



HAL
open science

Génétique des populations et phylogéographie du nématode à kyste de la pomme de terre (*Globodera pallida*) au Pérou

Damien Picard

► **To cite this version:**

Damien Picard. Génétique des populations et phylogéographie du nématode à kyste de la pomme de terre (*Globodera pallida*) au Pérou. Sciences du Vivant [q-bio]. Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes, 2005. Français. NNT : 2005NSARC076 . tel-04225873

HAL Id: tel-04225873

<https://univ-angers.hal.science/tel-04225873>

Submitted on 3 Oct 2023

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

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



Distributed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

N° d'ordre : 2005-7

N° de série : C-76

THÈSE

Présentée devant
AGROCAMPUS RENNES

Pour Obtenir le grade de:
DOCTEUR DE L'AGROCAMPUS RENNES.

Mention: Biologie

Par

DAMIEN PICARD

GÉNÉTIQUE DES POPULATIONS ET PHYLOGÉOGRAPHIE DU NÉMATODE À KYSTE DE LA POMME DE TERRE (*Globodera pallida*) AU PÉROU

Unité mixte de Recherche I.N.R.A/Agrocampus Rennes,
Biologie des Organismes et des Populations appliquée à la Protection des Plantes, le Rheu
Laboratoire de Nématologie

École Doctorale Université de Rennes 1/Agrocampus Rennes: Vie-Agro-Santé

Soutenu le 22 Mars 2005 devant la commission d'examen

J. MALLARD

M. PHILLIPS

J. Y. RASPLUS

D. ESMENJAUD

E. PETIT

D. MUGNIÉRY

O. PLANTARD

Professeur

Professeur

Directeur de Recherche

Directeur de Recherche

Maître de Conférence

Directeur de Recherche

Chargé de Recherche

Président

Rapporteur

Rapporteur

Membre

Membre

Directeur de Thèse

Directeur de Thèse associé

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier Olivier Plantard pour s'être tant investi au cours de ma thèse, ainsi que dans ma formation scientifique. Olivier est l'une des rares personnes qui ont la générosité de donner pour les autres sans rien attendre en retour. Et pour moi, il n'a jamais compté le temps passé pour m'apporter son savoir. Pour ta participation capitale à l'écriture du manuscrit, pour les nombreux allers-retours des articles entre nos deux bureaux, pour ton investissement altruiste, pour m'avoir apporté une large part de mes connaissances scientifiques actuelles, pour ta patience, ta bonne humeur, tes rires allant jusqu'aux larmes et pour tous les bons moments passés ensemble, je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance et toute ma satisfaction de t'avoir eu comme mentor.

Ce travail de thèse a été réalisé à l'UMR BiO3P, au centre INRA du Rheu. Je remercie très vivement les directeurs, Messieurs Charles-Antoine Dedryver, Bernard Tivoli et Didier Andrivon de m'avoir accueilli et permis de conduire mon travail dans les meilleures conditions.

J'adresse mes remerciements à Messieurs Mark Phillips, Jean-Yves Rasplus, Jacques Mallard, Daniel Esmenjaud et Eric Petit pour le jugement qu'ils ont porté sur ce travail.

Les échanges scientifiques au cours des comités de pilotage de cette thèse m'ont été d'un apport certain dans la conduite des expérimentations et dans l'analyse des résultats. Je remercie donc Messieurs François Bonhomme, Jean-Pierre Hugot, Philippe Castagnone-Sereno, Jacques Mallard et Madame Claire Neema.

Je tiens à remercier tout particulièrement Didier Mugniéry, Eric Grenier et Sylvain Fournet pour tous nos échanges scientifiques, votre aide à l'écriture du manuscrit, aux présentations orales et pour votre grande disponibilité.

Sylvie Valette et Lucie Mieuzet, je vous remercie pour votre travail m'ayant permis d'acquérir une partie des données de ma thèse.

Je suis aussi particulièrement reconnaissant à toutes les personnes qui travaillent quotidiennement au bon fonctionnement du laboratoire de biologie moléculaire.

Manuel Plantegenest, merci pour ton coup de pouce.

Malgré les fortes tensions entre le gouvernement ivoirien et le gouvernement français ayant eu cours pendant ma thèse, les relations diplomatiques entre Abou et moi n'ont jamais connu d'ombrage. Comment décrire cette parfaite cohabitation dans ce bureau du portakabin, peut-être en relatant qu'elle a conduit à une amitié tellement balèze que même la distance qui va bientôt nous séparer aura bien du mal à estomper. Ce bureau a vu passer une jeune fille à la grâce ensorcelante et

au parfum salvateur. Abou et moi avons vécu ce moment avec le plus grand des plaisirs, en tout bien tout honneur. Laure nous a charmés par sa rhétorique portant au plus haut l'art oratoire. La bonne ambiance régnant au portakabin ne s'est pas limitée à notre bureau. Il m'est encore très agréable de songer à mes deux égéries du portakabin : j'avoue que la belle Flora au sourire envoûtant et ma Nanabelle au regard troublant (hein ! Abou) peuplent encore mes rêves les plus doux. Un joyeux bordel ambiant a été mené de main de maître par Sabine, Fabian, Christophe et Sébastien et leur départ a été regretté par tous et a laissé un vide. Je tiens aussi à saluer toutes les autres personnes que j'ai côtoyées avec plaisir dans ce portakabin, comme Florian, Morvan, Delphine, Josselin, Valérie, Marie...

Pendant ces trois ans et demi, j'ai vécu une belle ambiance de sympathie et de convivialité avec l'ensemble de l'équipe de nématologie. J'ai vécu avec beaucoup de gaieté les amicales conversations avec vous, Géraldine et Alexandra. Je vous souhaite beaucoup de bonheur pour la suite. Ces phrases me rappellent ce voyage à Rome qui est classé numéro 1 dans le top 10 des séminaires. J'ai passé un chouette moment avec vous en Italie, bien qu'aillant failli dormir dehors car confronté à un italien revêche qui refusait avec véhémence d'ouvrir la porte de l'appartement, qui n'était pourtant habité que par d'éminents chercheurs de l'INRA. Sylvain, MÔssieu MUGNIÉRY, Eric, Olivier, Laurent, Didier, Marie-Christine, Catherine, Lionel, Claudia, Sylvie, Magali, merci pour votre accueil chaleureux.

A toi Adrien, j'ouvre mon cœur pour te déclarer ma flamme. Tu es mon dieu grec, avec toi, j'en perds mon latin, poil aux mains. Sublimant l'humour, la gaîté et la franche rigolade, je pense qu'ensemble, nous en avons atteint le paroxysme. De dieu de dieu et tu vas être papa, ça me fait chaud au cœur. A la tienne Adrien, vis heureux avec ta petite famille et surtout ne perds jamais ton humour et ta grandiloquence (je te fais plein de bisous...). Aude, bon ça ne va pas être facile après cette déclaration d'amour. Ne pleure pas, non ne pleure pas tu as, tu as toujours de beaux yeux, ne pleure pas, non ne pleure pas tu m'as souvent rendu heureux, dis-moi Audinette ma thèse vient de s'achever, Adrien va s'en aller et toi tu vas rester, alors ne perds pas courage et prends un petit poisson, glisse-le entre tes jambes, il n'y a pas de raison, pour se tirer la langue, ne me regarde pas comme ça tout de travers, qui fait le premier pas, pour s'aimer à l'envers. Maga, tu es rayonnante, une vraie perle. El gringo Laurent de los Estados Unidos, I'm very proud to meet you Lorenzo. Frédéric-le-normal, avec toi c'est le pied, avec toi j'ai passé des instants dignes d'une randonnée dans le Cantal. Je décerne le ballon d'or à : GAËL (oooooh ! bravo, si si, toutes mes félicitations, j'y tiens j'y tiens, quel homme...). Virgil, fieffé coquin, c'est toi qui l'as eue, hein ! Je m'incline et te souhaite un joyeux mariage plein de grâce, pour votre progéniture je ne me fais pas de soucis elle sera obligatoirement une réussite esthétique. Je me demande seulement qui de vous ou d'Adrien-

Maga fera la plus jolie des jolies jeunes filles. Fabien Halkett, je t'ai toujours estimé comme le meilleur des thésards de BiO3P, alors félicitations pour être arrivé N°1 dans mon classement et bonne chance pour la suite mi amigo. Eduardo, Beatriz, Alexandra : viva España! Viva Italia!

Los tres meses en las Andes del Peru ont été un épisode fantastique de la thèse, une expérience inoubliable pour Pauline et moi. L'ensemble de l'échantillonnage réalisé dans ces montagnes grandioses a été un réel succès grâce à de nombreuses personnes qui nous ont aidés tout au long de notre périple. Monsieur MUGNIÉRY nous a accompagnés pendant les 15 premiers jours. Ses connaissances du pays et de la langue nous ont permis de nous adapter en douceur. Maria Scurrah nous a accueillis avec beaucoup de chaleur et de bienveillance. Maria a été la personne sans qui rien n'aurait été possible. Elle a notamment obtenu l'autorisation du gouvernement péruvien d'échantillonner et d'exporter les nématodes, ce qui n'est pas une mince affaire. Susana Chumbiauca nous a accompagnés dans le nord du pays. Son dévouement à notre cause et ses compétences ont fortement contribué à notre réussite. Par la suite, elle a suivi de Lima notre expédition avec attention et a préparé notre arrivée dans toutes les villes où nous nous sommes rendus. Mario 1 et Mario 2, nos épisodiques chauffeurs de choc nous ont permis de nous déplacer sans encombre et de façon efficace sur des « routes » chaotiques et parfois dangereuses. La SENASA est un organisme gouvernemental péruvien qui possède un réseau d'ingénieurs agronomes répartis dans tout le pays. Ces gens nous ont accompagnés dans tous les champs échantillonnés. Je tiens donc ici à les remercier toutes pour leurs compétences, leur dévouement et leur accueil amical. Pauline m'a bien plus qu'accompagné au Pérou. Elle a participé avec beaucoup de punch à ce travail parfois épuisant et m'a suppléé avec efficacité quand les aléas du voyage me clouaient au lit.

Maman, papa, belle-maman, beau-papa, Audrey, Rahim, Ulrich, Cynthia, Juliette, Romain et Marie, Sophie et Nico, votre amour a été un soutien permanent pour moi.

Pauline est la compagne de ma vie, le pilier de mon équilibre, mon petit poussin, mon capuchon. Ton aide efficace, ton indéfectible soutien et ton amour m'auront permis de mener à bien cette thèse.

Préambule : agronomie et évolution

Les nouvelles méthodes de lutte contre les bioagresseurs issues des biotechnologies (plantes génétiquement modifiées, sélection assistée par marqueur pour l'obtention de nouvelles variétés résistantes) ainsi que le contrôle biologique du parasite à l'aide d'organismes génétiquement modifiés ou non enrichissent l'arsenal disponible contre les bioagresseurs. Néanmoins, de par la capacité à évoluer des bioagresseurs, l'efficacité de ces méthodes est souvent de courte durée. Dès lors la biologie évolutive, en s'intéressant à l'impact de la libération dans l'environnement de tels organismes tant sur les nuisibles des cultures que sur le milieu naturel, constitue une approche indispensable (Roderick et Navajas 2003). En outre ce type de libération a souvent montré la nature imprévisible de tels organismes introduits. En Amérique du nord, 16% des espèces introduites (insecte phytophage) contre une plante adventice ont aussi attaqué des plantes sauvages endémiques (Hawkins et Marino 1997). Le potentiel évolutif des espèces introduites, des nuisibles et des autres espèces en interactions dans cet environnement cultural, déterminant le succès du contrôle du nuisible, peuvent être appréhendés par des outils génétiques à travers une approche populationnelle ou phylogéographique. Les résultats de ces études aideront les chercheurs à évaluer les risques associés à l'utilisation à grande échelle d'organismes issus des biotechnologies ou à des nouvelles pratiques agricoles, en particulier les changements évolutifs à long terme. De plus, l'introduction d'organismes pour limiter les intrants chimiques peut être considérée comme un champ d'expérimentation semi-naturel qui permettrait d'élargir nos connaissances fondamentales sur l'évolution des êtres vivants.

SOMMAIRE

Introduction générale	1
Chapitre I	
Introduction : cadre évolutif du parasite, contexte biologique et agronomique	5
1.1. De l'apparition des nématodes parasites des plantes à l'endoparasitisme : l'importance des données moléculaires dans la reconstruction de leur histoire.....	6
1.2. Principales caractéristiques biologiques pouvant influencer le patron génétique.....	11
1.2.1. Interactions fines entre le parasite et l'hôte, reproduction amphimictique et forme de conservation.....	11
1.2.2. Capacité de dispersion du nématode à kyste.....	13
1.3. La plante hôte et l'homme.....	16
1.3.1 Le contexte évolutif : la plante hôte (<i>Solanum sect. petota</i>).....	16
1.3.2. Le contexte agronomique et culturel.....	18
Chapitre II	
Description du fonctionnement génétique des populations de <i>Globodera pallida</i> dans son berceau d'origine (le Pérou) à partir d'un échantillonnage hiérarchisé	21
Article 1: Inbreeding and population structure of the potato cyst nematode (<i>Globodera pallida</i>) its native area (Peru).....	23
Chapitre III	
Patron d'« isolement par la distance » le long d'un transect de 1.500 km dans la cordillère des Andes et structuration génétique chez un organisme du sol de 500 micromètres	33
Article 2: Isolation by distance only above 50 km for a 500 µm long soil nematode.....	35
3.1. Abstract.....	35
3.2. Introduction.....	36
3.3. Materials and Methods.....	37
3.3.1. Sampling design, field collection of nematodes and DNA sample preparation.....	37
3.3.2. Population differentiation and IBD.....	39
3.3.3. Genetic model-based clustering.....	40
3.4. Results.....	41
3.4.1. Population differentiation and IBD.....	41
3.4.2. Genetic model-based clustering and hierarchical population structure.....	41
3.5. Discussion.....	46
3.5.1. No evidence of genetic differentiation for fields less than 50 km apart.....	46
3.5.2. Increasing genetic differentiation among fields with geographic distance above 50 km.....	47
3.5.3. What is a population?.....	47
References.....	49
Chapitre IV	
Une colonisation du sud vers le nord de la Cordillère Andine par le nématode à kyste de la pomme de terre au cours des temps géologiques suggère de multiples changements d'hôtes des espèces sauvages aux espèces cultivées	53
Article 3: A South-to-North colonisation of the Andean Cordillera by the potato cyst nematode during geological times suggests multiple host shifts from wild to cultivated potatoes.....	57
4.1. Introduction.....	58
4.2. Materials and Methods.....	59
4.3. Results.....	63
4.3.1. Phylogeographical pattern based on the cytochrome B sequences.....	63
4.3.2. Phylogeographical pattern based on the microsatellite loci.....	65
4.3.3. Comparison of the trees based on the mitochondrial and the nuclear markers.....	65
4.4. Discussion.....	66
References.....	71

Chapitre V

Origine et diversité génétique des populations du nématode à kyste de la pomme de terre introduites en Europe.....

Article 4: Origin and genetic diversity of European populations of <i>Globodera pallida</i> inferred from mitochondrial sequences and microsatellite loci.....	79
5.1. Introduction.....	82
5.2. Material and Method.....	83
5.2.1. Sampling and data collection.....	83
5.2.2. Data analysis.....	86
5.3. Results.....	86
5.3.1. Origin and genetic diversity of the European populations inferred from the cytB sequences.....	86
5.3.2. Origin and genetic diversity of the European populations inferred from the microsatellite loci.....	87
5.3.3. Genetic structure among European populations.....	90
5.3.4. Comparison of European <i>versus</i> Peruvian allelic richness.....	90
5.3.5. Insights on the origin of European populations from assignment methods.....	91
5.3.6. Comparison of European <i>versus</i> Peruvian inbreeding through analysis of Fis and departure from Hardy-Weinberg equilibrium.....	94
5.4. Discussion.....	94
5.4.1. Geographical origin of the European populations.....	94
5.4.2. Single or multiple introductions?.....	94
5.4.3. Which European population is the sister group of all other European populations?.....	96
5.4.4. Geographical Pattern among European populations.....	97
5.4.5. Comparison of inbreeding level in Europe and Peru.....	97
5.4.6. Conclusion and consequences for the control of <i>G. pallida</i>	98
References.....	100

Chapitre VI

Conclusion générale.....

6.1. Génétique des populations et Phylogéographie : les principaux résultats.....	107
6.1.1. Description du fonctionnement génétique des populations de <i>Globodera pallida</i> dans son berceau d'origine (le Pérou) à partir d'un échantillonnage hiérarchisé.....	107
6.1.2. Patron d'« isolement par la distance » le long d'un transect de 1.500 km dans la cordillère des Andes et structuration génétique chez un organisme du sol de 500 micromètres.....	108
6.1.3. Une colonisation du sud vers le nord de la Cordillère Andine par le nématode à kyste de la pomme de terre au cours des temps géologiques suggère de multiples changements d'hôtes des espèces sauvages aux espèces cultivées	112
6.1.4. Origine et diversité génétique des populations du nématode à kyste de la pomme de terre introduites en Europe.....	114
6.2. Interrelation entre le patron génétique et l'agronomie.....	115
6.2.1. Le transport de kystes par l'homme : mythe ou réalité ?.....	115
6.2.2. Apport de la thèse en agronomie.....	117
6.3. Perspectives.....	118
6.3.1. Consanguinité, flux génique et structure génétique.....	118
6.3.2. Co-évolution entre l'hôte et le parasite.....	119
6.3.3. Phylogéographie et systématique.....	120

Références bibliographiques.....

123

ANNEXE

Annexes 1 : Le Pérou, berceau d'origine du nématode de la pomme de terre.....	131
Annexes 2 : Génétique des populations de <i>Globodera pallida</i> dans son berceau d'origine (le Pérou) : consanguinité et fort flux de gènes.....	139
Annexes 3 : Orientation et datation de l'orogénèse des Andes induits par la phylogéographie de <i>Globodera pallida</i>.....	141
Annexes 4 : Listes des espèce du genre <i>Globodera</i>, du genre <i>Punctodera</i> et autre espèces citées dans la thèse.....	155
Annexes 5 : Tailles (axe Y) et fréquences (diamètre des cercles) des allèles microsatellites représentées à l'aide de graphiques bulles.....	159
Annexes 6 : Gène cytochrome b (Test de la saturation dans le jeu de donnée, Divergence nucléotidique et Séquences).....	171
Annexes 7 : Abréviation.....	183

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Contexte de la thèse

Le nématode *Globodera pallida* est un endoparasite des racines de la pomme de terre. Originaire des hauts plateaux Andins, comme les espèces de *Solanum* sauvages auxquelles il est inféodé depuis des millions d'années, on le trouve actuellement associé aux champs à diverses espèces de *Solanum* domestiquées au Pérou depuis 5.000 ans. Plus récemment, il a été introduit sur le vieux continent suite à l'importation de *Solanum tuberosum* sous-espèce *tuberosum*. Il peut y occasionner des pertes de rendement allant jusqu'à 50% et est classé comme parasite de quarantaine dans la plupart des pays du monde. L'utilisation de nématicides est progressivement abandonnée en Europe en raison de la toxicité de ces produits pour l'homme et l'environnement. La lutte variétale, reposant sur la recherche de gènes de résistance isolés à partir de *Solanum* sauvages péruviens est actuellement privilégiée. Néanmoins, ces gènes de résistance ont une efficacité variable suivant l'origine géographique des nématodes, attestant de la diversité de ces derniers. L'étroite association entre le nématode et sa plante hôte (manipulation de l'expression des cellules végétales par le nématode pour son développement), ainsi que l'existence de nombreux gènes de résistance dans diverses espèces de *Solanum* sauvages des hauts plateaux andins, suggèrent une longue évolution commune entre ces deux protagonistes dans leur berceau d'origine. Le Pérou constitue donc une zone d'étude cruciale pour appréhender le patron génétique du parasite. De par la longue histoire de l'association entre l'hôte et le parasite, la diversité génétique des populations du nématode y est en effet maximale.

Notre étude se place en amont de l'introduction en Europe de nouvelles variétés de pommes de terre résistant aux nématodes à kyste *G. pallida*. Elle vise à appréhender la diversité génétique, le flux génique, l'histoire et le potentiel évolutifs d'un nématode du sol dans son bassin d'origine et secondairement dans ses zones d'introduction. Par la suite, cette étude permettra de suivre les modifications de la composition génétique des populations et d'estimer leur potentiel évolutif lors de l'introduction d'un gène de résistance qui constitue une pression de sélection. Ainsi, les informations obtenues permettraient d'adapter des stratégies d'utilisation des gènes de résistance pour limiter leur contournement, mais aussi d'enrichir un modèle épidémiologique pour combattre le parasite.

Objectif de la thèse

Dans cet étude, nous avons eu recours à une approche évolutive (génétique des populations et phylogéographie). Jusqu'alors, tant en génétique des populations qu'en phylogéographie, peu d'études ont été réalisées chez les nématodes phytoparasites et plus généralement chez l'ensemble des nématodes. L'objectif de ce travail a été d'approfondir les connaissances sur la biologie des nématodes à kyste de la pomme de terre (mode de reproduction, capacité de dispersion) mais aussi les connaissances sur son histoire comme la localisation de son origine géographique et sa dispersion dans la Cordillère des Andes. Les résultats obtenus ont été aussi comparés au patron génétique de *G. pallida* dans une zone d'introduction (l'Europe) afin de déterminer l'origine géographique des populations introduites.

Après un premier chapitre introductif, cette thèse est articulée autour de quatre chapitres complémentaires. Dans un premier temps (chapitre II), nous nous sommes intéressés aux questions suivantes :

- ✓ À quelle échelle spatiale observe-t-on une unité panmictique ?
- ✓ Comment se distribue la variabilité génétique à différentes échelles spatiales ?
- ✓ Quel est le niveau de la structuration génétique des populations et quelle est l'importance des flux géniques ?

Pour répondre à ces questions, nous avons réalisé un échantillonnage hiérarchisé au Pérou à différentes échelles spatiales (parcelle, région et pays). Huit loci microsatellites (marqueurs neutres et codominants) ont été utilisés pour géotyper les individus.

Dans un second temps (Chapitre III), nous nous sommes intéressés aux limites géographiques d'une population. Nous avons abordé ce sujet central en génétique des populations, en se posant les questions suivantes :

- ✓ Les tailles et les fréquences des allèles sont-elles géographiquement distribuées aux hasards ou s'associent-elles (ou se corrèlent-elles) en fonction de leur distribution géographique (l'association la plus commune est une augmentation de la différenciation génétique en fonction de la distance géographique ce qui traduit un isolement par la distance) ?
- ✓ Quel est le niveau de structure génétique observé à l'aide d'un algorithme bayésien de regroupement entre individu ou entre groupe d'individus ?

Grâce à un échantillonnage de 360 parcelles le long d'un transect nord - sud dans le massif andin (cf. Annexe 1), nous avons pu choisir les parcelles à analyser pour obtenir un jeu de données adapté pour répondre à nos questions et ainsi compléter les données déjà analysées dans le chapitre II.

Dans un troisième temps (chapitre IV), nous avons cherché à retracer l'histoire de la dispersion des populations (phylogéographie) dans le bassin d'origine de *G. pallida*. En plus des données analysées dans les deux chapitres précédents, la séquence du gène cytochrome b (ADN mitochondriale) a été utilisée pour géotyper des individus choisis parmi les 360 échantillons du transect.

Dans un dernier temps (chapitre V), nous avons confronté les données obtenues en génétique des populations et en phylogéographie dans le berceau d'origine de *G. pallida* avec de nouvelles données obtenues par ailleurs au sein de l'équipe après analyse des populations d'une zone d'introduction (six pays européens). La comparaison des données obtenues en Europe et au Pérou, nous permettra d'estimer les modifications de la composition génétique des populations consécutive à une ou plusieurs introductions, d'estimer la diversité génétique introduite en Europe et de déterminer l'origine des populations introduites en Europe.

Glossaire :

Allèle : une des formes d'un gène dont la séquence d'ADN diffère dans la position d'au moins une paire de base.

Flux génique : le mouvement des gènes entre les populations. Cela nécessite la migration des individus d'une population à une autre et la réussite subséquente de la reproduction.

Hétérozygotie : un individu diploïde est considéré hétérozygote si les deux copies du même gène (allèles) sont différents.

Homozygotie : un individu diploïde est considéré homozygote si les deux copies d'un même gène sont identiques.

Phylogénèse : l'histoire évolutionniste d'un groupe d'organismes typiquement représentée par un arbre à bifurcations.

Phylogénie : l'étude des affinités évolutives de groupes d'organismes.

Phylogéographie : l'étude de la répartition géographique de la variation génétique soulignant les relations évolutives (phylogénétiques) entre les populations.

CHAPITRE I

Introduction : cadre évolutif du parasite, contexte biologique et agronomique

Une bibliographie sur différentes thématiques en lien avec la thèse est présentée dans ce chapitre, afin d'établir un état des lieux des connaissances antérieures à la thèse et de développer des sujets discutés dans les chapitres qui suivront. Les points abordés sont le cycle parasitaire, la capacité de dispersion du parasite, la systématique des nématodes, la systématique de l'hôte et l'histoire de la culture de la pomme de terre dans les Andes, éléments essentiels et indispensables pour une approche de génétique des populations et de phylogéographie.

1.1. De l'apparition des nématodes parasites des plantes à l'endoparasitisme : l'importance des données moléculaires dans la reconstruction de leur histoire

La phylogéographie de *Globodera pallida* s'insère dans l'histoire du phylum Nematoda (figure 1.1) et particulièrement dans celles des nématodes endoparasites de plantes. Nous allons donc retracer l'histoire du parasitisme des plantes de ce phylum en mettant en lumière l'importance des données moléculaires (utilisées de façon privilégiée dans la thèse) dans sa reconstruction. La difficulté à établir une horloge moléculaire fiable dans le phylum et par conséquent dans le genre *Globodera* sera abordée.

La classification actuellement acceptée pour le phylum Nematoda (figure 1.1) est établie à partir de la phylogénie moléculaire basée sur le séquençage de la totalité du gène 18S de l'ADN ribosomique (Blaxter *et al.* 1998 ; Dorris *et al.* 1999 ; De Ley et Blaxter 2002). La précédente classification, basée exclusivement sur des caractères morphologiques, en a été profondément remaniée et ce, bien que les phylogénies moléculaires possèdent évidemment leurs propres limites (l'attraction des longues branches, la saturation due à des substitutions multiples au même site et les problèmes liés à l'alignement des séquences). Au sein du phylum Nematoda, la grande homogénéité morphologique des taxa rend difficile une résolution robuste de la phylogénie des nématodes basée sur ces seuls caractères (Dorris *et al.* 1999 ; Baldwin *et al.* 2004). À la lumière des données moléculaires, certains caractères morphologiques des nématodes se sont avérés similaires par convergence due à des pressions de sélection fonctionnelle dans des lignées différentes, ce qui peut avoir entraîné la formation de groupe paraphylétique ou polyphylétique (Baldwin *et al.* 2004). Par exemple, deux ordres composés de parasites de plantes (Dorylaimida et Triplonchida) qui étaient considérés comme formant un groupe monophylétique sur la base des données morphologiques se sont finalement avérés polyphylétiques sur la base des données moléculaires (figure 1.1). À un rang taxonomique inférieur, l'analyse morphologique ne permet pas de discriminer certaines espèces entre elles. En effet, *Caenorhabditis elegans* et *C. briggsae* sont deux espèces morphologiquement semblables qui pourtant divergent depuis approximativement de 23 à 120 millions d'années (Prasad

et Baillie 1989 ; Heschl et Baillie 1990 ; Lee *et al.* 1992 ; Kennedy *et al.* 1993 ; Thacker *et al.* 1999 ; Coghlan et Wolfe 2002). De même au sein du genre *Globodera*, il est difficile de discriminer les espèces entre elles sans l'aide d'un outil moléculaire.

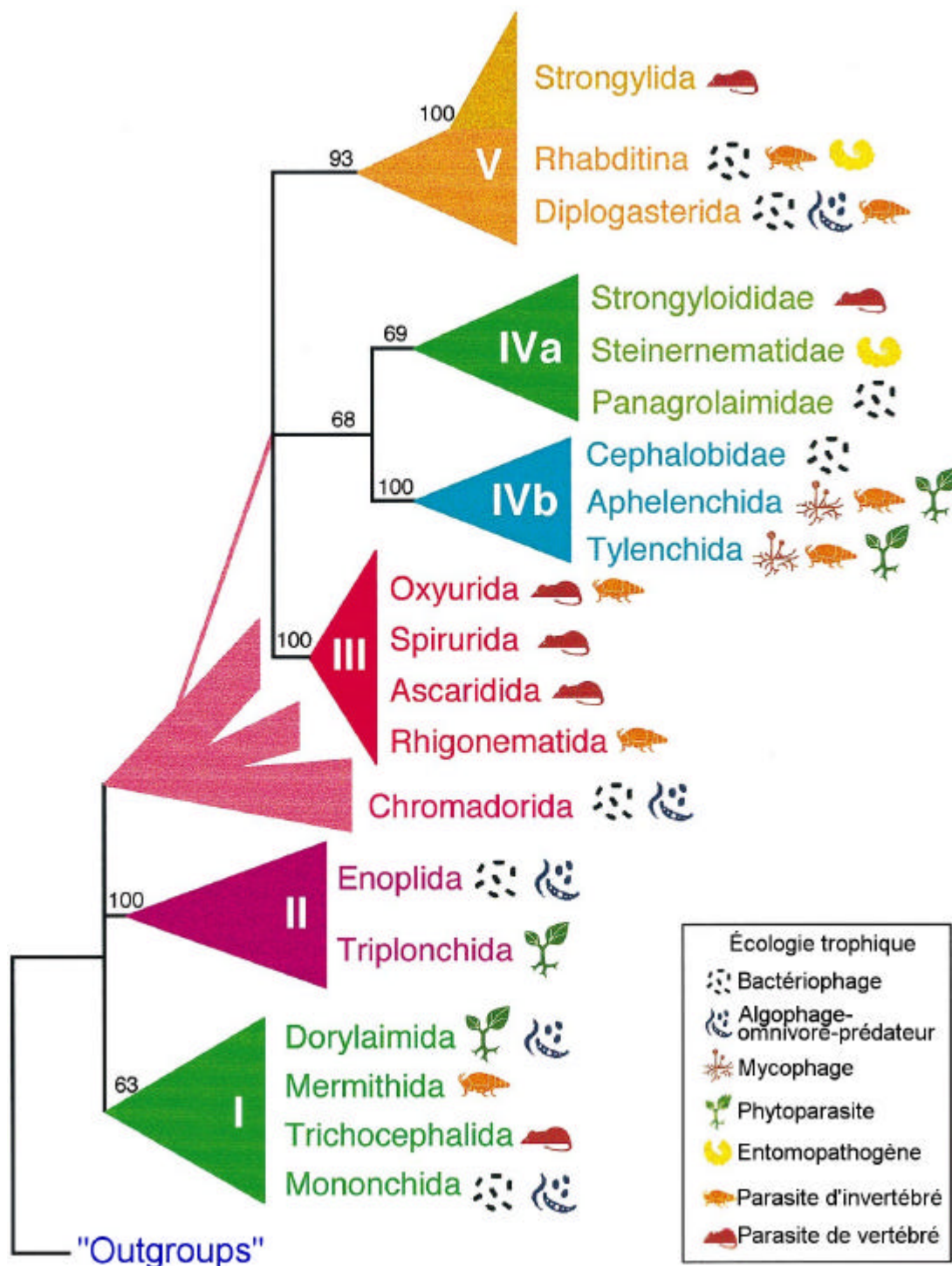


Figure 1.1 : Arbre phylogénétique du phylum Nematoda obtenu avec le gène 18S (d'après Dorris *et al.* 1999). Les nombres au dessus des branches indiquent la valeur de « bootstrap ». Cinq clades majeurs sont identifiés et numérotés de I à V. Les Chromadorida sont paraphylétiques et leur relation avec les Secernentea (clade III, IV et V) reste incertaine.

Glossaire :

Apomorphe : Qualifie, dans une séquence de transformations évolutives d'un caractère, l'état dérivé d'un état ancestral. On dit aussi état apomorphe, ou, par extension caractère apomorphe ou encore caractère dérivé.

Clade : Vient du grec *clados* qui signifie branche. Taxon* strictement monophylétique*, c'est-à-dire contenant un ancêtre et tous ses descendants.

Convergence : Ressemblance apparue indépendamment dans différents taxons*, par conséquent non héritée de l'espèce ancestrale à ces taxons. Une convergence apparue chez des taxons proches parents est appelée parallélisme*. La convergence est un cas particulier de l'homoplasie*.

Homoplasie : Similarité chez une ou plusieurs espèces, d'organes, de parties d'organes, ou de séquences d'ADN ou de protéines, lorsque l'on peut présumer que cette correspondance ne provient pas de l'héritage d'un ancêtre commun. On distingue plusieurs cas d'homoplasies : l'analogie, la convergence*, le parallélisme*, la réversion. Remarque : Dans le cas des caractères moléculaires, l'homoplasie n'est souvent pas détectable a priori et elle est révélée par l'arbre le plus parcimonieux. Dans le cas des caractères morphologiques, l'analyse fine des caractères et de leur homologie primaire permet plus souvent de détecter des homoplasies. Comme dans le cas précédent, celles qui n'auront pas été décelées seront révélées par l'arbre le plus parcimonieux.

Horloge moléculaire (hypothèse de l') : Hypothèse selon laquelle les molécules d'une même classe fonctionnelle évoluent régulièrement dans le temps et à un rythme égal dans différentes lignées. Ainsi la quantité des différences moléculaires constatées de nos jours dans des séquences homologues d'espèces distinctes peut être utilisée pour estimer le temps écoulé depuis le dernier ancêtre commun à ces deux espèces (ou temps de divergence).

Monophylétique (groupe) : En Systématique phylogénétique, groupe qui comprend une espèce ancestrale et tous ses descendants. Un groupe monophylétique est défini par au moins une synapomorphie*. On dit aussi d'un groupe monophylétique qu'il est un clade*.

Parallélisme : Ressemblance apparue indépendamment dans différents taxons* proches parents. Le parallélisme est un cas particulier de la convergence*.

Paraphylétique (groupe) : En Systématique phylogénétique, groupe qui comprend une espèce ancestrale, et une partie seulement de ses descendants. Un groupe paraphylétique est défini par au moins une symplesiomorphie* ou une absence de caractère.

Plésiomorphe : Se dit de l'état ancestral d'un caractère. Les adjectifs ancestral ou primitif sont synonymes.

Polyphylétique (groupe) : En Systématique phylogénétique, groupe qui contient un certain nombre d'espèces ou de taxons*, mais ne contient pas l'ancêtre commun à tous. En d'autres termes, un groupe polyphylétique dérive de deux ou plusieurs espèces ancestrales. Un groupe polyphylétique est défini par au moins une homoplasie*.

Taxon : Ensemble des organismes reconnus et définis dans chacune des catégories de la classification biologique hiérarchisée. En d'autres termes : contenu concret d'une catégorie. Exemple : *Canis lupus*, le Loup, est un taxon de rang spécifique (catégorie : espèce) ; les canidés (*Chien*, *Loup*, *Renard* .) constituent un taxon de rang familial (catégorie : famille).

Symplesiomorphe (caractère) : Caractère plésiomorphe* présent chez deux ou plusieurs taxons.

Synapomorphe (caractère) : Caractère apomorphe* partagé par deux ou plusieurs taxons*.

L'homogénéité morphologique observée chez les nématodes est étonnante de par leur longue évolution et leur importante diversité (Dorris *et al.* 1999). En effet, le phylum Nematoda serait probablement apparu au début du Cambrien vers moins 550 millions d'années (Ayala *et al.* 1998 ; Rodriguez-Trelles *et al.* 2002). Les données moléculaires et paléontologiques suggèrent que les plantes terrestres sont apparues depuis 425 à 490 millions d'années (Sanderson 2003). Les nématodes sont probablement à l'origine des organismes libres, leur coexistence dans le sol avec les plantes pendant une très longue période leur a permis d'exploiter en tant que parasite cette nouvelle ressource. Ce parasitisme des plantes semble être apparu de façon indépendante à au moins trois reprises au cours de l'évolution (l'ordre des Dorylaimida, des Triplonchida et des Tylenchida ; figure 1.1 ; Blaxter *et al.* 1998). L'endoparasitisme sédentaire des plantes est apparu chez les Tylenchida, indépendamment dans la sous-famille des Meloidogyninae avec les nématodes à galles

et dans la sous-famille des Heteroderinae avec les nématodes à kystes (Baldwin *et al.* 2004). La distribution mondiale des espèces de la sous-famille des Heteroderinae suggère que les ancêtres de ce groupe étaient présents à l'époque de la Pangée (Ferris 1979), donc il y a au moins 185 millions d'années (Veevers 2004). Cependant, l'absence de fossile limite la fiabilité des estimations temporelles et du calibrage d'une horloge moléculaire dans le phylum [Il faut noter l'existence de quelques nématodes fossiles (entomopathogène) conservés dans l'ambre : le plus ancien provient du Crétacé (Poinar et Poinar 2003)].

Chez les Heteroderinae, la phylogénie obtenue avec les séquences d'ITS « internal transcribed spacers » (Subbotin *et al.* 2001) ne permet pas de résoudre les relations phylogénétiques entre les espèces du genre *Globodera* et celles du genre le plus proche de *Globodera* : *Punctodera* (figure 1.2 ; Subbotin *et al.* 2001). En effet, on observe une trifurcation entre trois clades : les *Globodera* parasitant les Solanacées (Amérique), les *Globodera* parasitant les Astéracées (Eurasie) et les *Punctodera* parasitant les Poacées. Cependant, les espèces du genre *Globodera* (cf. Annexe 4) sont morphologiquement bien différenciées des espèces du genre *Punctodera* (Luc *et al.* 1988 ; forme du cône vulvaire, forme du kyste...). La systématique de ces deux genres est en cours de révision. Jusqu'alors, l'homogénéité morphologique au sein du genre *Globodera* a rendu difficile la détermination des relations phylogénétiques de ces espèces. De plus, les efforts de description et d'identification des espèces du genre *Globodera* se sont portés quasi-exclusivement sur des espèces d'intérêt agronomique. La répartition géographique de nombreuses espèces n'est connue qu'à travers une prospection dans des parcelles cultivées. En dehors des parasites de plantes cultivées dans le genre *Globodera* et plus largement dans la famille des Heteroderinae, beaucoup d'espèces ont été décrites à partir de peu d'individus et n'ont parfois aucun hôte connu ; quant à leur répartition géographique, elle se limite souvent à une unique localité (*G. leptonepia*, *G. zelandica*...). Une prospection des espèces du genre *Globodera* parasitant des plantes sauvages reste donc à faire. Toutefois, les espèces inféodées aux solanacées peuvent être considérées comme originaires des deux Amériques (figure 1.3). Ils forment un clade monophylétique. Ces espèces américaines se divisent en deux clades monophylétiques regroupant *G. rostochiensis* et *G. tabacum* d'un côté et *G. pallida* et *G. mexicana* de l'autre [sur la base de données personnelles et de l'étude de Subbotin *et al.* (2000) ; figure 1.2]. Dans le berceau d'origine (la Cordillère des Andes) *G. pallida* se distribue plus au nord et *G. rostochiensis* plus au sud avec une zone de sympatrie vers le lac Titicaca (Evans et Stone 1977 ; figure 1.3).

Le premier signalement du nématode à kyste de la pomme de terre est de Kühn (1881), qui l'identifie comme le nématode à kyste de la betterave (*Heterodera schachtii*). Wollenweber (1923) est le premier à distinguer le nématode à kyste de la pomme de terre de celui de la betterave. Il le nommera *Heterodera rostochiensis* à partir d'individus provenant de Rostock (Allemagne). Une seconde espèce (*H. pallida*) a été décrite par Stone (1972) créant le sous-genre *Globodera* que

Behrens (1975) élèvera au rang de genre. Jusqu'en 1972, ces deux espèces étaient donc confondues. Comme les caractères morphologiques permettant l'identification de chaque espèce sont ténus, une confusion restait possible jusqu'à l'établissement d'une identification moléculaire spécifique (Thierry et Mugniéry 1996). Le travail rapporté dans cette thèse permet d'affiner encore plus la systématique de ce groupe en s'intéressant à la variabilité intra-spécifique de *G. pallida*.

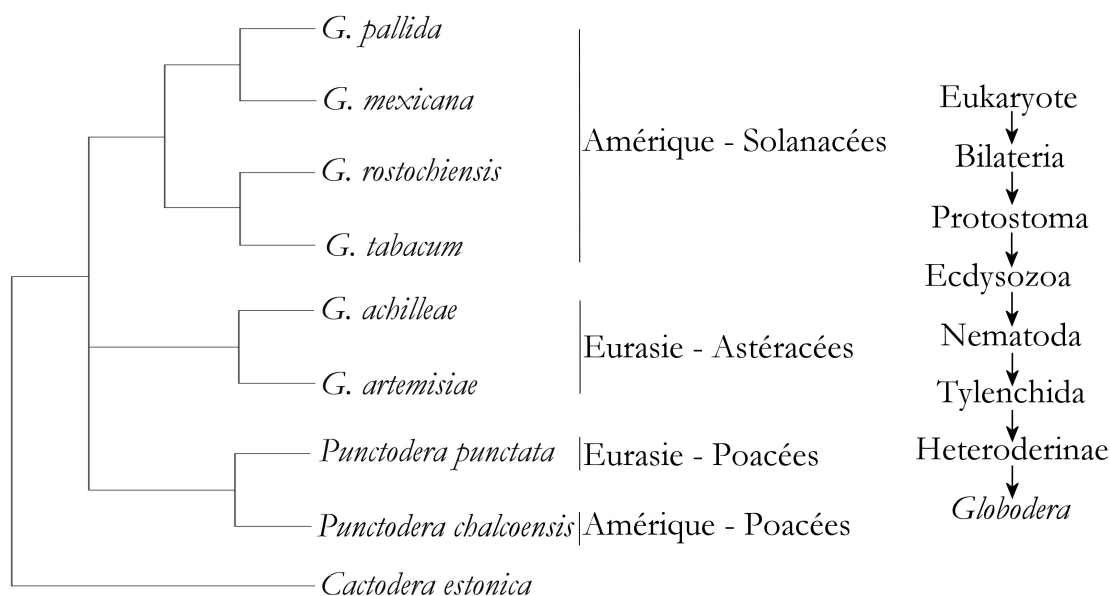


Figure 1.2 : (A) Synthèse schématique des relations phylogéniques entre des espèces du genre *Globodera* et *Punctodera* séquencées avec l'ITS ou le gène cytochrome b (d'après Subbotin *et al.* 2000 et données personnelles) ; (B) Rang taxonomique conduisant au genre *Globodera* (du règne au genre).

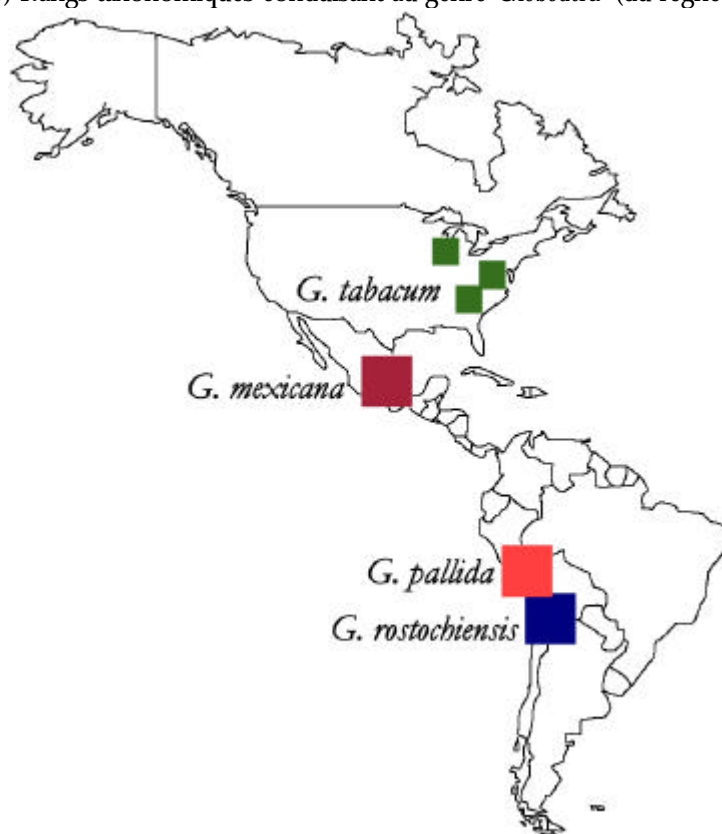


Figure 1.3 : Distribution géographique des espèces américaines de *Globodera* selon leur lieu probable d'origine. Toutefois, ces espèces ont été échantillonnées essentiellement en zone de culture et leur distribution sur des plantes sauvages reste inconnue.

1.2. Principales caractéristiques biologiques pouvant influencer le patron génétique

G. pallida est un parasite obligatoire, dont le cycle se déroule principalement dans la racine des pommes de terre. Afin d'appréhender les éléments de la biologie de ce parasite pouvant influencer la structuration génétique de ses populations, il nous faut d'abord décrire son cycle parasitaire et sa capacité de dispersion. Pour estimer la capacité de dispersion de *G. pallida*, nous décrirons des études sur la capacité de dispersion des organismes du sol. Comme ces études sont peu nombreuses, nous les aborderons de façon quasiment exhaustive.

1.2.1. Interactions fines entre le parasite et l'hôte, reproduction amphimictique et forme de conservation

Comme chez tous des nématodes, *G. pallida* a quatre stades juvéniles et un stade adulte (figure 1.4). Le second stade juvénile (J2) éclot de l'œuf, stimulé par des substances chimiques émanant de la racine et particulièrement de la zone d'élongation (Rawsthorne et Brodie 1986). Les exsudats radiculaires de la pomme de terre peuvent provoquer plus de 80% d'éclosion (Fenwick 1949). Il est attiré jusqu'à la racine par le gradient de ces substances chimiques, probablement capté par les amphides, organes sensoriels paires situés sur la tête. Ces stimulations sont spécifiques des plantes de la famille des *Solanaceae*. Des tests en laboratoire ont montré que *G. pallida* et *G. rostochiensis* peuvent parasiter une gamme d'hôte réduite aux *Solanum* tubéreux sauvages et cultivés, ainsi que *Lycopersicon esculentum* (la tomate).

Le nématode pénètre dans la racine essentiellement grâce à l'action mécanique de son stylet et migre de manière intracellulaire dans le cortex. Au niveau du cylindre central, il s'immobilise et perce la paroi d'une cellule cible unique. Les sécrétions des glandes œsophagiennes sont injectées dans la cellule. Une interaction spécifique plante-parasite induit la formation d'un large syncytium par rupture des parois des cellules adjacentes (Gheysen et Fenoll 2002). Cette structure métaboliquement très active joue le rôle de site nourricier. Le nématode reste au niveau de ce site jusqu'à la fin de son développement qui peut durer trois mois dans les conditions naturelles (Jones et Northcote 1972). Si les interactions entre l'hôte et le parasite ne sont pas optimales, les qualités nutritives insuffisantes du syncytium entraînent alors un arrêt et un retard du développement et/ou une masculinisation. En fonction de leur capacité à induire et maintenir dans leur plante hôte un syncytium de taille suffisante pour leur nutrition, les juvéniles évoluent en mâles ou en femelles. La

détermination du sexe femelle se fait dans un milieu riche en nutriments tandis que des conditions de stress alimentaire conduisent à la formation de mâles (Trudgill 1967). La femelle adulte a une forme sphérique et fait saillie à la surface de la racine (figure 1.4). Le mâle est vermiforme (~ 1 mm) et migre à l'extérieur de la racine pour féconder les femelles (reproduction amphimictique). Par la suite, la femelle meurt, sa cuticule se durcit, devient brune et l'ensemble donne un kyste contenant jusqu'à mille œufs ou plus (figure 1.5). Ce kyste est la forme de conservation de l'espèce. Il permet aux œufs de rester viables plus de dix ans. Même si, au fil des années le nombre d'œufs viables décroît.

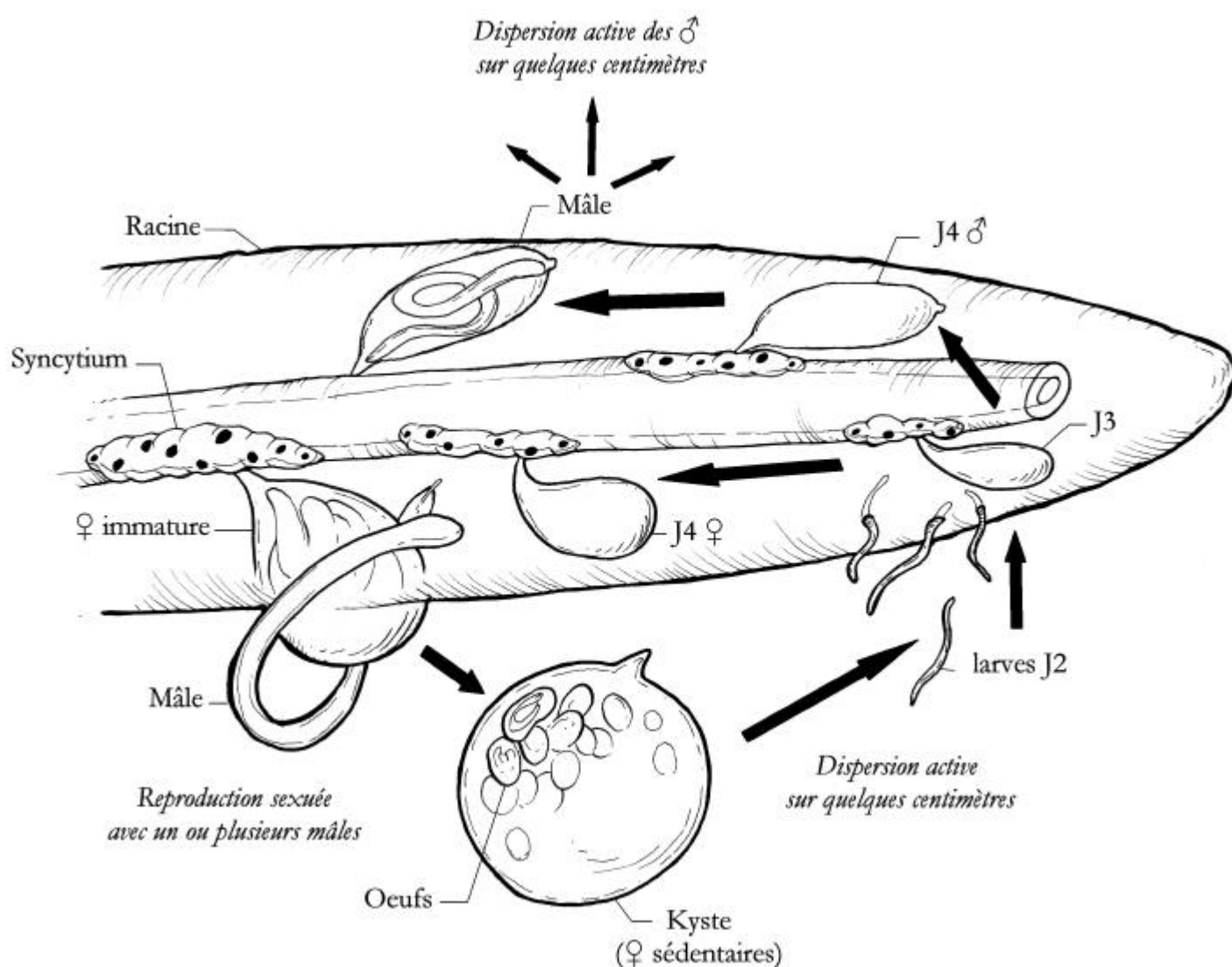


Figure 1.4 : Cycle parasitaire du nématode à kyste de la pomme de terre (dessin original de Pauline Casters-Picard).



Figure 1.5 : Kystes (~ 0,5 mm de diamètre) de *Globodera pallida* flottant dans l'acétone au niveau du goulot d'un erlenmeyer (dernière étape extraction des kystes du sol).

1.2.2. Capacité de dispersion du nématode à kyste

Le nématode à kyste peut se disperser activement lors de deux phases de son cycle (le stade mâle et le stade J2 ; figure 1.4). Cependant, cette dispersion active est très limitée dans le temps et dans l'espace, puisque les deux phases libres ont une durée de vie limitée à quelques jours et se déplacent uniquement dans la phase aqueuse du sol par des mouvements locomoteurs sinusoïdaux (Crofton 1971). Dès lors ces stades se déplacent tout au plus de quelques centimètres.

Pour ces raisons, la communauté scientifique pensait que les flux géniques de ce parasite du sol étaient négligeables (Bakker *et al.* 1993 ; Blok *et al.* 1997a ; Folkertsma *et al.* 2001 ; Bakker 2002). Des études sur différents organismes telluriques (voir ci-dessous) mettent en évidence qu'à longue distance, c'est la dispersion passive et non la dispersion active qui joue un rôle prépondérant dans la dissémination. Concernant les nématodes à kyste, on estimait que la dispersion passive était trop faible pour induire, à partir de quelques kystes, un flux génique conséquent entre parcelles de part les effectifs considérables au sein d'une parcelle cultivée en pomme de terre (jusqu'à dix milliards kystes par hectare ou sept kystes par gramme de sol ; Franco 1977). Des études sur la microfaune libre dans le sol révèlent des capacités importantes de dispersion passive à longue distance. Par exemple, chez deux espèces de collemboles (*Gomphiocephalus hodgoni* et *Orchesella cincta*), d'importants flux de gènes sur des distances supérieures à plusieurs kilomètres sont observés (Stevens et Hogg 2003 ; van der Wurff *et al.* 2003). Finlay (2002) généralise l'hypothèse d'une possible dissémination

à l'échelle mondiale à tous les organismes eucaryotes libres ayant une taille inférieure à 2 mm (pour mémoire le diamètre d'un kyste est de l'ordre de 0,5 mm). Des phénomènes semblables ont été observés aussi pour des nématodes. Lors d'une expérience originale menée par Wardle *et al.* (2003), des paniers remplis d'humus vierge de tout être vivant, sont disposés sur la canopée de la forêt tropicale de Nouvelle-Zélande. Six mois plus tard, les auteurs s'aperçoivent que de nombreux nématodes (bactériophages, mycophages, omnivores et prédateurs d'autres nématodes) ont colonisé ce milieu. Pour le nématode libre du sol *Caenorhabditis elegans*, la capacité à se disperser passivement atteint de telles proportions qu'elle empêche une structuration génétique entre la France, l'Allemagne, la Grande Bretagne, l'Australie, le Canada et les États-Unis d'Amérique (Koch *et al.* 2000).

Les nématodes à kystes ne sont pas des organismes libres du sol et doivent nécessairement rencontrer une plante hôte pour se développer, ce qui limite évidemment leur potentiel d'une dissémination effective (c'est-à-dire d'une dissémination suivie d'une reproduction). Cependant, en plus de sa taille, le kyste possède d'autres atouts pour se disperser de façon efficace : les œufs dans un kyste peuvent survivre plus de 10 ans et un seul kyste transporte suffisamment d'individus (jusqu'à 1.000 œufs par kyste) pour fonder une nouvelle population.

De nombreux facteurs abiotiques et biotiques permettent une dispersion passive des nématodes. Une étude a été menée sur la dissémination éolienne des nématodes dans le bassin arachidier du Sénégal en piégeant le sable et les poussières dans des pots affleurant la surface du sol (Baujard et Martiny 1994). De nombreux nématodes libres du sol dont certains en état d'anhydrobiose (figure 1.6), ainsi que des nématodes phytoparasites (ordre des Tylenchida et ordre de Dorylaimida) ont été piégés. Ces nématodes transportés par le vent conservent leurs facultés biologiques de reproduction malgré les stress subis. White (1953) décrit qu'à la suite d'une tempête, des kystes contenant des J2 viables ont été récupérés sur trois assiettes disposées à un mètre du sol près d'un champ de pomme de terre moyennement contaminé (8 kystes pour 25 grammes de sol) par *Globodera rostochiensis*. Bien qu'aucune étude n'ait été menée sur l'eau de ruissellement, il est probable que celle-ci joue aussi un rôle dans la dissémination des nématodes. Les animaux sont aussi un des facteurs de dispersion, en déplaçant de la terre contaminée, mais aussi en transportant des nématodes dans leur tube digestif. En effet, des kystes contenant des J2 viables ont été retrouvés dans des déjections d'oiseaux et de rongeurs (Norton et Niblack 1991 ; Epps 1971).



Figure 1.6 : Nématode libre (*Scutellonema cavenessi*) en état d'anhydrobiose, collé sur une particule de sable (d'après Baujard et Martiny 1994).

L'homme contribue aussi à la dispersion passive des kystes. Tout d'abord, la culture de la pomme de terre augmente considérablement les effectifs du nématode parasite et les surfaces de sol contaminé ce qui, par conséquent, accroît la quantité de kystes pouvant être dispersée par les animaux, l'eau de ruissellement ou le vent (surtout dans les parcelles où la terre reste à nu entre deux cultures). Ensuite, l'homme peut être plus directement un facteur de dissémination. En effet, à l'échelle d'une exploitation, différentes pratiques agricoles peuvent être incriminées telles que le travail de la terre (Marshall et Brain 1999), le drainage de parcelles ou le déplacement d'outils agricoles souillés. À une échelle plus large, le transport de tubercules associés à de la terre contaminée est une voie de dissémination possible bien qu'actuellement des mesures de quarantaine (prises dans la plupart des pays du monde) doivent limiter son impact. Toutefois, à l'intérieur du Pérou, les services phytosanitaires ne pratiquent aucun contrôle sur *G. pallida* ou *G. rostochiensis*.

