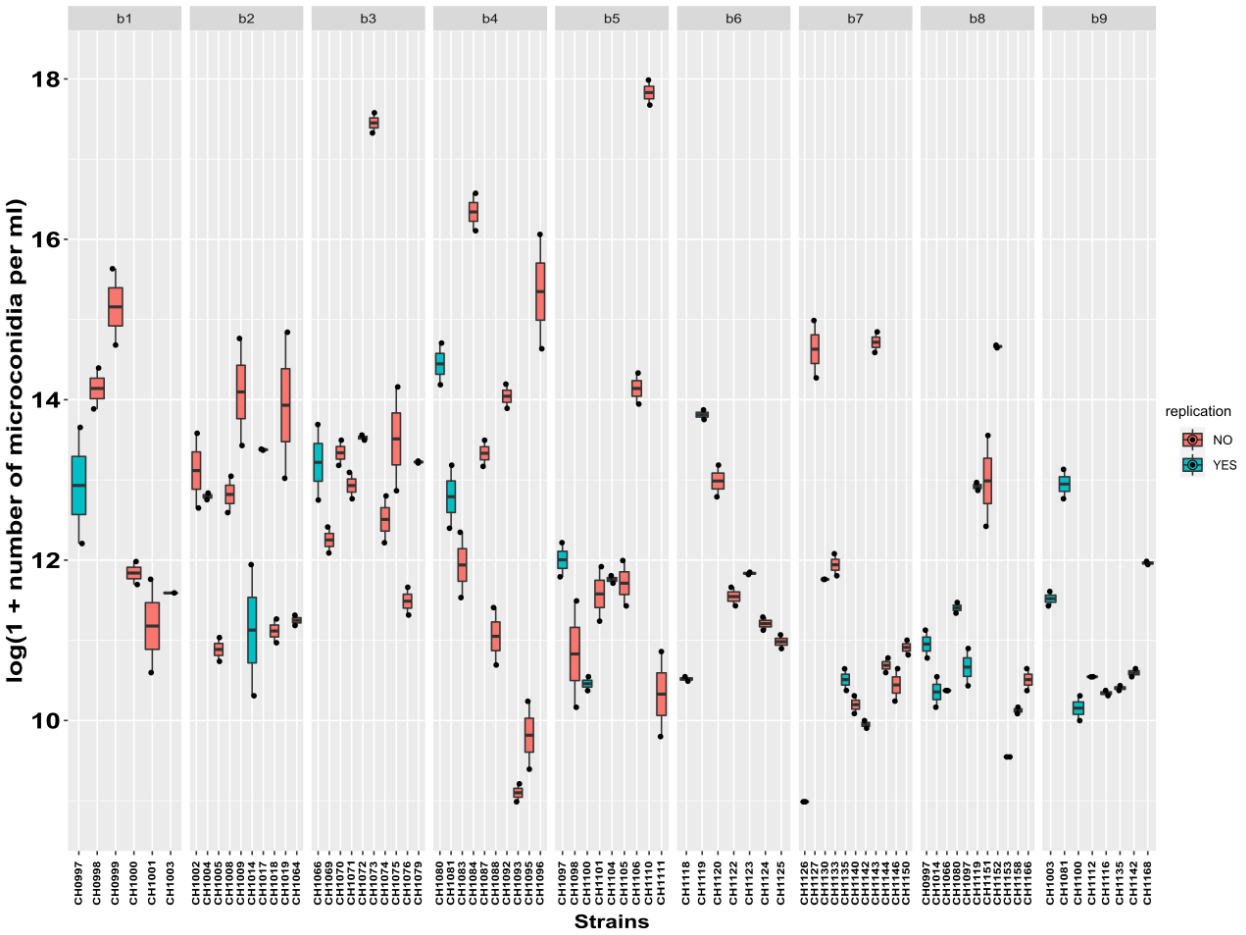
Supplementary Figure 2: Synteny of the 13 longest scaffolds of GUY11 reference genome to the 7 chromosomes of 70-15 v8 reference genome. The thirteen longest scaffolds of GUY11 reference genome were aligned with the 7 chromosomes of 70-15 reference genome using MUMMER. The 13 longest scaffolds of GUY11 reference genome cover 89% of 70-15 reference genome.



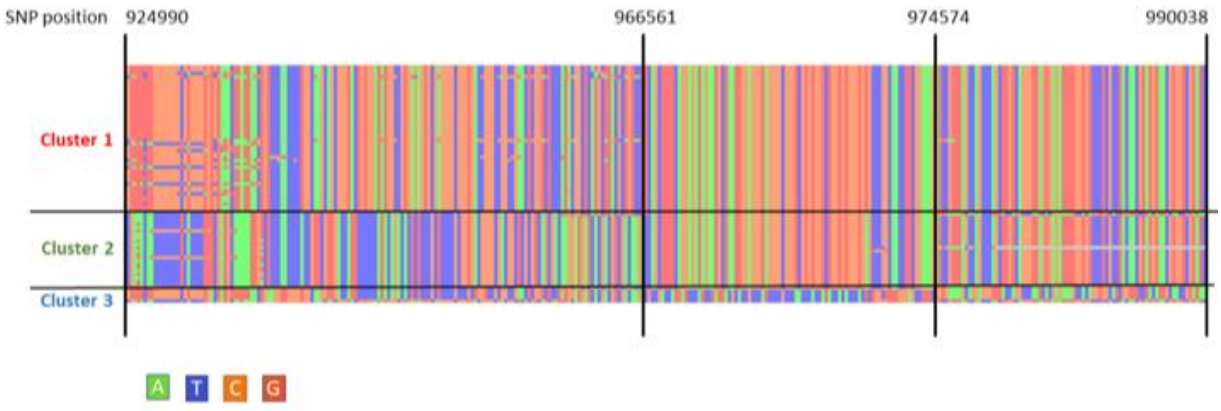
Supplementary Figure 3: Principal component analysis of the 71 *P. oryzae* strains, based on 12,725 SNPs.



Supplementary Figure 4: Linkage disequilibrium as a function of physical distance between SNPs among the 71 *P. oryzae* genomes. The horizontal axis represents the physical distance between markers (in kb). The vertical axis represents the mean value of linkage disequilibrium between equally distant pairs of SNPs averaged in 10 bp adjacent windows. The red line shows the half LD decay, which corresponds to a distance of 3.2 kb and which was calculated after adjusting the data to a logarithm regression y=a.ln(x) + b (with a = -0.068 and b = 0.9434).



Supplementary Figure 5: Quantity of microconidia produced by the 71 *P. oryzae* strains. The nine slots (from b1 to b9) correspond to the different batches of the experiment. The vertical axis is the log(1+ the number of microconidia produced). Blue boxplots correspond to strains replicated in two batches, whereas red boxplots correspond to strains present in only one batch.



Supplementary Figure 6: Graphic representation of multilocus genotypes of the 71 *P. oryzae* strains between positions 9224990 and 990038 of GUY scaffold 10. Strains are grouped in three haplotypic groups (clusters) identified by MCA. The four different colours represent the four different nucleotides (A/T/G/C). Vertical bars delimit three blocks of SNP markers showing conserved patterns between strains of the same cluster.

3. Conclusion et perspectives

L'objectif de cet article était d'identifier les gènes impliqués dans la production de microconidies, autrement dit dans une composante de la fertilité mâle.

Premièrement, nous avons quantifié la production de microconidies pour 71 souches d'une population recombinante collectée au champ à Yule (Yunnan, Chine). Nous avons observé une variation significative de ce trait entre souches. En effet, nous avons observé des productions de microconidies allant de 8,3 à 17,6, pour une moyenne de 12,2, une médiane de 12, et une variance de 3,5 (en log10). Nous n'avons pas observé de différence significative de la production de microconidies en fonction du locus MAT.

Deuxièmement, en utilisant l'approche d'étude d'association pangénomique (GWAS) dont le but est de corréler la variation phénotypique à la diversité génotypique, nous avons mis en évidence trois régions génomiques impliquées dans la production de microconidies : 2 régions proches entre elles sur le scaffold 4 du génome de référence GUY11 et une région (la plus significative) sur le scaffold 10. Dans cette dernière région, nous avons mis en lumière des gènes candidats sérieux tel que le gène Mo_GUY11_054420 possédant un domaine JmJ connu pour son implication dans la reproduction sexuée chez d'autres espèces au travers de la régulation transcriptionnelle via les histones.

La prochaine étape de ce travail serait, d'une part, de valider fonctionnellement l'implication des gènes trouvés sur le scaffold 10 en générant des mutants pour observer la variation du phénotype et, d'autre part, de regarder la diversité génotypique de ces gènes dans d'autres populations.

Chapitre 3 :

Identification des bases génétiques de la fertilité femelle chez *Pyricularia oryzae*

1. Présentation générale

Ce troisième chapitre porte sur l'identification des bases génétiques de la fertilité femelle à travers la production de périthèces chez *P. oryzae,* principalement par deux approches complémentaires : la « Genome Wide Association Study » (GWAS) et la « Bulk Segregant Analysis » (BSA). Une approche de cartographie QTL avait aussi été envisagée sur la descendance d'un croisement entre deux souches fertiles, pour laquelle les données de séquençage et de phénotypage étaient déjà disponibles. L'analyse QTL préliminaire a permis d'identifier des zones candidates du génome, mais les approches BSA et GWAS nous ont paru plus prometteuses et l'approche QTL n'a pas été approfondie.

Les résultats présentés dans ce chapitre ont fait l'objet d'une fructueuse collaboration entre différentes personnes de l'Institute for Integrative Biology of the Cell de Saclay, le Plant Health Institute of Montpellier ainsi que de la plateforme de séquençage MGX, conduisant à la rédaction d'un article de recherche en préparation, intitulé « **Combining two complementary forward genetic approaches to decipher the genomic bases of female fertility in *Pyricularia oryzae* ».** L'analyse QTL est présentée de façon succincte à la fin du chapitre.

L'objectif de cet article était d'identifier les bases génétiques impliquées dans la production de périthèces chez *P. oryzae*. Pour l'approche de BSA, quatre croisements *in vitro* entre parents ne pouvant pas produire des périthèces (femelle stérile) et parents pouvant produire des périthèces (femelle fertile) avaient précédemment été réalisés, et des descendants de ces croisements avaient été phénotypés pour leur fertilité femelle. Pour chaque croisement, nous avons extrait les ADNs des descendants et nous les avons séquencés en les regroupant par phénotype parental. Les variations génétiques intergroupes ont été mesurées et corrélées au phénotype, mettant en évidence quatre régions significativement associées au phénotype. Pour l'approche de GWAS, nous avons quantifié la production de périthèces pour 71 souches d'une

population recombinante (celle utilisée dans le Chapitre 2) en croisant les souches *in vitro* avec des souches de référence compatibles. Les génomes des 71 souches ont été séquencés. L'analyse d'association entre la variation de la production de périthèces et la variation génotypique, a permis de mettre en évidence un locus différent des régions trouvées en BSA.

2. Article : Combining two complementary forward genetic approaches to decipher the genomic bases of female fertility in *Pyricularia oryzae*

Introduction

From totally haploid selfing to obligatory outcrossing, sexual reproduction in fungi covers a variety of forms and processes (Billiard et al., 2012). The selfing or outcrossing ability is determined by different systems of compatibility. In heterothallic Ascomycetes, such as the plant-pathogen model species *Pyricularia oryzae* or the genetic model *Neurospora crassa*, the recognition between compatible thalli is controlled by a single mating-type locus with two well described idiomorphs (Kanamori et al., 2007; Metzenberg and Glass, 1990). The mating type system also regulates genes involved in sexual tissue differentiation (Ferreira et al., 1998) and in different steps of sexual reproduction.

During sexual reproduction in Ascomycetes, a specialized structure called ascogonia differentiates before syngamy (i.e. the fusion of sexual cells) and plays the role of female gamete (Dodge, 1935). Female fertility can be defined qualitatively by the ability to form ascogonia and quantitatively by the number of ascogonia formed. However, the direct observation, hence quantification, of ascogonia is challenging. Therefore, female fertility is usually assessed through the ability to produce fruiting bodies. As its name suggests, the fruiting body, also called ascocarp or hereafter perithecium, is the result of the fecundation between gametes and contains the ascospores (meiotic spores), but the outer envelope of this organ is composed of female tissue (Coppin et al., 1993).

In addition to genes at the mating type locus, many other genes are involved in sexual reproduction (Wilson et al., 2019; see section 3.5.2 of the general introduction of this thesis). More specifically, regarding the different aspects of female fertility, two proteic complexes are involved in perithecia formation and maturation and/or in ascogonia formation (Teichert et al., 2014). The COP9

signalosome, firstly identified in plant responses to light (Wei and Deng, 2003, 1992), is necessary for the formation of fruiting bodies in *Aspergillus nidulans* (Busch et al., 2007). The second complex is the Striatin-Interacting Phosphatase and Kinase (STRIPAK) complex. This well conserved complex in Eukaryotes plays a role in the formation of perithecia and ascogonia. Indeed, the genes *Pro11* and *Pro22*, encoding two proteins of the STRIPAK complex, are respectively involved in ascogonium formation and in ascogonial septation in *Sordaria macrospora* (Bloemendal et al., 2010; 2012). The whole complex is involved in the phosphorylation of target proteins in early steps of perithecium formation.

Here, we searched for genomic regions involved in female fertility of the causal agent of blast disease of rice and other cereals, *P. oryzae*, by using two complementary forward genetic approaches based on genotype-phenotype associations: Bulk-Segregant Analysis (BSA) and Genome Wide Association Study (GWAS). Initially developed to identify disease resistance genes in plant (Michelmore et al., 1991), BSA is based on the genetic comparison of a pair of DNA pools of progenies from a single controlled cross. Pools (or bulks) are composed of progenies sharing the same phenotype. Markers associated to the phenotype of interest are expected to be monomorphic within each pool and polymorphic between pools. The main advantage of BSA, compared to GWAS, is its low sequencing cost: for fungi with small genomes such as *P. oryzae* (genome size around 40 Mb), thousands of individuals can be sequenced in one sample. However, BSA suffers the same drawback as QTL mapping regarding the number of recombination events considered: when few progenies issued from a single cross are analyzed, the risk of strong linkage disequilibrium between the causal SNP and surrounding markers is high, hence limiting the resolutive power. Nonetheless, BSA proved its efficiency, for example, in the identification of loci involved in *P. oryzae* – rice interactions. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers linked to *P. oryzae* avirulence genes have been identified by BSA (Dioh et al., 2000). Genome-wide SNP markers linked to genes involved in resistance to blast were recently identified by BSA in rice (Liang et al., 2020). The second approach used in the present study, GWAS, aims to detect significant association between allelic frequencies at polymorphic SNP positions along the genome and phenotypic status for a given quantitative trait in wild recombinant populations (McCarthy et al., 2008). The pros and cons of GWAS have already been presented in Chapter 2.

In the present study, we performed GWAS on wild type strains of *P. oryzae* from the Yule population (already used in Chapter 2). In this population, that belongs to the rice-attacking lineage 1, evidences for sexual reproduction have been demonstrated (Saleh et al., 2012b; Thierry et al., 2022). In contrast, BSA was performed on progenies from four controlled crosses between field strains and experimentally evolved mutants (Sale et al., 2012a). For each cross, one parent was a wild-type (WT) strain (from the Yule population) whereas the other was a female-sterile mutant obtained by vegetative multiplication of a WT strain from the same population.

Material and Methods

Constitution of pools for BSA

Pools were constituted with progenies of controlled crosses between female fertile WT strains and female sterile mutants of *P. oryzae* described in Saleh et al. (2012a; Figure 1). Four controlled crosses were previously realized (#130, #131, #132 and #133), the progenies of which were phenotyped for female fertility (Saleh et al. 2012a). The phenotyping done in this previous study was binary: strains able or unable to produce perithecia were classified as female-fertile or female-sterile, respectively. For each cross, progenies were grouped based on their phenotype for female fertility to constitute bulks. We therefore obtained four pairs of bulks (one pair per cross, designed by the cross number), each pair being composed of one bulk containing female fertile progenies (“F” bulk) and of one bulk containing female sterile progenies (“S” bulk). Each bulk from the same cross contained the same number of individual (9, 6, 6 and 10 progenies per bulk for crosses #130, #131, #132 and #133, respectively).

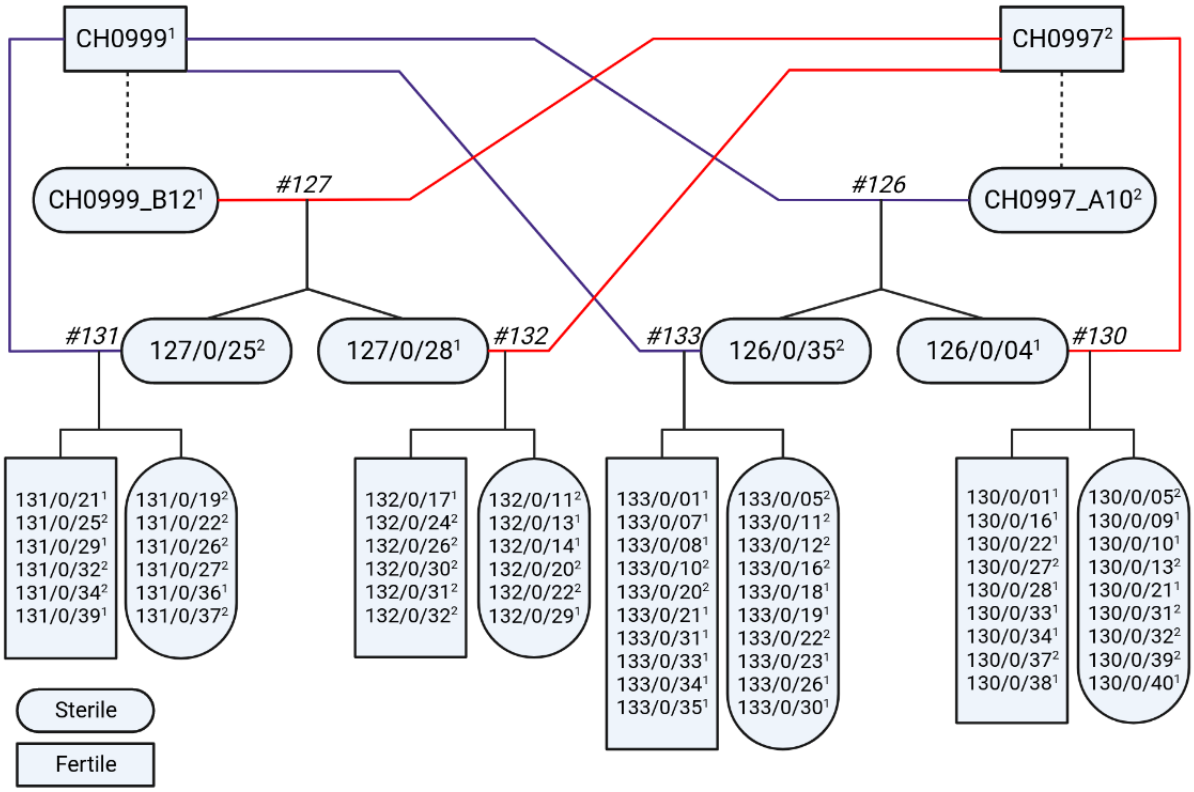


Figure 1: Crosses and progenies used for Bulk Segregant Analysis. Rounded frames correspond to female sterile strains, rectangular frames correspond to female fertile strains. Mating type MAT1-1 and MAT1-2 of strains are indicated by uppercase 1 and 2, respectively.

DNA extraction and Pool-seq for BSA

Extraction of DNA was achieved for each progeny separately following the extraction protocol described in Ali et al. (2021). DNA concentration was measured twice per sample by fluorimetry using a Qubit™ XY fluorimeter. Equal quantities of DNA from progenies from a bulk were pooled to obtain a final volume of 100 µl of mixed DNA and at least 40 ng/µl of DNA in total (Sup. Table 1). Preparation of libraries and Illumina NovaSeq 6000 sequencing were performed at Montpellier GenomiX (MGX), resulting in paired-end reads of 150 bp. One library, hence one Pool-seq, was generated per bulk.

Generation of SNP data for BSA

Genomic reads of each Pool-seq were first mapped on the GUY11 PacBio reference genome with repeated elements masked (Bao et al., 2017; BioSample: SAMN06050153) with bwa mem v.0.7.17 and filtered with samtools v.1.10 (Danecek et al., 2021) for a mapping quality q=30. For each Pool-seq, the mapping quality was assessed with samtools v.1.10 and reported in html format using multiqc v.1.9 (Ewels et al., 2016). BAM files were converted into mpileup format (that is, raw allele count per position) using samtools mpileup v.1.13 (Danecek et al., 2021). We then used the "mpileup2sync.jar" script to transform the mpileup format into the adequate input files format (i.e. allele count per position) for the softwares poolfstat (Gautier et al., 2022) and PoPoolation2 (Kofler et al., 2011).

SNP calling for BSA

SNPs from Pool-seq data were called with the poolfstat R-package (Gautier et al., 2022). SNP markers were filtered for minimal allowed read count per base (min.rc), minimal allowed read count per pool (min.cov.per.pool) and minimal allowed minor allele frequency (min.maf). Min.cov.per.pool was set up to 25, and min.maf to 0.01. The min.rc was calculated for each Pool-seq as the minimum number of reads expected at each position per individual. If the mean number of reads per position of a given Pool-seq was NX (e.g. 60X), and if the corresponding bulk contained n individuals (e.g. 6), then each individual was expected to be covered by at least N/n (10X in the example above). Hence, a rare allele present in a single individual within the bulk should harbor this minimal coverage. In other words, a rare allele had to be supported per a minimum number of N/n reads (10 in the example above) not to be considered as a sequencing error.

BSA SNP index

For each pair of bulk, the aim was to specifically target the positions that are monomorphic within each bulk but polymorphic among the two bulks. To this end, a SNP index was calculated

between the two bulks of a pair at each SNP position. Let us designate AF, AS, BF and BS the allele counts at position *P*, with A and B the two alleles, and F and S the two bulks. The SNP index is defined as the absolute difference in allelic frequencies at position *P* between pairs of bulks:

$$\Delta FreqP = \left| \frac{\mathrm{AF}}{\mathrm{AF} + \mathrm{BF}} - \frac{\mathrm{AS}}{\mathrm{AS} + \mathrm{BS}} \right|$$

We then tested the significance of the SNP index using a pairwise Fisher's exact test with the fisher-test.pl script of PoPoolation2, which considers the depth coverage at each position. The obtained p-values were corrected with the p.adjust function of the R-package stats using the Dunn-Šidák method (Šidák, 1967), the threshold of significance being calculated as:

$$\alpha^* = 1-(1-\alpha)^{1/k}$$

with α the accepted false positive risk (set at 0.01), and k the number of tests (here, the number of SNP positions). We used the R-package ggplot2 to simultaneously visualize ΔFreq*P* (in percentage) and corrected p-values of pairwise Fisher's exact tests in –log10(p-values).

As for the GWAS performed on male fertility (see Chapter 2), we present the results of BSA analyses only for the 13 longest scaffolds of the GUY11 reference genome.

Genome sequencing of strains for GWAS analysis

Strains from the Yule recombinant population (already described in Chapter 2) was used to perform GWAS on female fertility. Compared with the panel used in Chapter 2 for the GWAS analysis of male fertility, two strains (CH1010 and CH1091) were added and two strains (CH1112 and CH1127) were removed. Hence, the panel used here also comprised 71 strains. Genotyping of this population was realized using Illumina full-genome sequencing of each strain, and has already been described in Chapter 2. Mapping on the GUY11 reference genome and SNP calling followed the same procedure as in Chapter 2.

Phenotyping of female fertility for GWAS

To phenotype female fertility, we quantified the formation of perithecia in each strain. To this end, each strain was crossed *in vitro* as described by Nottéghem and Silué (1992) with a male- and female- fertile reference strain of opposite mating type. Crosses were performed on Rice Flour Agar (RFA) medium in 90 mm Petri dishes (see Chapter 2 for composition). The strains CH0997 (Mat1.2) and CH0999 (Mat1.1) were used as fertile reference strains since they are known to induce perithecium formation as well as to produce many perithecia when crossed with a broad number of genetically diverse strains (Thierry et al., 2022). On each Petri dish, two plugs of mycelium of the strain to be tested were deposited, so that two lines of confrontation between the reference strain and the tested strain were available (and used as two technical replicates). In addition, we performed two biological replicates per strain to be tested. We quantified the number of perithecia formed on each plate along each confrontation line, on two-week-old plates. First, each plate was pictured with a camera. Then, on each image, each of the two lines of perithecia corresponding to the tested strains were "manually" cut out, in order to exclude perithecia formed by the reference strain and to exclude masses of old mycelium disseminated on the plate that could be interpreted as perithecia. The processed images were analyzed using an in-house tool (https://github.com/sravel/LeAFtool) based on the R package Ebimage (Pau et al., 2010). Briefly, calibrations were made according to discriminant analysis of RGB composition of pixels chosen and classified by the user as background, mycelium and perithecia, and the resulting discriminant functions were used to assign pixels to these three categories. This resulted in the counting of the total number of pixels assigned to perithecia along each confrontation line of the tested strain. This absolute number was normalized by dividing it by the petri dish size (in pixels) on the original image to correct for the zoom effect of the camera. This proxy of the number of perithecia formed along each confrontation line was hereafter named the "normalized surface of perithecia".

Statistical analysis of phenotypic data

Production of perithecia measured with the proxy of "normalized surface of perithecia" was analyzed without transformation. An analysis of variance (ANOVA) using a nested linear model was performed with the aov function implemented in R. The model used was:

$$Y_{ijk} = \mu + a_i + b_j + c_k + d_l + (cd)_{kl} + E_{ijk}$$

where Y_{ijk} is the normalized surface of perithecia, μ is the intercept term, a_i the random genotype effect of genotype i, b_j the tester effect of mating type j, c_k the replicate box k, d_l the side effect l, $(cd)_{kl}$ the nested effect of the replicate on the side kl and E_{ijkl} the residuals term.

Genome-wide association study and local score approach analyses

As for the GWAS performed on male fertility (see Chapter 2), GWAS analyses presented here were performed using the 13 longest scaffolds of the GUY11 reference genome. GWAS was performed with the software TASSEL v.5.0 (Bradbury et al., 2007). We used a Mixed Linear Model (MLM), with tester as fixed effect, accounting for genetic relatedness using kinship between strains, estimated using the centered identity-by-step algorithm. The variant component procedure was used to estimate σ^2_a and σ^2_e using restricted maximum likelihood, from the equation:

$$Var(Y) = \sigma^2_a K + R$$

where Var(Y) is the phenotypic variance of the production of microconidia, σ^2_a the genetic variance, K the kinship matrix, and R the residual effect. Under the hypothesis of homogeneous variance, $R= I\sigma^2_e$, where I is an identity matrix and σ^2_e is the unknown residual variance. Broad sense heritability, defined as the proportion of genetic variance over the total variance, was calculated as follows:

$$h^2 = \sigma^2_a / (\sigma^2_a + \sigma^2_e).$$

P-values were considered significant when smaller than the threshold calculated using the Dunn-Šidák method (Šidák, 1967).

As in chapter 2, we also used the local score method (Fariello et al., 2017). The ξ parameter determines the range of p-values contributing to the local score: if p_i is the p-value of the i^{th} locus, then the score is taken as $X_i = -\log10(p_i) - \xi$, meaning that only p-values under $10^{-\xi}$ will contribute positively to the score and p-values above will substract from the signal. P-values distribution were here considered as uniform. We retained ξ=2 and a Type I error risk of α=1 % as local score parameters.

Results

I. BSA

Pools sequencing

The total number of reads generated per Pool-seq varied from 20.2 million to 28.0 million (mean: 23.7 million, median: 23.2 million; Sup. Figure 1). The proportion of reads mapped on GUY11 reference genome with a mapping quality above 30 varied from 78.4% to 85.7% (mean: 83.0%, median: 83.9%). This resulted in mean depths ranging from 63X to 94X (mean 77X, median 76X). Cross #132 had the largest depth difference between the two Pool-seqs. The minimum number of reads expected at each position per individual was calculated for each Pool-seq of a pair (Sup. Figure 1), and the lowest value was chosen to set the parameter min.rc for the pair (8X for #130, 13X for #131, 11X for #132 and 7X for #133). All Pool-seqs covered more than 85% of the reference genome. The number of SNPs recovered between Pool-seqs of the same pair was 11,333 for #130, 8,312 for #131, 11,605 for #132 and 7,099 for #133.

Analysis of the differences in allele frequencies among pairs

The underlying hypothesis of BSA is that, for a given pair of bulks, positions in the genome that are associated with the studied phenotype should be monomorphic within each bulk but polymorphic among the two bulks. Therefore, the absolute difference of allelic frequencies (ΔFreq*P*) at these putative candidate positions should be maximum, and the P-value of the associated Fisher test should be

significant. We therefore targeted SNP markers with ΔFreq*P* above 60% (i.e. allelic frequencies in bulks ranging from a given allele 0.8 to 1 and, consequently, from 0 to 0.2 for the other allele) and P-values above the Dunn-Šidák threshold.

The analysis first highlighted a very large region on scaffold 3 in which all SNPs passed the criteria (i.e. ΔFreq*P* above 60% and significant Fisher test values), with p-values being clearly higher than on all the other scaffolds (Figure 2). This ΔFreq*P* plateau was found in two crosses (#130, #132) and to a lesser extent in cross #131, covering the same region in all three crosses from approximately 1.9 Mb to 4.8 Mb (i.e. the end of the scaffold). In #132, a majority of positions in this plateau region of scaffold 3 were totally fixed in one Pool-Seq of the pair (ΔFreq*P* = 1), whereas we found intermediate ΔFreq*P* values in #130 and #131. The same phenomenon can be observed on scaffold 9 in #132, with a plateau starting at the beginning of the scaffold and ending approximately at 1.4 Mb in which almost all SNP positions were totally fixed in one Pool-Seq of the pair (ΔFreq*P* = 1; Figure 2). This second plateau region on scaffold 9 was also detected in #130 (at the same positions), but not in #131. This pattern might be due to a chromosomal rearrangement present in one of the two parents of cross #132 (and #130). Indeed, the synteny between GUY11 scaffolds and 70-15 chromosomes showed that scaffold 3 of GUY11 is split in two parts in 70-15, one part on chromosome 1, the other part on chromosome 4 (the other part of this chromosome being formed of scaffold 9; see Chapter 2 Sup. Figure 2). This rearrangement was previously described in Bao et al. (2017). The consequence of such a rearrangement is that the entire rearranged chromosomes will segregate during meiosis without any recombination. Hence, markers over a large region are in linkage disequilibrium and there is no possibility to pinpoint the exact SNP positions associated to the phenotype if these SNPs are located within the rearranged chromosomes (see also Discussion).

I

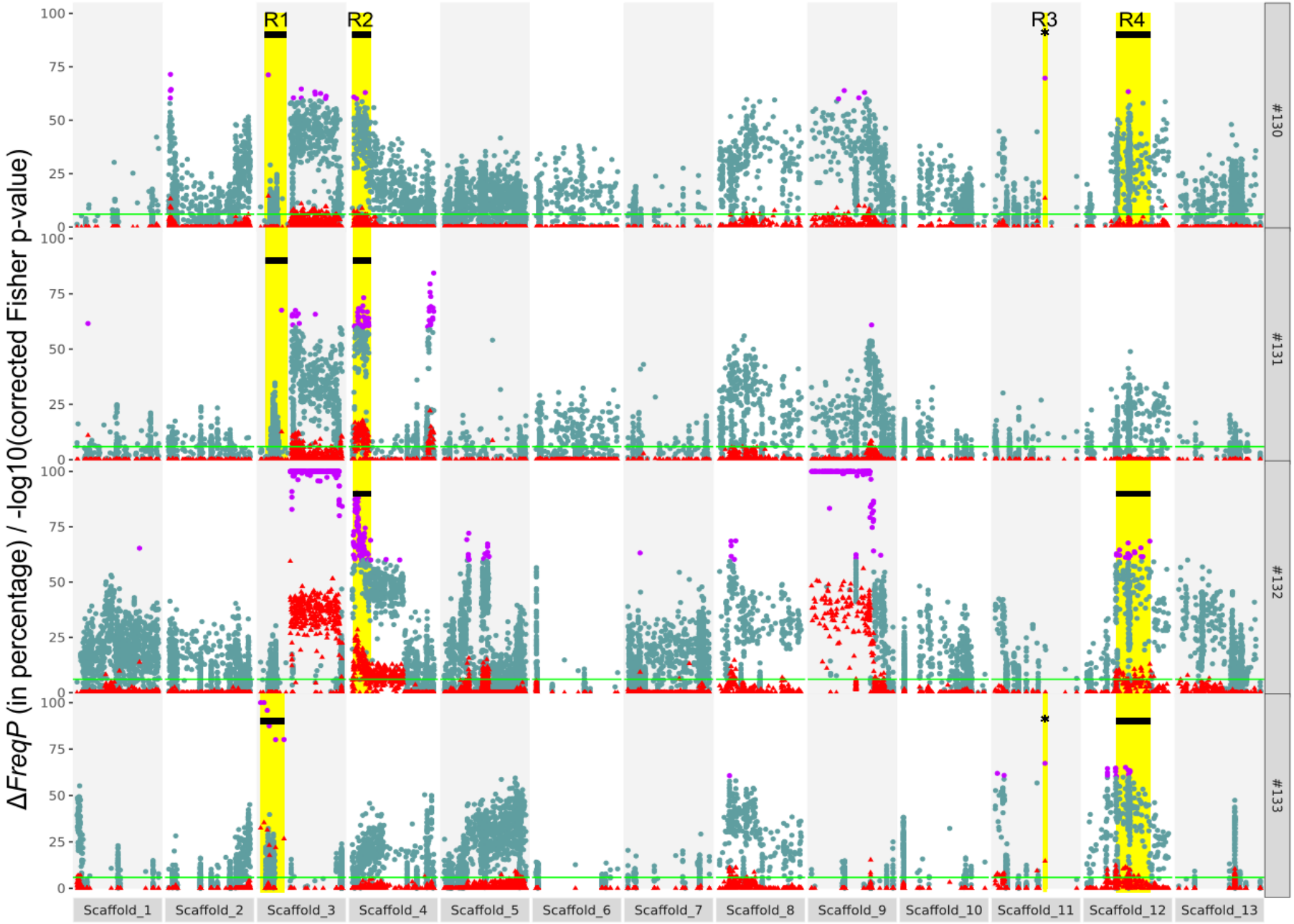

ΔFreqP (in percentage) / -log10(corrected Fisher p-value)
R1
R2
R3
R4
*
*
100
75
50
25
0
#130
#131
#132
#133
Scaffold_1
Scaffold_2
Scaffold_3
Scaffold_4
Scaffold_5
Scaffold_6
Scaffold_7
Scaffold_8
Scaffold_9
Scaffold_10
Scaffold_11
Scaffold_12
Scaffold_13

Figure 2: Distribution of SNP index (ΔFreqP, in percentage) and of p-values (in -log10(p)*100) along GUY11 scaffolds for crosses #130, #131, #132 and #133. Values of ΔFreqP are in blue and purple, the last colors indicating values above 60%. Red triangles correspond to p-values, the horizontal green line indicating the Dunn–Šidák threshold for p-value significance. Yellow rectangles indicate regions found in common in at least two crosses (named R1 to R4).

In addition to the particular cases of the plateaus on scaffolds 3 and 9 that were partly shared between different pairs of bulks, BSA allowed two discover several other regions associated with the female fertility phenotype (Table 1) which are hereafter presented for each pair.

For the pair #130, we found a region on scaffold 2 between positions 99,816 and 143,218 with the highest ΔFreq*P* (71.4%) at position 105,112. A SNP was found on scaffold 3 at position 647,670 (ΔFreq*P*=71.2%). Three SNPs were found on scaffold 4 at positions 110,279 (ΔFreq*P*=60.9%), 256,654 (ΔFreq*P*=60.1%) and 726,838 (ΔFreq*P*=63.0%). Four SNPs were found on scaffold 9 at positions 647,171 (ΔFreq*P*=60%), 778,783 (ΔFreq*P*=63.9%), 1,115,176 (ΔFreq*P*=60.5%) and 1,247,706 (ΔFreq*P*=63.0%). Two additional significant SNPs were found on scaffold 11 (position 745,189, ΔFreq*P*=69.7%) and scaffold 12 (position 576,184, ΔFreq*P*=63.4%).

For the pair #131, a SNP was found on scaffold 1 at position 726,746 (ΔFreq*P*=61.6%). Another SNP was found before the plateau on scaffold 3 at position 1,355,597 (ΔFreq*P*=67.6%). A 762.6 kb region was found on scaffold 4 between positions 129,546 and 892,183 (maximal ΔFreq*P*=73.2% at position 612,594), as well as a 325.5 kb region at the end of the same scaffold (4,104,452 - 4,429,988) with the highest ΔFreq*P* (84.4%) at position 4,428,114.

For the pair #132, a SNP was found on scaffold 1 at position 4,114,728 (ΔFreq*P*=65.3%). On scaffold 4, we found a region between positions 51,001 and 998,077 (overlapping one of two regions found on the same scaffold with the pair #131) with the highest ΔFreq*P* (90.3%) at position 242,670. Two regions were found on scaffold 5, the first between positions 949,891 and 1,039,493 (maximal ΔFreq*P*=72.1% at position 1,026,384), the second between positions 1,613,273 and 1,825,238 (maximal ΔFreq*P*=67.3% at position 1,763,385). A SNP was found on scaffold 7 at position 378,830 (ΔFreq*P*=63.2%). A 129.1 kb region was found on scaffold 8 from position 440,845 to position 569,975

(maximal ΔFreq*P*=68.7% at position 569,975). Finally, a 451.2 kb region on scaffold 12 was found from position 419,936 to position 871,184 (maximal ΔFreq*P*=68.5% at position 871,184).

For the pair #133, we found six highly significant SNPs on scaffold 3 at positions 471,686 (ΔFreq*P*=100%), 647,670 (ΔFreq*P*=100%), 815,790 (ΔFreq*P*=95.8%), 917,233 (ΔFreq*P*=87.5%), 1,244,730 (ΔFreq*P*=80.1%) and 1,679,992 (ΔFreq*P*=80.12%). A SNP was found on scaffold 8 at position 321,595 (ΔFreq*P*=60.7%). On scaffold 11, a region was observed between positions 74,884 and 170,258 (maximal ΔFreq*P*= 61.9% at position 74,884) as well as a SNP at position 745,189 (ΔFreq*P*=67.3%). Finally, three thin peaks were found on scaffold 12, at positions 297,512 (ΔFreq*P*=64.5%), 408,958 (ΔFreq*P*=64.8%) and 542,589 (ΔFreq*P*= 65.2%), respectively.

For further analysis, we decided to focus on regions identified with at least two crosses. Region 1, defined on scaffold 3 between positions 471,686 and 1,679,992 (1,208.3 kb), spanned the 6 highly significant SNPs found in pair #133 and included significant SNPs found in pairs #130 and #131. Note that within this region, the SNP located at position 647,670 was found both in pair #130 and #133. Region 2, defined on scaffold 4 between positions 51,001 and 998,077 (947.1 kb), included overlapping regions found in pairs #130, #131 and #132. Region 3 was only constituted of a single SNP at the position 745,189 of scaffold 11 common to the pairs #130 and #133. Region 4 was defined on scaffold 12 between positions 419,936 and 871,184 (451.2 kb) and included SNPs found in pairs #130, #132, #133.

Candidate genes in the four regions found with BSA

We did not explore the list of predicted genes in the large plateau regions detected by BSA on scaffold 3 and 9, because the genome size covered is 4.3 Mb and, thus, the number of genes is too high to pinpoint candidates.

The thorough analysis of the genes contained in the four regions detected in at least two crosses is still ongoing. The following results therefore need to be consolidated and have to be considered with caution. At this stage, the analysis is restricted to a rough description of the main biological processes

Cross	Scaffold	Interval with ΔFreqP above 60%			Single position with ΔFreqP above 60%		Regions shared by at least two pairs
		Range of positions	Max ΔFreqP (%)	Position with max ΔFreqP	Max ΔFreqP (%)	Position with max ΔFreqP	
B130	2	99,816 – 143,218	71.44	105,112			
B130	**3**				**71.21**	**647,670***	**Region 1**
B130	4				60.87	110,279	Region 2
B130	4				60.10	256,654	Region 2
B130	4				62.95	726,838	Region 2
B130	9				60.00	647,171	
B130	9				63.87	778,783	
B130	9				60.47	1,115,176	
B130	9				62.98	1,247,706	
B130	**11**				**69.70**	**745,189****	**Region 3**
B130	12				63.36	576,184	Region 4
B131	1				61.57	726,746	
B131	3				67.59	1,355,597	Region 1
B131	4	129,546 – 892,183	73.24	612,594			Region 2
B131	4	4,104,452 – 4,429,988	84.39	4,428,114			
B132	1				65.31	4,114,728	
B132	4	51,001 – 998,077	90.32	242,670			Region 2
B132	5	949,891 – 1,039,493	72.08	1,026,384			
B132	5	1,613,273 – 1,825,238	67.27	1,763,385			
B132	7				63.16	378,830	
B132	8	440,845 – 569,975	68.65	569,975			
B132	12	419,936 – 871,184	68.50	871,184			Region 4
B133	3				100.00	471,686	Region 1
B133	**3**				**100.00**	**647,670***	**Region 1**
B133	3				95.83	815,790	Region 1
B133	3				87.50	917,233	Region 1
B133	3				80.08	1,244,730	Region 1
B133	3				80.12	1,679,992	Region 1
B133	8				60.69	321,595	
B133	11	74,884 – 170,258	61.92	74,884			
B133	**11**				**67.32**	**745,189****	**Region 3**
B133	12				64.52	297,512	
B133	12				64.76	408,958	
B133	12				65.16	542,589	Region 4

Table 1: Results of the BSA for the for pairs analyzed. Lines in bold indicate the two SNPs found at exactly the same position in two different pairs (* for the SNP on scaffold 3 position 647,670, ** for the SNP on scaffold 11 at position 745,189).

controlled by the genes found within the regions, as well as to pinpoint some interesting candidates. To do so, we examined a list of 582 predicted genes present in the four regions to search biological processes that appeared relatively frequently. This sample represented 4.5% of the total number of predicted genes in 70-15 (12,865 genes). Almost half (49.1%) of the genes examined had no known function or domain that we could relate to a biological process. For Carbohydrate-Active enZYmes (CAZY) and for secondary metabolism genes, we exploited the expert analyses of Chiapello et al. (2015) to identify the genes in both categories. Seventeen CAZY genes were located in the four regions, representing 4.5 % of the sample, i.e. the expected ratio for a random sampling. For secondary metabolism, the 12 genes present in the four regions represented 25% of the total number (48) of genes predicted for this category in 70-15, suggesting that this category is overrepresented. For other categories of genes, to date we could not use gene ontologies to perform gene enrichment analyses. However, we identified functions that could be involved in sexual reproduction such as MAPK transduction signaling, transcription (Zinc Finger transcription factors for example), self/non-self recognition, pheromone biosynthesis and receptors, mitosis and meiosis control (including replication, DNA stability and conformation, and epigenetic regulation), cell wall and membrane rearrangements and fusion, microtubule organization and growth polarity, secretion via vesicles, calcium influx, and free radicals production and regulation.

In addition, we searched for candidate genes with a demonstrated role in sexual reproduction in *P. oryzae* or in Ascomycetes. Region 1 contained five interesting candidate genes. The gene Mo_GUY11_094720 (70-15 homolog: MGG_04621), annotated as a putative uncharacterized protein in the reference genome 70-15, contains a putative YTH domain. The YTH-family members have been shown to selectively remove transcripts of meiosis-specific genes expressed in mitotic cells, and may be involved in mechanisms to suppress gene regulation during gametogenesis (Harigaya et al, 2006). The gene Mo_GUY11_095240 (70-15 homolog: MGG_04711), annotated as a putative uncharacterized protein in the reference genome 70-15, contains a domain predicted as GPCR fungal pheromone mating factor STE2. This gene is the homolog of *Ste2*, the pheromone receptor of Mat-a strains in S. cerevisiae (see the General Introduction of the thesis: §2.2 and Table 1). The gene Mo_GUY11_095600 (70-15 homolog: MGG_13764), is annotated as a bilirubin oxidase in the reference genome 70-15. In *P.*

anserina, bilirubin oxidases are involved in fruiting body production (Xie et al., 2015). The gene Mo_GUY11_097110 (70-15 homolog: MGG_15163), is annotated as a calpain in the reference genome 70-15. Calpains are tightly related to Ca2+ dependent signaling (Hanna et al., 2008). In *P. oryzae*, calpains are involved in asexual and sexual development, cell wall integrity and pathogenicity (Liu et al., 2016). Finally, the gene Mo_GUY11_098000 (70-15 homolog: MGG_05641), annotated as a putative uncharacterized protein in the reference genome 70-15, contains a High Mobility Group box (HMG-box) domain. In *P. anserina*, several HMG-box transcription factors organized in network regulate the sexual cycle (Benkhali et al., 2013).

Region 2 contained two interesting candidate genes. The gene Mo_GUY11_110350 (70-15 homolog: MGG_00183), is annotated as the STE/STE11 protein kinase in the reference genome 70-15. It belongs to the Mst11-Mst7-Pmk1 MAPK cascade. As underlined in the General Introduction of the thesis (see § 4.3), *Pmk1* is involved in the production of microconidia. In yeast, STE11 belongs to the pheromone response module (cascade of MAPK) that regulates several processes such as development and secondary metabolism (Frawley and Bayram, 2020). The Mo_GUY11_110510 (70-15 homolog: MGG_00198), is annotated as Flavohemoglobin in the reference genome 70-15. Flavohaemoglobins are involved in reducing nitric oxide levels. In *Aspergillus nidulans*, the deletion of flavohemoglobin fhbA induced sexual development (Baidya et al., 2011).

In Region 3, the peak of *ΔFreqP* was located in the gene Mo_GUY11_057040 (70-15 homolog: MGG_08693) which is annotated as a topoisomerase in the reference genome 70-15. Topoisomerases change the topological conformation of DNA by cutting both strands of the DNA helix simultaneously in order to manage DNA tangles and supercoils (Seol et al., 2016).

Region 4 contained two interesting candidate genes. The gene Mo_GUY11_05994 (70-15 homolog: MGG_09005), is annotated as Chromosome segregation in meiosis protein 3 (Csm3) in the 70-15 reference genome. This protein is part of the Tof1-Csm3 fork protection complex which has a central role in the replisome by promoting the progression of DNA replication forks and protecting them when they stall, while also enabling cohesion establishment and checkpoint responses (Grabarczyk, 2020). The gene Mo_GUY11_059980 (70-15 homolog: MGG_09010) is annotated as the HAC-1

transcriptional activator (bZIP transcription factor). bZIP transcription factors play crucial role in the sexual development of filamentous fungi (Kong et al., 2015; Yin et al., 2013). In *N. crassa* the bZIP transcription factor HAC-1 is involved in the unfolded protein response (Montenegro-Montero et al., 2015).

II. GWAS

Sequencing, SNP calling, genetic diversity, and population structure of Yule population

Out of the 71 strains used in this Chapter, 69 strains were common to the GWAS analysis of male fertility performed in Chapter 2. Sequencing outputs were similar between both sets (data not shown). After mapping, SNP calling and filtering, 16,240 high-confidence SNPs distributed on the 56 scaffolds of the GUY11 genome were identified among the 71 strains. As for GWAS performed in Chapter 2, association mapping of female fertility was performed on the 13 longest scaffolds (> 800 kb) of GUY11, leading to a final dataset of 12,700 high confidence biallelic SNPs. Genetic diversity and population structure did not differ from those described in Chapter 2 (see Sup. Figures 2 and 3 of Chapter 2).

Variability in the normalized surface of perithecia among the strains

The normalized surface of perithecia produced by strains when confronted with a compatible reference strain ranged from zero (no perithecia formed) to 30.9 pixels (maximum value observed for one technical replicate of strain CH1140; Figure 3), with a mean of 10.6 and a median of 10.4. The effect of strains on this trait was significant (ANOVA: $F=14.8$, $P<2\times10^{-16}$, $Df=69$; Sup. Figure 2). Although two strains showed important differences between replicates (CH1000 and CH1009), no significant effect of the replicate was detected (ANOVA: $F=1.1$, $P=0.3$, $Df=11$; Sup. Figure 2). The effect of the mating type of tested strains was significant (ANOVA: $F=387.2$, $P<2\times10^{-16}$, $Df=1$): Mat1.2 strains produced more perithecia than Mat1.1 strains (Figure 4). However, since we used only one

reference strain of each mating type, it was not possible to separate this mating type effect from a putative effect of the reference strain. The broad sense heritability for the normalized surface of perithecia produced was estimated at 1.10^{-5}.

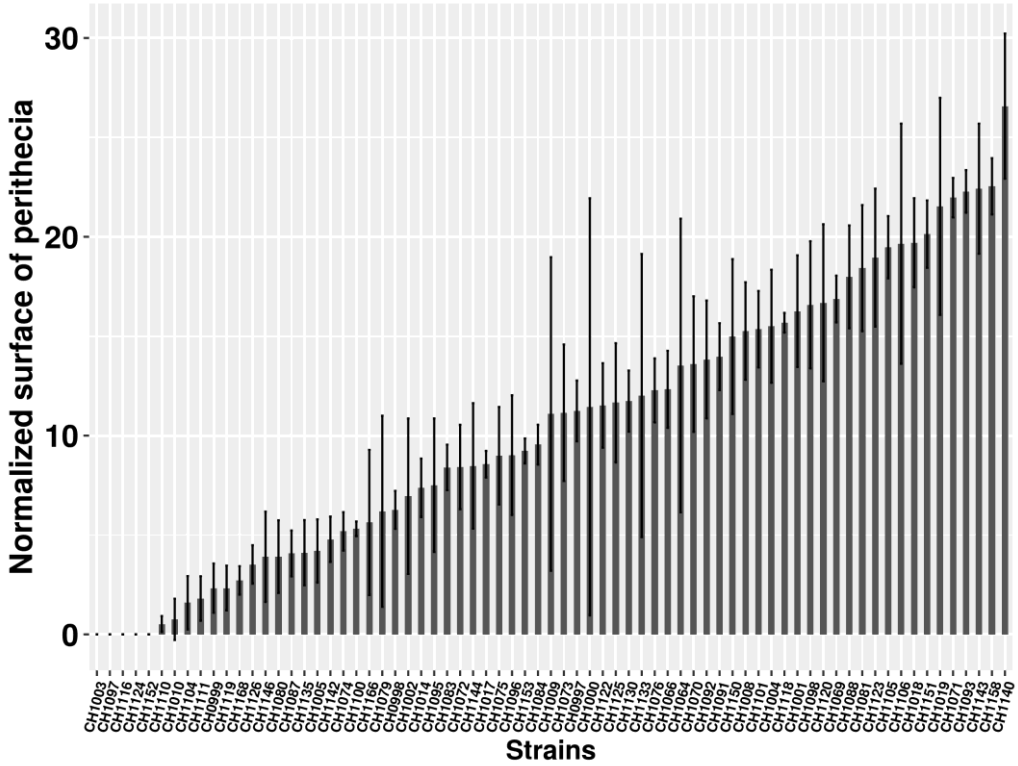


Figure 3: Production of perithecia of the 71 strains of *P. oryzae* from the Yule population used for GWAS. The production of perithecia is approximated by the normalized surface of perithecia produced by each strain on *in vitro* crosses against a compatible reference strain. Black vertical lines indicate standard deviations for each strain.

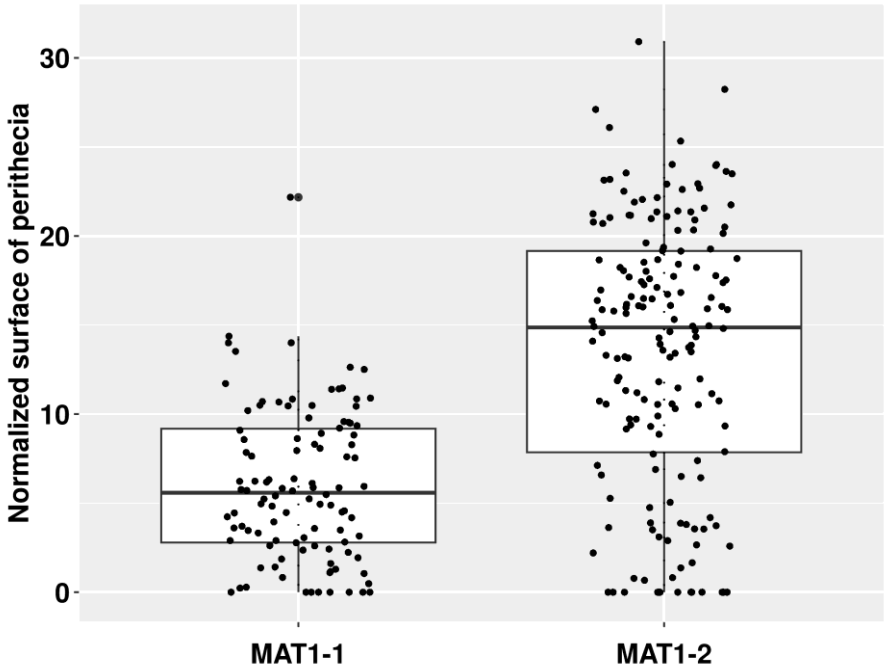


Figure 4: Effect of the mating type on the production of perithecia for the 71 strains.

Association study highlighted a peak on scaffold 6

The SNP markers with the highest –log10(p-value) were on scaffold 6. Two SNP markers at positions 212,958 and 212,965 had a –log10(p-value) of 3.38, which remained under the significant Dunn-Šidák p-value threshold (-log10(p-value) = 5.40). Using the local score approach, the SNP at position 212,695 (3.96) passed the local threshold of 3.05 (Figure 5). The analysis of the LD blocks in this region showed that this SNP was strongly linked to 5 other SNPs, forming a block from position 212,526 to position 212,695, this block being included in a larger block with lower LD values from position 212,526 to position 214,379 containing 16 SNPs in total (Figure 6). These blocks spanned a single gene, Mo_GUY11_025330. The ortholog of this gene in the 70-15 reference genome, MGG_09263, is located on Chromosome 1 between positions 3,974,522 and 3,982,701 and encodes a Zn(2)-C6 fungal type DNA-binding domain.

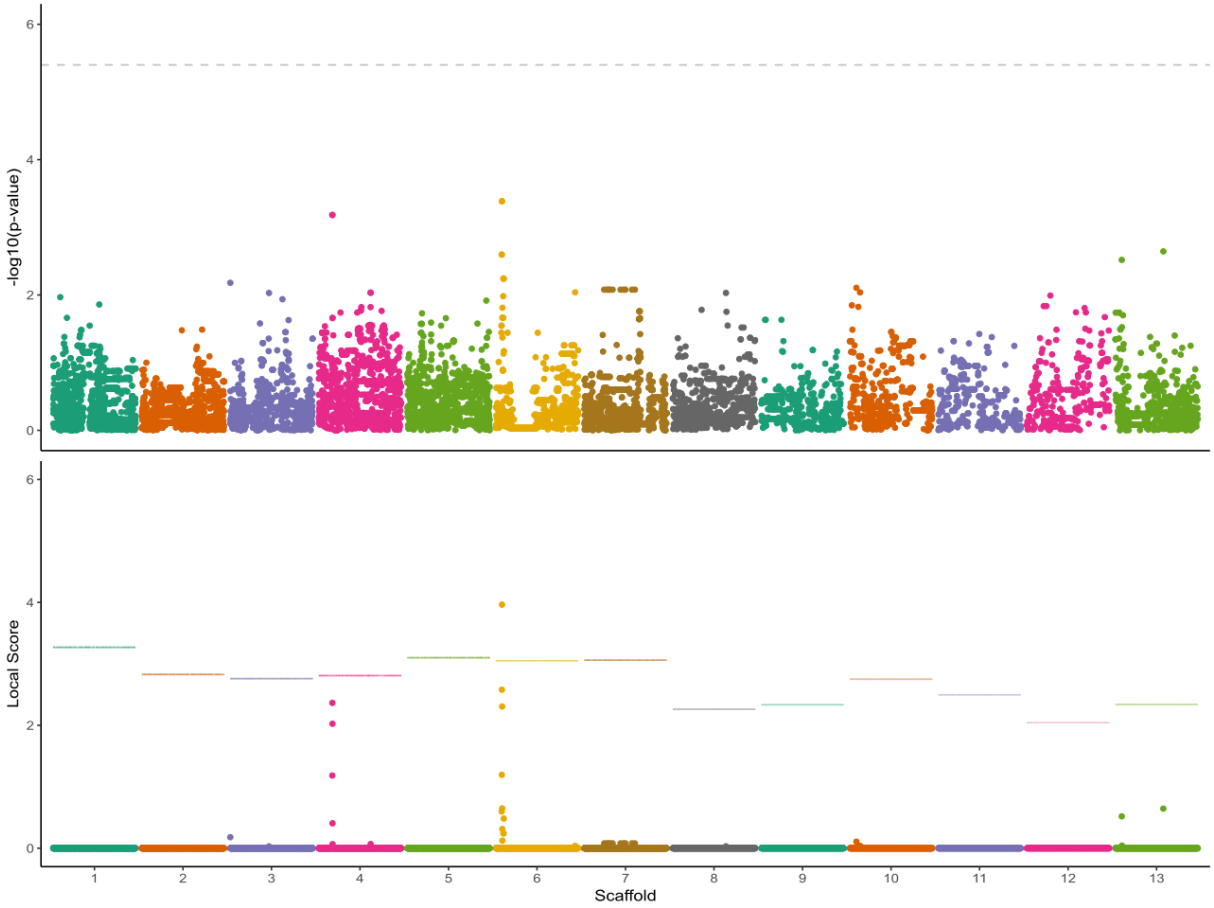


Figure 5: Genome-wide association mapping for perithecia production in *P. oryzae*. Top: Manhattan plot of GWAS showing SNP marker association p-values [Y axis, in –log(p-value)]. The grey horizontal dashed line indicates the significance Dunn-Šidák threshold value. Bottom: Manhattan plot of local score analysis showing SNP marker local score values. The horizontal dashed lines correspond to the local scaffold-wide threshold of significance of p-values.