Nous terminerons cette partie consacrée à la capacité de dispersion des nématodes avec des travaux menés au sein de l'équipe dans le nord de la France sur un autre nématode à kyste, *Heterodera schachtii*, le nématode de la betterave. Les résultats obtenus montrent une faible différenciation génétique, entre des parcelles séparées jusqu'à 175 kilomètres ce qui illustre la forte capacité de dissémination des kystes dans un contexte agronomique (Plantard et Porte, 2004). Néanmoins, il faut noter que l'épandage en champ des rejets contaminés de sucrerie favorise considérablement la dispersion des kystes.

1.3. La plante hôte et l'homme

1.3.1 Le contexte évolutif : la plante hôte (*Solanum* sect. *petota*)

Les interactions fines existant entre l'hôte et le parasite (paragraphe 1.2.1), ainsi que leur longue histoire commune soulignent l'intérêt qu'il y a à retracer l'histoire des pommes de terre sauvages pour mieux comprendre celle de son parasite.

Le Genre *Solanum* est composé d'approximativement 1400 espèces réparties à travers le monde (Kellogg 1998). L'un des principaux groupes de ce genre est la section *Petota* regroupant les pommes de terre sauvages et cultivées. La section *Petota* composée uniquement de plantes tubéreuses est associée à trois autres sections non tubéreuses phylogénétiquement proches : *Lycopersicum* (tomate), *Juglandifolium* et *Etuberosum* (Spooner et Hijmans 2001). Ces quatre sections sont réparties sur les deux Amériques. La distribution des 225 espèces (Hawkes 1990) de la section *Petota* s'étend du sud-ouest des États-Unis jusqu'au sud du Chili (figure 1.7). La distribution du nombre d'espèces n'est pas uniforme. Il existe deux centres de biodiversité majeurs. Le principal se situe au niveau des hautes altitudes entre les 10^{ème} et 20^{ème} degrés de latitude sud englobant le sud du Pérou et la Bolivie (figure 1.7). Le second, de moindre importance, se situe au cœur du Mexique (Hijmans et Spooner 2001).

La section *Petota* se divise en 21 séries dont la plus importante est la série *Tuberosa* (30 espèces) comprenant le complexe *Solanum brevicaule* d'où sont issues les neuf espèces et sous-espèces de pommes de terre cultivées (Spooner *et al.* 1999 ; figure 1.8). Mais, la systématique des pommes de terre sauvages diffère, à tous les niveaux taxonomiques (séries, espèces et sous-espèces ou variétés), d'un taxonomiste à l'autre. La systématique de ce groupe apparaît complexe et n'est toujours pas résolue, malgré les efforts de nombreux systématiciens pour ces plantes d'intérêt agronomique. Compte tenu des possibilités d'échanges génétiques entre les espèces et des faibles différences qui existent entre les génomes, il semble que la diversification soit plus la conséquence d'un isolement éco-géographique que de barrières cytogénétiques (Rossignol et Rousselle-Bourgeois 1996). Le complexe *Solanum brevicaule* illustre la complexité de la systématique de cette section. En effet, il existe de nombreux échanges génétiques entre les espèces du complexe, notamment entre le compartiment cultivé et le compartiment sauvage, avec des retours probables d'espèces cultivées à l'état sauvage. Spooner *et al.* (1999) se pose même la question de savoir s'il est possible de résoudre la systématique du complexe. Malgré tout, Hawkes (1990) propose une hypothèse pour l'origine des espèces cultivées (figure 1.8).

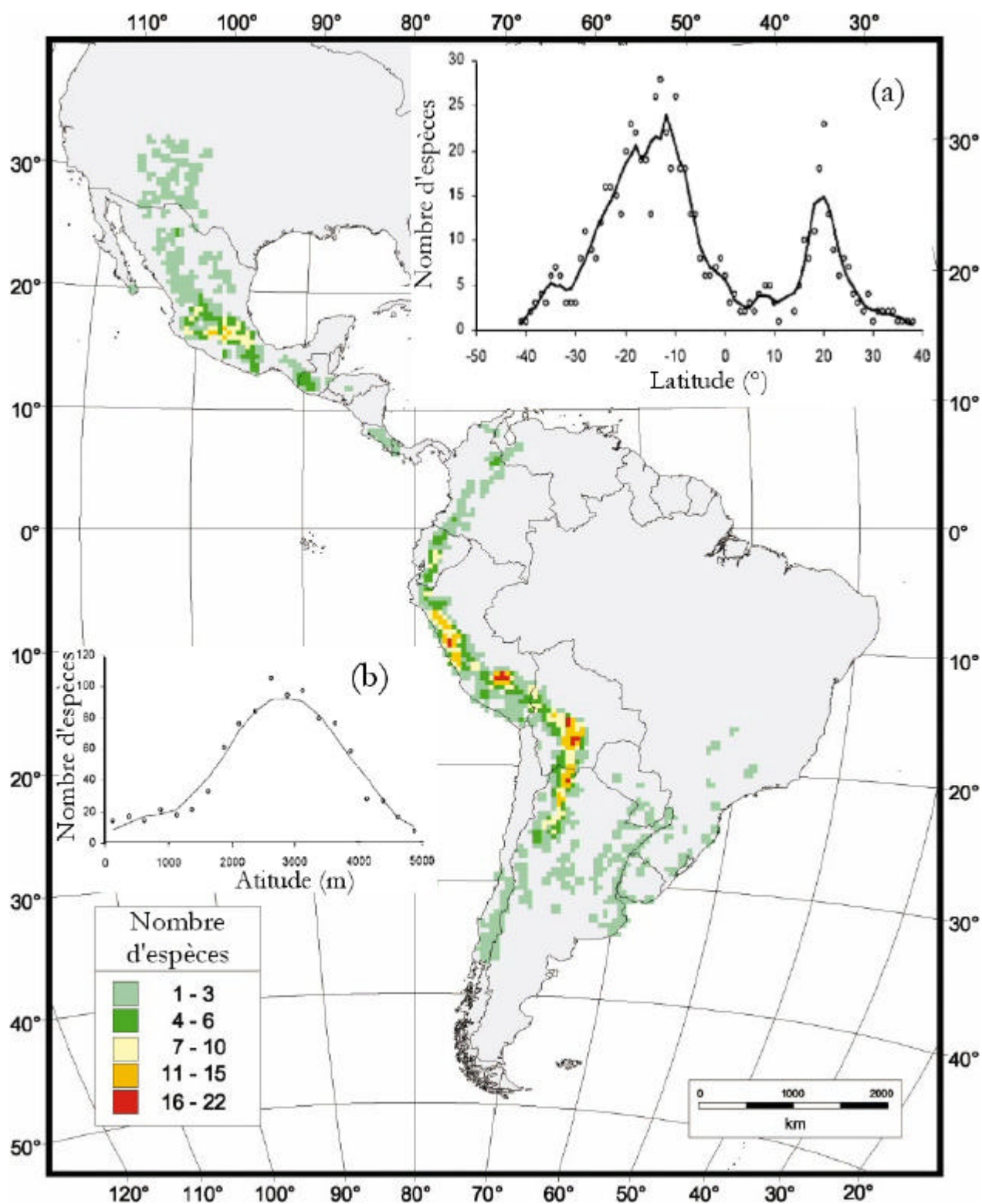


Figure 1.7 : Carte de la distribution du nombre d'espèces de *Solanum* sect. *petota* ; (a) répartition du nombre d'espèces en fonction de la latitude, (b) en fonction de l'altitude (d'après Hijmans et Spooner 2001).

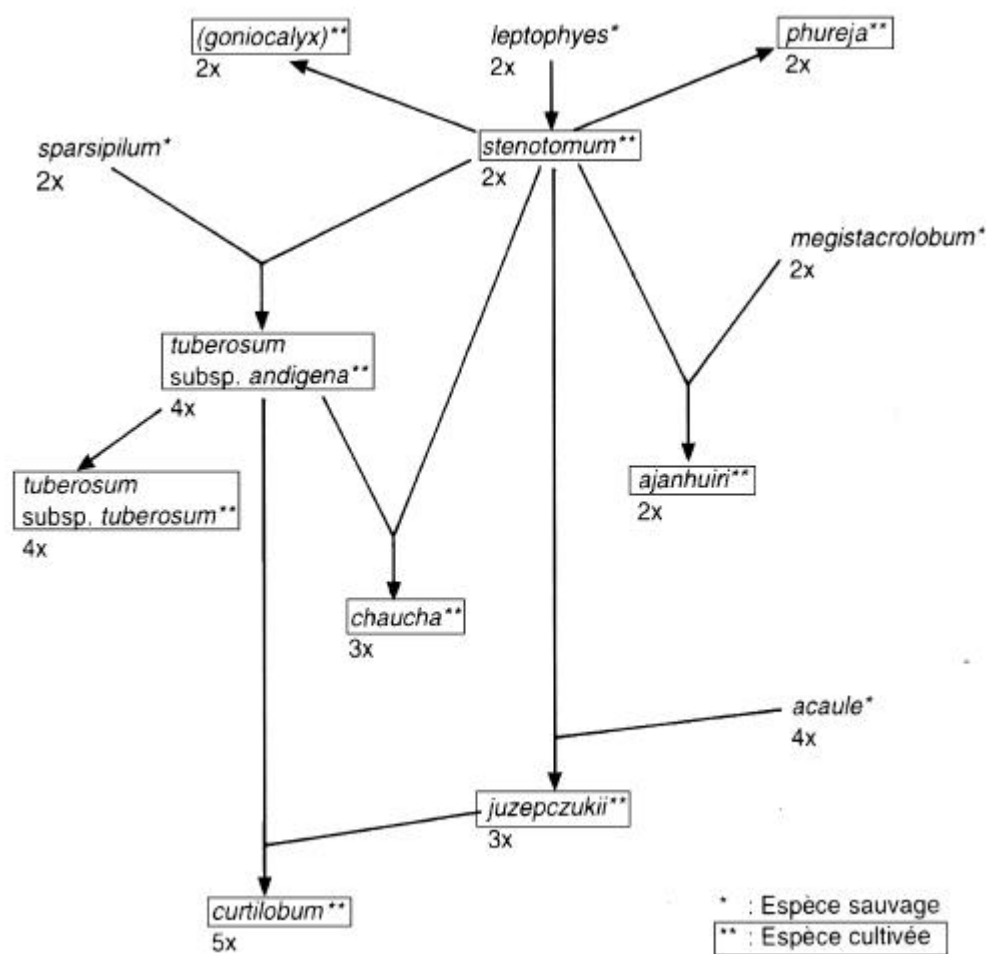


Figure 1.8 : Hypothèse de l'origine des espèces cultivées (d'après Hawkes 1990).

1.3.2. Le contexte agronomique et culturel

Les conditions climatiques difficiles expliquent pourquoi les hommes n'ont pas colonisé plus rapidement les hautes terres des Andes. Il y a 18.000 ans, les glaciers qui recouvrent les hautes altitudes commencent à reculer. Toutefois, ce processus est lent et sa progression dépend du relief. Dans les Andes centrales, la fonte des glaces ne s'est produite qu'il y a 12.000 ans environ. À cette époque, les températures andines sont inférieures de cinq à huit degrés à celles qui règnent aujourd'hui (Aldenderfer 2004). Sur les flancs occidentaux des Andes, la limite des neiges éternelles se trouve 500 mètres plus bas que son niveau actuel (4.800 mètres), et les plantes adaptées au froid comme la plupart des Solanacées tubéreuses poussent à des altitudes plus basses qu'aujourd'hui (Vuilleumier et Simberloff 1980 ; Foster 2001 ; Garcia-Moreno *et al.* 2004). Le réchauffement de la terre permet ensuite aux premiers hommes de coloniser ces hautes terres vers -10.000 ans (figure 1.9). Les données archéologiques de cette période suggèrent que l'homme ne séjourne que temporairement à ces hautes altitudes (Aldenderfer 2004). L'agriculture et la domestication du lama auraient été développées dans la montagne vers 4.000 ans avant notre ère à la suite d'une période

assez longue de 2.000 à 3.000 ans pendant laquelle, de façon continue, est née l'agriculture sud-américaine (Jensen et Krantz 1974). Les pommes de terre diploïdes sans alcaloïde ont probablement été l'une des premières étapes de l'agriculture andine (Spire et Rousselle 1996).

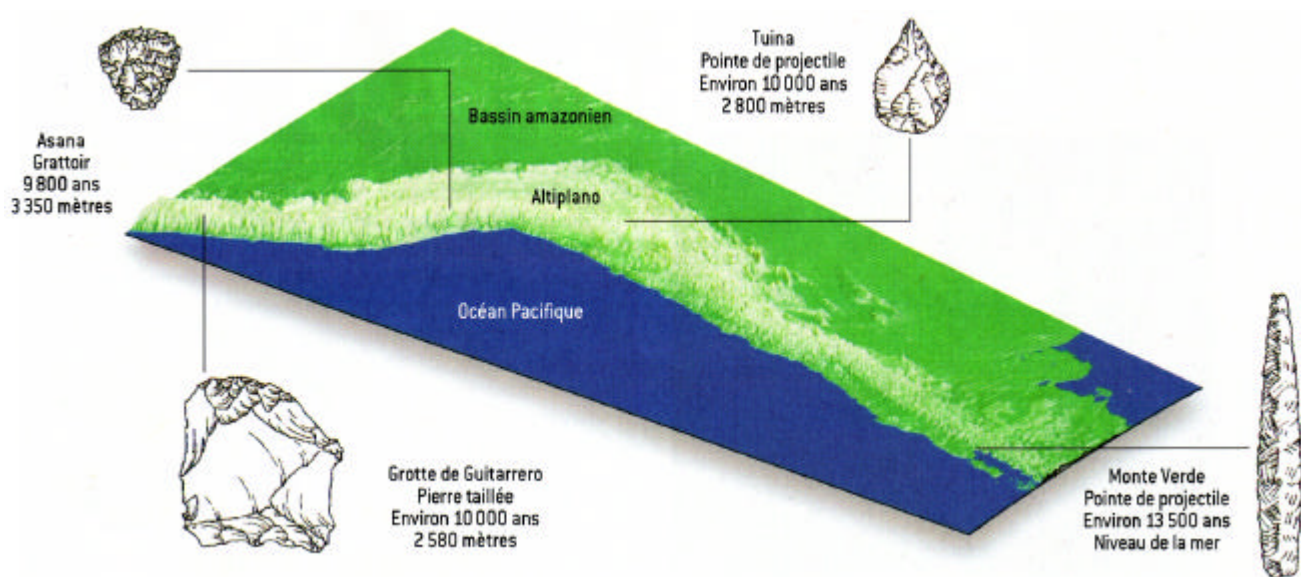


Figure 1.9 : Illustration des 1^{ères} trace de présence humaine dans la Cordillère Andine (d'après Aldenderfer 2004). Le peuplement des Andes a débuté vers la fin du dernier âge glaciaire, il y a une dizaine de milliers d'année. Monte Verde, le plus ancien site répertorié des Amériques, date d'il y a 13 500 ans. Il est intéressant de noter sur cette carte en trois dimensions l'élargissement des Andes au niveau de l'Altiplano, signe géologique suggérant que l'érection de la Cordillère des Andes a commencé dans cette région.

Le développement des pratiques agricoles culmine à la période Inca. Un site archéologique de cette période appelé Moray (figure 1.10) près de Cuzco aurait été l'un des premiers centres expérimental de recherche en agronomie. En effet, chaque étage est constitué d'un mètre d'empierrement pour obtenir un bon drainage sur lequel deux mètres de terre arable ont été ajoutés. L'ensemble de ces terre-pleins soutenus par des murs lithiques était irrigué par un système de canaux appropriés. L'héritage agronomique de la civilisation Inca reste riche en dépit de l'élimination de cette civilisation par les conquistadors. Poma de Ayala (1987) a listé 32 types de sols agricoles incluant les sols pour jachère et les sols pour rotations courtes dans une classification qu'utilisaient les Incas. Ils n'avaient probablement pas connaissance de la présence du nématode à kyste de la pomme de terre, mais leurs pratiques agricoles permettaient d'en limiter l'incidence. Une à trois cultures en rotation dont la première année était réservée à la culture de tubercules, suivies de huit ans ou plus de jachère étaient une pratique répandue à l'arrivée des espagnols, leur donnant l'impression de terres agricoles abandonnées (Thurston 1994, livre potato pest). Si de telles rotations étaient appliquées en Europe, on estime que ce mode de culture qui est encore pratiqué

dans certaines régions reculées au Pérou (cf. Annexe 1), permettrait de maintenir les populations du nématode à kyste en dessous de son seuil de nuisibilité (Jones 1970 ; Jones 1972). L'héritage des Incas et de leurs prédécesseurs ne se limite pas à des pratiques culturelles. De nombreuses variétés andines génétiquement très diverses sont encore disponibles. On rencontre notamment la variété Hualash, encore cultivée, qui s'est avérée résistante à *G. pallida* (com. Pers. de Maria Scurrah). Ces pratiques agricoles et la culture de variétés résistantes peuvent avoir un impact considérable sur le patron génétique du parasite.



Figure 1.10 : Site archéologique Inca de Moray considéré comme l'un des premiers centres expérimentaux de recherche en agronomie. Il y a un dénivelé de 150 mètres entre les terrasses les plus hautes et les plus basses.

CHAPITRE II

**Description du fonctionnement génétique
des populations de *Globodera pallida* dans
son berceau d'origine (le Pérou) à partir d'un
échantillonnage hiérarchisé**

Ce chapitre a fait l'objet d'une publication dans le journal « Molecular Ecology ».

Cette étude constitue la première description du patron génétique du nématode à kyste de la pomme de terre à différentes échelles spatiales. Grâce un échantillonnage hiérarchisé et le génotypage de 504 individus à l'aide de huit loci microsatellites, la partition de la variabilité génétique et des flux de gènes à l'échelle spatiale d'une parcelle, d'une région et du pays seront estimés. Par ailleurs, l'isolement par la distance sera testé à l'échelle la plus fine, c'est-à-dire entre quarante plantes espacées de dix mètres les unes des autres dans une même parcelle. L'hypothèse de l'origine sud-américaine du parasite sera testée par la comparaison de la richesse allélique entre le Pérou et l'Europe, ainsi qu'entre trois régions péruviennes.

Enfin, l'analyse de la consanguinité (révélant la façon dont les allèles s'associent dans la descendance), sera décrite afin de préciser les modalités de reproduction des populations péruviennes.

Inbreeding and population structure of the potato cyst nematode (*Globodera pallida*) in its native area (Peru)

D. PICARD,* O. PLANTARD,* M. SCURRAH† and D. MUGNIÉRY*

*UMR INRA-ENSAR BiO3P, Domaine de la Motte, B.P. 35327, 35653 Le Rheu cedex, France, †Centro Internacional de la Papa (CIP), Apartado 5969, Lima, Perú

Abstract

The dispersal abilities and the population genetic structure of nematodes living in the soil are poorly known. In the present study, we have pursued these issues in the potato cyst nematode *Globodera pallida*, which parasitizes potato roots and is indigenous to South America. A hierarchical sampling regime was conducted in Peru to investigate gene flow on regional, field and plant scales. Multilocus genotypes of single individuals were obtained using eight polymorphic microsatellites markers. Large heterozygote deficiencies were observed at most loci. The limited active dispersal of larvae from their cyst, which favours mating between (half) siblings, could be responsible for this pattern. Within fields, as well as among fields within regions (even 35 km apart), low F_{ST} values suggest extensive gene flow. Among fields within regions, only 1.5–4.4% genetic variability was observed. Passive dispersal of cysts by natural means (wind, running water, or wild animals) or by anthropogenic means (tillage, movement of infected seed tubers) is probably responsible for the results observed. Among regions, high F_{ST} values were observed. Thus long-range dispersal (more than 320 km apart) is probably limited by major biogeographical barriers such as the mountains found in the Andean Cordillera. These results provide useful information for the management of resistant varieties, to slow down the emergence and spread of resistance-breaking pathotypes.

Keywords: gene flow, heterozygote deficiency, long-distance dispersal, microsatellite, phytoparasitic nematode, soil-dwelling invertebrates

Received 30 April 2004; revision received 28 May 2004; accepted 28 May 2004

Introduction

Over the last few years there has been increasing interest in investigating the dispersal abilities of invertebrates and micro-organisms (Finlay 2002; Fenchel 2003; Stevens & Hogg 2003; van der Wurff *et al.* 2003). The use of molecular tools based on polymerase chain reaction (PCR) amplification now allows the estimation of gene flow for organisms that until now were too small to be investigated with alternative methods such as capture–recapture. For pest species, measurement of dispersal ability is of crucial importance to formulating control methods to limit the economic losses in agriculture (see for example Lenormand & Raymond 1998; Carriere *et al.* 2003). The use of population genetics to estimate dispersal also provides additional information concerning the inbreeding, the genetic structure and the level of gene flow at various spatial scales.

Globodera pallida is a quarantine parasite in Europe and the USA (a quarantine parasite is a pest of potential economic importance to the area endangered where it is present but not widely distributed): distribution of seed tubers must be regulated to exclude all material that could be contaminated with this parasite. It is difficult to combat cyst nematodes with conventional control methods such as nematicides. Moreover, nematicidal products are among the most toxic agrochemicals and have been banned in several countries (e.g. USA, Switzerland). For these reasons, the use of resistant crops is currently the preferred control method. However, the existence of resistance-breaking pathotypes has already been reported for several nematode resistance genes (Janssen *et al.* 1990; Castagnone-Sereno 2002). In this context, a good knowledge of population genetics is essential to the development of efficient strategies for the durable deployment of resistant crops (McDonald & Linde 2002; van den Bosch & Gilligan 2003).

Globodera pallida (and the sibling species *G. rostochiensis*) was introduced into Europe from South America and is

Correspondence: O. Plantard. Fax: 33 2 23 48 51 50; E-mail: plantard@rennes.inra.fr

probably native to the Andean Cordillera (Canto Saenz & Scurrah 1977; Stone 1985), the origin of its unique host genus *Solanum* (Hijmans & Spooner 2001). *Globodera pallida* is a sexually dimorphic amphimictic diploid species. Larvae of the second stage (hereafter referred to as J2) emerge from cysts and disperse actively in the soil, attracted to the plant root tips. While the females are sedentary, the males have an active dispersal stage in the soil, when they look for females and fertilize them. The fertilized females lay eggs within their body wall. When the female dies the body wall forms a cyst; this is the conservation stage containing several hundred J2s (up to 600) which can survive for many years (up to 10 years). The gene flow of *G. pallida* has been thought to be negligible (Bakker *et al.* 1993; Blok *et al.* 1997a; Folkertsma *et al.* 2001; Bakker 2002). However, contradictory observations also exist. In Europe, the two *Globodera* species occur in most regions where potatoes are cultivated (Turner & Evans 1998). A recent study (Plantard & Porte 2004) of population genetics of another cyst nematode (*Heterodera schachtii*) has also shown that cyst nematodes can have a high level of gene flow. However, the sugar beet cyst nematode is not dispersed on or with plant material (in contrast to *G. pallida* cysts which can be found in the soil attached to seed tubers), has a world-wide distribution (while *G. pallida* populations outside South America are considered as recent introductions), is polyphagous (being able to reproduce on numerous botanic families while *G. pallida* is restricted to *Solanum*) and have several generations a year.

The study of the population genetics of an introduced organism is more difficult because the current genetic structure will have been influenced by (i) number of individuals that were introduced, (ii) number of generations since introduction, (iii) origin, and thus genotypes, of the individuals introduced, and (iv) stochastic effect of genetic drift. Moreover, in the case of the potato cyst nematodes the history of the introduction events is poorly documented. A similar argument is at the heart of numerous studies of plant pathogens in their native area (Cattan-Toupance *et al.* 1998; Perez *et al.* 2001). To avoid the effect of bottlenecks and genetic drift as a consequence of one or more multiplication cycles in the laboratory (De Boer *et al.* 1992; Folkertsma *et al.* 1996, 2001; Blok *et al.* 1997b), we have only used individuals of *G. pallida* from cysts collected in South America without such multiplication.

The present study constitutes the first population genetic study of a *Globodera* species using microsatellite loci of individuals collected in South America. Our aim is to describe the genetic variability, gene flow at various spatial scales, and the reproductive mode (i.e. the precise modalities of mating that affect the way the alleles are re-associated in offspring) of Peruvian populations of this species. The consequences of our findings for control methods of *G. pallida* are discussed.

Materials and methods

Sampling design, field collection of nematodes and DNA sample preparation

During summer 2002, a hierarchical sampling programme was conducted to allow the investigation of three spatial scales: the geographical region/the field/the plant. Three large agronomic regions of potato and seed tuber production were sampled (Fig. 1). The distance between regions varied between 326 km (from Huancayo to Andahuaylas) to 832 km (from Andahuaylas to Otuzco). In each region, three fields separated from each other by 3–35 km were sampled. Approximately 500 g of soil was taken with a semi-cylindrical corer in an area of 2 m². Cysts were extracted from each soil sample using the Fenwick method. Each J2 was extracted from a different cyst.

For the investigation at the field scale, 40 J2s were used, each coming from a soil sample taken at a regular distance (10 m) from others, to maximize the area of the field investigated. For the investigation at the plant scale, four soil samples separated from each other by 10–70 m (Fig. 1) were taken from one field (Andahuaylas field 3). For each soil sample, 40 J2s from 40 different cysts were analysed.

DNA preparation and PCR were performed with only one J2 juvenile, as described in Plantard & Porte (2003). The 20 µL of DNA extract were diluted with 20 µL of water. From the 40 µL obtained for each juvenile, 10 µL were used for species identification based on rDNA PCR–restriction fragment length polymorphism (RFLP). Indeed, *Globodera*



Fig. 1 Map of Peru showing locations of regions and fields (flower) where *Globodera pallida* were sampled. The sampling within a field is schematized with the 40 samples (• and +). The crosses symbolize plants where 40 cysts were analysed.

pallida and its sibling species *G. rostochiensis* can be found in sympatry in some parts of Peru. However, they exhibit a distinct restriction profile by rDNA PCR-RFLP (Thiéry & Mugniéry 1996). The remaining part of the DNA extract was used for the microsatellite genotyping, using 2 µL for each locus. The microsatellite primers used were those described by Thiéry & Mugniéry (2000). Eight loci (*GP20*, -32, -33, -34, -36, -38, -42 and -46) were analysed. Allele size was determined with a LI-COR Global IR² DNA Analyzer, using fluorescent forward primers at IRDye 700 and IRDye 800. To avoid artefacts caused by poor amplification, all individuals with more than two amplification failures among the eight loci were excluded. Finally, the correspondence of alleles between gels was checked by reloading on the same gel different individuals arranged by allele size.

Data analysis

The observed and expected heterozygosities were calculated using GENETIX (version 4.04; Belkhir *et al.* 2001). An unbiased estimate of expected heterozygosity was based on Nei (1978). Hardy–Weinberg exact tests were performed using GENEPOP (version 3.4; Raymond & Rousset 1995) assuming that the alternative hypothesis H1 is heterozygote deficiency. To determine without bias the exact *P*-value of this test, a Markov chain method was used, using the default options as the dememorization number (10 000), the number of batches (100) and the number of iterations per batch (5 000). Estimates of the parameter F_{IS} were also calculated with GENEPOP based on Weir & Cockerham (1984). Significance of F_{IS} for each population was tested using the permutation by population procedure of GENETIX. To generate a distribution of F_{IS} under the null hypothesis (assuming a Hardy–Weinberg equilibrium within populations), 10 000 permutations were used and the observed value of F_{IS} was compared to this distribution.

Pairwise F_{ST} estimates were obtained from F-STAT (version 2.9.3; Goudet 2001), according to Weir & Cockerham (1984). Because uneven numbers of nucleotides were observed between different alleles of the same locus (despite being all based on dinucleotide repeats), we consider that they do not mutate according to a strict single-step mutation (SMM) model. This is possibly because of mutations in the flanking regions – see Orti *et al.* (1997) or Delmotte *et al.* (2003) for example – as already observed for numerous invertebrate species in which SMM was not respected (see Estoup *et al.* 1995 for example). Thus we decided not to use allele size-based measures of differentiation such as Slatkin's R_{ST} that hypothesize a strict SMM model and have a high variance (Gaggiotti *et al.* 1999; Balloux & Lugon-Moulin 2002).

We have also examined the population genetic structure by means of a hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA) using ARLEQUIN (version 2.0; Excoffier *et al.* 1992;

Schneider *et al.* 2000): among regions, among fields within regions, within fields, among plants and within plants sources of variations were investigated. A two-way AMOVA (for region and fields) reflecting the hierarchical design of samples was conducted; F_{SC} (i.e. permuting individual genotypes among populations but within groups) and F_{CT} (i.e. permuting populations among groups) were calculated using ARLEQUIN. Three one-way AMOVA were also conducted by considering each region separately, to examine if the partitioning of genetic variability among vs. within fields was similar in each region. Because the four 'plant' samples were from only one field, only a one-way AMOVA was conducted to partition the genetic variability among vs. within plants.

Isolation by distance, in a subdivided or in a continuously distributed population, can be investigated with the help of spatial autocorrelation analysis and Mantel tests (Hardy & Vekemans 1999). Such analyses were performed using the software GENALEX (Peakall & Smouse 2001) on the data sets relating to the investigation of the field scales, for which GPS (Global Positioning System) coordinates of each soil sample had been recorded.

Results

Polymorphism at the eight loci

Among the 504 individuals genotyped, 134 alleles were found, with seven to 36 alleles per locus (Fig. 2). Over all loci, the Andahuaylas region had the highest allelic richness, with 86 alleles; there were 59 alleles in the Huancayo region and 46 alleles in the Otuzco region. This pattern remains true for each locus separately, except for locus *GP36* which had more alleles in the Huancayo region.

Many alleles were region specific (52% for Andahuaylas, 37% for Huancayo and 28% for Otuzco). Few alleles (14%) were shared between the three regions. In each region, few alleles were field specific (for the example of Andahuaylas region: 10% for field 1 and field 3, 18% for field 2). In the Andahuaylas region, 52% of the alleles were shared between the three fields. In field 3 of the Andahuaylas region, few alleles were plant specific (3% for plant 1 and plant 4, 7% for plant 2, 8% for plant 3), while 48% of the alleles were shared between the four plants. The allelic diversity observed at the plant scale was very similar to those observed at the field scale (allelic richness in Andahuaylas field 3 was 60 alleles and mean allelic richness at the plant scale was 59 ± 3.5 alleles with 40 individuals per sample) (Fig. 2).

Heterozygosity

Heterozygote deficiencies were observed for most loci in most fields and plants (Table 1). A significant deviation from Hardy–Weinberg equilibrium was found in 31 out of

Table 1 Genetic diversity of *Globodera pallida* sampled at the field and plant scale

	Otuzco			Huancayo			Andahuaylas			Andahuaylas – Plant			
Field:	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	4
<i>n</i> :	37	38	40	38	40	37	37	40	39	40	40	39	39
Locus GP20													
H_E	0.6905	0.7257	0.6636	0.1562	0.2345	0.0796	0.7848	0.8272	0.7802	0.6959	0.8582	0.7686	0.7812
H_O	0.4865	0.4167	0.5500	0.1622	0.2000	0.0811	0.8056	0.7436	0.6410	0.5750	0.8500	0.6667	0.6923
<i>P-val</i>	0.0007	0.0000	0.0587	1	0.1051	1	0.2606	0.0000	0.0029	0.0971	0.4951	0.1714	0.4223
F_{IS}	+0.298	+0.429	+0.173	-0.038	+0.149	-0.008	-0.027	+0.102	+0.180	+0.176	+0.010	+0.134	+0.115
Locus GP32													
H_E	0.3543	0.2695	0.4443	0.0519	0.0494	0.1311	0.7360	0.6320	0.6895	0.6703	0.6383	0.6620	0.5937
H_O	0.3514	0.2632	0.4000	0.0526	0.0500	0.0833	0.7297	0.5750	0.6842	0.6750	0.6000	0.6410	0.6154
<i>P-val</i>	0.5211	0.6425	0.3842	1	1	0.1378	0.5664	0.3470	0.4643	0.7284	0.1440	0.6007	0.6315
F_{IS}	+0.008	+0.024	+0.101	-0.014	-0.013	+0.367	+0.009	+0.091	+0.008	-0.007	+0.061	+0.032	-0.037
Locus GP33													
H_E	0.5454	0.5582	0.5123	0.7000	0.6710	0.6598	0.7260	0.7263	0.7719	0.7845	0.7592	0.7869	0.7539
H_O	0.5676	0.4474	0.4750	0.3947	0.6410	0.5135	0.5946	0.6750	0.6216	0.5641	0.5897	0.7179	0.6410
<i>P-val</i>	0.5788	0.1298	0.3677	0.0000	0.3065	0.0904	0.0261	0.0641	0.0100	0.0013	0.0252	0.0333	0.0017
F_{IS}	-0.041	+0.201	+0.074	+0.439	+0.045	+0.224	+0.183	+0.071	+0.197	+0.284	+0.226	+0.089	+0.151
Locus GP34													
H_E	0.3803	0.3800	0.0731	0.0000	0.0497	0.0000	0.2980	0.4358	0.6004	0.5177	0.3737	0.6530	0.5837
H_O	0.2778	0.3947	0.0750	0.0000	0.0500	0.0000	0.1892	0.4000	0.4872	0.5250	0.2500	0.6667	0.5641
<i>P-val</i>	0.1142	0.7444	1	—	1	—	0.0325	0.0652	0.0190	0.5328	0.0641	0.5316	0.5018
F_{IS}	+0.272	-0.039	-0.026	—	-0.006	—	+0.368	+0.083	+0.191	-0.014	+0.334	-0.021	+0.034
Locus GP36													
H_E	0.7485	0.7409	0.6830	0.7629	0.7912	0.8230	0.4627	0.4002	0.5498	0.3983	0.4799	0.5544	0.5591
H_O	0.4375	0.2903	0.1818	0.2813	0.4211	0.3784	0.1613	0.2973	0.3243	0.3077	0.1795	0.4359	0.2564
<i>P-val</i>	0.0013	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0564	0.0006	0.0982	0.0000	0.0528	0.0001
F_{IS}	+0.419	+0.612	+0.737	+0.635	+0.471	+0.544	+0.655	+0.260	+0.413	+0.230	+0.629	+0.216	+0.545
Locus GP38													
H_E	0.6335	0.4881	0.6364	0.2116	0.0731	0.2003	0.7438	0.6696	0.7289	0.7231	0.7389	0.7346	0.6633
H_O	0.5946	0.4474	0.5500	0.1842	0.0250	0.1667	0.6486	0.5750	0.6667	0.7000	0.5500	0.7179	0.6410
<i>P-val</i>	0.3798	0.1717	0.1080	0.4142	0.0380	0.3528	0.0911	0.0293	0.1192	0.2176	0.0002	0.3000	0.3162
F_{IS}	+0.062	+0.084	+0.137	+0.131	+0.661	+0.170	+0.129	+0.143	+0.086	+0.032	+0.258	+0.023	+0.034
Locus GP42													
H_E	0.6761	0.7014	0.6503	0.8382	0.8955	0.8381	0.8282	0.9101	0.9131	0.8509	0.9025	0.8848	0.8888
H_O	0.5833	0.6053	0.4103	0.7297	0.7778	0.7714	0.6944	0.8750	0.7436	0.8000	0.9000	0.8718	0.8462
<i>P-val</i>	0.0513	0.1256	0.0000	0.0601	0.0015	0.0037	0.0184	0.0890	0.0000	0.0438	0.4031	0.3198	0.1465
F_{IS}	+0.139	+0.139	+0.372	+0.131	+0.133	+0.081	+0.163	+0.039	+0.188	+0.061	+0.003	+0.015	+0.049
Locus GP46													
H_E	0.5520	0.5713	0.4902	0.7053	0.6506	0.6412	0.7397	0.7366	0.7058	0.8098	0.7361	0.7890	0.7916
H_O	0.4054	0.4324	0.4250	0.2895	0.4000	0.2162	0.2647	0.3333	0.5000	0.2632	0.3158	0.5946	0.5526
<i>P-val</i>	0.0030	0.0947	0.2487	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0045	0.0000	0.0000	0.0003	0.0000
F_{IS}	+0.268	+0.228	+0.134	+0.593	+0.419	+0.666	+0.646	+0.551	+0.295	+0.678	+0.574	+0.249	+0.305
All loci													
H_E	0.5726	0.5544	0.5192	0.4283	0.4269	0.4216	0.6649	0.6672	0.7175	0.6813	0.6859	0.7292	0.7019
H_O	0.4630	0.4122	0.3834	0.2618	0.3206	0.2763	0.5110	0.5593	0.5836	0.5512	0.5294	0.6641	0.6011
<i>P-val</i>	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0004	0.0000
F_{IS}	+0.1936	+0.2593	+0.2642	+0.3921	+0.2514	+0.3477	+0.2341	+0.1637	+0.1886	+0.1929	+0.2304	+0.0903	+0.1452

H_E and H_O , expected and observed heterozygosity; *P-val*, significance of heterozygote deficiencies (in bold: significant departure from Hardy–Weinberg expectation); F_{IS} values, estimate of heterozygote deficiencies; *n*, sample size.

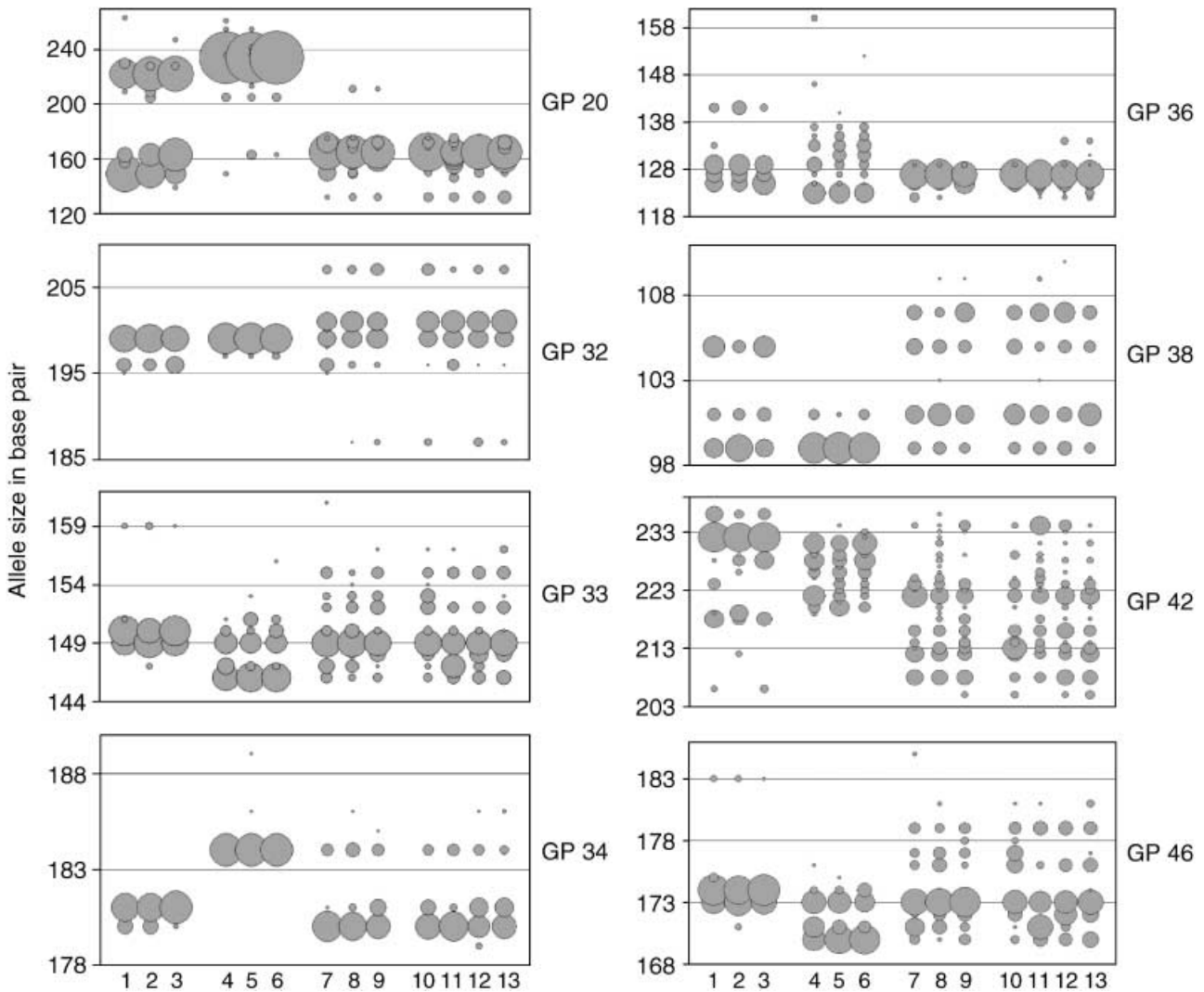


Fig. 2 Allele size (in base pairs) and allele frequencies at the eight microsatellite loci of *Globodera pallida*. The circle areas are proportional to the frequencies of the respective alleles in given population (1–3: three fields of the Otuzco region; 4–6: three fields of the Huancayo region; 7–9: three fields of the Andahuaylas region; 10–13: four plants in the field Andahuaylas 3).

72 tests for field samples and in 12 out of 32 plant samples [Hardy–Weinberg exact test based on the alternative hypothesis (H1) of heterozygote deficiency; Table 1]. A heterozygote deficiency was observed with a highly significant deviation from Hardy–Weinberg equilibrium in all fields and all plants when global tests across loci were conducted. Furthermore, the high values of F_{IS} are indicative of a high heterozygote deficiency (between 0.16 and 0.39 among the nine fields and between 0.12 and 0.23 among the four plants). One hundred per cent of the values of F_{IS} obtained by permutation (GENETIX: 10 000 iterations) were lower than the observed F_{IS} value. To test for the presence of null alleles in the data set, the relationship between the number of nonamplifying samples for each locus and F_{IS} was examined (Beaumont *et al.* 2001). A positive relationship would indicate that F_{IS} is affected by amplifying failure

hence suggesting that homozygous individuals are the result of null alleles. For each locus, this relationship was never significant ($P > 0.05$). Thus, we considered that the loci used were not greatly affected by null alleles.

Partition of the genetic variability and gene flow

The analysis of nine fields in three regions reveals that 33% of the genetic variability was observed among regions and 65% of the genetic variability was observed within fields (Table 2). The fixation index reflecting the nested design of the samples indicated that genetic differentiation was weak among fields within regions ($F_{SC} = 0.023$, i.e. permuting individual genotypes among fields but within regions) while genetic differentiation was strong among regions ($F_{CT} = 0.319$, i.e. permuting fields among regions). The high

Table 2 Partition of genetic variability of *Globodera pallida* populations

Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation
At the regional scale				
Among regions	2	430.578	0.90835	32.80
Among fields within regions	6	34.552	0.05138	1.86
Within fields	683	1236.239	1.81001	65.35
Total	691	1701.370	2.76975	
At the field scale				
Three fields in the region of Otuzco				
Among fields	2	16.371	0.08338	4.44
Within fields	227	407.742	1.79622	95.56
Total	229	424.113	1.87960	
Three fields in the region of Huancayo				
Among fields	2	3.840	0.01375	1.56
Within fields	227	196.582	0.86600	98.44
Total	229	200.422	0.87975	
Three fields in the region of Andahuaylas				
Among fields	2	11.151	0.04503	2.10
Within fields	229	479.715	2.09483	97.90
Total	231	490.866	2.13986	
At the plant scale				
Four plants in the field 3 Andahuaylas				
Among plants	3	27.808	0.08255	2.92
Within plants	312	857.454	2.74825	97.08
Total	315	885.263	2.83080	

F_{ST} values (Table 3) between regions (> 0.2) are related to the relatively high level of genetic variation observed among regions (33%). So, both results suggest weak gene flow between regions.

In each region, a small part of the genetic variation is observed among fields (from 1.6% to 4.4% in the three one-way AMOVA treating each region separately, and 1.9% in the two-way AMOVA taking into account nine fields without considering regions). In Andahuaylas field 3, a small part of the genetic variation was observed among plants (3.8%) and consequently, a large part of the variation was observed within fields (between 96% and 98%) and within plants (96%) (Table 2). Inside each region, the weak F_{ST} values between fields ($0.0001 < F_{ST} < 0.05$) were associated with the small part of genetic variation observed among fields (Table 3). In the Andahuaylas field 3, the small genetic differentiation between plants revealed by low F_{ST} values ($0.01 < F_{ST} < 0.06$) was associated with a small part of the genetic variation observed among plants. This suggests extensive gene flow among plants and among fields within regions.

Isolation by distance

Inside each field (i.e. between samples separated by 8–200 m), isolation by distance could not be detected using spatial autocorrelation analysis (when examining the genetic correlation as a function of distance, over all nine fields, among the 68 distance classes investigated, r -values lay

Table 3 Genetic differentiation (F_{ST}) among *Globodera pallida* populations (a) between field among regions (in bold: F_{ST} between field within each region) and (b) between plants

Region:	Otuzco			Huancayo			Andahuaylas		
Field:	1	2	3	1	2	3	1	2	3
(a) between fields among regions									
Otuzco	1	0.0260	0.0298	0.3808	0.3895	0.3883	0.2521	0.2374	0.2049
	2		0.0485	0.3487	0.3573	0.3621	0.2543	0.2371	0.2057
	3			0.4185	0.4273	0.4241	0.2995	0.2837	0.2393
Huancayo	1				0.0152	0.0179	0.3511	0.3450	0.3284
	2					0.0001	0.3661	0.3588	0.3372
	3						0.3693	0.3598	0.3406
Andahuaylas	1							0.0059	0.0284
	2								0.0197
(b) between plants of the Andahuaylas field 3									
Region:	Andahuaylas – Plant								
Plant:	1	2	3	4					
1		0.0453	0.0163	0.0075					
2			0.0414	0.0451					
3				0.0083					

between the upper and the lower confidence limits in all except four distances classes; 95% confidence interval; results not shown) or Mantel tests (P was between 0.260 and 0.750 for the three fields of the Andahuaylas region, between 0.080 and 0.330 for the three fields of the Huancayo region, and between 0.320 and 0.620 for the three fields of the Otuzco region). Among the three fields inside each region and among the three regions, the spatial autocorrelation or the Mantel tests could not be performed because there were only three distance classes.

Discussion

Polymorphism and origin area

The hypothesis that *Globodera pallida* is native in the Andean Cordillera, like its host, the *Solanum* genus (Hijmans & Spooner 2001), is widely accepted (Canto Saenz & Scurrah 1977; Stone 1985; Bendezu *et al.* 1998; Blok *et al.* 1998; Folkertsma *et al.* 2001). Thus, we expected that the allelic richness level in Peru would be higher than in Europe because of the founder effect and genetic drift following introduction events. The analysis of 120 individuals from five countries in Europe for the same seven loci (namely GP20, -32, -34, -36, -38, -42 and -46) gave a total of 25 alleles (Thiéry & Mugniéry 2000) while our study revealed 63 alleles in only 40 individuals from one field in Andahuaylas (117 alleles for the data set). However, the genetic drift as a result of consecutive laboratory population multiplications could also be responsible for the lower allelic richness observed in the European samples analysed by Thiéry & Mugniéry (2000). Bendezu *et al.* (1998), using random amplified polymorphic DNA markers, also found considerably less genetic diversity in samples from the UK than in those from Peru, but laboratory strains were also used in this study.

Although only three regions have been investigated in the present study, a higher allelic richness was observed while sampling nearer Lake Titicaca. As *G. rostochiensis* is also found in this area, our study highlights how interesting this region is for the investigation of genetic variability of both *Globodera* species.

Reproduction mode

Globodera pallida is characterized by a high deficit of heterozygotes with high F_{IS} values observed at both plant and field scales. Because there is 10-m separation between samples at the field scale and because the active dispersal is less than several decimetres for juveniles and males, the sampling could have generated a Wahlund effect responsible for the heterozygote deficit observed. However, a similar heterozygote deficit is observed at the localized plant scale, allowing rejection of the Wahlund effect (Table 1). Moreover,

heterozygote deficiency is observed in all loci, as would be expected when it is the result of inbreeding, while with a Wahlund effect caused by population subdivision, the frequency of heterozygotes would differ from panmictic proportions in a way that depends on the co-variances of allele frequencies across populations (Hartl & Clark 1989). Artefacts as a result of null alleles are very unlikely to account for the results because all eight loci were affected and because there is no positive relationship between nonamplification and F_{IS} .

We hypothesize that the heterozygote deficiency is the result of the particular biology and life cycle of this soil-dwelling organism. Indeed, nematodes are able to move only in the water phase in soil because of their sinusoidal wave locomotor progression in surface tension films (Crofton 1971). Thus, active dispersal of larvae and males is probably limited to a few centimetres or decimetres. All larvae from a given cyst are siblings, or half-siblings if several males have fertilized the female (a case reported in laboratory studies by Thiéry *et al.* 1997). Also, at hatching, there are several hundred sibling or half-sibling larvae that actively move short distances to invade the roots of their host plant. These larvae will develop into males and females that will have a high probability of mating with each other because of the small dispersal range of males. This life cycle and behaviour should thus favour mating between siblings or half-siblings enhancing the production of homozygotes. Furthermore, this phenomenon occurs at each generation.

The assortative mating (tendency of like to mate with like) could also explain the heterozygote deficiency observed. Additional experiments should be conducted to investigate those two hypotheses as there are no data on these topics in the nematological literature.

A two-dimensional gel electrophoretic (2-DGE) study of *G. pallida* did not show any significant deviation from Hardy–Weinberg equilibrium (De Boer *et al.* 1992). This result could be because of the difficulty of determining the heterozygote state with 2-DGE. Furthermore, one cyst containing several hundred (half)sibling J2 juveniles were used for the protein extraction; the admixture of (half) siblings could increase the number of heterozygotes. In another study using 2-DGE, low heterozygosity was observed (Folkertsma *et al.* 2001). However, because this study was conducted on populations from an area (the Netherlands) where *G. pallida* had been introduced, the relative role of genetic bottlenecks since introduction relative to inbreeding could not be evaluated in the assessment of heterozygosity.

In conclusion, *G. pallida* can be considered as a highly inbred species as a result of the limited active dispersal of larvae and males. Such a pattern has recently been observed in another cyst nematode species, *Heterodera schachtii* (Plantard & Porte 2004). However, the present study is based on more loci (eight vs. five) and with greater polymorphism (36 alleles per loci vs. 11 alleles per loci). In

two studies of *Heterodera avenae* with enzymatic markers (Gillois *et al.* 1981; Lasserre *et al.* 1996), a heterozygote deficit was also observed but not with the entire data set. Thus, this reproductive mode could be a more general feature of those organisms characterized by restricted active dispersal and aggregated clutch (i.e. cysts containing several hundred eggs).

Gene flow among regions

A large genetic differentiation was observed at the regional scale (distance: 326–832 km). The allelic diversity and frequency pattern are different from one region to another (Fig. 2). In fact, there is a high number of alleles specific to each region. This is congruent with the values of F_{ST} ($F_{ST} = 0.2$ – 0.4) and with a fixation index based on the nested design of the samples ($F_{CT} = 0.318$) indicating a large genetic differentiation between regions. The AMOVA results also suggest low gene flow at the inter-regional scale with a large part of the genetic variation being observed among regions (33%).

The three regions sampled correspond to the largest potato and seed tuber production areas at high altitudes (3000–3800 m) in Peru. These regions import few seed tubers. Moreover, these agronomic regions are isolated by large areas without *G. pallida* (tropical valleys and very high altitude areas, 4400 m, where potatoes are not grown). These facts could explain the genetic structure observed and the barrier to gene flow. Such a large genetic differentiation was not observed in the study of the sugar beet cyst nematode by Plantard & Porte (2004). However, in this latter study the largest distance between regions (150 km) was less than the inter-region distances of the present study. Moreover, no major barrier to gene flow exists between the French regions sampled, in contrast to the present study.

Gene flow inside regions and inside fields

Within regions, *G. pallida* exhibits a low genetic differentiation from field to field even 35 km apart (distance: 3–35 km; $F_{ST} = 0.00$ – 0.05 ; $F_{SC} = 0.023$; partition of genetic variation: 1.6–4.4%). Within Andahuaylas field 3, *G. pallida* exhibits a low genetic differentiation from plant to plant (distance: 10–50 m; $F_{ST} = 0.01$ – 0.06 ; partition of genetic variation: 2.9%). A large gene flow at both spatial scales is suggested by the F_{ST} and the AMOVA results. Moreover, no isolation by distance is observed when considering the geographical localization of each sample inside each field.

The origin of the gene flow within regions could be the passive dispersal of cysts. The cyst has biological characteristics that are well adapted to a long-distance effective dispersal. The eggs are protected inside a cyst and can survive for *c.* 10 years. One cyst contains several hundred eggs. The considerable number of cysts per hectare that *G.*

pallida can reach in soils (9 billion cysts per hectare or 3 cysts per gram of soil) enhances the probability of an effective long-range passive dispersal. Passive dispersal of cysts might have an anthropogenic or natural origin. Wind dispersal has been reported for cyst nematodes (White 1953; Norton & Niblack 1991; Gavassoni *et al.* 2001) and for other soil nematodes (Baujard & Martiny 1994). The water can carry some cysts with runoff, irrigation and drainage. Farm implements transport cysts from one part of a field to another or from field to field in the soil stuck on the wheels and tools. Seed tubers could also disperse cysts (Steiner *et al.* 1951), especially inside the three Peruvian regions sampled because of the exchange of many seed tubers within each region, without any phyto-sanitary control of cyst nematodes. In the Netherlands, a weak genetic structure was also observed, even for fields ± 150 km apart (Folkertsma *et al.* 2001). However, because populations of *G. pallida* in Europe are introduced, this structure could either be the result of high gene flow inside regions or of a limited number of introduction events.

Recently, other studies on soil-dwelling organisms have observed large gene flow over long distances using a population genetics approach (see for example van der Wurff *et al.* 2003 in relation to the collembolan *Orchesella cincta*; Stevens & Hogg 2003 with regard to the collembolan *Gomphiocephalus hodgoni*; and Plantard & Porte 2004 with reference to the nematode *Heterodera schachtii*). Furthermore, for the free-living soil nematode *Caenorhabditis elegans*, Koch *et al.* (2000) suggest long-range dispersal to explain the low genetic differentiation at the global scale. The gene flow at long distances is not the only similarity between *G. pallida* and other soil-dwellings species such as *H. schachtii* or *Go. hodgoni* or *O. cincta*. A deficit of heterozygotes (at least for some loci) was also observed for all those three species. In this study, active dispersal of larvae and males at a very short distance leads to inbreeding, while passive dispersal of cyst leads to long-distance gene flow and lack of genetic differentiation within regions, as observed for *H. schachtii* (Plantard & Porte 2004).

Implications for the control of cyst nematodes

According to our results, *G. pallida* is highly inbred, has a high capacity for dispersal and a large part of the genetic variation observed at the intra-regional scale was also observed at the plant scale. These results have consequences for the management and deployment of resistant varieties. The inbred reproductive mode favours the production of homozygotes. According to the gene-for-gene relationship theory (Flor 1955), because most plant disease-resistance genes are dominant while the corresponding pathogen-avirulence genes are recessive, only the pathogen individuals being virulent homozygotes (avr/avr) have a resistance-breaking phenotype. Thus, the reproductive mode of *G.*

pallida could facilitate the emergence of such homozygous virulent individuals.

Finally, our finding that gene flow is extensive not only at the intra-field scale but also among fields within the same regions, suggests that prophylactic measures such as the disinfection of seed tubers used for planting, the cleaning of farm machines and restricting the spread of cysts through irrigation water should be promoted.

According to the criteria used by McDonald & Linde (2002) *G. pallida* should be considered a parasite with a high capacity to overcome resistance because of its high capacity for dispersal and its large genetic and effective population sizes. The observations of frequent resistant-breaking pathotypes reported in the literature (Llontop *et al.* 1989; Janssen *et al.* 1990; Turner & Fleming 2002) follow this interpretation.

Van den Bosch & Gilligan (2003) have shown that population dynamics and population genetics of a pest should be linked to estimate the durability of resistance within an epidemiological model. The present study, by giving new information on the dispersal abilities of *G. pallida* and its genetic variability, should constitute a valuable step towards the building of epidemiological models to combat this pest.

Acknowledgements

We would like to thank the 'Servicio Nacional de Sanidad Agraria' (SENASA, Peru), 'Instituto Nacional de Investigación Agraria' (INIA, Peru) and particularly Dr Elsa Carbonell Torres and Ing Susana Chumbiauca for all their help in the sampling of potato cyst nematodes in Peru. This work was financially supported by the INRA department 'Santé des Plantes et Environnement' and 'la Région Bretagne'. The French 'Ministère des affaires étrangères' provided funding for the trip. We would also like to thank two anonymous referees and Paul Sunnucks for useful comments on a previous version of the manuscript. Jean-Christophe Simon, Eric Petit and Mark Phillips made helpful suggestions. Finally, we thank Mrs Sylvie Valette, Mrs Pauline Casters-Picard, Mr Abou Bakari-Kouassi, Mr Marcelo Trebejo and Mr Mario Curasi-Nina for their help.

References

- Bakker J (2002) Durability of resistance against potato cyst nematodes. *Euphytica*, **124**, 157–162.
- Bakker J, Folkertsma RT, Rouppe van der Voort JN, DeBoer JM, Gommers FJ (1993) Changing concepts and molecular approaches in the management of virulence genes in potato cyst nematodes. *Annual Review of Phytopathology*, **31**, 169–190.
- Balloux F, Lugon-Moulin N (2002) The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*, **11**, 155–165.
- Baujard P, Martiny B (1994) Transport of nematodes by wind in the peanut cropping area of Senegal, West Africa. *Fundamental and Applied Nematology*, **17**, 543–550.
- Beaumont M, Barratt EM, Gottelli D *et al.* (2001) Genetic diversity and introgression in the Scottish wildcat. *Molecular Ecology*, **10**, 319–336.

- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (2001) *GENETIX 4.02, logiciel sous Windows™ pour la génétique des populations*. Laboratoire Génome, Populations, Interactions: CNRS UMR. 5000, Université de Montpellier II, Montpellier.
- Bendezu IF, Evans K, Burrows PR, Pomerai Dd Canto-Saenz M (1998) Inter- and intra-specific genomic variability of the potato cyst nematodes *Globodera pallida* and *G. rostochiensis* from Europe and South America using RAPD-PCR. *Nematologica*, **44**, 49–61.
- Blok VC, Ehwaeti M, Fargette M *et al.* (1997a) Evolution of resistance and virulence in relation to the management of nematodes with different biology, origins and reproductive strategies. *Nematologica*, **43**, 1–13.
- Blok VC, Phillips MS, Harrower BE (1997b) Comparison of British populations of potato cyst nematodes with populations from continental Europe and South America using RAPDs. *Genome*, **40**, 286–293.
- Blok VC, Malloch G, Harrower BE, Phillips MS, Vrain TC (1998) Intraspecific variation in ribosomal DNA in populations of the potato cyst nematode *Globodera pallida*. *Journal of Nematology*, **30**, 262–274.
- van den Bosch F, Gilligan CA (2003) Measures of durability of resistance. *Phytopathology*, **93**, 616–625.
- Canto Saenz M, Mayer de Scurrah M (1977) Races of the potato cyst nematode in the Andean region and a new system of classification. *Nematologica*, **23**, 340–349.
- Carriere Y, Eilers-Kirk C, Sisterson M *et al.* (2003) Long-term regional suppression of pink bollworm by *Bacillus thuringiensis* cotton. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **100**, 1519–1523.
- Castagnone-Sereno P (2002) Genetic variability of nematodes: a threat to the durability of plant resistance genes? *Euphytica*, **124**, 193–199.
- Cattan-Toupance I, Michalakakis Y, Neema C (1998) Genetic structure of wild bean populations in their South-Andean centre of origin. *Theoretical and Applied Genetics*, **96**, 844–851.
- Crofton HD (1971) Form, function, and behavior. In: *Plant Parasitic Nematodes* (eds Zuckerman BM, Mai WF, Rohde RA), pp. 83–116. Academic Press, New York.
- De Boer JM, Overmars HA, Bouwman-Smits L *et al.* (1992) Protein polymorphisms within *Globodera pallida* assessed with mini two dimensional gel electrophoresis of single females. *Fundamental and Applied Nematology*, **15**, 495–501.
- Delmotte F, Sabater-Munoz B, Prunier-Leterme N *et al.* (2003) Phylogenetic evidence for hybrid origins of asexual lineages in an aphid species. *Evolution*, **57**, 1291–1303.
- Estoup A, Garnery L, Solignac M, Cornuet JM (1995) Microsatellite variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) populations: hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models. *Genetics*, **140**, 679–695.
- Excoffier L, Smouse P, Quattro J (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, **131**, 479–491.
- Fenchel T (2003) Biogeography for bacteria. *Science*, **301**, 925–926.
- Finlay BJ (2002) Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. *Science*, **296**, 1061–1063.
- Flor HH (1955) Host–parasite interaction in flax rust — its genetics and other implications. *Phytopathology*, **45**, 680–685.
- Folkertsma RT, Voort JN, Groot K *et al.* (1996) Gene pool similarities of potato cyst nematode populations assessed by AFLP analysis. *Molecular Plant–Microbe Interactions*, **9**, 47–54.

- Folkertsma RT, Van Koert PH, Rouppe van der Voort JN *et al.* (2001) The effects of founding events and agricultural practices on the genetic structure of three metapopulations of *Globodera pallida*. *Phytopathology*, **91**, 753–758.
- Gaggiotti OE, Lange O, Rassmann K, Gliddon C (1999) A comparison of two indirect methods for estimating average levels of gene flow using microsatellite data. *Molecular Ecology*, **8**, 1513–1520.
- Gavassoni WL, Tylka GL, Munkvold GP (2001) Relationships between tillage and spatial patterns of *Heterodera glycines*. *Phytopathology*, **91**, 534–545.
- Gillois M, Chevalet C, Thomas D, Dalmaso A (1981) Isoesterases in *Heterodera avenae*. II. — A genetic model applied to two populations. *Revue de Nématologie*, **4**, 107–114.
- Goudet J (2001) *FSTAT, a Program to Estimate and Test Gene Diversities and Fixation Indices* Version 2.9.3. Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. Updated from Goudet (1995).
- Hardy OJ, Vekemans X (1999) Isolation by distance in a continuous population: reconciliation between spatial autocorrelation analysis and population genetics models. *Heredity*, **83**, 145–154.
- Hartl D, Clark A (1989) *Principles of Population Genetics*. Sinauer Associates Inc, Sunderland, MA.
- Hijmans RJ, Spooner DM (2001) Geographic distribution of wild potato species. *American Journal of Botany*, **88**, 2101–2112.
- Janssen R, Bakker J, Gommers F (1990) Selection of virulent and avirulent lines of *Globodera rostochiensis* for the H1 resistance gene in *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* CPC 1673. *Revue de Nématologie*, **13**, 265–268.
- Koch R, van Luenen HGAM, van der Horst M, Thijssen KL, Plasterk RHA (2000) Single nucleotide polymorphisms in wild isolates of *Caenorhabditis elegans*. *Genome Research*, **10**, 1690–1696.
- Lasserre F, Gigault F, Gauthier J *et al.* (1996) Genetic variation in natural populations of the cereal cyst nematode (*Heterodera avenae* Woll.) submitted to resistant and susceptible cultivars of cereals. *Theoretical and Applied Genetics*, **93**, 1–8.
- Lenormand T, Raymond M (1998) Resistance management: the stable zone strategy. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biology Sciences*, **265**, 1985–1990.
- Llontop J, Franco J, Scurrah M (1989) Variation in virulence and aggressiveness of *Globodera pallida* in potato clones resistant to races P4A and P5A in Peru. *Nematropica*, **19**, 111–124.
- McDonald BA, Linde C (2002) Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology*, **40**, 349–379.
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, **89**, 583–590.
- Norton DC, Niblack TL (1991) Biology and ecology of nematodes. In: *Manual of Agricultural Nematology* (ed. Nickle WR), pp. 47–72. Marcel Dekker, New-York.
- Orti G, Pearse DE, Avise JC (1997) Phylogenetic assessment of length variation at a microsatellite locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **94**, 10745–10749.
- Peakall R, Smouse PE (2001) *GENALEX V5: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research*. Australian National University, Canberra, Australia. <http://www.anu.edu.au/BoZo/GenALEX/>.
- Perez WG, Gamboa JS, Falcon YV *et al.* (2001) Genetic structure of Peruvian populations of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology*, **91**, 956–965.
- Plantard O, Porte C (2003) Isolation and characterization of microsatellite loci in the sugar beet cyst nematode *Heterodera schachtii*. *Molecular Ecology Notes*, **3**, 139–141.
- Plantard O, Porte C (2004) Population genetic structure of the sugar beet cyst nematode *Heterodera schachtii*: a gonochoristic and amphimictic species with highly inbred but weakly differentiated populations. *Molecular Ecology*, **13**, 33–41.
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP Version 1.2.: population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, **86**, 248–249.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L (2000) *Arlequin: a software for population genetics data analysis [2.0]*. University of Geneva, Geneva.
- Steiner G, Taylor AL, Cobb GS (1951) Cyst-forming plant parasitic nematodes and their spread in commerce. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, **18**, 13–18.
- Stevens MI, Hogg ID (2003) Long-term isolation and recent range expansion from glacial refugia revealed for the endemic springtail *Gomphiocephalus hodgsoni* from Victoria Land, Antarctica. *Molecular Ecology*, **12**, 2357–2369.
- Stone AR (1985) Co-evolution of potato cyst nematodes and their host: implication for pathotypes and resistance. *Bulletin OEPP*, **15**, 131–137.
- Thiéry M, Mugniéry D (1996) Interspecific rDNA restriction fragment length polymorphism in *Globodera* species, parasites of solanaceous plants. *Fundamental and Applied Nematology*, **19**, 471–479.
- Thiéry M, Mugniéry D (2000) Microsatellite loci in the phytoparasitic nematode *Globodera*. *Genome*, **43**, 160–165.
- Thiéry M, Mugniéry D, Bossis M, Sosa-Moss C (1997) Crossing between *Globodera pallida* Stone and G. ‘mexicana’ Campos-Vela: species concept and heritability of the development on potato. *Fundamental and Applied Nematology*, **20**, 551–556.
- Turner SJ, Evans K (1998) The origins, global distribution and biology of potato cyst nematodes (*Globodera rostochiensis* (Woll.) and *Globodera pallida* Stone). In: *Potato Cyst Nematodes Biology, Distribution and Control* (eds Marks RJ, Broodie BB), pp. 7–26. CAB International, Oxon.
- Turner SJ, Fleming CC (2002) Multiple selection of potato cyst nematode *Globodera pallida* virulence on a range of potato species. I. Serial selection on *Solanum*-hybrids. *European Journal of Plant Pathology*, **108**, 461–467.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistic for the analysis of population structure. *Evolution*, **38**, 1358–1370.
- White J (1953) Wind-borne dispersal of potato-root eelworm. *Nature*, **172**, 686–687.
- van der Wurff AWG, Isaaks JA, Ernsting G, Van Straalen NM (2003) Population substructures in the soil invertebrate *Orchesella cincta*, as revealed by microsatellite and TE-AFLP markers. *Molecular Ecology*, **12**, 1349–1359.

The authors are members of the team ‘Biology and Genetics of phytoparasitic nematodes’ of the UMR BiO3P that focuses on the management of sedentary nematodes by the use of resistant varieties. This study is part of the PhD work of Damien Picard which is focused in population genetics and phylogeography of *Globodera pallida* and the systematics of the *Heteroderidae* family. Olivier Plantard is a researcher interested in population genetics of plant nematodes and other evolutionary aspects of those organisms. Maria Scurrah is a geneticist working on potato cyst nematodes in Peru. Didier Mugniéry is a senior research scientist interested in nematode control.

CHAPITRE III

**Patron d'« isolement par la distance » le long
d'un transect de 1.500 km dans la cordillère
des Andes et structuration génétique chez un
organisme du sol de 500 micromètres**

Dans le chapitre précédent, les populations de *G. pallida* analysées se sont avérées très consanguines. Le déficit en hétérozygotes observé peut s'expliquer par une reproduction préférentielle entre individus apparentés ou par la faible dispersion active de centaines de frères et sœurs lors de l'éclosion d'un kyste. Les principaux résultats concernant la partition de la variabilité génétique à différentes échelles spatiales et la structure génétique obtenus dans le chapitre II, sont résumés ici de façon synthétique :

- ✓ La quasi-totalité de la variabilité génétique observée dans une région (bassin de production de la pomme de terre) se retrouve à l'échelle de la rhizosphère d'une plante.
- ✓ Aucune structuration génétique n'est observée à l'intérieur des trois régions analysées, ce qui reflète des forts flux de gènes à cette échelle. Nous faisons l'hypothèse que ceux-ci sont dus à une forte dispersion passive des kystes.
- ✓ Une importante structuration génétique est observée entre les trois régions analysées, attestant de l'absence de flux de gènes à cette échelle, absence due probablement aux puissants reliefs géographiques de la Cordillère des Andes.

Dans ce chapitre III, la description du patron génétique à l'échelle intra et inter-région va être approfondie. Rappelons qu'à ces deux échelles géographiques, nous avons observé dans le chapitre II une absence de structuration génétique entre parcelles séparées jusqu'à 35 km à l'intérieur d'une région et une très forte structure génétique entre régions séparées de plus de 320 km. Se pose alors la question : Où, pourquoi et comment passe t'on de tout à rien ? Autrement dit : qu'est ce qu'une population pour un nématode à kyste ? Pour répondre à cette question centrale en génétique des populations, nous avons réalisé un échantillonnage spécifique qui a été analysé par deux approches.

Dans trois bassins agricoles, où la production de pommes de terre est importante et les parcelles sont contiguës, en plus des parcelles déjà analysées dans le chapitre II, de nouvelles parcelles ont été échantillonnées. Par ailleurs des parcelles de plus en plus isolées géographiquement entre elles ont été aussi ajoutées. L'analyse a concerné un total de 703 individus répartis sur 23 parcelles qui ont été génotypés à l'aide des huit loci microsatellites utilisés précédemment.

La première approche a consisté à établir le patron d'isolement par la distance (Isolation By Distance en anglais ; IBD). Deux méthodes ont été utilisées : le calcul du rapport $F_{ST}/(1 - F_{ST})$ versus la distance entre les parcelles et l'analyse de l'autocorrélation spatiale. La deuxième approche a quant à elle consisté à estimer le niveau de structure génétique entre individus ou entre groupes d'individus grâce à un algorithme bayésien de regroupement.

Isolation by distance only above 50 km for a 500 µm long soil nematode

Damien Picard, Olivier Plantard,

UMR INRA-ENSAR BiO3P, Domaine de la Motte, B.P. 35327, 35653 Le Rheu cedex, France.

Corresponding author: Olivier Plantard, UMR INRA-ENSAR BiO3P, Domaine de la Motte, B.P.

35327, 35653 Le Rheu cedex, France. Fax number: 33 2 23 48 51 50;

olivier.plantard@rennes.inra.fr

Abstract

Although numerous species are distributed in discrete populations easily recognized by geographical barriers, continuous populations are a common feature of plants or marine organisms. This is particularly true for soil organisms as their habitat is continuous and their range cannot easily be assessed as they are buried below ground. In the case of organisms for which standard methods such as Markage/Capture/Recapture cannot be used, population genetics provide a straightforward approach to delimitate populations. In this study, we have pursued this topic with a soil-dwelling nematode (*Globodera pallida*), which parasitizes potato roots and is indigenous to South America. Potential barriers to gene flow were identified using the analysis of the $F_{ST}/(1 - F_{ST})$ ratio against geographical distance and spatial autocorrelation combined with model-based clustering algorithm. Inside regions, neither genetic differentiation nor isolation by distance (IBD) occur among fields less than 50 km distant. We hypothesize that the large amount of gene flow revealed by the absence of genetic structure of this tiny organism could be due to large passive dispersion inside an agronomic area where *G. pallida* has a continuous distribution and is found at high density. The first evidence of genetic differentiation appeared when a field was separated from others by area without farming (where *G. pallida* is absent). Among regions, a high genetic structure coupled with an IBD pattern occurs as the consequences of the limitations of passive dispersal due to deep valleys or high mountains. To our knowledge, this is the first study identifying the spatial limit of a population for a plant nematode parasite.

Keywords: microsatellite, phytoparasitic nematode, soil dwelling invertebrates, spatial autocorrelation, IBD, clustering analysis, genetic structure, passive dispersion.

3.2. INTRODUCTION

Unlike the species definition, which has been the topic of extensive debate, the definition of a population is rarely evoked, even in population genetic studies. Classically, terrestrial animals have a discontinuous distribution due to habitat fragmentation. They disperse actively among those patches, which are used as the sampling unit for population studies. To measure the genetic structure of populations, Wright (1978) proposed to use a hierarchical sampling design that corresponds to spatial subdivisions of natural populations. In such a context, the zoologist decides *a priori* what a population is according to the biology of the organism (dispersal abilities...) and its landscape. But for plants and small marine organisms, the passive dispersion in a more or less continuous distribution does not allow *a priori* decisions to be made about what a population is. For nematode parasites of vertebrates, the population genetic structure is largely due to host movement (Blouin et al., 1995; Fisher and Viney, 1996; Hoekstra et al., 1997; Fisher and Viney, 1998; Peng et al., 1998; Viney, 1998; Müller-Graf et al., 1999; Otsen et al., 2000; Hawdon et al., 2001). For plant parasitic nematodes, which of course can not be dispersed by their hosts, intra- and interpopulation genetic variability as well as gene flow at various spatial scales are largely unknown. A common way to determine what a population is, for such organisms, is to study if the allele frequencies exhibit a spatial pattern (Palumbi, 1994; Vekemans and Hardy, 2004). Are they randomly distributed over space, or do they show any spatial association or correlation? To solve this task, the relationship between Wright's F -statistics (Wright, 1951) against spatial distance or spatial autocorrelation (Sokal and Wartenberg, 1983; Slatkin, 1993; Epperson and Li, 1997; Rousset, 1997) could be studied as specified by particular models of population structure. Some of these indirect methods consist in plotting the genetic distance (Sokal et al., 1986) or the $F_{ST}/(1 - F_{ST})$ ratio (Rousset, 1997) against the spatial distance between individuals or groups of individuals. A classical genetic pattern is the "isolation by distance (IBD)" due to a process by which geographically-restricted gene flow generates, under migration-drift, a substantial increase of genetic divergence with the geographical distance among populations (Wright, 1943). More recently, a new and powerful method has been developed to assign individuals in groups according to their multilocus genotype (Structure software, Pritchard et al., 2000). Indeed, the model-based clustering algorithm identifies groups that have distinctive allele frequencies and enables inferences to be made about the level of genetic structure between groups of individuals.

The soil fauna, which is made up of thousands of nematoda, acari, insects, crustacean or annelids species, is a poorly known part of the global biodiversity. In these biota, numerous plant-, invertebrate- (insect-, mollusc-), or vertebrate-parasites are found (Silva et al., 2003). Numerous life-history traits of the species constituting this fauna are still unknown. Although active dispersion is restricted by the weak permeability of the soil habitat, some soil-dwelling organisms can disperse passively over a long distance [for examples, collembolans like *Orchesella cincta* (van der Wurff et al.,

2003) or *Gomphiocephalus hodgsoni* (Stevens and Hogg, 2003) and nematodes like *Caenorhabditis elegans* (Koch et al., 2000) or *Heterodera schachtii* (Plantard and Porte, 2004) or *Globodera pallida* (Picard et al., 2004)]. Even though the passive dispersion was responsible for high gene flow at long distance, the weak active dispersion for individual buried in the soil and the egg clustering was responsible for the inbreeding (Stevens and Hogg, 2003; van der Wurff et al., 2003; Picard et al., 2004; Plantard and Porte, 2004). For *Caenorhabditis elegans*, the passive dispersion appears to prevent a genetic structure at the global scale (Koch et al., 2000), while a restricted gene flow was observed for *G. pallida* among only 3 regions separated by geographical barriers (deep valley and high mountains) in the Andean Cordillera (Picard et al., 2004). In all the cases, the delimitation of what a population is for a soil organism is still unanswered. We will address this issue by studying population genetics of *Globodera pallida*, a cyst nematode parasiting potato roots. *G. pallida* is a sexually dimorphic amphimictic diploid species. Juveniles (500 µm long) and males (1 mm long) are the two free stages of the parasiting cycle and can disperse actively over few centimetres (Norton and Niblack, 1991). When the female dies, the body wall forms a cyst, which is the conservation stage containing several hundred juvenile (up to 600) which can survive for many years (up to 10 years). *G. pallida* is probably native to the Andean Cordillera (Canto Saenz and Mayer de Scurrah, 1977; Stone, 1985), the origin of its main host genus *Solanum* (Hijmans and Spooner, 2001). In a given field, no genetic differentiation was observed among samples of nematodes associated to individual plants, in a previous analysis of the genetic structure of *Globodera pallida* populations using a hierarchical sampling (Picard et al., 2004). A field could therefore be considered as an homogeneous genetic unit and will be the smallest genetic entity considered in this article.

The aim of this study was to combine the complementary analysis of IBD patterns and clustering analysis to determine i) at which spatial scale a genetic structure is observed? ii) at which spatial scale an IDB pattern is observed? iii) what a population is for *G. pallida*? Finally, the usefulness of this approach for all organisms that disperse passively and do not show a priori evidence of spatial population subdivisions will be discussed.

3.3. MATERIALS AND METHODS

3.3.1. Sampling design, field collection of nematodes and DNA sample preparation:

Sampling program was conducted between 2,700 m and 4,200 m along 1,500 km of the Andean Cordillera in Peru (from the Equatorial to the Bolivian border) from June to August 2002. Soil containing *Globodera pallida* cysts were collected from 342 fields sampled. Fields were located precisely by GPS (Global Positioning System).

Nine different regions were identified along the Andean Cordillera (Figure 1 & Table 1). In the interest of clarity, our use of the term “region” pertains to a set of fields within a defined geographic area rather than implying any hierarchical structure or analyses. The regions are

separated by major geographic relief such as deep valleys with tropical climate or high mountains (more than 4,300 m), acting as a geographic barrier to *Globodera pallida* passive dispersion (Picard et al., 2004). For example, the Huaraz region and the Huanuco region were considered as belonging to two different regions as they are separated by the Cordillera Blanca with Huascarán top (6,768 m) and the wide and deep valley of the Marañón river. The Arapa region (40 km from the Titicaca lake border) and the Amantani island region (an island in the Titicaca lake) were also considered as belonging to distinct regions as they are separated by water. Six regions are represented by one field (Table 1).

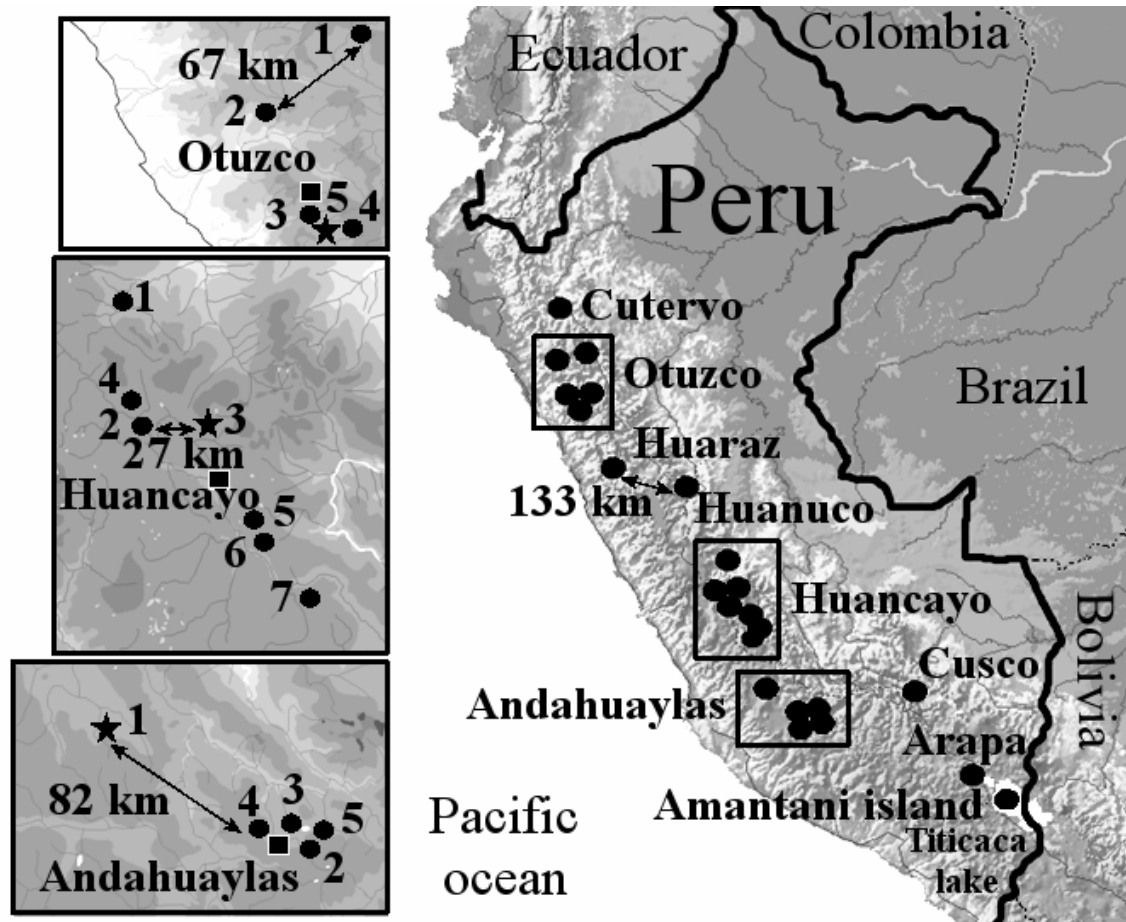


Figure 1: Map of Peru showing the field locations in the 9 regions. The stars symbolize the fields representing each region (in the subset data with one field for each region).

The Otuzco and Andahuaylas regions are represented by 5 fields and the Huancayo region by 7 fields (Table 1). Inside these regions, we recognized (i) “agronomic areas” where *G. pallida* could be considered to have a continuous distribution due to the close proximity of highly infected fields and (ii) “isolated fields” separated from others by areas without farming where *G. pallida* is absent (figure 1). Finally, a total of 23 highly infected fields were analyzed (figure 1) including the nine already studied in Picard et al. (2004).

For each field, forty cysts were randomly taken from a soil sample that was collected with a semi-cylindrical corer. A total of 703 individuals were analyzed with 8 polymorphic microsatellite

markers. The protocols of extraction of cyst from the soil, DNA amplification and the specific identification of *G. pallida* were described in Picard et al. (2004). As clustering analysis has been developed to assign individuals in groups according to their multilocus genotype (Structure software, Pritchard et al., 2000), all individuals with only one locus without amplification were excluded from the data set to have the best assignation for each individual.

Table 1: Sampling sites, altitude and number of genotyped nematodes (*n*). In bold : fields representing each region (in the subset data with one field for each region); * fields analyzed in Picard *et al.* 2004.

Region	Field	Altitude (m)	<i>n</i>
I Cutervo		2786	28
II Otuzco	1 Cajamarca	3583	29
	2 Contumaza	2949	30
	3 Otuzco*	3318	30
	4 Otuzco*	3401	29
	5 Otuzco*	3174	32
III Huaraz		3993	26
IV Huanuco		3585	35
V Huancayo	1 Huasahuasi	3352	27
	2 Jauja*	3549	31
	3 Concepcion*	3652	34
	4 Jauja*	3784	34
	5 Huancayo	4041	28
	6 Huancayo	4089	33
	7 Huancavelica	4174	27
VI Andahuaylas	1 Ayacucho	3456	36
	2 Andahuayla*	3870	28
	3 Andahuaylas*	3484	29
	4 Andahuaylas*	2778	31
	5 Andahuaylas	4118	31
VII Cusco		3726	28
VIII Arapa		3915	34
IX Amantani island		4059	33

3.3.2. Population differentiation and IBD

Two complementary methods were used to test the association between genetic divergence and geographical distance. Firstly, the regression of $F_{ST} / (1 - F_{ST})$ estimates on logarithm of distance. Under IBD in a two-dimensional space, pairwise $F_{ST} / (1 - F_{ST})$ ratios are expected to increase approximately linearly with the logarithm of spatial distance (Rousset, 1997). Pairwise F_{ST} estimates were obtained from FSTAT (version 2.9.3; Goudet, 2001), according to Weir and Cockerham (1984). Secondly, an unidirectional Mantel correlogram - correlation between genetic divergence and geographic distance - (Sokal et al., 1986, see also Arnaud, 2003) was performed with PASSAGE software (Rosenberg, 2001). To assess the genetic divergence among fields, the allele-sharing genetic distance D_{AS} (Jin and Chakraborty, 1994) was estimated using

POPULATION version 1.2.28, a program written by O. Langella and available at <http://www.pge.cnrs-gif.fr/bioinfo>. The geographical variable was assessed simply by the linear geographical distance measured “as the crow flies”, which is a straight-line distance between any pair of locations. The distance classes were designated to achieve approximately equal frequencies of field pairs. In relation to the mutation model of microsatellite loci, the IAM model was chosen (Wright’s *F*-statistics and allele-sharing genetic distance) for the reasons explained in Picard *et al.* (2004).

3.3.3. Genetic model-based clustering

We used the model-based clustering method (Pritchard *et al.*, 2000) to infer population structure and assign individuals to populations using multilocus genotype data by a Bayesian approach, as implemented in the Structure software. The model assumes *K* populations (or clusters) modeled each by its own set of allele frequencies at each locus. The results of the assignation process can be illustrated by colored graphs in which each individual is represented by a vertical bar. At each cluster (*K*), the model gives a posterior probability of the data. We chose the value of *K* clusters that maximizes the posterior probability of the data (PPD). We considered the successive increase of the PPD for increasing values of *K*, which can be regarded as the gain of information obtained after each addition of one cluster. Nevertheless, it should be emphasized that the PPD is not an accurate estimate and should be regarded as an heuristic guide to determine the most consistent model (Pritchard *et al.*, 2000).

Five independent runs were conducted to assess the consistency of the results across runs and the PPD was the mean of the five independent runs. All runs were based on 100,000 iterations after a burn-in period of 20,000 iterations. Between the regions (using one field representing each region), we tested if *K* was equal to the number of regions (*K* varying between 1 and 15). Inside the regions, we tested if *K* > 1 to detect a genetic structure at the smallest scale (*K* varying between one and the number of fields). Choosing a *K* value that maximizes the PPD can be difficult to apply for complex data sets including many groups (Rosenberg *et al.*, 2002). Therefore, in the interest of clarity, the data set was split in four subsets (a subset with one field representing each region, and three subsets corresponding to the Otuzco, Huancayo and Andahuaylas regions).

3.4. RESULTS

3.4.1. Population differentiation and IBD

The curve of the spatial autocorrelation analysis with 23 fields (figure 2a) decreased with a monotonic trend characterizing the IBD. This pattern is due to positive values of mantel *r* for the smallest geographical distances (because locations close to each other tend to have similar allelic frequencies), while locations far from each other tend to have very different allelic frequencies and thus are characterized by negative mantel *r* coefficients. The mantel *r* coefficients were significantly

different from zero for most distance classes. When using the 23 fields, the $F_{ST}/(1 - F_{ST})$ ratio against the logarithm of geographical distance (figure 2b) could be split in two parts. Below 50 km, the $F_{ST}/(1 - F_{ST})$ ratio between fields pairs remained constant and very low (< 0.06). The ratio was not correlated with the geographical distance ($y = 0.007x + 0.01$, $r = 0.37$, $ddl = 14$, not significant). Above 50 km, the ratio increased with geographical distance ($y = 0.158x - 0.46$, $r = 0.54$, $ddl = 235$, highly significant). These results suggested an IBD above 50 km and an absence of IBD below 50 km.

Within the Otuzco and Huancayo regions, the spatial autocorrelation analysis (figure 3a,b) detected an IBD. Indeed, the curves decreased with a monotonic trend (significant positive mantel r coefficients for the smallest distance class and significant negative mantel r coefficients at the end of the curve). For the Huancayo region, if the two outlying fields (field 1 and field 7) were excluded of the analysis, the autocorrelation coefficients were no longer significant (figure 3d). For the Andahuaylas region, none of the autocorrelation coefficients was significant (figure 3d).

3.4.2. Genetic model-based clustering and hierarchical population structure

Using only one field representing each region, the best assignation was observed for $K=9$, corresponding to the 9 regions we had defined (figure 4a). The PPD was maximum for this value of K ; moreover the standard error of the PPD was higher for greater values of K (figure 5a). Structure software failed to calculate an homogeneous PPD between each iteration for $K > 9$. At $K=9$, all individuals were always assigned in the same cluster among the 5 independent runs. One of the clusters of individuals obtained for a given value of K was split into two clusters for $K+1$, until $K=9$ (figure 4a). At $K=9$, 97% of the individuals were assigned to their clusters at more than 80% (see figure 4a). Only one individual out of 286 was assigned incorrectly (an Andahuaylas individual was assigned to the Cusco cluster at 82%). When $K=10$, only 7 individuals (all in the region of Huancayo) were in majority assigned to the new cluster (black color; cf field V, figure 4a).

In the Otuzco, Huancayo and Andahuaylas regions, for K equal to the number of fields sampled, the clusters recognized by structure didn't match the fields sampled (figure 4b). For example, although 5 fields have been sampled in the Otuzco region, the 5 clusters recognized by Structure (when K is set to 5) did not correspond to them. The individuals were more correctly assigned when they belonged to the outlying fields (figure 4b; see fields 1 & 2 for Otuzco and fields 1 & 7 for Huancayo). The PPD weakly increased in the three regions (figure 5b). In the Otuzco region, when K goes from 3 to 5, still 3 groups (field 1, field 2 and fields 3, 4 & 5) could be distinguished. In the Huancayo region, a similar pattern was observed. At $K=3$, the outlying fields (fields 1 and 7) could be distinguished. At $K=7$, no other group could be distinguished. In the Andahuaylas region at $K=5$, only the field 5 could be weakly distinguished.

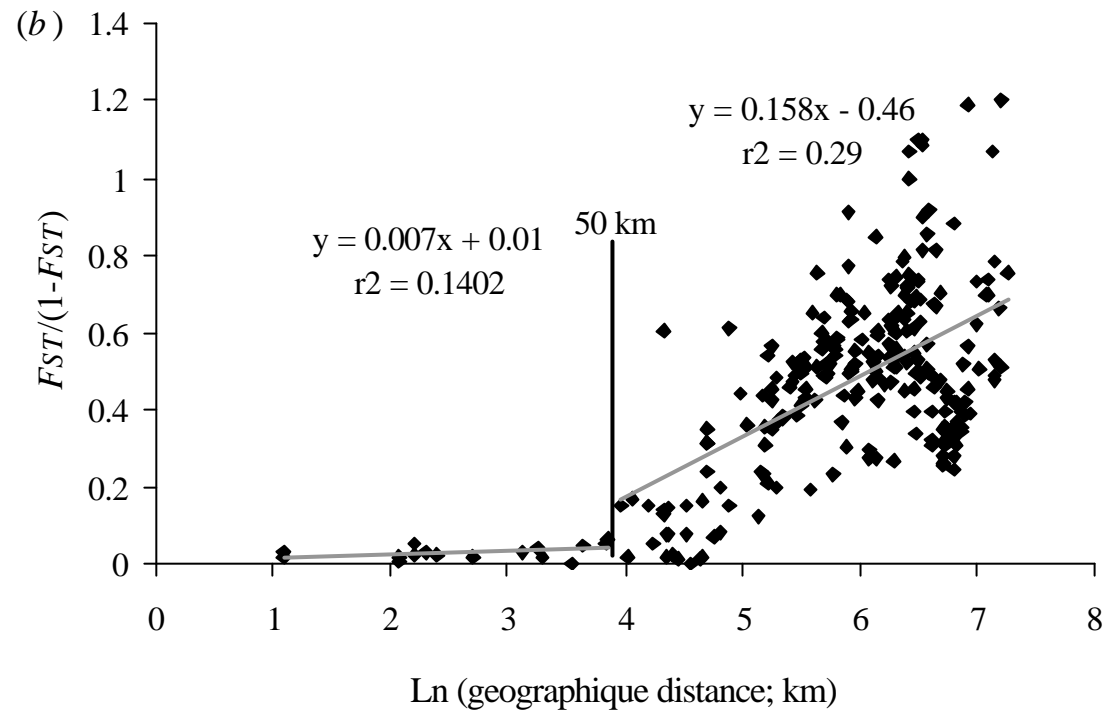
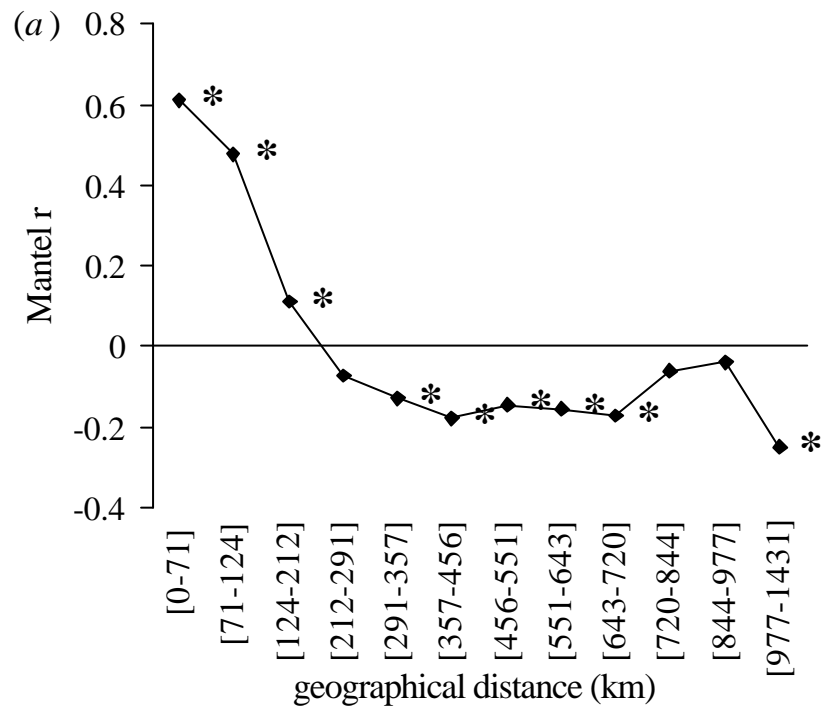


Figure 2 IBD on all the data set (23 fields); (a) mantel correlograms depicting the relationship between estimates of genetic divergence (DAS) and geographical distance (straight-line), * $p < 0.05$; (b) regression of $F_{ST}/(1-F_{ST})$ estimates on logarithm of distance, two linear regressions were calculated below 50 km ($p > 0.05$) and above 50 km ($p < 0.001$).

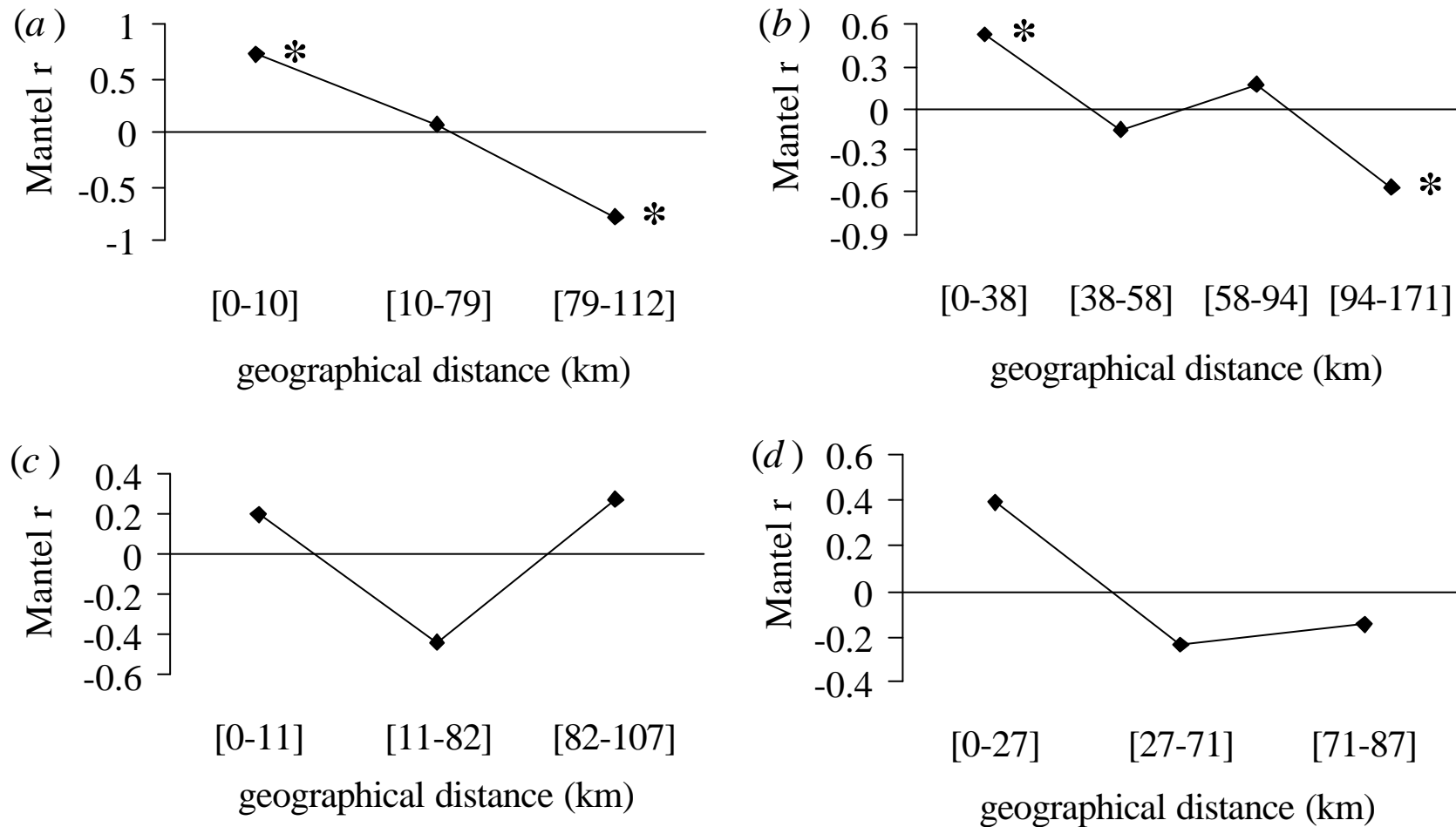
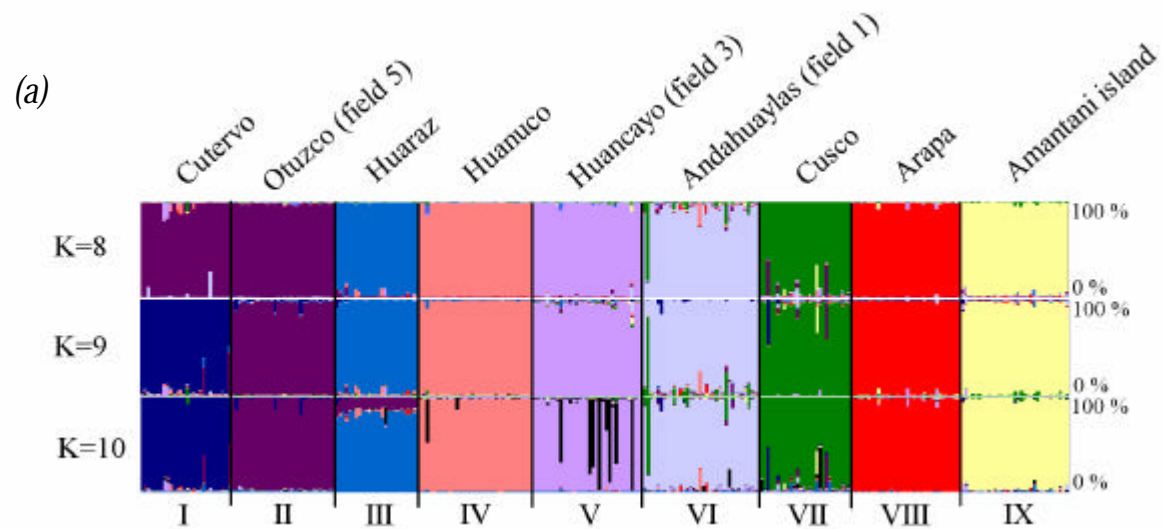


Figure 3. Mantel correlograms depicting the relationship between estimates of genetic divergence and geographical distance inside regions; * $p < 0.05$; (a) Otuzco region, (b) Huancayo region (7 fields), (c) Huancayo region (5 fields, *i.e.* without the peripheral field V1 and Field V7), (d) Andahuaylas region.



(b)

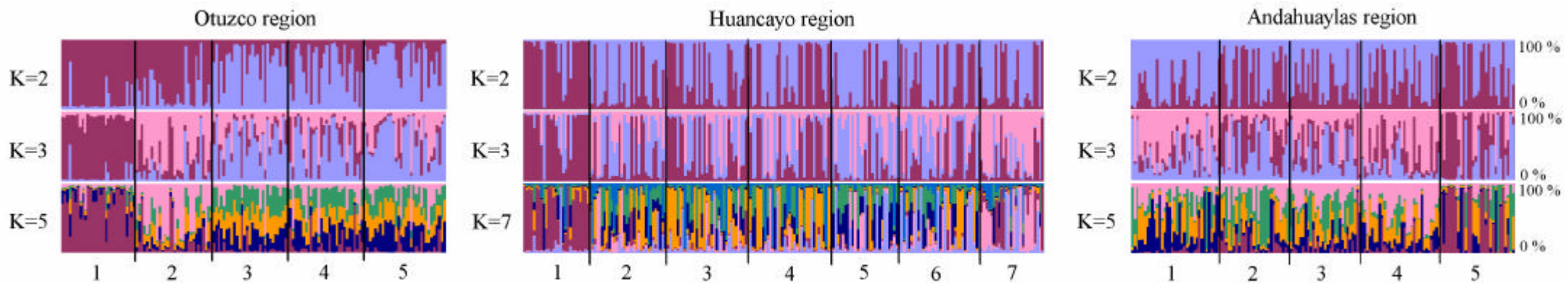
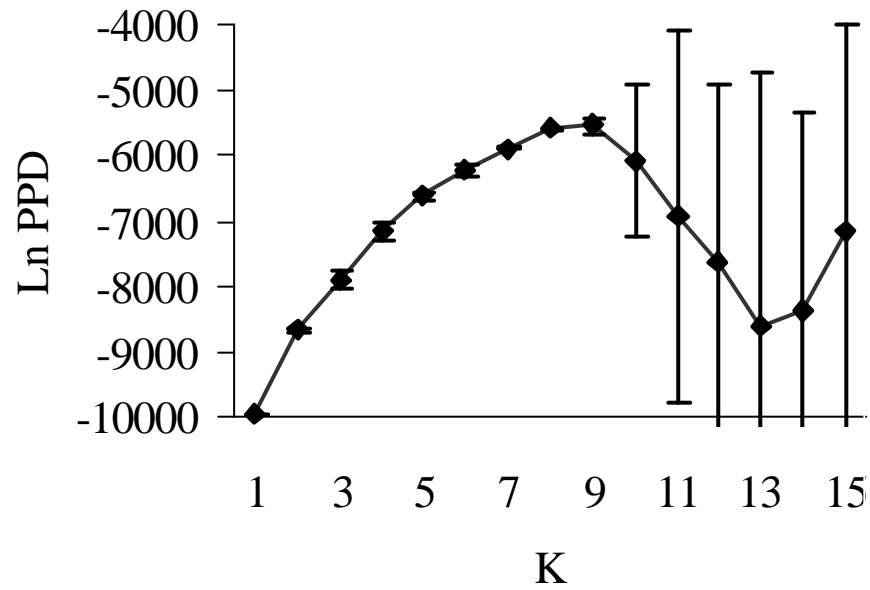


Figure 4 Estimated population structure; (a) analysis of the subset data with one field for each region; (b) analyses of the Otuzco region with 5 fields, the Huancayo region with 7 fields and the Andahuaylas region 5 fields. Each individual is represented by a thin vertical line, which is partitioned into K colored segments that represent the individual's estimated membership fraction in K clusters (designated on the Y axis as a percentage). Black lines separate individuals of different populations. Populations are labeled below each figure.

(a)



(b)

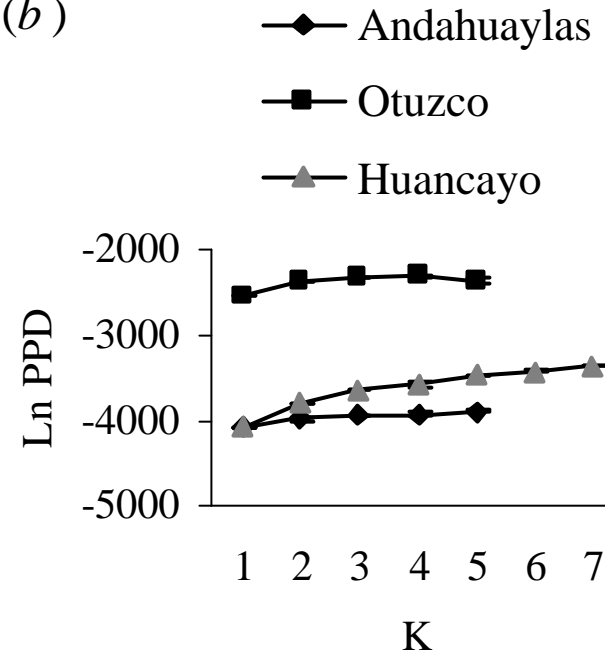


Figure 5 Posterior probability of the data (PPD) against the maximum number of clusters (K) considered; (a) analysis of the subset data with one field for each region, (b) analyses of the Otuzco, Huancayo and Andahuaylas regions.

3.5. DISCUSSION

To our knowledge, this is the first study that clearly defined the limit of a population for a soil-dwelling nematode. This goal was achieved by the complementary approach of both analysis of Isolation by Distance pattern and assignation methods of multilocus genotypes of the potato cyst nematode *Globodera pallida*.

3.5.1. No evidence of genetic differentiation for fields less than 50 km apart.

Inside a continuous potato production area (agronomic area; figure 1), nematodes found inside fields located at less than 50 km apart could be considered as belonging to the same population.

An absence of IBD below 50 km for the regression of $F_{ST}/(1 - F_{ST})$ against the logarithm of distance was observed and F_{ST} values for such pairs of fields were very low (< to 0.057). This result was consistent with the absence of IBD observed in the spatial autocorrelation of the Andahuaylas and Huancayo regions (when the most distant fields were excluded from the data set of the Huancayo region). The use of the assignation method confirmed this interpretation: in the Otuzco (fields 3, 4 & 5), the Huancayo (fields 2, 3, 4, 5 & 6) and the Andahuaylas regions, the clusters (K=5 or K=7) did not match the fields sampled, revealing very weak or no genetic structure among fields. For another cyst nematode species (*Heterodera schachtii*, a parasite of sugar beet) studied in a large sugar beet production area of the north of France, a low genetic differentiation among fields (even 175 km apart) was observed, suggesting a significant gene flow at such a scale (Plantard and Porte, 2004).

The absence of genetic structure could be due to large passive dispersion inside an agronomic area where *G. pallida* has a continuous distribution and is found at high density (until 9 billion cysts/ hectare). The efficiency of passive dispersion should be enhanced by the fact that the cyst is a conservation form containing hundreds of individuals that can stay viable more than 10 years. Passive dispersion could be due to natural factors (wind, irrigation, wild animal...) or human activities (transport of cysts in soil stuck to seed tubers, wheels or tools). The impact of human activities can for example be observed when comparing fields 7 of Huancayo and 5 of Andahuaylas (respectively 4,174 m and 4,118 m, the maximum altitude for potato culture) to their neighboring fields (which are not geographically isolated and belong to the same continuous production area). A higher genetic differentiation was observed than among other fields at similar distance of the same agronomic area. This differentiation could be due to lower tuber exchange, as at such an altitude, farmers live in self-sufficient communities (self-production of seed tubers and no exportation of seed tubers). Moreover, their extensive agriculture system with long rotations could favor recurrent bottlenecks in nematode populations, increasing genetic differentiation.

3.5.2. Increasing genetic differentiation among fields with geographic distance above 50 km.

Above 50 km, an IBD pattern (i.e. increase of genetic differentiation correlated with that of geographical distance) was detected among fields. We could notice that in our sample set, 53 km corresponded to the weakest distance between two fields without farming (between the field 1 and the field 4 in the Huancayo region; figure 1). The two methods [$F_{ST}/(1 - F_{ST})$ and autocorrelogram] used to detect IBD pattern with 23 fields exhibited the same pattern of IBD among regions. The IBD pattern among regions could be explained by the increase of genetic differentiation between populations due to the increasing impact of the geographic relief (acting as a geographic barrier to *Globodera pallida* passive dispersion) with the increase of geographical distance between regions. However, the end of the spatial autocorrelation curve (23 fields) stops decreasing indicating that above the distance class [357 – 456 km] the genetic distance stops increasing with the geographical distance. At the same level of geographical distance, the $F_{ST}/(1 - F_{ST})$ ratio exhibits a high variance. These observations could be explained by the fact that alleles from very divergent populations were submitted to homoplasy, a feature already described for the microsatellite markers (Goldstein and Pollock, 1997; Orti et al., 1997; Estoup et al., 2002).

The individuals were strongly assigned to each of the 9 clusters (K=9) that matched clearly with the 9 regions (using one field representing each region). The same data set (9 fields for 9 regions) analyzed by a neighbor-joining clustering model with the D_{AS} genetic distance also showed groups clearly matching regions, with few individuals assigned to another region (data not shown). In the Andean Cordillera, as *G. pallida* was found between the altitudes of 2,700 m and 4,300 m, the populations are largely isolated by the high geographic relief (such as the Cordillera Blanca reaching 6,768 m at Huascarán top). These obstacles could prevent a passive dispersion due to natural factors (wind, wild animals). Commercial exchanges, thus transport of cysts due to human activities are also limited by such relief.

3.5.3. What is a population?

The figure of 50 km as the limit prior to detect IBD should be considered as a rough estimation. Indeed, inside a given region, the first evidence of genetic differentiation appeared when an isolated field was separated from others by area without farming (where *G. pallida* is absent). For example, the IBD pattern in the Huancayo region was mainly due to the presence in this data set of the field 1 (isolated by area without farming), as the IBD pattern disappears when the field was excluded (data not show). The use of the assignation method was consistent with this result: in the Otuzco and Huancayo regions, the individuals from fields which are isolated by area without farming (fields 1 & 2 of Otuzco and field 1 of Huancayo), were more strongly inferred to a single group compared to individuals sampled in fields belonging to an agronomic area (figure 4b).

This effect could also be seen in the analysis of F_{ST} values: in the Huancayo agronomic area, the genetic differentiation between fields 4 and 6, which are 86 km apart, was weak (F_{ST} values = 0.01), while the genetic differentiation between fields 1 and 4, which are 53 km apart but are separated by an area without farming, was higher (F_{ST} values = 0.13). All those results indicate a highest genetic differentiation for fields isolated by area without farming.

Finally, inside a given agronomic area, *Globodera pallida* does not behave as an animal with discrete populations but rather as an organism with continuous populations and substantial gene flow preventing the differentiation due to genetic drift over large areas. Quite similarly to plants (Hamrick and Godt, 1990; Hamrick et al., 1992), nematodes are characterized by their absence of (or very reduced) active dispersal coupled with long distance passive dispersal. In Peru, an IBD was observed, only above 50 km and is associated with areas without any culture of potato or major geographical barriers such as deep valleys or high mountains where found among the fields considered. Because we hypothesize that passive dispersal due to their small size is a key process to explain this pattern, the genetic structure observed for *G. pallida* could also be relevant to numerous other soil organisms. In the absence of any similar study, we can hardly extend our results to other soil organisms. However, we think that the combine analysis of IBD patterns and clustering methods constitute a powerful approach to determine the limit of populations of such organisms.

Acknowledgements

We would like to thank the “Servicio Nacional de Sanidad Agraria” (SENASA, Peru), “Instituto Nacional de Investigación Agraria” (INIA, Peru) and particularly Dr María Scurrah, Dr Elsa Carbonell Torres and Ing Susana Chumbiauca for all their help in the sampling of potato cyst nematode in Peru. This work was financially supported by the INRA department “Santé des Plantes et Environnement” and “la Région Bretagne”. The French “Ministère des affaires étrangères” provided fund for the trip. We would also like to thank Katell Jolivet, Éric Grenier and Didier Mugniéry for useful comments on a previous version of the manuscript. Finally, we thank Mrs Sylvie Valette, Mrs Pauline Casters-Picard for their technical help.

References

- Arnaud, J. F. 2003 Metapopulation genetic structure and migration pathways in the land snail *Helix aspersa*: influence of landscape heterogeneity. *Landscape Ecol.* **18**, 333-346.
- Canto Saenz, M. & Mayer de Scurrah, M. 1977 Races of the potato cyst nematode in the Andean region and a new system of classification. *Nematologica* **23**, 340-349.
- Epperson, B. K. & Li, T. Q. 1997 Gene dispersal and spatial genetic structure. *Evolution* **51**, 672-681.
- Estoup, A., Jarne, P. & Cornuet, J. M. 2002 Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Mol. Ecol.* **11**, 1591-1604.
- Goldstein, D. B. & Pollock, D. D. 1997 Launching microsatellites: a review of mutation processes and methods of phylogenetic inference. *J. Hered.* **88**, 335-342.
- Goudet, J. 2001 FSTAT, version 2.9.3, a *Program to Estimate and Test Gene Diversities and Fixation Indices*. Available from www.unil.ch/izea/software/fstat.html. Updated from Goudet (1995).
- Hamrick, J. L. & Godt, M. J. W. 1990 Allozyme diversity in plant species. In *Plant population genetics, breeding, and genetic resources* (ed. A. H. D. Brown, M. T. Clegg, A. L. Kahler, B. S. Weir), pp. 43-63. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc.
- Hamrick, J. L., Godt, M. J. W. & Sherman-Broyles, S. L. 1992 Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New For.* **6**, 95-124.
- Hijmans, R. J. & Spooner, D. M. 2001 Geographic distribution of wild potato species. *Am. J. Bot.* **88**, 2101-2112.
- Hutchison, D. W. & Templeton, A. R. 1999 Correlation of pairwise genetic and geographic distance measures: Inferring the relative influences of gene flow and drift on the distribution of genetic variability. *Evolution* **53**, 1898-1914.

- Jin, L. & Chakraborty, R. 1994 Estimation of Genetic-Distance and Coefficient of Gene Diversity from Single-Probe Multilocus Dna-Fingerprinting Data. *Mol. Biol. Evol.* **11**, 120-127.
- Koch, R., van Luenen, H. G. A. M., van der Horst, M., Thijssen, K. L. & Plasterk, R. H. A. 2000 Single nucleotide polymorphisms in wild isolates of *Caenorhabditis elegans*. *Genome Res* **10**, 1690-1696.
- Norton, D. C. & Niblack, T. L. 1991 Biology and ecology of nematodes. In *Manual of agricultural nematology* (ed. W. R. Nickle), pp. 47-72. New-York: M. Dekker.
- Orti, G., Pearse, D. E. & Avise, J. C. 1997 Phylogenetic assessment of length variation at a microsatellite locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 10745-10749.
- Palumbi, S. R. 1994 Genetic Divergence, Reproductive Isolation, and Marine Speciation. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **25**, 547-572.
- Picard, D., Plantard, O., Scurrah, M. & Mugniéry, D. 2004 Inbreeding and population structure of the potato cyst nematode (*Globodera pallida*) in its native area (Peru). *Mol. Ecol.* **13**, 2899-2908.
- Plantard, O. & Porte, C. 2004 Population genetic structure of the sugar beet cyst nematode *Heterodera schachtii*: a gonochoristic and amphimictic species with highly inbred but weakly differentiated populations. *Mol. Ecol.* **13**, 33-41.
- Pritchard, J. K., Stephens, M. & Donnelly, P. 2000 Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**, 945-959.
- Rosenberg, M. S. 2001 PASSAGE, version 1.1, *Pattern Analysis, Spatial Statistics, and Geographic Exegesis*. Department of Biology, Arizona State University, Tempe AZ.
- Rosenberg, N. A., Pritchard, J. K., Weber, J. L., Cann, H. M., Kidd, K. K., Zhivotovsky, L. A. & Feldman, M. W. 2002 Genetic structure of human populations. *Science* **298**, 2381-2385.
- Rousset, F. 1997 Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics* **145**, 1219-1228.