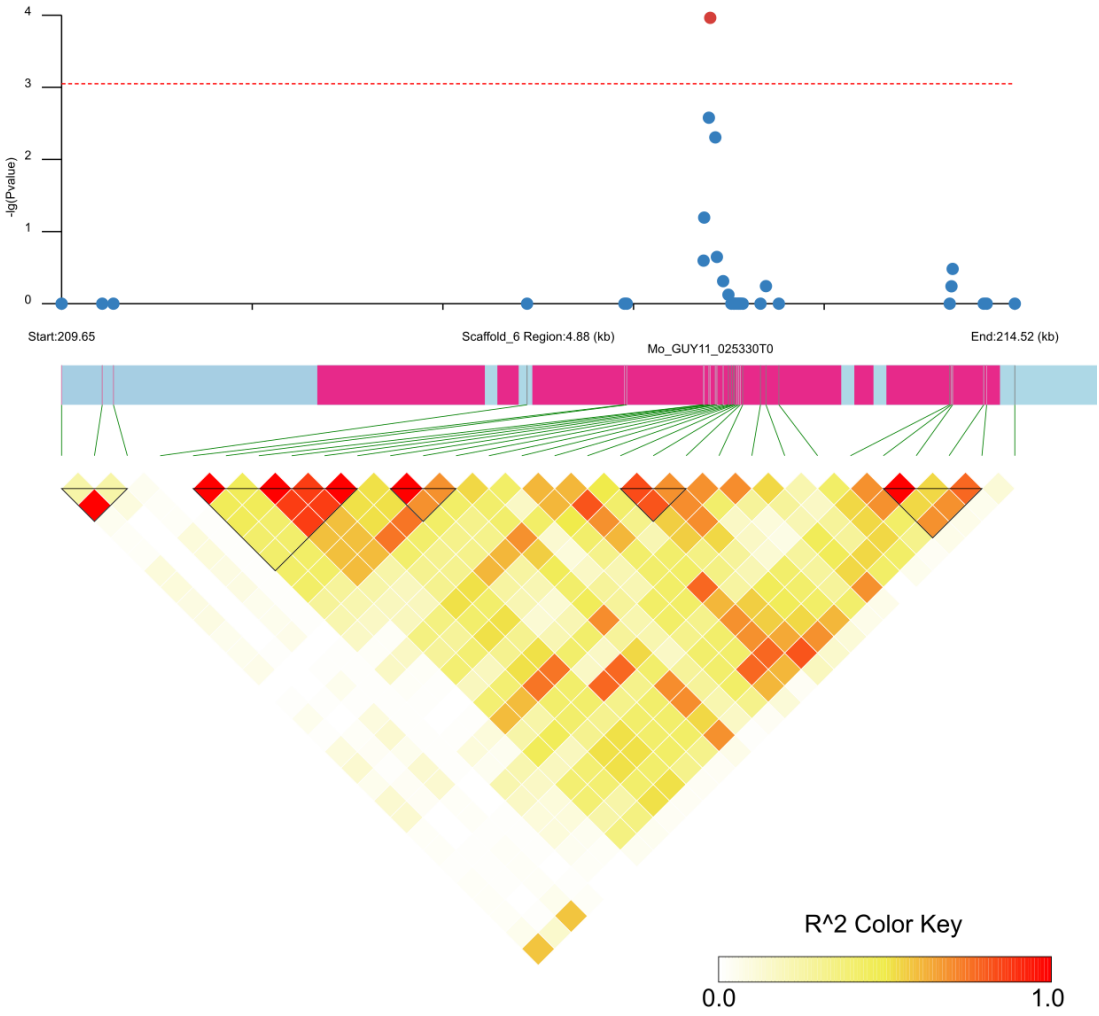


Figure 6: LD blocks contained in the associated region on scaffold 6 determined with the local score method. Upper panel: Manhattan plot of local score analysis on scaffold 6 (red dashed line: scaffold-wide local score threshold = 3.05). Bottom panel: LD blocks contained in the 4.88 kb spanning 30 SNP markers.

III. Comparison of candidate genes obtained with BSA and GWAS

Using the local score approach, the GWAS also detected a sub-significant peak situated on scaffold 4, with the most significant associated SNP at the position 554,016 with a local score value of 2.36 (local threshold = 3.73). This peak belonged to the region 2 identified with BSA, located on scaffold 4 between positions 51,001 and 998,077. Among all SNPs identified with BSA that belonged to the region 2, the closest to the sub-significant peak identified with GWAS using local score was in the pair #131 with a ΔFreq*P* value of 73.2% at position 612,594. No other common region between the two methods was detected.

Discussion

In this chapter, we used two different kinds of biological materials and methods to decipher the genetic bases of female fertility in *P. oryzae*. First, we used pairs of fertile and sterile progenies from four crosses produced by Saleh et al. (2012a) to perform a BSA analysis. Sterile mutants used in crosses were obtained by vegetative multiplication from WT fertile strains from the Yule field population. Vegetative multiplication by successive transfers of asexual spores led to the loss of female fertility in mutants (Saleh et al., 2012a). Other phenotypes associated to female sterility have been observed in the sterile mutants used in these crosses, especially a facilitated release of asexual spores, and a reduction of male fertility (Saleh et al., 2012a). Second, we used a set of 71 *P. oryzae* strains from the same population of Yule, already described in Chapter 2. We took advantage of these two sets of biological materials already available in the laboratory to perform two complementary analyses of association genetics. The BSA pairs of bulked progenies segregated on a binary female fertility / sterility phenotype (i.e. the capability / incapability to produced perithecia). The GWAS performed on the Yule population analyzed female fertility measured as a continuous quantitative trait (i.e. the capacity to produce more or less perithecia).

Our study is the first that used BSA to search genomic regions involved in fertility in *P. oryzae*. The BSA approach is a powerful method to detect genomic regions associated with a given phenotype with low sequencing cost. Austin et al. (2011) previously showed the high efficiency of combining Next Generation Sequencing methods and BSA on *Arabidopsis thaliana*. Here, we obtained a mean coverage of 77X per Pool-seq. According to Rellstab et al. (2013), this mean coverage is sufficient to correctly estimate allele frequencies. The main limitation in the identification of candidate genes came from the low resolution of the method in terms of size of candidate regions (see Introduction above). Indeed, among the four shared regions highlighted by our analysis, only region 3 was constituted of a single SNP on scaffold 11, the three others being at least 400kb large. This low resolution was likely due to the fact that we analyzed a small number of recombination events, since few progenies per cross were sequenced and since the progenies analyzed were obtained after a small number of generations of sexual reproduction (Figure 1). Another limitation came from the probable existence of a chromosomic

rearrangement between parents of crosses #130 and #132. We observed two plateaus of fixed SNPs on scaffolds 3 and 9 (Figure 2), that correspond to chromosomes 1 and 4 on 70-15 reference genome (Dean et al., 2005). A rearrangement between GUY11 and 70-15 spanning exactly the same regions was previously described by Bao et al. (2017). We hypothesized that for crosses #130 and #132, one parent had the same chromosomal architecture as 70-15 reference genome and the other the same chromosomal architecture as GUY11 reference genome. This rearrangement generated a lack of recombination in the regions involved, preventing to detect narrow regions associated to female fertility in these chromosomic regions (Sup. Figure 3).

In the progenies analyzed in this chapter, produced by Saleh et al. (2012a), we systematically found at least two significant regions per cross, suggesting the involvement of two independent loci. This hypothesis agrees with the results of Saleh et al. (2012a) who suggested the involvement of two unlinked and epistatic genes in the loss of female fertility in each mutant. Independent mutations in two genes would have occurred twice, once in strain CH999_B12 and once in strain CH0997_A10. According to this hypothesis, the theoretical maximum value of $\Delta Freq_P$ that should be observed is 66% (2/3). However, the small number of progenies in the bulks limits the possibility to test this hypothesis and alternative ones such as segregation distortions, as already proposed by Saleh et al. (2012a).

Among the four crosses analyzed, crosses #130 and #133 shared CH0997_A10 as the sterile mutant ancestor, and crosses #131 and #132 shared CH0999_B12 as the sterile mutant ancestor. Hence, we expected to find the same regions involved in loss of fertility for crosses #130 and #133 on one hand, and for crosses #131 and #132 on the other hand. Out of four regions found in cross #130, three were shared with cross #133 (regions 1, 3 and 4), but also one with cross #131 (region 1) and one with cross #132 (region 4). On the contrary, crosses # 131 and #132 shared only one region (region 2). Due to the small number of progenies in some bulks, we cannot exclude that our sample was biased and that one region involved in the loss of fertility in the original mutant was sometime not represented in some bulks of sterile progenies. Another interesting point is to know if genes involved in the loss of fertility were the same in CH0997_A10 and CH0999_B12. Our results suggest that regions 1, 2 and 4 could be shared between both mutants, although not detected or segregating in all crosses. One way to address this

question would be to cross these two mutants to check if it leads to the restauration of the WT character of female fertility. However, crosses between these two mutants are impossible since they are precisely completely defective in sexual reproduction.

As for the GWAS performed on male fertility described in Chapter 2, the broad-sense heritability of the female fertility trait (normalized surface of perithecia produced) was extremely low. This might be one reason why the classical GWAS failed to detect any significant association between SNPs and the production of perithecia. The local score approach allowed to circumvent this limitation, confirming that this approach is a powerful tool for the detection of the genomic bases of weakly heritable traits. The GWAS identified a gene on scaffold 4 named Mo_GUY11_025330 significantly associated with the production of perithecia, which constitute an interesting candidate. Indeed, the ortholog of this gene on the 70-15 reference genome, MGG_09263, was shown to be involved in conidiation in *P. oryzae* (Kim and Lee, 2012; MGG_09263 was named MoCOD2 in their study). This gene encodes a $Zn(II)_2Cys_6$ transcription factor (TF). MGG_09263 (MoCOD2) plays a role in invasive growth and its deletion leads to a reduction in conidiation (Chung et al., 2013). In *Fusarium graminearum*, Son et al. (2011) mutated 170 TFs, among which a majority of TFs of $Zn(II)_2Cys_6$ type, and showed that 105 out of the 170 mutants were defected in sexual development and more precisely in perithecia production. However, the assembly of the GUY11 reference genome GUY11 (Bao et al., 2017) contained missing data in the gene Mo_GUY11_025330, leading to three missing regions in exons in the protein-coding sequence. Hence, we did not analyze the correlation between haplotypic variation and phenotypic values among the 71 individuals, because putative SNPs located in these missing regions would have been ignored, leading to bias results. One solution to this problem would be to map reads on another reference assembly in which the sequence of the candidate gene is complete.

The BSA approach generated a large list of predicted genes. Additional work is needed to determine if some functions or biological processes are enriched in the regions identified. Gene ontologies are available for the 70-15 predicted genes and will be used to classify genes in the candidate regions. But, some candidates can already be considered as very promising since they were previously

described as contributing in sexual reproduction, either in *P. oryzae* or in other fungi. Functional validation by complementation will allow to confirm their role.

The two approaches used here yielded different results, and we found no candidate regions common to both approaches. The joint use of GWAS and BSA has been employed in maize by Gyawali et al. (2019), by analyzing the same dataset with both methods in order to identify highly-confident candidate genes associated with plant height. Here, we used GWAS and BSA on different biological materials with the aim to identify several genes implied in female fertility more than to validate one candidate with both methods. Indeed, as suggested by former studies of female fertility in fungal model organisms (Teichert et al., 2012; Wilson et al., 2019), a polygenic determinism of this trait was expected and was observed.

References cited

Ali, S., Gladieux, P., Ravel, S., Adreit, H., Meusnier, I., Milazzo, J., Cros-Arteil, S., Bonnot, F., Jin, B., Dumartinet, T., Charriat, F., Lassagne, A., He, X., Tharreau, D., Huang, H., Morel, J.-B., Fournier, E., 202. Coevolution with spatially structured rice landraces maintains multiple generalist lineages in the rice blast pathogen. BioRXiv. https://doi.org/10.1101/2021.12.15.472812

Austin, R.S., Vidaurre, D., Stamatiou, G., Breit, R., Provart, N.J., Bonetta, D., Zhang, J., Fung, P., Gong, Y., Wang, P.W., McCourt, P., Guttman, D.S., 2011. Next-generation mapping of *Arabidopsis* genes. The Plant Journal 67, 715–725. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04619.x

Baidya, S., Cary, J.W., Grayburn, W.S., Calvo, A.M., 2011. Role of nitric oxide and flavohemoglobin homolog genes in *Aspergillus nidulans* sexual development and mycotoxin production. Applied Environmental Microbiology 77(15):5524-8. https://doi.org/10.1128/AEM.00638-11

Bao, J., Chen, M., Zhong, Z., Tang, W., Lin, L., Zhang, X., Jiang, H., Zhang, D., Miao, C., Tang, H., Zhang, J., Lu, G., Ming, R., Norvienyeku, J., Wang, B., Wang, Z., 2017. PacBio sequencing reveals transposable elements as a key contributor to genomic plasticity and virulence variation in *Magnaporthe oryzae*. Molecular Plant 10, 1465–1468. https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.08.008

Benkhali, J., Coppin, E., Brun, S., Peraza-Reyes, L., Martin, T., et al., 2013. A network of HMG-box transcription factors regulates sexual cycle in the fungus *Podospora anserina*. PLOS Genetics 9(7): e1003642. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003642

Billiard, S., López-Villavicencio, M., Hood, M.E., Giraud, T., 2012. Sex, outcrossing and mating types: unsolved questions in fungi and beyond. Journal of Evolutionary Biology 25, 1020–1038. https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2012.02495.x

Bloemendal, S., Bernhards, Y., Bartho, K., Dettmann, A., Voigt, O., Teichert, I., Seiler, S., Wolters, D.A., Pöggeler, S., Kück, U., 2012. A homologue of the human STRIPAK complex controls sexual development in fungi. Molecular Microbiology 84, 310–323. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08024.x

Bloemendal, S., Lord, K.M., Rech, C., Hoff, B., Engh, I., Read, N.D., Kück, U., 2010. A mutant defective in sexual development produces aseptate ascogonia. Eukaryot Cell 9, 1856–1866. https://doi.org/10.1128/EC.00186-10

Bradbury, P.J., Zhang, Z., Kroon, D.E., Casstevens, T.M., Ramdoss, Y., Buckler, E.S., 2007. TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. Bioinformatics 23, 2633–2635. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm308

Busch, S., Schwier, E.U., Nahlik, K., Bayram, O., Helmstaedt, K., Draht, O.W., Krappmann, S., Valerius, O., Lipscomb, W.N., Braus, G.H., 2007. An eight-subunit COP9 signalosome with an intact JAMM motif is required for fungal fruit body formation. Proceedings of the National Academy of Sciences 104, 8089–8094. https://doi.org/10.1073/pnas.0702108104

Chung, H., Choi, J., Park, S.-Y., Jeon, J., Lee, Y.-H., 2013. Two conidiation-related Zn(II)2Cys6 transcription factor genes in the rice blast fungus. Fungal Genetics and Biology 61, 133–141. https://doi.org/10.1016/j.fgb.2013.10.004

Coppin, E., Arnaise, S., Contamine, V., Picard, M., 1993. Deletion of the mating-type sequences in *Podospora anserina* abolishes mating without affecting vegetative functions and sexual differentiation. Molec. Gen. Genet. 241–241, 409–414. https://doi.org/10.1007/BF00284694

Danecek, P., Bonfield, J.K., Liddle, J., Marshall, J., Ohan, V., Pollard, M.O., Whitwham, A., Keane, T., McCarthy, S.A., Davies, R.M., Li, H., 2021. Twelve years of SAMtools and BCFtools. GigaScience 10, giab008. https://doi.org/10.1093/gigascience/giab008

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., Rehmeyer, 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., 2005. The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. Nature 434, 980–986. https://doi.org/10.1038/nature03449

Dioh, W., Tharreau, D., Notteghem, J.L., Orbach, M., Lebrun, M.-H., 2000. Mapping of avirulence genes in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*, with RFLP and RAPD markers. MPMI 13, 217–227. https://doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.2.217

Dodge, B.O., 1935. The mechanics of sexual reproduction in *Neurospora*. Mycologia 27, 418–438. https://doi.org/10.1080/00275514.1935.12017089

Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S., Käller, M., 2016. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. Bioinformatics 32, 3047–3048. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354

Fariello, M.I., Boitard, S., Mercier, S., Robelin, D., Faraut, T., Arnould, C., Recoquillay, J., Bouchez, O., Salin, G., Dehais, P., Gourichon, D., Leroux, S., Pitel, F., Leterrier, C., San Cristobal, M., 2017. Accounting for linkage disequilibrium in genome scans for selection without individual genotypes: The local score approach. Mol Ecol 26, 3700–3714. https://doi.org/10.1111/mec.14141

Ferreira, A.V., An, Z., Metzenberg, R.L., Glass, N.L., 1998. Characterization of mat A-2, mat A-3 and deltamatA mating-type mutants of *Neurospora crassa*. Genetics 148, 1069–1079.

Frawley, D., Bayram, Ö., 2020. The pheromone response module, a mitogen-activated protein kinase pathway implicated in the regulation of fungal development, secondary metabolism and pathogenicity. Fungal Genetics and Biology 144: 103469. https://doi.org/10.1016/j.fgb.2020.103469

Gautier, M., Vitalis, R., Flori, L., Estoup, A., 2022. f -Statistics estimation and admixture graph construction with Pool-Seq or allele count data using the R package poolfstat. Molecular Ecology Resources 22, 1394–1416. https://doi.org/10.1111/1755-0998.13557

Grabarczyk, D.B., 2020. Crystal structure and interactions of the Tof1-Csm3 (Timeless-Tipin) fork protection complex. Nucleic Acids Research 9;48(12):6996-7004. https://doi.org/10.1093/nar/gkaa456.

Gyawali, A., Shrestha, V., Guill, K.E., Flint-Garcia, S., Beissinger, T.M., 2019. Single-plant GWAS coupled with bulk segregant analysis allows rapid identification and corroboration of plant-height candidate SNPs. BMC Plant Biol 19, 412. https://doi.org/10.1186/s12870-019-2000-y

Hanna, R.A., Campbell, R.L., Davies, P.L.,2008. Calcium-bound structure of calpain and its mechanism of inhibition by calpastatin. Nature 456(7220):409-12. https://doi.org/10.1038/nature07451

Harigaya, Y., Tanaka, H., Yamanaka, S., Tanaka, K., Watanabe, Y., Tsutsumi, C., Chikashige, Y., Hiraoka, Y., Yamashita, A., Yamamoto, M, 2006. Selective elimination of messenger RNA prevents an incidence of untimely meiosis. Nature 6;442(7098):45-50. https://doi.org/10.1038/nature04881.

Kanamori, M., Kato, H., Yasuda, N., Koizumi, S., Peever, T.L., Kamakura, T., Teraoka, T., Arie, T., 2007. Novel mating type-dependent transcripts at the mating type locus in *Magnaporthe oryzae*. Gene 403, 6–17. https://doi.org/10.1016/j.gene.2007.06.015

Kim, K.S., Lee, Y.-H., 2012. Gene expression profiling during conidiation in the rice blast pathogen Magnaporthe oryzae. PLoS ONE 7, e43202. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043202

Kofler, R., Pandey, R.V., Schlotterer, C., 2011. PoPoolation2: identifying differentiation between populations using sequencing of pooled DNA samples (Pool-Seq). Bioinformatics 27, 3435–3436. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr589

Kong, S., Park, S-Y., Lee, Y-H., 2015. bZIP TF family in the rice blast fungus *M. oryzae*. Environmental Microbiology 17:1425-1443. https://doi.org/10.1111/1462-2920.12633

Kozielska, M., Weissing, F.J., Beukeboom, L.W., Pen, I., 2010. Segregation distortion and the evolution of sex-determining mechanisms. Heredity 104, 100–112.

Liang, T., Chi, W., Huang, L., Qu, M., Zhang, S., Chen, Z.-Q., Chen, Z.-J., Tian, D., Gui, Y., Chen, X., Wang, Z., Tang, W., Chen, S., 2020. Bulked Segregant Analysis coupled with whole-genome sequencing (BSA-Seq) mapping identifies a novel pi21 haplotype conferring basal resistance to rice blast disease. Int J Mol Sci 21, E2162. https://doi.org/10.3390/ijms21062162

Liu, XH., Ning, GA., Huang, LY. et al., 2016. Calpains are involved in asexual and sexual development, cell wall integrity and pathogenicity of the rice blast fungus. Scientific Reports 6, 31204. https://doi.org/10.1038/srep31204

McCarthy, M.I., Abecasis, G.R., Cardon, L.R., Goldstein, D.B., Little, J., Ioannidis, J.P.A., Hirschhorn, J.N., 2008. Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. Nature Reviews Genetics 9, 356–369. https://doi.org/10.1038/nrg2344

Metzenberg, R.L., Glass, N.L., 1990. Mating type and mating strategies in *Neurospora*. Bioessays 12, 53–59. https://doi.org/10.1002/bies.950120202

Michelmore, R.W., Paran, I., Kesseli, R.V., 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. Proceedings of the National Academy of Sciences 88, 9828–9832. https://doi.org/10.1073/pnas.88.21.9828

Montenegro-Montero, A., Goity, A., Larrondo, L.F., 2015. The bZIP transcription factor HAC-1 is involved in the unfolded protein response and is necessary for growth on cellulose in *Neurospora crassa*. PLOS ONE 10(7): e0131415. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131415

Nottéghem, J.L., Silué, D., 1992. Distribution of the mating type alleles in *Magnaporthe Grisea* populations pathogenic on rice. Phytopathology 82, 421–424. https://doi.org/10.1094/Phyto-82-421

Pau, G., Fuchs, F., Sklyar, O., Boutros, M., Huber, W., 2010. EBImage an R package for image processing with applications to cellular phenotypes. Bioinformatics 26, 979–981. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq046

Rellstab, C., Zoller, S., Tedder, A., Gugerli, F., Fischer, M.C., 2013. Validation of SNP allele frequencies determined by Pooled Next-Generation Sequencing in natural populations of a non-model plant species. PLoS ONE 8, e80422. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080422

Saleh, D., Milazzo, J., Adreit, H., Tharreau, D., Fournier, E., 2012a. Asexual reproduction induces a rapid and permanent loss of sexual reproduction capacity in the rice fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*: results of in vitro experimental evolution assays. BMC Evol Biol 12, 42. https://doi.org/10.1186/1471-2148-12-42

Saleh, D., Xu, P., Shen, Y., Li, C., Adreit, H., Milazzo, J., Ravigné, V., Bazin, E., Nottéghem, J.-L., Fournier, E., Tharreau, D., 2012b. Sex at the origin: an Asian population of the rice blast fungus

Magnaporthe oryzae reproduces sexually. Molecular Ecology 21, 1330–1344. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05469.x

Seol, Y., Neuman, K.C., 2016. The dynamic interplay between DNA topoisomerases and DNA topology. Biophysics Review 8(Suppl 1):101-111. https://doi.org/10.1007/s12551-016-0240-8

Shim, W.-B., Sagaram, U.S., Choi, Y.-E., So, J., Wilkinson, H.H., Lee, Y.-W., 2006. FSR1 is essential for virulence and female fertility in *Fusarium verticillioides* and *F. graminearum*. MPMI 19, 725–733. https://doi.org/10.1094/MPMI-19-0725

Šidák, Z., 1967. Rectangular confidence regions for the means of multivariate normal distributions. Journal of the American Statistical Association 62, 626–633. https://doi.org/10.1080/01621459.1967.10482935

Son, H., Seo, Y.-S., Min, K., Park, A.R., Lee, J., Jin, J.-M., Lin, Y., Cao, P., Hong, S.-Y., Kim, E.-K., Lee, S.-H., Cho, A., Lee, S., Kim, M.-G., Kim, Y., Kim, J.-E., Kim, J.-C., Choi, G.J., Yun, S.-H., Lim, J.Y., Kim, M., Lee, Y.-H., Choi, Y.-D., Lee, Y.-W., 2011. A phenome-based functional analysis of transcription factors in the cereal head blight fungus, *Fusarium graminearum*. PLoS Pathog 7, e1002310. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002310

Teichert, I., Nowrousian, M., Pöggeler, S., Kück, U., 2014. The filamentous fungus *Sordaria macrospora* as a genetic model to study fruiting body development, in: Advances in Genetics. Elsevier, pp. 199–244. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800149-3.00004-4

Teichert, I., Wolff, G., Kück, U., Nowrousian, M., 2012. Combining laser microdissection and RNA-seq to chart the transcriptional landscape of fungal development. BMC Genomics 13, 511. https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-511

Thierry, M., Charriat, F., Milazzo, J., Adreit, H., Ravel, S., Cros-Arteil, S., borron, S., Sella, V., Kroj, T., Ioos, R., Fournier, E., Tharreau, D., Gladieux, P., 2022. Maintenance of divergent lineages of the rice blast fungus *Pyricularia oryzae* through niche separation, loss of sex and post-mating genetic incompatibilities. PLoS Pathog 18, e1010687. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010687

Wei, N., Deng, X.W., 2003. The COP9 signalosome. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 19, 261–286. https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.19.111301.112449

Wei, N., Deng, X.W., 1992. COP9: a new genetic locus involved in light-regulated development and gene expression in *Arabidopsis*. Plant Cell 4, 1507–1518. https://doi.org/10.1105/tpc.4.12.1507

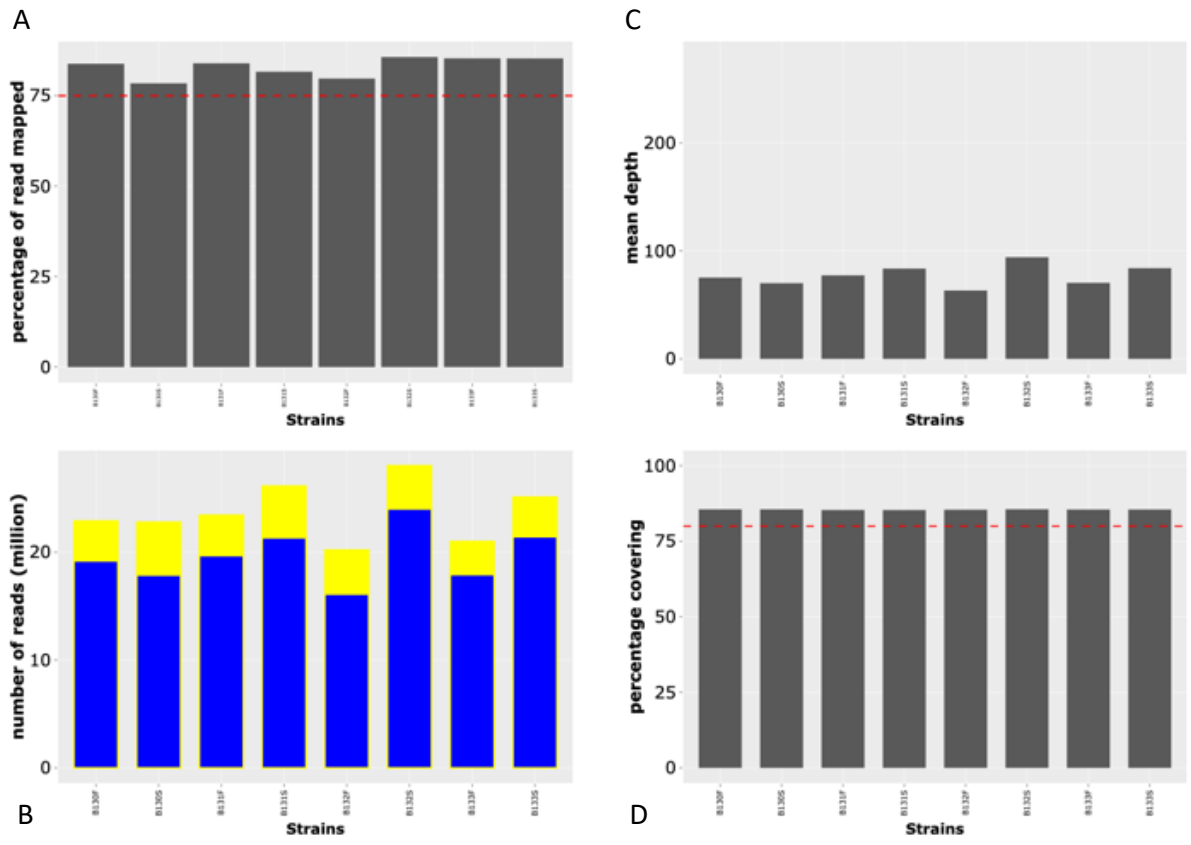
Wilson, Wilken, van der Nest, Wingfield, Wingfield, 2019. It's all in the genes: The regulatory pathways of sexual reproduction in filamentous Ascomycetes. Genes 10, 330. https://doi.org/10.3390/genes10050330

Xie, N., Ruprich-Robert, G., Silar, P., Chapeland-Leclerc, F., 2015. Bilirubin oxidase-like proteins from *Podospora anserina*: promising thermostable enzymes for application in transformation of plant biomass. Environmental Microbiology 17(3): 866-875. https://doi.org/10.1111/1462-2920.12549

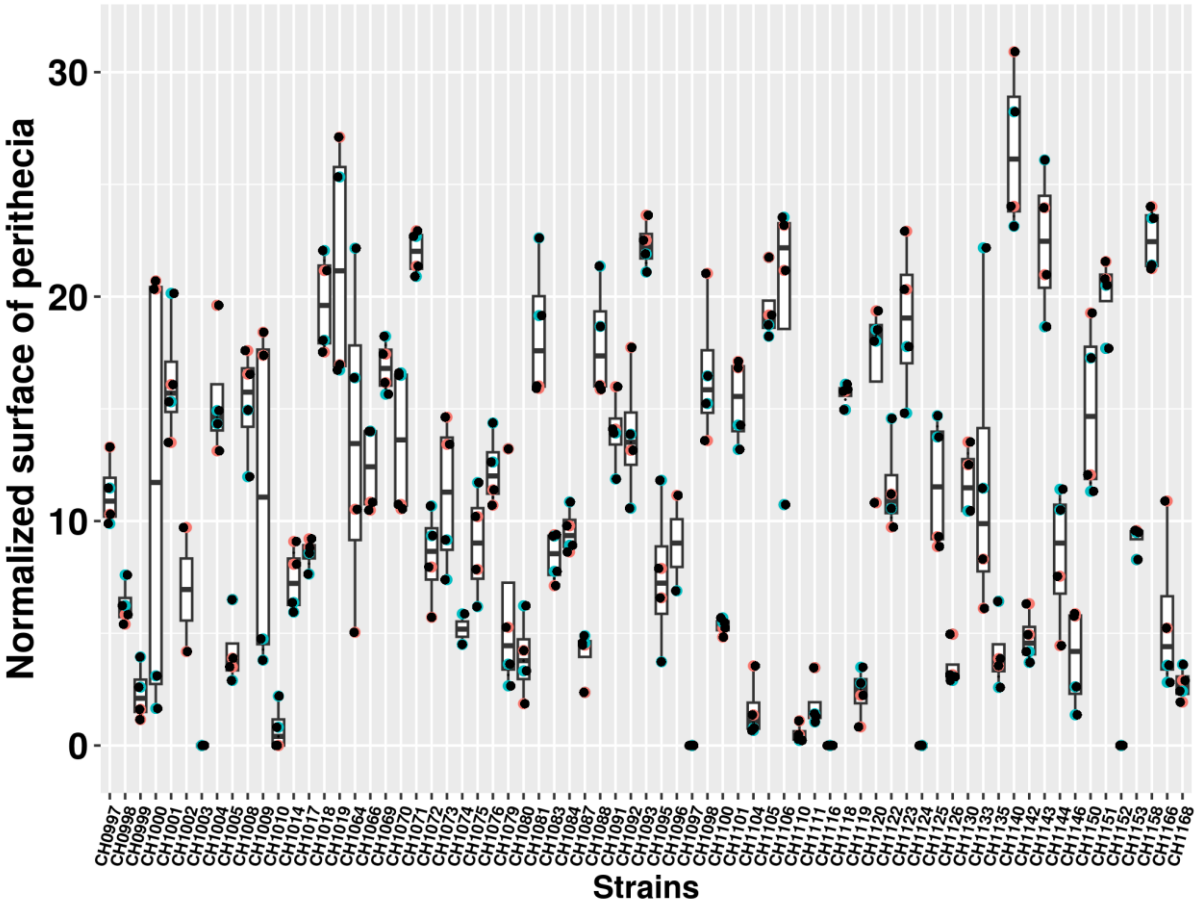
Yin, W.B., Reinke, A.W., Szilágyi, M., Emri, T., Chiang, Y.M., Keating, A.E., Pócsi, I., Wang, C.C.C., Keller, N.P., 2013. bZIP transcription factors affecting secondary metabolism, sexual development and stress responses in *Aspergillus nidulans*. Microbiology 159(Pt 1):77-88. https://doi.org/10.1099/mic.0.063370-0

Supplementary Table 1: Constitution of bulks of sterile and fertile progenies for Pool-Seqs for each cross. FC: final concentration of bulks in the corresponding Pool-Seq. Information for each strain are italicized (ID: name of strain, V: volume of DNA solution used to constitute the pool, Q: corresponding DNA quantity).