- Slatkin, M. 1993 Isolation by distance in equilibrium and nonequilibrium populations. *Evolution* **47**, 264-279.
- Sokal, R. R., Smouse, P. E. & Neel, J. V. 1986 The genetic structure of a tribal population, the Yanomama indians. XV. Patterns inferred by autocorrelation analysis. *Genetics* **114**, 259-287.
- Sokal, R. R. & Wartenberg, D. E. 1983 A test of spatial autocorrelation analysis using an isolation-by-distance model. *Genetics* **105**, 219-237.
- Stevens, M. I. & Hogg, I. D. 2003 Long-term isolation and recent range expansion from glacial refugia revealed for the endemic springtail *Gomphiocephalus hodgsoni* from Victoria Land, Antarctica. *Mol. Ecol.* **12**, 2357-2369.
- Stone, A. R. 1985 Co-evolution of potato cyst nematodes and their host: implication for pathotypes and resistance. *Bulletin OEPP* **15**, 131-137.
- Vekemans, X. & Hardy, O. J. 2004 New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. *Mol. Ecol.* **13**, 921-935.
- van der Wurff, A. W. G., Isaaks, J. A., Ernsting, G. & Van Straalen, N. M. 2003 Population substructures in the soil invertebrate *Orchesella cincta*, as revealed by microsatellite and TE-AFLP markers. *Mol. Ecol.* **12**, 1349-1359.
- Weir, B. S. & Cockerham, C. C. 1984 Estimating F-statistic for the analysis of population structure. *Evolution* **38**, 1358-1370.
- Wright, S. 1943 Isolation by distance. *Genetics* **28**, 114-138.
- Wright, S. 1951 The genetical structure of populations. *Ann. Eugenics* **15**, 323-354.
- Wright, S. (ed) 1978 *Evolution and the genetics of populations. A treatise in four volumes. Volume 4. Variability within and among natural populations.* Chicago, IL USA: University of Chicago Press.

CHAPITRE IV

**Une colonisation du sud vers le nord de la
Cordillère Andine par le nématode à kyste de
la pomme de terre au cours des temps
géologiques suggère de multiples
changements d'hôtes des espèces sauvages
aux espèces cultivées**

Dans le chapitre précédent lorsque l'on considère séparément chacune des trois régions agricoles étudiées, aucun IBD ni aucune structuration génétique (à l'exception des parcelles de hautes altitudes ; cf. paragraphe 6.1.2) n'ont été observés. Nous émettons donc l'hypothèse qu'il n'y a qu'une seule population à l'intérieur d'une région agricole où la distribution de *G. pallida* est continue de par la distribution continue de sa plante hôte. Par contre, un patron d'isolement par la distance émerge dès l'apparition de zones exemptes de cultures entre bassins de production mais ne devient plus détectable pour les régions séparées par des distances supérieures à ~ 400 km. L'absence de détection d'IBD peut être expliquée par le type de marqueur utilisé (loci microsatellites) qui serait soumis à l'homoplasie ou par des événements historiques (colonisation, fragmentation...) à l'origine de la mise en place de lignées entre lesquelles le flux génique serait nul ou négligeable. Dans ce chapitre IV, nous allons donc maintenant nous intéresser aux causes de la disparition de l'IBD à des distances supérieures à 400 km et aux relations historiques entre les populations.

Si l'approche de la génétique des populations, nous a permis de décrire le patron génétique actuel de *Globodera pallida* dans des parcelles cultivées de pommes de terre, ce n'est bien que parce que ce patron est issu de processus s'étant déroulés au plus au cours de quelques milliers de générations. En effet, la génétique des populations ne nous permet pas d'appréhender des processus évolutifs ayant eu lieu au cours de périodes beaucoup plus longues [dizaine de milliers d'années (glaciation) voire de millions d'années]. La phylogéographie intraspécifique fait le lien entre la génétique des populations et la systématique (Avice *et al.* 1987). La phylogéographie, nous permet donc de retracer l'histoire entre taxa à une échelle populationnelle.

Avant de développer le contenu de ce chapitre, nous allons brièvement introduire l'approche phylogéographique. La systématique hiérarchise le classement des organismes vivants en différents rangs taxonomiques (espèce, genre, famille...). Cette classification permet de mieux appréhender l'immense biodiversité de la planète, mais ne doit pas faire oublier que la diversité des êtres vivants est issue du hasard (mutation) et de la sélection suivant un processus continu dans le temps (Kupiec et Soniguo, 2000). Parmi les rangs taxonomiques utilisés, le classement en espèces (tout du moins lorsque celles-ci sont basées sur le concept biologique *i.e.* la possibilité de croisement engendrant une descendance viable et fertile) est certainement le moins arbitraire. Toutefois, le processus de spéciation est continu dans le temps et dans l'espace (figure 4.1B). Autrement dit, la phylogénie dans le sens macroévolutif est inéluctablement une extrapolation de la microévolution (Avice *et al.* 1987). Le classement en espèces reste donc arbitraire dans le sens où il

impose de ranger les organismes en deux catégories à un temps donné alors qu'ils sont en perpétuelle évolution. Il est donc plus ou moins facile de définir les limites d'une espèce notamment en fonction du degré d'achèvement du processus de spéciation. Chez les vertébrés, la mise en place de barrières à la reproduction et les fortes variations morphologiques facilitent le classement en espèces. A l'opposé, certains organismes comme les nématodes dont la morphologie varie peu (cf. paragraphe 1.1) et la lente mise en place de barrières à la reproduction (cf. paragraphe 6.3) rendent le classement en espèces plus ténu. La phylogéographie est à l'interface entre la microévolution et la macroévolution (figure 4.1A ; Avise 2000) en appréhendant la notion d'espèce d'une manière évolutive. La phylogéographie est une approche du processus de spéciation qui décrit sa mise en place à un moment précis du temps. Elle permet de retracer l'histoire de la colonisation d'une espèce en confrontant les relations de parentés entre des populations ou entre des dèmes (groupes de populations) avec leur distribution géographique.

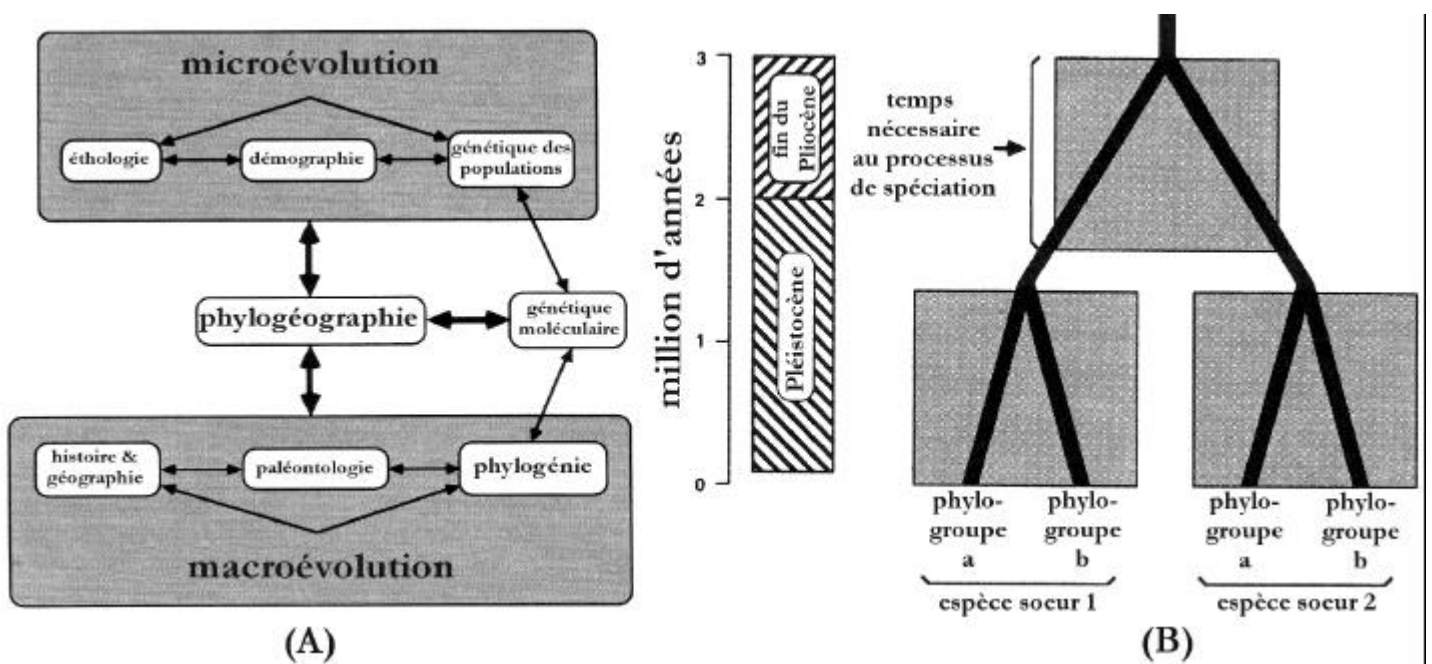


Figure 4.1 : (A) la phylogéographie est à l'interface de domaines scientifiques bien établis. (B) L'approche phylogéographique permet d'appréhender le processus de spéciation. Le processus de spéciation se met en place dans la durée ; dans ce schéma, la durée de spéciation a été estimée à partir de données de vertébrés (d'après Avise, 2000).

Les relations historiques des populations de *G. pallida* ont été retracées dans ce chapitre. Pour reconstruire cet arbre phylogénétique, trois distances génétiques ont été calculées avec huit loci microsatellites entre 24 parcelles contaminées par *G. pallida*, plus une population de *Globodera mexicana* pour enraciner l'arbre. Comme la résolution de l'arbre obtenu est faible, le gène mitochondrial cytochrome b de 32 individus a été analysé pour confirmer les résultats obtenus avec les marqueurs microsatellites. Les deux arbres analysés sont confrontés à la distribution géographique des individus considérés. Par la suite nous chercherons à savoir s'il existe une correspondance entre les arbres phylogénétiques et la distribution géographique des individus considérés et si celle-ci reflète la route de la dispersion de la pomme de terre cultivée ou si elle est antérieure ? Pour répondre à cette question, nous tenterons de calibrer une horloge moléculaire.

A South-to-North colonisation of the Andean Cordillera by the potato cyst nematode during geological times suggests multiple host shifts from wild to cultivated potatoes

D. PICARD & O. PLANTARD

UMR INRA-ENSAR BiO3P, Domaine de la Motte, B.P. 35327, 35653 Le Rheu cedex, France.

Date of receipt:

Keywords: microsatellite, cytochrome b, *Globodera pallida*, pest, phytoparasitic, potato cyst nematode, PCN, Peru, Phylogeography

Corresponding author: O. Plantard, UMR INRA-ENSAR BiO3P, Domaine de la Motte, B.P. 35327, 35653 Le Rheu cedex, France. Fax number: 33 2 23 48 51 50; plantard@rennes.inra.fr

Running title: potato cyst nematode phylogeography

All sequences have been deposited in GenBank under Accession Nos. AY851617 - AY851648 and AY8516

4.1. Introduction

The evaluation of human activities on the genetic variability of plant or animals is an old issue in evolutionary biology (Darwin, 1883). The recent analysis of polymorphic molecular markers that trace past events with the help of population genetics tools has allowed improvement of our understanding of such processes. After having placed those results in a geographical context, it has been possible to identify the centre of diversity of numerous crops (Heun *et al.*, 1997; Matsuoka *et al.*, 2002) and to retrace the route followed by men when they have spread such crops. In most cases, the relative impact of man (during domestication and spreading of a crop) is assessed relative to the natural variability of the wild plant from which the crop issued. This phylogeographical approach can also be applied to pests and has been especially fruitful to identify the origin of non-indigenous pests (Brasier *et al.*, 1999; O'Donnell *et al.*, 2000; Davies *et al.*, 1999). However, this phylogenetical approach is limited by the huge dispersal abilities of most pest organisms especially for wind dispersed fungi (but see Aguilar *et al.*, 2004 for the specific case of symbiotic bacteria associated with the roots of its host plant). For example, it has been shown that potato blight has spread across most of Europe from west to east in a few months (Austin Bourke, 1964). However, without any survey by man of this spread in “real time”, it would not have been possible to mark out the routes followed by this pathogen because no molecular signature of such a rapid event could be kept in the fungal genome. Thus, the identification of the routes followed by a pest (both in space and time) can hardly be developed for crops or pests that have a long co-evolutionary history, prior to human domestication (but see Stahl *et al.*, - 1999 - for an example of molecular signatures in the plant genome due to millions of years of interaction with its parasite).

Taking advantage of the still little pertubated phylogeographical patterns of plants in South America (numerous wild potatoes are still present in the Central Andes), we have followed a phylogeographical approach to a specialised pest with weak active dispersal abilities and have studied its genetic variability in its centre of origin (which is also the centre of origin of its host crop).

Native to the Central Andes (Evans & Stone, 1977), the potato cyst nematode *Globodera pallida* is an obligatory parasite of the genus *Solanum*, its unique host plant. Once inside the root, the nematode larva modifies the expression of some plant cells to produce a feeding cell (syncytium) to get nutrients from its host-plant (Davis *et al.*, 2004). Such a close association between the parasite and its plant suggest a long co-evolutionary history between *G. pallida* and *Solanum spp* (Stone, 1979). Moreover, numerous resistance genes have been found

in germplasm of wild *Solanum* species from South America (Castelli *et al.*, 2003), where a hotspot of species richness lies in Peru and Bolivia (Hijmans & Spooner, 2001).

Globodera pallida is a major pest of potatoes in South America, especially in the Andean Cordillera but also in Europe where it has been introduced since the XIX century. As the potato culture is estimated to have began 5000 years ago in the Andean Cordillera (Thurston, 1994), Peruvian growers must have been faced with the impact of potato cyst nematode for along time. It has been hypothesized that the 8 to 10 years long rotation of potato crops conducted by Incas avoided severe losses due to potato cyst nematodes. Indeed, nematode larvae are able to survive inside cysts in soils for almost 10 years, and only such long rotations allowed time for population levels to fall below the threshold of acceptable damage (Thurston, 1994). We have addressed two main questions on this plant-pathogen system: (1) is there any geographical structure in the genetic variability of *G. pallida* sampled in fields of its native area? (2) when did the phylogeographical pattern observed take place: following human domestication of potatoes (i.e. the spread of the nematodes would have been influenced by human activities) or before?

To address those issues, we have sampled populations along a 1500 km transect from the southern range of *G. pallida* (Titicaca lake) to the north border of Peru and genetically characterized them with two complementary molecular markers. Five clades were recognized, revealing a clear South-to-North pattern with decreasing genetic variability. The large genetic divergences among those clades suggest that the different clades diverge far before human settlement, and that those ancient populations of nematodes have independently made multiple host shifts from wild to cultivated potatoes. The consequences of this finding to control this pest both in its native and introduced areas will be discussed.

4.2. Materials and Methods

A sampling program was conducted in 2002 from 2,500 m to 4,300 m along the Andean Cordillera in Peru to collect *Globodera pallida* cysts (see Picard *et al.*, 2004 for a description of the methods to sample soil and to extract cysts from the soil). Forty two samples (41 from potato fields mainly cultivated with *Solanum tuberosum* subsp. *andigenum* and one, the Cajabamba sample, from a soil collected under a wild *Solanum* species - *S. chiquidenum* -) containing cysts were selected, covering a 1500 km North to South transect from the border with Ecuador to the Bolivian border (see figure 1). Although a few records of *G. pallida* from Bolivia has been reported, it seems that this species is replaced to the south of the 15.6° S in latitude by another potato cyst nematode, *G. rostochiensis* (Evans, Franco & Scurrah 1975, Stone 1979, Franco *et al.*, 1998). However, the species

identification of each individual sequenced or genotyped in the present study has been checked by PCR-RFLP of the ITS region (see Picard *et al.*, 2004 for a description of this method).

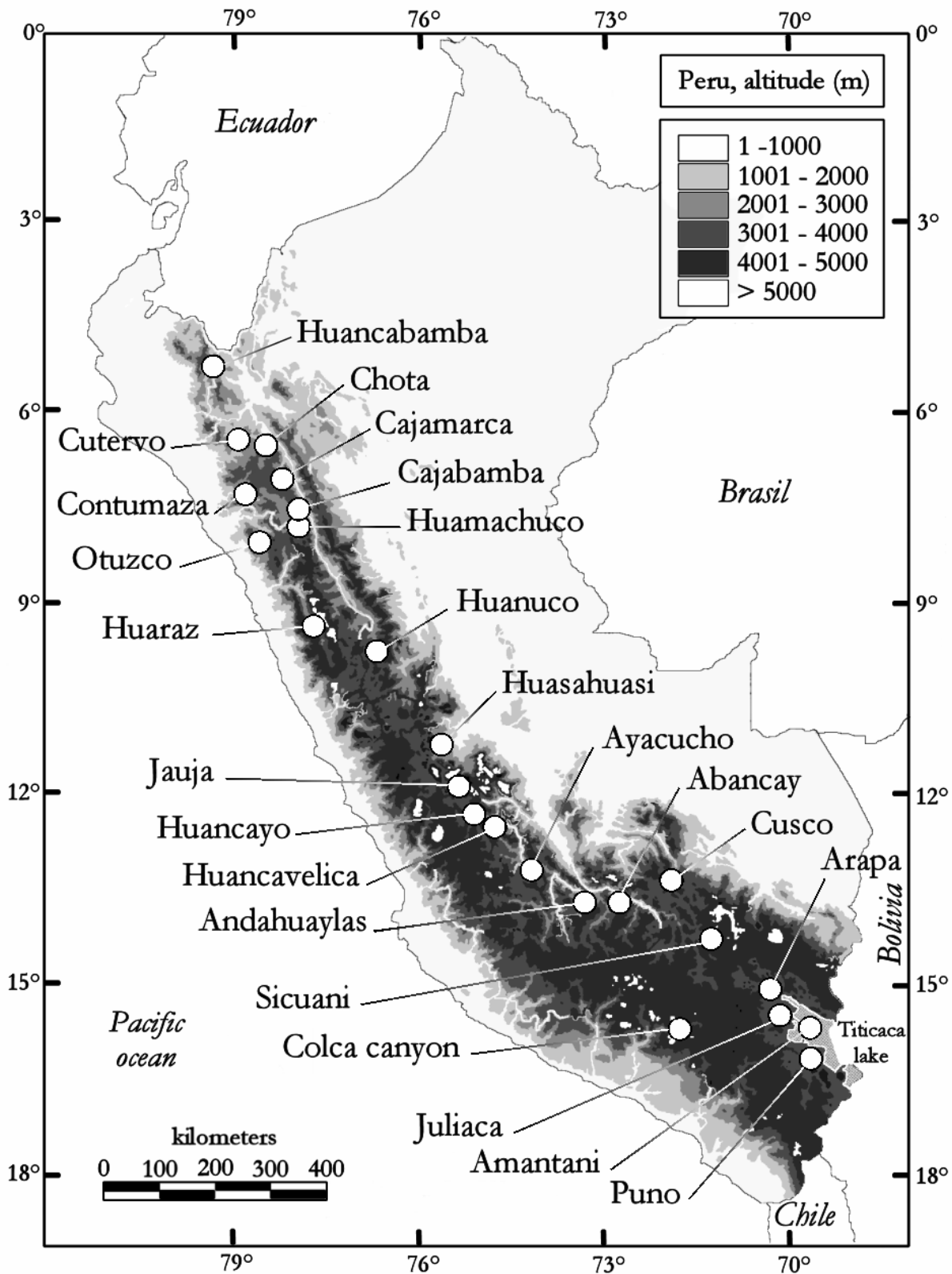


Figure 1 Location of *G. pallida* samples in Peru. Sample sites (symbolized by white points) are located at high altitude (from 2,570 m to 4174 m).

Two specific primers (INRAcytbL: 5'-GGGTGTGGCCTTGTTATTTTC-3'; INRAcytbR: 5'-ACCAGCTAAAACCCCATCCT-3') were designed from the complete cytochrome b sequence of a Scottish population of *G. pallida* obtained by Armstrong *et al.* (2000). PCR products using those primers enabled the amplification of partial sequences (872 bp) of the cytochrome b gene (cytb) from 32 samples of the 42 mentioned above. Mitochondrial DNA preparation and PCR amplification were performed as described in Plantard & Porte (2003), except that mtDNA was extracted from one cyst (*i.e.* from 100 to 500 juveniles sharing the same mother instead of one larva). Five to ten PCR amplifications from the same DNA extract (*i.e.* from one cyst) were pooled to obtain enough DNA for sequencing. The amplified DNA was sent to Macrogen inc. for purification and sequencing. DNA sequences were aligned by eye. Because the sequences are protein-coding and have no introns or gaps, alignment was straightforward.

Model parameters for likelihood searches were estimated using Modeltest (Posada & Crandall, 1998), which compares goodness of fit of models using the likelihood ratio test. The best fitting model for the *Globodera* sequences was HKY85+G, with a ts/tv ratio=3.9338 and a gamma distribution shape parameter=0.2657. We used the base frequency values suggested by the model (pA=0.1659, pC=0.1391, pG=0.1907). Using PHYLIP package version 3.62 (Felsenstein, 2004), three methods of phylogenetic analysis were performed: maximum-likelihood (ML; Felsenstein & Churchill, 1996) using algorithm analogous to HKY85 model, maximum-parsimony (MP; Fitch, 1971; Eck & Dayhoff, 1966; Kluge & Farris, 1969) and neighbor-joining (NJ; Kishino & Hasegawa 1989; Felsenstein & Churchill 1996) using the F84 model. The robustness of the ML, MP and NJ results was assessed by bootstrap analysis (Felsenstein, 1985) involving 500 iterations. A sequence of *G. mexicana* (the sister group of *Gp*, producing viable hybrid with *G. pallida*, but only when using males of *G. mexicana* with females of *G. pallida* – Thiéry *et al.*, 1997 -) was obtained from a sample collected in 1985 in Mexico by D. Mugniery on wild non-tuberous *Solanum*, and used as an outgroup in our phylogenetic analysis.

Twenty four populations (see Table 1) of the 42 mentioned above were analyzed with 8 polymorphic microsatellite makers (9 populations were already used in Picard *et al.*, 2004; see this paper for the description of the DNA extraction method, the PCR conditions and the allele identification method). All individuals genotyped with the 8 microsatellite loci have at least one individual from the same field or from neighboring fields in the cytochrome B analyses, excepted for the Huanuco population. Thirty nine individuals of *G. mexicana* were genotyped with 6 microsatellite markers (as GP36 and GP46 loci failed to amplify *G. mexicana*) and used as an outgroup in our phylogenetic analysis. To avoid artefacts caused by poor DNA extract quality, all individuals with more than two amplification failures among the eight loci were excluded.

Clade	Region	N	A
Vm	Huancabamba	38	35
	Cutervo	38	26
	Cajamarca	39	34
	Contumaza	38	32
	Otuzco-1	38	22
	Otuzco-2	37	20
	Otuzco-3	40	27
	Huaraz	38	36
	Huanuco	40	35
IVm	Huasahuasi	37	45
	Jauja-1	37	38
	Jauja-2	38	39
	Jauja-3	40	42
	Huancayo-1	36	43
	Huancayo-2	37	48
	Huancavelica	33	47
IIIIm	Ayacucho	39	51
	Andahuaylas-1	39	51
	Andahuaylas-2	40	61
	Andahuaylas-3	37	57
	Andahuaylas-4	37	62
IIm	Cusco-3	40	61
Im	Arapa	40	29
	Amantani-2	40	52

Table 1: Sample size (N) and mean allelic richness (A) based on the rarefaction index method ($n=26$; ElMousadik & Petit, 1996) for each field population genotyped.

To calculate genetic distances among populations, we considered that our microsatellite loci mutate according to the IAM mutation model (see Picard *et al.*, 2004 for a justification of this choice). For tree reconstruction, D_A distances, a distance based on the IAM model (Nei *et al.*, 1983), were used as this method is estimated to be superior to the others in topology construction (Nei, 1995; Takezaki & Nei 1996; Goldstein & Pollock, 1997). We used D_C (Cavalli-Sforza & Edwards, 1967) and D_m (Nei, 1973) distances (both based on the IAM model) to compare the topology of the three trees obtained. All the genetic distances and the NJ trees were performed using Populations 1.2.28 (available at <http://www.cnrs-gif.fr/pge>). Statistical support estimates for phylogram nodes were obtained by resampling loci across 500 bootstrap iterations for each genetic distance. The allelic richness of each population was estimated by the rarefaction index (ElMousadik & Petit, 1996) using the Populations 1.2.28 software. This method avoids the biased error of the allele number variation due to different sample sizes among populations (sample size is fixed to the smallest number of individual genotypes in a field, i.e. $n=26$). In these analyses, all individuals with amplification failure at one locus were excluded because a null amplification is considered as an absence of an allele that can lead to an underestimation of the allelic richness.

4.3. Results

Prior to phylogenetic analysis, we looked for any evidence of saturation in our data set (cf multiple substitutions at the same base that are especially frequent for transitions at the third position of codons; Page & Charleston, 1998). With that aim, we partitioned our data set in to six subsets (i.e. transitions and transversions among the three codon positions; see for example Groth, 1998). Then we examined the scatterplot of pairwise total divergence versus pairwise divergence calculated from each data set. All six data sets did not exhibit any evidence of saturation as no plateau was observed in the six scatterplots, even for pairwise comparisons involving the outgroup (Annexe 6).

4.3.1. Phylogeographical pattern based on the cytochrome B sequences

ML, MP and NJ analyses of the *cytb* genes produced trees with similar topologies with nodes well supported by high bootstrap values (figure 2a). Five well supported and monophyletic clades were clearly differentiated with the most basal group corresponding to the southern clade and the most derived group corresponding to the northern clade (figure 2a). Thus, the northern clade (clade Vc, Contumaza) is the sister group of the clade immediately to the south (i.e. clade IVc, Huancayo); the group formed by the clades Vc and IVc is the sister group of the clade immediately to the south (i.e. clade IIIc, Andahuaylas); the group formed by clades Vc, IVc and IIIc is the sister group of the clade immediately to the south (i.e. clade IIc, Cusco); and finally the southern clade (i.e. clade Ic, Titicaca Lake), is the sister group to all other clades. Thus, it is likely that the origin of *G. pallida* is around the Titicaca lake in the central Andes (Altiplano), and that the species dispersed subsequently northward. This South-to-North pattern is supported by robust nodes between clades (except for the clade IIc with bootstrap values < 50%). Inside clades, sequences from the same location (for example the 3 sequences from Amantani, the 2 sequences from Puno in clade Ic) are always identical or form a monophyletic group (for example the 3 Cusco sequences from clade IIc), except one sequence among the three from Puno (clade Ic) and Andahuaylas (clade IIIc). While the largest geographical area is covered by the Northern clade (clade Vc), the largest genetic distance among populations of a given clade is observed in the three Southern clades (maximum distance between pair of populations: clade Ic: 0.07 > clades IIc and IIIc: 0.05 > clade IVc: 0.009 > clade Vc: 0.003; see also the branch lengths inside those clades in figure 2a). The pairwise genetic distances among the three Southern clades (=0.05) were larger than between the two Northern clades (=0.01). This pattern is congruent with the interpretation that the northern regions (i.e. clades IVc and Vc) have been more recently colonized by *G. pallida* than southern regions (i.e. divergence time is shorter between the two terminal clades than among southern clades).

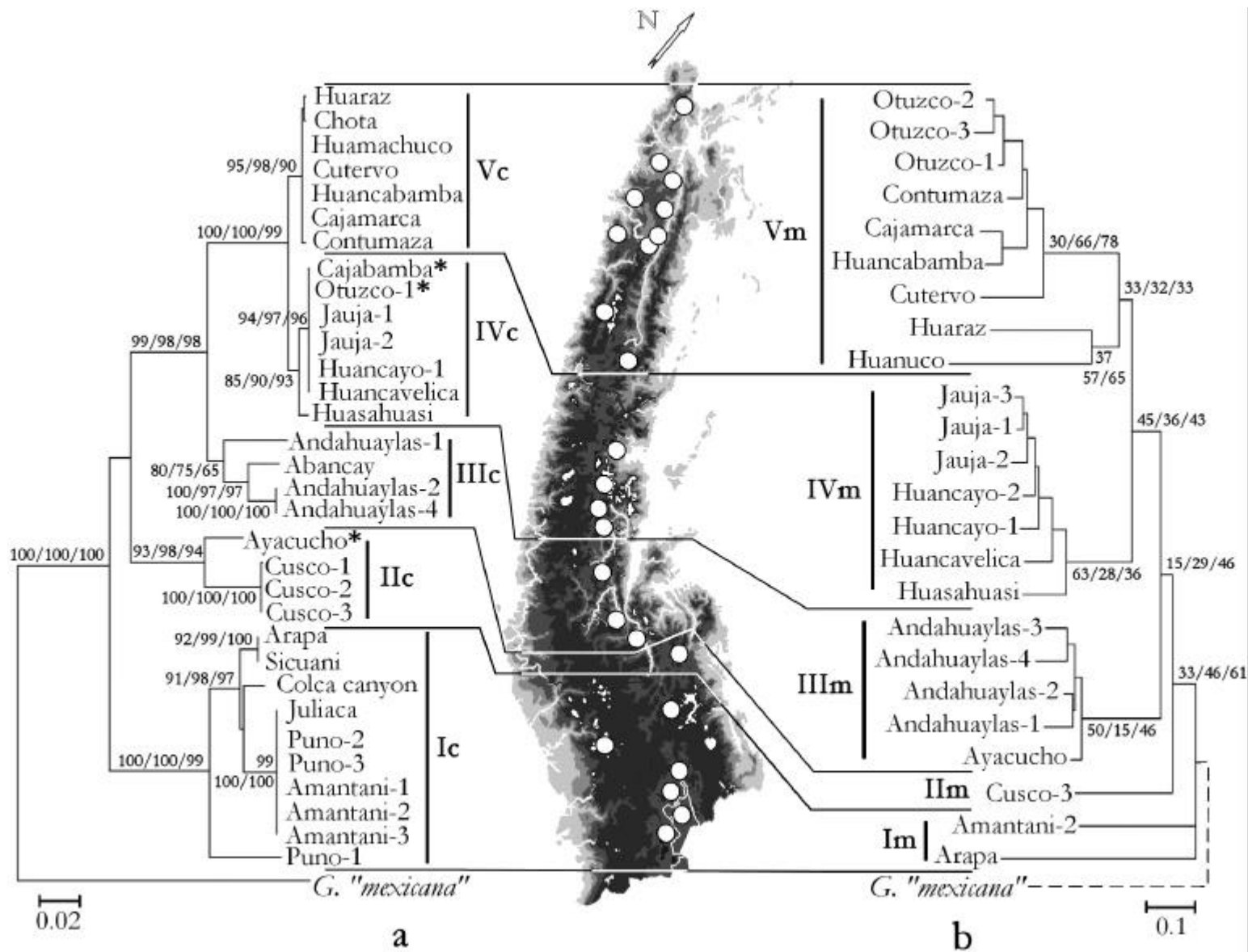


Figure 2: Agreement between phylograms based on mitochondrial marker (a), and nuclear markers (b). The map indicates the limit of the five clades (numbered I to V from south to north) along the Andean Cordillera. (a) Maximum-likelihood analysis based on Cytochrome b partial gene (872 bp); Stars (*) symbolize haplotypes located outside the clade corresponding to their geographical origin (see text); bootstrap values (500 iterations) are indicated for the nodes common to the tree analyses (neighbor-joining /maximum parsimony /maximum likelihood). (b) Neighbor-joining analysis, with a IAM genetic distance D_A , based on 8 microsatellite loci; numbers by nodes represent bootstrap (500 iterations) for the node between clades common to the three IAM genetic distance Methods ($D_m/D_c/D_a$).

Because a multipartite mitochondrial genome has been described in *G. pallida* with at least two different subcircles carrying the cytochrome B gene in the nematode population studied independent evolution of duplicated sequences located on different subcircles could preclude the use of this marker for phylogeographical and population genetics investigations (Armstrong *et al.*, 2000). However, sequence similarity of two clones from two subcircles over 581 bp of comparable sequence containing part of the ND3 and the CytB genes were found to be 99% identical (Armstrong *et al.*, 2000). Without any homogenizing process of gene sequences from different subcircles such as gene conversion, we would not have obtained a clear and geographically structured pattern at both the intra and the interclade level; moreover, the 6 identical sequences observed among the 10 fields of the clade Vc or among the 7 fields of the clade IVc would not be observed.

4.3.2. Phylogeographical pattern based on the microsatellite loci

The analysis of microsatellite data allows recognition of 5 monophyletic clades among the 24 populations studied (figure 2b). When considering clade position relatively to each other, the tree topology obtained with the three genetic distances (D_A , D_C , D_m) is identical with the most basal clades in the south and the most terminal clades in the north of the transect. Inside clades, neighbouring fields (for example the three Otuzco fields in clade Vm, the three Jauja fields in clade IVm) always form monophyletic groups (except the 2 Huancayo populations that form a paraphyletic group). However, the microsatellite tree is poorly resolved with a few nodes well supported by high bootstrap values. A South-to-North pattern was also observed with allelic richness analysis: the allele numbers increase towards the South, with the allelic richness of the clades Im (except the Amantani population), IIm & IIIIm nearly twice as high as in the clade Vm (Table 1). This decreasing South-to-North gradient is congruent with the hypothesis that the northern populations have been colonized more recently by *G. pallida*, after several allele losses due to genetic drift and *subsequent* bottleneck effects.

4.3.3. Comparison of the trees based on the mitochondrial and the nuclear markers

The topologies of the trees obtained using the cytochrome b sequences and the microsatellite loci were congruent (figure 2) and reveal the same phylogeographical regions. Only three cytb haplotypes do not belong to the same clade in both analysis: Cajabamba (which was not studied with the microsatellite loci but whose geographical location suggests as being part of clade V rather than IV), Otuzco [IVc *versus* Vm] and Ayacucho [IIc *versus* IIIIm], whose both geographical location suggests that the most likely assignment to a given clade is deduced from microsatellite data rather than from cytochrome B sequences. Contrarily to the location of a population in the

microsatellite tree which is based on the multilocus genotype of more than 30 individuals, the location of a cytochrome B haplotype is only based on one female. As different sequences could be present in a single field or in closely located fields (see for example the cases of the Puno sequences in clade Ic or the Andahuaylas sequences in clade IIIc), this marker is more prone to exhibit drastic differences in the location of an haplotype in the tree from one individual to the other. Finally, recent migrations – due to human transport of potato tubers for example – could also explain this assignment of an individual to a clade that does not correspond to the geographical location where it has been sampled.

Apart from tree topology, a parallel between the mitochondrial and the microsatellite data can be made by the comparisons of the South-to-North pattern of reduction in allelic richness for the microsatellite loci with the South-to-North pattern of reduction in branch lengths among populations of the same clade in the cytochrome B tree. The decreasing divergence time among populations from the basal clades of the trees to the terminal ones could explain this similar pattern in both markers.

The uses of the two molecular markers provide complementary information. Due to its slower mutation rate, the cytochrome B tree is not affected by saturation and homoplasy and is thus more efficient to resolve clades positions relatively to each other (as they have diverge for a longer time) than to resolve populations positions inside clades. Bootstrap values on clade nodes are much weaker for the tree based on microsatellite data that are more subject to homoplasy due to their high mutation rates. However, in terminal and northern clades (such as V), which are constituted by populations that have diverged more recently, too few polymorphisms are observed among the cytochrome B sequences, preventing the resolution of the phylogenetical relationships among populations inside this clade. At this spatial and temporal scale, the microsatellite data are more efficient as illustrated by (1) the larger divergence between the Huanuco and Huaraz populations relatively to all the other populations from this clade Vm as expected due to their geographical isolation (figure 2b) (while the Huaraz haplotype does not diverge from other haplotypes of the Vc clade; figure 2a) and by (2) higher bootstrap values among populations of clade Vm than southern clades (data not shown).

4.4. Discussion

Our investigations on the phylogeography of the potato cyst nematode *G. pallida* in the Central Andes (Altiplano) clearly illustrate a northward expansion of populations from the South of Peru (around the Titicaca lake) to the north.

As all the nematodes genotyped and sequenced in the present study have been sampled in potato fields (except one), the South-to-North pattern identified among the five clades could result in two alternative hypothesis : (h1) a recent range expansion of the nematodes due to the spread of potato culture by man that has occurred during the last few thousand years (Jensen & Kantz, 1974) or (h2) recent and multiple host shifts from wild to cultivated potato of nematodes that were already present in the soil long before man cultivated potato in those areas.

The high level of *cytb* sequence divergence among the different peruvian clades of *Gp* species (12%) is identical to the one observed between *Caenorhabditis briggsae* and *C. elegans* that are considered to have diverged from each other between 23 to 120 My ago (Prasad & Baillie, 1989; Heschl & Baillie, 1990, Lee et al., 1992; Kennedy et al., 1993; Thacker et al., 1999; Coghlan & Wolfe, 2002). Studies in other animals provide similar estimations of the mutation rates of the cytochrome B gene (insects: Diptera: 27%/~225 My, Coleoptera: 20%/~265 My, Lepidoptera: 20%/~195 My (Simmons & Weller 2001); rodents: mouse/rat: 19%/~9-12 My; Jaeger *et al.*, 1986). As the generation time of *Globodera pallida* is much longer than for *Caenorhabditis spp* (one year versus a few days), this estimation of divergence time could be under-estimated for the plant-parasitic nematode. However, the Tylenchida and Rhabditida are distant nematode orders among which the calibration rate could be disparate. Alternatively, the mutation rate of the *cytb* gene of *G. pallida* relatively to other nematodes could also be affected by the multipartite structure of its mitochondrial genome. The cytochrome B mutation rate of *Meloidogyne spp.* (another genus of the Tylenchida order, like *Globodera*) has also been reported as accelerated relatively to *C. elegans* (Power *et al.*, 1993). However, those species have a short generation time. The species are parthenogenetic and crossing-over among mitochondrial molecules has been demonstrated (Lunt & Hyman, 1997). To estimate divergent times among clades, we have also sequenced a nuclear gene, the ribosomal ITS1-5.8S-ITS2, of individuals from three different clades (data not show). Using a calibration date with our ITS1-5.8S-ITS2 sequences (cf. paragraph 5.3 of annexe 3), the divergence time observed among the *G. pallida* clades corresponds to 16-11 My between “Amantani” and “Cusco-Huancabamba” clades and 8.9-6.1 My between the “Cusco” and “Huancabamba” clades (sequence divergence: Amantani *versus* Huancabamba = 1.9%; Amantani *versus* Cusco = 1.5%; Cusco *versus* Huancabamba = 0.8%).

Despite the need for these two markers to be more precisely assessed (especially with the help of precise calibration dates that are lacking for the whole nematode phylum), the divergence times enable the rejection of the hypothesis that the *G. pallida* expansion has been contemporaneous with the human spread of the cultivated potato during the 5000 last years.

The divergence time and the South-to-North pattern observed among the *G. pallida* clades match with the uplift of the Andean Cordillera that occurred firstly in central Andes (southern Peru and Bolivia) in the late Oligocene (~25My) followed by mountain uplift towards the north until now (Hartley, 2003; Sempere *et al.*, 1990; Gregory-Wodzicki, 2000; Rousse *et al.*, 2003; cf. annexe 3). A similar South-to-North pattern of dispersion (from Bolivia to Central America) has also been observed in another animal restricted to high altitude, the lizard genus *Proctoporus* (Doan, 2003).

Such a South-to-North pattern of decreasing genetic variability is frequently observed in Europe (see Taberlet *et al.*, 1998 for a review) or in North America (Avice, 2000) due to the recent colonization of northern latitudes from Southern refugia after the last ice ages. As similar climatic events also occurred during the Pleistocene in the Southern hemisphere, (Vuilleumier, 1969; Vuilleumier, 1971), a symmetric pattern is expected there. It has been observed at least once in a plant (*Solanum pimpinellifolium*) along the Peruvian coast (Caicedo & Schaal, 2004). Instead of such a North-to-South pattern of diversification, the opposite pattern is observed among the five *G. pallida* clades. This South-to-North pattern is not compatible with the hypothesis that the phylogeographical pattern observed for *G. pallida* is the result of warming following the last Pleistocene glaciations 12000 years ago. However, pleistocene glaciations may have affected population genetic variability of *G. pallida*. As in Peru this nematode is only found at high altitude (between 2000 and 4500 m; Evans *et al.*, 1975; Franco, 1977) and is adapted to cold climates (Evans & Stone, 1977), the range of this species could have moved down in altitude during periods of cooling, allowing gene flow among populations from different valleys that were previously isolated by the lower altitude limit of their range (Garcia Moreno *et al.*, 2004).

With such an ancient diversification of *G. pallida* populations, it's tentative to speculate that it reflects a co-evolutionary process of this specialised and obligatory endoparasite with its host-plant (as already postulated by Stone 1979 or Franco 1977 or Bakker *et al.*, 1993). A geographical coincidence can be observed between the two groups, as the hot spot for the tuber-bearing *Solanum* diversity is observed from 2,000 m to 4,000 m in the south part of Peru and in Bolivia (Hijmans & Spooner, 2001). The systematics of the *Solanum* genus is particularly complex and its phylogeny is still poorly resolved (Spooner & Hijmans, 2001). However, some elements are in favour of a South-to-North diversification hypothesis. For example, a molecular phylogeny based on cpDNA restriction enzyme in the second species rich series (series *Conicibaccata*) of the *Solanum* genus and the analysis of ploidy level among species (with diploid being the ancestral state - Carputo *et al.*, 2003), suggests a South-to-North pattern from Bolivia to Mexico (Castillo & Spooner, 1997).

To observe such an ancient genetic divergence between clades of *G. pallida* that are now associated to cultivated potatoes, *G. pallida* should have shifted from wild to cultivated potatoes

independently in each area corresponding to each clade. For specialized parasites (such as these nematodes) that modify the expression of some root cells transforming them into a transfer organ on which they feed (Davis *et al.*, 2004), the individuals that are able to develop on a crop often exhibit a narrow genetic pool (Goodwin *et al.*, 1994), characterizing the fact that all the parasites are derive from a single host shift onto the crop. To our knowledge, this study is the first one illustrating that an ancient phylogeographical pattern of a plant parasite can be studied by the investigation of this parasite on cultivated plants. Although extensive gene flow among populations of *G. pallida* inside a given region or clade (but not among regions) has been previously demonstrated (Picard *et al.*, 2004), the ancient divergence of the five *G. pallida* clades attested by this molecular signature is probably due to the specific life history traits of those soil nematodes (poor active dispersal abilities, long conservation and huge effective population size) slowing the homogenizing effect of a few individuals passively transported among clades on the genetic structure of the populations.

The tremendous genetic diversity and phylogeographical pattern exhibited by the *G. pallida* clades should be taken into account to efficiently control this pest. Plant breeding efforts may benefit from including representatives of each lineage inside *G. pallida* species when testing new resistant varieties increasing the likelihood that broad-based resistance, effective against all lineages of the *G. pallida*, is achieved (O'Donnell *et al.*, 2000). If a co-evolution between *G. pallida* and its host has occurred, the discoveries of new resistance sources could be helped by taking into account the distribution of the different wild *Solanum* species and by selecting taxa or accessions endemic from the region where the targeted *G. pallida* clade is found (see for exemple Castelli *et al.*, 2003, Chavez *et al.*, 1988; Turner *et al.*, 1989). Finally, the characterisation of the five clades corresponding to five geographical regions in the Andes could enable the identification of the origin of the parasite imported by humans all over the world and to detect if there was a single or multiple importation(s) in each country.

Finally, this study illustrates that the poorly known, but ecologically important soil dwelling organisms (Wardle & Ettema, 2002; Ettema *et al.*, 1998; Mortimer *et al.*, 1999), could also be especially interesting to describe phylogeographical patterns. Indeed, the study of such species with poor active dispersal abilities could provide a unique and more accurate phylogeographical pattern for ancient events than organisms with larger dispersal ability.

Acknowledgements

We would like to thank the “Servicio Nacional de Sanidad Agraria” (SENASA, Peru), “Instituto Nacional de Investigación Agraria” (INIA, Peru) and particularly Dr Maria Scurrah, Dr Elsa Carbonell Torres and Ing Susana Chumbiauca for all their help in the sampling of potato cyst nematode in Peru. This work was financially supported by the INRA department “Santé des Plantes et Environnement” and “la Région Bretagne”. The French "Ministère des affaires étrangères" provided fund for the sampling trip. We would also like to thank Eric Grenier and Didier Mugniéry for useful comments on the manuscript and Miss Pauline Casters-Picard for the conception of the figures. Finally, we thank Miss Sylvie Valette, Mr Abou Bakari-Kouassi, Mr Marcelo Trebejo and Mr Mario Curasi-Nina for their help.

References

- Aguilar OM, Riva O, and Peltzer E (2004) Analysis of *Rhizobium etli* and of its symbiosis with wild *Phaseolus vulgaris* supports coevolution in centers of host diversification. *PNAS* **101**, 13548-13553.
- Amstrong MR, Blok VC, Phillips MS (2000) A Multipartite Mitochondrial Genome in the Potato Cyst Nematode *Globodera pallida*. *Genetic*, **154**, 181-192.
- Austin Bourke PM (1964) Emergence of potato blight. *Nature*, **203**, 805-808.
- Avise JC (2000) *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, MA, 447p.
- Bakker J, Folkertsma RT, Rouppe van der Voort JN *et al.* (1993) Changing concepts and molecular approaches in the management of virulence genes in potato cyst nematodes. *Annual Review of Phytopathology*, **31**, 169-190.
- Brasier CM, Cooke DE, Duncan JM (1999) Origin of a new Phytophthora pathogen through interspecific hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **96**, 5878-5883.
- Caicedo AL, Schaal BA (2004) Population structure and phylogeography of *Solanum pimpinellifolium* inferred from a nuclear gene. *Molecular Ecology*, **13**, 1871-1882.
- Carputo D, Frusciante L, Peloquin SJ (2003) The role of 2n gametes and endosperm balance number in the origin and evolution of polyploids in the tuber-bearing solanums. *Genetics*, **163**, 287-294.
- Castelli L, Ramsay G, Bryan G *et al.* (2003) New sources of resistance to the potato cyst nematodes *Globodera pallida* and *G-rostochiensis* in the Commonwealth Potato Collection. *Euphytica*, **129**, 377-386.
- Castillo RO, Spooner DM (1997) Phylogenetic relationships of wild potatoes, *Solanum* series *Conicibaccata* (sect. *Petota*). *Systematic Botany*, **22**, 45-83.

Cavalli-Sforza LL, Edwards AWF (1967) Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *American journal of human genetics*, **19**, 233-257.

Chavez R, Jackson M, Schmiediche P *et al.* (1988) The importance of wild potato species resistant to the potato cyst nematode, *Globodera pallida*, pathotypes P4A and P5A, in potato breeding. II. The crossability of resistant species. *Euphytica*, **37**.

Coghlan A, Wolfe KH (2002) Fourfold faster rate of genome rearrangement in nematodes than in *Drosophila*. *Genome Research*, **12**, 857-867.

Darwin C (1883) *The Variation of Animals and Plants Under Domestication*, 2nd edn. New York: D. Appleton & Co. <http://www.esp.org/books/darwin/variation/facsimile/>

Davies N, Villablanca FX, and Roderick GK (1999) Bioinvasions of the Medfly *Ceratitis capitata*: Source Estimation Using DNA Sequences at Multiple Intron Loci. *Genetics* **153**, 351-360.

Davis EL, Hussey RS, Baum TJ (2004) Getting to the roots of parasitism by nematodes. *Trends in Parasitology*, **20**, 134-141.

Doan TM (2003) A south-to-north biogeographic hypothesis for Andean speciation: evidence from the lizard genus *Proctoporus* (Reptilia, Gymnophthalmidae). *Journal of Biogeography*, **30**, 361-374.

Eck RV, Dayhoff MO (1966) *Atlas of Protein Sequence and Structure 1966*, National Biomedical Research Foundation, Silver Spring, Maryland.

ElMousadik A, Petit RJ (1996) High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L) Skeels] endemic to Morocco. *Theoretical and Applied Genetics*, **92**, 832-839.

Ettema C, Coleman D, Vellidis G *et al.* (1998) Spatiotemporal distributions of bacterivorous nematodes and soil resources in a restored riparian wetland. *Ecology*, **79**.

Evans K, Franco J, Scurrah M (1975) Distribution of species of potato cyst-nematodes in South America. *Nematologica*, **21**, 265-269.

Evans K, Stone AR (1977) A review of the distribution and biology of the potato cyst-nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. *Pans*, **23**, 178-189.

Felsenstein J (1985) Confidence-limits on phylogenies, an approach using the bootstrap. *Evolution*, **39**, 783-791.

Felsenstein J, Churchill GA (1996) A hidden Markov Model approach to variation among sites in rate of evolution. *Molecular Biology and Evolution*, **13**, 93-104.

Felsenstein J (2004) Phylogeny Inference Package (PHYLIP), Version 3.62, University of Washington, Seattle.

Ferris VR (1979) Cladistic approaches in the study of soil and plant parasitic nematodes. *American Zoologist*, **19**, 1195-1215.

Fitch WM (1971) Toward defining the course of evolution: minimum change for a specified tree topology. *Systematic Zoology*, **20**, 406-416.

Franco J (1977) Studies on the taxonomy and biology of potato cyst nematodes *Globodera spp*. Mulvey and Stone 1976. PhD thesis, University of London, 325p.

Franco J, Oros R, Main G, Ortuno N (1998) Potato cyst nematodes (*Globodera* species) in South America. In: *Potato Cyst Nematodes, Biology, Distribution and Control* (eds. Marks RJ, Brodie BB), pp. 239-269. CAB International, Oxon.

Garcia-Moreno J, Navarro-Siguenza AG, Peterson AT *et al.* (2004) Genetic variation coincides with geographic structure in the common bush-tanager (*Chlorospingus ophthalmicus*) complex from Mexico. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **33**, 186-196.

- Goldstein DB, Pollock DD (1997) Launching microsatellites: a review of mutation processes and methods of phylogenetic inference. *Journal of Heredity*, **88**, 335-342.
- Goodwin SB, Cohen BA, Fry WE (1994) Panglobal Distribution of a Single Clonal Lineage of the Irish Potato Famine Fungus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **91**, 11591-11595.
- Gregory-Wodzicki KM (2000) Uplift history of the Central and Northern Andes: A review. *Geological Society of America Bulletin*, **112**, 1091-1105.
- Groth JG (1998) Molecular phylogenetics of finches and sparrows: Consequences of character state removal in cytochrome b sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **10**, 377-390.
- Hanotte O, Bradley DG, Ochieng JW *et al.* (2002) African pastoralism: genetic imprints of origins and migrations. *Science*, **296**(5566), 336-9.
- Hartley AJ (2003) Andean uplift and climate change. *Journal of the Geological Society*, **160**, 7-10.
- Heschl M, Baillie D (1990) Functional elements and domains inferred from sequence comparisons of a heat shock gene in two nematodes. *Journal of Molecular Biology*, **31**, 3-9.
- Heun M, Schafer-Pregl R, Klawan D *et al.* (1997) Site of Einkorn Wheat Domestication Identified by DNA Fingerprinting. *Science*, **278**, 1312-1314.
- Hijmans RJ, Spooner DM (2001) Geographic distribution of wild potato species. *American Journal of Botany*, **88**, 2101-2112.
- Jaeger JJ, Tong H, Denys C (1986) The age of *Mus-Rattus* divergence: paleontological data compared with the molecular clock. *Comptes rendus de l'Academie des Sciences*, **302**, 917-922.
- Jensen PM, Kantz RR (1974) Preceramic transhumance and andean food production. *Economic Botany*, **28**, 43-55.

Kennedy BP, Aamodt EJ, Allen FL *et al.* (1993) The Gut Esterase Gene (Ges-1) from the Nematodes *Caenorhabditis-Elegans* and *Caenorhabditis-Briggsae*. *Journal of Molecular Biology*, **229**, 890-908.

Kishino H, Hasegawa M (1989) Evaluation of the maximum likelihood estimate of the evolutionary tree topologies from DNA sequence data, and the branching order in hominoidea. *J Mol Evol*, **29**, 170-179.

Kluge AG, Farris JS (1969) Quantitative phyletics and the evolution of anurans. *Systematic Zoology*, **18**, 1-32.

Koufopanou V, Burt A, Taylor JW (1997) Concordance of gene genealogies reveals reproductive isolation in the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**, 5478-5482.

Lee YH, Huang XY, Hirsh D *et al.* (1992) Conservation of Gene Organization and Transsplicing in the Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase-Encoding Genes of *Caenorhabditis-Briggsae*. *Gene*, **121**, 227-235.

Lunt DH, Hyman BC (1997) Animal mitochondrial DNA recombination. *Nature*, **387**, 247.

Matsuoka Y, Vigouroux Y, Goodman MM *et al.* (2002) A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99**, 6080-6084.

Mortimer SR, Van der Putten WH, Brown VK (1999) Insect and nematode herbivory below ground: interactions and role in vegetation succession. *Herbivores: Between Plants and Predators*, 205-238.

Nei M (1973) The theory and estimation of genetic distance. In: *Genetic Structure of Populations* (ed. Morton NE), pp. 45-54. University Press of Hawaii, Honolulu.

Nei M, Tajima F, Tateno Y (1983) Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *Journal of Molecular Evolution*, **19**, 153-170.

Nei M (1995) Genetic Support for the Out-Of-Africa Theory of Human-Evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**, 6720-6722.

O'Donnell K, Kistler HC, Tacke BK *et al.* (2000) Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 7905-7910.

Page RDM, Charleston MA (1998) Trees within trees: phylogeny and historical associations. *TREE*, **13**, 356-359.

Picard D, Plantard O, Scurrah M *et al.* (2004) Inbreeding and population structure of the potato cyst nematode (*Globodera pallida*) in its native area (Peru). *Molecular Ecology*, **13**, 2899-2908.

Plantard O, Porte C (2003) Isolation and characterization of microsatellite loci in the sugar beet cyst nematode *Heterodera schachtii*. *Molecular Ecology Notes*, **3**, 139-141.

Posada D, Crandall KA (1998) MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, **14**, 817-818.

Powers TO, Harris TS, Hyman BC (1993) Mitochondrial-Dna Sequence Divergence Among *Meloidogyne-Incognita*, *Romanomermis-Culicivora*x, *Ascaris-Suum*, and *Caenorhabditis-Elegans*. *Journal of Nematology*, **25**, 564-572.

Prasad S, Baillie D (1989) Evolutionarily conserved coding sequences in the dpy-20-unc-22 region of *Caenorhabditis elegans*. *Genomics*, **5**, 185-198.

Rousse S, Gilder S, Farber D *et al.* (2003) Paleomagnetic tracking of mountain building in the Peruvian Andes since 10 Ma. *Tectonics*, **22**, 1048.

Sempere T, Hérail G, Oller J *et al.* (1990) Late Oligocene-early Miocene major tectonic crisis and related basins in Bolivia. *Geology* **18**, 946-949.

Simmons RB, Weller SJ (2001) Utility and evolution of cytochrome b in insects. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **20**, 196-210.

Spooner DM, Hijmans RJ (2001) Potato systematics and germplasm collecting, 1989-2000. *American Journal of Potato Research*, **78**, 237-268.

Stahl E, Dwyer G, Mauricio R (1999) Dynamics of disease resistance polymorphism at the *Rpm1* locus of *Arabidopsis*. *Nature* **400**, 667-671.

Stone AR (1979) Co-evolution of nematodes and plants. *Symbolae Botanicae Upsalienses*, **22**, 46-61.

Subbotin SA, Vierstraete A, De Ley P et al. (2001) Phylogenetic relationships within the cyst-forming nematodes (Nematoda, Heteroderidae) based on analysis of sequences from the ITS regions of ribosomal DNA. *Mol. Phylogenet. Evol.*, **21**, 1-16.

Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy AG, Cosson JF (1998) Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology*, **7**, 453-464.

Takezaki N, Nei M (1996) Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics*, **144**, 389-399.

Thacker C, Marra MA, Jones A et al. (1999) Functional genomics in *Caenorhabditis elegans*: An approach involving comparisons of sequences from related nematodes. *Genome Research*, **9**, 348-359.

Thièry M, Mugniéry D, Bossis M et al. (1997) Crossing between *Globodera pallida* Stone and *G. "mexicana"* Campos-Vela: species concept and heritability of the development on potato. [French]. *Fundamental & Applied Nematology*, **20**, 551-556.

Thurston HD (1994) Andean potato culture: 5000 years of experience with sustainable agriculture. In: *Potato Pest Biology and Management* (eds. Zehnder GW, Powelson ML, Jansson RK, Raman KV), pp 6-13. The American Phytopathological Society, St. Paul.

Turner SJ (1989) New source of resistance to potato cyst-nematodes in the commonwealth potato collection. *Euphytica* **42**, 142-153.

Veevers JJ (2004) Gondwanaland from 650-500 Ma assembly through 320 Ma merger in Pangea to 185-100 Ma breakup: supercontinental tectonics via stratigraphy and radiometric dating. *Earth-Science Reviews*, **68**, 1-132.

Vuilleumier F (1969) Pleistocene speciation in birds living in the high Andes. *Nature*, **223**, 1179-1180.

Vuilleumier BS (1971) Pleistocene changes in the fauna and flora of South America. *Science*, **173**, 771-780.

Yang ZH (1997) PAML: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Computer Applications in the Biosciences*, **13**, 555-556.

Wardle D, Ettema C (2002) Spatial soil ecology. *Trends in Ecology & Evolution*, 177-183.