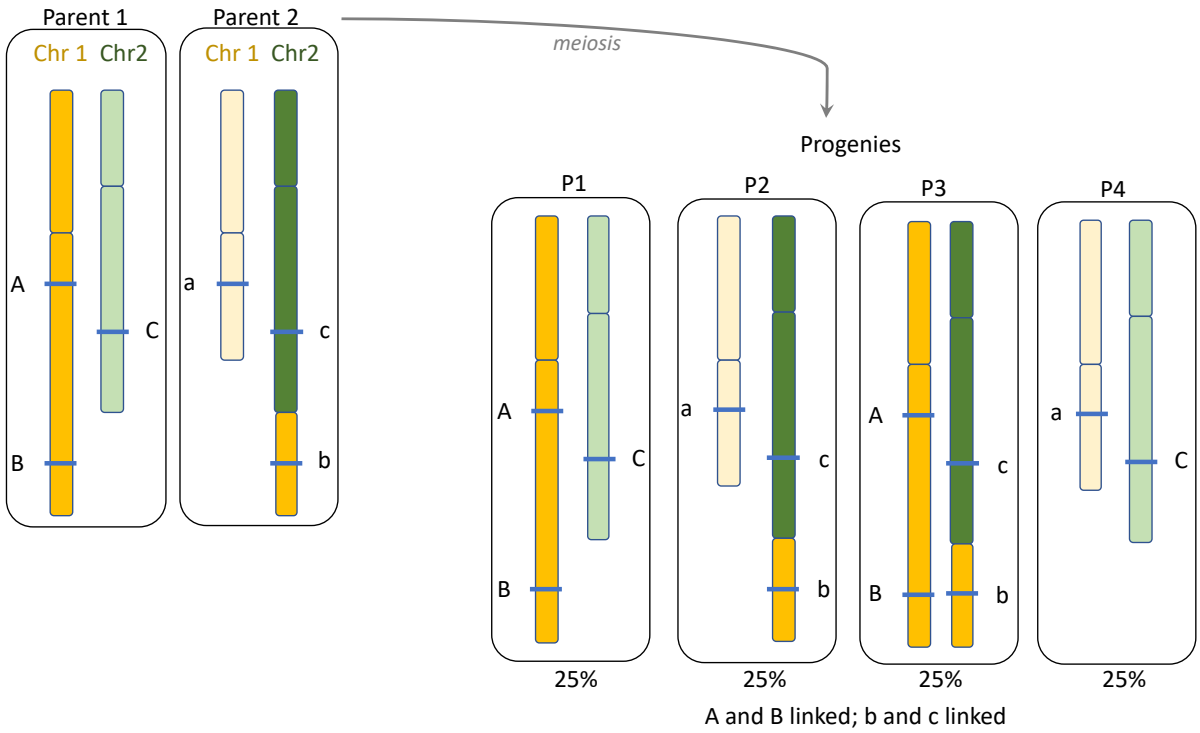
	Cross #130			**Cross #131**			**Cross #132**			**Cross #133**		
Bulks of sterile progenies	Pool-seq #130S 9 strains FC = 44,44 ng/µl			Pool-seq #131S 6 strains FC = 66,67 ng/µl			Pool-seq #132S 6 strains FC = 66,67 ng/µl			Pool-seq #133S 10 strains FC = 40 ng/µl		
	ID	*V (µl)*	*Q (ng)*	*ID*	*V (µl)*	*Q (ng)*	*ID*	*V (µl)*	*Q (ng)*	*ID*	*V (µl)*	*Q (ng)*
	130/0/5	*8,54*	*766,46*	*131/0/19*	*13,99*	*906,51*	*132/0/11*	*15,21*	*1186,43*	*133/0/05*	*14,70*	*981,97*
	130/0/9	*12,05*	*766,46*	*131/0/22*	*16,54*	*906,51*	*132/0/13*	*21,34*	*1186,43*	*133/0/11*	*9,44*	*981,97*
	130/0/10	*18,16*	*766,46*	*131/0/26*	*14,96*	*906,51*	*132/0/14*	*22,47*	*1186,43*	*133/0/12*	*10,40*	*981,97*
	130/0/13	*13,26*	*766,46*	*131/0/27*	*13,82*	*906,51*	*132/0/20*	*13,61*	*1186,43*	*133/0/16*	*8,16*	*981,97*
	130/0/21	*10,65*	*766,46*	*131/0/36*	*19,71*	*906,51*	*132/0/22*	*14,19*	*1186,43*	*133/0/18*	*11,75*	*981,97*
	130/0/31	*8,95*	*766,46*	*131/0/37*	*20,98*	*906,51*	*132/0/29*	*13,18*	*1186,43*	*133/0/19*	*6,58*	*981,97*
	130/0/32	*8,57*	*766,46*							*133/0/22*	*10,02*	*981,97*
	130/0/39	*11,11*	*766,46*							*133/0/23*	*9,06*	*981,97*
	130/0/40	*8,71*	*766,46*							*133/0/26*	*9,13*	*981,97*
										133/0/30	*10,77*	*981,97*
Bulks of fertile progenies	Pool-seq #130F 9 strains FC = 44,44 ng/µl			Pool-seq #131F 6 strains FC = 66,67 ng/µl			Pool-seq #132F 6 strains FC = 66,67 ng/µl			Pool-seq #133F 10 strains FC = 40 ng/µl		
	ID	*V (µl)*	*Q (ng)*	*ID*	*V (µl)*	*Q (ng)*	*ID*	*V (µl)*	*Q (ng)*	*ID*	*V (µl)*	*Q (ng)*
	130/0/1	*17,90*	*812,85*	*131/0/21*	*16,99*	*1264,00*	*132/0/17*	*15,94*	*589,89*	*133/0/01*	*10,18*	*912,34*
	130/0/16	*12,32*	*812,85*	*131/0/25*	*13,50*	*1264,00*	*132/0/24*	*43,70*	*589,89*	*133/0/07*	*11,46*	*912,34*
	130/0/22	*11,26*	*812,85*	*131/0/29*	*16,99*	*1264,00*	*132/0/26*	*12,71*	*589,89*	*133/0/08*	*7,60*	*912,34*
	130/0/27	*10,32*	*812,85*	*131/0/32*	*25,90*	*1264,00*	*132/0/30*	*6,70*	*589,89*	*133/0/10*	*8,35*	*912,34*
	130/0/28	*12,62*	*812,85*	*131/0/34*	*15,57*	*1264,00*	*132/0/31*	*6,76*	*589,89*	*133/0/20*	*7,17*	*912,34*
	130/0/33	*7,08*	*812,85*	*131/0/39*	*11,05*	*1264,00*	*132/0/32*	*14,18*	*589,89*	*133/0/21*	*10,86*	*912,34*
	130/0/34	*8,82*	*812,85*							*133/0/31*	*9,83*	*912,34*
	130/0/37	*9,68*	*812,85*							*133/0/33*	*15,95*	*912,34*
	130/0/38	*10,01*	*812,85*							*133/0/34*	*10,61*	*912,34*
										133/0/35	*7,97*	*912,34*



Supplementary Figure 1. Genome sequencing statistics of the 8 Pool-Seqs used for BSA analysis. A: Percentage of reads mapped on the reference genome GUY11; the red dashed line is a threshold at 75%. B: Number of reads (in million) produced per strain (yellow + blue) and number of reads (in million) mapped on the reference (blue). C: Mean depth. D: Percentage of reference genome covered; the red dashed line is the threshold of 80% coverage.



Supplementary Figure 2: Quantity of perithecia produced by the 71 *P. oryzae* strains. The vertical axis is the normalized surface corresponding to perithecia. Blue and red points correspond to the first and second replicates respectively.



Supplementary Figure 3: Consequences of the putative chromosomal rearrangement between parents in the progenies

3. Résultats complémentaires : Analyse QTL

A QTL analysis was performed on progenies of a cross between two female fertile strains. This cross was chosen for the analysis of female fertility because the genome sequences of progenies were available and fertility had been evaluated by crossing with reference strains. Both parents belong to the same population and were isolated on barley grains in Thailand. These strains are genetically indistinguishable from strains isolated on rice.

3.1 Materials

Strains TH0012 and TH0016 were crossed *in vitro* and 151 monoascospore progenies were isolated. The genome of progenies was sequenced and mapped on the 70-15 reference genome. A genetic map was constructed with 496 non-redundant markers distributed on chromosomes as follows:

chromosome 1: 84
chromosome 2: 20
chromosome 3: 109
chromosome 4: 103
chromosome 5: 13
chromosome 6: 106
chromosome 7: 61

Female fertility was measured based on visual evaluation of the formation of perithecia after crossing with reference strains and the following a semi-quantitative scale:

0: no perithecia
1: some perithecia
2: some group of perithecia
3: thin line of perithecia
4: thick line of perithecia

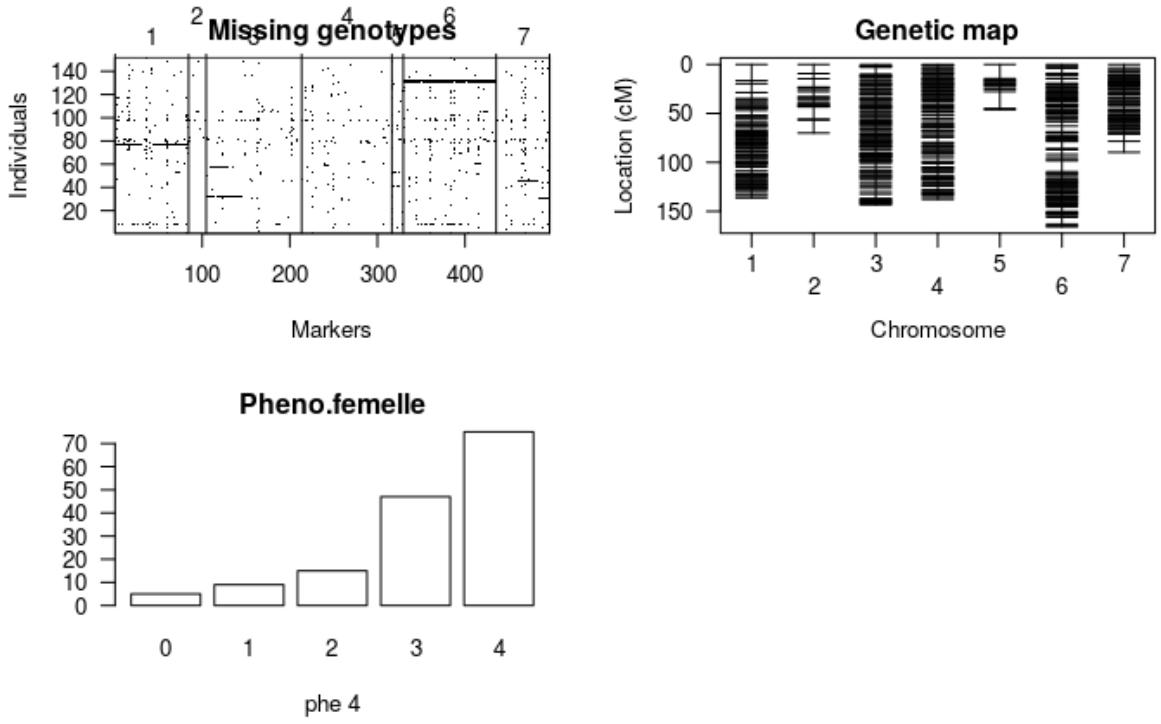


Figure 7. Information on the QTL data. Up-left panel: plot of the missing values of genotype for each individual; up-right panel: genetic map for the seven linkage groups; lower panel: distribution of female fertility.

3.2. QTL analyses

The analyses were performed with the R package "qtl". The method used was Maximum Likelihood performed via the EM algorithm (Dempster et al., 1977).

Female fertility segregated in the progeny: a majority of progenies were female fertile but a some did not produce perithecia (Figure 7).

3.2.1 Simple Interval Mapping (SIM)

We used a non parametric model, with an extension of the Kruskal-Wallis test, similar to the method described by Kruglyak and Lander (1995). This method allows to take into account incomplete genotype information (such as at locations between genetic markers), by

modifying the Kruskal-Wallis statistic so that the rank for each individual is weighted by the genotype probabilities (analogous to Haley-Knott regression).

The resulting Manhattan plot highlighted two peaks, one on chromosome 5 and one on chromosome 3 (Figure 8). The peak on chromosome 5 was slightly higher than the peak on chromosome 3. However, none of the peaks was above the threshold of significance. This threshold was calculated by permutation test using simulations from the joint distribution Pr(g | O), where g is the underlying genotype vector and O is the observed multipoint marker data. With 10,000 permutations, the threshold value is 2.62 for a risk of false positive of 5% (risk of mistakenly considering the peak to be truly associated).

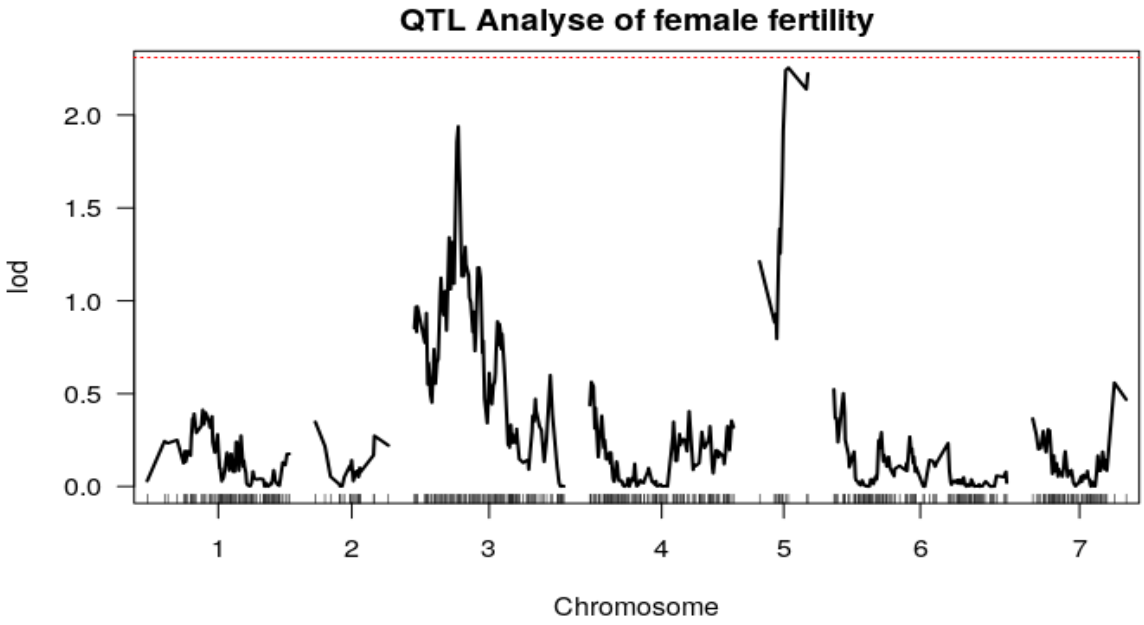


Figure 8. Manhattan plot of the local score for the SIM model. The threshold is the red dotted line.

The position of the marker with the highest association was at position 3,700,485 on Chromosome 5. To calculate a credible interval for the region, we used a drop-off method based on the likelihood ratio test (Lander and Botstein, 1989). The confidence interval was calculated by finding the location at each side of the estimated QTL location that corresponds to a decrease in the LOD score of 1 unit (also called 1-LOD). This resulted in a region of 2 Mb between positions 2,403,622and 4,430,284.

3.2.2. Composite Interval Mapping (CIM)

The CIM procedure is expected to increase the power of QTL detection and reduce the bias in the estimated position and effect(s) of QTL (for details, see Jansen and Stam, 1994; Utz and Melchinger, 1994; Zeng, 1994).

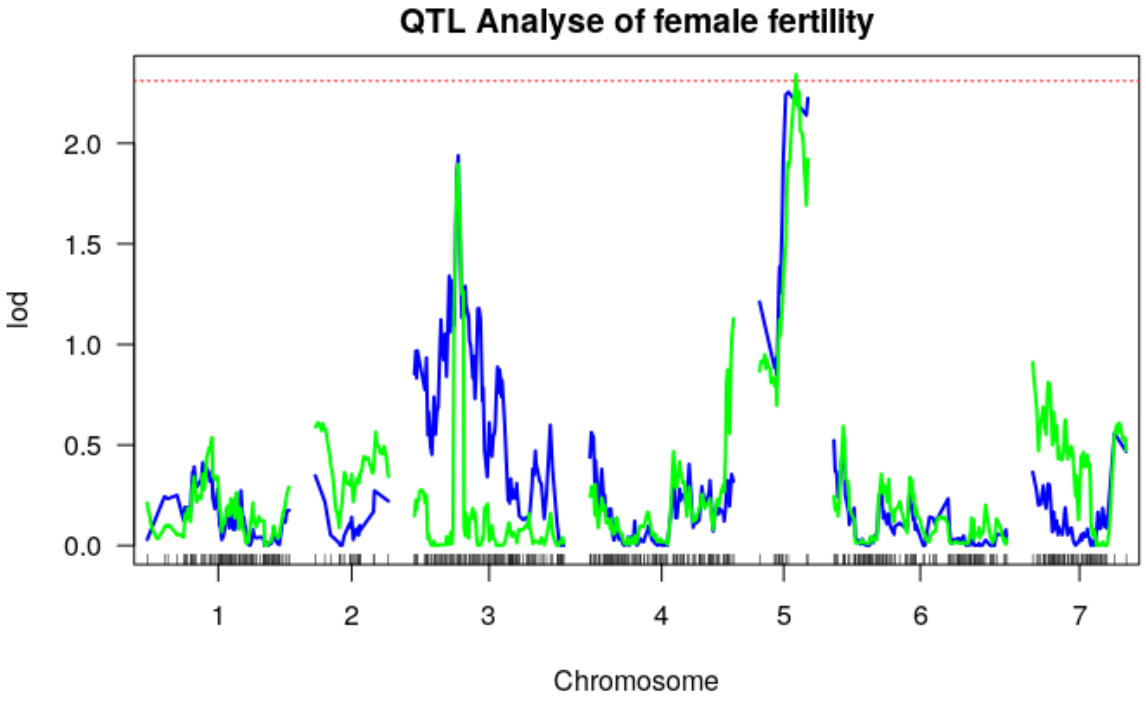


Figure 9. Manhattan plot of the local score for the SIM model in blue and the CIM model in green. The threshold is the red dotted line.

Both models predicted the same two peaks (Figure 9). With the CIM model, the peak on chromosome 5 turned significant. The marker at the position 3,700,485 had the highest LOD score (2.26). The peak on chromosome 3 was sharper but still remained under the threshold. Due to the low number of markers, the confidence interval for the peak on chromosome 5 was not improved. For the sub-significant peak on Chromosome 3, the maximum association LOD score was located at position 1,138,340 for a confidence interval of 2.5 Mb (positions 1,103,339 to 3,661,162).

3.2.3. Congruence with the regions found with BSA

The first interval identified by QTL mapping (Chromosome 5 of 70-15, positions 2,403,622 to 4,430,284), overlapped the Region 2 identified by BSA that corresponded to a

region located on Chromosome 5 between positions 3,507,005 and 4,269,568 on the 70-15 reference genome. Note that the second maximum ΔFreqP value obtained by BSA in this region (73.24) fell between positions 3,720,560 and 3,744,799 on Chromosome 5 of 70-15, that is, very close to the peak identified by QTL mapping at position 3,700,485.

The second sub-significant interval identified by QTL mapping (Chromosome 3, positions 1,103,339 to 3,661,162), did not correspond to any region identified by BSA or GWAS.

3.3. Cited reference:

Dempster, A.P., Laird, N.M., Rubin, D.B., 1977. Maximum likelihood from incomplete data via the EM Algorithm. Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological) 39, 1–22. https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1977.tb01600.x

Jansen, R.C., Stam, P., 1994. High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. Genetics 136, 1447–1455. https://doi.org/10.1093/genetics/136.4.1447

Kruglyak, L., Lander, E.S., 1995. Complete multipoint sib-pair analysis of qualitative and quantitative traits. Am J Hum Genet 57, 439–454.

Lander, E.S., Botstein, D., 1989. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. Genetics 121, 185–199. https://doi.org/10.1093/genetics/121.1.185

Utz, H.F., Melchinger, A.E., Seitz, G., Mistele, M., Zeddies, J., 1994. Economic aspects of breeding for yield and quality traits in forage maize. II. Derivation and Evaluation of Selection Indices. Plant Breeding 112, 110–119. https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.1994.tb00658.x

Zeng, Z.B., 1994. Precision mapping of quantitative trait loci. Genetics 136, 1457–1468. https://doi.org/10.1093/genetics/136.4.1457

4. Conclusion et perspectives

L'objectif de ce chapitre était d'identifier les gènes impliqués dans la production de périthèces, considéré comme un proxy de la fertilité femelle.

Nous avons quantifié la production de périthèces pour 71 souches d'une population recombinante collectée au champ à Yule (Yunnan, Chine) en utilisant un outil de traitement d'images. Nous avons observé une variation significative de ce trait entre souches. En effet, nous avons observé des productions de périthèces allant de 0 à 30,9, pour une moyenne de 10,6, une médiane de 10,4 (en pixel sur la surface normalisée). En utilisant l'approche d'étude d'association pangénomique (GWAS), nous avons mis en évidence un gène (Mo_GUY11_025330) sur le scaffold 6 du génome de référence GUY11. Ce gène nommé *MoCOD2* code pour un facteur de transcription Zinc Finger.

L'approche de bulk segregant analysis (BSA) a été testée sur les descendances de quatre croisements déjà disponibles et phénotypés pour la fertilité femelle (phénotype binaire). Même avec un faible nombre de descendants analysés, cette approche, jusqu'ici très peu utilisée chez les champignons sur des traits liés à la reproduction sexuée, a permis de mettre en lumière quatre régions intéressantes contenant des gènes préalablement identifiés chez d'autres espèces pour leurs rôles dans la reproduction sexuée, mais également des gènes non-identifiés possédants des domaines et des fonctions impliquées notamment dans le métabolisme secondaire et dans la régulation transcriptionnelle. Une des régions identifiées par l'approche BSA (Région 2) est également retrouvée avec l'approche de cartographie QTL, qui utilise un jeu de données totalement différent des approches BSA et GWAS.

Les perspectives de ce travail seraient d'une part, de valider fonctionnellement l'implication du gène *MoCOD2* et des autres gènes candidats en générant des mutants pour observer la variation du phénotype, et, d'autre part, de faire des analyses d'enrichissement pour

savoir si certaines régions identifiées avec l'approche BSA possèdent une fréquence plus élevée pour certains processus ou fonctions que le reste du génome.

Discussion générale

L'élucidation des gènes impliqués dans la fertilité chez *P. oryzae,* ainsi que de leur évolution dans les populations naturelles, est nécessaire pour mieux comprendre les processus évolutifs ayant conduit à la perte de la reproduction sexuée dans les populations ayant migré hors du centre d'origine. Dans ce cadre, l'objectif principal de ma thèse était donc de déterminer les bases génétiques de la fertilité chez *P. oryzae*. Pour cela, nous avons utilisé différentes approches, de la biologie cellulaire à la génétique. Nous avons combiné des observations à différentes échelles : microscopique vs macroscopique, et individu (mutants) vs population (naturelle recombinante). Nous avons également utilisé trois approches complémentaires de génétique d'association, la GWAS, la BSA et la cartographie de QTL, afin d'étudier les bases génétiques de la fertilité.

1. Apports de la thèse sur la compréhension des mécanismes de la reproduction sexuée chez *P. oryzae*

1.1. Identification des spermaties et quantification de la fertilité mâle

Bien que les microconidies aient été produites et observées pour la première fois par Kato *et al* en 1994, jusque-là, aucune expérimentation n'avait été menée spécifiquement pour caractériser la fertilité mâle, et elle n'était abordée qu'indirectement par la capacité d'induire la formation de périthèces chez une souche mise en confrontation sur un milieu solide (en boite de Petri). Plus globalement, les microconidies chez *P. oryzae* ont rarement été observées et leur rôle en tant que spermatie, bien que communément accepté, n'avait jamais été démontré (Chuma et al., 2009 ; Zhang et al., 2014). L'étude menée dans le chapitre 1 a permis, d'une part, de fiabiliser la production de microconidies et d'autre part de démontrer pour la première fois leur rôle comme unique élément de fécondation. Nous avons donc pu définir la fertilité

mâle comme la production de microconidies. Cette nouvelle définition à l'avantage de ne pas dépendre d'une autre souche (phénotypage indirect) et ainsi éviter les problèmes d'interactions spécifiques non liées au MAT (Tharreau, 1994 ; Thierry, 2019). Le deuxième avantage est un phénotypage quantitatif précis de la fertilité mâle nécessaire pour la détermination des bases génétiques impliquées dans la fertilité mâle mise en œuvre dans le chapitre 2.

Un point limitant de cette étude et une perspective d'amélioration sont les conditions de cultures pour la production de microconidies. En effet, les souches ont été cultivées en milieu liquide PDB « maison ». D'une part, ces conditions ne représentent pas des conditions observables au champ, et on ne peut donc pas extrapoler les résultats de fertilité à ce qui se passe en milieu naturel. La quantification des microconidies *in planta* est une approche possible, une étude ayant montrée que les microconidies sont observées dans des plantes infectées artificiellement en serre ou naturellement au champ (Zhang et al., 2014). D'autre part, nous avons observé une forte variabilité de production des microconidies entre réplicats, liée aux conditions de culture. Des études sur *N. crassa* ont montré l'importance des facteurs externes tels que la température, la disponibilité en ressources ou encore l'humidité sur la production des microconidies (Maheshwari, 1999 ; Rossier et al., 1977). Ces études soulignent donc la nécessité d'avoir conscience de ces paramètres pour pouvoir mettre en place des solutions pour normaliser au maximum la production de microconidies entre les réplicats. La solution la plus simple envisagée est la standardisation du milieu de culture et de ses composants.

1.2. Phénotypage de la fertilité femelle

Dans le troisième chapitre de cette thèse, nous nous sommes intéressés à la fertilité femelle. Chez les champignons, la fertilité femelle est souvent mesurée par la production des

ascocarpes, parfois en évaluant la formation des asques et ascospores. La mesure est donc indirecte et basée sur un estimateur qui résume partiellement le cycle de reproduction. Chez *P. oryzae*, jusqu'à présent, le phénotypage de la fertilité femelle était limité principalement à la présence ou à l'absence de périthèces, et, plus rarement, à un phénotypage semi-quantitatif par observation visuelle de la quantité de périthèces. Nous avons cherché à améliorer ce phénotypage par deux approches. Pour mesurer quantitativement la fertilité femelle, il est en théorie possible de phénotyper la production de gamètes en mesurant le nombre d'ascogones formés à un temps donné sur une surface connue. Nous avons observé en microscopie des ascogones (Lassagne et al., 2022). Les expérimentations que j'ai réalisées en collaboration avec Sylvain Brun et Fabienne Malagnac pour tenter d'améliorer la quantification des ascogones ne sont pas présentées dans cette thèse. Ces expérimentations ont montré quelques points limitants. Tout d'abord, le dispositif lié à la microscopie est lourd à mettre en place et nécessite un microscope inversé performant. De plus, le milieu de culture doit être relativement transparent pour permettre l'observation, ce qui oblige de s'éloigner des paramètres standards de culture dans lesquels la production de périthèces est optimale (Silué et Nottéghem, 1990). La période de maturité optimale pour pouvoir observer des ascogones est très peu connue. Nous l'avons étudiée pour une seule souche (chapitre 1), mais nous ne pouvons pas affirmer que cela est généralisable pour toutes les souches. Cette vérification nécessiterait des expérimentations complémentaires conséquentes (nombreux réplicats décalés dans le temps). Enfin, l'observation d'ascogones n'est pas évidente (organe peu différencié du mycélium, faible fréquence de formation) et rendrait le phénotypage très chronophage, surtout pour évaluer une population entière.

La mesure directe de formation des gamètes femelle se révélant difficile à réaliser dans le cadre de la thèse, nous avons cherché à disposer d'une méthode permettant une évaluation quantitative de la formation des périthèces. Nous avons pu mettre au point un phénotypage

quantitatif de la production de périthèces grâce à l'utilisation d'outils de prise et de traitement d'images pour 71 souches d'une population naturelle. L'utilisation d'outils de prise et de traitement d'images, originellement développés dans notre équipe pour le phénotypage de symptômes de maladie sur plante, s'est révélée très efficace. En effet, la méthode consiste en l'assignation automatique de pixels à différentes classes définies au préalable par l'utilisateur à partir d'un jeu de données d'apprentissage, sur la base de la composition des pixels en rouge – vert – bleu (RGB). A ce stade, ce phénotypage utilise la méthode classique de confrontation sur boite, et reste donc basé sur l'utilisation d'une autre souche que la souche à évaluer, dont l'effet sur la production de périthèces doit être pris en compte.

Une perspective d'amélioration du phénotypage de la fertilité femelle est la standardisation de la fertilisation par l'apport direct de microconidies en quantité connue. En effet, la méthode de pulvérisation d'une quantité contrôlée de microconidies sur des souches en culture employée dans le chapitre 1, permettrait de phénotyper la formation de périthèces indépendamment de la fertilité mâle des souches testeurs. Cependant, même en utilisant une suspension calibrée de microconidies, une limite importante demeure. En effet, une telle méthode fait l'hypothèse que le pouvoir fécondant des microconidies est équivalent pour toutes les souches, et notamment pour les souches de types sexuels opposés. Une différence dans l'attraction des microconidies en fonction du MAT a été observée chez *N. crassa* (Bistis, 1983). Chez *P. oryzae*, nous avons observé une différence de production de périthèces en fonction du testeur (chapitre 3) que nous ne pouvons pas différencier d'un probable effet MAT. Il semble donc crucial de mesurer l'éventuelle différence de pouvoir fécondant des microconidies entre souches de MAT opposés chez *P. oryzae*, afin d'en tenir éventuellement compte dans le protocole de phénotypage de la fertilité femelle. Une seconde hypothèse importante sur laquelle se base une telle méthode de phénotypage, est qu'il n'y ait pas de différence souche-spécifique

sur la forme de la relation de réponse à la stimulation par les microconidies. A ce stade, cette hypothèse reste à tester.

1.3 Perspectives sur l'observation de la rencontre des gamètes chez *P. oryzae*

Le cycle de reproduction sexuée chez les Ascomycètes est assez complexe (voir Figure 4 de l'introduction générale). En effet, plusieurs étapes sont nécessaires afin d'obtenir un zygote. La première étape est l'interaction entre le trichogyne et la spermatie. Toutefois, la fusion entre la microconidie et un potentiel trichogyne n'a jamais été observée chez *P. oryzae*. L'interaction chimiotropique entre la spermatie et le trichogyne a été observée pour la première fois chez *N. crassa* par Bistis en 1981. En effet, cette étude a permis de montrer la diffusibilité des hormones produites par la spermatie ainsi que la mise en évidence et la croissance du trichogyne vers la spermatie. Cette interaction trichogyne-spermatie a été confirmée et le transfert du noyau de la spermatie à travers le trichogyne a été observé et décrit par des observations récentes en microscopie chez *N. crassa* (Brun et al., 2021). Chez *P. oryzae*, nous avons essayé de déposer un carré d'agar ensemencé avec une suspension de microconidies sur une souche femelle fertile mais sans observer de trichogyne (données non-présentées). Nous avons également mené des observations en microscopie (données non présentées) dans des conditions similaires à celle de Brun et al. (2021). Nous avons observé des hyphes croissants similaires à des trichogynes, ainsi que des ascogones conduisant a posteriori à l'apparition de périthèces, ce qui laisse supposer que des événements de reproduction sexuée ont eu lieu. Cependant, nous n'avons pas observé directement de fusion entre une spermatie et un trichogyne. L'observation des phases de rencontre et de fusion des gamètes permettrait une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires lors de la reproduction. Ces observations

microscopiques d'évènements de fécondation entre les gamètes sont couteuses et longues à mettre en place, et ne peuvent être réalisées que sur un nombre restreint de souches. L'utilisation d'approches de génétique directe telles que la GWAS ne peuvent donc pas être utilisées sur un phénotype basé uniquement sur de telles méthodes de microscopie. En revanche, c'est un très bon outil à développer pour faire de la validation fonctionnelle. En effet, l'observation de mutants femelle-stériles en microscopie permettrait de déterminer avec précision l'étape conduisant à la non-formation des périthèces et, ainsi, de mieux caractériser la fonction des gènes impliqués dans la reproduction sexuée.

2. Apports de la thèse sur les gènes impliqués dans la reproduction sexuée chez *P. oryzae*

Comme mentionné dans l'introduction générale de la thèse (section 3.5), le déterminisme génétique de la reproduction sexuée chez les Ascomycètes est très complexe et met en jeu l'action coordonnée d'une multitude de gènes. Les résultats obtenus par les différentes approches pour la fertilité mâle et la fertilité femelle ont mis en avant plusieurs régions génomiques et sont donc cohérents avec cet attendu. La Figure 10 permet de replacer sur le génome de référence de GUY11 les gènes majeurs impliqués dans la reproduction sexuée identifiés dans la littérature chez *P. oryzae* et d'autre espèces, ainsi que les principaux gènes candidats et fonctions majeures qui ont été identifiés au cours de cette thèse par les différentes approches utilisées.

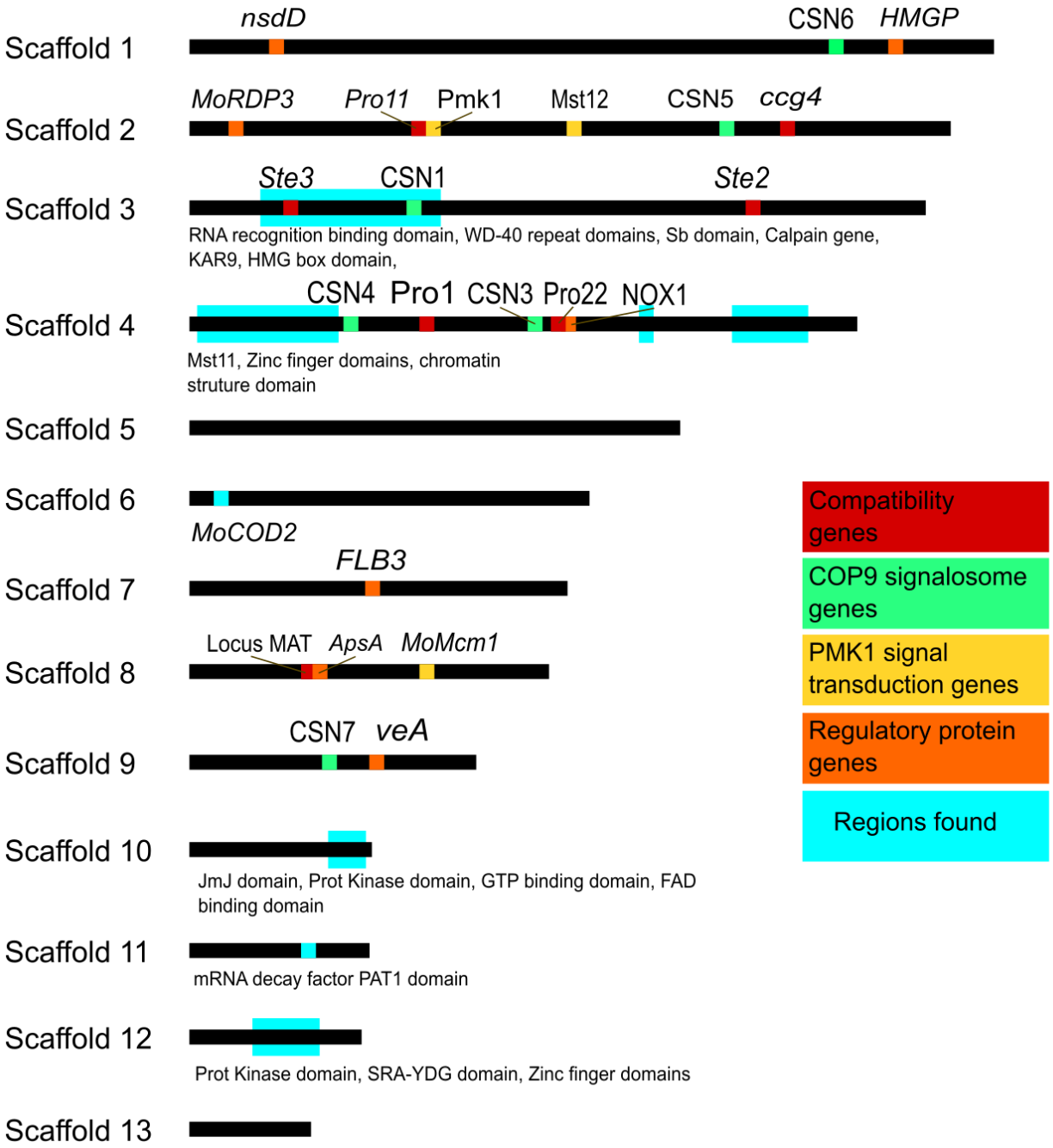


Figure 10 : Cartographie des gènes identifiés dans la littérature pour leur implication dans la reproduction sexuée chez *P. oryzae*, et des régions identifiées au cours de cette thèse par différentes approches de génétique d'association. Les gènes identifiés dans la littérature sont en noir et leur fonction correspond au code couleur ci-dessus. Les gènes et fonctions identifiés sont en bleu. Pour les zones surlignées en bleu, les régions correspondant à des intervalles larges sont symbolisées par des rectangles dépassant la ligne noire symbolisant le scaffold, tandis que les régions correspondant à des gènes uniques ont la même hauteur que la ligne noire. Chaque gène identifié à partir de la littérature est répertorié dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Correspondance et positions génomiques chez *P. oryzae* des gènes impliqués dans la reproduction sexuée chez les Ascomycètes

Identification			**70-15 reference genome**					**GUY11 reference genome**			
ID	Species	reference	Name	ID	Chromosome	Start	Stop	ID	Scaffold	Start	Stop
PaHMG4	*P. anserina*	Ait Benkhali et al., 2013	*HMGP*	MGG_01325	Chromosome 2	3102369	3104524	Mo_GUY11_013500	Scaffold_1	4709429	4710838
nsdD	*A. nidulans*	Han et al., 2001	NA	MGG_07319	Chromosome 2	7234591	7239106	NA	Scaffold_1	580076	584592
Pro11	*S. macrospora*	Bloemendal et al., 2010	*Pro11*	MGG_06211	Chromosome 3	2952506	2957178	Mo_GUY11_076870	Scaffold_2	1527668	1532058
MF1-2	*N. crassa*	NA	*ccg4*	MGG_07733	Chromosome 3	5559978	5561103	Mo_GUY11_084140	Scaffold_2	3988602	3989528
PMK1	*P. oryzae*	Zhang et al., 2014	*PMK1*	MGG_09565	Chromosome 3	3251746	3254587	Mo_GUY11_077260	Scaffold_2	1627354	1628778
ste12	*S. cerevisiae*	Pi et al., 1997	*MST12*	MGG_12958	Chromosome 3	4220800	4225271	NA	Scaffold_2	2567564	2564971
pre-1	*N. crassa*	Pögeler and Kück, 2001	*ste3-like*	MGG_06452	Chromosome 4	3681527	3683564	NA	Scaffold_3	3758318	3760356
pre-2	*N. crassa*	Pögeler and Kück, 2001	*ste2-like*	MGG_04711	Chromosome 1	6893499	6895113	NA	Scaffold_3	718459	719643
Pro22	*S. macrospora*	Bloemendal et al., 2010	NA	MGG_00731	Chromosome 5	1838244	1842185	Mo_GUY11_116210	Scaffold_4	2459051	2462448
Pro1	*S. macrospora*	Masloff et al., 1999	*PRO1*	MGG_00494	Chromosome 5	2714870	2718294	Mo_GUY11_113650	Scaffold_4	1583373	1585534
veA	*A. nidulans*	Kim et al., 2002	*VEA*	MGG_08556	Chromosome 4	643591	646713	NA	Scaffold_9	1248747	1251870
ApsA	*A. nidulans*	Fischer and Timberlake, 1995	*AND1*	MGG_02961	Chromosome 7	849599	856927	NA	Scaffold_8	869947	874217
FLE1	*P. anserina*	Coppin, 2002	*FLB3*	MGG_04699	Chromosome 2	1273360	1277418	NA	Scaffold_7	1223374	1221999
MCM1	*S. cerevisiae*	Debuchy et al., 2010	*MoMcm1*	MGG_02773	Chromosome 7	1566835	1569522	NA	Scaffold_8	1584403	1585368
CSN1	*A. nidulans*	Busch et al., 2007	*CSN-1*	MGG_05682	Chromosome 1	6100557	6102778	Mo_GUY11_097600	Scaffold_3	1497837	1499616
CSN3	*A. nidulans*	Busch et al., 2007	NA	MGG_00687	Chromosome 5	1993669	1996281	Mo_GUY11_115750	Scaffold_4	2305267	2306933
CSN4	*A. nidulans*	Busch et al., 2007	COP9 signalosome complex subunit 4	MGG_00336	Chromosome 5	3221782	3224097	Mo_GUY11_111940	Scaffold_4	1077580	1078927
CSN5	*A. nidulans*	Busch et al., 2007	COP9 signalosome complex subunit 5	MGG_05274	Chromosome 3	5240608	5242329	NA	Scaffold_2	3584000	3585159
CSN6	*A. nidulans*	Busch et al., 2007	NA	MGG_01432	Chromosome 2	3504726	3506908	Mo_GUY11_012330	Scaffold_1	4313031	4314362
CSN7	*A. nidulans*	Busch et al., 2007	COP9 signalosome complex subunit 7a	MGG_03725	Chromosome 4	904587	906074	Mo_GUY11_049530	Scaffold_9	934607	935521
MoRPD3	*P. oryzae*	Lee et al., 2021	*MoRPD3*	MGG_05857	Chromosome 3	1742145	1744953	Mo_GUY11_072860	Scaffold_2	310715	312912
PaNOX1	*P. anserina*	Malagnac et al., 2004	*NOX1*	MGG_00750	Chromosome 5	1770020	1773084	Mo_GUY11_116420	Scaffold_4	2528371	2530262
Locus MAT	*P. oryzae*	Kanamori et al., 2007	Locus MAT	Locus MAT	Chromosome 7	770000	780000	Locus MAT	Scaffold_8	866960	874288

2.1. Régions génomiques contrôlant la fertilité mâle et femelle identifiées par les différentes approches

Au cours de ce projet de thèse, l'utilisation de méthodes complémentaires de génétique d'association, nous a permis de mettre en évidence plusieurs régions génomiques impliquées dans la fertilité mâle et femelle chez *P. oryzae*. La taille des régions identifiées par GWAS était relativement réduite (1,8 kb pour le pic d'association identifié sur le scaffold 6 pour la fertilité femelle, cf chapitre 3 ; 65,1 kb pour le pic d'association identifié sur le scaffold 10 pour la fertilité mâle, cf chapitre 2 ; 99,2 kb et 511 kb pour les deux pics d'association adjacents identifiés sur le scaffold 4 pour la fertilité mâle, cf chapitre 2). Cette résolution plutôt bonne est expliquée par la précision des mesures phénotypiques et par le fort taux de recombinaison observée dans la population utilisée pour la GWAS (1/2 LD-decay = 3,2 kb, voir chapitre 2). En revanche, les régions identifiées en BSA partagées par au moins deux des quatre croisements analysés (voir chapitre 3), étaient en général plus larges (1208 kb, 947 kb et 451 kb pour les régions 1, 2 et 4, respectivement) à l'exception d'une région constituée d'un SNP unique (région 3). La moindre résolution obtenue avec l'approche BSA s'explique en partie par le plus faible nombre d'événements de recombinaison analysés. Ceci est dû aux petits effectifs de descendants utilisés pour constituer les pools et au nombre limité de générations recombinantes entre les parents de ces descendants.

2.2. Fonctions des gènes candidats et processus biologiques

Considérées toutes ensemble, les régions génomiques identifiées au cours de ce projet contiennent un grand nombre de gènes, particulièrement les régions identifiées en BSA. En tout, nous avons listé plus de 600 gènes, et nous avons recherché leur orthologue dans le génome de référence de la souche 70-15 ainsi que leur fonction et/ou domaine protéique prédit dans

70-15. Ceci nous a permis d'examiner les grandes fonctions et/ou processus biologiques fréquemment trouvés dans ces régions, et de proposer quelques gènes candidats qui nous semblent intéressants. Par ailleurs, les régions dont la résolution est fine (pic d'association identifié sur le scaffold 10 pour la fertilité mâle : 12 gènes, cf chapitre 2 ; pic d'association identifié sur le scaffold 6 pour la fertilité femelle : 1 gène, cf chapitre 3 ; région 3 identifiée par BSA sur le scaffold 11 : 1 gène, cf chapitre 3), permettent de pointer avec une confiance importante vers des candidats très prometteurs qui pourraient être étudiés en priorité.

2.2.1 Gènes candidats considérés comme prioritaires

a. Processus de régulation épigénétique de la transcription

L'analyse GWAS réalisée dans le chapitre 2 a permis de mettre en évidence un pic d'association fort contenant 12 gènes. Parmi eux, le gène Mo_GUY_054420 (homologue de MGG_02051 dans 70-15) contient un domaine Jmj (pour Jumonji) qui semble impliqué dans la fertilité mâle au travers de la production de microconidies. Les gènes ayant un domaine Jmj sont connus pour leur rôle dans la régulation de la conformation de la chromatine via la méthylation des histones. La super famille des protéines Jumonji est donc impliquée dans les processus de régulation épigénétique. Nous considérons ce gène comme un candidat prioritaire. En plus du candidat Mo_GUY_054420 (MGG_02051), nous avons détecté un autre gène avec un domaine JMJ dans la région identifiée en GWAS sur le scaffold 4 pour la fertilité mâle (chapitre 2) : Mo_GUY11_119860 (MGG_01068 dans le génome de référence 70-15). De plus, de nombreuses études montrent l'importance du contrôle transcriptionnel par les modifications post-traductionnelles des histones. Par exemple, les histone-méthyltransférases contenant un domaine SET ou EZH2 sont des protéines nécessaires au maintien des fonctions de sporulation, de fertilité ou de pathogénicité chez différentes espèces d'Ascomycètes (Carlier et al., 2021;

Pham et al., 2015). D'autres gènes contenus dans les régions étudiées jouent également un rôle possible dans ce type de régulation, par exemple Mo_GUY11_110440 (MGG_11643 dans le génome de référence 70-15) annoté comme « Chromatin structure-remodeling complex protein RSC7 ».

b. Facteurs de transcription et cascades de signalisation

L'analyse GWAS réalisée dans le chapitre 3 a également mis en évidence un fort pic d'association pointant sur un unique gène (Mo_GUY11_025330) qui semble donc impliqué dans la fertilité femelle au travers la production de périthèces. L'homologue de ce gène dans 70-15 (MGG_09263) code pour un facteur de transcription zinc finger de type $Zn(II)_2Cys_6$ (ou zinc-finger C6). Ce facteur de transcription a été identifié pour son rôle dans la formation des conidies (spore asexuée) et a été nommé MoCOD2 (Kim et Lee, 2012). Nous considérons ce gène comme un autre candidat à étudier en priorité. Dans le génome de référence 70-15, sur 481 facteurs de transcription putatifs (ce qui correspond à 4% des 12 991 gènes prédits au total dans 70-15), la famille la plus représentée est celle des facteurs en doigt de zinc C6. Dans une étude systématique sur l'implication des facteurs de transcription zinc finger C6 menée par Lu et al. (2014), 61 des 104 facteurs de ce type ayant subi une délétion étaient requis pour le développement et ou la pathogénicité de *P. oryzae*. Cependant leur implication dans la reproduction sexuée n'a pas été testée. En revanche, chez *N. crassa*, le gène *ADA-6*, qui code pour un facteur de transcription zinc finger C6, est impliqué dans la régulation de gènes contrôlant la sporulation mais également la formation de périthèces (Sun et al., 2019). De la même manière, le gène NosA régule la formation des périthèces chez *A. nidulans* (Vienken et Fischer, 2006). Le facteur de transcription *Papro1* chez *P. anserina*, homologue de *Pro1* chez *S. macrospora*, régule la cascade de signalisation de MAP kinases (Gautier et al., 2018). En effet, *Pro1* qui code pour un facteur de transcription zinc finger C6 est nécessaire à la formation

du périthèce (Masloff et al., 1999). Son rôle dans la fertilité femelle a aussi été démontré récemment chez *P. oryzae* -Uchida et al., 2023). Dans les régions candidates, en plus de Mo_GUY_025330, nous avons identifié plusieurs gènes contenant d'autres types de domaines zinc finger, notamment C2H2. Chez *Cryptococcus neoformans*, le gène *Zfp1* codant pour le facteur de transcription zinc finger de type C2H2 régule la reproduction sexuée. En effet, la mutation du gène conduit à l'absence de formation d'ascospores due à l'incapacité de produire des méioses (Fan et al., 2019).

En parallèle des gènes appartenant à la famille des facteurs de transcription, notre analyse a également mis en évidence des gènes cruciaux dans les cascades de signalisation. Dans la région 2 trouvée en BSA, nous avons notamment identifié la protéine kinase *Mst11* homologue de *Ste11* (Mo_GUY11_110350, correspondant à MGG_00183 dans le génome 70-15). La MAP-kinase *Mst11* est la première MAP-kinase la plus en aval des trois de la voie de signalisation *PMK1* (*Mst11-Mst7-Pmk1*). Cette voie est importante pour la fertilité femelle, et plus précisément la formation du périthèce, car elle conduit le signal induit par le récepteur aux phéromones du système de compatibilité en amont jusqu'à l'activation de facteurs de transcription en aval, tel que le facteur de transcription *Ste12* (homologue *Mst12* chez *P. oryzae*).

c. Processus de contrôle de la méiose

La région 3 identifiée en BSA sur le scaffold 11 (chapitre 3) correspond également à un unique gène Mo_GUY11_057040, dont l'homologue dans 70-15 (MGG_08693) code pour une topoisomérase. Ces enzymes jouent un rôle crucial dans le contrôle de la structure topologique de l'ADN. Elles permettent notamment d'introduire des supertours négatifs et d'enlever des supertours dans les molécules d'ADN. Elles jouent un rôle essentiel lors de nombreuses étapes

de la vie cellulaire, notamment lors de la réplication, la transcription, et la séparation des chromosomes. Nous considérons également ce gène comme un candidat prioritaire. Il est à noter que le génome de référence 70-15 contient une autre topoisomérase importante pour la reproduction sexuée : il s'agit d'une topoisomérase méiose-spécifique (MGG_10666), homologue du gène *Spo11* identifiée chez la levure comme indispensable à la réalisation du cycle sexué (Keeney, 2008) ; cependant, ce gène n'a pas été trouvé dans les régions identifiées en BSA.

En plus des topoisomérases, plusieurs autres gènes présents dans les différentes régions trouvées en BSA possèdent des domaines caractérisés pour leur implication dans les processus de contrôle de la méiose. Ainsi, le gène Mo_GUY11_097890 (MGG_05652) codant pour une protéine de type KAR9, est présent dans la région 1 trouvée en BSA. La fonction de la protéine KAR9 est liée à la croissance des microtubules lors de la caryogamie chez *S. cerevisiae* (Ghaemmaghami et al., 2003). De la même manière, le gène Mo_GUY11_059940 (MGG_09005) présent dans la région 4 trouvée en BSA code pour une protéine du complexe Csm3. Le complexe de protection de la fourche Csm3 joue un rôle central dans le réplisome. En effet, il favorise la progression des fourches de réplication de l'ADN et les protège lorsqu'elles se décrochent, tout en permettant l'établissement de la cohésion.

2.2.2 Autres fonctions et processus biologiques fréquemment retrouvés dans les régions identifiées

Les gènes ci-dessus mentionnés comme candidats prioritaires reflètent trois processus biologiques cruciaux pour la fertilité mâle et femelle et le bon déroulement du cycle de reproduction sexée. D'autres processus également intéressants sont aussi représentés parmi les autres gènes identifiés dans les différentes régions.

a. Processus de reconnaissance entre thalles

Comme mentionné en introduction, le bon déroulement de la reproduction sexuée implique au départ une reconnaissance entre thalles compatibles. Une grande partie de cette reconnaissance est basée sur le système de chimiotropisme positif phéromone/récepteur. Le gène *ste2* codant pour le récepteur a au phéromone α est présent dans la région 1 identifiée en BSA. Ce gène code pour un récepteur couplé à un protéine G qui va ensuite déclencher la cascade de signalisation *PMK1* (mentionnée dans la section 2.2.1.b) et ainsi réguler l'expression du locus MAT. La fonctionnalité de ce gène est donc nécessaire à la fécondation à travers la reconnaissance de la souche de MAT opposé. En plus de *ste2* lié au système de compatibilité MAT, plusieurs gènes impliqués dans la reconnaissance du soi/non soi et de l'immunité au sens large ont été recensés dans les différentes régions candidates. Par exemple, nous avons trouvé plusieurs gènes contenant des domaines de type ankyrine, NACHT ou het.

b. Autres processus en lien avec la reproduction sexuée

Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction générale de la thèse (fin de la section 3), plusieurs autres processus biologiques sont mis en jeu dans l'ensemble du cycle de reproduction sexué chez les Ascomycètes. Ces processus sont effectivement retrouvés dans les régions identifiées par nos approches.

Un premier processus est celui lié à la fusion et au remaniement des parois et des membranes plasmiques. Des gènes liés à ce processus ont été trouvés dans la Région 1 identifiée en BSA. Le gène Mo_GUY11_094650 (homologue 70-15 : MGG_04599), sans fonction connue dans 70-15, possède un domaine annoté comme « Yeast cell wall synthesis Kre9/Knh1-like », qui est impliqué dans la biosynthèse des parois cellulaires. Chez *S. cerevisiae*, le mutant nul dans le gène *kre9* conduit à des altérations de la croissance et de la reproduction sexée

(Brown et Bussey, 1993). Le gène Mo_GUY11_096010 dont l'homologue dans 70-15 (MGG_13744) code pour une MIPC synthase appartient aussi à cette catégorie. Le mannosylinositol phosphorylceramide (MIPC) est un composant majeur des sphingolipides impliqué dans l'intégrité de la paroi cellulaire chez *S. cerevisiae* (Morimoto et Tani, 2015).

Concernant le processus de sécrétion d'enzymes via des vésicules, nous avons trouvé dans la Région 1 identifiée en BSA le gène Mo_GUY11_096740, dont l'homologue dans 70-15 (MGG_05755) est annoté comme « Vacuolar fusion protein mon-1 ». Chez *S. cerevisiae*, cette protéine forme un complexe avec la protéine *Ccz1* nécessaire au transport de composés vers les vacuoles (Wang et al., 2002).

Un autre processus souligné comme important dans la reproduction sexuée est le processus d'influx et d'efflux de calcium. Par exemple, nous avons mentionné dans le chapitre 3 le gène Mo_GUY11_097110 (homologue 70-15 : MGG_15163), trouvé dans la Région 1 identifiée en BSA, et qui code pour une calpaine. Ces enzymes participent à la signalisation cellulaire Ca2+-dépendante, et ont été montrées chez *P. oryzae* comme impliquées dans le développement asexué et sexué, l'intégrité de la paroi cellulaire et la pathogénicité. La Région 3 identifiée en BSA contient le gène Mo_GUY11_057220 (homologue chez 70-15 : MGG_08710) qui code pour un transporteur vacuolaire d'ion Calcium.

La production et la régulation de radicaux libres et d'espèces réactives de l'oxygène est aussi un processus souligné comme important dans la reproduction sexuée. La Région 1 identifiée en BSA contient le gène Mo_GUY11_095640 dont l'homologue dans 70-15 (MGG_13762), annoté comme « Multidrug resistance protein 3 », est un transporteur ABC impliqué dans la réponse au stress oxydatif (Sun et al., 2006). La Région 2 contient le gène Mo_GUY11_110510 (déjà mentionné dans le chapitre 3), dont l'homologue dans 70-16 (MGG_00198) code pour une flavohemoglobine, protéine impliquée dans la réduction des

niveaux d'oxyde nitrique (NO) dans la cellule. Cette région contient également deux gènes adjacents, Mo_GUY11_110700 et Mo_GUY11_110710, ayant tous deux pour homologue le gène MGG_00212 dans 70-15, qui code pour une superoxide dismutase, enzyme qui catalyse la transformation des radicaux superoxydes (O2-) en dioxygène (O2) et en peroxyde d'hydrogène (H2O2), assurant la défense contre les espèces réactives de l'oxygène.

Nous avons aussi trouvé plusieurs gènes impliqués dans l'organisation et le remaniement des microtubules et dans la croissance polarisée du mycelium. Ainsi, la Région 2 contient le gène Mo_GUY11_110800 (homologue dans 70-15 : MGG_00222) annoté comme « Dynactin Arp1 p62 subunit RO2 ». La dynactine est un complexe protéique qui régule l'activité des dynéines, autres complexes protéiques associés aux mouvements des microtubules.

Enfin, comme mentionné dans le chapitre 3, nous avons également trouvé plusieurs gènes impliqués dans la biosynthèse de métabolites secondaires. Il est difficile en l'état de quantifier exactement le nombre de gènes trouvés, car ces gènes sont difficiles à annoter du fait de leur structure modulaire. Néanmoins, reproduction et métabolisme secondaire sont intimement liés. Notamment, le complexe Velvet, dont nous avons parlé en introduction générale, est une plaque tournante impliqué à la fois dans la régulation du métabolisme secondaire et dans certaines étapes de la reproduction sexuée.