CHAPITRE V

Origine et diversité génétique des populations du nématode à kyste de la pomme de terre introduites en Europe

Dans le paragraphe précédent, nous avons émis l'hypothèse que *G. pallida* a colonisé les Andes à partir du lac Titicaca au fur et à mesure que la montagne s'élevait en progressant depuis le sud vers le nord, grâce à la progression conjointe de son hôte (les *Solanum* tubéreux sauvages). Lors de la domestication de la pomme de terre, *G. pallida* aurait parasité les pommes de terre cultivées à plusieurs reprises et ceci de façon indépendante dans chacun des cinq clades. Ce travail met en évidence que l'étude d'un parasite à des fins agronomiques permet aussi d'appréhender des questions de recherches fondamentales comme la phylogéographie des espèces andines et de façon plus inattendue la géologie de la Cordillère des Andes (annexe 3).

Dans les trois chapitres précédents, le patron génétique de *G. pallida* a été appréhendé dans son berceau d'origine. Se pose maintenant la question de la description de son patron génétique dans un milieu d'introduction. En Europe, l'homme a probablement introduit *G. pallida* avec l'importation de tubercules de pommes de terre contaminés. La pomme de terre serait arrivée en Europe vers la fin du XVI^e siècle, et ceci par deux portes d'entrée différentes ; la première fut l'Espagne vers 1570 (Salaman 1937), la seconde les îles Britanniques en 1590 (Gerard 1597). Puis à partir de l'Europe, la pomme de terre a été dispersée dans le reste du monde (figure 5.1). Le développement de la culture en Europe commence réellement au cours du XVIII^e siècle. D'abord marginale, cultivée sur jachère ou chènevière, la pomme de terre prend progressivement une place plus importante (Spire et Rousselle 1996). En 2003, la production mondiale s'est élevée à 311 millions de tonnes (blé=573 ; riz=383 ; orge=135 and maïs=604) pour 19,2 millions d'hectares plantés (source : « Food and Agriculture Organization »). Actuellement en Europe, *G. pallida* se développe dans des parcelles cultivées de pommes de terre. Sur le vieux continent, le patron génétique de *G. pallida* est fortement lié (1) aux perturbations apportées par l'homme (nombre d'introductions), (2) au niveau de diversité génétique des populations importées et (3) à l'origine géographique des populations importées. À partir de l'étude de génétique des populations et de l'étude phylogéographique au Pérou, nous allons tenter dans ce dernier chapitre d'éclaircir ces zones d'ombre, mais aussi de comparer le fonctionnement génétique des populations dans ces deux régions.



Figure 5.1 : Dispersion de la pomme de terre à travers le monde (Turner & Evans 1998).

Origin and genetic diversity of European populations of *Globodera pallida* inferred from mitochondrial sequences and microsatellite loci

Keywords: phylogeography, population genetics, invasive pest, origin, introduction, cytochrome B, potato cyst nematode, Europe, Peru, South America

5.1. Introduction

The potato cyst nematode *G. pallida* is an important world wide pest of potato (Marks and Brodie, 1998). After a migration inside root tissue, this specialised endoparasite nematode modifies the expression of plant cells by producing a syncytium on which it feeds to the detriment of its host-plant. It's generally accepted that *G. pallida* is native to South America (Stone 1979), where it is the principal pest of Andean potato crops (Atkinson *et al.*, 2001). Although a few records of *G. pallida* have been made in Bolivia (Evans, Franco *et al.*, 1975; Franco, 1977), its main range lies in Peru, Ecuador and Colombia, *i.e.* to the north (15.6°S) while its sibling species, *G. rostochiensis* is found to south of this latitude. In South America, this cyst nematode is mainly found between 2000 and 4000 m above sea level with the heaviest infestations between 2900 and 3800 m.a.s.l. (Franco 1997). It has been introduced in many parts of the world and particularly in Europe (Minnis *et al.*, 2002), but also in USA (Brodie, 1998), Canada, New-Zealand (Marshall, 1993) and in numerous other countries where potatoes are grown intensively.

Until its description by Stone in 1972, *G. pallida* was not distinguished from the golden potato cyst nematode *G. rostochiensis*. This improvement to the *Globodera* genus systematic has had numerous practical and economical consequences. For example, this distinction between the 2 species is especially necessary as numerous resistance genes against one species are not efficient against the other (Bakker *et al.*, 1993). For this reason, an in-depth description of intraspecific genetic variability of *G. pallida* is necessary to efficiently control this pest.

The identification of the geographical origin of a pest is a common feature for introduced pests (O'Donnell *et al.*, 2000; Davies *et al.*, 1999; Huffbauer *et al.*, 2004). The origin(s) of the potato cyst nematodes found in Europe is an old question already considered by several authors. Before the use of molecular markers, most hypotheses were poorly supported by any tangible data or only based on the geographical distribution of resistance genes among wild potatoes (Franco, 1977). The intraspecific polymorphism revealed in European populations of *G. pallida* by various molecular markers provided new information to solve this issue. However, those studies did not include any Peruvian populations (Phillips *et al.*, 1992; Folkertsma *et al.*, 1994; Folkertsma *et al.*,

1996a; Folkertsma *et al.*, 1996b; Folkertsma *et al.*, 2001; Thiery and Mugniery, 1996; Burrows *et al.*, 1996; Manduric and Andersson, 2003) or did not allow precise identification of the origin of European populations due to the low representation of Peruvian samples (Blok and Phillips 1995; Blok *et al.* 1997; 1998; Subbotin 2000, Grenier *et al.* 2001). Moreover, the molecular markers used in those studies were not always adequate enough for phylogeographical purpose (cf. 2-DGE; Folkertsma *et al.* 1996, 2001, or hybridisation with satellite DNA; Grenier *et al.* 2001). Without dealing with poorly reproducible markers such as RAPD, the ideal marker should be polymorphic enough (for such purpose, the ITS sequence seems too be insufficient at the intra-specific level -see for example Subbotin 2000-, without dealing with troubles due to among copies polymorphism in this gene with more than 150 copies per genome) but not too variable otherwise homoplasy and saturation could obscure the phylogenetic signal in the data.

In a previous study (Picard and Plantard submitted [chapter 4]), using an extensive sampling regime along a 1500 km transect from the south to the north border of Peru, we have been able to describe a clear phylogeographical pattern among Peruvian populations with a colonisation from south to north (Picard and Plantard submitted [chapter 4]). To identify precisely the origin of European populations, we have obtained the partial *cytb* sequence and genotyped the same microsatellite loci of European populations, and investigated the location of the haplotypes or multilocus genotype European populations in phylogenetical trees containing the Peruvian samples.

Using this data set, we address the following issues: (1) from how many different Peruvian regions *G. pallida* has been introduced in Europe? (2) is there any geographical pattern in genetic variability in Europe that could help to reconstruct the history of the introduction? (3) how much genetic variability has been lost during the introduction from South America to Europe through founder effects, bottlenecks and subsequent genetic drift?

The insights of those results for the understanding of the population genetics of this soil nematode will be discussed, as well as their consequences for the control of this pest in Europe and elsewhere in the world.

5.2. Material and Method

5.2.1. Sampling and data collection

Fifteen European populations directly collected from potato fields (i.e. not from laboratory rearing) from France (9 populations), UK (3 populations), Netherlands (2 populations) and Spain (1 population) have been genotyped with 7 microsatellite loci (loci GP20, GP32, GP33, GP34, GP36, GP38 and GP42; Table I; see Picard *et al.* 2004 for the description of the methods used).

Partial sequences of the *cytB* gene (872 bp) (see Picard and Plantard submitted for the description of the methods used [chapter 4]) have been obtained for one individual of each of those 15 European populations (except 4 French populations; table I), to which two sequences have been added: one from the Chavornay population (a reference and laboratory strains from Switzerland) and the other being a sequence obtained by Armstrong *et al.* (2000) from an individual from the Gourdie population in Scotland (see Picard and Plantard submitted for the description of the methods used).

Table I: list of the European populations studied indicating the country from which the samples came, their precise location, and if they have been used for sequencing or for microsatellite genotyping (as well as sample size for the microsatellite data).

	Location	Country	Cyt b	μ sat	N
FR-1	Ouessant		+	+	30
FR-2	Ile de ré (Ars-en-ré)			+	57
FR-3	Ile de ré (Saint Clément 7)		+	+	30
FR-4	Ile de ré (Saint Clément 48)			+	29
FR-5	Ile de ré (Bois plage)	France	+	+	22
FR-6	Nourmoutier (Pinaudières)			+	57
FR-7	Nourmoutier (Roussière)		+	+	21
FR-8	Nourmoutier (Loubinc)			+	22
FR-9	Saint Méloir des Ondes		+	+	59
SW	Chavornay	Switzerland	+		
SP	Majorca	Spain	+	+	28
NL-1	Centre	Netherland	+	+	23
NL-2	North		+	+	30
UK-1	Shropshire	England	+	+	29
UK-2	Sacrewell Peterborough		+	+	30
UK-3	Gourdie	Scotland	+		
UK-4	South		+	+	19

The samples from the native area used for comparison is constituted by twenty seven Peruvian populations sampled along a 1500 km transect from the Bolivian to the Equatorial boarder (figure 1). All Peruvian individuals sequenced or genotyped have already been used in Picard and Plantard (submitted [chapter 4]), except the microsatellite multilocus genotype of three populations from the southern “clade I” region (see Picard and Plantard submitted [chapter 4]), namely the Sicuani, Colca canyon and Arapa populations (whose haplotypes where already used in the previous study mentioned above).

Because of the presence of both *G. pallida* and *G. rostochiensis* in Europe (sometimes in the same field), the species identification of each individual sequenced or genotyped in the present study has been checked by PCR-RFLP of the ITS region (see Picard *et al.* 2004 for a description of this method).

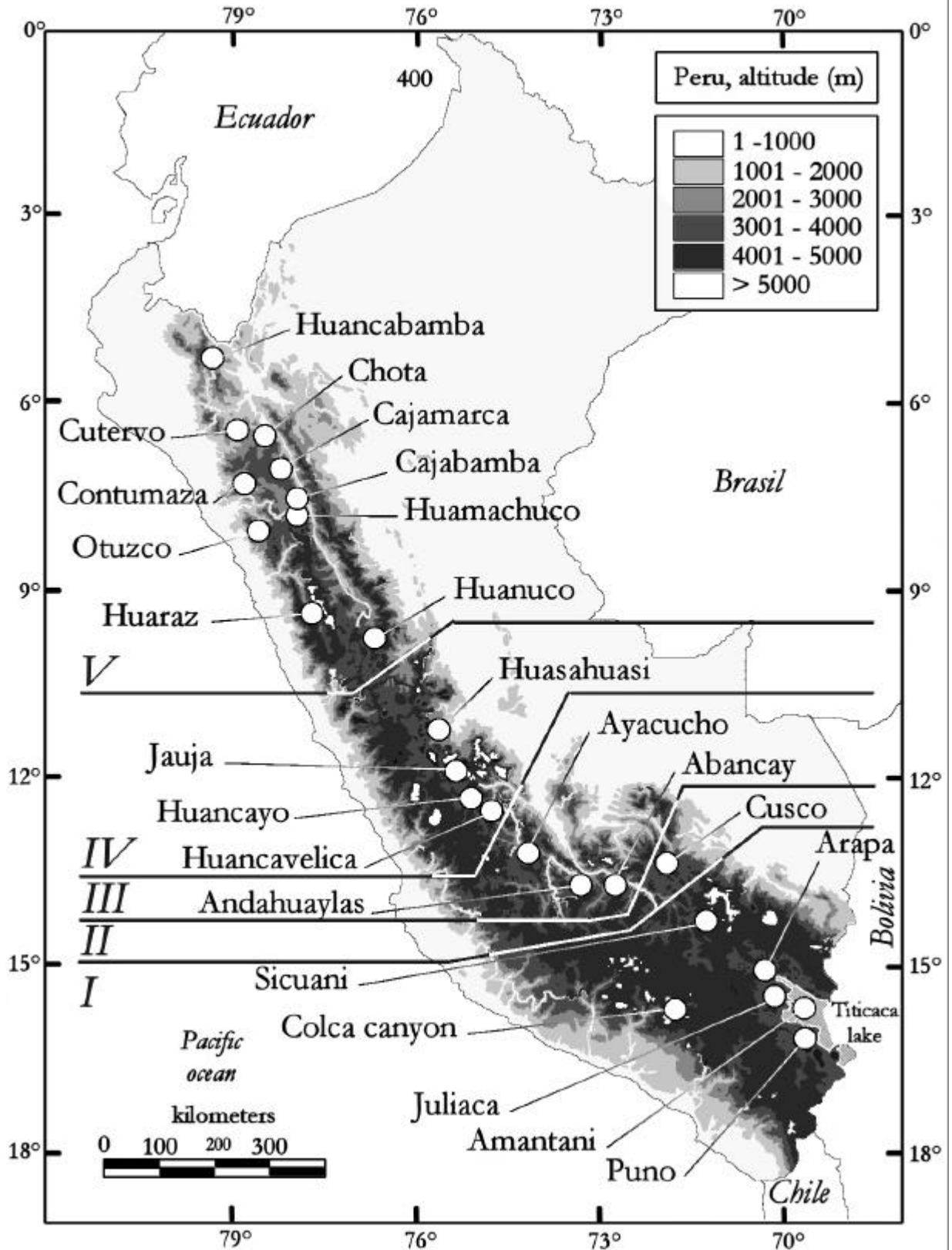


Figure 1 Map of Peru indicating the location of sampling sites. The limits among the five phylogeographical clades (Picard and Plantard submitted) are indicated and numbered from I to V.

5.2.2. Data analysis

The phylogenetic trees based on the *cytB* sequences and the microsatellite multilocus populations were constructed according to the same method as described in Picard and Plantard (submitted, chapter 4).

For the haplotype tree, Modeltest was used to choose the best-fit model (maximum likelihood) according to the Akaike information criterion. The best fit substitution model was the HKY85 + G model (nucleotide frequencies 16.6%, 14.0%, 19.1% and 50.3% for A, C, G and T respectively; transition to transversion ratio = 3.85; Gamma distribution shape parameter = 1.91). Then Phylip (Felsenstein, 2004) was used to reconstruct the phylogenetic tree by maximum likelihood, maximum parsimony and neighbour-joining method using the parameters obtained by Modeltest. Robustness of the ML, MP and NJ trees were assessed by bootstrap analysis (Felsenstein 1985) using 500 iterations. A sequence of *G. mexicana* (the sister group of *G. pallida*) was used as an outgroup in our phylogenetic analysis (see Picard and Plantard submitted [chapter 4]).

For tree reconstruction based on microsatellite multilocus data, D_A distances were used (see Picard and Plantard submitted for a justification of this method). All the genetic distances and the NJ trees were performed using Populations 1.2.28 (available at <http://www.cnrs-gif.fr/pge>). Statistical support estimates for phylogram nodes were obtained by resampling loci across 500 bootstrap iterations for each genetic distance.

The allelic richness of each population was estimated by the rarefaction index (ElMousadik and Petit, 1996) using the Populations 1.2.28 software. This method avoids the biased error of the allele number variations due to different sample sizes among populations (n is fixed as the smallest number of individual genotypes in a field). In those analyses, all individuals with amplification failure at one locus were excluded because a null amplification is considered as an absence of an allele that leads to an underestimation of the allelic richness.

The Genepop software (Raymond and Rousset, 1995) was used to estimate F_{st} values between pair of European populations, and to test Hardy-Weinberg equilibrium in each Peruvian or European population (see Picard *et al.*, 2004). Significance of F_{is} for each population was also tested using the permutation by population procedure of the Genetix software (Belkhir *et al.*, 1996).

5.3. Results

5.3.1. Origin and genetic diversity of the European populations inferred from the *cytB* sequences

According to the *cytB* tree (figure 2), all the haplotypes found in Europe belong to the same clade (Ic) corresponding to the southern region of Peru (i.e. the Altiplano from the Bolivian

boarder, on the north shore of the Titicaca lake, to the Sicuani area). Only four haplotypes are represented among the 13 populations sampled from 5 European countries: the haplotype I β is found in 9 European populations; a very similar haplotype I α is found in the populations from FR-3 (only 1 substitution between I β and I α). The Peruvian haplotype from Colca Canyon (I ϵ) is the sister group of this main European group, with only (4 and 3 substitutions with the I β and I α haplotype respectively); this Peruvian-European group of haplotypes (called Ic(P+E)1) is supported by a high bootstrap value (99%). The second group of European populations is represented by two haplotypes, I δ – with one population from UK-3 (Scotland) - and I γ – 2 populations (FR-1 and NL2) - , with 1 substitution between those two haplotypes. The haplotype I β is also found in two Peruvian populations (Sicuani and Arapa-2). This second Peruvian-European group of haplotypes (called Ic(P+E)2) is supported by a 100% bootstrap value. However, a weaker bootstrap value is observed between those two mix Peruvian-European groups (Ic(P+E)1 and Ic(P+E)2 (62%). The two other haplotypes of the clade *Ic* are represented only by Peruvian populations (I ζ - with the Puno-1 population - and I η – with the Puno-2 and -3, Juliaca, Amantani-1 to -3 populations). Note that Puno, Juliaca and Amantani are situated to the south of the region where the three previous populations mentioned as belonging to mix Peruvian-European groups of haplotypes (*i.e.* Sicuani, Colca canyon and Arapa; figure 1) were sampled.

5.3.2. Origin and genetic diversity of the European populations inferred from the microsatellite loci

Although most nodes are weakly supported by bootstrap values (data not shown; figure 3), the phylogenetic tree based on microsatellite loci is compatible with the topology of the *cytB* tree: the Clades *I_m*, *II_m*, *III_m*, *IV_m* and *V_m* also form monophyletic groups (except Arapa-2, which constitutes a different clade on its own, instead of being in clade I; all the European populations are included in the clade *I_m*, and this clade is paraphyletic if the European populations are not included. However, in contrast to the cytochrome B tree, the European populations form a monophyletic group, without any Peruvian populations among them. Most internal nodes (*i.e.* between each of the 5 clades) are poorly resolved with most populations situated on long branches. Among the European populations, geographic pattern/structure variability can be deduced from the analysis of microsatellite variability. All four samples collected on the French “île de Ré” (from 1 to 15 km apart; FR-2 to -5), or the three samples from “île de Noirmoutier” (from 1 to 3 km apart; FR-6 to -8) and the two populations from the Netherlands (NL-1 and -2), each forms a monophyletic group (although low bootstrap values are associated with these 3 groups).

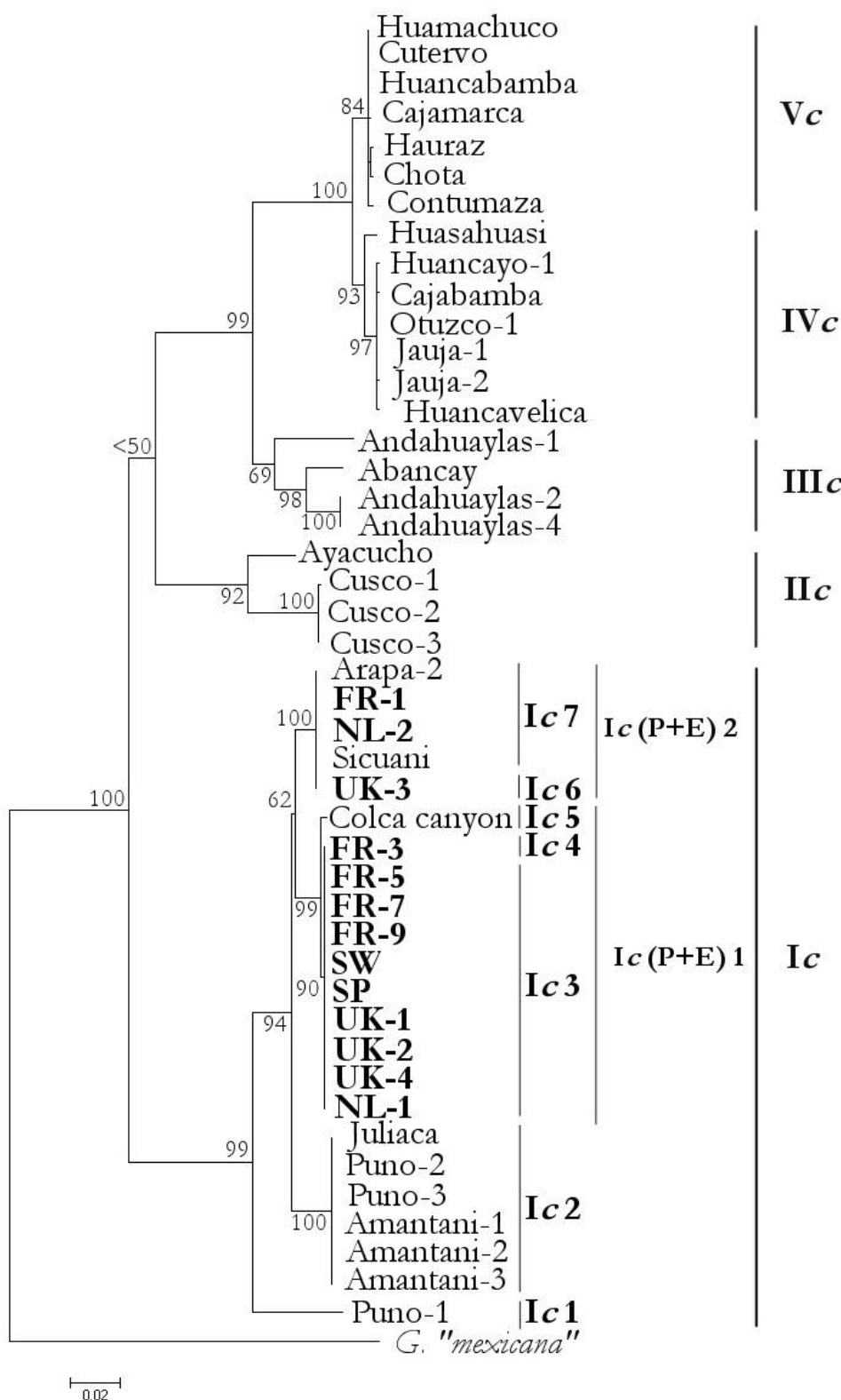


Figure 2 Phylogenetic tree of the mitochondrial haplotypes (based on partial cytochrome B sequences) found in Peru and in Europe (in bold). The five clades (numbered from Ic to Vc) and the detail of each haplotype found in the clade Ic are indicated by a vertical bar. The Neighbour-Joining tree was constructed using Phylip and a HKY85 + G model as determined according to Modeltest. Bootstrap analysis based on 500 iterations is indicated.

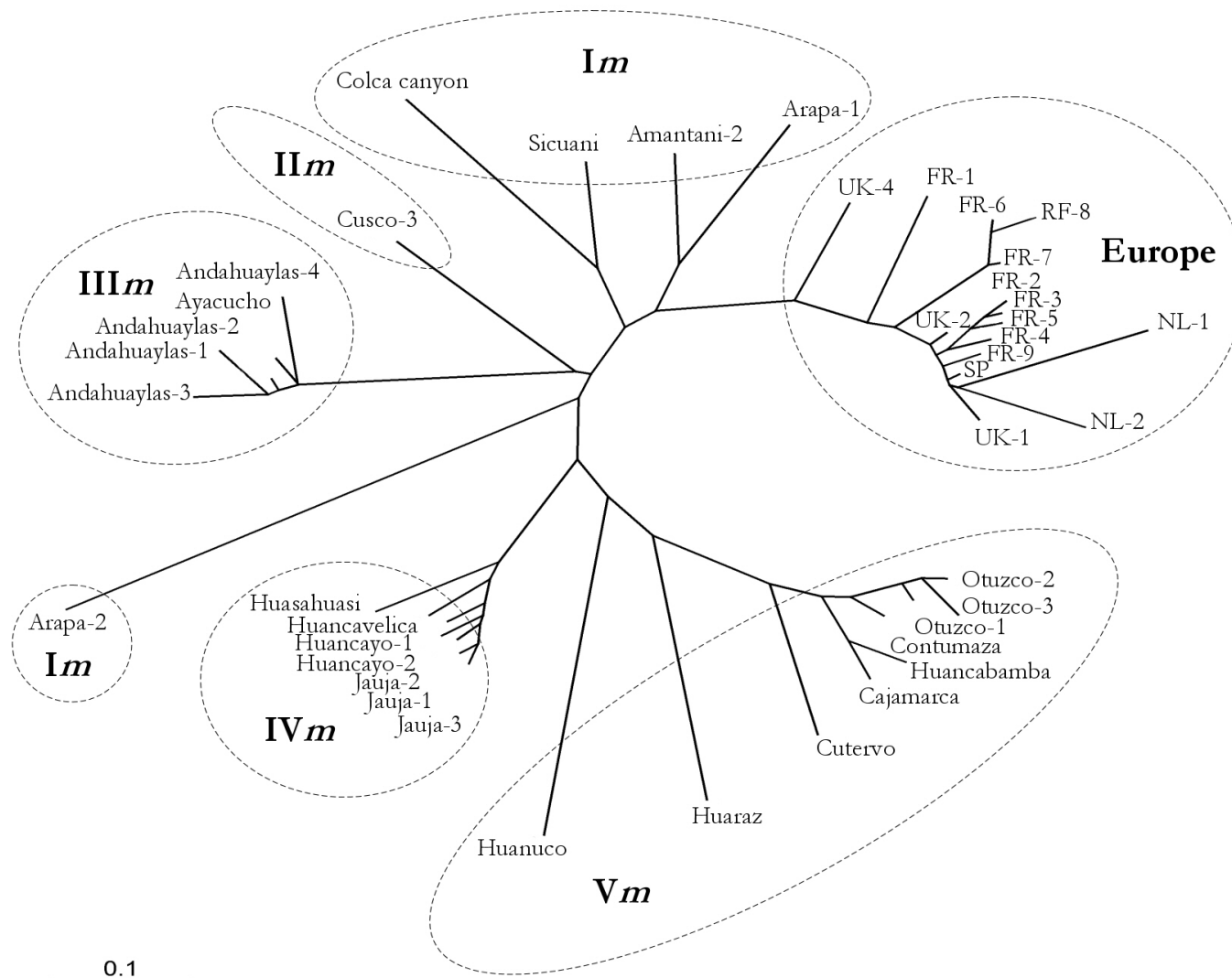


Figure 3: Dendrogram of *G. pallida* populations based on multilocus microsatellite genotypes. This Neighbour-Joining tree is based on D_A distances and was performed using Populations 1.2.28

5.3.3. Genetic structure among European populations

When considering *Fst* between pairs of populations, lowest values are observed between the samples from the same area in France (i.e. among the 4 populations from “île de Ré” – except FR-4 - ; $Fst < 0.0675$, or the 3 populations from Noirmoutier - $Fst < 0.0873$ - ; Table II), while larger *Fst* values are usually observed between populations from different countries. However, low *Fst* values between European populations belonging to different countries are sometimes observed (e.g. 0.0219 between FR-9 – France – and SP – Spain -, 0.0517 between UKS-2 and FR-5-). The two populations from Netherlands, the UK-4 and the FR-1 populations appear to be more divergent from all other European populations.

Table II: pairwise *Fst* distances between European populations.

	FR-1	FR-2	FR-3	FR-4	FR-5	FR-6	FR-7	FR-8	FR-9	SP	NL-1	NL-2	UK-1	UK-2
FR-2	0.321													
FR-3	0.269	0.040												
FR-4	0.248	0.176	0.120											
FR-5	0.248	0.048	0.036	0.068										
FR-6	0.249	0.311	0.308	0.298	0.249									
FR-7	0.258	0.236	0.231	0.236	0.177	0.064								
FR-8	0.285	0.273	0.277	0.252	0.211	0.021	0.017							
FR-9	0.170	0.121	0.117	0.071	0.046	0.208	0.162	0.184						
SP	0.176	0.171	0.126	0.048	0.082	0.230	0.195	0.205	0.033					
NL-1	0.372	0.281	0.256	0.230	0.223	0.408	0.352	0.377	0.175	0.145				
NL-2	0.326	0.230	0.174	0.197	0.163	0.347	0.270	0.316	0.130	0.105	0.201			
UK-1	0.230	0.163	0.133	0.057	0.089	0.282	0.235	0.250	0.056	0.013	0.172	0.121		
UK-2	0.129	0.151	0.095	0.094	0.052	0.213	0.180	0.209	0.071	0.061	0.261	0.174	0.061	
UK-4	0.351	0.446	0.414	0.297	0.364	0.345	0.358	0.351	0.213	0.216	0.448	0.340	0.239	0.299

5.3.4. Comparison of European versus Peruvian allelic richness

The comparison of allelic richness between European and Peruvian populations (figure 4) must be taken with caution as the sample size differed between the two data sets (in particular, European samples contain more missing data. Moreover, allelic richness of each population should be considered as belonging to a particular Peruvian clade, i.e. in its phylogeographical context: Due to the different age of each Peruvian clade (the northern being the youngest), there is a south to north decreasing gradient of allelic richness (Picard and Plantard submitted [chapter 4]). Despite those caveats, the mean estimated allelic richness of European populations lies between 20.9 (for a sample size of 7 individuals) to 28.4 (for a sample size of 35). This allelic richness is similar to the one estimated for the northern Peruvian clade *Vm* (20.3 for a sample size of 7 to 34 for a sample size of 35), but is one third less rich than mean allelic richness estimated for the southern clade *Im*

(30.4 for a sample size of 7 to 34 for a sample size of 30, or even 33.3 for a sample size of 7 to 43.2 for a sample size of 30 when excluding the atypical Arapa-2 populations that exhibit a drastic impoverishment in allelic richness relative to the other populations of this clade *Im*).

5.3.5. Insights on the origin of European populations from assigning methods

When *K* is set to 2 (figure 5a), two geographically homogenous entities are recognized (hereafter called the "north entity" – in purple – and the "south + Europe" entity – in blue -): all individuals belonging to the northern clades (*Vm*, *IVm*, *IIIIm*) form the first group, with more than 95% of their genome being characteristic of the "North" entity (except one individual from the Ayacucho population), while all individuals from Europe are found in the second group (i.e. the "south + Europe" entity); individuals from clade *IIIm* (i.e. the Cuzco-3 population) appear to be in intermediate position (with some individuals with more than 50% of their genome being assigned to the "north entity", while others have more than 50% of their genome assigned to the "south+ Europe" entity). Two kinds of Peruvian populations can be recognized in the populations belonging to the clade *I*; some populations (Arapa-1, Sicuani, Colca canyon) have most of their individuals with part of their genome assigned to the north entity, but always at less than 50% (except 2 individuals from Arapa-1, 4 individuals from Sicuani and 1 individual from Colca canyon that have more than 50% of their genome assigned to the "north entity"); other populations (Arapa2 and Amantani) have all their individuals at more than 90% assigned to the "south + Europe" entity (except one individual from both populations which are assigned at only 70% to the "European group", in blue-grey).

When *K* is set to 10 (figure 5b), the clades *IIIm* to *Vm* each constitute an homogenous entity of the same colour (i.e. all individuals - except a few exceptions – have more than 90% of their genome characteristic of this entity). Clade *V* is divided in two homogenous entities. Clade *Im* is now subdivided in 3 entities (3 colours): (1) the Arapa-2 population (in orange in the figure 5b), (2) the Amantani-2 and Arapa-1 populations that are both constituted by individuals whose 90% of their genome belong to the same entity (in yellow) and (3) the Colca canyon population (in blue). The Sicuani population seems to be a mixture of individuals from the last two entities plus some alleles from the Cuzco population. Except the UK-4 population (which seems to have most of its individuals with their genome being characteristic of the same entity of some Peruvian populations, i.e. the yellow colour as Arapa-1 or Amantani-2 populations), most European populations have their individuals with most of their genome being assigned to two genetic entities (in purple or in blue-grey). Among those European populations, some are homogenous with almost all their individuals corresponding to one genetic entity (FR-1, FR-6 or FR-7 in purple, or NL-1 or NL-2 in blue-grey for example), while others are some mixture of the two entities (FR-5 or FR-9 for example).

Mean allelic richness

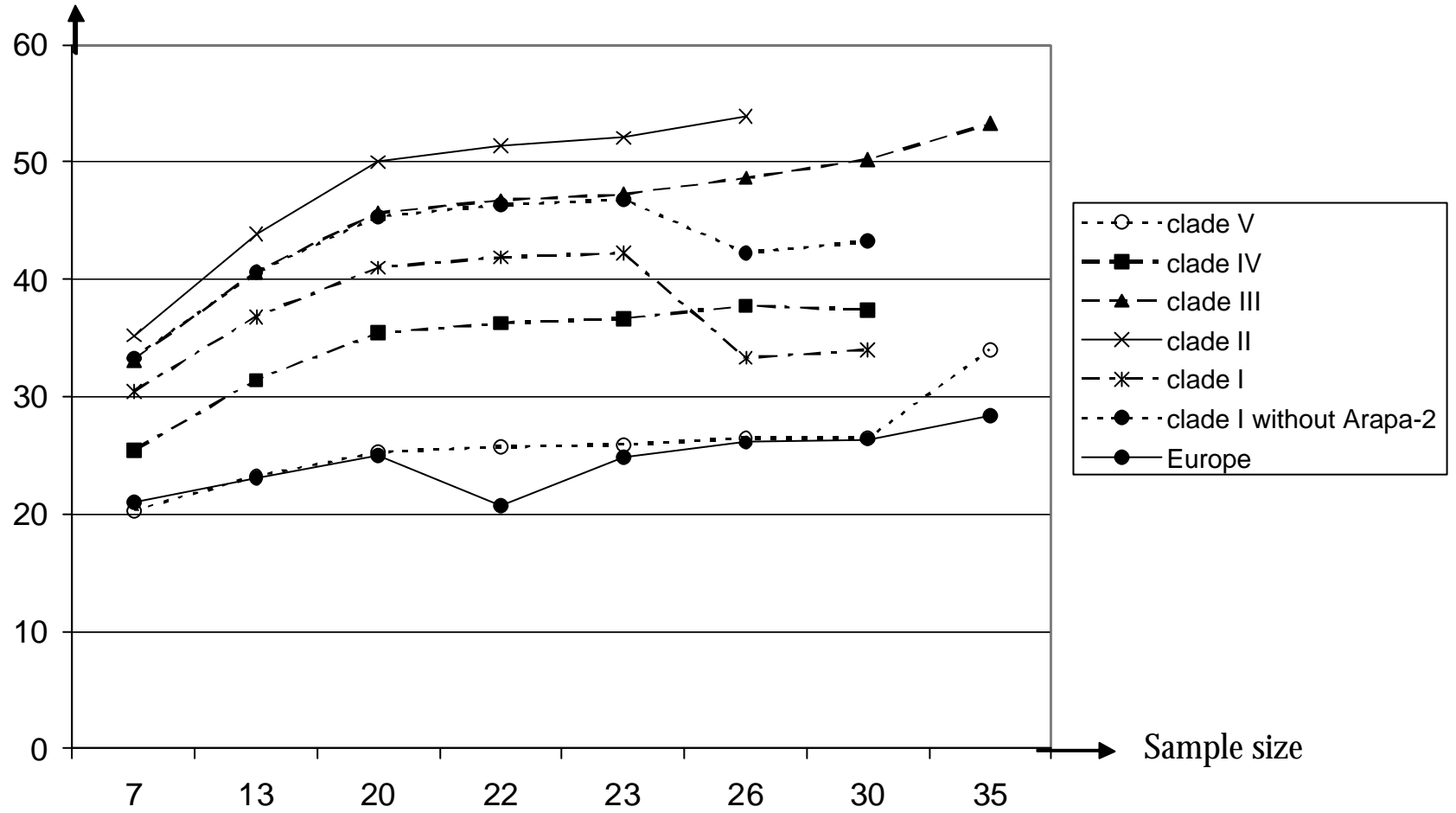


Figure 4: Mean allelic richness of each population estimated by the rarefaction index (ElMousadik and Petit, 1996). Note that the means are calculated on decreasing number of populations as sample size increases (excluding the use in this mean of some populations as they did not contain the minimum sample size).

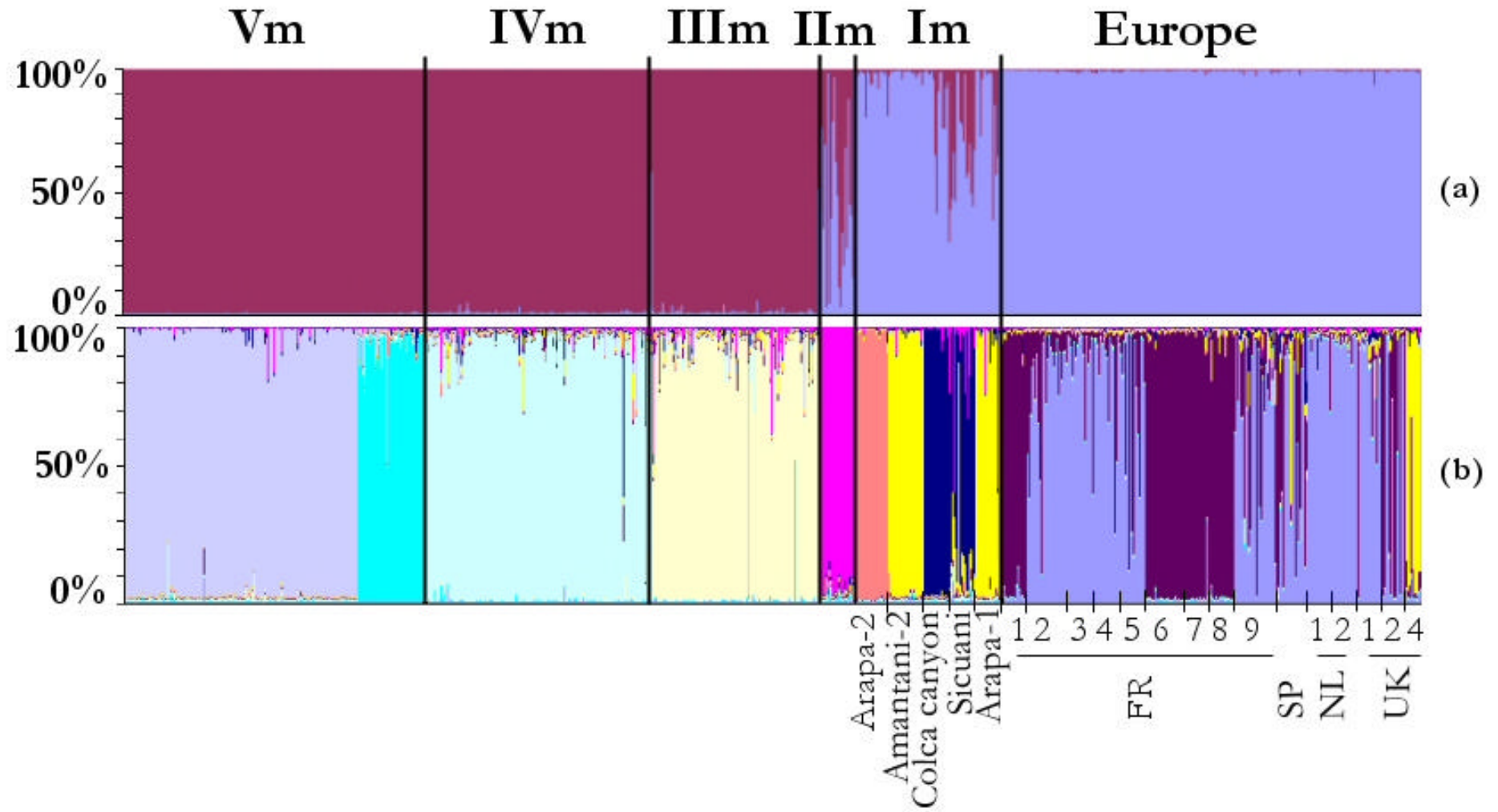


Figure 5: Results of assigning methods to reveal genetic structure on the global data set (Peruvian + European populations) using the Structure software. Each individual is represented by a thin vertical line, which is partitioned into K colored segments that represent the individual's estimated membership fractions in K clusters. Black lines separates the 5 Peruvian clades as well as the European populations, with their name labeled above the figure; details of each Peruvian populations belonging to clade I and of all European populations are indicated below the figure. (a) results when setting K to 2; (b) results when setting K to 10.

5.3.6. Comparison of European versus Peruvian inbreeding through analysis of *F_{is}* and departure from Hardy-Weinberg equilibrium

Analysis of *F_{is}* using a permutation test reveals that all 27 Peruvian populations have 100% of observed *F_{is}* values superior to the expected *F_{is}* value corresponding to the Hardy-Weinberg equilibrium (data not shown). Five out of the 14 European populations have less than 94% of observed *F_{is}* values superior to the expected *F_{is}* value corresponding to the Hardy-Weinberg equilibrium (data not shown).

Among the 27 Peruvian populations and the 7 loci tested, 47% out of the possible tests (n=181) exhibit a significant homozygote excess, while 29% out of all possible tests (n=121) were significant among the European populations. When considering all loci together, all 27 Peruvian populations exhibit a significant difference between observed and expected heterozygosity according to the Hardy-Weinberg equilibrium, while only 12 out of the 18 European populations showing a significant heterozygote deficit.

5.4. Discussion

5.4.1. Geographical origin of the European populations

As far as we know, this study is the first one that seeks to identify the origin of European populations of *G. pallida* conjointly with an extensive sampling of Peruvian populations from known geographical areas. Using two complementary molecular markers evolving at different rates, we have been able to precisely determine the origin of European populations: they all come from the same area in the south of Peru, in the Altiplano that goes from the north shore of the Titicaca Lake to the south of the Cuzco area. This result is clearly illustrated by the cytochrome B tree: all the European individuals studied have an haplotype identical to the one observed in Peruvian populations of this region – haplotype I_{c7} – or an haplotype being the sister group of the Peruvian haplotype I_{c5} which is also only found in this same Peruvian region. This result is confirmed by the microsatellite tree: all European populations form a monophyletic group branching among Peruvian populations of the same southern region of Peru. The results of the assigning method, dividing the whole data set in two groups with one comprising all European populations and all Peruvian populations from clade I_m are also congruent with this interpretation.

5.4.2. Single or multiple introductions?

As two clusters containing European haplotypes are observed, each being associated to a particular Peruvian haplotype, a double origin of European populations could be hypothesized.

However, we have not investigated in the present study intra-population haplotype diversity in the native Peruvian populations. Thus, we can not exclude the hypothesis of a unique introduction event from a single Peruvian population from this southern region and containing those two haplotypes. Although we can not conclude for one or the other of those two alternative hypotheses, it remains true that the original population(s) from which is (are) all European *G. pallida* individuals came from this southern Peruvian region located among, Colca canyon (Arequipa) and Sicuani.

When considering allelic richness, a relatively large genetic variability is still found in Europe, as this variability is higher than the one observed in the northern Peruvian clade. However, as this genetic variability is a subset of the variability of the southern Peruvian region which is also the most diverse one, a reduction in allelic richness is observed in this area of introduction, as expected due to the consequences of genetic drift, founder events and bottlenecks (to which should be added selection by particular potato varieties and even partial resistant varieties such as in the UK; Trudgill *et al.*, 2003). Even if some alleles could have appeared in Europe since the introduction of this species (cf the high mutation rate of this marker – compared to the cytB markers, for which the production and conservation of a new haplotype in Europe in less than 300 years is unlikely due its much lower mutation rate), the most likely hypothesis to explain the existence of numerous common alleles in Europe and in those southern Peruvian populations is to consider that the introduction is not a single introduction of a single cyst but rather the introduction of one or several groups of cysts bearing their own genetic variability. The relatively low level of reduction in allelic richness between the introduced and the native area (when considering only the native southern region, not all the Peru) can be partly explained by the partition of genetic variability at different spatial scales. Indeed, as 96% of the genetic variability observed inside a region is found inside a field or even 97% at the scale of a few plant (Picard *et al.*, 2004), it's not surprising that even if all European cysts are the offspring of a few cysts that were associated with a single contaminated potato plant, a large part of the genetic variability of this region has been introduced in European soils. Moreover, numerous pathogens (bacteria, fungi...) predators (mites, collembola, other nematodes...) or antagonists (other plant-parasitic nematodes associated to potato) of this cyst nematodes must be absent in European soils; partial resistant varieties have been used only for a short time in Europe and only on very limited area (Trudgill *et al.*, 2003). Thus, once introduced in a potato field in Europe, *G. pallida* could multiply quickly, producing huge population sizes (billions of individuals per hectare) preventing the effect of genetic drift that could otherwise reduce allelic richness.

5.4.3. Which European population is the sister group of all other European populations?

By identifying the locality of the first introduction in Europe, it could help to reconstruct the history of the introduction of *G. pallida* in the “old world”. With only two branches containing European haplotypes (excepting I4 from FR-3 which is minor variation of more common I3 haplotype), it is not possible to identify the most basal haplotype in the I1+2+3 group (figure 2). Increasing the cytB sequence length and obtaining other sequences from the clade I geographical region could help to solve this issue. According to the microsatellite data (i.e. the topology of the NJ-tree and the Structure result), the UK-4 population from Scotland is a likely candidate to be the sister group of all other European populations. The introduction history of the potato cyst nematode (*G. pallida* and *G. rostochiensis*) is poorly documented, as its spread in Europe was not documented (see for example Stone and Sunnucks 1993 for a well documented case of colonisation due to mans activity by a conspicuous, above ground pest in western Europe since the 17th century). *G. pallida* was described first in 1882 in Rostock (Germany) where it was probably already a secondary introduction and while other European countries were probably already contaminated. However, several authors have made various hypotheses concerning the scenario of its introduction. Jones (1970) considered that *Globodera spp.* may have been introduced during the second half of the 19th century in England, following the numerous introductions of wild *Solanum* plants in Europe to screen for potato blight resistance that caused the Irish potato famine. This hypothesis is compatible with our finding (but does not allow us to conclude with confidence). As they were able to find potato cyst nematodes in only 100 g of guano, Inagaki and Kegasawa (1973) made an alternative hypothesis by considering that this fertiliser (that was at the origin of major commercial exchange between Peru and Europe during the 19th), could have been at the origin of the introduction. The Humber port of Hull was a major entrance for the guano from Peru (Franco, 1977). However, those island are very far away for major potato culture area; as no plants are able to survive in such a place, it seems an unlikely explanation (see also Franco 1977 for other arguments against this hypothesis). Another hypothesis made by Franco (1977) is that the same bags were used for guano transport and for potato exchange in Peru; thus, contaminated soil could have been still present in those bags, when they were used for guano transport. The location in the cytB tree of the haplotype of *G. pallida* that could be found in the Azores islands would also be interesting as those islands are usually considered as a “garden” for European botanists on they way back from South America to Europe in the 19th century. Because of the high resolution of our mitochondrial marker, the sequencing of cytB from cysts found on the Peruvian island from which guano is extracted (will it belong to the clade I group? will it be the sister group of all European haplotypes?) / from the Azores Island or around the Humber port of Hull (will it be the sister

group of all European haplotypes) could enable the reconstruction of the history of the introduction of the potato cyst nematode.

5.4.4. Geographical Pattern among European populations

With only 3 haplotypes found in Europe, the *cytB* marker is not useful for the description of any structure in the genetic variability observed in Europe; we can only notice that the association of some European populations sharing the same haplotype is not correlated with their geographical location (*e.g.* the Gourdie haplotype from Scotland has the same haplotype as a Dutch and a French populations, while other populations from each of these three countries are found in the other haplotype group). Because of their larger mutation rate, microsatellite loci are more informative for this issue. Inside each country, some clustering of populations is observed among populations from the same region (*e.g.* the four populations from the French Noirmoutier Island, with a 83% bootstrap value, which is also illustrate by the low *Fst* values among those populations). However, other examples can be found in which the different populations from the same country do not cluster together (*e.g.* the three populations from UK). Thus, because the pattern of geographical variability observed in the microsatellite data seems to be contingent on historical events such as commercial exchange among countries that promote cyst nematode spreading, we did not conducted any investigation concerning any pattern of isolation by distance among European populations (see Plantard and Picard submitted[chapter 2]). Among different countries, bootstrap values are low and thus clustering is not consistent. Some populations exhibit particularly long branches, suggesting that they have highly diverged, possibly due to genetic drift following founder effects or bottlenecks (*e.g.* the FR-1 populations, which has been found on the Ouessant, an island with low exchange with the mainland).

Our results also illustrates the usefulness of the sampling a pest in its native area (Cattan-Toupance *et al.*, 1998; Niederhauser *et al.*, 1991): with only European populations available, it would have been impossible to distinguish the relative effect of genetic drift, bottleneck and founder events to understand gene flow, dispersal abilities and population genetic structure of this cyst nematodes (Folkertsma, 2001).

5.4.5. Comparison of inbreeding level in Europe and Peru

The comparison of *Fis* values revealed a contrasting situation between the native and the introduced areas, with populations in Peru being more inbred than in Europe. Rather than a “biological explanation”, this result could be due to a lower allelic richness in Europe than in Peru (especially when comparing European populations to Peruvian populations from the clade *Im* from

which all the European populations came). However, although, a similar allelic richness is found in the populations from the northern Peruvian clades and in European populations, a similar higher level of inbreeding is still observed in those Peruvian clades when compared to the European populations. A difference in inbreeding level could also be due to the age of the European populations: being youngest (less than 300 years), those populations could be less close to the equilibrium than the Peruvian populations (i.e. European population are still growing in a given European field; they could be formed by two separate introduction events forming genetically distinct focus in the same fields that come secondarily into contact, causing a higher heterozygote deficiency). Despite being the youngest among the Peruvian populations, this should hold true even for the northern clade Peruvian populations, who have probably diverged from southern populations for one million years (Picard and Plantard submitted [chapter 4]). However with such a departure from the equilibrium state in Europe, we would expect that the recent introduction of European populations would increase inbreeding compared to Peru, while the opposite is observed. Finally, we hypothesize that the difference in inbreeding level between the two geographically areas is due to different agronomical practices: in Peru, soil perturbation is very low compared to Europe. Most potato fields in Peru are ploughed at low depth, usually manually, while in Europe those fields are heavily disturbed by the numerous agriculture devices (tillage...). A homogenising effect on potato cyst densities in soil due to such activities has already been reported (Mugniéry and Zaouchi 1976), and we hypothesized that it also could be observed on population genetics of this pest. Because of the recent interest for low disturbance soil activities, these results could provide cues for ongoing studies aimed at studying the advantage of such agricultural practices.

5.4.6. Conclusion and consequences for the control of *G. pallida*

Due to (1) an extensive sampling of populations in both its native and introduced area, (2) the existence of a well structured phylogeographical pattern in its native area (Picard and Plantard submitted) and (3) the use of two complementary molecular markers providing information on evolutionary processes occurring at the scale from millions (cytB) to hundreds of years (microsatellite), we have been able for the first time to unambiguously identify the Southern region of Peru (from the north shore of the Titicaca lake to the Sicuani region) as being the region from which all European populations have been introduced. The identification of the origin of this pest has major consequences for its control in Europe. In particular, it can be used to *a priori* select particular germplasm resources according to their geographical origin in Peru (see for example Castelli, *et al.*, 2003; Chavez, *et al.*, 1988). Because of the long co-evolutionary process between *G.*

pallida and various wild *Solanum* in this southern region, we can hypothesize that a higher number of still effective resistance genes will be found in this region (but this hypothesis should be checked first; see Castelli *et al.*, 2003). Because the other Peruvian northern clades are probably a subset of the genetically richest areas located in the south (except the Clade II that could have its own genetic variability being located basally in the cytB tree; Picard and Plantard submitted [chapter 4]), these resistance sources could also be efficient for other Peruvian areas. In other introduced areas such as in USA (Marks and Brodie, 1998), a similar investigation could also be conducted to identify the origin of those North American populations and provide important information to control this pest. In Europe, quarantine measures should still be taken, with a particular attention taken to avoid the introduction of new *G. pallida* gene pools from South America (especially from the clade II which is also genetically diverse) (Brasier *et al.* 1999). Concerning the durability of resistance genes (which is the favoured control method in most countries due to the high toxicity of nematicide products), the evaluation of the genetic diversity of the pest is a central issue (Mac Donald and Linde, 2002). The relatively large genetic variability of European *G. pallida* compared to Peruvian populations (already observed by several authors although they had no or limited Peruvian populations among their samples; see the references quoted in the introduction) suggests that the control of this pest in Europe should be more difficult than for a pest with a narrow gene pool (all things being equal by elsewhere – i.e. same life history traits... –; compare for example the case of the Oomycetes *Phytophthora infestans* – Goodwin *et al.*, 1994 – with *Fusarium oxysporum* – O'Donnell *et al.*, 2000–). Finally, our results concerning the higher inbreeding level in Peru compared to Europe suggest that a population genetics approach should also provide important information concerning the reproductive mode of pest populations that could have important consequences for their control. In particular, it could provide a new tool to examine the consequences of some agricultural practices such as tilling, ploughing or any soil activities that could affect resistance durability of soil pests such as nematodes but also fungi.

References

Atkinson HJ, Green J, Cowgill S *et al.* (2001) The case for genetically modified crops with a poverty focus. *Trends in Biotechnology*, **19** (3), 91-96.

Amstrong MR, Blok VC, Phillips MS (2000) A Multipartite Mitochondrial Genome in the Potato Cyst Nematode *Globodera pallida*. *Genetic*, **154**, 181-192.

Bakker J (1993) Current state of nematicides. In: *Modern crop protection: developments and perspectives* pp. 21-26. Wageningen Agric. Univ. Press, Wageningen.

Blok VC, Malloch G, Harrower BE *et al.* (1998) Intraspecific variation in ribosomal DNA in populations of the potato cyst nematode *Globodera pallida*. *Journal of Nematology*, **30**, 262-274.

Blok VC, Phillips MS (1995) The use of repeat sequence primers for investigating genetic diversity between populations of potato cyst nematodes with differing virulence. *Fundamental and applied Nematology*, **18**, 575-582.

Blok VC, Phillips MS, Harrower BE (1997) Comparison of British populations of potato cyst nematodes with populations from continental Europe and South America using RAPD. *Genome*, **40** (1), 286-293.

Brasier CM, Cooke DE, Duncan JM (1999) Origin of a new Phytophthora pathogen through interspecific hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96** (10):5878-5883, 1999.

Brodie BB (1998) Potato cyst nematodes (*Globodera* species) in Central and North America. In: *Potato Cyst Nematodes, Biology, Distribution and Control* (eds. Marks RJ, Brodie BB), pp 317-331. CAB International, Oxon.

Burrows PR, Halford PD, Evans K (1996) Estimation of genetic variation between British populations of the potato cyst nematode *Globodera pallida* using RAPD-PCR. *Molecular Ecology*, **5**, 697-701.

Castelli L, Ramsay G, Bryan G *et al.* (2003) New sources of resistance to the potato cyst nematodes *Globodera pallida* and *G. rostochiensis* in the Commonwealth potato collection. *Euphytica* **129**, 377-386.

Cattan-Toupance I, Michalakakis Y and Neema C (1998) Genetic structure of wild bean populations in their South-Andean centre of origin. *Theoretical Applied Genetic* **96**: 844-851.

Davies N, Villablanca FX, and Roderick GK (1999) Bioinvasions of the Medfly *Ceratitidis capitata*: Source Estimation Using DNA Sequences at Multiple Intron Loci. *Genetics* **153**, 351-360.

ElMousadik A, Petit RJ (1996) High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L) Skeels] endemic to Morocco. *Theoretical and Applied Genetics*, **92**, 832-839.

Evans K, Franco J, Scurrah M (1975) Distribution of species of potato cyst-nematodes in South America. *Nematologica*, **21**, 265-269.

Felsenstein J (1985) Confidence-limits on phylogenies, an approach using the bootstrap. *Evolution*, **39**, 783-791.

Felsenstein J (2004) Phylogeny Inference Package (PHYLIP), Version 3.62, University of Washington, Seattle.

Flokertsma RT (1994) Inter- and intraspecific variation between populations of *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* revealed by random amplified polymorphic DNA. *The American Phytopathological society*, **84** (8) 807-811.

Folkertsma R, van der Voort JNAMR, de Goot KE *et al.* (1996a) Gene pool similarities of potato cyst nematode populations assessed by AFLP analysis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **9**, 47-54.

Folkertsma RT, deGroot KE, Van Koert PH *et al.* (1996b) Cluster analysis of 36 *Globodera pallida* field populations using two sets of molecular markers. *European Journal of Plant Pathology*, **102**, 577-584.

Folkertsma R, van Koert P, van der Voort JNAMR *et al.* (2001) The effects of founding events and agricultural practices on the genetic structure of three metapopulations of *Globodera pallida*. *Phytopathology*, **91**, 753-758.

Franco J (1977) Studies on the taxonomy and biology of potato cyst nematodes *Globodera spp.* Mulvey and Stone 1976. PhD thesis, University of London, 325p.

Jones FGW (1970) The control of potato cyst-nematode. *Journal of the Royal Society of Arts* 118: 179-199.

Goodwin SB, Cohen BA, Fry WE (1994) Panglobal Distribution of a Single Clonal Lineage of the Irish Potato Famine Fungus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **91**, 11591-11595.

Grenier E, Bossis M, Fouville D *et al.* (2001) Molecular approaches to the taxonomic position of Peruvian potato cyst nematodes and gene pool similarities in indigenous and imported populations of *Globodera*. *Heredity*, **86**, 277-290.

Hufbauer RA, Bogdanowicz S.M, Harrison RG (2004) The population genetics of a biological control introduction: mitochondrial DNA and microsatellite variation in native and introduced populations of *Aphidus ervi*, a parasitoid wasp. *Molecular Ecology*, **13**, 337-348.

Inagaki H, Kegasawa K (1973) Discovery of the potato cyst nematode, *Heterodera rostochiensis* Wollenweber, 1923 (Tylenchida: Heteroderidae) from Peru guano. *Applied Entomology and Zoology* **8**, 97-102.

MacDonald BA, Linde C (2002) Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology*, **40**, 349-379.

Manduric S, Andersson S (2003) Potato cyst nematode (*Globodera rostochiensis* and *G. pallida*) from Swedish potato cultivation-an AFLP study of their genetic diversity and relationships to other european populations. *Nematology*, **5**(6), 851-858.

Marks RJ, Brodie BB (1998) *Potato cyst Nematodes-Biology, distribution and control*. CAB International, Oxon 408p.

Marshall JW (1996) Detecting the presence and distribution of *Globodera rostochiensis* et *G. pallida* mixed populations in New Zealand using DNA probes. *New Zealand journal of crop and horticultural science*, **21**, 219-223.

Minnis ST, Haydock PPJ, Ibrahim SK *et al.* (2002) Potato cyst nematodes in England and Wales - occurrence and distribution. *Annals of Applied Biology*, **140**, 187-195.

Niederhauser JS (1991) The Potato Association of America and international cooperation 1916-1991. *American Potato Journal*. **68**, 237-239.

Mugniéry D, Zaouchi H (1976) Etude critique de la méthode d'échantillonnage des nématodes à kystes dans le sol et de la validité des différents critères d'estimation des populations. *Annales de Zoologie-Ecologie animale*, **8**, 177-195.

O'Donnell K, Kistler HC, Tacke BK *et al.* (2000) Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 7905-7910

Phillips MS, Harrower BE, Trudgill DL *et al.* (1992) Genetic variation in british populations of *Globodera pallida* as revealed by isozyme and DNA analysis. *Nematologica*, **38**, 304-319.

Picard D, Plantard O, Scurrah M *et al.* (2004) Inbreeding and population structure of the potato cyst nematode (*Globodera pallida*) in its native area (Peru). *Molecular Ecology*, **13**, 2899-2908

Raymond M, Rousset F Genepop (Version 1.2): a population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, **86**, 248-249.

Stone AR (1979) Co-evolution of nematodes and plants. *Symbolae Botanicae Upsalienses*, **22**, 46-61.

Stone GN, Sunnucks P (1993) Genetic consequences of an invasion through a patchy environment - the cynipid gallwasp *Andricus quercuscalicis* (Hymenoptera: Cynipidae). *Molecular Ecology*, **2**, 251-268.

Subbotin SA, Waeyenberge L, Moens M (2000) Identification of cyst forming nematodes of the genus *Heterodera* (Nematoda: Heteroderidae) based on the ribosomal DNA-RFLP. *Nematology*, **2**, 153-164.

Thiéry M, Mugniéry D (1996) Interspecific rDNA restriction fragment length polymorphism in *Globodera* species, parasites of Solanaceous plants. *Fundamental applied Nematology*, **19** (5), 471-479.

Trudgill DL, Elliott MJ, Evans K, *et al.* (2003) The white potato cyst nematode (*Globodera pallida*) - a critical analysis of the threat in Britain. *Annals of Applied Biology*, **143**, 73-80.

CHAPITRE VI

CONCLUSION GÉNÉRALE

Pour l'étude populationnelle du nématode de la pomme de terre *Globodera pallida* dans son berceau d'origine, nous avons mis en œuvre deux types d'échantillonnages, l'un hiérarchisé au niveau d'une région, d'un champ, d'une plante, l'autre le long d'un transect, ainsi qu'un diptyque méthodologique associant la génétique des populations et la phylogéographie. Cette approche évolutive nous a permis de mieux comprendre la biologie, la capacité de dispersion et l'histoire en des temps géologiques de ce nématode parasite de la pomme de terre. Certaines de ces avancées dépassent le cadre des nématodes endoparasites de plantes et peuvent s'appliquer à d'autres organismes telluriques. Nous avons ainsi mis en évidence au niveau intraspécifique chez *G. pallida* :

- ✓ une importante consanguinité
- ✓ un flux de gènes considérable à l'intérieur de bassins de production de la pomme de terre
- ✓ un isolement par la distance entre groupes d'individus séparés de plus de 50 km
- ✓ une structuration génétique forte entre des populations isolées par de puissants reliefs géographiques
- ✓ cinq clades ayant divergé à l'échelle de millions d'années sur des *Solanum* sauvages
- ✓ de multiples changements d'hôtes entre les *Solanum* sauvages et cultivés
- ✓ l'identification de l'origine des populations européennes.

Les résultats obtenus au cours de cette thèse s'incluent dans deux thématiques majeures (génétique des populations et phylogéographie) pour lesquelles nous suggérons, après un rappel détaillé de nos principaux résultats et leur discussion, de faire la synthèse des éléments qui constituent un fil rouge de ce travail (capacité de dispersion et les apports de ce travail au niveau agronomique). En conclusion, nous exposerons les orientations de recherches qui pourraient être développées à la suite de ce travail.

6.1. Génétique des populations et Phylogéographie : les principaux résultats

6.1.1. Description du fonctionnement génétique des populations de *Globodera pallida* dans son berceau d'origine (le Pérou) à partir d'un échantillonnage hiérarchisé

Au Pérou, *G. pallida* s'est avéré très consanguin. Deux hypothèses ont été émises pour expliquer le déficit en hétérozygotes significatif observé :

- ✓ Une reproduction préférentielle entre individus apparentés (« assortative mating »)
- ✓ Lors de l'éclosion d'un kyste, des centaines de frères et sœurs se dispersent activement à distance réduite (paragraphe 1.2.2) favorisant ainsi une reproduction entre individus étroitement apparentés et ceci à chaque génération.

Jusqu'alors, les flux de gènes de *G. pallida* étaient considérés comme négligeables (cf. paragraphe 1.2.2). On s'attendait alors à observer une augmentation de la variabilité génétique au fur et à mesure que l'on augmentait le nombre de parcelles analysées dans une région donnée. Toutefois, pour les trois régions analysées (jusqu'à 35 km) correspondant à des bassins importants de production de la pomme de terre, nos résultats montrent que la quasi-totalité de la variabilité génétique observée dans une région se retrouve à l'échelle de la rhizosphère d'une plante. En ce qui concerne la structure génétique, celle-ci n'a pas pu être détectée dans ces trois régions, ce qui reflète une forte dispersion passive des kystes. À partir de ce premier résultat majeur, on peut dire que la capacité de dispersion de *G. pallida* a été jusqu'ici largement sous-estimée, ce constat est probablement généralisable à l'ensemble des nématodes à kyste. Une structuration génétique n'a été constatée uniquement qu'à l'échelle la plus large, c'est-à-dire entre les trois régions distantes de plusieurs centaines de kilomètres les unes des autres. Cette structure génétique s'est avérée très forte. Nous l'expliquons par les puissants reliefs géographiques que présente la Cordillère des Andes (annexe 2) et qui sont autant de barrières à la dissémination passive des kystes.

Il y a une apparente contradiction entre les importants flux de gènes au sein d'un bassin de production et la consanguinité observée. Nonobstant, à l'échelle de la rhizosphère d'une plante, la faible dispersion active des juvéniles et des adultes mâles entraîne la consanguinité, alors que sur de longues distances, les flux géniques sont la conséquence de la dispersion passive des kystes (annexe 2). En effet, de nombreux facteurs biotiques et abiotiques permettent une large dispersion passive des kystes comme nous l'avons vue en détail dans le paragraphe 1.2.2.

Nous observons donc une absence de structuration génétique entre parcelles séparées jusqu'à 35 km et une très forte structure génétique entre régions séparées de plus de 320 km. Où,

pourquoi et comment passe-t-on de tout à rien ? Autrement dit : (a) quelles sont les limites géographiques de l'absence de structuration génétique ? (b) quels sont les facteurs (biologiques, topographiques...) à l'origine de l'apparition de la structure génétique ? (c) le passage de l'absence à la forte structuration génétique se fait-il suivant un patron d'isolement par la distance (Isolation By Distance en anglais ; IBD) ? (d) qu'est ce qu'une population pour ce nématode à kyste ?

6.1.2. Patron d'« isolement par la distance » le long d'un transect de 1.500 km dans la cordillère des Andes et structuration génétique chez un organisme du sol de 500 micromètres

Bien que les organismes telluriques aient pour la plupart une distribution continue comme certaines plantes (par exemple les chênes ou certaines graminées sous nos latitudes), les nématodes à kyste ont une distribution discontinue limitée par la présence de leur hôte. Cependant, les régions de production de la pomme de terre sur les hauts plateaux andins sont constituées de parcelles contiguës où la pomme de terre est régulièrement cultivée (rotation courte de trois à quatre ans), formant ainsi un territoire où le nématode est distribué de façon continue (figure 6.1). Aux altitudes les plus hautes de ces régions de production (> 4.000m), l'homme cultive actuellement la pomme de terre suivant une pratique culturelle ancestrale et utilise des variétés andines déjà adoptées par les Incas (annexe 1 ; figure 6.2). Ces communautés des hautes terres vivent plus ou moins en autarcie, ce qui se traduit pour la culture de pomme de terre par la mise en réserve d'une partie des tubercules récoltés pour être plantés l'année suivante, le reste étant dévolu à la consommation de la communauté et à la vente sur les marchés locaux (annexe 1). Les variétés andines cultivées à cette altitude doivent nécessairement résister au gel et leurs semences ne sont pas commercialisées, alors qu'aux altitudes plus basses où le climat est moins rigoureux, les variétés cultivées sont souvent issues de sélections récentes (Hijmans *et al.* 2003). Ces régions de culture sont séparées par des zones plus ou moins larges où toute culture est absente et où par conséquent *G. pallida* est aussi absent, provoquant des discontinuités dans sa distribution (figure 6.1). Toutefois, en dehors des zones de très hautes altitudes (> 4.900 m), des zones tropicales dans les vallées et des zones arides, des foyers de *Solanum tubéreux* sauvages contaminés par *G. pallida* peuvent persister.



Figure 6.1 : Photo prise près de Chinchero (Cuzco). Le premier plan montre une région agricole des hauts plateaux andins et l'arrière plan montre une zone sans cultures pouvant induire une barrière à la dispersion des kystes.



Figure 6.2 : Photo prise à 4.150 m dans la province de Huancavelica. À cette altitude, des variétés andines résistant au gel sont cultivées. Une rotation d'une à trois cultures (dont la première année est réservée à la culture de tubercules) suivies de huit ans ou plus de jachères, laisse un paysage dominé par les graminées sauvages des hautes altitudes des Andes (« la puna »).

L'approche bayésienne de regroupement décèle une structuration génétique entre les régions séparées par une zone non cultivée, la structuration pouvant être très forte pour des régions isolées les unes des autres par de puissantes barrières géographiques. Par ailleurs, nous ne constatons pas de structure génétique à l'intérieur des régions agricoles où la distribution du nématode à kyste est continue. Cependant, à la plus haute altitude (> 4.000m) où persistent quelques parcelles cultivées éparses, une structuration génétique, toutefois moins importante qu'entre régions, a été décelée. Deux hypothèses peuvent expliquer la structuration génétique observée à haute altitude :

- ✓ Une diminution de la dissémination de kystes, donc du flux génétique, due à l'absence ou aux faibles échanges de tubercules associés à de la terre contaminée entre les parcelles de hautes altitudes et celles de plus basses altitudes. Dans ce cas, l'homme, par ces pratiques, est directement lié à la structuration génétique observée.
- ✓ L'existence de génotypes de *G. pallida* adaptés aux génotypes de variétés andines résistant au gel. Dans ce cas, c'est le processus de co-évolution entre l'hôte et le parasite qui est lié à la structuration génétique observée.

L'étude du patron d'isolement par la distance donne des résultats similaires à ceux obtenus par l'analyse bayésienne. À l'intérieur des bassins de production, aucun IBD n'a été détecté, bien que des parcelles soient distantes de 120 km. Un patron d'isolement par la distance émerge dès l'apparition de zones exemptes de cultures entre bassins de production et ne devient plus détectable pour les régions séparées par des distances supérieures à ~ 400 km. Pour expliquer cette absence d'IBD, deux hypothèses peuvent être envisagées pour les distances supérieures à ~ 400 km :

- ✓ L'IBD entre populations persiste, mais les populations atteignent une telle divergence que les marqueurs microsatellites sont soumis à l'homoplasie.
- ✓ L'IBD est absent. À cette échelle, l'espèce serait fragmentée en plusieurs lignées entre lesquelles le flux génétique serait nul ou négligeable. Des événements historiques (colonisation, fragmentation...) auraient mis ces lignées en place (figure 6.3).

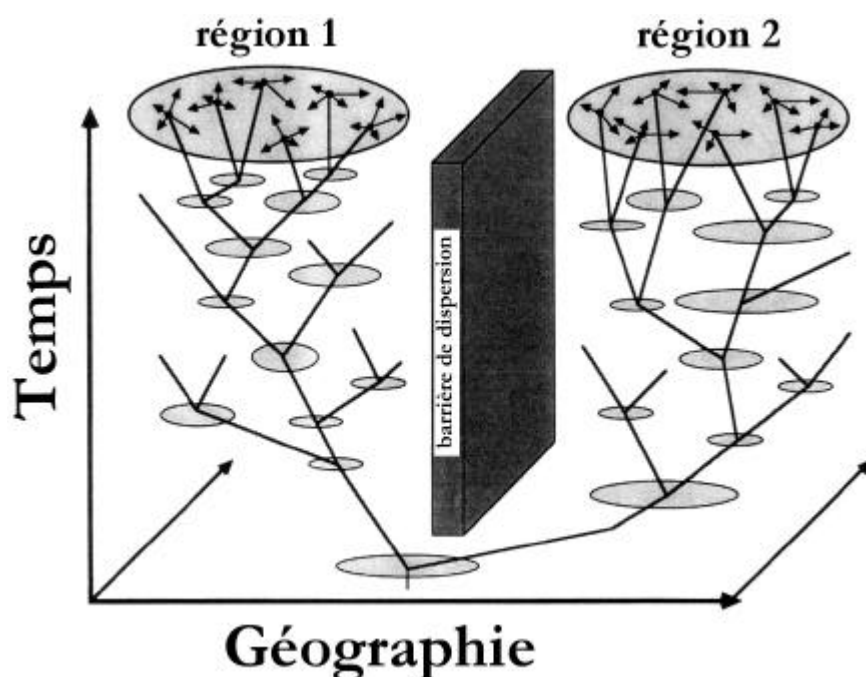


Figure 6.3 : Généalogie de gènes pour une espèce avec des flux génétiques limités à l'intérieur de chaque région séparée par une barrière physique. Les ovals grisés représentent l'étendue géographique de chaque lignée et les flèches la magnitude spatiale contemporaine de dispersion. (d'après Avise 2000).

Dans cette étude, aucun IBD et aucune structuration génétique (à l'exception des parcelles de hautes altitudes) ne sont détectés jusqu'à 50 km. Il est possible qu'une analyse statistique plus puissante avec un échantillonnage plus important permette d'observer un patron d'isolement par la distance à cette échelle. Mais dans tous les cas, la diminution du flux génique associée à l'augmentation de la distance resterait ténue. Nous pouvons considérer qu'il n'existe qu'une seule population pour des distances inférieures à 50 km. Toutefois, (1) comme les plus petites distances entre deux parcelles séparées par une zone non cultivée sont légèrement supérieures à 50 km et (2) comme aucun IBD ni aucune structuration génétique (à l'exception des parcelles de hautes altitudes) n'ont été observés à l'intérieur des trois régions agricoles, nous émettons donc l'hypothèse qu'il n'y a qu'une seule population à l'intérieur d'une région agricole où la distribution de *G. pallida* est continue. Cette hypothèse est limitée par la distance maximale de 120 km entre deux parcelles dans une même région agricole.

Cette approche combinant patron d'isolement par la distance et structuration génétique apparaît puissante pour appréhender les limites d'une population de nématodes à kyste. A l'aide de cette méthodologie, il serait intéressant de regarder comment le patron génétique observé dans notre étude se généralise à d'autres organismes telluriques, voire même à des plantes dont la dispersion passive des graines peut s'apparenter à celle des kystes.

Nous avons émis l'hypothèse qu'il n'y a qu'une seule population à l'intérieur d'une région agricole où la distribution de *G. pallida* est continue et nous avons observé qu'un patron d'isolement par la distance émerge dès l'apparition de zones exemptes de cultures entre bassins de production et ne devient plus détectable pour les régions séparées par des distances supérieures à ~ 400 km. Quelles sont les relations historiques entre les populations séparées par une forte structuration génétique ? Quelles sont les causes de l'origine de la disparition de l'IBD à des distances supérieures à ~ 400 km (voir les deux hypothèses ci-dessus) ?

6.1.3. Une colonisation du sud vers le nord de la Cordillère Andine par le nématode à kyste de la pomme de terre au cours des temps géologiques suggère de multiples changements d'hôtes des espèces sauvages aux espèces cultivées

La dissémination de *G. pallida* apparaît fortement limitée par les reliefs géographiques des Andes. À l'inverse de nombreux organismes ubiquistes, la capacité de dispersion limitée par la topographie fait de *G. pallida* un candidat intéressant pour aborder son histoire. En effet, l'arbre élaboré à partir de séquences nucléotidiques (gène cytochrome b) permet de décrire cinq clades

robustes concordants avec l'origine géographique des individus analysés. Tous les résultats (topologie des arbres basés sur les marqueurs cytochrome b et microsatellite ; longueur des branches dans l'arbre cytochrome b; patron géographique de la diversité allélique obtenu avec l'analyse des loci microsatellites) convergent vers la même hypothèse d'une colonisation des Andes, du sud vers le nord (du lac Titicaca à la frontière de l'Équateur). Les divergences entre les séquences cytochrome b (ADN mitochondrial) obtenues sont bien trop fortes pour que cette colonisation du sud vers le nord soit consécutive à la domestication des pommes de terre il y a quelques milliers d'années. En effet, le niveau de divergence obtenu avec le gène mitochondrial est du même ordre de grandeur que celui d'autres nématodes, d'insectes et de mammifères ayant divergé depuis plusieurs dizaines à plusieurs centaines de millions d'années. Le taux de divergence de séquences d'ADN nucléaire (ITS1-5.8S-ITS2) renforce ce résultat.

La même hypothèse d'une colonisation des Andes du sud (Bolivie) vers le nord (Venezuela) à l'échelle de millions d'années, est acceptée chez l'unique autre étude en phylogéographie d'espèces inféodées à de hautes altitudes et endémiques de la Cordillère andine (Doan 2003). Ces espèces appartiennent au genre *Proctoporus* (lézard). En recoupant des données (centre de biodiversité, phylogénie) sur les *Solanum* tubéreux sauvages (Castillo et Spooner 1997 ; Hijmans et Spooner 2001 ; Carputo *et al.* 2003), une colonisation des Andes similaire à celle observée pour le genre *Proctoporus* est vraisemblable dans le cas de *G. pallida*. L'hôte de *G. pallida* (*Solanum* tubéreux), *G. pallida* et le genre *Proctoporus* sont des espèces de hautes altitudes de la Cordillère andine et à ce titre ont donc été influencés par la géologie de cette chaîne de montagne. En effet, il y a concordance entre la direction du processus de colonisation de ces organismes et l'orogénèse des Andes ainsi que la datation de ces processus : l'érection des Andes aurait commencé durant le début du Miocène (~ 24 millions d'années) à l'emplacement de l'actuel Altiplano (figure 1.9), à partir de ce point, l'érection aurait progressé vers le nord (annexe 3).

D'après la concordance de nos résultats, avec la phylogéographie du genre *Proctoporus*, les données observées chez l'hôte de *G. pallida* et le processus d'orogénèse des Andes, nous émettons l'hypothèse qu'à partir du lac Titicaca, *G. pallida* a colonisé les Andes au fur et à mesure que l'érection de la montagne progressait vers le nord, grâce à la progression conjointe de son hôte (les *Solanum* tubéreux sauvages). Lors de la domestication de la pomme de terre, *G. pallida* aurait parasité les pommes de terre cultivées à plusieurs reprises et ceci de façon indépendante dans les cinq clades.

Le patron génétique de *G. pallida* a été appréhendé dans son berceau d'origine, se pose maintenant la question de la description du patron génétique dans un milieu d'introduction. En Europe, l'homme a probablement introduit *G. pallida* avec l'importation de tubercules de pommes

de terre contaminés. Actuellement, cette espèce se développe dans des parcelles cultivées en pommes de terre ou en tomates. Sur le vieux continent, le patron génétique de *G. pallida* est fortement lié au nombre d'introductions, au niveau de diversité génétique des populations importées et à l'origine géographique des populations importées. À partir de l'étude de génétique des populations et de l'étude de phylogéographie au Pérou, nous allons tenter d'éclaircir ces zones d'ombre, mais aussi d'estimer l'impact des pratiques agricoles modernes sur le patron génétique : le travail mécanique de la terre en profondeur modifie-t-il le déficit en hétérozygotes observé au Pérou ?

6.1.4. Origine et diversité génétique des populations du nématode à kyste de la pomme de terre introduites en Europe

Une question classique pour les ravageurs des cultures introduits est celle de leur origine géographique. En Europe, cette question est récurrente dans le cas de *G. pallida*. Plusieurs scénarii ont déjà été envisagés (Franco 1977 ; Armstrong 2000). Mais aucune hypothèse s'appuyant sur des données robustes n'a pu être énoncée jusqu'alors. Dans l'arbre phylogénétique péruvien établi à partir des séquences du gène cytochrome b, les treize haplotypes issus de populations échantillonnées dans six pays européens se sont tous placés dans le clade le plus basal correspondant au sud du Pérou. L'arbre établi à partir des données de sept loci microsatellites donne le même résultat : les quinze populations analysées se placent dans le clade correspondant aux populations situées le plus au sud du Pérou. On peut donc en conclure que les populations européennes sont originaires du sud du Pérou (clade I). En comparant la richesse allélique observée dans les populations européennes et celle observée dans les populations péruviennes du clade I, on constate une diminution de moitié de la richesse allélique dans les populations d'Europe. Cette diminution était attendue pour les populations introduites car elle est la conséquence des goulots d'étranglement, des effets fondateurs et de la dérive génétique. Toutefois, la richesse allélique observée en Europe est supérieure à celle observée dans le nord du Pérou (clade V). Bien que les populations du clade V soient les plus récentes du Pérou donc les moins riches en allèles, ce résultat démontre la présence d'une diversité génétique relativement haute en Europe. La biologie de *G. pallida* peut expliquer ce résultat. En effet, la vitesse de reproduction de *G. pallida* (plus de 1000 œufs par femelle) et les effectifs considérables que peuvent atteindre *G. pallida* dans une parcelle cultivée en pomme de terre (jusqu'à dix kystes par gramme de sol) limitent l'effet de goulot d'étranglement. De plus, la quasi-totalité de la variabilité génétique observée dans un bassin agricole péruvien se retrouve à l'échelle de la rhizosphère d'une plante ce qui permet l'introduction de

nombreux allèles lors du transport d'un tubercule associé à de la terre contaminée et par conséquent ceci restreint l'effet fondateur. En Europe, pour expliquer l'importante richesse allélique observée dans des populations très divergentes entre elles, nous émettons l'hypothèse d'introductions multiples de plusieurs kystes. Les 2 haplotypes (gène cytochrome b) introduits en Europe correspondent aux haplotypes de «Colca Canyon» d'une part et de Sicuani et d'Arapa d'autre part. Ce résultat renforce l'hypothèse qu'il n'y a pas eu qu'une seule introduction en Europe. Cependant pour confirmer l'hypothèse de multiples introductions de plusieurs kystes, la diversité haplotypique (gène cytochrome b) à l'intérieur d'une parcelle devra être testée et le nombre de parcelles analysées dans le clade V et en Europe devra être accru.

G. pallida apparaît moins consanguin en Europe qu'au Pérou. Deux hypothèses ont été émises pour expliquer la consanguinité observée au Pérou (cf. paragraphe 6.1.1.). Il n'y a apparemment pas de raison pour penser que la reproduction préférentielle entre individus apparentés (« assortative mating ») soit différente entre l'Europe et la Pérou où la diversité génétique peut y être inférieure. Pour expliquer la consanguinité observée dans les deux zones géographiques, nous posons comme postulat que la faible dispersion active des juvéniles et des mâles à chaque génération conduit à un phénomène d'agrégation entraînant un regroupement d'individus apparentés dans le sol (figure 6.4). Au Pérou, le travail de la terre est très superficiel et dans le meilleur des cas, il est analogue à celui de l'araire. Par contre en Europe, il y a une homogénéisation mécanique due à un labour profond avec un retournement complet du sol, ce qui aboutit à une certaine homogénéisation de la distribution verticale des kystes dans le sol et diminue l'agrégation des kystes (Mugniéry et Zaouchi 1976).

6.2. Interrelation entre le patron génétique et l'agronomie

Dans ce chapitre sont développées les thématiques dont les résultats sont répartis dans les différentes études ci-dessus. Ces thèmes sont regroupés en une partie homogène afin de faciliter leur compréhension.

6.2.1. Le transport de kystes par l'homme : mythe ou réalité ?

G. pallida peut entraîner des dégâts considérables. Le transport des tubercules associés à de la terre contaminée est incriminé comme principale cause de dissémination des kystes de ce parasite d'où son classement comme organisme de quarantaine dans la plupart des pays du monde.

Au Pérou, dans un bassin de production de pommes de terre, une structuration génétique est observée entre des parcelles de hautes altitudes et celles de basses altitudes. Cependant, cette structuration reste faible et un flux génétique persiste en dépit de l'absence ou de faibles échanges de tubercules entre les parcelles de hautes et basses altitudes. Il apparaît donc directement que les kystes peuvent se disperser autrement que par le transport de tubercules contaminés. À l'échelle du pays, l'absence de structuration génétique entre la région agricole d'Andahuaylas et celle d'Ayacucho (chapitre 3), séparées par une vaste zone sans culture de pommes de terre peut s'expliquer par un échange récurrent de tubercules contaminés. Cette dispersion due à l'homme peut aussi expliquer les rares haplotypes typiques d'un clade qui ont été échantillonnés en dehors de l'aire géographique correspondant à leur clade (chapitre 4). Il serait nécessaire d'augmenter le nombre de taxons dans l'arbre basé sur le marqueur mitochondrial pour le confirmer. L'évolution de *G. pallida* en cinq clades divergeant depuis des millions d'années montre les limites de la capacité naturelle (non anthropique) de dispersion du nématode. Pendant ces millions d'années, les échanges d'individus entre clades ont été nuls ou rares.

Le transport de tubercules avec de la terre contenant des kystes engendre vraisemblablement des flux génétiques importants. Cependant, même si les mesures de quarantaine limitent la dissémination du parasite à longue distance, elles n'ont visiblement qu'une influence réduite à l'intérieur des bassins de production de la pomme de terre.

Toutefois, il faut noter que l'échantillonnage accompli au cours de la thèse a été effectué dans des parcelles avec des effectifs de *G. pallida* souvent considérables. Dans ces conditions, pour pouvoir détecter un flux de gènes entre des parcelles à fort effectif, il est nécessaire que le nombre de kystes échangés soit considérable. Il en résulte que l'absence de flux génétique constaté dans cette étude ne signifie pas qu'il y ait une absence totale de migration de kystes. Par ailleurs, un seul kyste permet d'établir une nouvelle population dans une parcelle vierge de *Globodera*. Il est donc envisageable que *G. pallida* puisse contaminer des régions agronomiques isolées situées à plusieurs centaines de kilomètres, sans transport de kystes par l'homme. Toutefois, les mesures de quarantaine restent intéressantes pour empêcher des flux de gènes importants à travers toute l'Europe et ainsi limiter la propagation d'éventuels génotypes virulents. Si une variété résistante permet de réduire de façon drastique les populations de *G. pallida*, les mesures de quarantaine permettraient d'éviter une rapide dissémination à toute l'Europe (si elles ne peuvent l'empêcher) d'un génotype virulent se dévoilant localement.

6.2.2. Apport de la thèse en agronomie

Au Pérou, *G. pallida* est (1) fortement consanguin, (2) capable de se disséminer à longue distance, (3) possède à l'échelle de la rhizosphère d'une plante une large part de la variabilité génétique observée à l'échelle de toute une région agronomique (chapitre 2 et 3) et (4) est présent dans les parcelles cultivées en pomme de terre avec des effectifs souvent très élevés. D'après ces caractéristiques, *G. pallida* peut être considéré comme un parasite ayant une forte capacité à contourner un gène de résistance selon la classification McDonald et Linde (2002). Les observations fréquentes de contournement de résistance rapportées dans la littérature (Llontop *et al.* 1989; Janssen *et al.* 1990; Turner et Fleming 2002) sont en accord avec cette interprétation, ainsi qu'avec la théorie gène pour gène (Flor 1955) : face à un gène de résistance dominant chez l'hôte correspond un gène d'avirulence récessif pour le pathogène. Comme la plupart des variétés résistantes sont constituées à partir de gènes dominants, seuls les individus homozygotes pour la virulence peuvent parvenir au stade femelle sur les plantes résistantes. La reproduction consanguine favorise la production d'individus homozygotes et donc le contournement de résistance. En Europe, *G. pallida* apparaît moins consanguin qu'au Pérou, ce qui peut s'expliquer par un travail accru de la terre entraînant la déstructuration de groupes d'individus apparentés au niveau de la rhizosphère d'une plante (chapitre 5; figure 6.4). Si cette hypothèse était confirmée, le travail de la terre serait recommandé pour diminuer le nombre d'individus homozygotes et ainsi favoriser la durabilité de la variété résistante. Van den Bosch et Gilligan (2003) soulignent l'importance de combiner les approches de génétique des populations et de dynamique des populations afin d'estimer la durabilité de la résistance à l'aide d'un modèle épidémiologique. Les résultats obtenus ici apportent de nouvelles données pour la réalisation de ce type de modèle.

Les résultats de l'approche phylogéographique (chapitre 4 et 5) pourront être utilisés par les services phytosanitaires pour déterminer la diversité génétique et l'origine géographique des populations introduites de *G. pallida*. La méthodologie utilisée dans cette étude leur apporte un outil d'identification des populations de *G. pallida*. Pour les sélectionneurs européens de variétés résistantes à *G. pallida*, nos résultats (chapitre 5) indiquent qu'il est préférable d'utiliser des populations du sud du Pérou pour tester l'efficacité d'un gène de résistance. Mais pour les sélectionneurs péruviens, mieux vaut utiliser des populations de chacun des cinq clades identifiés (chapitre 4). De la sorte, ces efforts permettront d'augmenter la probabilité que la résistance soit effective sur l'ensemble des populations de *G. pallida* concernées (O'Donnell *et al.* 2000). Il en est de même dans le domaine médical. L'élaboration d'un vaccin nécessite d'appréhender la diversité génétique d'un pathogène pour augmenter son efficacité (Koufopanou *et al.* 1997).

Cette étude permettra de suivre les modifications du patron génétique lors du déploiement de gènes de résistance en Europe et ainsi d'estimer le potentiel évolutif du nématode face à une forte pression de sélection. Nous développerons plus cet aspect dans le paragraphe suivant.

6.3. Perspectives

6.3.1. Consanguinité, flux génique et structure génétique

La structuration en groupes d'individus apparentés au niveau de la rhizosphère d'une plante (cf. paragraphe 6.1.4) est une hypothèse qui mériterait d'être confirmée. Dans une parcelle où la terre est peu travaillée, un échantillonnage le long d'un transect vertical et horizontal au niveau des racines d'une plante (figure 6.4) pourrait être conduit avant et après le labour. Ainsi, l'existence d'une structuration génétique ou d'un isolement par la distance à cette échelle seraient testés, tout comme l'impact d'un labour profond sur le patron génétique. Ce travail serait facilité par le choix d'une parcelle ayant une importante diversité génétique comme dans le sud du Pérou.

Toutefois, même si la faible capacité de dispersion active et la structuration génétique à l'échelle d'une plante est l'hypothèse privilégiée pour expliquer la consanguinité observée, la reproduction préférentielle entre individus apparentés (« assortative mating ») ne peut être encore définitivement exclue. Pour répondre à cette question, des manipulations biologiques en boîte de Petri peuvent être envisagées. Des individus mâles originaires des cinq clades pourraient être mis en compétition pour se reproduire avec une femelle originaire d'un clade donné. L'utilisation de marqueurs microsatellites permettrait de savoir si les individus les plus apparentés se reproduisent ensemble de façon significative, ainsi que de déterminer quantitativement l'influence de chacun des mâles lors de la reproduction.

Un échantillonnage sur des *Solanum* sauvages, bien que très difficile à réaliser [les *Solanum* sauvages sont ardues à trouver ; la prévalence (pourcentage d'hôtes parasités) et la charge parasitaire sont nettement inférieures à celles observées chez les *Solanum* cultivés] permettrait de décrire la structure génétique de *G. pallida* dans son milieu naturel et d'estimer les flux géniques entre le compartiment sauvage et cultivé. Il en résulterait une meilleure compréhension des modifications sur le patron génétique des nématodes phytoparasites engendrées par l'agriculture et une meilleure estimation de la capacité naturelle de dispersion des kystes. Comme nous l'avons vu dans un paragraphe précédent (paragraphe 6.2.1), il est difficile d'évaluer l'impact des activités humaines sur l'augmentation de la dissémination des kystes et par conséquent d'apprécier l'intérêt des mesures de

quarantaine ou de mesures prophylactiques comme la désinfection de machines agricoles. Une étude de génétique des populations sur des *Solanum* sauvages apporterait de nombreuses informations à ce sujet en décrivant la part de la dissémination naturelle par rapport celle observée dans la thèse.

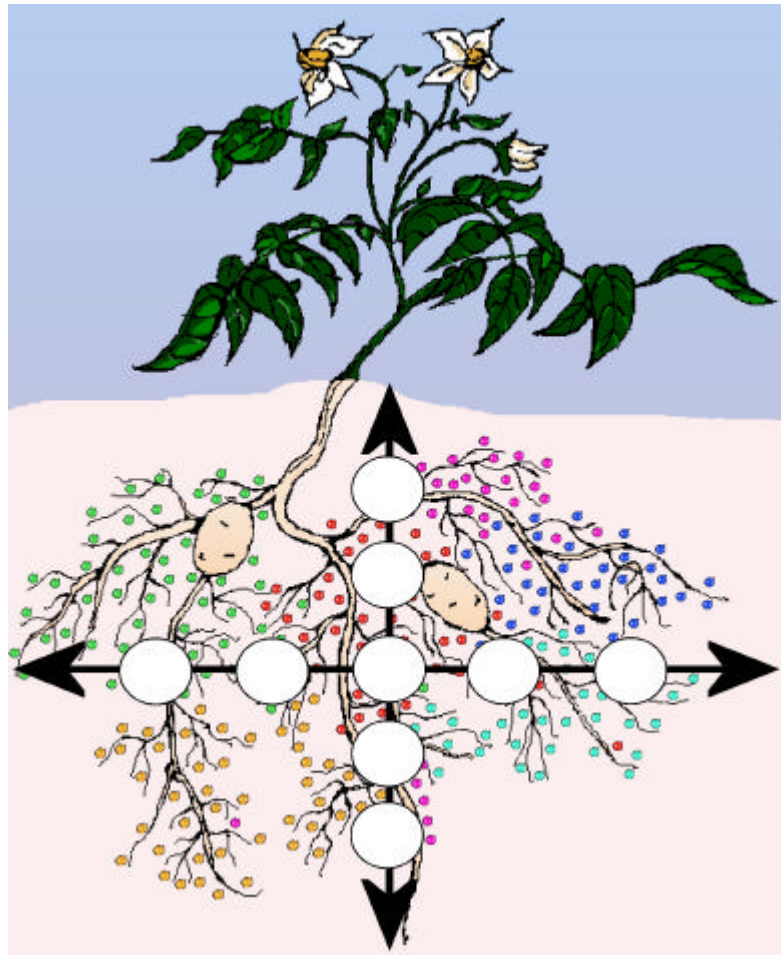


Figure 6.4 : Schématisation de l'échantillonnage au niveau de la rhizosphère d'une plante ; les cercles représentent les zones échantillonnées (20 cm de diamètre) le long de deux transects de 1,50 mètre ; les points de couleurs représentent les kystes, chaque couleur symbolise un groupe d'individus apparentés (hypothèse à tester).

6.3.2. Co-évolution entre l'hôte et le parasite

L'étude de la modification du patron génétique de *G. pallida* soumis à des pressions de sélection enrichirait les connaissances sur le potentiel évolutif de ce parasite. Au Pérou, une monoculture sur une dizaine d'années de différentes espèces de *Solanum* cultivées (cf. paragraphe 1.3.1) ou sauvages dans des parcelles séparées permettrait de suivre une éventuelle modification du patron génétique de *G. pallida*. Ainsi, nous testerions si certains génotypes du parasite sont particulièrement adaptés à certains génotypes de son hôte, ce qui indiquerait une forte

spécialisation (co-évolution) de *G. pallida* associée à un fort potentiel adaptatif. Une étude similaire pourrait être réalisée avec des variétés de pommes de terre résistantes (la variété Hualash) ou avec un clone de *Solanum* sauvage dont le gène de résistance à *G. pallida* est connu, cartographié voire séquencé (Van der Vossen *et al.* 2000). Une telle étude nous permettrait de mieux comprendre pourquoi la variété Maria Huanca, lorsqu'elle a été cultivée dans deux parcelles voisines (région d'Otuzco), s'est avérée résistante dans l'une et sensible dans l'autre. Ce cas particulier, rapporté par Maria Schurrah va à l'encontre des résultats obtenus avec des marqueurs neutres (les parcelles d'une même région agricole sont identiques génétiquement ; chapitre 3). Cependant une explication peut être avancée. Il est avéré que la variété Hualash est résistante à *G. pallida*. Il est probable qu'il existe d'autres variétés résistantes à *G. pallida* dans la multitude des variétés péruviennes actuellement cultivées. La culture d'une de ces variétés dans une parcelle peut entraîner l'augmentation ponctuelle de la fréquence d'un gène de virulence, dont la variété Maria Huanca aurait fait les frais. L'identification de gènes de virulence reste un point crucial pour comprendre les stratégies de contournement de variétés résistantes, mises en place par le parasite.

6.3.3. Phylogéographie et systématique

Couplée à la géologie, la phylogéographie s'est avérée une approche efficace pour retracer l'histoire de *G. pallida*. L'utilisation de cette approche dans ce travail soulève de nombreuses questions captivantes. L'altiplano se serait soulevé en premier (figure 1.9) et l'érection des Andes se serait poursuivie vers le nord (Colombie) et vers le sud (Patagonie). Vers le nord, nous avons émis l'hypothèse vraisemblable d'une colonisation de *G. pallida* concomitante avec l'orogénèse des Andes (annexe 3). L'étude de la phylogéographie de *Globodera rostochiensis* distribué plus au sud que *G. pallida* pourrait confirmer cette hypothèse. Il serait intéressant de confirmer le patron de colonisation avec l'étude de *G. pallida* sur des *Solanum* sauvages, ce qui permettrait aussi de tester l'hypothèse d'une co-évolution à l'intérieur des cinq clades décrits (chapitre 4) entre l'hôte et le parasite.

La divergence entre *Globodera pallida* et *G. rostochiensis* (figure 1.2 ; chapitre I) est forcément antérieure à la diversification intra-spécifique observée entre les 5 clades de *G. pallida* (qui serait, elle, contemporaine de l'érection des Andes). Comme *G. rostochiensis* est actuellement aussi inféodé aux hautes altitudes, il serait intéressant d'étudier la phylogéographie de cette espèce au sud du lac Titicaca afin de la comparer avec le pattern observé chez *G. pallida* et vérifier si cette espèce s'est indépendamment adaptée aux *Solanum* tubéreux sauvages de cette zone. Ce tableau biogéographique pourrait aussi être étendu à l'ensemble des espèces du genre *Globodera* et plus

particulièrement des espèces inféodées aux Solanacées, qu'on trouve toutes dans les Amériques (cf *G. mexicana*, en Amérique centrale, *G. tabacum* en Amérique du nord ; figure 1.3). Les temps de divergence entre ces groupes étant encore plus anciens, ces études pourraient permettre d'affiner la calibration moléculaire de ce genre, en ajoutant plusieurs points de calibration.

Etant donné l'ancienneté des divergences entre les 5 clades péruviens, il est étonnant d'observer l'absence de barrière à la reproduction et de différenciation morphologique au sein de cette espèce (voir cependant Franco – 1977 – qui a toutefois noté quelques différences morphologiques entre les populations péruviennes du nord et du sud). Dans la plupart des phyla du règne vivant, une telle divergence aurait conduit à la formation d'espèces distinctes. La lente mise en place de barrière à la reproduction s'observe entre les espèces américaines du genre *Globodera* : (1) Une femelle de *G. pallida* et un mâle de *G. mexicana* donnent une descendance interféconde, (2) *G. rostockiensis* et *G. pallida* donnent une descendance viable mais stérile, (3) *G. rostockiensis* et *G. tabacum* donnent une descendance interféconde bien que peu prolifique et (4) Une femelle de *G. tabacum solanacearum* et un mâle de *G. mexicana* donnent une descendance interféconde. D'un autre côté, on peut restituer ces observations dans le cadre de nos résultats sur le fonctionnement génétique des populations de *G. pallida*. En effet, cette espèce s'est avérée très consanguine dans les parcelles cultivées du Pérou. Il est possible que cette consanguinité s'accroisse dans son milieu naturel. En effet, l'absence totale de travail de la terre et la dispersion clairsemée en foyers des *Solanum* tubéreux sauvages doivent limiter la dispersion passive des kystes et renforcer la consanguinité. Dès lors, la lente mise en place de barrière à la reproduction présente l'avantage sélectif de limiter la consanguinité et par conséquent l'accumulation d'allèles délétères. L'absence de mise en place de barrière reproductive pourrait donc être une adaptation de ces organismes pour compenser leur faible capacité de dispersion (effet Allee ?). Néanmoins, un tel phénomène aurait pour conséquence indirecte de freiner l'adaptation locale de ces nématodes. Dans un contexte co-évolutif, où ce parasite doit perpétuellement s'adapter aux mécanismes de défense mis en place par sa plante hôte, une telle stratégie pourrait donc se révéler coûteuse. L'estimation précise des bénéfices et des coûts de ces différentes stratégies représenterait une avancée importante dans le cadre des études sur l'évolution de la virulence, qui constitue actuellement une branche très dynamique de la biologie évolutive

BIBLIOGRAPHIE

(hors références citées dans les articles)

- Aldenderfer M (2004) Sur le toit du monde. *Pour la science*, **320**, 62-68.
- Amstrong MR, Blok VC, Phillips MS (2000) A Multipartite Mitochondrial Genome in the Potato Cyst Nematode *Globodera pallida*. *Genetic*, **154**, 181-192.
- Avise JC, Arnold J, Ball RM *et al.* (1987) Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **18**, 489-522.
- Avise JC (2000) *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, MA, 447p.
- Ayala FJ, Rzhetsky A & Ayala FJ (1998) Origin of the metazoan phyla: Molecular clocks confirm paleontological estimates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 606-611.
- Bakker J, Folkertsma RT, Rouppe van der Voort JN *et al.* (1993) Changing concepts and molecular approaches in the management of virulence genes in potato cyst nematodes. *Annual Review of Phytopathology*, **31**, 169-190.
- Bakker J (2002) Durability of resistance against potato cyst nematodes. *Euphytica*, **124**, 157-162.
- Baldwin JG, Nadler SA & Adams BJ (2004) Evolution of plant parasitism among nematodes. *Annual Review of Phytopathology*, **42**, 83-105.
- Baujard P & Martiny B (1994) Transport of nematodes by wind in the peanut cropping area of Sengal, West Africa. *Fundamental & Applied Nematology*, **17**, 543-550.
- Bendezu IF, Evans K, Burrows PR *et al.* (1998) Inter and intra-specific genomic variability of the potato cyst nematodes *Globodera pallida* and *G. rostochiensis* from Europe and South America using RAPD-PCR. *Nematologica*, **44**, 49-61.
- Berhens EC (1975) *Globodera* Skarbilovich, 1959, eine selbständige Gattung in der Unterfamilie Heteroderinae Skarbilovich, 1974 (Nematoda: Heteroderinae). In: *1 Vortragstagung 24 Aktuellen Problemen der Phytoneematologie am 29.5.1975 in Rostock*, pp12-26.
- Blaxter ML, Ley Pd, Garey JR *et al.* (1998) A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature*, **392**, 71-75.
- Blok VC, Ehwaeti M, Fargette M *et al.* (1997a) Evolution of resistance and virulence in relation to the management of nematodes with different biology, origins and reproductive strategies. *Nematologica*, **43**, 1-13.
- Blok VC, Phillips MS & Harrower BE (1997b) Comparison of British populations of potato cyst nematodes with populations from continental Europe and South America using RAPDs. *Genome*, **40**, 286-293.

- Carputo D, Frusciante L & Peloquin SJ (2003) The role of 2n gametes and endosperm balance number in the origin and evolution of polyploids in the tuber-bearing solanums. *Genetics*, **163**, 287-294.
- Castillo RO & Spooner DM (1997) Phylogenetic relationships of wild potatoes, *Solanum* series *Conicibaccata* (sect. *Petota*). *Systematic Botany*, **22**, 45-83.
- Coghlan A & Wolfe KH (2002) Fourfold faster rate of genome rearrangement in nematodes than in *Drosophila*. *Genome Research*, **12**, 857-867.
- Crofton HD (1971) Form, Function, and Behavior. In: *Plant Parasitic Nematodes* (eds. Zuckerman BM, Mai WF, Rohde RA), pp 83-116. Academic Press, New York.
- De Ley P & Blaxter ML. 2002. Systematic position and phylogeny. In *The Biology of Nematodes*, ed. DL Lee, pp 1-30, Taylor & Francis, London.
- Doan TM (2003) A south-to-north biogeographic hypothesis for Andean speciation: evidence from the lizard genus *Proctoporus* (Reptilia, Gymnophthalmidae). *Journal of Biogeography*, **30**, 361-374.
- Dorris M, De Ley P & Blaxter ML (1999) Molecular analysis of nematode diversity and the evolution of parasitism. *Parasitology Today*, **15**, 188-193.
- Epps JM (1971) Recovery of soybean cyst nematodes (*Heterodera glycines*) from the digestive tracts of blackbirds. *Journal of Nematology*, **3**, 417-419.
- Evans K & Stone AR (1977) A review of the distribution and biology of the potato cyst-nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. *Pans*, **23**, 178-189.
- Fenwick DW (1949) Investigations on the emergence of larvae from cysts of the potato-root eelworm *Heterodera rostochiensis*. I. Technique and variability. *Journal of Helminthology* **23**, 157-170.
- Ferris VR (1979) Cladistic approaches in the study of soil and plant parasitic nematodes. *American Zoologist*, **19**, 1195-1215.
- Finlay BJ (2002) Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. *Science*, **296**, 1061-1063.
- Flor HH (1955) Host-parasite interaction in flax rust _ its genetics and other implications. *Phytopathology*, **45**, 680-685.
- Folkertsma RT, Van Koert PH, Rouppe van der Voort JN *et al.* (2001) The effects of founding events and agricultural practices on the genetic structure of three metapopulations of *Globodera pallida*. *Phytopathology*, **91**, 753-758.
- Foster P (2001) The potential negative impacts of global climate change on tropical montane cloud forests. *Earth-Science Reviews*, **55**, 73-106.

- Franco J (1977) Studies on the taxonomy and biology of potato cyst nematodes *Globodera* spp. Mulvey and Stone 1976. PhD thesis, University of London, 325p.
- Garcia-Moreno J, Navarro-Siguenza AG, Peterson AT *et al.* (2004) Genetic variation coincides with geographic structure in the common bush-tanager (*Chlorospingus ophthalmicus*) complex from Mexico. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **33**, 186-196.
- Gerard J (1597) *The Herball or General Historie of Plantes*, 1st edn. London (cité dans Hawkes 1990).
- Gheysen G & Fenoll C (2002) Gene expression in nematode feeding sites. *Annual Review of Phytopathology*, **40**, 191-219.
- Grenier E, Bossis M, Fouville D *et al.* (2001) Molecular approaches to the taxonomic position of Peruvian potato cyst nematodes and gene pool similarities in indigenous and imported populations of *Globodera*. *Heredity*, **86**, 277-290.
- Hawkes JG (1990) *The potato. Evolution, biodiversity and genetic resource*. Belhaven Press, London, 259p.
- Hawkins BA & Marino PC (1997) The colonization of native phytophagous insects in North America by exotic parasitoids. *Oecologia*, **112**, 566-571.
- Heschl M & Baillie D (1990) Functional elements and domains inferred from sequence comparisons of a heat shock gene in two nematodes. *Journal of Molecular Biology*, **31**, 3-9.
- Hijmans RJ & Spooner DM (2001) Geographic distribution of wild potato species. *American Journal of Botany*, **88**, 2101-2112.
- Hijmans RJ, Condori B, Carrillo R *et al.* (2003) A quantitative and constraint-specific method to assess the potential impact of new agricultural technology: the case of frost resistant potato for the Altiplano (Peru and Bolivia). *Agricultural Systems*, **76**, 895-911.
- Janssen R, Bakker J & Gommers F (1990) Selection of virulent and avirulent lines of *Globodera rostochiensis* for the H1 resistance gene in *Solanum tuberosum* ssp. andigena CPC 1673. *Revue de Nématologie*, **13**, 265-268.
- Jensen PM & Kantz RR (1974) Pre-ceramic transhumance and andean food production. *Economic botany*, **28**, 43-55.
- Jones FGW (1970) The control of the potato-cyst nematode. *Royal Society of Arts*, **117**, 179-199.
- Jones FGW (1972). Management of nematode populations in Great Britain. pp 81-107 in: *Proceedings 12th Tall Timbers Fire Ecology Conference, Tall Timbers Research Station, Tallahassee, FL.*

Jones MG & Northcote DH (1972) Nematode-induced syncytium-a multinucleate transfer cell. *Journal of cell science*, **10**, 789-809.

Kellogg EA (1998) Who's related to whom? Recent results from molecular systematic studies. *Current Opinion in Plant Biology*, **1**, 149-158.

Kennedy BP, Aamodt EJ, Allen FL *et al.* (1993) The Gut Esterase Gene (Ges-1) from the Nematodes *Caenorhabditis-Elegans* and *Caenorhabditis-Briggsae*. *Journal of Molecular Biology*, **229**, 890-908.

Koch R, van Luenen HGAM, van der Horst M *et al.* (2000) Single nucleotide polymorphisms in wild isolates of *Caenorhabditis elegans*. *Genome Research*, **10**, 1690-1696.

Koufopanou V, Burt A & Taylor JW (1997) Concordance of gene genealogies reveals reproductive isolation in the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**, 5478-5482.

Kühn J (1881) Die Ergebnisse der Versuche zur Ermittlung der Ursache der Rübenmüdigkeit und zur Erforschung der Natur der Nematoden. *Berichte Physiologischen Laboratorium und der Versuchsanstalt des Landwirtschaftlichen Instituts der Universität Halle*, **3**, 1-153.

Kupiec JJ & Sonigo P (2000) *Ni Dieu ni gène. Pour une autre théorie de l'hérédité*. Editions du seuil, Paris, 229p.

Lee YH, Huang XY, Hirsh D *et al.* (1992) Conservation of Gene Organization and Transsplicing in the Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase-Encoding Genes of *Caenorhabditis-Briggsae*. *Gene*, **121**, 227-235.

Llontop J, Franco J & Scurrah M (1989) Variation in virulence and aggressiveness of *Globodera pallida* in potato clones resistant to races P4A and P5A in Peru. *Nematropica*, **19**, 111-124.

Luc M, Maggenti AR & Fortuner R (1988) A reappraisal of Tylenchina (Nemata). 9. The family Heteroderidae Filip'ev & Schuurmans Stekhoven, 1941. *Revue de Nématologie* **11**, 159-176.

Marshall EJP & Brain P (1999) The horizontal movement of seeds in arable soil by different soil cultivation methods. *Journal of Applied Ecology*, **36**, 443-454.

McDonald B & Linde C (2002) The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. *Euphytica*, **124**, 163-180.

Mugniéry D & Zaouchi H (1976) Etude critique de la méthode d'échantillonnage des nématodes à kystes dans le sol et de la validité des différents critères d'estimation des populations. *Annales de Zoologie-Ecologie animale*, **8**, 177-195.

Norton DC & Niblack TL (1991) Biology and ecology of nematodes. In: *Manual of agricultural nematology* (ed. Nickle WR), pp 47-72. M. Dekker, New-York.

- O'Donnell K, Kistler HC, Tacke BK *et al.* (2000) Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 7905-7910.
- Plantard O & Porte C (2004) Population genetic structure of the sugar beet cyst nematode *Heterodera schachtii*: a gonochoristic and amphimictic species with highly inbred but weakly differentiated populations. *Molecular Ecology*, **13**, 33-41.
- Poinar GO & Poinar R (2003) *Agathis amber: a cretaceous insect trap*. Presented at Annu. Meet., Geol. Soc. Am., Seattle (cité dans Baldwin *et al.* 2004)
- Poma de Ayala FG (1987) *Nueva Cronica y Buen Gobierno*. Murra JV, Adorno R, and Urioste JL, eds. Historia 16, Madrid. 1384 p.
- Prasad S & Baillie D (1989) Evolutionarily conserved coding sequences in the dpy-20-unc-22 region of *Caenorhabditis elegans*. *Genomics*, **5**, 185-198.
- Rawsthorne D & Brodie B (1986) Root growth of susceptible and resistant potato cultivars and population dynamics of *Globodera rostochiensis* in the field. *Journal of Nematology*, **18**, 379-384.
- Roderick GK & Navajas M (2003) Genes in new environments: Genetics and evolution in biological control. *Nature Reviews Genetics*, **4**, 889-899.
- Rodriguez-Trelles F, Tarrío R & Ayala FJ (2002) A methodological bias toward overestimation of molecular evolutionary time scales. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 8112-8115.
- Rossignol L & Roussel-Bourgeois F (1996) Botanique, morphologie et taxonomie. In : *La pomme de terre* (eds. Rousselle P, Robert Y, Crosnier JC), pp 49-69. INRA, Paris.
- Salaman RN (1937) The potato in its early home and its introduction into Europe. *Journal of the Royal Horticultural Society* **62**, 61-77, 112-123, 153-162, 253-266.
- Sanderson MJ (2003) Molecular data from 27 proteins do not support a Precambrian origin of land plants. *American Journal of Botany*, **90**, 954-956.
- Spire D & Roussel P (1996) Origine socio-historique. In : *La pomme de terre* (eds. Rousselle P, Robert Y, Crosnier JC), pp 25-48. INRA, Paris.
- Spooner DM, Lopez AS, Huaman Z *et al.* (1999) Wild potato collecting expedition in southern Peru (Departments of Apurimac, Arequipa, Cusco, Moquegua Puno, Tacna) in 1998: taxonomy and new genetic resources. *American Journal of Potato Research*, **76**, 103-119.
- Spooner DM & Hijmans RJ (2001) Potato systematics and germplasm collecting, 1989-2000. *American Journal of Potato Research*, **78**, 237-268.

- Stevens MI & Hogg ID (2003) Long-term isolation and recent range expansion from glacial refugia revealed for the endemic springtail *Gomphiocephalus hodgsoni* from Victoria Land, Antarctica. *Molecular Ecology*, **12**, 2357-2369.
- Stone AR (1972) *Heterodera pallida* n.sp. (Nematoda: Heteroderidae), a second species of potato cyst nematode. *Nematologica*, **18**, 591-606.
- Strong DR (1997) Ecology - Fear no weevil? *Science*, **277**, 1058-1059.
- Subbotin SA, Halford PD, Warry A *et al.* (2000) Variations in ribosomal DNA sequences and phylogeny of *Globodera* parasitising solanaceous plants. *Nematology*, **2**, 591-604.
- Subbotin SA, Vierstraete A, De Ley P *et al.* (2001) Phylogenetic relationships within the cyst-forming nematodes (Nematoda, Heteroderidae) based on analysis of sequences from the ITS regions of ribosomal DNA. *Molecular Phylogenetic Evolution*, **21**, 1-16.
- Thacker C & Marra MA, Jones A *et al.* (1999) Functional genomics in *Caenorhabditis elegans*: An approach involving comparisons of sequences from related nematodes. *Genome Research*, **9**, 348-359.
- Thièry M & Mugniéry D (1996) Interspecific rDNA restriction fragment length polymorphism in *Globodera* species, parasites of solanaceous plants. *Fundamental & Applied Nematology*, **19**, 471-479.
- Thurston HD (1994) Andean potato culture: 5000 years of experience with sustainable agriculture. In: *Potato Pest Biology and Management* (eds. Zehnder GW, Powelson ML, Jansson RK, Raman KV), pp 6-13. The American Phytopathological Society, St. Paul.
- Trudgill DL (1967) The effect of environment on sex determination in *Heterodera rostochiensis*. *Nematologica* **13**, 263-272.
- Turner SJ & Evans K (1998) The origins, global distribution and biology of potato cyst nematodes (*Globodera rostochiensis* (Woll.) and *Globodera pallida* Stone). In: *Potato Cyst Nematodes, Biology, Distribution and Control* (eds. Marks RJ, Broodie BB), pp 7-26. CAB International, Oxon.
- Turner SJ & Fleming CC (2002) Multiple Selection of Potato Cyst Nematode *Globodera pallida* Virulence on a Range of Potato Species. I. Serial Selection on Solanum-hybrids. *European Journal of Plant Pathology*, **108**, 461-467.
- Van den Bosch F & Gilligan CA (2003) Measures of durability of resistance. *Phytopathology*, **93**, 616-625.
- Van der Vossen E, Rouppe van der Voort JN, Kanyuka K *et al.* (2000) Homologues of a single resistance-gene cluster in potato confer resistance to distinct pathogens: a virus and a nematode. *Plant Journal*, **23**, 567-576.

Van der Wurff AWG, Isaaks JA, Ernsting G & Van Straalen NM (2003) Population substructures in the soil invertebrate *Orchesella cincta*, as revealed by microsatellite and TE-AFLP markers. *Molecular Ecology*, **12**, 1349-1359.

Veevers JJ (2004) Gondwanaland from 650-500 Ma assembly through 320 Ma merger in Pangea to 185-100 Ma breakup: supercontinental tectonics via stratigraphy and radiometric dating. *Earth-Science Reviews*, **68**, 1-132.

Vuilleumier F & Simberloff D (1980) Ecology versus history as determinants of patchy and insular distributions in High Andean birds. *Evolution Biology*, **12**, 235-379.