2.2.3. Pléiotropie des gènes impliqués dans la reproduction sexuée

Plusieurs processus complexes comme la sporulation, la reproduction et la pathogénicité partagent des gènes régulateurs communs et des voies de signalisation communes. La conséquence est que les gènes de ce type ayant un rôle dans la fertilité peuvent aussi avoir un effet pléiotrope sur d'autres phénotypes. Par exemple, la voie *PMK1* chez *P. oryza*e, est

également impliquée dans la formation de l'appressorium et de la croissance invasive. Les traits liés à la structure du mycélium et à la sporulation sont également corégulés. Lors de la croissance sur un milieu de culture, il n'est pas rare d'observer l'apparition de secteurs dont le mycélium est morphologiquement différent, dont la capacité de sporulation asexuée est modifiée (Silar et Daboussi, 1999), et qui résultent de mutations génétiques. La mesure de différents traits sur des souches monospores isolées de ces secteurs, a permis de montrer que les régions mutées étaient aussi impliquées dans la fertilité mâle et femelle. Chez *P. oryzae*, le lien entre la reproduction sexuée et asexuée n'est pas aussi clairement établi, mais Tharreau et al. (1997) ont montré que des mutants apparus par repiquages successifs et qui ont une sporulation asexuée plus abondante *in vitro*, ont également perdu la fertilité femelle. De même, des expérimentations de repiquages répétées ont conduit à produire des descendants stériles dont les spores se détachent plus facilement du mycélium (Saleh et al., 2012a). Dans une expérience sur des mutants indépendants, une mutation dans le gène *Pro1*, qui code pour une protéine a domaine doigt de zinc C6, a produit les mêmes phénotypes (Uchida et al. 2023). Un autre exemple est celui des gènes de la famille Velvet tel que *VeA* chez *A. nidulans* et son homologue *FvVE1* chez *F. verticillioides*, qui impactent le ratio entre le nombre de microconidies et celui de macroconidies (Li et al., 2006). Il s'agit là encore d'un facteur de transcription de type zinc finger.

L'article de Saleh et al. (2012a) suggérait que les souches affectées dans leur fertilité femelle l'étaient aussi dans leur fertilité mâle. Il se pourrait que certains gènes aient des effets pléiotropiques sur les deux caractères. C'est le cas par exemple du gène *Ssnsd1* chez *S. sclerotiorum*, dont la délétion entraine à la fois une surproduction de spermaties et interrompt la formation des ascogones (Li et al., 2018). L'hypothèse d'effets pléiotropes sur les traits de fertilité mâle et femelle pourrait être testée grâce aux méthodes de GWAS permettant d'analyser des phénotypes multivariés sur la population de Yule dont nous possédons déjà les phénotypes

de fertilité mâle et femelle ainsi que les génotypes. A plus long terme, le phénotypage systématique pour la fertilité mâle et femelle de tout mutant généré pour d'autres traits permettrait d'identifier ces gènes aux effets pléiotropes.

2.3. Stratégie de validation des gènes candidats et de découverte de nouveaux gènes

Pour valider la fonction des gènes candidats identifiés dans cette thèse, il sera nécessaire de faire des délétions ciblées des gènes dans des souches fertiles pour observer si la délétion du gène entraine la perte de fertilité de la souche. Cependant, l'effet attendu n'est pas garanti du fait de la faible héritabilité que nous avons mesuré pour la fertilité mâle et pour la fertilité femelle.

Pour réduire le nombre de candidats, il serait également intéressant de regarder le polymorphisme des gènes candidats dans les populations sexuées et clonales. En effet, nous disposons d'une grande collection de souches des différentes lignées, pathogènes du riz notamment, dont les génomes ont été séquencés. Un potentiel polymorphisme dans ces gènes corrélés au niveau de fertilité observé dans une population pourrait étayer l'hypothèse d'implication du gène dans le phénotype de fertilité. De plus, chercher les potentielles signatures de sélection dans ces gènes pourrait nous éclairer sur l'évolution de ces populations et apporter un élément de réponse à l'objectif général de déterminer si l'expansion du champignon est la cause ou une conséquence de cette perte de fertilité.

Chez les espèces modèles comme *S. macrospora*, *N. crassa* et *P. anserina*, les gènes impliqués dans la fertilité, et notamment ceux impliqués dans la formation et la production de périthèces, ont été abondamment décrits (revues : Pöggeler et al., 2018; Teichert et al., 2014).

Il serait possible de muter à l'aveugle chez *P. oryzae* les gènes homologues à ces gènes et ensuite de phénotyper les mutants. Cette stratégie avec a priori est couteuse et longue à mettre en place. Un moyen d'optimiser cette méthode serait, comme précédemment, de caractériser la diversité haplotypique de ces gènes dans les différentes populations (pour lesquelles nous possédons les génotypes et les phénotypes pour la fertilité mâle et femelle) et de déterminer s'il y a des corrélations génotype-phénotype. Les gènes potentiellement identifiés pour leur implication dans un trait de fertilité pourraient par la suite être validés fonctionnellement par délétion ciblée.

Une autre stratégie intéressante pour identifier de nouveaux gènes ou valider des gènes candidats potentiellement impliqués dans la formation des périthèces, est l'analyse RNAseq. En effet, cette méthode a notamment été utilisée chez *S. macrospora* pour identifier différents gènes impliqués dans la maturation des périthèces (Teichert et al., 2012). La première étape est la microdissection de proto-périthèces (périthèces au stade précoce) pour ensuite extraire l'ARN. Le séquençage et le « mapping » des ADNc correspondants permettraient d'identifier les gènes surexprimés ou réprimés durant les phases de maturation du périthèce. Ces gènes sont en général de bons candidats pour une validation fonctionnelle.

3. Hypothèses sur l'absence d'observation de la reproduction sexuée au champ

La reproduction sexuée de *P. oryzae* n'a jamais été observée au champ. Il est clair que la reproduction sexuée de *P. oryzae* doit être recherchée dans certaines zones géographiques et dans certains systèmes de cultures. Les zones géographiques où les deux MAT sont présents en fréquences équilibrées et où les souches femelles fertiles sont très fréquentes sont à privilégier.

Les populations ayant ces caractéristiques n'ont été échantillonnées qu'en culture pluviale. Les zones à privilégier pour la recherche de la reproduction sexuée sont donc les parcelles en riziculture pluviale stricte dans le Piémont Himalayen (Sud de la Chine, Nord du Laos, du Vietnam, de la Thaïlande).

Toutefois, malgré la présence de populations ayant toutes les caractéristiques biologiques et génétiques de populations sexuées (Saleh et al., 2012b; Thierry et al., 2022), y compris la capacité à produire des périthèces, asques et ascospores viables au laboratoire (Saleh et al., 2012b), aucun périthèce n'a été observé dans les parcelles de riz situées au Yunnan. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette non-observation de la reproduction sexuée aux champs.

Tout d'abord, il n'est pas certain que les observations aient été conduites au bon moment du cycle de reproduction et au bon endroit dans la parcelle. En effet, nous ne savons pas quand et où la reproduction sexuée se passe. Les campagnes d'échantillonnages de *P. oryzae* au champ ont souvent lieu juste avant la récolte du riz et rarement l'année suivante sur les pailles laissées au champ après récolte. Il est probable que la production de périthèces nécessite des conditions environnementales particulières, notamment pour l'humidité. Par exemple, bien que la production de périthèces soit possible sur des tissus morts de riz (Hayashi et al., 1997 ; Nottéghem et Silué, 1990), la production *in planta* semble bien plus faible que sur milieu enrichi (Hayashi et al., 1997). Ces observations chez *P. oryzae* sont en accord avec les conditions nécessaires à la production de périthèce chez d'autres espèces (revue Debuchy et al., 2010). Malgré tout, ces informations ne nous permettent pas mieux cibler la recherche de périthèces au champ.

Au cours de cette thèse nous avons aussi montré que la production de microconidies, même en conditions relativement contrôlées, pouvait varier en fonction des expérimentations.

L’environnement a donc un effet important sur la production des gamètes mâles. Nous avons produit des microconidies dans des conditions permettant d’avoir de bons rendements mais cela n’est surement pas le cas en milieu naturel. Si la production de gamètes mâle est réduite les évènements de rencontres entres les gamètes et la formation des périthèces sont aussi réduits, donc difficiles à observer. La faible production de gamètes mâles conduit peut-être à une absence de reproduction sexuée et, finalement, à la perte progressive de la fertilité femelle dans les populations qui ont migré en dehors du centre d’origine. La connaissance des gènes impliqués dans la reproduction sexuée chez *P. oryzae* contribueront à tester cette nouvelle hypothèse.

Conclusion générale

La reproduction sexuée est un mécanisme de vie majeur chez les Eucaryotes. En effet, ce mécanisme en apparence couteux est nécessaire au maintien de l'espèces car son absence conduit à un cul de sac évolutif. Chez les Ascomycètes qui ont la capacité de se reproduire à la fois de manière végétative et sexuée, il est intéressant de comprendre comment ce trait évolue. Chez le champignon phytopathogène *Pyricularia oryzae* dont trois des quatre grandes lignées pathogènes du riz sont clonales, et où seulement des traces indirectes de reproduction sexuées ont été observées dans la quatrième, la compréhension des modes de reproduction prend tout son sens. Afin d'essayer d'apporter des premiers éléments de réponse sur l'évolution des modes de reproduction chez cette espèce, nous nous sommes particulièrement intéressés aux traits de fertilité mâle et femelle et à l'élucidation de leurs bases génétiques.

Dans ce manuscrit, nous avons décrit et observé les gamètes mâles chez *P. oryzae,* et essayé de mieux comprendre le cycle de reproduction sexuée. La production de gamètes ainsi que leur rencontre est un processus complexe dépendant de facteurs externes. Il reste encore plusieurs zones d'ombres pour comprendre entièrement le cycle de reproduction. L'observation de la rencontre et de la fusion des gamètes ainsi que des paramètres environnementaux exacts nécessaire à la production des gamètes et à leur rencontre reste à explorer.

L'exploration des bases génétiques des traits de fertilité menée au cours de cette thèse, a permis de montrer que le déterminisme génétique de la fertilité mâle (à travers la production de microconidies) et de la fertilité femelle (à travers la production de périthèces) est multigénique, et a mis en évidence plusieurs candidats très intéressants. De plus, la fertilité fait intervenir plusieurs processus biologiques majeurs comme les voies de signalisation et la régulation épigénétique. De ce fait, la reproduction sexuée est connectée à d'autres traits de vie tels que la sporulation asexuée et la croissance mycélienne.

Bibliographie de l'Introduction et de la Conclusion générale

A

Aguilar, P.S., Engel, A., Walter, P., 2007. The plasma membrane proteins Prm1 and Fig1 ascertain fidelity of membrane fusion during yeast mating. MBoC 18, 547–556. https://doi.org/10.1091/mbc.e06-09-0776

Ait Benkhali, J., Coppin, E., Brun, S., Peraza-Reyes, L., Martin, T., Dixelius, C., Lazar, N., van Tilbeurgh, H., Debuchy, R., 2013. A network of HMG-box transcription factors regulates sexual cycle in the fungus *Podospora anserina*. PLoS Genet 9, e1003642. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003642

C

Bennett, R.J., Turgeon, B.G., 2016. Fungal sex: the Ascomycota. Microbiology Spectrum 4. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0005-2016

Billiard, S., López-Villavicencio, M., Hood, M.E., Giraud, T., 2012. Sex, outcrossing and mating types: unsolved questions in fungi and beyond. Journal of Evolutionary Biology 25, 1020–1038. https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2012.02495.x

Bistis, G.N., 1983. Evidence for diffusible, mating-type-specific trichogyne attractants in *Neurospora crassa*. Experimental Mycology 7, 292–295. https://doi.org/10.1016/0147-5975(83)90051-8

Bistis, G.N., 1981. Chemotropic interactions between trichogynes and conidia of opposite mating-type in *Neurospora crassa*. Mycologia 73, 959. https://doi.org/10.2307/3759806

Bloemendal, S., Bernhards, Y., Bartho, K., Dettmann, A., Voigt, O., Teichert, I., Seiler, S., Wolters, D.A., Pöggeler, S., Kück, U., 2012. A homologue of the human STRIPAK complex controls sexual development in fungi. Molecular Microbiology 84, 310–323. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08024.x

Bloemendal, S., Lord, K.M., Rech, C., Hoff, B., Engh, I., Read, N.D., Kück, U., 2010. A mutant defective in sexual development produces aseptate ascogonia. Eukaryot Cell 9, 1856–1866. https://doi.org/10.1128/EC.00186-10

Bobrowicz, P., Pawlak, R., Correa, A., Bell-Pedersen, D., Ebbole, D.J., 2002. The *Neurospora crassa* pheromone precursor genes are regulated by the mating type locus and the circadian clock. Molecular Microbiology 45, 795–804. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03052.x

Boddy, L., 2016. Pathogens of autotrophs, in: The Fungi. Elsevier, pp. 245–292. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382034-1.00008-6

Bouhouche, K., Zickler, D., Debuchy, R., Arnaise, S., 2004. Altering a gene involved in nuclear distribution increases the repeat-induced point mutation process in the fungus *Podospora anserina*. Genetics 167, 151–159. https://doi.org/10.1534/genetics.167.1.151

Braus, G.H., Irniger, S., Bayram, Ö., 2010. Fungal development and the COP9 signalosome. Current Opinion in Microbiology 13, 672–676. https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.09.011

Brown, J.L., Bussey, H., 1993. The yeast *KRE9* gene encodes an O glycoprotein involved in cell surface beta-glucan assembly. Mol Cell Biol 13, 6346–6356. https://doi.org/10.1128/mcb.13.10.6346-6356.1993

Bruggeman, J., Debets, A., Wijngaarden, P., de Visser, J.A., Hoekstra, R.F., 2003. Sex slows down the accumulation of deleterious mutations in the homothallic fungus *Aspergillus nidulans*. Genetics 164: 479-485. Genetics 164, 479–85. https://doi.org/10.1093/genetics/164.2.479

Brun, S., Kuo, H.-C., Jeffree, C.E., Thomson, D.D., Read, N., 2021. Courtship ritual of male and female nuclei during fertilisation in *Neurospora crassa*. bioRxiv 2021.03.10.434724. https://doi.org/10.1101/2021.03.10.434724

Busch, S., Schwier, E.U., Nahlik, K., Bayram, O., Helmstaedt, K., Draht, O.W., Krappmann, S., Valerius, O., Lipscomb, W.N., Braus, G.H., 2007. An eight-subunit COP9 signalosome with an intact JAMM motif is required for fungal fruit body formation. Proceedings of the National Academy of Sciences 104, 8089–8094. https://doi.org/10.1073/pnas.0702108104

C

Carlier, F., Li, M., Maroc, L., Debuchy, R., Souaid, C., Noordermeer, D., Grognet, P., Malagnac, F., 2021. Loss of EZH2-like or SU(VAR)3–9-like proteins causes simultaneous perturbations in H3K27 and H3K9 tri-methylation and associated developmental defects in the fungus *Podospora anserina*. Epigenetics & Chromatin 14, 22. https://doi.org/10.1186/s13072-021-00395-7

Cavinder, B., Sikhakolli, U., Fellows, K.M., Trail, F., 2012. Sexual development and ascospore discharge in *Fusarium graminearum*. JoVE 3895. https://doi.org/10.3791/3895

Chuma, I., Shinogi, T., Hosogi, N., Ikeda, K., Nakayashiki, H., Park, P., Tosa, Y., 2009. Cytological characteristics of microconidia of *Magnaporthe oryzae*. J Gen Plant Pathol 75, 353–358. https://doi.org/10.1007/s10327-009-0181-1

Coppin, E., 2002. The fle1 gene encoding a C2H2 zinc finger protein co-ordinates male and female sexual differentiation in *Podospora anserina*. Molecular Microbiology 43, 1255–1268. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02819.x

Coppin, E., Arnaise, S., Contamine, V., Picard, M., 1993. Deletion of the mating-type sequences in *Podospora anserina* abolishes mating without affecting vegetative functions and sexual differentiation. Molec. Gen. Genet. 241–241, 409–414. https://doi.org/10.1007/BF00284694

Coppin, E., de Renty, C., Debuchy, R., 2005. The function of the coding sequences for the putative pheromone precursors in *Podospora anserina* is restricted to fertilization. Eukaryot Cell 4, 407–420. https://doi.org/10.1128/EC.4.2.407-420.2005

Coppin, E., Debuchy, R., Arnaise, S., Picard, M., 1997. Mating types and sexual development in filamentous ascomycetes. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61, 411–428.

Cruz, C.D., Valent, B., 2017. Wheat blast disease: danger on the move. Trop. plant pathol. 42, 210–222. https://doi.org/10.1007/s40858-017-0159-z

D

De Meeûs, T., Prugnolle, F., Agnew, P., 2007. Asexual reproduction: genetics and evolutionary aspects. Cell. Mol. Life Sci. 64, 1355–1372. https://doi.org/10.1007/s00018-007-6515-2

De Vienne, D.M., Giraud, T., Gouyon, P.-H., 2013. Lineage selection and the maintenance of sex. PLoS ONE 8, e66906. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066906

Dean, R., Van Kan, J.A.L., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D., Rudd, J.J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., Foster, G.D., 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. Molecular Plant Pathology 13, 414–430. https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x

Debuchy, R., Berteaux-Lecellier, V., Silar, P., 2010. Mating systems and sexual morphogenesis in Ascomycetes, in: Borkovich, Ebbole (Eds.), Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi. American Society of Microbiology, pp. 501–535. https://doi.org/10.1128/9781555816636.ch33

Dodge, B.O., 1935. The mechanics of sexual reproduction in *Neurospora*. Mycologia 27, 418–438. https://doi.org/10.1080/00275514.1935.12017089

Dyer, P.S., Inderbitzin, P., Debuchy, R., 2016. 14 Mating-type structure, function, regulation and evolution in the *Pezizomycotina*, in: Wendland, J. (Ed.), Growth, Differentiation and Sexuality. Springer International Publishing, Cham, pp. 351–385. https://doi.org/10.1007/978-3-319-25844-7_14

E

Erdman, S., Lin, L., Malczynski, M., Snyder, M., 1998. Pheromone-regulated genes required for yeast mating differentiation. Journal of Cell Biology 140, 461–483. https://doi.org/10.1083/jcb.140.3.461

F

Fan, C.-L., Han, L.-T., Jiang, S.-T., Chang, A.-N., Zhou, Z.-Y., Liu, T.-B., 2019. The Cys2His2 zinc finger protein Zfp1 regulates sexual reproduction and virulence in *Cryptococcus neoformans*. Fungal Genetics and Biology 124, 59–72. https://doi.org/10.1016/j.fgb.2019.01.002

Ferreira, A.V., An, Z., Metzenberg, R.L., Glass, N.L., 1998. Characterization of mat A-2, mat A-3 and deltamatA mating-type mutants of *Neurospora crassa*. Genetics 148, 1069–1079. https://doi.org/10.1093/genetics/148.3.1069

Fischer, R., Timberlake, W.E., 1995. *Aspergillus nidulans apsA* (anucleate primary sterigmata) encodes a coiled-coil protein required for nuclear positioning and completion of asexual development. Journal of Cell Biology 128, 485–498. https://doi.org/10.1083/jcb.128.4.485

Fisher, M.C., Henk, Daniel.A., Briggs, C.J., Brownstein, J.S., Madoff, L.C., McCraw, S.L., Gurr, S.J., 2012. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. Nature 484, 186–194. https://doi.org/10.1038/nature10947

Fukumori, Y., Nakajima, M., Akutsu, K., 2004. Microconidia act the role as spermatia in the sexual reproduction of Botrytis cinerea. J Gen Plant Pathol 70, 256–260. https://doi.org/10.1007/s10327-004-0124-9

G

Gammie, A.E., Brizzio, V., Rose, M.D., 1998. Distinct morphological phenotypes of cell fusion mutants. MBoC 9, 1395–1410. https://doi.org/10.1091/mbc.9.6.1395

Gautier, V., Tong, L., Nguyen, T.-S., Debuchy, R., Silar, P., 2018. *PaPro1* and *IDC4*, two genes controlling stationary phase, sexual development and cell degeneration in *Podospora anserina*. JoF 4, 85. https://doi.org/10.3390/jof4030085

Ghaemmaghami, S., Huh, W.-K., Bower, K., Howson, R.W., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E.K., Weissman, J.S., 2003. Global analysis of protein expression in yeast. Nature 425, 737–741. https://doi.org/10.1038/nature02046

Gladieux, P., Ravel, S., Rieux, A., Cros-Arteil, S., Adreit, H., Milazzo, J., Thierry, M., Fournier, E., Terauchi, R., Tharreau, D., 2018. Coexistence of multiple endemic and pandemic lineages of the rice blast pathogen. mBio 9, e01806-17, /mbio/9/2/mBio.01806-17.atom. https://doi.org/10.1128/mBio.01806-17

Goodenough, U., Heitman, J., 2014. Origins of eukaryotic sexual reproduction. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 6, a016154–a016154. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016154

Grote, E., 2010. Secretion is required for late events in the cell-fusion pathway of mating yeast. Journal of Cell Science 123, 1902–1912. https://doi.org/10.1242/jcs.066662

Gurr, S., Samalova, M., Fisher, M., 2011. The rise and rise of emerging infectious fungi challenges food security and ecosystem health. Fungal Biology Reviews 25, 181–188. https://doi.org/10.1016/j.fbr.2011.10.004

Guyot, J., Eveno, P., 2015. Maturation of perithecia and ascospores discharge in South American leaf blight of rubber tree. Eur J Plant Pathol 143, 427–436. https://doi.org/10.1007/s10658-015-0694-8

H

Hagen, D.C., Bruhn, L., Westby, C.A., Sprague, G.F., 1993. Transcription of alpha-specific genes in *Saccharomyces cerevisiae*: DNA sequence requirements for activity of the coregulator alpha 1. Mol. Cell. Biol. 13, 6866–6875. https://doi.org/10.1128/MCB.13.11.6866

Han, K.-H., Han, K.-Y., Yu, J.-H., Chae, K.-S., Jahng, K.-Y., Han, D.-M., 2001. The *nsdD* gene encodes a putative GATA-type transcription factor necessary for sexual development of *Aspergillus nidulans*. Molecular Microbiology 41, 299–309. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02472.x

Hayashi, N., Li, C.Y., Li, J.L., Naito, H., 1997. In vitro production on rice plants of perithecia of *Magnaporthe grisea* from Yunnan, China. Mycological Research 101, 1308–1310. https://doi.org/10.1017/S095375629700422X

Heiman, M.G., Walter, P., 2000. Prm1p, a pheromone-regulated multispanning membrane protein, facilitates plasma membrane fusion during yeast mating. Journal of Cell Biology 151, 719–730. https://doi.org/10.1083/jcb.151.3.719

Heitman, J., 2015. Evolution of sexual reproduction: A view from the fungal kingdom supports an evolutionary epoch with sex before sexes. Fungal Biology Reviews 29, 108–117. https://doi.org/10.1016/j.fbr.2015.08.002

Heitman, J., Howlett, B.J., Crous, P.W., Stukenbrock, E.H., James, T.Y., Gow, N.A.R. (Eds.), 2018. The fungal kingdom. ASM Press, American Society for Microbiology, Washington, DC.

Herskowitz, I., 1989. A regulatory hierarchy for cell specialization in yeast. Nature 342, 749–757. https://doi.org/10.1038/342749a0Hwang, J., Pallas, D.C., 2014. STRIPAK complexes: Structure, biological function, and involvement in human diseases. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 47, 118–148. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.11.021

I

Islam, M.T., Croll, D., Gladieux, P., Soanes, D.M., Persoons, A., Bhattacharjee, P., Hossain, Md.S., Gupta, D.R., Rahman, Md.M., Mahboob, M.G., Cook, N., Salam, M.U., Surovy, M.Z., Sancho, V.B., Maciel, J.L.N., NhaniJúnior, A., Castroagudín, V.L., Reges, J.T. de A., Ceresini, P.C., Ravel, S., Kellner, R., Fournier, E., Tharreau, D., Lebrun, M.-H., McDonald, B.A., Stitt, T., Swan, D., Talbot, N.J., Saunders, D.G.O., Win, J., Kamoun, S., 2016. Emergence of wheat blast in Bangladesh was caused by a South American lineage of *Magnaporthe oryzae*. BMC Biol 14, 84. https://doi.org/10.1186/s12915-016-0309-7

J

Jones, S.K., Bennett, R.J., 2011. Fungal mating pheromones: choreographing the dating game. Fungal Genetics and Biology 48, 668–676. https://doi.org/10.1016/j.fgb.2011.04.001

Judson, O.P., Normark, B.B., 1996. Ancient asexual scandals. Trends in Ecology & Evolution 11, 41–46. https://doi.org/10.1016/0169-5347(96)81040-8

K

Kanamori, M., Kato, H., Yasuda, N., Koizumi, S., Peever, T.L., Kamakura, T., Teraoka, T., Arie, T., 2007. Novel mating type-dependent transcripts at the mating type locus in *Magnaporthe oryzae*. Gene 403, 6–17. https://doi.org/10.1016/j.gene.2007.06.015

Kang, S., Chumley, F.G., Valent, B., 1994. Isolation of the mating-type genes of the phytopathogenic fungus *Magnaporthe grisea* using genomic subtraction. Genetics 138, 289–296.

Keeney, S., 2008. *Spo11* and the formation of DNA double-strand breaks in meiosis, in: Egel, R., Lankenau, D.-H. (Eds.), Recombination and Meiosis, Genome Dynamics and Stability. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 81–123. https://doi.org/10.1007/7050_2007_026

Kim, H., Borkovich, K.A., 2004. A pheromone receptor gene, *pre-1*, is essential for mating type-specific directional growth and fusion of trichogynes and female fertility in *Neurospora crassa*. Molecular Microbiology 52, 1781–1798. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04096.x

Kim, H., Wright, S.J., Park, G., Ouyang, S., Krystofova, S., Borkovich, K.A., 2012. Roles for receptors, pheromones, G proteins, and mating type genes during sexual reproduction in *Neurospora crassa*. Genetics 190, 1389–1404. https://doi.org/10.1534/genetics.111.136358

Kim, H.-S., Han, K.-Y., Kim, K.-J., Han, D.-M., Jahng, K.-Y., Chae, K.-S., 2002. The *veA* gene activates sexual development in *Aspergillus nidulans*. Fungal Genetics and Biology 37, 72–80. https://doi.org/10.1016/S1087-1845(02)00029-4

Kim, K.S., Lee, Y.-H., 2012. Gene expression profiling during conidiation in the rice blast pathogen *Magnaporthe oryzae*. PLoS ONE 7, e43202. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043202

Klaubauf, S., Tharreau, D., Fournier, E., Groenewald, J.Z., Crous, P.W., de Vries, R.P., Lebrun, M.-H., 2014. Resolving the polyphyletic nature of *Pyricularia* (Pyriculariaceae). Studies in Mycology 79, 85–120. https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.004

Koelle, M.R., 2006. Heterotrimeric G protein signaling: getting inside the cell. Cell 126, 25–27. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.026

L

Lara-Ortíz, T., Riveros-Rosas, H., Aguirre, J., 2003. Reactive oxygen species generated by microbial NADPH oxidase NoxA regulate sexual development in *Aspergillus nidulans*. Molecular Microbiology 50, 1241–1255. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03800.x

Lassagne, A., Brun, S., Malagnac, F., Adreit, H., Milazzo, J., Fournier, E., Tharreau, D., 2022. Male fertility in *Pyricularia oryzae*: microconidia are spermatia. Environmental Microbiology 1462-2920.16226. https://doi.org/10.1111/1462-2920.16226

Latorre, S.M., Were, V.M., Foster, A.J., Langner, T., Malmgren, A., Harant, A., Asuke, S., Reyes-Avila, S., Gupta, D.R., Jensen, C., Ma, W., Mahmud, N.U., Mehebub, Md.S., Mulenga, R.M., Muzahid, A.N.Md., Paul, S.K., Rabby, S.M.F., Raha, A.A.M., Ryder, L., Shrestha, R.-K., Sichilima, S., Soanes, D.M., Singh, P.K., Bentley, A.R., Saunders, D.G.O., Tosa, Y., Croll, D., Lamour, K.H., Islam, T., Tembo, B., Win, J., Talbot, N.J., Burbano, H.A., Kamoun, S., 2022. A pandemic clonal lineage of the wheat blast fungus. Evolutionary Biology. https://doi.org/10.1101/2022.06.06.494979

Lee, S.H., Farh, M.E.-A., Lee, J., Oh, Y.T., Cho, E., Park, J., Son, H., Jeon, J., 2021. A Histone deacetylase, *Magnaporthe oryzae* RPD3, regulates reproduction and pathogenic development in the rice blast fungus. mBio 12, e02600-21. https://doi.org/10.1128/mBio.02600-21

Li, J., Mu, W., Veluchamy, S., Liu, Y., Zhang, Y., Pan, H., Rollins, J.A., 2018. The GATA-type IVb zinc-finger transcription factor SsNsd1 regulates asexual-sexual development and appressoria formation in *Sclerotinia sclerotiorum*. Molecular Plant Pathology 19, 1679–1689. https://doi.org/10.1111/mpp.12651

Li, M., Liu, X., Liu, Z., Sun, Y., Liu, M., Wang, X., Zhang, H., Zheng, X., Zhang, Z., 2016. Glycoside hydrolase MoGls2 controls asexual/sexual development, cell wall integrity and infectious growth in the rice blast fungus. PLoS ONE 11, e0162243. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162243

Li, S., Myung, K., Guse, D., Donkin, B., Proctor, R.H., Grayburn, W.S., Calvo, A.M., 2006. FvVE1 regulates filamentous growth, the ratio of microconidia to macroconidia and cell wall formation in *Fusarium verticillioides*. Mol Microbiol 62, 1418–1432. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05447.x

Lu, J., Cao, H., Zhang, L., Huang, P., Lin, F., 2014. Systematic analysis of Zn2Cys6 transcription factors required for development and pathogenicity by high-throughput gene knockout in the rice blast fungus. PLoS Pathog 10, e1004432. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004432

M

Maerz, S., Ziv, C., Vogt, N., Helmstaedt, K., Cohen, N., Gorovits, R., Yarden, O., Seiler, S., 2008. The nuclear Dbf2-related kinase COT1 and the Mitogen-Activated Protein Kinases MAK1 and MAK2 genetically interact to regulate filamentous growth, hyphal fusion and sexual development in *Neurospora crassa*. Genetics 179, 1313–1325. https://doi.org/10.1534/genetics.108.089425

Maheshwari, R., 1999. Microconidia of *Neurospora crassa*. Fungal Genetics and Biology 26, 1–18. https://doi.org/10.1006/fgbi.1998.1103

Malagnac, F., Lalucque, H., Lepère, G., Silar, P., 2004. Two NADPH oxidase isoforms are required for sexual reproduction and ascospore germination in the filamentous fungus *Podospora anserina*. Fungal Genetics and Biology 41, 982–997. https://doi.org/10.1016/j.fgb.2004.07.008

Martin, T., Lu, S.-W., van Tilbeurgh, H., Ripoll, D.R., Dixelius, C., Turgeon, B.G., Debuchy, R., 2010. Tracing the origin of the fungal α1 domain places its ancestor in the HMG-box superfamily: implication for fungal mating-type evolution. PLoS ONE 5, e15199. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015199

Masloff, S., Pöggeler, S., Kück, U., 1999. The *pro1+* gene from *Sordaria macrospora* encodes a C6 zinc finger transcription factor required for fruiting body development. Genetics 152, 191–199. https://doi.org/10.1093/genetics/152.1.191

Mayrhofer, S., Weber, J.M., Pöggeler, S., 2006. Pheromones and pheromone receptors are required for proper sexual development in the homothallic Ascomycete *Sordaria macrospora*. Genetics 172, 1521–1533. https://doi.org/10.1534/genetics.105.047381

Meirmans, S., Meirmans, P.G., Kirkendall, L.R., 2012. The costs of sex: facing real-world complexities. The Quarterly Review of Biology 87, 19–40. https://doi.org/10.1086/663945

Metzenberg, R.L., Glass, N.L., 1990. Mating type and mating strategies in *Neurospora*. Bioessays 12, 53–59. https://doi.org/10.1002/bies.950120202

Morimoto, Y., Tani, M., 2015. Synthesis of mannosylinositol phosphorylceramides is involved in maintenance of cell integrity of yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Role of MIPC synthase in cell integrity. Molecular Microbiology 95, 706–722. https://doi.org/10.1111/mmi.12896

N

Ni, M., Feretzaki, M., Sun, S., Wang, X., Heitman, J., 2011. Sex in fungi. Annu. Rev. Genet. 45, 405–430. https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132536

Nolting, N., Pöggeler, S., 2006. A MADS box protein interacts with a mating-type protein and is required for fruiting body development in the homothallic Ascomycete *Sordaria macrospora*. Eukaryot Cell 5, 1043–1056. https://doi.org/10.1128/EC.00086-06

Nottéghem, J., Silué, D., 1992. Distribution of the Mating Type Alleles in *Magnaporthe grisea* Populations Pathogenic on Rice. Phytopathology 82, 421–424. https://doi.org/10.1094/Phyto-82-421

O

Ou, S.H., 1985 Rice diseases, 2nd edition. Slough, UK: Common-wealth Agricultural Bureau, pp. 109-201

P

Palma-Guerrero, J., Leeder, A.C., Welch, J., Glass, N.L., 2014. Identification and characterization of LFD1, a novel protein involved in membrane merger during cell fusion in *Neurospora crassa*. Molecular Microbiology 92, 164–182. https://doi.org/10.1111/mmi.12545

Park, H.-S., Nam, T.-Y., Han, K.-H., Kim, S.C., Yu, J.-H., 2014. *VelC* positively controls sexual development in *Aspergillus nidulans*. PLoS ONE 9, e89883. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089883

Passer, A.R., Clancey, S.A., Shea, T., David-Palma, M., Averette, A.F., Boekhout, T., Porcel, B.M., Nowrousian, M., Cuomo, C.A., Sun, S., Heitman, J., Coelho, M.A., 2022. Obligate sexual reproduction of a homothallic fungus closely related to the *Cryptococcus* pathogenic species complex. eLife 11, e79114. https://doi.org/10.7554/eLife.79114

Pennisi, E., 2010. Armed and dangerous. Science 327, 804–805. https://doi.org/10.1126/science.327.5967.804

Peraza-Reyes, L., Malagnac, F., 2016. 16 Sexual development in fungi, in: Wendland, J. (Ed.), Growth, Differentiation and Sexuality. Springer International Publishing, Cham, pp. 407–455. https://doi.org/10.1007/978-3-319-25844-7_16

Pham, K.T.M., Inoue, Y., Vu, B.V., Nguyen, H.H., Nakayashiki, T., Ikeda, K., Nakayashiki, H., 2015. MoSET1 (Histone H3K4 Methyltransferase in *Magnaporthe oryzae*) regulates global gene expression during infection-related morphogenesis. PLoS Genet 11, e1005385. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005385

Pi, H., Chien, C.T., Fields, S., 1997. Transcriptional activation upon pheromone stimulation mediated by a small domain of Saccharomyces cerevisiae Ste12p. Mol Cell Biol 17, 6410–6418. https://doi.org/10.1128/MCB.17.11.6410

Pöggeler, S., 2000. Two pheromone precursor genes are transcriptionally expressed in the homothallic ascomycete *Sordaria macrospora*. Current Genetics 37, 403–411. https://doi.org/10.1007/s002940000120

Pöggeler, S., Kück, U., 2001. Identification of transcriptionally expressed pheromone receptor genes in filamentous ascomycetes. Gene 280, 9–17. https://doi.org/10.1016/S0378-1119(01)00786-7

Pöggeler, S., Nowrousian, M., Teichert, I., Beier, A., Kück, U., 2018. Fruiting-body development in Ascomycetes, in: Anke, T., Schüffler, A. (Eds.), Physiology and Genetics. Springer International Publishing, Cham, pp. 1–56. https://doi.org/10.1007/978-3-319-71740-1_1

Pordel, A., Ravel, S., Charriat, F., Gladieux, P., Cros-Arteil, S., Milazzo, J., Adreit, H., Javan-Nikkhah, M., Mirzadi-Gohari, A., Moumeni, A., Tharreau, D., 2021. Tracing the origin and evolutionary history of *Pyricularia oryzae* infecting maize and barnyard grass. Phytopathology 111, 128–136. https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-20-0423-R

R

Rossier, C., Ton-That, T.-C., Turian, G., 1977. Microcyclic microconidiation in *Neurospora crassa*. Experimental Mycology 1, 52–62. https://doi.org/10.1016/S0147-5975(77)80030-3

S

Saleh, D., Milazzo, J., Adreit, H., Fournier, E., Tharreau, D., 2014. South-East Asia is the center of origin, diversity and dispersion of the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. New Phytol 201, 1440–1456. https://doi.org/10.1111/nph.12627

Saleh, D., Milazzo, J., Adreit, H., Tharreau, D., Fournier, E., 2012a. Asexual reproduction induces a rapid and permanent loss of sexual reproduction capacity in the rice fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*: results of in vitro experimental evolution assays. BMC Evol Biol 12, 42. https://doi.org/10.1186/1471-2148-12-42

Saleh, D., Xu, P., Shen, Y., Li, C., Adreit, H., Milazzo, J., Ravigné, V., Bazin, E., Nottéghem, J.-L., Fournier, E., Tharreau, D., 2012b. Sex at the origin: an Asian population of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* reproduces sexually. Molecular Ecology 21, 1330–1344. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05469.x

Savary, S., Willocquet, L., Pethybridge, S.J., Esker, P., McRoberts, N., Nelson, A., 2019. The global burden of pathogens and pests on major food crops. Nature Ecology & Evolution 3, 430–439. https://doi.org/10.1038/s41559-018-0793-y

Semighini, C.P., Harris, S.D., 2008. Regulation of apical dominance in *Aspergillus nidulans* hyphae by reactive oxygen species. Genetics 179, 1919–1932. https://doi.org/10.1534/genetics.108.089318

Silar, P., Daboussi, M.-J., 1999. Non-conventional infectious elements in filamentous fungi. Trends in Genetics 15, 141–145. https://doi.org/10.1016/S0168-9525(99)01698-4

Silué, D., Nottéghem, J.L., 1990. Production of perithecia of *Magnaporthe grisea* on rice plants. Mycological Research 94, 1151–1152. https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)81351-8

Stukenbrock, E.H., McDonald, B.A., 2008. The origins of plant pathogens in agro-ecosystems. Annu. Rev. Phytopathol. 46, 75–100. https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.010708.154114

Sun, X., Wang, F., Lan, N., Liu, B., Hu, C., Xue, W., Zhang, Z., Li, S., 2019. The Zn(II)2Cys6-type transcription factor ADA-6 regulates conidiation, sexual sevelopment, and oxidative stress response in *Neurospora crassa*. Front. Microbiol. 10, 750. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00750

Sun, C.B., Suresh, A., Deng, Y.Z., Naqvi, N.I., 2007. A multidrug resistance transporter in *Magnaporthe* is required for host penetration and for survival during oxidative stress. The Plant Cell 18, 3686–3705. https://doi.org/10.1105/tpc.105.037861

T

Taylor, J., Jacobson, D., Fisher, M., 1999. The evolution of asexual fungi: Reproduction, Speciation and Classification. Annu. Rev. Phytopathol. 37, 197–246. https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.37.1.197

Taylor, J.W., Hann-Soden, C., Branco, S., Sylvain, I., Ellison, C.E., 2015. Clonal reproduction in fungi. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 112, 8901–8908. https://doi.org/10.1073/pnas.1503159112

Teichert, I., Nowrousian, M., Pöggeler, S., Kück, U., 2014. The filamentous fungus *Sordaria macrospora* as a genetic model to study fruiting body development, in: Advances in Genetics. Elsevier, pp. 199–244. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800149-3.00004-4

Teichert, I., Wolff, G., Kück, U., Nowrousian, M., 2012. Combining laser microdissection and RNA-seq to chart the transcriptional landscape of fungal development. BMC Genomics 13, 511. https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-511

Tembo, B., Mulenga, R.M., Sichilima, S., M'siska, K.K., Mwale, M., Chikoti, P.C., Singh, P.K., He, X., Pedley, K.F., Peterson, G.L., Singh, R.P., Braun, H.J., 2020. Detection and characterization of fungus (*Magnaporthe oryzae* pathotype *Triticum*) causing wheat blast disease on rain-fed grown wheat (*Triticum aestivum* L.) in Zambia. PLoS ONE 15, e0238724. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238724

Tharreau, D., Fudal, I., Andriantsimialona, D., Santoso, Utami, D., Fournier, E., Lebrun, M.-H., Nottéghem, J.-L., 2009. World population structure and migration of the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*, in: Wang, G.-L., Valent, B. (Eds.), Advances in Genetics, Genomics and Control of Rice Blast Disease. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 209–215. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9500-9_21

Tharreau, D., Notteghem, J.-L., Lebrun, M.-H., 1997. Mutations affecting perithecium development and sporulation in *Magnaporthe grisea*. Fungal Genetics and Biology 21, 206–213. https://doi.org/10.1006/fgbi.1996.0951

Tharreau D. 1994. Etude génétique des interactions hôte-pathogène dans le cas du pathosytème *Oryza sativa-Magnaporthe grisea*. Thèse de Doctorat de l'Université Paris-Sud, Orsay. pp 86

Thierry, M., Charriat, F., Milazzo, J., Adreit, H., Ravel, S., Cros-Arteil, S., borron, S., Sella, V., Kroj, T., Ioos, R., Fournier, E., Tharreau, D., Gladieux, P., 2022. Maintenance of divergent lineages of the rice blast fungus *Pyricularia oryzae* through niche separation, loss of sex and post-mating genetic incompatibilities. PLoS Pathog 18, e1010687. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010687

Thierry M. 2019. Diagnostic et inference de l'histoire évolutive des lignées endémiques et pandémiques de *Pyricularia oryzae* causant la pyriculariose du, du blé, et d'autres Poacées sauvages. Thèse de Doctorat de Montpellier SupAgro. pp 180

Tudzynski, P., Heller, J., Siegmund, U., 2012. Reactive oxygen species generation in fungal development and pathogenesis. Current Opinion in Microbiology 15, 653–659. https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.10.002

Turgeon, B.G., Yoder, O.C., 2000. Proposed nomenclature for mating type genes of filamentous Ascomycetes. Fungal Genetics and Biology 31, 1–5. https://doi.org/10.1006/fgbi.2000.1227

U

Uchida, M., Konishi, T., Fujigasaki, A., Kita, K., Arie, T., Teraoka, T., Arazoe, T., Kamakura, T., 2023. Why do some fungi want to be sterile? The role of dysfunctional *Pro1* in the rice blast fungus (preprint). Microbiology. https://doi.org/10.1101/2023.01.23.525283

V

Valent, B., 2021. The impact of blast disease: past, present, and future, in: Jacob, S. (Ed.), *Magnaporthe oryzae*, methods in molecular biology. Springer US, New York, NY, pp. 1–18. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1613-0_1

Valent, B., 1990. Rice blast as a model system for plant pathology. Phytopathology 80, 33. https://doi.org/10.1094/Phyto-80-33

Vienken, K., Fischer, R., 2006. The Zn(II)2Cys6 putative transcription factor NosA controls fruiting body formation in *Aspergillus nidulans*. Mol Microbiol 61, 544–554. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05257.x

Vrijenhoek, R.C., 1998. Animal clones and diversity. BioScience 48, 617–628. https://doi.org/10.2307/1313421

W

Wang, C.-W., Stromhaug, P.E., Shima, J., Klionsky, D.J., 2002. The Ccz1-Mon1 protein complex is required for the late step of multiple vacuole delivery pathways. Journal of Biological Chemistry 277, 47917–47927. https://doi.org/10.1074/jbc.M208191200

Wang, J., Wang, S., Zhang, Z., Hao, Z., Shi, X., Li, Ling, Zhu, X., Qiu, H., Chai, R., Wang, Y., Li, Lin, Liu, X., Feng, X., Sun, G., Lin, F., 2021. MAT loci play crucial roles in sexual development but are dispensable for asexual reproduction and pathogenicity in rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. JoF 7, 858. https://doi.org/10.3390/jof7100858

Whittaker, R.H., 1959. On the broad classification of organisms. The Quarterly Review of Biology 34, 210–226. https://doi.org/10.1086/402733

Whitton, J., Sears, C.J., Baack, E.J., Otto, S.P., 2008. The dynamic nature of apomixis in the Angiosperms. International Journal of Plant Sciences 169, 169–182. https://doi.org/10.1086/523369

Wilson, W., van der Nest, W., 2019. It's All in the genes: the regulatory pathways of sexual reproduction in filamentous ascomycetes. Genes 10, 330. https://doi.org/10.3390/genes10050330

Z

Zeigler, R.S., 1998. Recombination in *Magnaporthe grisea*. Annu. Rev. Phytopathol. 36, 249–275. https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.36.1.249

Zeigler, R.S., Scott, R.P., Leung, H., Bordeos, A.A., Kumar, J., Nelson, R.J., 1997. Evidence of parasexual exchange of DNA in the rice blast fungus challenges its exclusive clonality. Phytopathology 87, 284–294. https://doi.org/10.1094/PHYTO.1997.87.3.284

Zeyl, C., 2009. The role of sex in fungal evolution. Current Opinion in Microbiology 12, 592–598. https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.09.011

Zhang, H., Wu, Z., Wang, C., Li, Y., Xu, J.-R., 2014. Germination and infectivity of microconidia in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. Nat Commun 5, 4518. https://doi.org/10.1038/ncomms5518

Zhou, X., Liu, W., Wang, C., Xu, Q., Wang, Y., Ding, S., Xu, J.-R., 2011. A MADS-box transcription factor MoMcm1 is required for male fertility, microconidium production and virulence in *Magnaporthe oryzae*. Molecular Microbiology 80, 33–53. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07556.x

Annexes

Annexe 1 : Scripts informatiques utilisés pour l'analyse GWAS

Script1

```
#!/bin/sh
#SBATCH --job-name=mapping_evol
#SBATCH --partition=long
#SBATCH --output=R-%x.%j.out
#SBATCH --error=R-%x.%j.err
#SBATCH --mem-per-cpu=12G

module load bwa/0.7.17
module load samtools/1.10

# Input & Ouput path
REF='/shared/home/alassagne/pyrigenome/ref/GUY11_PacBio_masked.fasta'
PATH_FASTQ='/shared/home/alassagne/pyrigenome/Strains/'
OUTPUT='/shared/home/alassagne/pyrigenome/'


OUTPUT_MAPPING="$OUTPUT/Mapping/"
mkdir $OUTPUT
mkdir $OUTPUT_MAPPING
## Indexing the reference genome
bwa index -a bwtsw /shared/home/alassagne/pyrigenome/ref/GUY11_PacBio_masked.fasta

for fastq in ${PATH_FASTQ}*R1.fastq.gz; do
ID=`basename -s _R1.fastq.gz $fastq`

echo '#!/bin/sh'> $ID.sh
echo 'module load bwa/0.7.17' >> $ID.sh
echo 'module load samtools/1.10'>> $ID.sh

echo "bwa mem $REF ${PATH_FASTQ}${ID}_R1.fastq.gz ${PATH_FASTQ}${ID}_R2.fastq.gz -R
\"@RG\tID:${ID}\tSM:${ID}\tPL:ILLUMINA\" | samtools view -F 0x04 -q 20 -bh | samtools sort -o
${OUTPUT_MAPPING}${ID}.filt_sort.bam" >> ${ID}.sh
sbatch --export=ALL --partition=long --mem-per-cpu=12G --output=R-%x.%j.out --error=R-%x.%j.err
--job-name=mapping_$ID $ID.sh
done
```

Script2

```
#!/bin/bash
#SBATCH --job-name=mapping_stats_MA
#SBATCH --partition=long
#SBATCH --ntasks-per-node=10
#SBATCH --output=R-%x.%j.out
#SBATCH --error=R-%x.%j.err
#SBATCH --mem-per-cpu=5G

module load samtools/1.10
module load multiqc/1.9
```

```
# Input & Ouput path
REF='/shared/home/alassagne/pyrigenome/ref/GUY11_PacBio_masked.fasta'
PATH_FASTQ='/shared/home/alassagne/pyrigenome/Strains/'
OUTPUT='/shared/home/alassagne/pyrigenome/'


mkdir ${OUTPUT}/flagstat
#### Run samtools flagstat and samtools depth on filtered reads
for bam in ${OUTPUT}/Mapping/*.filt_sort.bam; do
ID=`basename -s .filt_sort.bam $bam`
samtools flagstat -@ 10 ${OUTPUT}/Mapping/${ID}.filt_sort.bam >
${OUTPUT}/Mapping/${ID}_flagstat.txt
samtools depth -a ${OUTPUT}/Mapping/${ID}.filt_sort.bam >
${OUTPUT}/flagstat/${ID}_depth_a.txt
samtools depth ${OUTPUT}/Mapping/${ID}.filt_sort.bam > ${OUTPUT}/flagstat/${ID}_depth.txt
done
multiqc ${OUTPUT}/flagstat/*.flagstat -o ${OUTPUT}/flagstat/
#### Estimate mean read depth
# size_ref= total number of position of ref genome size
# sum= sum of depth estimates at each position
# the sum is done only with depth estimated at mapped positions

#### Estimate breath depth = proportion of reads that mapped to the reference genome (_depth_a.txt file
shows all positions)
# size_ref= total number of positions of the ref ~ approximation of the the reference genome size
# mapped= number of positions of mapped genome (increment 1 each time there is at least 1 read that
mapped at a position)

echo -e "ID\tmean_read_DP\tbreath_DP" > ${OUTPUT}/DP_MA.txt
for depth_file in ${OUTPUT}/flagstat/*_depth_a.txt; do
ID=`basename -s _depth_a.txt $depth_file`
mean_read_DP=`awk -v OFS='\t' -v spname="$ID" '{size_ref++; if($3>0) sum+=$3}END{print
spname, sum/size_ref}' ${OUTPUT}/flagstat/${ID}_depth.txt`
breath_DP=`awk -v OFS='\t' -v spname="$ID" '{size_ref++; if($3>0)
mapped+=1}END{print(mapped/size_ref)*100}' ${OUTPUT}/flagstat/${ID}_depth_a.txt`
paste <(printf %s "$mean_read_DP") <(printf %s "$breath_DP")>> ${OUTPUT}/DP_MA.txt
done

#### Estimate the proportion of mapped reads to the reference

# 1st way = from samtools flagstat file if you keep unfiltered/on unfiltered reads
# 2nd way = use the number of mapped reads from flagstat filtered file and count the total number of
reads in the fastq.gz file
echo -e "ID\tMAPPED_reads"> ${OUTPUT}/nbreads_mapped_MA.txt
for flagstat_file in ${OUTPUT}/flagstat/*.flagstat; do
ID=`basename -s .flagstat $flagstat_file`
awk -v spname="$ID" -F "[+]" 'NR == 5 {print spname, $1}' ${OUTPUT}/flagstat/${ID}.flagstat >>
${OUTPUT}/nbreads_mapped_MA.txt
done

#in a fastq file, 1read has 4 lines: (nbR1+nbR2)/4 ==> nbR1/2 because nbR1=nbR2
echo -e "ID\tTOTAL_reads"> ${OUTPUT}/nbreads_tot_MA.txt
for fastq in ${PATH_FASTQ}*_R1.fastq.gz; do
ID=${fastq/_R1.fastq.gz/}
```

```
nbR=`zcat ${ID}_R1.fastq.gz | wc -l`
TOT=$(($nbR/2))
paste <(printf %s "$ID") <(printf %s "$TOT")>>${OUTPUT}/nbreads_tot_MA.txt
done

paste ${OUTPUT}/nbreads_mapped_MA.txt ${OUTPUT}/nbreads_tot_MA.txt >
${OUTPUT}/prop_mapped_MA.txt
echo -e "ID\tMAPPED_reads\tID\tTOT\tPROPORTION" > ${OUTPUT}/prop_mapped2_MA.txt
awk 'NR>1{PROPORTION = 100*$2/$4 ; print $1"\t"$2"\t"$3"\t"$4"\t"PROPORTION}'
${OUTPUT}/prop_mapped_MA.txt >> ${OUTPUT}/prop_mapped2_MA.txt
```

Script 3

```
#!/bin/sh

#SBATCH --job-name=SNPcall_GBS
#SBATCH --partition=long
#SBATCH --output=R-%x.%j.out
#SBATCH --error=R-%x.%j.err
#SBATCH --mem-per-cpu=10G
#SBATCH --cpus-per-task=20
module load samtools/1.10
module load bcftools/1.10.2
module load vcftools/0.1.16

# Input & Ouput path
REF='/shared/home/alassagne/pyrigenome/ref/GUY11_PacBio_masked.fasta'
PATH_FASTQ='/shared/home/alassagne/pyrigenome/Strains/'
OUTPUT='/shared/home/alassagne/pyrigenome/'
OUTPUT_VCF='/shared/home/alassagne/pyrigenome/SNPCAlling_XX.vcf'

bcftools mpileup --threads 20 --annotate "DP,AD,INFO/AD" -f ${REF}
${OUTPUT}/Mapping/*.filt_sort.bam | bcftools call --threads 20 -m --ploidy 1 -f GQ| bgzip >
${OUTPUT_VCF}
```

Annexe 2 : Protocole de production des microconidies

- Milieu PDB:

    - Éplucher et couper en petits morceaux 200g de pomme de terre biologique (sans traimement).
    - Faire cuire les 200g de pomme de terre dans 800mL d'eau MilliRo en ébullition pendant 25min.
    - Filtrer le liquide à travers plusieurs couches de Miracloth à une maille de 22µm pour récupérer le filtrat.
    - Ajouter 20g de glucose puis qsp 1000mL avec de l'eau MilliRo
    - Autoclaver à 120°C pendant 20min
- Milieu farine de riz
    - Pour 1 litre d'eau MilliRo
    - 15g d'AGAR
    - 20g de farine de riz
    - 2g d'extrait de levure
    - Autoclaver à 120°C pendant 20min
    - Ajouter 500000u de pénicilline G
    - Couler dans boite de pétri stérile 90mm
- Culture sur milieu farine de riz
    - Déposer un confetti contenant du mycelium de la souche à mettre en culture au centre de la boite de petri farine de riz.
    - Mettre la boite de pétri à 25°C avec alternance 12h/12h pour la lumière pendant une semaine.
- Culture liquide en milieu PDB
    - Mettre 40mL de milieu PDB dans un erlen 100mL préalablement autoclavé et bouché avec du coton cardé.
    - Prélever à l'apporte pièce, 2 plugs de mycélium jeune (le plus extérieur au cercle) des cultures sur boite de pétri farine de riz âgées d'une semaine.
    - Déposer les plugs dans l'erlen contenant les 40mL de PDB.
    - Placer en suite les erlens en agitation constante (150rpm) à 25°C avec alternance 12h/12h pour la lumière pdt 3 jours puis en agitation constante (150rpm) à 20°C pdt 6 jours.
- Récupération des microconidies et observation
    - Filtrer les erlens avec Miracloth à une maille de 22µm pour récupérer le filtrat dans tube 50mL puis qsp à 50mL pour équilibrage des tubes.
    - Centrifuger les tubes à 4500g pdt 10 minutes.
    - Jeter le surnageant en faisant attention à ce que le culot ne se décroche pas.
    - Resuspendre le culot dans 1 à 2 mL d'eau.
    - Observer la solution de microconidies au microscope à contraste de phase et sur cellule de Malassez pour quantification.

Annexe 3 : Séquences des gènes candidats sur le scaffold 10 de GUY11

>Mo_GUY11_054380
ATGTCGATACACTGCAAAAGCTCGACGCAGGTGAACTTCGAAATATATTACGATCCCGAGACTGACCAGGTCACAC
TAATAAATGGCCAATCTTCACCCACGCTCGTTCTCAAAAAGGAATCGGGACCCGACAATATTATTGTCTACAAAGG
GACGAGCGCGGAGCTGGAACCTGGCGCCTGGAACCTCACCGCGCCCGATGTTAACCGCACAACCACACTTTTGGTT
CTCCCACGGCGTTTTCTCCCTGCTAGGGATAATGCTAAAGAATTCGAGCCGGAAAGCAGGAAACGATCCGCGTCAG
CTACCCTGCCAGCGAAACGTGCGAAGGCCAGCAACACGGTAACATTGGTGCCAAAACATACCGTTCCGGTTACCGA
CTTTAAAATGCGGCAGCTGGAACACCCTCTCGTGTCCCTTAGACCTGGGCAAACCCTGAAACTCGTAGGATCGCAC
CCTCAAAAGGAATATTCCATCACATATGCCCAAAAACTGGCGGAAAACAAGTCATCGTTAGTCAGAAAAGTTCAGT
TTTCCTTTCCGGGTCATGGAAACGTTGATATGGTTGCCAAAACGGTACGCAAAGGGATGCGTAACGCTAAAGCTGC
TGCCAGGGTCTGGCAGAGCGAAACCAGGATACATAGCAAGCTGATGGCTACTACGGCTGGCGCCCGTTTCATTGTA
CAGCTGCTTGGAACAAACGCACGCATCCACACAATATACATGGAGGACGTTGAAAGACCGTCACTGGCACACCCTA
CCTGGCGACAAAGGCCCGAAAACCTGTTTACAGGCTCACGGGGCGTCGCAGGCCGCATTATGCGTAATATAGCCCT
AGCTCTGGATTACGTCCACTCTAAAGGCATTACCCATTACGACGTCAAGCCGGGCAACATTCTCTACAACGATACC
CGCGGCGCCGTCCTCATCGACTTTGGTCTCAACAGCGATAGCCCAGATACGGCGACCAATGTTTACGCGGCGGGCA
CGCCCTGGTATATACCACCCGAATTTCTTGCGGCATCAAATCCCGGCCGAGGCTTCCCTGGCGACGTCTGGGCACT
GGGCGTAGTGCAACTTTTTCTATTCAAACTGCTTCCGCTCCCGGAAACCACCGCCGAATGGATAATCTCTCATGTC
GTTGGTCCGAAAGGTCCAAACCGCGACAAAGCGAGGGAAACCATGGTTCAATGGCTGAAACGGGTGAAAAATGCCC
GGGGATTGCTTGCCCCAGAGGGCCCTGGATCGGATCCAGACACTTTACTACACGCAGCCGGCGGCCGAAAAGGAAA
AGCACACCGTAACGGCCAATATAATGCGGTACGAGGCGACGGGGACGGACGAAACCACGACGGTATGGACAAACTT
GTCCACGAGATGACAGAAAGCGACTGCCGCAAACGTATTACAATCCGTAACATCATTGGAGGACTCCGCCCAGCGG
CCAAATACGTGTCGGATGTCGCTCTTCATGATCCTCCCACTACTCCGAATTAA
>Mo_GUY11_054390
ATGGACGGTCAGCGCCCAACTCAACCCGATTTCGACAATGCACCTCAATGGCGCTGGGACTCGTGGAGAGTCGGAC
TCGATCCTGAATCGCTTTTCACGATTTTAAGCGAATAATACAACAAGGTCTTTTGCGACATCCAATCCCCCGAAGC
GTTCCATCACGACGTATCTTCAATCGTCCTCCAGGCGAGAAATCTCGAAGATTTCCATCATAGATTGTCGAAGCGA
CGCGAGGAGCGCCTGCGCGAGCTACGAACAGCCTGGACTCGAGTCATACAAAACTTTTATGGCTGGCGGCCAATTC
GATTTGGCCAAGATGAGGACCTAATATATTCGGTTTTCGGAAAAATGGTTGGGAACTTATCCTTCGAGTCTATTAT
TTGTTATGCCGACGCGCATATACCCGACGACCGCAAATATTCCCCGACCTTGAGCAACTTGGATCCCGAGGCAAAG
CCGCTATCGCCAGACAGCGGACCTGACGCTGGCCCAGACCAGAAGGTGCTGCAGCGACCCGAAGAGCCCCGGCTGC
CGGCGTGGCCGCCAAAGCCAACGACCCGGCCTGCACATGCTTTATTAACATCGCCGCCGGGATACTGCAACCGCAA
ACCGCTCGAAAAGATCGTGCCACCGAGTTTATTGACACCAGCCGGCGACGATGAGGACGTGACGGTTGAGTCTGCG
GCTGCTGGCTCTTCCAAGAGCATACGGAAGCAATCGAGCACGGAGCAGGGAAAGGAGTGGCAACTCAAGCGGGGAC
AAAGCCAGGAACTGGAAGCAAAGGAATATAGCACTGCACTTAAGCCAGCGGACATCCTGTCCCCTAGCGGCAGCGG
CTGCAGCAATCCAAAACGGCAGCAGCAGAGCATTCAACTGGAGTATGGGCAGGACACTGTTGCAGGCGACGATAAG
GACTCACCGTCAAGGACAATGTTTGCGTCAGCAGTGTTACCACGACGAAAAAGCGCCTATTTGGGGATAACATCGT
CACCAACGTTGACCAGCGTTCGGAGTTGCAAAAAGCGGCCGCGCACACCAGAATCACCCGGCAGTGACGATGGGCC
GACCTGCAAAAGGAACCGGACGAGAGTCTTCGCCTCGCCGAAGTAA
>Mo_GUY11_054400
ATGCGTAGTGAAGAGCCTAGCGCACCGTCCTCCGTTGTGCGTGGCCTGAACTCGTCCAGGTCGACGGAGCGCATCA
ACCAGATCGATCAAGTAAGAGCCTATGGGATTGGAGATGTTGTCTCTCTACCCCAGCTGGTGGTCTGCGGCGACCA
GTCGGCCGGCAAGAGCTCGGTCTTAGAGAGCGTCACTGGCATCCCGTTCCCCAGAAAGAATGGACTTTGTACAAGG
TTCCCCACTGAAATCATCCTTCGGCACAACTCCACGGCTACGCGTATTATGGCCACTATTCACCCTCACGACTCCA
GACTGAAGGAAAAGAGAGATGCCCTTCTACAATACCGCCGCGTGCTAGCAGACATGTCGGAACTCCCTGATGTTAT
TGAGCAGGTGTCCGCATTGATGGAGATCCGTGGGTATGCGGACCATAGTCTCGGGAACGCGTTTGCGTCTGATGTC
TTGCGGATTGAATTCACGGGCCAGACAAATCTCAATCTGACTATCGTTGATCTGCCTGGACTCATCTCTGTGGCCA
ACGAAGAGCAAACAGAAGAAGACATCCAGCTCGTCAAAGACATGGTTAAAGGCTATGTTCAAAGTTCTCGCACGAT
TGTGCTAGCAGTGGTGCAGGCCACCAACGACATCGCCAACCAAGTCATCATCCAGCTTGCGCGACAGTACGACCCG
GAAGGTCAGAGGACGGTGGGGATTATCACCAAGGCGGACTTGATTAACGAGGGAAGCGAGGCTAGCTTGGCACAGC
TTGCGAACAACCAGGCCAACATTAAGCTGAACCTTGGCTTTTTTCTTTTGAAAAACCCGAAGCCATCCGAGATTGA
AGAGGGTATCAAACCTGAGCAGCGGTCGCAGAGGGAGCTGAGATTTTTCTCGGAGCCCGTTTGGAAGCAGCATCTC
GATATGAGTCGTGTAGGGGCCGAGAATCTGAAGCTGTTTCTGCAGGACCTCCTGGACGCCCACATCGAGAAGGAAA