Wardle D, Yeates G, Barker G *et al.* (2003) Island Biology and Ecosystem Functioning in Epiphytic Soil Communities. *Science*, **301**, 1717-1720.

White J (1953) Wind-borne dispersal of potato-root eelworm. *Nature*, **172**, 686-687.

Wollenweber HW (1923) *Krankheiten und Beschädigungen der Kartoffel*. Arbeiten des Forschungsinstitutes für Kartoffelbau, Heft 7, Paul Parey, Berlin, 56 p.

ANNEXE 1

Le Pérou, berceau d'origine du nématode de la pomme de terre

Le Pérou, berceau d'origine du nématode de la pomme de terre

Pour limiter l'emploi de nématicides dans la lutte contre le nématode à kyste de la pomme de terre, le recours à des variétés résistantes est une des alternatives possibles. La 1^{re} étape consiste à aborder la diversité génétique du parasite. L'Inra-Rennes mène l'enquête depuis 2002.

Par Damien Picard et Pauline Casters

Inra-Rennes, U.M.R. "Biologie des organismes et des populations appliquée à la protection des plantes".

Le nématode à kyste de la pomme de terre (*Globodera pallida*) est un sérieux parasite des racines. Il se maintient dans le sol sous forme de kystes (sorte de sac de moins d'1 mm de diamètre) pendant plus de 10 ans en absence de pomme de terre. En présence de la plante, le kyste libère des centaines de larves envahissant les racines. Les symptômes au champ se matérialisent par des foyers de plantes chétives, comparables à un flétrissement dû à un déficit hydrique. Parasite de quarantaine* en Europe et dans pratiquement tous les pays du monde, il peut occasionner des pertes de rendement allant jusqu'à 50 %. En France, la contamination d'un champ entraîne l'interdiction d'y produire des semences pendant 5 ans, renouvelable par période de 3 ans le cas échéant, jusqu'à ce que les analyses de sols ne révèlent plus d'individus vivants ni de kystes contenant des larves viables. Sa dissémination par le vent, les engins agricoles et surtout la terre adhérent aux semences lui permet de coloniser progressivement une grande partie du monde. Originaire des hauts plateaux andins, comme la pomme de terre sauvage (photo 1) à laquelle il est associé depuis des millions d'années, le nématode se rencontre aujourd'hui sur toutes les variétés cultivées de pommes de terre. Il a été importé sur le vieux continent avec l'introduction de la pomme de terre au XVI^e siècle. Dans le monde, les dégâts dus au nématode sont importants en terme de rendement. Au Pérou, ils sont occultés par les dégâts liés aux coléoptères des Andes. Jusqu'alors employés en masse, les nématicides dévoilent leurs limites (toxicité pour l'homme, l'environnement, et pertes d'efficacité) et poussent l'Europe à développer d'autres moyens de lutte. L'une de ces méthodes consiste à utiliser des plantes résistantes. Les recherches menées à l'INRA de Rennes depuis 20 ans visent à connaître la variabilité des populations** de nématodes phytoparasites et celle des pommes de terre dans le cadre de la recherche de résistances: identification d'individus résistants, étude du mode de résistance et de l'hérédité de cette résistance, mise en place d'un schéma de sélection, durabilité de la résistance... Quelques soient les types de résistances trouvées, un délai de 15 ans est nécessaire pour obtenir une nouvelle variété commerciale, résistante à un nématode ... Ce travail s'effectue en liaison et collaboration avec les sélectionneurs français.

*engendrant des dégâts très importants, l'organisme de quarantaine fait l'objet d'une surveillance phytosanitaire particulière. En cas de présence sur le territoire, la législation impose de prendre des mesures pour empêcher sa dissémination et l'éradiquer.

** groupe d'individus interféconds habitant dans une même zone géographique (même bassin de production de la pomme de terre).



Photo 1 : Fleur de pomme de terre sauvage (photo D. Picard).

LA CORDILLÈRE PÉRUVIENNE : UN SITE IDÉAL POUR L'ÉCHANTILLONNAGE

La lutte variétale repose sur la recherche de gènes de résistance isolés à partir d'espèces de pommes de terre sauvages. Mais ces gènes ont une efficacité variable selon la population (souche, lignée) de nématodes. Ainsi, en 1990, l'utilisation de variétés de pommes de terre résistantes s'est avérée efficace ou non selon les localités péruviennes. La description génétique des nématodes à l'échelle du territoire permettra d'identifier les populations du Pérou et leurs limites géographiques. Par la suite, les sélectionneurs pourront tester si les nouvelles variétés de pommes de terre résistantes possèdent une efficacité totale ou partielle sur l'ensemble des populations identifiées. De plus, l'origine géographique de l'importation en Europe du nématode pourra être établie précisément.

L'Amérique du Sud, et plus précisément la Cordillère des Andes, est le berceau d'origine de la pomme de terre ; on y retrouve des milliers de variétés, sauvages, andines ou améliorées, offrant une multitude de couleurs et de formes. Au Pérou, la diversité du nématode est maximale du fait de la longue histoire de l'association hôte-parasite. Ce pays constitue donc une zone d'observation idéale. Les études sur d'autres pathogènes de la pomme de terre (mildiou...) de cette région soulignent l'intérêt de l'échantillonnage dans le berceau d'origine.

L'échantillonnage a nécessité une mission de 3 mois durant l'été 2002, dont 9 semaines de prélèvements sur le terrain et 3 semaines d'extraction des kystes au laboratoire du Centre international de la pomme de terre (C.I.P.) de Lima, capitale du Pérou.

Le test de la bouteille : une méthode qui a fait ses preuves

Comment identifier un champ sain d'un champ infesté ? Les ingénieurs péruviens ont mis au point une méthode qui a fait ses preuves. Cette dernière consiste à :

- prélever quelques poignées de terre sèche sur l'ensemble du champ,
- placer quelques centimètres de cette terre dans une bouteille,
- compléter par de l'eau.

Après agitation, les kystes, plus légers que l'eau, flottent en surface permettant une 1^{re} estimation de l'état d'infestation de la parcelle, qui devra être confirmée par un échantillonnage et une analyse plus poussés.

VARIÉTÉS ET PRATIQUES CULTURALES SELON L'ALTITUDE

Les variétés les plus communément cultivées au Pérou sont des variétés modernes sélectionnées en station expérimentale, aussi appelées **pommes de terre améliorées**. Elles sont le plus souvent cultivées à des **altitudes inférieures à 3 800 m**. Des échanges importants de plants existent à l'échelon régional, voire national. Or, les contrôles sanitaires ne prennent pas en compte les nématodes à kystes, qui ne sont pas des organismes de quarantaine dans ce pays. Un déplacement important des nématodes existe donc dans les zones où sont cultivées ces pommes de terre. En outre, ce phénomène est accentué par la production de semences dans des zones très contaminées. Les variétés plus anciennes que les pommes de terre améliorées, dites **pommes de terre andines**, présentent une plus grande diversité génétique. Elles sont sélectionnées sur place depuis de nombreuses générations. Les civilisations andines, dès 2 000 ans avant J.-C., réussirent à domestiquer la pomme de terre sauvage. La pomme de terre andine (photo 2) est la descendante directe de ces pommes de terre. Actuellement, elle est le plus souvent cultivée à des **altitudes supérieures à 3 800 m**, de par sa résistance au gel.



Photo 2 : Variété andine : la 'Kitipchu' (photo D. Picard).

Aux altitudes inférieures à 2 500 m, où règne un climat équatorial, la culture de pomme de terre se caractérise par des rendements élevés pouvant atteindre 40 à 50 t/ha et des pratiques culturales modernes. Le nématode ne parvient pas à se développer dans cette zone au climat trop chaud.

Entre 2 500 m et 3 000 m, la culture de la pomme de terre en saison sèche implique le recours à l'irrigation. À cette altitude, le maïs domine. Cultivé principalement en saison humide et chaude, il peut alterner avec la pomme de terre, plutôt cultivée en saison sèche.

De 3 000 m à 3 800 m, la production de pomme de terre est importante (photo 3). Les terrains escarpés et souvent peu accessibles offrent peu de possibilités de mécanisation, et les rendements restent inférieurs à 20 t/ha. À cette altitude, les pommes de terre sont le plus souvent des variétés "modernes". Elles sont conditionnées sur place (photo 4) et vendues à des négociants pour les marchés urbains.



Photo 3 : Récolte de pomme de terre vers 3 500 m d'altitude (photo D. Picard).



Photo 4 : Le tri des pommes de terre en bord de champ (photo D. Picard).

Entre 3 800 à 4 200 m, l'agriculture se raréfie et les rotations s'allongent. La pratique la plus courante est : une jachère d'au moins 7 ans, suivie d'une année de pomme de terre et d'une année de céréale (blé, seigle). Les jachères, fortement dominantes dans ces zones, sont colonisées rapidement par des graminées sauvages broutées par les moutons, vaches, lamas et alpagas. La pomme de terre cultivée est andine. À la fin de la récolte, les tubercules de petits calibres sont réservés pour la semence, les autres étant destinés à la consommation familiale et à la vente en cas de surplus. La présence de nématodes à kyste est rare, mais ces zones sont intéressantes par l'isolement des populations présentes. Il est donc probable que les populations de nématodes qui s'y développent ont divergé de façon considérable en raison de leur isolement géographique.

Deux cas particuliers d'une pratique agricole limitant le développement du nématode

La dispersion de semences de pommes de terre fortement contaminées par les nématodes a pour conséquence une dissémination de la maladie dans toutes les zones de production du Pérou. La vallée de Colca (région nord d'Arequipa, voir figure 1) est un cas particulier : les agriculteurs ont pour coutume de nettoyer les plants dans l'eau à l'aide de filets de pêcheur ; la terre et donc les kystes sont ainsi éliminés, avec pour conséquence la décontamination des semences. Les régions d'élevage à longues rotations rencontrées dans le Nord sont aussi faiblement infestées. La pratique du pâturage est plus longue que la survie du nématode, permettant ainsi de décontaminer les parcelles pour les cultures de pomme de terre suivantes.

UN LARGE PANEL DE POPULATIONS DE NÉMATODES À ANALYSER GÉNÉTIQUEMENT

La prospection a eu lieu entre 2 500 et 4 200 m d'altitude dans toute la cordillère péruvienne. Elle a permis de prélever un nombre important de populations représentatives de la diversité des nématodes.

Chaque champ échantillonné est caractérisé par ses coordonnées géographiques (latitude, longitude et altitude) à l'aide du G.P.S.* Ces données permettront de rééchantillonner au même endroit le cas échéant. L'exposition du champ, la rotation pratiquée et la variété de pomme de terre cultivée sont aussi prises en compte. Sur les 342 champs échantillonnés, l'analyse du sol en laboratoire s'est révélée positive pour 281 échantillons (tableau 1). Quatre-vingt quinze champs s'avèrent peu contaminés (5 kystes pour 100 g de terre), mais une grande partie (100 champs) l'est fortement (plus de 200 kystes pour 100 g de terre).

Tableau 1. Niveaux d'infestation des 342 champs échantillonnés.

infestation	nulle	faible	moyenne	forte	très forte
nombre de kystes/100 g de sol (estimation)	0	0-50	50-150	150-300	plus de 300
nombre de champs	61	95	86	63	37

L'analyse génétique des nématodes sera réalisée à l'aide de techniques modernes (génotypage de loci microsatellites consistant en l'analyse de la taille d'une partie du génome dont la longueur est hypervariable, séquençage de gènes) développées sur la plate-forme de génotypage Grand-Ouest (programme d'achat et de gestion d'appareils de haute technologie). Cette analyse permettra d'identifier les populations du Pérou, mais aussi d'estimer leurs variabilités génétiques et la capacité du nématode à migrer d'une population à l'autre. Une approche permettant de retracer l'historique des populations selon leur dispersion géographique sera utilisée pour trouver l'origine des populations européennes et le nombre d'événements d'introduction. Ces connaissances fondamentales sur ce parasite constitueront une aide appréciable pour mieux gérer la durabilité de variétés de pommes de terre résistantes.

*Global positioning system.

ANNEXE 2

**Génétique des populations de *Globodera pallida* dans son berceau d'origine (le Pérou) :
consanguinité et fort flux de gènes**

Population genetics of the potato cyst nematode in Peru: high inbreeding but long range dispersal

D. Picard, O. Plantard & D. Mugniéry

UMR INRA-AGROCAMPUS BIO3P, Domaine de la Motte, B.P. 35327, 35653 Le Rheu cedex, France.



Aim: Assessment of the genetic variability and the gene flow at various spatial scales, and the reproductive mode

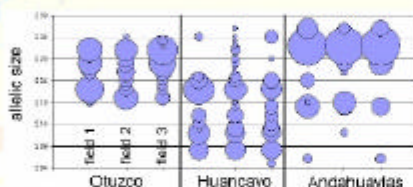
Globodera pallida is native of the Andean Cordillera (the origin of its unique host plant, *Solanum* spp.) and has been recently introduced in Europe. A sampling was done in Peru to avoid any distortion in the population genetics study due to multiplication cycles in the laboratory and stochastic effect of genetic drift in introduced populations.

Three fields in three regions (Otuzco, Huancayo and Andahuaylas) were sampled. For each field, 40 juveniles (each from a different cyst and from a different soil sample) were genotyped with 8 microsatellite loci.

RESULTS

1- Long range dispersal

e.g. Locus GP20: each allele is represented by a distinct circle with an area proportional to allele frequency.



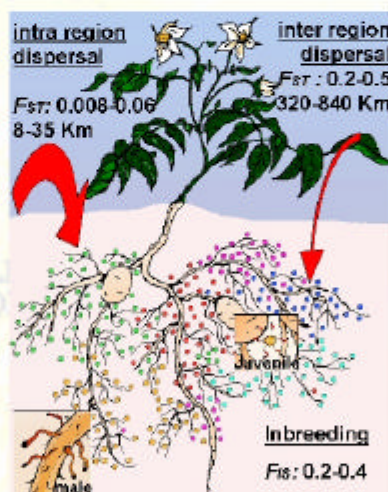
A large allelic richness was observed at all loci. Most alleles in each region are identical and indicate a lack of genetic structuration. Most alleles between regions are different and indicate a large genetic structuration.

Intra region dispersal

A lack of genetic structuration was observed between fields within regions and supported by weak F_{ST} values that are indicative of **high intra region gene flow**.

Such a long range dispersal (more than 35 km) could be explained by an effective passive transport of cysts due to :

- ✓ wind, water or transport of soil and seed tubers
- ✓ huge population size
up to 9 billions cysts by hectare
- ✓ founding a population with one cyst is possible
containing hundreds eggs
- ✓ conservation form
a cyst is viable more than 10 years



Inter region dispersal

A large genetic structuration was observed between regions and supported by high F_{ST} values that are indicative of low inter region gene flow. Such a limited dispersal of cyst at more than 320 km is probably due to major biogeographic barriers (deep valleys and high mountains) in the Andean Cordillera.



2- High inbreeding

High F_{IS} values (high deficit of heterozygotes) were observed and are indicative of a **high inbreeding**.

To explain this result, we must remember that:

- ✓ Cysts contain hundreds siblings
- ✓ Juveniles and males disperse actively at weak distance in the soil (a few cm)

Therefore, a large number of weakly dispersing siblings leads to inbreeding.

CONCLUSION

There is an apparent contradiction between long range dispersal and high inbreeding. However, even if cysts disperse passively at long distance, the weak active dispersal of hundreds siblings occurs at each generation allowing to maintain inbreeding.

ANNEXE 3

Orientation et datation de l'orogénèse des Andes induits par la phylogéographie de *Globodera pallida*

Direction and timing of Andean uplift propagation deduced from the molecular phylogeny of highland biota

Damien Picard¹, Thierry Sempere² & Olivier Plantard¹

¹ UMR INRA-ENSAR BiO3P, Domaine de la Motte, B.P. 35327, 35653 Le Rheu cedex, France

² IRD, Laboratoire "Mécanismes et Transferts en Géologie", 14 avenue Edouard Belin, 31400 Toulouse, France

Abstract

Because the rise of mountains creates new ecosystems and triggers evolutionary changes, biological data may be used to assess the development and timing of surface uplift. Here we apply this idea to the Peruvian Andes through a molecular phylogenetic and phylogeographic study of *Globodera pallida*, a potato parasite nematode that requires cool temperatures and thus thrives above 2000-2500 m in these tropical highlands. The Peruvian populations of this species exhibit a clear evolutionary pattern with basal lineages occurring in Andean southern Peru and more derived lineages progressively occurring northwards. Genetically diverging *G. pallida* populations thus progressively colonised northerly-expanding uplifted areas, demonstrating that altitude in the Peruvian Andes was acquired longitudinally from south to north, i.e. in the direction of decreasing orogenic volume. After calibration by consistent geological and biological events, the phylogeny of *G. pallida* is used as a molecular clock, which indicates that the 2000-2500 m critical elevation range was reached in the Early Miocene (~23-18 Ma) in southern Peru, in the Middle Miocene (~16-11 Ma) in southern central Peru, and in the latest Miocene (~9-6 Ma) in central and northern Peru.

1. Introduction

The Central Andes result from crustal thickening (James, 1971) but their uplift history is poorly known (Gregory-Wodzicki, 2000). Orogeny imposed adaptive pressure on western South American biota, creating new ecosystems and triggering a variety of speciations among plant and animal groups, which resulted in the Andean region being one of the world's high biodiversity centers (Balslev, 1993). In particular, orogeny produced a marked decrease in mean annual temperature (MAT) in areas being uplifted. Biomolecular data concerning highland species inform on synorogenic biotic evolution and should thus provide an indirect way to assess and date the acquisition of altitude.

At tropical latitudes, i.e. between ~20°N and ~20°S, areas of lower MATs are highlands. Jumps in altitudinal range and related adaptation to cooler conditions were associated with Andean speciations (e.g., Willmott et al., 2001). Among plants, one major adaptation to highland conditions is exemplified by the wild potatoes (*Solanum* section *Petota*), with several Central Andean species showing a pronounced tolerance to frost (Spooner et al., 1999; Hijmans & Spooner, 2001; Hijmans et al., 2003). Potato parasites such as cyst-nematodes, which coevolved with the wild potatoes, are also cold-adapted (see below; Franco, 1977; Picard, 2005; Picard & Plantard, 2005).

Here we use the molecular phylogeny and phylogeography of highland potato cyst-nematodes, along with other published biological and geological data, to characterise and date aspects of the Andean uplift in Peru. We observe that the uplift ages deduced from molecular clocks and those

obtained by more classical geochronological tools are generally consistent and mutually help to constrain the geological and biological evolutions of the Peruvian Andes.

2. Andean surface uplift and its timing: a poorly resolved geologic issue

The Andes are considered as a mountain belt built along a continental margin by tectonic and magmatic processes produced by subduction of an oceanic plate, in an apparently non-collisional setting (James, 1971; Isacks, 1988, Kono et al., 1989; James & Sacks, 1996). This outstanding orogenic belt shows considerable longitudinal variations (Fig. GEOL).



Fig. GEOL Segmentation of the Andes Cordillera (after Sempere et al., 2002).

The Central Andes are the largest and most mountainous segment of the cordillera. This ~4000 km-long segment is itself segmented into the northern Central Andes (5°30'S-~13°S; entirely located in Peru), Bolivian Orocline (~13°S-28°S; over southern Peru, Bolivia, northern Chile, northwestern Argentina), and southern Central Andes (28°S-37°S; over central Chile and west-central Argentina). The Bolivian Orocline covers an area of ~1.300.000 km² and its orogenic volume is by far the largest of the entire Andes. Orogenic volume clearly decreases along strike north and south of the Orocline. In Peru, it is characteristic that the width of the emerged orogen

is ~500 km between Lake Titicaca and Cusco, ~360 km in south-central Peru, and ~240 km in northern Peru; correspondingly, mean maximum elevations decrease northwards (Fig. WW).

Although considerable work has been performed in the Central Andes during the last decades, the chronology of the orogeny and related uplift is still debated. For instance, in the Bolivian Orocline, onset of the main orogeny in the Eastern Cordillera has been estimated at ages as contrasted as ~26 Ma (Sempere et al., 1990) and ~40 Ma (Lamb & Davis, 2003); according to fission track analyses, uplift in the Bolivian Orocline seems to have slowly started about 46 Ma (Anders et al., 2002), and exhumation rates in the Eastern Cordillera near La Paz, Bolivia, would have increased at $\sim 25 \pm 5$ Ma (Kennan, 2000) or ~15-10 Ma (Masek et al., 1994). More independent data are clearly needed to resolve current discrepancies, and we believe biological data may help to constrain the Central Andean uplift chronology.

3. Methods

We address the emergence of Andean highlands by selecting the potatoes and their cyst-nematode parasites because they originated in response to uplift and because molecular data, including phylogenetic trees, are available. We therefore analyse biological information concerning plants of the *Solanum* genus (potatoes, tomatoes, eggplant) and cyst-nematode parasites (Heteroderidae: Punctoderinae, with special attention to the *Globodera* genus).

We estimate relevant divergence ages in phylogenetic dendrograms concerning the *Solanum* and *Globodera* genera by using appropriate chronological tie-points and making the assumption that evolutionary rates were approximately constant during the corresponding time intervals (we use phylogenetic trees as molecular clocks because we favor the idea that it is preferable to have rough chronological indications than none; Bromham et al., 1999). Results from molecular clock analyses are compared for mutual consistency and confronted with geological data. In particular, coevolution of the wild potatoes and their cyst-nematode parasites provides a test for checking the accuracy of the respective independent molecular clocks.

4. Andean highland plants: the wild potatoes

4.1. Potatoes and tomatoes

The wild potatoes (*Solanum* section *Petota*) comprise >200 species irregularly distributed from the southwestern USA to southern South America; most species are rare and endemic; 75 % of all species occur above 2300 m and 91 % above 1750 m, with an average elevation at about 2770-2890 m and a maximum altitude near 4900 m; low-elevation occurrences in both hemispheres are from latitudes >20°, where MATs are cooler (Hijmans & Spooner, 2001). Species richness is strongly correlated to highlands between latitudes 20°N and 20°S, the highest numbers of species being found in Peru (93) and Bolivia (39), and the highest number of species in a 50 km x 50 km grid cell (22) occurring in southern Peru (Hijmans & Spooner, 2001). The highest species richness is observed along the eastern Andes between 12°S and 26°S (southern Peru, central Bolivia, northwestern Argentina) and along all highlands between 12°S and 6°S (central Peru), and wild potatoes are thus thought to have originated in the Central Andes (Hijmans & Spooner, 2001).

The wild tomatoes (*Solanum* section *Lycopersicum*) comprise 8 species native to northwestern South America, and 1 endemic to the Galapagos Islands and most probably resulting from dispersal across seawater from the former region. Apart from the more widespread *S. lycopersicum*, the continental species grow along the western Central Andes, from central Ecuador through Peru to northern Chile, and from sea level up to ~3300 m (Peralta & Spooner, 2001). Wild tomatoes thus probably originated in the western lowlands of the Central Andes, while wild potatoes originated in the Central Andean highlands.

Potatoes and tomatoes belong to the same subgenus *Potatoe* and form indeed closely related sister groups (Olmstead & Palmer, 1997; Olmstead et al., 1999). Divergence of the former from the latter was characterised by the development of tuberisation, a complementary reproductive strategy that is likely to have accompanied adaptation of wild potatoes to emerging harsher, cooler conditions. Thus biological datings of the divergence between potatoes and tomatoes should provide a tentative estimate of the early development of Andean uplift.

4.2. Dating the potato-tomato divergence

Although both generic and species level diversity in the family Solanaceae is presently concentrated in the Andes, the family has a classic Gondwanan distribution (Symon, 1991), suggesting it emerged after breakup of Pangea but before long-distance dispersal of the Gondwanan continental blocks, i.e. at some time within the ~185-90 Ma interval (dates after Veevers, 2004). We underline that biogeography and geological timing of continental separations place constraints on evolutionary history that apparently require older dates than currently considered for divergence of main orders of phanerogams; accordingly, it has been suggested that diversification of angiosperms occurred much earlier than their first, Early Cretaceous, fossil record (e.g., McLoughlin, 2001; Morley, 2003). The Gondwanan distribution of Solanaceae thus suggests that the ~90 Ma age estimated for the divergence of the order Solanales, as illustrated by Davies et al. (2004), is only a minimum age.

Solanum, with over 1000 species, is one of the largest angiosperm genera, and is dominantly represented in South America (Olmstead et al., 1999). Some species of *Solanum* however occur in the Old World. In particular, *S. melongena* (the eggplant), a native of Africa or India related to African species (Doganlar et al., 2002), belongs to the monophyletic subgenus *Leptostemonum*, that has wild representatives in Gondwanan continents (South America, Africa, India, Australia) and whose African and Australian members derive from New World ancestors (Olmstead and Palmer, 1997). The African *Leptostemonum* species form a monophyletic clade (Olmstead and Palmer, 1997) that must have diverged from South American *Leptostemonum* populations at a time when plant interchanges were still possible between Africa and South America. Considering the estimated young age of emergence of the order Solanales (90 Ma; Davies et al., 2004), the admitted time of final separation between Africa and South America (also 90 Ma; Pitman et al., 1993; Veevers, 2004), the probability that the *Leptostemonum* subgenus diverged some time before this separation, and the possibility of plant dispersal across seawater over moderate distances, we propose that this divergence occurred at 100 ± 20 Ma, i.e. at some time within the 120-80 Ma interval.

Using this broad time range as a tie-point, the age of the potato-tomato divergence can be estimated by comparing evolutionary chromosomal structural changes between *S. tuberosum* (the potato), *S. lycopersicum* (the tomato) and *S. melongena* (the eggplant). The tomato and potato genomes differ by a total of 5 chromosomal rearrangements (5 inversions and 0 translocation; Tanksley et al., 1992) whereas the tomato and eggplant genomes differ by 28 rearrangements (23 inversions and 5 translocations; Doganlar et al. 2002), and the potato and eggplant genomes by 24 rearrangements (19 inversions and 5 translocations; Doganlar et al. 2002).

Taking into account the numbers of chromosomal inversions only, the divergence age of the tomato and potato lineages is thus younger than that of the tomato and eggplant lineages approximately by a factor $5/23$, and than that of the potato and eggplant lineages approximately by a factor $5/19$. In this case, estimates for the potato-tomato divergence are respectively the 26.1-17.4 Ma and 31.6-21.1 Ma intervals. The common intersection of these two intervals is 26.1-21.1 Ma (interval I).

Taking into account the total numbers of chromosomal rearrangements, the divergence age of the tomato and potato lineages is younger than that of the tomato and eggplant lineages approximately by a factor $5/28$, and than that of the potato and eggplant lineages approximately by a factor $5/24$ (Table 1). In this case, estimates for the potato-tomato divergence are respectively the 21.4-14.3 Ma and 25.0-16.7 Ma intervals. The common intersection of these two intervals is 21.4-16.7 Ma

(interval I+T).

The common intersection of these four intervals is 21.4-21.1 Ma (interval R1), i.e. 21.25 ± 0.15 Ma. Because larger uncertainties are likely, and given the nucleotide information below, we expand this narrow interval to 22.5-20.0 Ma (interval R2), i.e. 21.25 ± 1.25 Ma.

The age of the potato-tomato divergence can also be estimated by using rough assessments of the amount of nucleotide changes, which suggest that the tomato and eggplant are diverged 2.5 to 3.5 times more than the tomato and potato (Doganlar et al. 2002). This leads to a rougher age estimate, namely the 44-20 Ma interval (interval N). The younger part of this interval N based on assessment of nucleotide changes however includes both the interval R1 calculated on the basis of chromosomal rearrangements and the expanded interval R2. These calculations thus consistently suggest that the potato and tomato lineages diverged in the Early Miocene, tentatively within the 22.5-20.0 Ma interval, which is compatible with geologic data (see below).

5. Andean highland plant parasites: the potato cyst-nematodes

5.1. The highland nematodes *Globodera pallida* and *G. rostochiensis*

Coevolution of hosts and parasites is a well known phenomenon, and plant nematodes make no exception (Sturhan, 2002; Subbotin et al., 2004). The cyst-nematode parasites of wild potatoes coevolved with their hosts and thus originated in the Andes (Jones, 1951; Willi et al., 1952; Franco, 1977; Stone, 1985). The two known species, *Globodera pallida* and *G. rostochiensis* (Heteroderidae: Punctoderinae), require cool to cold conditions because of their initial adaptation to highlands (Franco, 1977; Canto Saenz & Scurrah, 1977; Picard, 2005). Adaptation of both species to cool climatic conditions is demonstrated by their unfortunately successful introduction by humans in low-elevation cool-temperate climates worldwide (Franco, 1977).

However, *G. pallida* is better adapted to cold MATs than *G. rostochiensis*, and the wild potato species most resistant to *G. pallida* are also the most resistant to frost, suggesting that speciation of *G. rostochiensis* occurred on the eastern, warmer side of the paleo-Andes, and that speciation of *G. pallida* occurred in a colder environment (Franco, 1977). Although they are both found around Lake Titicaca, the two species display almost distinct distributions as *G. rostochiensis* is only known south of Lake Titicaca whereas *G. pallida* is mostly known north of it. In Peru, Martin et al. (1963) observed infestations by *G. pallida* mostly between 2000 and 4000 m, with the heaviest infestations between 2900 and 3800 m, whereas Picard (2005) observed that *G. pallida* principally occupies altitudes comprised between 2500 and 4000 m. Although it is apparently adapted to somewhat warmer MATs, *G. rostochiensis* also require cool conditions **but its altitudinal range is not securely known**.

Phylogenetic trees show that (1) *G. pallida* and the poorly known species *G. mexicana* form a monophyletic clade, whereas (2) *G. rostochiensis* and *G. tabacum* form its sister monophyletic clade (Fig. WW; Picard, 2005; Picard & Plantard, 2005). Too little is known about *G. mexicana* to compare its MAT range with its sister taxon *G. pallida*. But, because development and reproduction of *G. tabacum* (subsp. *solanacearum*) is optimum at 27 ± 3 °C (Adams et al., 1982), it is clear that speciation of its sister taxon *G. rostochiensis* was necessarily accompanied by a significant decrease in optimum MAT, hence corroborating that divergence of this potato cyst-nematode coevolved with its hosts while these adapted to emerging cooler, highland conditions. Hence dating the divergence of *G. rostochiensis* and *G. tabacum*, and the speciation of *G. pallida*, should provide two other estimates of the time at which the Andes reached elevations sufficient to produce speciations of cold-adapted biota.

Furthermore, in contrast with *G. tabacum* which parasites a wider range of Solanaceae (including, for the latter, the genus *Nicotiana*, i.e. the tobaccos), *G. rostochiensis*, as *G. pallida*, preferentially parasites potatoes (although these two species retain the ability to parasite other *Solanum* species under forced experimental conditions), suggesting that *G. rostochiensis* is specialized when compared

to *G. tabacum*, from which it diverged. The same may be true for *G. pallida* in relation with *G. mexicana*, but lack of data concerning the latter precludes any secure interpretation.

5.2. Phylogeography of *Globodera pallida*

Evidence for 5 biogeographically structured lineages of *G. pallida* (Fig. WW; Picard, 2005; Picard & Plantard, 2005) indicates a significant evolutionary history of reproductive isolation within this species. This developed most likely in coevolution with wild potatoes, each *G. pallida* lineage independently having infected cultivated potatoes in its respective area only during the last millenia. When rooted with its closest *Globodera* relatives, the *G. pallida* dendrogram exhibits a clear south-to-north phylogeographic pattern, with the most basal clade grouping the southernmost populations (Lake Titicaca area) and the most terminal clade grouping populations of northern Peru. Characteristically, the more derived is a clade in a dendrogram, the more northern are its representatives. The tree topologies obtained by using the mitochondrial (cytb) and nuclear (microsatellite) markers are concordant in this respect (Fig. WW).

The same south-to-north pattern is also observed for allelic richness, which is similar between fields in each clade defined by the cytb tree (Picard, 2005). A consistent correlation is evident between mean allelic richness and latitude (Fig. WW). The southern allelic richness is nearly twice the northern one. The same pattern is also observed for the genetic divergence between the cytb haplotypes of each clade. Total pairwise sequence divergences among *G. pallida*, including *G. mexicana* (as outgroup), range from 0 to 15 % (Fig. WW). The variation in percentage divergences between pairwise individuals is much larger for the southern clade (0-11 %) and decreases dramatically northwards (south central Peru: 0-5 %; north central Peru: 0-1%; northern Peru: 0-0.5 %). When mitochondrial or nuclear markers are considered, the branches between haplotypes or fields are longer in the south and shorter in the north. *G. pallida* populations in Peru are thus also characterised by clear south-to-north decreases in allelic richness and pairwise sequence divergence.

5.3. Dating the divergence of highland cyst-nematodes

Although nematologic biogeography is hampered by incomplete knowledge of the distribution of known species and by incomplete identification of taxa parasiting non-cultivated plants (Ferris, 1979), available data permit to work out a coarse phylogeography of the genus *Globodera*. First, no *Globodera* species is known to be native to any Gondwanan continent except South America. Second, molecular studies (Subbotin et al., 2001; Tanha Maafi et al., 2003; Picard, 2005) show that the genera *Punctodera* and *Globodera* form a monophyletic clade which splits into a *Punctodera* clade, an apparently Laurasian genus parasiting Poaceae (Ferris, 1979), and a *Globodera* clade which comprises a Eurasian subclade (with species such as *G. achilleae* and *G. artemisiae*, parasiting Asteraceae; Ferris, 1979) and a South American subclade (grouping species parasiting Solanaceae). This variety of hosts confirms that related cyst-nematode groups may parasite distantly related or unrelated plant taxa (Sturhan, 2002; Subbotin et al., 2004), suggesting that speciation among cyst-nematodes may also have occurred by opportunistic parasiting of new host groups.

One explanation of these phylogeographic relationships would be that the *Punctodera-Globodera* clade originated in Laurasia (as proposed by Ferris, 1979) and that a form ancestral to the South American *Globodera* species spread from North America to South America during a period when both continents were connected, and after South America had become isolated from Africa (~90 Ma; Pitman et al., 1993; McLoughlin, 2001; Veevers, 2004). Another explanation would be that the *Globodera* clade is of South American origin and that a population ancestor to the Eurasian species dispersed to North America (and later to Eurasia) when both continents were connected. In both hypotheses divergence of the two *Globodera* subclades is explained by vicariance following the breakup of a temporary connection between North and South America, after separation of the latter from Africa. This connection was necessarily comprised in the ~80~55 Ma interval during which substantial biotic interchanges are known to have occurred between North and South America (Gayet et al., 1992; Marshall and Sempere, 1993; Marshall et al., 1997). Vicariance was

imposed by subsequent isolation of South America from North America (until the Pliocene emergence of the Panama isthmus; Stehli & Webb, 1985), and from Antarctica starting ~35 Ma (McLoughlin, 2001).

We thus propose that the divergence of the South American and Laurasian *Globodera* sub-clades occurred between 80 and 55 Ma, and we use this age range to calibrate a molecular clock for the former. We find that the *G. mexicana* - *G. pallida* and *G. tabacum* - *G. rostochiensis* clades diverged at some time within the 29.0-19.9 Ma interval; that *G. rostochiensis* diverged from *G. tabacum* in the 19.1-13.1 Ma interval; and that *G. pallida* diverged from *G. mexicana* in the ww-ww Ma interval. Within the *G. pallida* species, the “Amantani” and “CUSCO-Huancabamba” clades diverged within the 16.0-11.0 Ma interval, and finally the “CUSCO” and “Huancabamba” sub-clades diverged within the 8.9-6.1 Ma interval.

Other divergence age estimates can be obtained by using another chronological tie-point, namely by assuming that the divergence of Punctoderinae and Heteroderinae occurred before the breakup of Pangea (Ferris, 1979), thus before 185 Ma (Veevers, 2004). In this hypothesis, the largest sequence divergences among Heteroderidae (14.7 %; Subbotin et al., 2001) corresponds to this >185 Ma divergence. Applying this calibration date to our ITS1-5.8S-ITS2 sequences, the divergence observed among in the *G. pallida* clades corresponds to between clades I and IV (sequence divergence between AmantaniXX and HuancabambaXX = 1.9%), 19 My between clades I and II (AmantaniXX / CuscoXX = 1.5%) and 9 My between clades II and IV (CuscoXX / HuancabambaXX = 0.8%). [autre phrasé possible :] speciation of *G. pallida* occurred before 23 Ma, the “Amantani” and “CUSCO-Huancabamba” clades diverged before 19 Ma, and the “CUSCO” and “Huancabamba” sub-clades diverged before 9 Ma.

6. Discussion

6.1. *Globodera pallida* as a paleoaltitudinal marker

Current observations show that *G. pallida* and most of its potato hosts thrive above 2000-2500 m in the Andes (Martin et al., 1963; Hijmans & Spooner, 2001; Picard, 2005). Because abrupt jumps in altitudinal range are generally associated to speciation induced by uplift (e.g., Willmott et al., 2001), we thus consider hereafter the 2000-2500 m elevation range as the critical altitude range for colonisation of an Andean area by *G. pallida*.

6.2. Phylogeographic evidence for south-to-north propagation of Andean uplift

The marked south-to-north phylogenetic pattern evidenced above for *G. pallida* indicates that dispersion of its populations developed northwards from an ancestral stock in the Altiplano. Colonisation is likely to have propagated northwards as highlands were being uplifted above 2000-2500 m. Such a phenomenon clearly points to a northward propagation of Andean uplift in Peru.

The wild potatoes (*Solanum* section *Petota*) being the natural hosts of *G. pallida*, a similar south-to-north evolutionary pattern is obviously expected. However, the situation for the host is much less clear than for the parasite, as current taxonomic classifications of wild potatoes are being seriously challenged by molecular studies (e.g., Castillo & Spooner, 1997). Some data may however be mentioned. On the basis of cpDNA restriction analyses, wild potatoes of the series *Conicibaccata* do exhibit a south-to-north phylogenetic pattern from the Central Andes to Mexico, with all Peruvian and Bolivian taxa forming the most basal and longest branches (Castillo & Spooner, 1997). Furthermore, all 20 species from Peru and Bolivia are diploids (with only 3 noteworthy exceptions: 1 tetraploid from the Peru-Bolivia border area, 1 tetraploid from central Peru, and 1 hexaploid from northern Peru) whereas all 11 species from Ecuador to Mexico are tetraploids or hexaploids (Castillo & Spooner, 1997): because among plants polyploids derive from diploids, the Peruvian and Bolivian *Conicibaccata* species again appear as basal, and data concerning polyploidy in this series are compatible with the idea that diversification occurred from Bolivia northwards.

Furthermore, a cladistic analysis of the external morphology of the Andean highland lizard genus *Proctoporus* concluded that speciation within this genus has occurred from south to north along the Andes, from Bolivia to Venezuela (Doan, 2003).

These three south-to-north phylogenetic patterns of highland biota are clearly consistent. Applied to Peru, they support that altitude was acquired from south to north, i.e. that Andean uplift propagated northwards starting from the Bolivian Orocline region.

6.3. Mutual consistency of molecular clocks

The primary time intervals independently estimated above for the respective divergences of *Solanum* sect. *Petota* (intervals I and I+T) and of *Globodera pallida* and *G. rostochiensis* (intervals ww-ww) are distributed in the Early and Middle Miocene, agreeing fairly and supporting the hypothesis of coevolution of the wild potatoes and their *Globodera* parasites. A comparison of our more precise estimate for the divergence of *Solanum* sect. *Petota*, namely the 22.5-20.0 Ma interval (interval R2), with the ages obtained for the two highland cyst-nematodes, namely 19.1-13.1 Ma and before 16.0 Ma or 23.0 Ma, suggests that the 23-18 Ma interval is an acceptable estimate for coevolutionary speciations of wild potatoes and their *Globodera* parasites.

It must be underlined here that these phylochronologic estimates strikingly agree with the geological data that identify the Early Miocene (23.8-16.4 Ma) as a period of major uplift in the Bolivian Orocline region. Data from more northern areas also provide uplift information concerning the Middle Miocene (16.4-11.2 Ma) and Late Miocene (11.2-5.3 Ma).

6.4. Consistency of results with available geological data

Using the assumed critical altitude range specified above, the age estimates presented here indicate that the Andes of southern Peru, i.e. the northern part of the Bolivian Orocline, were above 2000-2500 m at ~23-18 Ma. This result fairly agrees with Sébrier et al.'s (1988) independent conclusion, based on geomorphic observations, that the same region was at least 2000 m-high at ~20-17 Ma. In the Pacific Andean slope of southernmost Peru, regional uplift triggered incision of deep valleys into a thick, 23-18 Ma old, ignimbrite blanket shortly after the end of emplacement of these ignimbrites, thus starting ~18-17 Ma (Flores & Sempere, 2002). Our results also support that the main orogeny started at ~26 Ma in the Eastern Cordillera of western Bolivia (Sempere et al., 1990), and that exhumation rates in the same area increased at $\sim 25 \pm 5$ Ma (Kennan, 2000).

These results stand in apparent conflict with MATs and altitude estimates drawn from the analysis of fossil leaf morphology, according to which a locality of the western Bolivian Altiplano, close to southern Peru and now at 3940 m, was only at 1160 ± 600 m at 10.7 Ma (Gregory-Wodzicki et al., 1998; Gregory-Wodzicki, 2000, 2002). It has been shown, however, that determination of paleoaltitudes on the basis of leaf morphology analysis commonly overestimates MATs and thus underestimates elevations (Kowalski, 2002), and we suggest our results may be viewed as an independent confirmation of the potential bias attached to this method.

Our results estimate that the region located southwest of Cusco was uplifted above 2000-2500 m in the Middle to Late Miocene. In southern Andean Peru, apatite fission-track ages indicate that the Apurímac valley southwest of Cusco underwent exhumation in the Middle and Late Miocene (van Heiningen et al., 2004).

Because vertical-axis tectonic rotations evidenced by paleomagnetism reflect mountain building (Rousse et al., 2003), timing of rotations provide indirect information about uplift. It is therefore interesting that the Ayacucho area of south-central Peru (13.5°-13°S) underwent $11 \pm 5^\circ$ of counterclockwise rotation between 9 and 7 Ma (Rousse et al., 2002). Our results indicate that the Ayacucho region was uplifted above 2000-2500 m slightly before 9-6 Ma.

Our results estimate that central Peru was uplifted above 2000-2500 m at about 9-6 Ma. The main geological feature of the Cordillera Blanca area of north-central Peru (10°-9°S) is a Late Miocene granodioritic batholith (Beckinsale et al., 1985; McNulty et al., 1998; Garver et al., 2005). This area underwent $15 \pm 7^\circ$ of counterclockwise rotation during exhumation of the batholith between 8 and

3 Ma (Rousse et al., 2003). Apatite fission track analyses indicate that the mean exhumation rate of the batholith has been high, ~1 km/Myr, since ~8 Ma (Montario, 2001). A major phase of canyon incision was produced between 8 and 5 Ma by coeval uplift (Montario et al., 2005). Regional fission track and U+Th/He ages consistently indicate that uplift was especially vigorous between 6 and 2 Ma (Garver et al., 2003; Perry & Garver, 2004; Garver et al., 2005). In central Peru, available geological data are thus also in agreement with our phylochronologic results.

7. Conclusions

In Peru, altitudes in excess of 2000-2500 m were acquired first in the Bolivian orocline area. Uplift produced a profound modification of surface conditions which led to speciations of cold-adapted highland biota, such as the wild potatoes and their cyst-nematode parasites, and the *Proctoporus* lizards. Uplift progressively propagated northwards along the orogen, rising new areas above the critical altitude range of 2000-2500 m and thus making them available for colonisation by southern highland biota. Accordingly, these biota display phylogenetic patterns that reflect a marked south-to-north phylogeographic structure.

Because it yields ages consistent with other biological and geological chronologic data, the *Globodera pallida* molecular clock can be used to assess the timing of uplift propagation. It indicates that the 2000-2500 m critical elevation range was reached in the Early Miocene (~23-18 Ma) in southern Peru, in the Middle Miocene (~16-11 Ma) in southern central Peru, and in the latest Miocene (~9-6 Ma) in central and northern Peru.

References

- Adams, H. S., Osborne, W. W. & Webber Jr., A. J. Effect of temperature on development and reproduction of *Globodera solanacearum*. *Nematropica* **12**, 305-311 (1982).
- Anders, M. H., Gregory-Wodzicki, K. N. & Spiegelmann, M. A critical evaluation of Late Tertiary accelerated uplift rates for the Eastern Cordillera, central Andes of Bolivia. *The Journal of Geology* **110**, 89-100 (2002).
- Balslev, H. Introduction. In: Balslev, H. (ed.). *Neotropical Montane Forests – Biodiversity and Conservation*. Aalborg Universitet publication **31**, Aarhus University Press, Århus (1993).
- Beckinsale, R. D., Sánchez-Fernández, A. W., Brook, M., Cobbing, E. J., Taylor, W. P. & Moore, N. D. Rb-Sr whole-rock isochron and K-Ar age determinations for the Coastal Batholith of Peru. In: *Magmatism at a Plate Edge*, Pitcher, W. S., Atherton, M. P., Cobbing, E. J. & Beckinsale, R. D. (eds.), 177-202 (1985).
- Bromham, L. D., Phillips, M. J. & Penny, D. Growing up with dinosaurs: Molecular dates and the mammalian radiation. *Trends Ecol. Evol.* **14**, 113-118 (1999).
- Canto Saenz, M. & Mayer de Scurrah, M. Races of the potato cyst-nematode in the Andean region and a new system of classification. *Nematologica* **23**, 340-349 (1977).
- Castillo, R. O. & Spooner, D. M. Phylogenetic relationships of wild potatoes, *Solanum* series *Conicibaccata* (sect. *Petota*). *Systematic Botany* **22**, 45-83 (1997).
- Davies, T. J., Barraclough, T. G., Chase, M. W., Soltis, P. S., Soltis, D. E. & Savolainen, V. Darwin's abominable mystery: Insights from a supertree of the angiosperms. *PNAS* **101**, 1904-1909 (2004).
- Doan, T. M. A south-to-north biogeographic hypothesis for Andean speciation: evidence from the lizard genus *Proctoporus* (Reptilia, Gymnophthalmidae). *Journal of Biogeography* **30**, 361-374 (2003).
- Doganlar, S., Frary, A., Daunay, M.-C., Lester, R. N. & Tanksley, S. D. A comparative genetic linkage map of eggplant (*Solanum melongena*) and its implications for genome evolution in the Solanaceae. *Genetics* **161**, 1697-1711 (2002).
- Ferris, V. R., Goseco, C. G. & Ferris, J. M. Biogeography of free-living soil nematodes from the

- perspective of plate tectonics. *Science* **193**, 508 (1976).
- Ferris, V. R. Cladistic approaches in the study of soil and plant parasitic nematodes. *Amer. Zool.* **19**, 1195–1215 (1979).
- Ferris, V. R. in *Concepts in Nematode Systematics* (eds Stone, A. R., Platt, H. M. & Khalil, L. F.), 141–161 (Special Volume 22, The Systematics Association, Academic Press, London, 1983).
- Flores, A., & Sempere, T. Avances sobre la historia geológica del valle de Tacna. *XI Congreso Peruano de Geología*, Lima, CD-ROM, chapter 1, archive ALEXAN~1.DOC, 10 p. (2002).
- Franco, J. Studies on the taxonomy and biology of potato cyst-nematodes *Globodera* spp. Mulvey and Stone 1976. Ph.D. dissertation, University of London, 325 p. (1977).
- Garver, J. I., Schiffman, C. R. & Perry, S. E. Rapid tectonic exhumation of the Cordillera Blanca, northern Peru. *Geological Society of America Abstracts with Programs* **35**, 6, 429 (2003).
- Garver, J. I., Reiners, P. W., Walker, L. J., Ramage, J. M. & Perry, S. E. Implications for timing of Andean uplift from thermal resetting of radiation-damaged zircon in the Cordillera Huayhuash, northern Peru. *Journal of Geology* **113**, ww-ww (2005).
- Gayet, M., Rage, J. C., Sempere, T. & Gagnier, P.-Y. Modalités des échanges de vertébrés continentaux entre l'Amérique du Nord et l'Amérique du Sud au Crétacé supérieur et au Paléocène. *Bulletin de la Société Géologique de France* **163**, 781-791 (1992).
- Gregory-Wodzicki, K. M. Uplift history of the Central and Northern Andes: A review. *Geological Society of America Bulletin* **112**, 1091–1105 (2000).
- Gregory-Wodzicki, K. M. A late Miocene subtropical-dry flora from the northern Altiplano, Bolivia. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* **180**, 331-348 (2002).
- Gregory-Wodzicki, K. M., McIntosh, W.C. & Velásquez, K. Climatic and tectonic implications of the late Miocene Jakokkota flora, Bolivian Altiplano. *Journal of South American Earth Sciences* **11**, 533-560 (1998).
- Hijmans, R. J. & Spooner, D. M. Geographic distribution of wild potato species. *American Journal of Botany* **88**, 2101–2112 (2001).
- Hijmans, R. J., Jacobs, M., Bamberg, J. B. & Spooner, D. M. Frost tolerance in wild potato species: Assessing the predictivity of taxonomic, geographic, and ecological factors. *Euphytica* **130**, 47–59 (2003).
- Isacks, B. L. Uplift of the central Andean plateau and bending of the Bolivian Orocline. *Journal of Geophysical Research* **93**, 3211-3231 (1988).
- James, D. E. Andean crustal and upper mantle structure. *Journal of Geophysical Research* **76**, 3246-3271 (1971).
- James, D. E. & Sacks, I. S. Cenozoic formation of the Central Andes: A geophysical perspective. In: *Geology and Ore Deposits of the Central Andes*, B. J. Skinner (ed.), Society of Economic Geologists Special Publication **7**, 1-25 (1999).
- Jones 1951 — ref chez Franco 1977
- Kennan, L. Large-scale geomorphology of the Andes: interrelationships of tectonics, magmatism and climate. In: Summerfield, M. A. (ed.), *Geomorphology and Global Tectonics*, Wiley, New York, 165-199 (2000).
- Kono, M., Fukao, Y. & Yamamoto, A. Mountain building in the Central Andes. *Journal of Geophysical Research* **94**, 3891-3905 (1989).
- Kowalski, E. A. Mean annual temperature estimation based on leaf morphology: a test from tropical South America. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* **188**, 141-165 (2002).

- Lamb, S. & Davis, P. Cenozoic climate change as a possible cause for the rise of the Andes. *Nature* **425**, 792-797 (2003).
- Marshall, L. G. & Sempere, T. Evolution of the Neotropical Cenozoic land-mammal fauna in its geochronologic, stratigraphic and tectonic context. In *Biological Relationships between Africa and South America*, P. Goldblatt (ed.), Yale University Press, Newhaven, 329-392 (1993).
- Marshall, L. G., Sempere, T. & Butler, R. F. Chronostratigraphy of the mammal-bearing Paleocene of South America. *Journal of South American Earth Sciences* **10**, 49-70 (1997).
- Martin et al. 1963 altitude G. "rostochiensis" — ref chez Franco 1977
- Masek, J. G., Isacks, B. L., Gubbels, T. L. & Fielding, E. J. Erosion and tectonics at the margins of continental plateaus. *Journal of Geophysical Research* **99**, 13941-13956 (1994).
- McLoughlin, S. The breakup history of Gondwana and its impact on pre-Cenozoic floristic provincialism. *Australian Journal of Botany* **49**, 271-300 (2001).
- McNulty, B. A., Farber, D. L., Wallace, G. S., López, R., Palacios, O. Role of plate kinematics and plate-slip-vector partitioning in continental magmatic arcs: Evidence from the Cordillera Blanca, Peru. *Geology* **26**, 827-830 (1998).
- Montario, M. J. Exhumation of the Cordillera Blanca, Northern Peru, based on apatite fission track analysis. Unpublished thesis, Department of Geology, Union College, Schenectady, New York, 55 p. (2001).
- Montario, M. J., Garver, J. I. & Reiners, P. Timing of canyon incision of the Rio Pativilica in response to uplift of the Andes in northern Peru. *Geological Society of America Abstracts with Programs* **37**, 1, 76, paper 30-1 (2005).
- Morley, R. J. Interplate dispersal paths for megathermal angiosperms. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* **6**, 5-20 (2003).
- Olmstead, R. G. & Palmer, J. D. Implications for the phylogeny, classification, and biogeography of *Solanum* from cpDNA restriction site variation. *Systematic Botany* **22**, 19-29 (1997).
- Olmstead, R. G., Sweere, J. A., Spangler, R. E., Bohs, L. & Palmer, J. D. Phylogeny and provisional classification of the Solanaceae based on chloroplast DNA. In: *Solanaceae IV: Advances in Biology and Utilization*, M. Nee, D. E. Symon, J. P. Jessup, and J. G. Hawkes (eds). Royal Botanic Gardens, Kew: 111-137 (1999).
- Peralta, I. E. & Spooner, D. M. Granule-bound starch synthase (GBSSI) gene phylogeny of wild tomatoes (*Solanum* L. section *Lycopersicon* [Mill.] Wettst. subsection *Lycopersicon*). *American Journal of Botany* **88**, 1888-1902 (2001).
- Perry, S. E. & Garver, J. I. Onset of tectonic exhumation of the Cordillera Blanca, northern Peru based on fission-track and U+Th/He dating of zircon. *Geological Society of America Abstracts with Programs* **36**, 2, 92 (2004).
- Picard, 2005
- Picard & Plantard, 2005
- Pitman III, W. C., Cande, S., LaBrecque, J. & Pindell, J. in *Biological Relationships between Africa and South America* (ed P. Goldblatt), 14-34 (Yale University Press, New Haven, 1993).
- Rousse, S., Gilder, S., Farber, D., McNulty, B. & Torres, V. R. Paleomagnetic evidence for rapid vertical-axis rotation in the Peruvian Cordillera ca. 8 Ma. *Geology* **30**, 75-78 (2002).
- Rousse, S., Stuart Gilder, S., Farber, D., McNulty, B., Patriat, P., Torres, V. & Sempere, T. Paleomagnetic tracking of mountain building in the Peruvian Andes since 10 Ma. *Tectonics* **22**, 1048, doi:10.1029/2003TC001508 (2003).
- Sempere, T., Hérial, G., Oller, J. & Bonhomme, M.G. Late Oligocene-early Miocene major tectonic crisis and related basins in Bolivia. *Geology* **18**, 946-949 (1990).
- Sempere, T., Carlier, G., Soler, P., Fornari, M., Carlotto, V., Jacay, J., Arispe, O., Néraudeau, D., Cárdenas, J., Rosas, S., & Jiménez, N. Late Permian - Middle Jurassic lithospheric thinning in Peru and Bolivia, and its bearing on Andean-age tectonics. *Tectonophysics* **345**, 153-181 (2002).
- Spooner, D. M., Salas-López, A., Huamán, Z. & Hijmans, R. J. Wild potato collecting expedition in southern Peru (departments of Apurímac, Arequipa, Cusco, Moquegua, Puno, Tacna) in 1998:

- taxonomy and new genetic resources. *American Journal of Potato Research* **76**, 103-119 (1999).
- Stehli, F. G. & Webb, S. D. (eds). *The Great American Biotic Interchange*. Plenum Press, New York.
- Stone, A. R. Co-evolution of potato cyst-nematodes and their host: implication for pathotypes and resistance. *EPPO Bulletin* **15**, 131–137 (1985).
- Sturhan, D. Notes on the genus *Cactodera* Krall & Krall 1978 and proposal of *Betulodera betulae* gen. nov., comb. nov. (Nematoda: Heteroderidae). *Nematology* **4**, 875-882 (2002).
- Subbotin, S. A., Halford, P. D., Warry, A. & Perry, R. N. Variations in ribosomal DNA sequences and phylogeny of *Globodera* parasitising solanaceous plants. *Nematology* **2**, 591-604 (2000).
- Subbotin, S. A., Vierstraete, A., De Ley, P., Rowe, J., Waeyenberge, L., Moens, M. & Vanfleteren, J. R. Phylogenetic relationships within the cyst-forming nematodes (Nematoda, Heteroderidae) based on analysis of sequences from the ITS regions of ribosomal DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **21**, 1–16 (2001).
- Subbotin, S. A., Krall, E. L., Riley, I. T., Chizhov, V. N., Staelens, A., De Loose, M. & Moens, M. Evolution of the gall-forming plant parasitic nematodes (Tylenchida: Anguinidae) and their relationships with hosts as inferred from Internal Transcribed Spacer sequences of nuclear ribosomal DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **30**, 226-235 (2004).
- Symon, D. E. Gondwanan elements of the Solanaceae. In: *Solanaceae III: Taxonomy – Chemistry – Evolution*, J. G. Hawkes, R. N. Lester, M. Nee, N. Estrada (eds). Royal Botanic Gardens, Kew: 139–150 (1991).
- Tanha Maafi, Z., Subbotin, S. A. & Moens, M. Molecular identification of cyst-forming nematodes (Heteroderidae) from Iran and a phylogeny based on ITS-rDNA sequences. *Nematology* **5**, 99–111 (2003).
- Tanksley, S. D., Ganai, M. W., Prince, J. P., Vicente, M. C. de, Bonierbale, M. W., et al. High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics* **132**, 1141–1160 (1992).
- Van Heiningen, P., Ruiz, G., Andriessen, P., Zuloaga, A. & Romero, L. Landscape evolution of the Apurímac River drainage basin. *XII Congreso Peruano de Geología*, 249-251 (2004).
- Veevers, J. J. Gondwanaland from 650–500 Ma assembly through 320 Ma merger in Pangea to 185–100 Ma breakup: supercontinental tectonics via stratigraphy and radiometric dating. *Earth-Science Reviews* **68**, 1–132 (2004).
- Willi et al. 1952 nematodes Andes — ref chez Franco 1977
- Willmott, K. R., Hall, J. P. W. & Lamas, G. Systematics of *Hypanartia* (Lepidoptera: Nymphalidae: Nymphalinae), with a test for geographical speciation mechanisms in the Andes. *Systematic Entomology* **26**, 369-399 (2001).