TGCCCCAGGTGGTTGAAGATATTCGGAAGGTCCTGCGCACCACAGAGGAGAGCTTGACGCGACTTGGCCAAGCCCG
TCCCACTGTCGGGCACATCCGCATTTTTCTGACGCAAGTTAGCACCAGCTTTGCCCAGCTGGTCCAAGCTGCCTTG
GATGGCAACTATCATGGGCCGTACTACGATTTTTTCGATCAGGTTGAAGATTCGCGGTTGCGCGCCGTGGTCCACA
AGATCAATGGCCAATTCGCTACCGACATCCGTACCCATGGCAAAAAAAGGGTTTTGAGGCCGGCAGATTCAGAGAT
CAACTGGACTCTGGATGAAAATTCAATTAAGGAAAACGACGAGAAGGAGCTTTTCGTGACCCAAAAGGAAATGAAA
AACTGGGTCAAAAAGGTGTATTTGCGCACACGGGGTCGTGAGCTTCCAGGAAACTACAATCATGTCCTGCTGGCCG
AGTTGTTCCTGGAACAATCCTCTCGTTGGCTCCCTATTGCCACAGCCCACGTGGAAAGCATTATCGCGATCGTTAC
AGGGTGGCTGCAGCACGCCACTCGAGTGGTTCTGCCCGAGGATAAACTTCGTGGTGATGTGCTTTCCATTTGCTCT
CAGTGGATTGAGGACGCCGGCAATGACGCTTTGATGGAGCTTGACAAACTTAGAAAAGACGAGCAGCGCCAGCCGA
TTACGTACAACCATTATTACACTGATAACATTCAAAAGTCCCGTCATGGTTTTTTGCGTGAGGCCGTGGAAGGTGC
TATCAAAGAGACAGCAAGCTCGGATTACCATGGCAAACTCCACGTTAGCAACATCCCCATGGATATTGAAAAGTTC
CTTGAGGCAATGAAGCGCAAAGTCAACGTCGACATGGACGACCAGGCATGTGCTGAGGCCCTGGCGGGGTTGGAAG
CTTATTACAAGGTCGCCATGAAGACTTTCGTGGATAATGTCTGTCGGCAGGTTGTCGAACGTCACATTATTGCGCC
CCTTCCCAAGATCTTCAGTCCAGTGACTGTTTCCCGATTCACGGACGACGAGCTTCTTCAAATCGGAGCCGAGTCA
GAAAAACAAAACCGCAAGCGGGAAGAGCTTAGGAGCAGGGCAAATAAATTGAGGAGCAGCCTTGAAAACCTCCAGC
GACGCTGA
>Mo_GUY11_122940
ATGGACAGCATCAAAAGTTTTGCGGTCGAGAATGGAGCCGACGACGAGTTTCTCTTTCTCAACTACGCCGACCTTA
GCCAGAACCCTCTGGGAAGCTATGGCGACAAAGACATTGCGTTCATGGAGAAGGTTGCGAGCAAATACGACCCGAA
CGGAGTGTTTCAACGAAATGTGCCTGGAGGATTCAGGTTGTCAATTGCTCGAACAACTGCGTGTTTGAGGTGA
>Mo_GUY11_054410
ATGGACAACCACCGTTCCCACCAGCCCCTTACAGAAGATAATCTTATCAAACTAAAGGAGCAAATCCCATTACTTC
CTCGAGAAAGATTGAACAAAGCGAAACGTCGGGTGCATCATCTTATCAGGTGGCTAGAAAATCAATCAAGAAATGT
AGGCATTTTGTTTGCCGTACGTGCACAAATCAACAATGACGACTACGGCTGCCGCGACCACCATTACCGAGATCTC
GTTTATAAGGGAAATGGCAAACCTGACCTCGATGACCCTAAGTTCTGGGAGGACCAACTTCGTTCTCTCCAGAAAT
ACAAGCCTGTCGTCAGGATAAAAGAAGCTAAGGGACGCGTCCGTGACGCACTGACTGGCATTACAAAATTGGGGGG
CGAAGGCTTGCAAGTTTTAGAAAATGAGGAGATTTATCTCGGTGAGGGTCAAGCCCTCCTTTATCGACTCAAAAAT
GGAGGTTCTACTCCCAACCTCAAAAGCCCATCTTTTTGGGAAGCCAAAGCCAAACATTTAACATGGCTCTGGAGCA
CTCTTGAGCGGGAAAAGCATCAACCATCAAAACTTCCGTCACCGGAGCCACTTTATCAGCCACCGCCCTCCACTGT
TTCCTCAGGGCCGCTTTCTGAGATGTTGTCTTGGCCGGCCCCGGGACCTTCCCTACCCCGGGATCTCCCCAGGAGC
CGGCCATGGCGCGAGCCAAGCAGTGAAACCAGCTCCAACTTCTCCAGCGAGACACCTCCGCCCCACCGTGCCCCGT
ATCACAAATTTGTCTGGAAAAGCAGGACAGACGCTTTCCAGGCGTGGATCGAAACATCCCCAGAAAGTGGTATGCC
GTCGCCGTCACCGCCGCCGTCGAACCATCTATCGTTCTATGGAGAAGATTTCCCCCTGGGTAGCATGATCATGATC
TGGCAAAATCCAGATTTGCAGAAGTTGGTGGACGCTGAAAAGCGCAACCGGGCTAAATGGTCTGTATACCATTTGC
TATCAGGCCTGCAGAACCATTGTGGCGAATCAGGTCGCAACGTCGTTGAGGAGGTAGATGACATCTACATCGACGA
ACGAGGTGCCCACAGACGTGGCAATAGAGTAACACCAGTTCCTACGGACGACATTATGGAAACTATCCATCCTCCT
GACGAAATGGGATTTTCGCGTGTCCAATATGACGCAATGACCCCTGAACAGCGGCAGGAAATTTACAGGAAGAAGG
CAAAGATGCCCAGAGATCAATGGCTTTTAGCCAGGAAGGAGGCAAGAGAGAAGGAGATCGAAATGTACAAAGAGGA
TCAAAGAAGGAGAGAGAAGGAGCAAAGGATGATTATTGATGATCTTACGTATTGGGAGGAGAAGGAAGCCTATCTC
GCTGAAAAATACGCAAGCTTGATTGGTGCGGAGCGAAAACCCGGAGACGATGAACTGCCGGACGCTACGCCGTCAA
GAGTTTCAAATAGGAAACGCCGTCACCCAGATGGTGACGCAGATCAAGTAAATTCGCGTGCTGCTACGCGTCGCAA
GTTACAACAGCCAAACTCGACCATCACTCCAGCTTTAACACGACCAACAGCAAGGGCCTCGAAACTACGTGAGAGA
AGAACAACCACAATCGCCGCTTCAGTAATGGGCAGTTTCTATGACGAAGGTGTGAGGAGAAGTGCCCGGATTGCGA
GGCCGCCAAGGAACCATACTTTGCATGATAGGTCGTCATCCAGTACTAGAGGTACTAGAAAATGA
>Mo_GUY11_122950
ATGCCACCAATTTCCTCCTCAACCTACACAGACGAGCTTCGATCGCCAGTCTCTCCTGACTACGACCTCCTTTCCA
TGCCACCTCCACCATCGACTGGAATCACATCACCCCTAATGGCTGACGCCGGCGAGGCGGAGTTTGTGGACGGACG
GTTGCTGCAAACCCAGCAACAGGGTCTCCACTCCTCGATAGCCAGCAGCGAGCGTGGAAAAACGCGGCTTCCACCC
AATGATTTCTCCAGACATATTCTAAGATCGTCGACCTCATACCCGCAAACCGGTAAACCCAACAAAGCTAGCGCCT
GA
>Mo_GUY11_122960
ATGTCCTCGACCAGCTGCGTCTCTTTGCCGAAGAGACAGAAATCGTTAAACGGCCGAGTCCCACTAAGGCGGAAAG
GCCGGAAGATATCTTCAGGCAGTACTATGATAGCAAATGGTGACAGAAATACCAAGGCTCTTGTCCCGGGAGAAGT
GTACGCCACGCATTGGGAATACTCCGTTTACTTGGCCATGGTCCTCCCTTGGTCTCCATCGCTTGCCCAAAACTGT
CCGAATATGACTAGGGCTCTGTTTTTTCAACTTATAGCAGCTGACCTGCCCAAAAGGTTAATTCCCGAATGCTTTT
CGATACTTGACCCGTCTACCTTGAAATGGGCTTCCGGGTACGAAGACGGTGGCGAACATGTCAATGAACGCCAATA
CCCTGTACGATGGTTCGACAAAGAAGGGTTTGTTGGCTGGGTACCAGGTTCGGAGCTGGTTGGTTTCGACTTTCTC
AAGGACTGCGAACAAGAAGAAATACAAGGATTTGGAGACGCCAAAAGAGAGGACGCAAACACTTGCGGATACAGCA
GCTATGCAGAAATGAAAAAGAGGGCAGCCGTTCTTGGAGCGACTTCAACCCCAATTTCGACGAAGCTCATCTCAGA
GATTGCTGCTGACGAGACTCCCATTCCGAAATTTACCTCCCGCCCAGCAGTTGCTTTAAACGCCAAAGAGCAGTGT
GAAATACAGAGCTCCCAACTGACTGGCGAGAGACACCAAAAGGAGCTTTCATCATTGGCCAGGGCGGTAAATGCAT

ACATTGATGCCGCAGAAAAGTATCGTCAAGCTAAGCGAGGATAA
>Mo_GUY_054420
ATGGCAAAACTTAACAGCTTTCTTGATGACGCGCCTGAATCTATTCGCAGTAACAAAGAAGTAATTGCGTGGCTTT
CAGAAAAACTGGAAACGCTAGAATCAGAAAAGAAAATCGAAAGGCTGGAGGCTGAAATCAAGAAGCTCAAAGGTAG
CCGGTCCAACGAAGAGAATCTTCGAAAGCAAGCCAACGAGTGGAAAGCCAAGTATGAAAGACTGCATAGAGCAGCC
ACGATTCCAAAGCATGAGCATTCTGAGGATAATGCCAAGCTTATCGAGAAAACCAGACAACAGCTGCTCAAGCAGT
ACGATGAAGAGATTGGGCGTCGGGCCGAGAACGAGCAACGGCAAGCACAGCAGGTTAGAGAGCAAGCCAAAAAGAT
CGAGAGATTGCAGGCCGAAAACGCAAAATACAGACAAGTACTCGAAAAGGCCAAAAAACAAGATTTCCATCCCTCT
GCACCAAGTAAAGCGACGTCGGCCAGTGGCAATGTTTACAACGACCTTACTGGATATAAAACAAAGTCGTTGACGG
TCAGCAACGAAAAGCAAAATGGAAGTCCAAACAATTCCCGCAGAACTTGCAGCAGCGTATCCAACGACATCCAGGG
TAATGCGCATGCACACGCGGCGGTCAAGCTCGCTATATCAACCCTTGATGCCGAATTGCCCGAATCCTACACAAAA
AATTCGATCGATATCGAATCTTTGCAGTTGCCGAGGCGGCGCCCAGGCCTCAAAGTCCCCCAATTTGAAGGGTCCT
GTGAAGTAAGGCTTGGTCAGATGATTGACTGGGGTACACAATCCTTCCCTAAACGCAAGGCTGAGGTTAGGTACTT
TAACGCCGATACATTTATTGGGGCTGGTGTCTTTTACCAGCTATGTCGCATGGATTCCTGTCGCGTTATTGAGTAC
GGAAAAAATTTATCCATCACTGGTAAATCCCGGAAGCACGCCGACATTACCATTATCCTTTGCCATGTCGCAGCTG
GAAACCAGTTGTCGCTCGTACAGCCTGACCATTTCGTTGTCGCTATTGTCGACTCCGGAGAAAAGGCTGTGCAACA
TTTTCAAAAGAAAAGGGTTCAAGAAGACCGAAAATTGGGGAGCTTGTCCTGCTGGGGAATGGAAAACGCCCTGGTA
AACAAGCTAAAAACCGATCTCGAACAAGCCTGGAACCTAAATTTGAGTGTTTCTCAGAAAGAGTTTAACTATGCCG
GCAATACTTGTTTACTTCAATGCGTAACATCGGTACGATCATATTTCGGCAAACATACTCCGCAAGAAGGCGACCA
ATACTCTATTCGATTATTTTACCTCGAGCGACTGCTGGAGGAATGGGTCCGTGAAGAAAACGAGTCTGGCACGTCA
AAAACCTCGCAAAACAAACTTCAAAGCCGGACTCCACCAGCAATCATCGCGCTAGCTGAACCATCTTCCCATCCCA
GCGTATGCGGGGTGGCATATCGGCAGGTTCCTTGCCAGGGTGGCGAATTTGTGCTGCTTCTTCCAAACCCTGAACA
ATATCGGGACCTGAAAGAAAGAAGGAAAGGTAGCCCTTTGCTTTTCACTGTCGCCGAGAAACTCGGAGCACGAAAG
CAGGGCGCATTCCTTATCGAAATCCCCACAGCCTCTCGACCGGAACTTCCCGAACAAAGACCTCAGCAAGCACAGT
GCACAACCTACGTCCCGGAAAAGCTGGACGGCTTTTGGCGGCTCTTCACTAAAAAAGAAAAATCAAGCCTTCCTCT
TTTACCTGCCAATCCACAGAAGGTTGGCTGTTTGGACGCCGCCACCAAGGCGTACGAAAACCTCGTTGCGGAATCA
TTCAAGCAAAAGAAAAGCTTGGAGGGTGTTGCTTATCAGACGGACATCCCAGCAGAGACCAGCAACGAACGGGATT
GTGCTTATTTGCCTCCAGAAAGTCCTATTTGGCCAATCCGAGGCAACAAGCTACCTCGAACAGGTATACCGGGACT
CCATACTCCGACATGCTACCGAGGGACCCCTTTCGCTCCGTTTGCATGGCATCACGAAGACTTTGAGCTGGGCGCG
ATCAATTATCTTCATTATGGACAGAAAATATGGTTTGTCACACACCCAGGGTTCTTTGACAAAGCAACCGCAACGT
TTCAAGAAGCTCTAAACATCGACCAAGATCACAGCCAATTTCTGCGGCATGAGGCGGTACATGGCGGTGTTCAGTA
TCTACGGAACAAAGACATACCGACGATAGGTTTTATGCAAGAAGCCGGGCAAATAGTCGTCGTTTACCCACGCGCC
TACCACTCGGGATTTGGTGCGACGGCGACAGTCGCTGAAGCGGTCAATTATGCCGATCTGCAATACACTCTTCCGC
AAGACTACAGGCCGTGTCACAAGAAATGCCAGCCGTCAGACCCCATCACCGCTGACTTGGTGTTCCCCGAAAATAA
TTGTGGGCGGACTGCTACCTTACGCTGCAAGCCTAAGACAGTTGCAACTTTGTGCCCCGCGCCGACTTCCCAGGAT
CTCCGCGAAGGTGTTCCAAAAAGGAAATACGCACCAGAGCCTAAGAGAAAACCTAGTGAACGGCCTAGATTGAAAG
GAAAGAAGCACAACGAGGCACAAGACGAACCATCAAACGAGCCCCCAGCGAAACGACAAAAAGACCTACCCCCTCT
TGAGGACATGGCAAACGAGGTCATAAATGCAGAAGAGCGGGCCAAGAGCCACATCATGGCATGTATTGACAACTCG
GATCTCATTTTGCCCAACAAGACTATGGAAAAAAAGGCAGATCAGTATTTAGTCCTTAGCGCACGTTGGGCAAAGC
ATGCGCCGTTTAGCAGAATGGTGGCCTTGATATTGGAGACCCACGCAGTTGAGCTGATGTACTATGAATCATTTGG
CACTTTATTCGACAAGAACAGAGTTTTGCGGCGATTACCAAGCGAAATAGTTGACAAGTCTCTCGACATGCTGACC
GAAAGACCAACCGATTCCGCGTTCAGGACCTGGTTAGGAAGACGCCGTACCTTTTTAAAACTTGGCCTGGAATACC
TACTGTTTATACCCGTTGCTGGGGAGAAAAGGATGCCTGGCTTTCAAGACTTTGAACGGTTAACAGACCATCAGAT
CCAATCATTGCGCAAACTTATCAAAACCCCTGCCAACGCCGATACCATTGCAAAAGTCGGCGAAAGATTTCGACGC
AGTATTATCGAAGGTGACATCTCGGTTTGGAAAAATATTGGGCAAAATGAAATTCGGGATATGAACTTGGAGGAGA
TATCACGCCGGATTTTTCCGCTCGAAACAGAGCAGGTGGAACGCTAG
>Mo_GUY11_054430
ATGACCGAAAATATGCCTCCAGGACGTTAAAGTAATACTGAACGCCGGCGAATTAGAGACGACTGTCGCAAAAGAC
TGGCTGATCATATCTATGACAGTCTCGGACTCCAAGTCAAACCTGCTGACGTTCGCCTTTTGCCGCGAGGATCCGA
TTTTTACAGATGGCGAGTTCTTCCAGGCAACGAGGAAATATGTTCCAAGATATTTTCTAAGAGTTTGAGTGATCAT
TCCGTCAACGCATTGCGGCTACTTCGTGAGGAGGTCGGGAAATCGTTTGAAGCGATTGGAACGTCAGAATCTCCAA
ATCTAAATTCTCAGAAGCCGAGTTCGCTTATCAGCCAACTCCAAAATGAAAATGCACAACTTTCTGACCAACTGCG
TGCTGTAGCGGGAGAACTAGCTACAGAACGTGACCACCGAAGTGATCTGGAAGAAGAAAATCAAAGTTTGAGGAGC
ACGCAGAGCTTGTTGGAGAAGAAGCTTCAGGACCAAATAGATATTGCAGAGAATTTTCGGAGCGTTTTAGCCAGAT
GTGCTACTGTATTACCTGTTCTCGAAAACATGAGGAAACAAATGGCGGAATCTTTAGGTGATATTTGTCCAAATTA
A
>Mo_GUY11_054440
ATGGGAGCGTTTAAGATTCGAGGCGCGCAGGTGGGGCGAGAAACACAGCCACCGCGAACCAACGCTACTGAGTGGT
CCGCAAGAACGGGCATCCTCATACATCCGACCAATAACCTCTCCAAACACAGTAGTTTTGCCGCGAGCCACCAGAA
CCAAACAGCTGCGGTGGGCAGACTCACGAAAGGAGCAAAACAGTCGCATCGCGGGTAG
>Mo_GUY11_054450

ATGATGATACAATATCTTTACCTCCTCGACTATAAACCGGCACATGACCCTAGCTTCCAGCTCGCCGAGAGTAAGC
AGAACGCAAGCGCCCCTGATCTCCTTCTACACACCAAAGTGTACGCTATTGCAGACAACTATGCCATCGCCGGTCT
CAAAGCTCTAGCCGTTGTCAAATTTAAATCATCTGCAGGAGAGGCCTGGAACATCAAAGATTTTCTCGATGCGGCT
ATTGAGGCATACAGCTCTACTGTTGAGACTGATCGGGATATGCGAAATGCTGTTGTTCAGATGTTTGCCAGGCGCA
AGGAGCTGTTGGAACTGGATGAAGTCAAAAACCTCGTCAGAAAACTGGACCAACTTGCATATGACTTGCTCCTGCA
CTTCCACAACGAAAGGAGAATCTTATAA
>Mo_GUY11_054470
ATGGAACCTGACCATTCGCCAACCGACAGTGGCTATCTAATTGACAAAGAACAAAGCATACGATACTGGGAAGATG
CCAACGCTGATGATGACGGCATGCTCGGCGGAGTTTCCTCAGTGGCCGGATTTTCGAGCACATCAAAAGTCGATAT
ACAAGGTTCACGGGGTTTCTTGGCAAAACTTGGGATCGGTAGGGCAAGCAATAGACGTACCGTTGAATGCGCATTG
GAGGGCGGTGCAGGAATCGGTAGAGTAACGGGCGGACTTCTCAGTACTGTGGCTTCACATATCGACATAATCGAAC
CTGTAGCCAAATTCAACACCAAATTGCGAGAAAACGCTTGCGTACGACAGATCTTCAACGTCGGCCTAGAGGAATG
GTTGCCTGCCGATGGCGTACTATATGACCTGGTCTGGATTCAGTGGTGCGTTGGTTATCTAACAGATGAGCACCTG
GTGGGGTTTTTGATGCGATGCCAGCAAGCGTTGAGTCCGGAGAACGGCGTTATTGTTATGAAGGAAAACATAAGTA
CGAGCGACGCCGATTATTTCGACGACACTGACAATAGCTTGACAAGGGAAGATAGCAAGTTCCGAAACATATTCTG
TCAGGCTGGCTTGCGAATTATAAGAACTGAACTCCAAAGGGGTTTGTCTGCTGGTTCGCCTAAGAAGCTGTTGCCT
GTCCGGATGTATGCGCTGAAGCCCCGCTTATGTTAA

Résumé

Le système de reproduction d'un organisme a un impact sur l'émergence et l'évolution de nouveaux génotypes. La compréhension du mode de reproduction chez les organismes pathogènes aide donc à comprendre leur histoire de vie. Les mécanismes biologiques, et les gènes sous-jacents, impliqués dans la reproduction sexuée chez les Ascomycètes sont relativement bien décrits chez plusieurs organismes modèles tels que *Neurospora crassa* ou *Podospora anserina*. Cependant, chez *Pyricularia oryzae*, le champignon pathogène responsable de la pyriculariose du riz, la biologie et les déterminants génétiques de la reproduction sexuée restent peu documentés. Bien que la reproduction sexuée n'ait jamais été observée directement au champ, elle a déjà été réalisée au laboratoire. En effet, le croisement de souches fertiles conduit à la formation de périthèces, organes contenant les produits de la méiose. Par ailleurs, une lignée phylogénétique montre des traces d'événements de recombinaison tandis que les trois autres lignées ont une structure clonale. Certaines populations de *P. oryzae* semblent donc avoir perdu la capacité à se reproduire de manière sexuée *in natura*. Pour comprendre cette évolution, nous avons contribué à caractériser, les traits de fertilité mâle et femelle chez ce champignon phytopathogène d'intérêt agronomique majeur.

Tout d'abord, nous avons cherché à identifier les cellules ayant le rôle de gamètes mâles. La littérature suggérait que les microconidies sont les éléments fécondant mâle chez *P. oryzae*, sans toutefois le démontrer. C'est cette hypothèse que nous avons testée. Nous avons mis au point un protocole permettant la production et l'observation des microconidies. Puis nous avons quantifié la production de microconidies pour plusieurs souches. Enfin, par le biais de la fertilisation de mycélium femelle, nous avons démontré pour la première fois que les microconidies sont les gamètes mâles de *P. oryzae*.

La caractérisation de la production de spermaties nous a permis de réaliser un phénotypage quantitatif précis de la fertilité mâle dans une population naturelle de 71 souches de *P. oryzae* appartenant à la lignée pathogène du riz et recombinante. Nous avons tiré profit de ce phénotypage pour rechercher les bases génétiques de la fertilité mâle par une approche de génomique d'association (GWAS). Trois régions génomiques ont ainsi été mises en évidence. Parmi ces trois régions, une région d'une largeur de 65,05 kb, présentait des gènes candidats sérieux connus pour leur implication dans des mécanismes important pour la reproduction sexuée chez d'autres espèces. Nous avons en particulier identifié un gène contenant un domaine JmJ qui pourrait potentiellement être impliqué dans la régulation transcriptionnelle.

Enfin, nous nous sommes intéressés à la fertilité femelle, et plus particulièrement aux gènes impliqués dans la formation des périthèces. Pour cela, nous avons d'une part tiré profit de croisements produits au cours d'une précédente thèse, impliquant des souches femelle-fertiles et des mutants femelle-stériles, dont les descendants avaient été phénotypés pour la fertilité femelle. Nous avons utilisé ce matériel pour réaliser une analyse de « Bulk Segregant ». En parallèle, nous avons développé et utilisé une méthode de quantification des périthèces par analyse d'image pour phénotyper la fertilité femelle, et appliqué une approche de GWAS, comme précédemment. L'utilisation de ces méthodes complémentaires nous a permis de mettre en évidence plusieurs régions génomiques significativement associées à la fertilité femelle : 1 région constituée d'un gène identifié par GWAS, 4 régions majeures par BSA. Dans ces régions, nous avons observé des gènes déjà décrits pour leur implication dans la production de périthèces chez d'autres espèces, mais également des gènes possédant des fonctions potentiellement liées à la reproduction sexuée (métabolisme secondaire, remaniement des parois, cascades de signalisation, contrôle de la méiose…).

Abstract

The reproductive system of an organism has an impact on the emergence and evolution of adaptive variants in response to selective constraints. The understanding of the mode of reproduction in pathogens helps to understand their life history. The biological mechanisms and the genes involved in sexual reproduction in Ascomycetes are relatively well described in several model organisms such as *Neurospora crassa* or *Podospora anserina*. However, in *Pyricularia oryzae*, the fungal pathogen responsible for rice blast that causes about 3% yield loss worldwide, the biology and genetic determinants of sexual reproduction remain poorly documented. Although sexual reproduction has never been directly observed in the field, it is easily produced on artificial medium in the laboratory. Indeed, the crossing of fertile strains leads to the formation of perithecia which is the fruiting body containing the ascospores. In addition, one phylogenetic lineage shows evidence of recombination events, while the other three lineages have a clonal structure. Thus, some *P. oryzae* populations seem to have lost the capacity to reproduce sexually *in natura*. To understand this evolution, we have contributed to characterize the male and female fertility traits in this phytopathogen fungus of agronomic interest.

First, we sought to determine which cells act as male gametes. The literature suggests that microconidia are the male fertilizing element in *P. oryzae* but it has not been demonstrated. We tested this hypothesis in three steps. We designed a protocol to produce and observe microconidia. Then, we quantified the production of microconidia for several strains. Finally, thanks to controlled quantity deposition of microconidia on female mycelium, we demonstrated for the first time that microconidia are spermatia.

The characterization of spermatia production allowed us to perform a precise quantitative phenotyping to determine the genetic bases of male fertility. To this end, we performed a genomic association approach (GWAS) on a recombinant population of 71 *P. oryzae* strains from the recombinant lineage. Three genomic regions were identified. Among these three regions, the region of 65.05 kb containing 321 SNP markers located on Scaffold 10 of the GUY11 genome presented serious candidate genes known to be involved in mechanisms important for sexual reproduction in others species. In particular, we identified a gene possessing a Jmj domain that could be involved in transcriptional regulation (histone demethylation).

Finally, we focused on female fertility and more particularly on the genes involved in perithecia formation. To this end, we took advantage of previous crosses involving female-fertile strains and female-sterile mutants whose progenies had previously been phenotyped for female fertility. We used this material to perform a "Bulk Segregant" analysis. In parallel, we developed a method to quantify perithecia by image analysis and used it to phenotype female fertility and to conduct a GWAS study, as above. The use of these complementary methods allowed us to identify, by GWAS, a region composed of one single gene and 4 main genomic regions by BSA. In these regions, we observed genes already described for their involvement in perithecia production in other species but also unidentified genes with functions potentially involved in sexual reproduction (secondary metabolite production, cell wall rearrangements, signaling cascades, meiosis control…).