ANNEXE 4

Listes des espèce du genre *Globodera*, du genre *Punctodera* et autre espèces citées dans la thèse

Cactodera estonica (Kirjanova & Krall, 1963) Krall & Krall, 1978

Caenorhabditis briggsae (Dougherty & Nigon, 1949) Dougherty, 1953

C. elegans (Maupas, 1899) Dougherty, 1953

Fusarium oxysporum Schlecht.

Globodera achilleae (Golden & Klindié 1973) Behrens, 1975

G. artemisiae (Eroshenko & Kazachenko, 1972) Behrens, 1975

G. chuabattia (Gupta & Edward, 1973) Wouts, 1984

G. hypolsyi Ogawa, Ohshima & Ichinohe, 1983

G. leptonepia (Cobb & Taylor, 1953) Skarbilovich, 1959

G. mexicana Franco, 1977

G. millefolii (Kirjanova & Krall, 1965) Behrens, 1975

G. mirabilis (Kirjanova, 1971) Mulvey & Stone, 1976

G. pallida (Stone, 1973) Behrens, 1975

G. pseudorotchiensis (Kirjanova, 1963) Mulvey & Stone, 1976

G. rostochiensis (Wollenweber, 1923) Skarbilovich, 1959

G. tabacum solanacearum (Miller & Gray, 1972) Behrens, 1975

G. tabacum tabacum (Lownsbery & Lownsbery, 1954) Skarbilovich, 1959

G. tabacum virginiae (Miller & Gray, 1968) Stone, 1973

G. zelandica Wouts, 1984

Gomphiocephalus hodgsoni Carpenter, 1908

Heterodera avenae Wollenweber, 1924

H. schachtii A. Schmidt, 1871

Lycopersicon esculentum Mill. [(*Solanum* L. subsect. *Lycopersicon*, an autonym of *Solanum* section *Lycopersicon* (Mill.) Wettst.)]

Orchesella cincta Linnaeus, 1758

Phytophthora infestans (Mont.) de Bary

Punctodera chalconensis Stone, Soa Moss & Mulvey, 1976

P. matadorensis Mulvey & Stone, 1976

P. punctata (Thone, 1928) Mulvey & Stone, 1976

Solanum tuberosum Linnaeus, 1753

S. tuberosum L. subsp. *andigenum* (Juz. & Bukasov) Hawkes, 1956

S. tuberosum L. subsp. *tuberosum*

S. ajanhuiri Juz. & Bukasov, 1930

S. acaule Bitter, 1921

S. brevicaule Bitter, 1912

S. chaucha Juz. & Bukasov, 1929

S. chiquidenum Ochoa, 1954

S. curtilobum Juz. & Bukasov, 1929

S. goniocalyx Juzepczuk & Bukasov, 1929

S. juzepczukii Bukasov, 1929

S. leptophyes Bitter, 1913

S. melongena Linnaeus, 1753

S. megistacrolobum Bitter, 1912

S. phureja Juz. & Bukasov, 1929

S. pimpinellifolium Linnaeus, 1755

S. sparsipilum (Bitter) Juz. & Bukasov, 1937

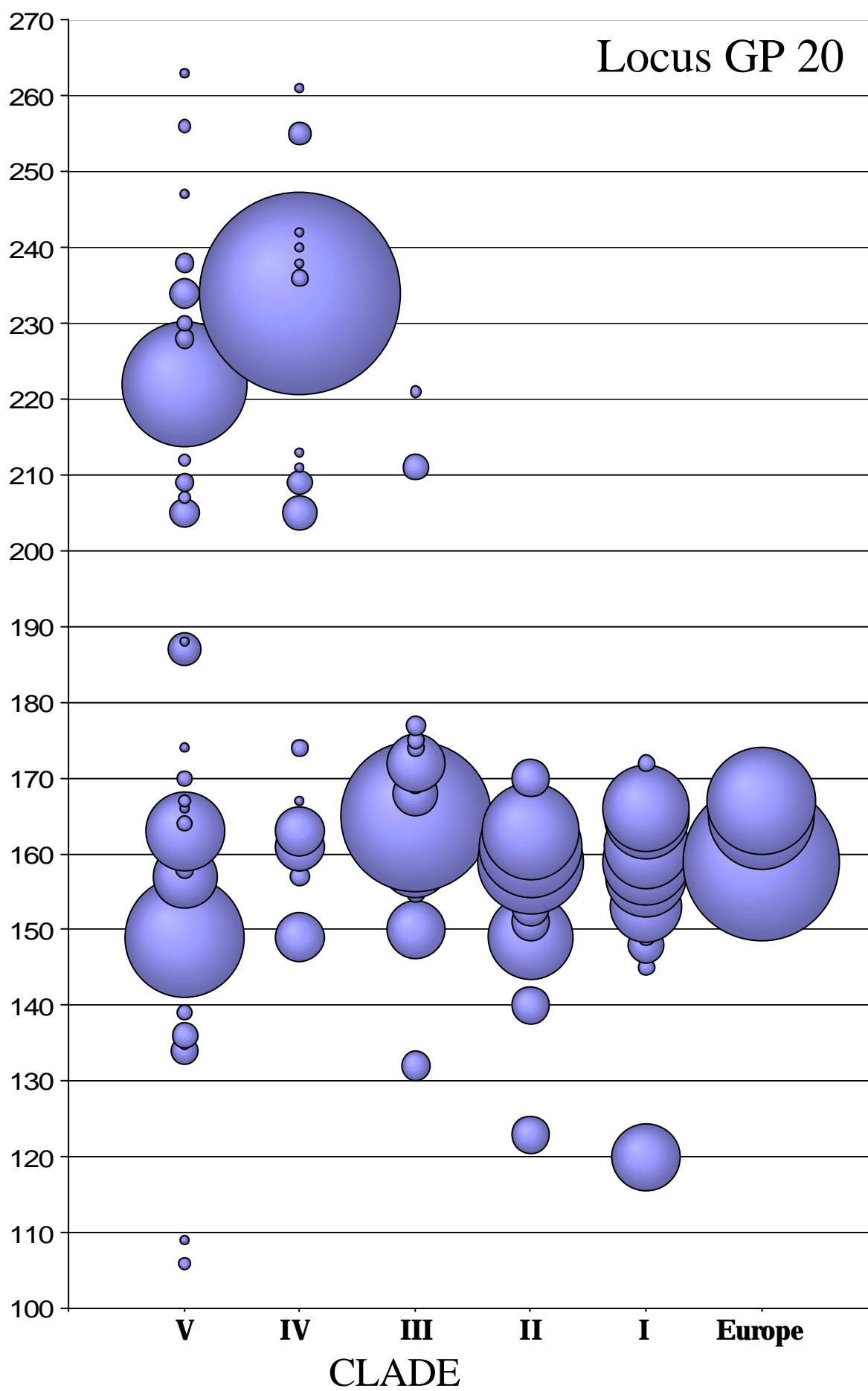
S. stenotomum Juz. & Bukasov, 1929

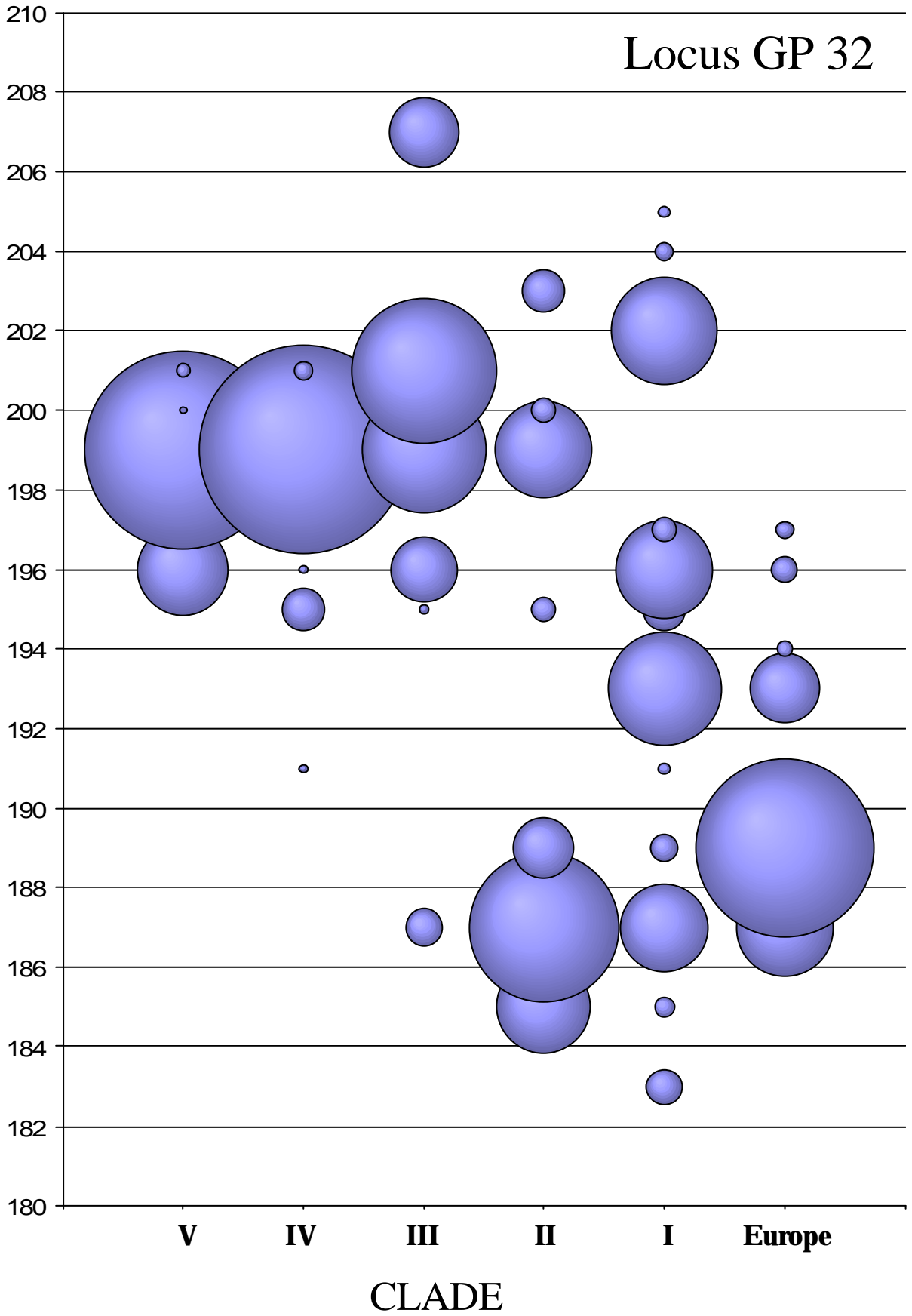
ANNEXE 5

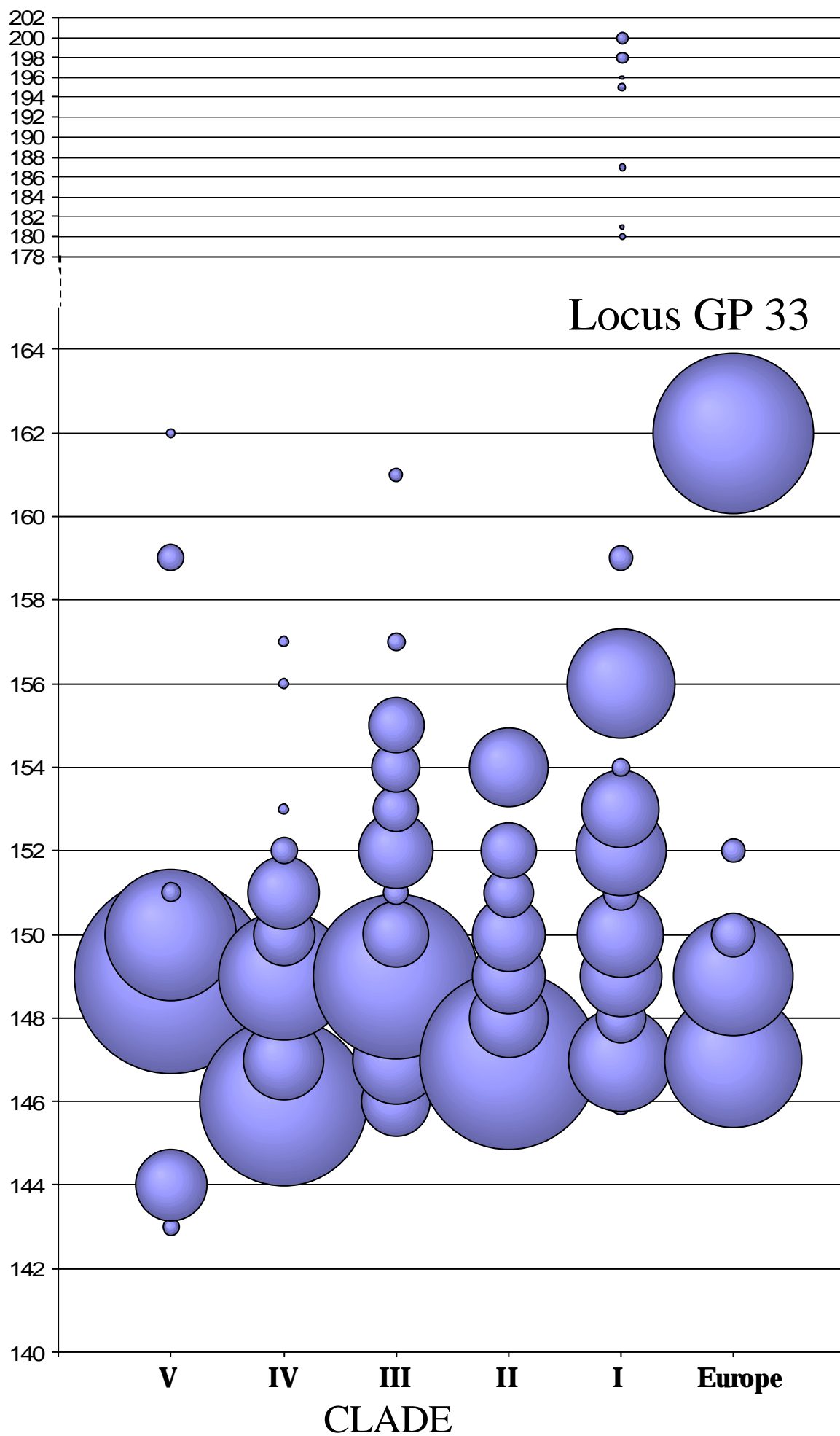
Tailles (axe Y) et fréquences (diamètre des cercles) des allèles microsatellites représentées à l'aide de graphiques bulles

Les individus péruviens analysés sont regroupés par clades définis dans le chapitre IV.
Nombre d'individus par groupe :

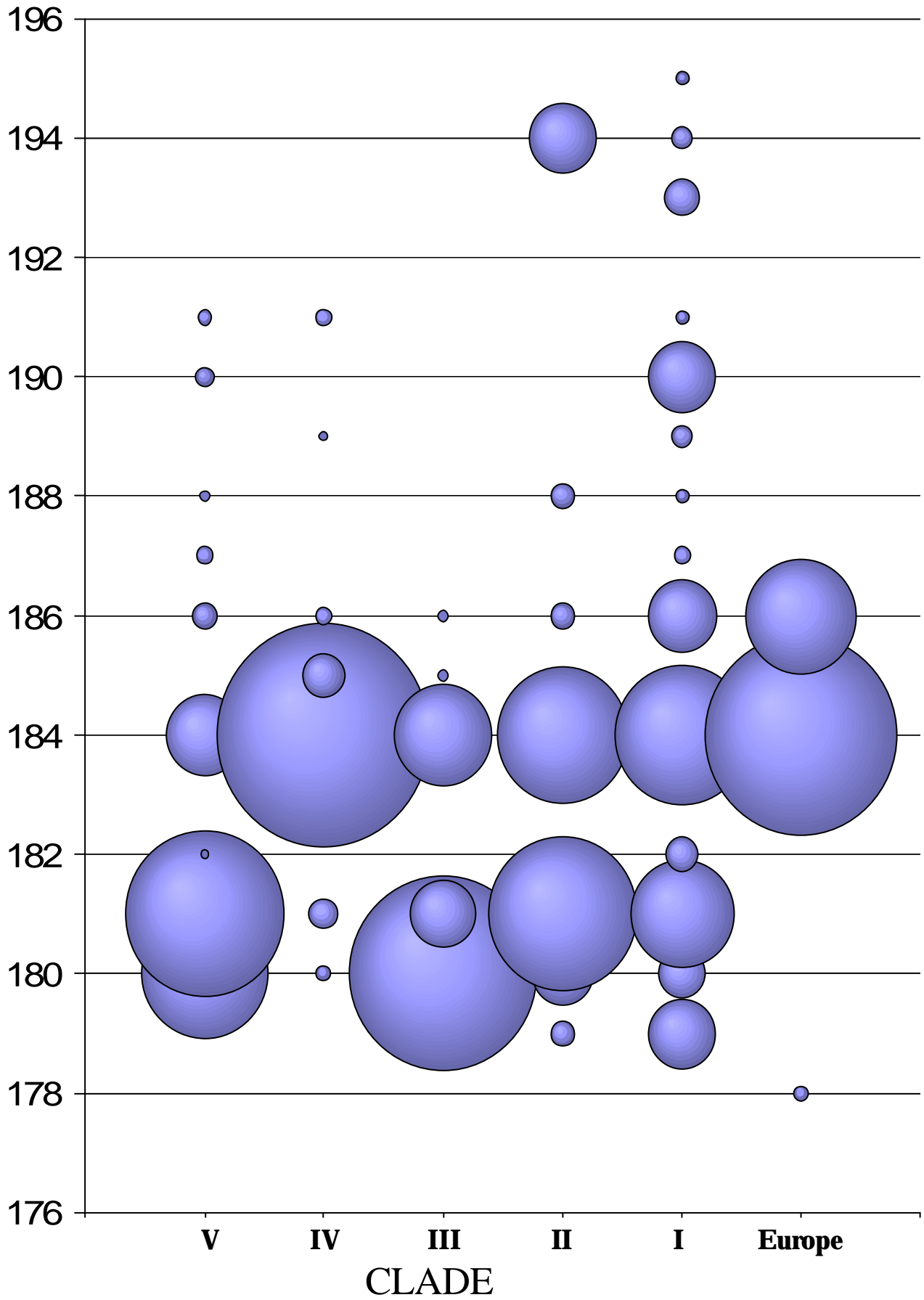
- ✓ Clade V, n=347
- ✓ Clade IV, n=261
- ✓ Clade III, n=193
- ✓ Clade II, n=40
- ✓ Clade I, n=168
- ✓ Europe, n=486



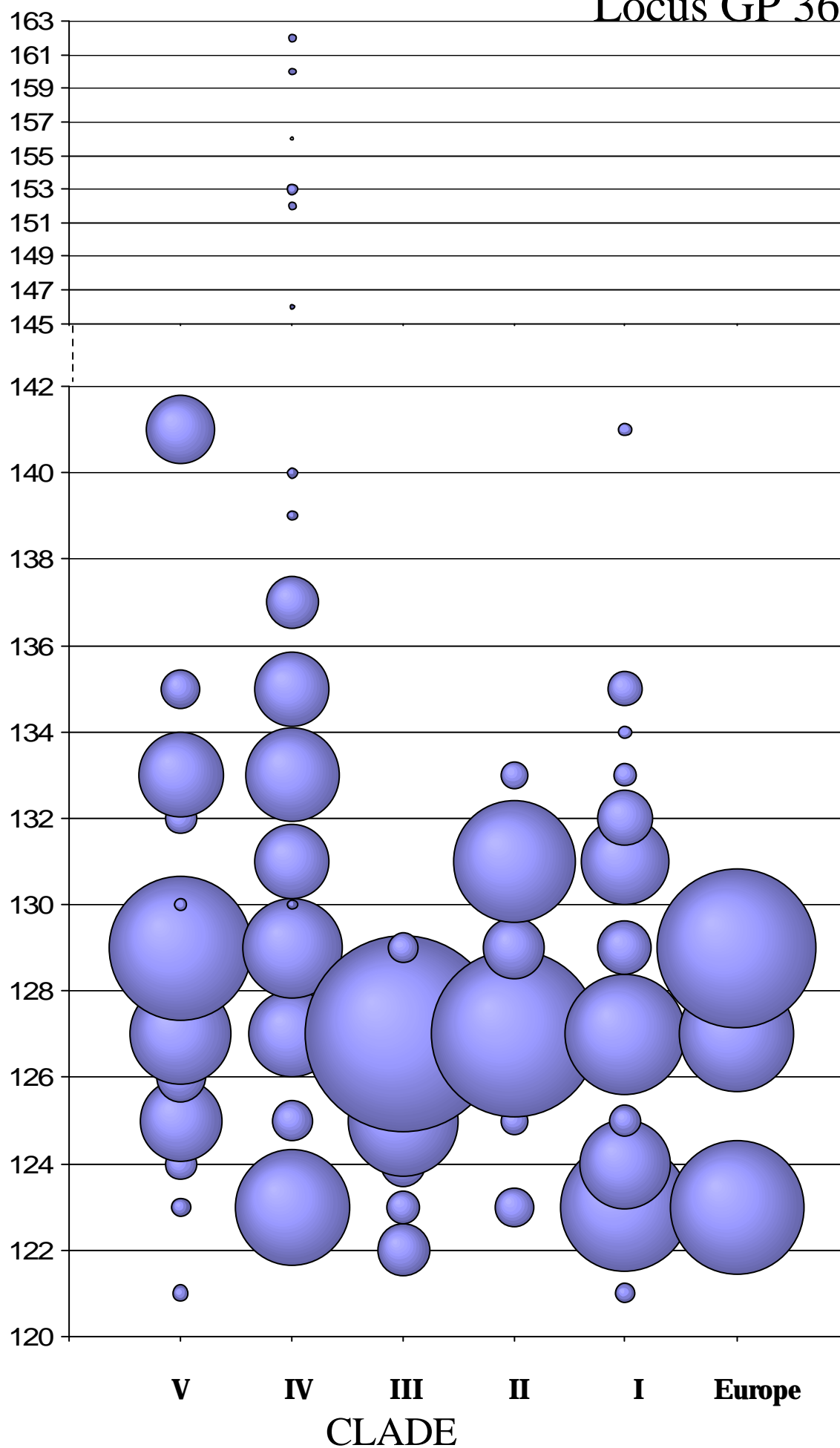


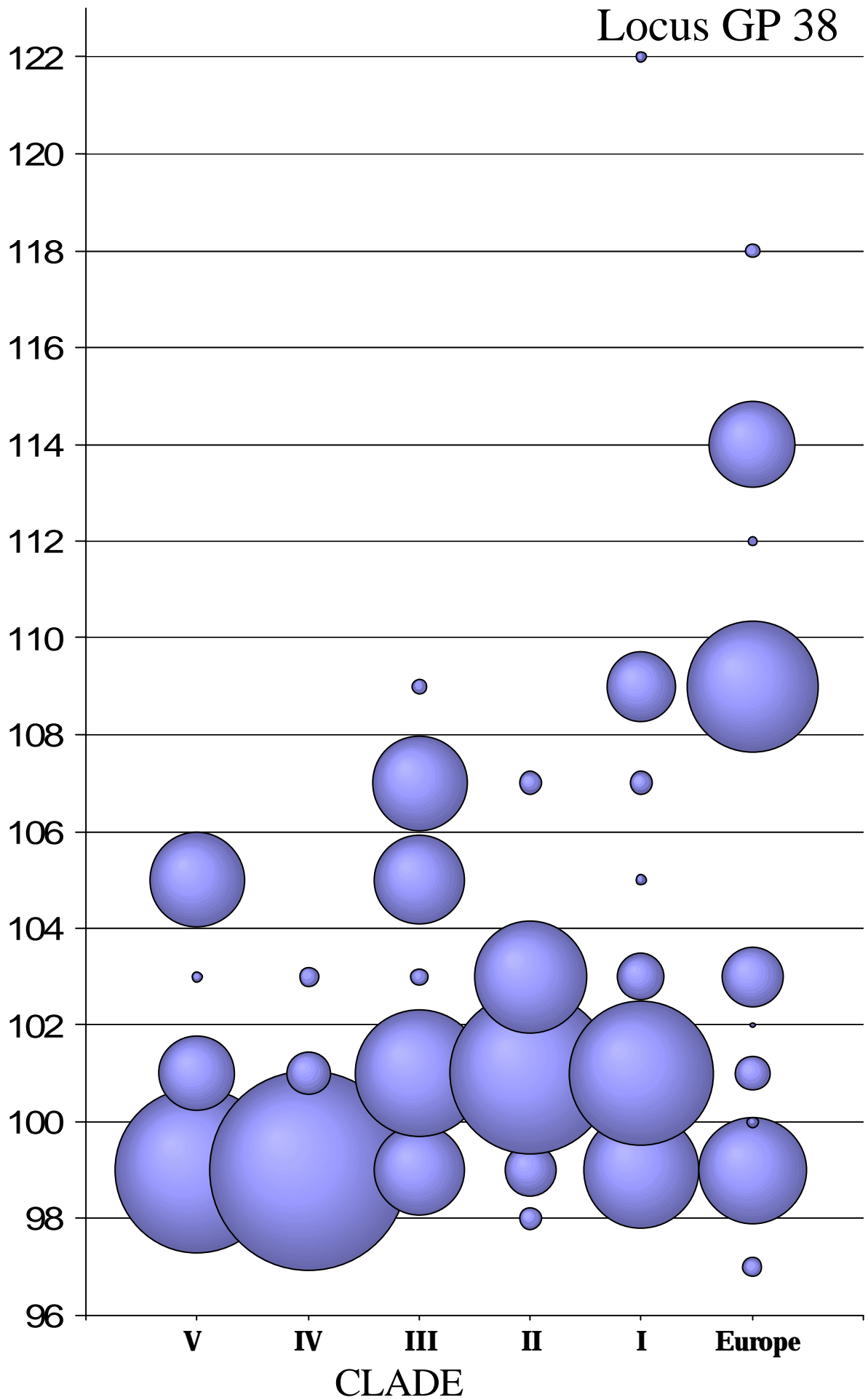


Locus GP 34

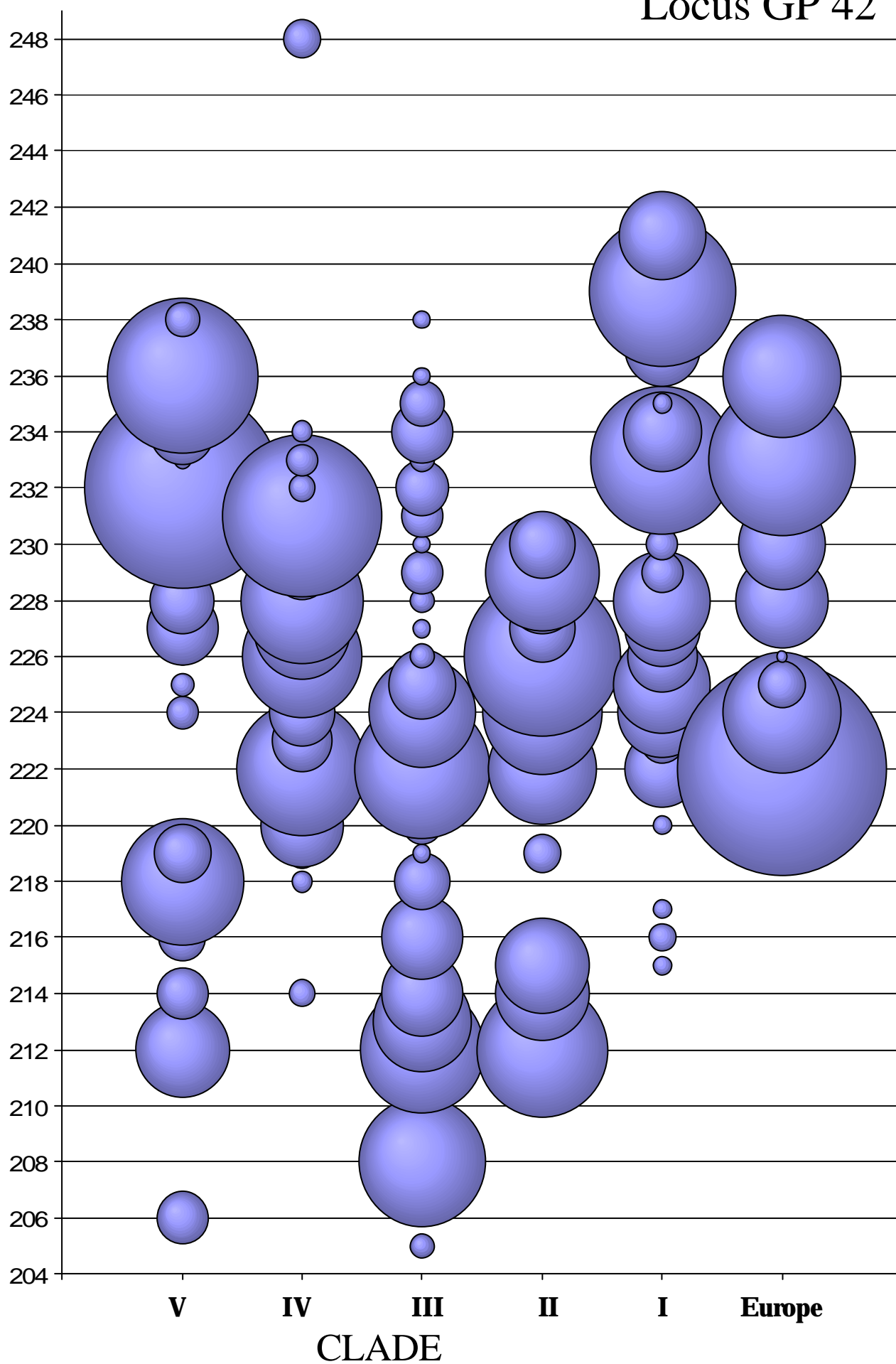


Locus GP 36





Locus GP 42



FREQUENCES ALLELIQUES POUR CHAQUE POPULATION

GP20						
LOCUS	CladeV	CladeIV	CladeIII	CladeII	CladeI	Europe
106	0.0031	0	0	0	0	0
109	0.0016	0	0	0	0	0
120	0	0	0	0	0.0898	0
123	0	0	0	0.0278	0	0
132	0	0	0.0158	0	0	0
134	0.0142	0	0	0	0	0
135	0.0031	0	0	0	0	0
136	0.0126	0	0	0	0	0
139	0.0047	0	0	0	0	0
140	0	0	0	0.0278	0	0
143	0.011	0	0	0	0	0
145	0.0016	0	0	0	0.006	0
146	0.0267	0	0	0	0	0
147	0.0267	0	0	0	0	0
148	0.0031	0	0	0	0.0269	0
149	0.2736	0.0471	0.0132	0.1389	0.006	0
150	0	0	0.0658	0	0	0
151	0	0	0	0.0278	0	0
153	0	0	0	0.0278	0.0988	0
155	0	0	0.0079	0	0.012	0
156	0.0063	0	0.0053	0.0278	0	0
157	0.0786	0.0078	0	0.0417	0.1257	0.0936
158	0.0063	0	0.0053	0	0.003	0.0011
159	0.0031	0.0078	0.0974	0.2083	0.1407	0.4681
160	0	0	0.0184	0.0139	0.0629	0
161	0	0.0451	0.0105	0.1944	0.1377	0
162	0.0031	0	0.0053	0.0556	0	0
163	0.1195	0.0471	0.0789	0.1806	0.006	0
164	0.0047	0	0.1	0	0	0
165	0	0	0.4289	0	0.1377	0.2159
166	0.0016	0	0	0	0.1407	0
167	0.0031	0.002	0	0	0	0.2214
168	0	0	0.0395	0	0	0
169	0	0	0.0053	0	0	0
170	0.0047	0	0	0.0278	0	0
171	0	0	0.0026	0	0	0
172	0	0	0.0658	0	0.006	0
174	0.0016	0.0059	0.0053	0	0	0
175	0	0	0.0053	0	0	0
177	0	0	0.0079	0	0	0
187	0.0204	0	0	0	0	0
188	0.0016	0	0	0	0	0
205	0.0173	0.0235	0	0	0	0
207	0.0031	0	0	0	0	0
208	0	0.002	0	0	0	0
209	0.0063	0.0118	0	0	0	0
211	0	0.002	0.0132	0	0	0
212	0.0031	0	0	0	0	0
213	0	0.002	0	0	0	0
221	0	0	0.0026	0	0	0

222	0.2925	0	0	0	0	0
228	0.0063	0	0	0	0	0
230	0.0047	0	0	0	0	0
234	0.0173	0.7725	0	0	0	0
236	0	0.0059	0	0	0	0
238	0.0063	0.002	0	0	0	0
240	0	0.002	0	0	0	0
242	0	0.002	0	0	0	0
247	0.0016	0	0	0	0	0
255	0	0.0098	0	0	0	0
256	0.0031	0	0	0	0	0
261	0	0.002	0	0	0	0
263	0.0016	0	0	0	0	0

GP32						
LOCUS	CladeV	CladeIV	CladeIII	CladeII	CladeI	Europe
183	0	0	0	0	0.0276	0
185	0	0	0	0.1842	0.0092	0
187	0	0	0.0288	0.4737	0.1656	0.2033
189	0	0	0	0.0789	0.0153	0.6656
191	0	0.0019	0	0	0.0031	0
193	0	0	0	0	0.2761	0.1044
194	0	0	0	0	0	0.0056
195	0.0014	0.0389	0.0026	0.0132	0.0399	0
196	0.1744	0.0019	0.0916	0	0.2025	0.0144
197	0	0.0311	0	0	0.0123	0.0067
198	0.0014	0	0.0026	0	0	0
199	0.817	0.9183	0.3272	0.1974	0	0
200	0.0014	0	0.0026	0.0132	0	0
201	0.0043	0.0078	0.4398	0	0	0
202	0	0	0	0	0.2393	0
203	0	0	0	0.0395	0	0
204	0	0	0	0	0.0061	0
205	0	0	0	0	0.0031	0
207	0	0	0.1047	0	0	0

GP33						
LOCUS	CladeV	CladeIV	CladeIII	CladeII	CladeI	Europe
143	0.0043	0	0	0	0	0
144	0.0824	0	0	0	0	0
145	0	0.0077	0	0	0	0
146	0	0.4537	0.0763	0.0128	0.0091	0.0054
147	0.0029	0.1042	0.1263	0.5128	0.1758	0.303
148	0	0.0019	0.05	0.1026	0.0394	0
149	0.6127	0.2664	0.4421	0.0897	0.1061	0.2359
150	0.2789	0.0618	0.0711	0.0897	0.1212	0.0325
151	0.0058	0.0869	0.0105	0.0385	0.0212	0
152	0	0.0116	0.0921	0.0513	0.1333	0.0097
153	0	0.0019	0.0342	0	0.097	0
154	0	0	0.0395	0.1026	0.0061	0
155	0	0	0.05	0	0.0061	0
156	0	0.0019	0	0	0.1909	0
157	0	0.0019	0.0053	0	0	0
159	0.0116	0	0	0	0.0091	0
161	0	0	0.0026	0	0	0
162	0.0014	0	0	0	0	0.4134

180	0	0	0	0	0.0061	0
181	0	0	0	0	0.003	0
187	0	0	0	0	0.0061	0
195	0	0	0	0	0.0091	0
196	0	0	0	0	0.003	0
198	0	0	0	0	0.0242	0
200	0	0	0	0	0.0212	0
206	0	0	0	0	0.0121	0

GP34						
LOCUS	CladeV	CladeIV	CladeIII	CladeII	CladeI	Europe
178	0	0	0	0	0	0.0046
179	0.0015	0	0	0.0132	0.0912	0
180	0.3235	0.0041	0.7124	0.0789	0.0472	0
181	0.5191	0.0164	0.0881	0.4474	0.2233	0
182	0.0015	0	0	0	0.022	0
184	0.1206	0.9283	0.1943	0.3421	0.3648	0.7432
185	0	0.0369	0.0026	0	0	0
186	0.0132	0.0061	0.0026	0.0132	0.0975	0.2523
187	0.0059	0	0	0	0.0063	0
188	0.0029	0	0	0.0132	0.0031	0
189	0	0.002	0	0	0.0094	0
190	0.0074	0	0	0	0.0943	0
191	0.0044	0.0061	0	0	0.0031	0
193	0	0	0	0	0.0252	0
194	0	0	0	0.0921	0.0094	0
195	0	0	0	0	0.0031	0

GP36						
LOCUS	CladeV	CladeIV	CladeIII	CladeII	CladeI	Europe
119	0	0	0	0.1351	0.0156	0.0185
121	0.0048	0	0	0	0.0063	0
122	0	0	0.0467	0	0	0
123	0.0064	0.2308	0.0192	0.027	0.2937	0.3141
124	0.0176	0	0.0357	0	0.1406	0
125	0.1182	0.0283	0.2143	0.0135	0.0156	0
126	0.0431	0	0.0055	0	0.0063	0
127	0.1789	0.1336	0.6621	0.4865	0.25	0.2293
128	0.0176	0	0	0	0	0
129	0.3594	0.17	0.0165	0.0676	0.05	0.438
130	0.0032	0.002	0	0	0	0
131	0	0.0951	0	0.2568	0.1312	0
132	0.0176	0	0	0	0.0531	0
133	0.1278	0.1498	0	0.0135	0.0094	0
134	0	0	0	0	0.0031	0
135	0.0256	0.0951	0	0	0.0219	0
137	0	0.0466	0	0	0	0
139	0	0.002	0	0	0	0
140	0	0.002	0	0	0	0
141	0.0799	0	0	0	0.0031	0
146	0	0.004	0	0	0	0
152	0	0.0081	0	0	0	0
153	0	0.0162	0	0	0	0
156	0	0.002	0	0	0	0
160	0	0.0061	0	0	0	0
162	0	0.0081	0	0	0	0

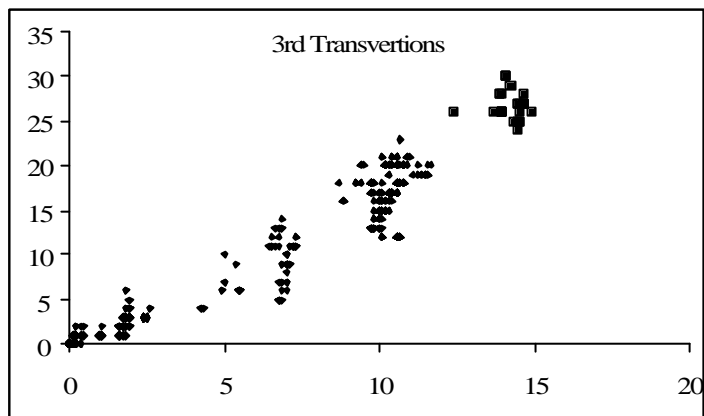
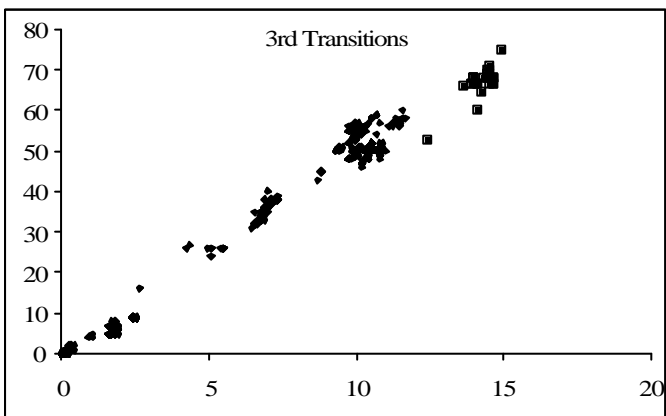
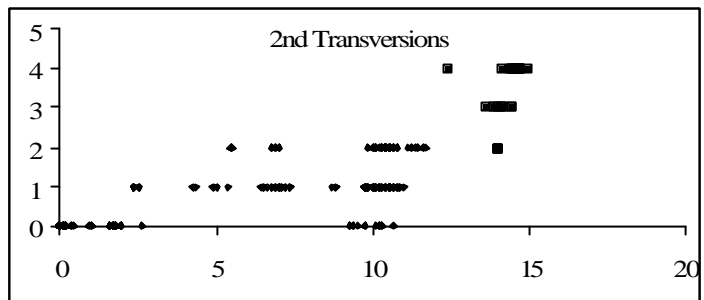
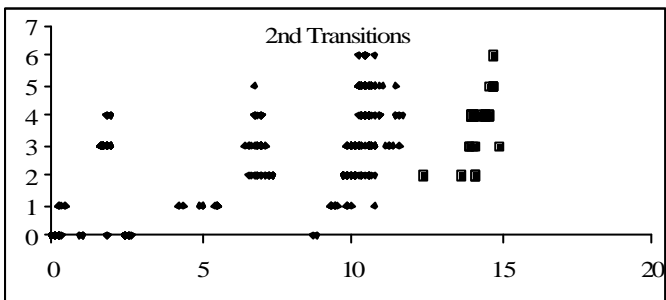
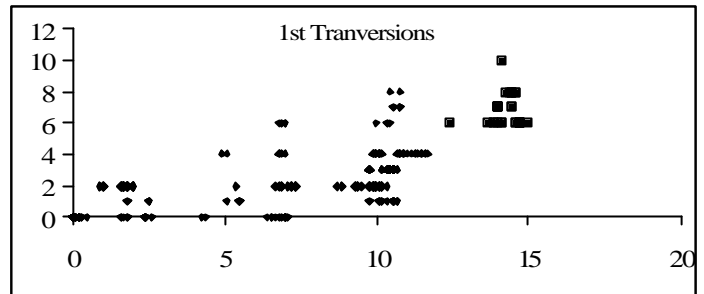
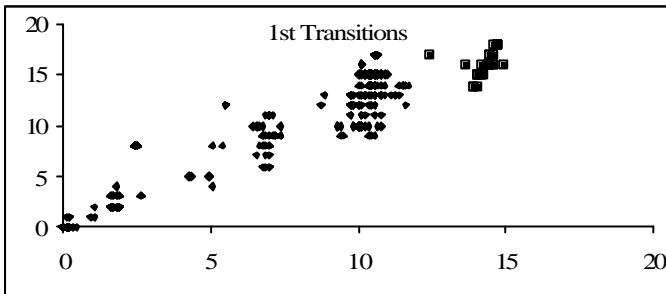
GP38						
LOCUS	CladeV	CladeIV	CladeIII	CladeII	CladeI	Europe
97	0	0	0	0	0	0.0088
98	0	0	0	0.0128	0	0
99	0.6412	0.9459	0.2	0.0641	0.3204	0.2737
100	0	0	0	0	0	0.0033
101	0.1383	0.0444	0.3816	0.6154	0.491	0.0298
102	0	0	0	0	0	0.0011
103	0.0029	0.0097	0.0079	0.2949	0.0539	0.0872
105	0.2176	0	0.1947	0	0.003	0
107	0	0	0.2105	0.0128	0.012	0
109	0	0	0.0053	0	0.1168	0.4106
112	0	0	0	0	0	0.0022
114	0	0	0	0	0	0.1777
118	0	0	0	0	0	0.0055
122	0	0	0	0	0.003	0

GP42						
LOCUS	CladeV	CladeIV	CladeIII	CladeII	CladeI	Europe
205	0	0	0.0052	0	0	0
206	0.0235	0	0	0	0	0
208	0	0	0.1432	0	0	0
212	0.0777	0	0.138	0.1538	0	0
213	0	0	0.0859	0	0	0
214	0.0235	0.0061	0.0599	0.0769	0	0
215	0	0	0.0026	0.0769	0.0031	0
216	0.0205	0	0.0599	0	0.0061	0
217	0	0	0	0	0.0031	0
218	0.1334	0.0041	0.0286	0	0	0
219	0.0279	0.0082	0.0026	0.0128	0	0
220	0	0.0615	0.013	0	0.0031	0
221	0	0.0082	0	0	0	0
222	0	0.1496	0.1641	0.1026	0.0521	0.3829
223	0	0.0328	0.0208	0	0.0184	0
224	0.0088	0.0389	0.099	0.1282	0.0706	0.1224
225	0.0044	0.0348	0.0417	0	0.0828	0.019
226	0.0029	0.127	0.0052	0.2179	0.0429	0.0011
227	0.044	0.0861	0.0026	0.0385	0.0491	0
228	0.0367	0.1352	0.0052	0.0385	0.0828	0.0759
229	0.0015	0.0266	0.0156	0.1154	0.0153	0
230	0	0.0287	0.0026	0.0385	0.0092	0.0686
231	0	0.2213	0.0156	0	0	0
232	0.3416	0.0061	0.026	0	0.0123	0
233	0.0029	0.0082	0.0052	0	0.184	0.193
234	0.0367	0.0041	0.0339	0	0.0552	0
235	0	0	0.0182	0	0.0031	0.0105
236	0.2038	0	0.0026	0	0	0.1266
237	0	0	0	0	0.0491	0
238	0.0103	0	0.0026	0	0	0
239	0	0	0	0	0.1902	0
241	0	0	0	0	0.0675	0
248	0	0.0123	0	0	0	0

ANNEXE 6

Gène cytochrome b (Test de la saturation dans le jeu de donnée, Divergence nucléotidique et Séquences)

Test de la saturation dans le jeu de donnée



Les diamants représentent les comparaisons par paire dans l'ingroup
Les carrés représentent les comparaisons entre l'ingroup et l'outgroup

Axe des Y : nombre de substitutions par partition
Axe des X : pourcentage de la divergence entre séquences

Divergence nucléotidique (nombre de nucléotides divergents entre deux séquences sur un total de 872 pb)

1	FR1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	
2	FR3	15																																	
3	FR5	16	1																																
4	UK3	1	16	17																															
5	UK4	15	0	1	16																														
6	Huaraz	91	93	94	92	93																													
7	Chota	89	91	92	90	91	2																												
8	Huamachuco	89	91	92	90	91	2	2																											
9	Cutervo	90	92	93	91	92	3	3	1																										
10	Huancabamb	89	91	92	90	91	2	2	0	1																									
11	Cajamarca	89	91	92	90	91	2	2	0	1	0																								
12	Contumaza	89	91	92	90	91	4	4	2	3	2	2																							
13	Cajabamba	92	93	94	93	93	17	17	15	16	15	15	17																						
14	Otuzco1	91	92	93	92	92	16	16	14	15	14	14	16	1																					
15	Jauja1	92	93	94	93	93	17	17	15	16	15	15	17	2	1																				
16	Jauja2	91	92	93	92	92	16	16	14	15	14	14	16	1	0	1																			
17	Huancayo	90	91	92	91	91	17	17	15	16	15	15	17	2	1	2	1																		
18	Huancaveli	92	93	94	93	93	17	17	15	16	15	15	17	2	1	2	1	2																	
19	Huasahuasi	92	93	94	93	93	16	16	14	15	14	14	16	9	8	9	8	9	9																
20	Andahuayl1	92	91	92	93	91	61	61	59	60	59	59	59	61	60	61	60	59	61	60															
21	Abancay	90	93	94	91	93	59	58	57	56	57	57	59	60	59	60	59	58	60	57	44														
22	Andahuayl2	85	88	89	86	88	61	62	61	60	61	61	61	64	63	64	63	62	64	61	43	23													
23	Andahuayl4	85	88	89	86	88	61	62	61	60	61	61	61	64	63	64	63	62	64	61	43	23	0												
24	Ayacucho	85	86	87	86	86	89	88	87	88	87	87	89	88	87	88	87	86	88	86	87	76	77	77											
25	Cusco1	89	90	91	90	90	87	86	85	86	85	85	87	88	87	87	87	86	88	86	90	82	81	81	37										
26	Cusco2	89	90	91	90	90	87	86	85	86	85	85	87	88	87	87	87	86	88	86	90	82	81	81	37	0									
27	Arapa	0	15	16	1	15	91	89	89	90	89	89	89	92	91	92	91	90	92	92	92	90	85	85	85	89	89								
28	Sicuani	0	15	16	1	15	91	89	89	90	89	89	89	92	91	92	91	90	92	92	92	90	85	85	85	89	89	0							
29	Colca	16	3	4	17	3	96	94	94	95	94	94	94	95	94	95	94	93	95	95	91	93	88	88	87	89	89	16	16						
30	Juliaca	21	23	24	22	23	93	92	91	90	91	91	91	92	91	92	91	90	92	92	94	92	85	85	88	92	92	21	21	22					
31	Puno2	21	23	24	22	23	93	92	91	90	91	91	91	92	91	92	91	90	92	92	94	92	85	85	88	92	92	21	21	22	0				
32	Amantani1	21	23	24	22	23	93	92	91	90	91	91	91	92	91	92	91	90	92	92	94	92	85	85	88	92	92	21	21	22	0	0			
33	Puno1	44	48	49	45	48	102	101	100	101	100	100	100	99	98	98	98	97	99	101	94	94	86	86	86	88	88	44	44	47	48	48	48		
34	Gmexican	126	127	128	127	127	128	128	128	127	128	128	128	127	126	126	126	125	127	127	123	119	123	123	108	121	121	126	126	124	122	122	122	130	

	123	456	789	111	111	111	122	222	222	223	333	333	333	444	444	444	455	555	555	556	666	666	666	777	777	777	788	888	888	889	999	999	999		
[123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	123	456	789]	
#FR1	TTC	TTA	GGT	AAA	ATT	TTA	ATA	ATT	CAA	ATC	TCT	AGG	GGG	TTT	TTG	TTG	GTT	TTC	TAT	TAC	TCT	AAT	TCT	TCT	TTT	TTT	TCT	TTT	GAT	TCG	GTT	CAG	TAT		
#FR3	..TC	
#FR5	..TC	
#FR7	..TC	
#FR9	..TC	
#SW	..TC	
#SP	..TC	
#NL1	..TC	
#NL2
#UK1	..TC	
#UK2	..TC	
#UK3C	
#UK4	..TC	
#Huaraz	C.T	TCTCA	GCC	C.C	
#Chota	C.T	TCTCA	GCC	C.C	
#Huamachuco	C.T	TCTCA	GCC	C.C	
#Cutervo	C.T	TCTCA	GCC	C.C	
#Huancabamb	C.T	TCTCA	GCC	C.C	
#Cajamarca	C.T	TCTCA	GCC	C.C	
#Contumaza	C.T	TCTCA	GCC	C.C	
#Cajabamba	C.T	TCTCA	G.C	C.C	
#Otuzcol	C.T	TCTCA	G.C	C.C	
#Jauja1	C.T	TCTCA	G.C	C.C	
#Jauja2	C.T	TCTCA	G.C	C.C	
#Huancayo	C.T	TCTCA	G.C	C.C	
#Huancaveli	C.T	TCTCA	G.C	C.C	
#Huasahuasi	C.T	TCTCA	G.C	C.C	
#Andahuayl1	C.T	T.TT	..CA	G.C	C..	..CCCC	
#Abancay	C.T	T.ATCA	G.C	C..CCC	
#Andahuayl2	C.T	T.TCA	G.C	C..CCC	
#Andahuayl4	C.T	T.TCA	G.C	C..CCC	
#Ayacucho	..T	T.	..ATCA	C..	C..	
#Cusco1	C.T	T.	..ACG	C.C	C..CCC	
#Cusco2	C.T	T.	..ACG	C.C	C..CCC	
#Cusco3	C.T	T.	..ACG	C.C	C..CCC	
#Arapa	
#Sicuani	
#Colca	..TC	
#Juliaca	C.T	
#Puno2	C.T	
#Puno3	C.T
#Amantani1	C.T
#Amantani2	C.T
#Amantani3	C.T
#Puno1	..TAGCC	..C	..AC	
#Gmexican	C.TG.TTAGTTTG	..GG	..G	

ANNEXE 7

Abréviation

Bp (Pb in French): Base pair.

cytb, cytB: cytochrome b gene that have been important as sequences for molecular phylogenetic analyses.

cpDNA: Chloroplast DNA.

D_A (Nei *et al.*, 1983), **D_{AS}** (Jin & Chakraborty 1994), **D_C** (Cavalli-Sforza & Edwards, 1967) & **D_m** (Nei, 1973) are genetic distances based on the IAM model.

2-DGE [2DE or 2D gel; two-dimensional (isoelectric focusing/SDS-PAGE) gel electrophoresis]: 2-DGE is used to separate the proteins by isoelectric point and then by size.

DNA (ADN in French): deoxyribonucleic acid. DNA is the double helix molecule of hereditary. It is composed of 4 bases: adenine (A), thymine (T), cytosine (C) and guanine (G). These bases are strung along two opposing strands, like pearls on a string. The A is always bound to T and G is always bound to C by weak hydrogen bonds. The specific order of bases is the DNA sequence.

F_{ST} is the proportion of the total genetic variance contained in a subpopulation relative to the total genetic variance. Values can range from 0 to 1. High F_{ST} implies a considerable degree of differentiation among populations.

F_{IS} (inbreeding coefficient) is the proportion of the variance in the subpopulation contained in an individual. High F_{IS} implies a considerable degree of inbreeding.

GPS: Global Positioning System

IAM (Infinite Alleles Model): a model for the mutation process which assumes an infinite number of possible alleles at a given locus, so that any new allele arising by mutation is different from those previously present in the species, used to derive measures of genetic distance or differentiation. A major alternative is the stepwise mutation model (**SMM**).

IBD: Isolation By Distance.

ITS (Internal Transcribed Spacer): The ITS is a region of DNA in the DNA ribosomal repeat which flanks the 5.8S gene and is included as part of the transcription unit of the 18S-5.8S-25S

gene cluster. ITS1 is immediately upstream of the 5.8S gene and ITS2 is immediately downstream of the 5.8S gene.

J2: juvenile at the second stage.

Ma, My: Millions of years ago.

MAT: Mean Annual Temperature.

ML: maximum-likelihood

MP: maximum-parsimony.

mtDNA: mitochondrial DNA.

NJ: neighbor-joining.

ND3: NADH dehydrogenase subunit 3 gene (mitochondrial DNA).

PCR (Polymerase Chain Reaction): Technique for amplifying nucleic acids in a thermal cycle. Involves use of forward and reverse primer pairs that start off the reaction. End yield is many orders of magnitude more DNA of the target sequence than one started with. The resulting amplified DNA can then be visualized with stains or radioactive labeling, or sized with fluorescent markers in a sequencer.

PPD: Posterior Probability of the Data.

RAPD (Randomly amplified polymorphic DNA): A source of often polymorphic DNA fragments generated in a PCR-like reaction.

RFLP (pronounced 'riflip'): Restriction Fragment Length Polymorphism. A genetic marker technique using variants in the DNA exposed by cutting with restriction enzymes. Variants are visualized by running through electrophoretic gels.

SMM (Stepwise Mutation Model): The model which describes mutation of VNTR alleles by the loss or gain of a single tandem repeat in such a way that alleles mutate possibly towards allelic states already present in the population.

VNTR: Variable Number of Tandem Repeats.

RÉSUMÉ

Originaire des Andes, comme ses plantes hôtes du genre *Solanum*, le nématode à kyste de la pomme de terre (*Globodera pallida*) a été introduit accidentellement en Europe. Une approche mixte de génétique des populations et de phylogéographie a été réalisée sur cette espèce dans son berceau d'origine et secondairement dans une zone d'introduction.

Le géotypage avec 8 loci microsatellites, d'individus issus de 27 populations échantillonnées le long d'un transect de plus de 1600 Km à travers le Pérou, a permis de mettre en évidence : une forte consanguinité, que la quasi-totalité de la variabilité génétique d'une région (bassin de production de pommes de terre) se retrouve à l'échelle de la rhizosphère d'une plante, qu'une région peut être considérée comme une unique population et qu'un patron d'IBD s'observe entre populations.

L'approche phylogéographique (cytochrome B) montre que ces populations ont dispersé du sud du Pérou vers le nord. La forte divergence observée suggère une différenciation entre populations de l'ordre du million d'années. Ce scénario n'est pas compatible avec l'hypothèse d'une colonisation liée à la domestication de la pomme de terre (5000 ans). *G. pallida* aurait colonisé les Andes à partir du lac Titicaca au fur et à mesure que la montagne s'élevait en progressant vers le nord, grâce à la progression conjointe de son hôte sauvage. Puis lors de la domestication de la pomme de terre, il serait passé des *Solanum* sauvages aux cultivés à plusieurs reprises et ceci de façon indépendante.

Les populations européennes ont été identifiées comme originaire du sud du Pérou. La comparaison du patron génétique observé au Pérou et en Europe a permis d'appréhender l'impact des forces évolutives mise en jeu lors de son introduction.

Cette meilleure connaissance de la variabilité génétique des populations de nématodes et de leur origine géographique devraient permettre de mieux raisonner les méthodes de luttes contre ce ravageur majeur des cultures de pommes de terre.

ABSTRACT

“Population genetics and phylogeography of potato cyst nematode (*Globodera pallida*) in Peru”

The potato cyst nematode (*Globodera pallida*) is a plant parasitic nematode that was introduced in Europe but originates from the Andes, as its host (genus *Solanum*). Population genetics and phylogeography of this species were performed in its native area and secondary in an introduction area.

Individuals from 27 Peruvian populations, sampled along a 1600 Km North to South transect, were genotyped using 8 microsatellite loci. The main results were: (i) a high consanguinity, (ii) most of the genetic variability present in an agronomic region could be observed at the scale of a single plant, (iii) an agronomic region could be considered as a single population and (iv) isolation by distance pattern was observed between populations.

Using a phylogeographical approach (cytochrome B), five clades were identified and have revealed a clear expansion of populations from South to North of Peru. The 5 clades diverged far before human settlement (million years ago) indicating that *G. pallida* populations have independently made at least 5 host shifts from wild to cultivated potatoes. The estimated divergence time and the South-to-North pattern observed among the clades of *G. pallida*, a species restricted to high altitude in Peru, match to the Andean uplift that occurred firstly in southern Peru followed by mountain uplift towards the North.

This study is also the first one that identified the origin of the European populations. All the imported populations studied come from the same area in the south part of Peru. Population genetics data obtained in Europe compared to those obtained in the native area allow us to have a grasp of the evolutionary forces that take place during introduction event.

This in-depth knowledge of the genetic variability of *G. pallida* as well as the identification of the origin of the introduced populations have clear implications on the management of the resistance gene against this major pest of the potatoes.